



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

**PRODUZIONE SEMINTENSIVE DI GIOVANILI DI SPECIE MARINE DA ACQUACOLTURA BIOLOGICA
(*Sparus aurata* come caso di studio).**

Acronimo: PROSEGAB

III Relazione intermedia

La presente relazione riporta il testo già trasmesso (II relazione intermedia) integrato con le ulteriori attività svolte e attualmente in corso.

MONITORAGGIO DELLE ATTIVITÀ

Le attività svolte vengono di seguito riportate per ogni *Working Package* (WP). Per favorire la lettura, sotto ogni intestazione dei vari WP è stato riportato il rationale che lo sottintendeva (così come riportato nel programma approvato), in corsivo. Gli obiettivi si riferiscono a quanto riportato nel programma di ricerca approvato.

WP1: Impostazione delle modalità sperimentali

Le attività previste sono di supporto al raggiungimento dell'obiettivo A, in particolare A.1 (ottenimento di uova da riproduttori biologici). A tal fine occorre predisporre le condizioni di allevamento per poter disporre di riproduttori definiti biologici secondo le norme contenute nel Regolamento CE 710/2009 che prevedono un allevamento in regime di produzione biologica per almeno tre mesi prima dell'utilizzo per la riproduzione. Pertanto in questa fase, oltre ad aggiornare la ricerca bibliografica di riferimento, verranno individuati regimi alimentari biologici ottimali per riproduttori e giovanili di orata.

A partire dall'inizio di ottobre sono stati costituiti i due stock di riproduttori di orata atlantica da destinare uno all'alimentazione biologica, l'altro a quella convenzionale, come previsto dal protocollo sperimentare. L'utilizzo del ceppo atlantico di orata è ormai pratica diffusa negli impianti Mediterranei per la sua maggior tolleranza alle basse temperature invernali. Un totale di 34 individui (peso medio 2 kg) è stato selezionato ed immesso in ognuna di due vasche rettangolari (3mx7mx1,5m) identiche di cemento, con una disponibilità di volume di 30 m³, situate all'aperto, ad una densità stimata di 2,7 kg/m³, ben al di sotto rispetto al coefficiente di densità massimo pari a 15 kg/m³ previsto dal regolamento CE 710/09. La *sex ratio* di 1:1 è stata ottenuta identificando i maschi e le femmine con parere esperto, basato sulle differenze di taglia tra i due sessi (l'orata è un ermafrodita proterandrico), eliminando così di stressare gli animali con le biopsie.

Il fotoperiodo è naturale ed il ricambio giornaliero con acqua di mare è maggiore del 100%.

L'andamento della temperatura nelle due vasche ha rispecchiato quello dell'acqua di mare, fino al primo evento di deposizione avvenuto il 16 dicembre. A partire da quella data, l'acqua di mare è stata miscelata con acqua di pozzo salina, con le stesse caratteristiche chimiche e fisiche dell'acqua di mare ma costantemente a 21°C, in quantità tale da mantenere un *range* compreso tra i 17,5° ed i 18°C (*range* di temperatura in cui si verifica la riproduzione naturale in orata).

L'ossigeno disciolto è maggiore del livello di saturazione ed è compreso tra i 6 e gli 8 ppm. Entrambe le vasche di riproduttori OC1 (convenzionale) e OB1 (biologico) hanno deposto in condizione di fotoperiodo naturale e temperatura controllata (compresa tra 17,0 e 18,5 °C) da metà dicembre fino a fine marzo. Il totale delle uova emesse è stato di 60 kg per OC1 e 48 kg per OB1.

WP2: Verifica dell'applicabilità di un protocollo di alimentazione biologica a riproduttori di specie ittiche marine eurialine

In questo WP sono comprese le attività finalizzate al raggiungimento dell'obiettivo A e le attività previste sono quelle definite come A.1 (ottenimento di uova da riproduttori biologici), A.2 (valutazione della qualità delle uova ottenute da riproduttori biologiche e confronto con quelle ottenute da riproduttori convenzionali) e A.3 (valutazione integrata dei dati produttivi, economici e biologici ottenuti ai fini della valutazione degli effetti del regime alimentare dei riproduttori sulla produttività economica e biologica in avannotteria): in pratica si predisporrà un modulo di allevamento sperimentale per riproduttori biologici e la qualità delle uova da essi ottenuta verrà confrontata con quella delle uova ottenute parallelamente da riproduttori alimentati con alimenti tradizionali nello stesso impianto.

La dieta *convenzionale* (OC1) per i riproduttori nel periodo pre-riproduttivo è a base di gamberi ed alaccie congelati e sminuzzati, mentre ai riproduttori destinati al biologico (OB1) è stato somministrato un mangime certificato biologico. Non essendo attualmente presente in commercio un mangime biologico specifico per riproduttori di orata è stato utilizzato un mangime biologico specifico per l'ingrasso dell'orata: Ecolife Pearl 864 6,5 mm prodotto dalla Biomar. Tale mangime con certificazione biologica ISO, GLOBALG.A.P., e QUALITÉ-FRANCE presenta concentrazioni di vitamina E e di acidi grassi che sono state considerate compatibili con le esigenze nutrizionali dei riproduttori. Gli allegati 1 e 2 che riportano rispettivamente i valori nutrizionali del mangime e le certificazioni ottenute, sono stati allegati alla II relazione intermedia. In entrambe le vasche la quantità di alimento somministrato ha variato, in accordo con la temperatura, tra il 3 ed il 5 % della biomassa dei riproduttori.

L'alimentazione con mangime biologico (OB1) e convenzionale (OC1) ha avuto inizio il 17/10/2011, in entrambe le vasche. A partire da quella data è stato quindi ottenuto un parco riproduttori biologico ed uno convenzionale. Entrambi i gruppi di riproduttori hanno iniziato a deporre spontaneamente e regolarmente sin dal 16 dicembre.

I campionamenti sulle uova utilizzate nell'esperimento sono iniziati il 29 febbraio dopo 4 mesi di alimentazione con mangime biologico (OB1). Il pomeriggio di tale giorno sono state raccolte 2,2 kg di uova da OB1 (uova deposte a partire dalle ore 18 del giorno 28 febbraio) e 2,45 kg da OC1 (uova deposte a partire dalle ore 8 del 29 febbraio). In entrambi i casi, il tasso di fecondazione è stato del 100%.

I parametri chimici e fisici principali sono stati rilevati lungo l'intero periodo di incubazione delle uova (e nelle successive fasi di allevamento larvale). La tabella seguente riporta quelli registrati nelle vasche dei riproduttori il giorno del campionamento (29/02/2012):

Parametro	ore 8:30		ore 15:30	
	OC1 (conv)	OB1 (bio)	OC1 (conv)	OB1 (bio)
T °C	17,6	18,0	17,8	18,3
O ₂ (mg/L)	7,8	7,6	7,4	7,6

pH	7,30	7,42	7,38	7,43
cond.(mS/cm)	55,07	54,88	55,36	54,76
TDS* (mg/L)	50,03	49,8	50,11	49,8
Res. Fisso 180° (mg/L)	10,01	10,04	9,98	10,04
NaCl	35,34	35,28	35,15	35,27

* TDS = solidi totali disciolti

WP3: Contributo alla costruzione di un protocollo per avannotterie biologiche di specie ittiche marine eurialine

Scopo di questo WP è chiarire, con un caso di studio, la possibilità di applicazione dei principi del biologico sulla produzione di novellame, capitolo ancora incerto del regolamento, suscettibile di evoluzioni nei prossimi anni (Obiettivo B – attività B.2). In particolare, le larve ottenute dalla schiusa da uova biologiche verranno allevate con la tecnica dei Grandi Volumi. Questo approccio si basa su un sistema controllato sviluppato per ricreare il più possibile le condizioni ambientali presenti nelle nursery naturali.

Appena raccolte, le uova sono state incubate in 4 embrioschioditoi, dal volume di 520 litri ciascuno (1 per ogni condizione di semina: PV bio, PV con, GV bio, GV con). A causa del differente stadio di sviluppo le uova hanno cominciato a schiudere la mattina del giorno 2 marzo mentre il 100% schiusa è stato osservato la notte tra il 2 e 3 marzo. Per esigenze sperimentali il giorno 1 per tutte le larve è stato considerato il 2 marzo. La tabella seguente riporta per ciascun embrioschioditoio il quantitativo di uova incubate, il quantitativo di uova morte (raccolte per spurgo), la percentuale di schiusa stimata (calcolata su base delle uova morte raccolte e il numero di larve stimate alla semina):

schioditoio	origine	uova incubate (g)	uova morte (g)	n. larve stimate alla semina	% di schiusa
S5	conv	1300	160	1.497.000	87,7
S6	conv	900	100	1.086.000	88,9
S7	bio	1300	170	1.185.000	86,9
S8	bio	1150	170	1.398.000	85,2

La tabella seguente riporta i parametri chimici e fisici principali registrati in ogni schioditoio durante la fase di schiusa:

S5 (ore 11:30)	01/03/2012	02/03/2012	03/03/2012	04/03/2012
O ₂ (mg/l)	7,5	7,3	7,2	7,1
O ₂ (%)	96,0	96,0	94,0	94,0
T°	17,9	18,0	18,1	18,1
TDS	49,59	49,95	50,53	50,33
NaCl	35,12	34,63	34,96	34,82
cond.	54,50	54,92	55,53	55,42
res	10,02	10,02	9,92	9,92
Ph	7,82	7,63	7,64	7,73
mv	-41,00	-30,70	-29,80	-35,50

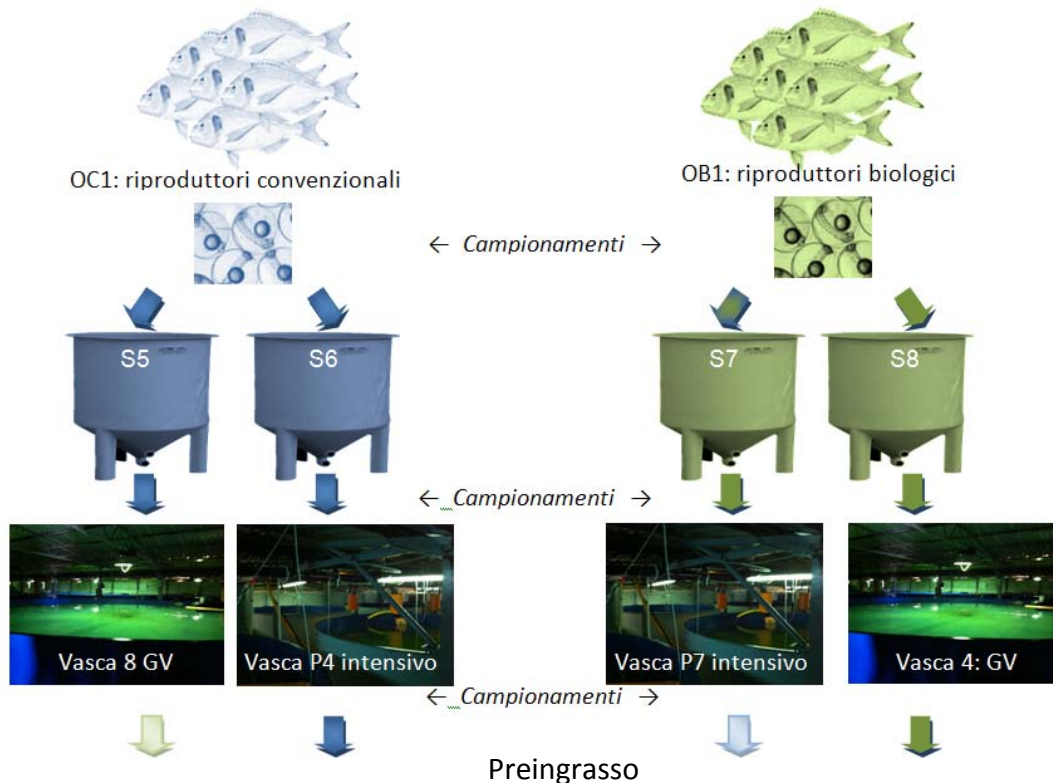
S6 (ore 11:30)	01/03/2012	02/03/2012	03/03/2012	04/03/2012
O ₂ (mg/l)	7,7	7,6	7,6	7,4

O ₂ (%)	98,0	100,0	98,0	98,0
T°	17,9	18,0	17,9	18,0
TDS	50,40	50,46	50,54	50,43
NaCl	35,51	34,92	35,54	34,88
cond.	54,98	55,48	55,59	55,42
res	9,92	9,92	9,98	9,92
Ph	7,82	7,71	7,68	7,78
mv	-42,00	-34,70	-35,50	-38,40

S7 (ore 11:30)	01/03/2012	02/03/2012	03/03/2012	04/03/2012
O ₂ (mg/l)	7,4	7,3	7,4	7,3
O ₂ (%)	95,0	96,0	97,0	97,0
T°	17,8	18,1	18,0	18,1
TDS	50,44	50,51	50,72	50,27
NaCl	35,57	35,03	35,02	34,76
cond.	55,47	55,51	55,33	55,33
res	9,91	9,99	9,96	9,94
Ph	7,81	7,74	7,72	7,77
mv	-41,60	-36,40	-35,30	-39,20

S8 (ore 11:30)	01/03/2012	02/03/2012	03/03/2012	04/03/2012
O ₂ (mg/l)	7,6	7,3	7,3	7,4
O ₂ (%)	97,0	96,0	93,0	96,0
T°	17,8	18,0	18,0	18,1
TDS	50,35	50,58	50,60	50,31
NaCl	35,60	34,91	35,02	34,39
cond.	55,51	55,61	54,64	55,45
Res	9,91	9,89	9,89	9,92
Ph	7,84	7,75	7,73	7,78
Mv	-41,90	-36,90	-35,90	-37,90

Uno schema che riassume l'impianto sperimentale applicato è riportato nella figura che segue:

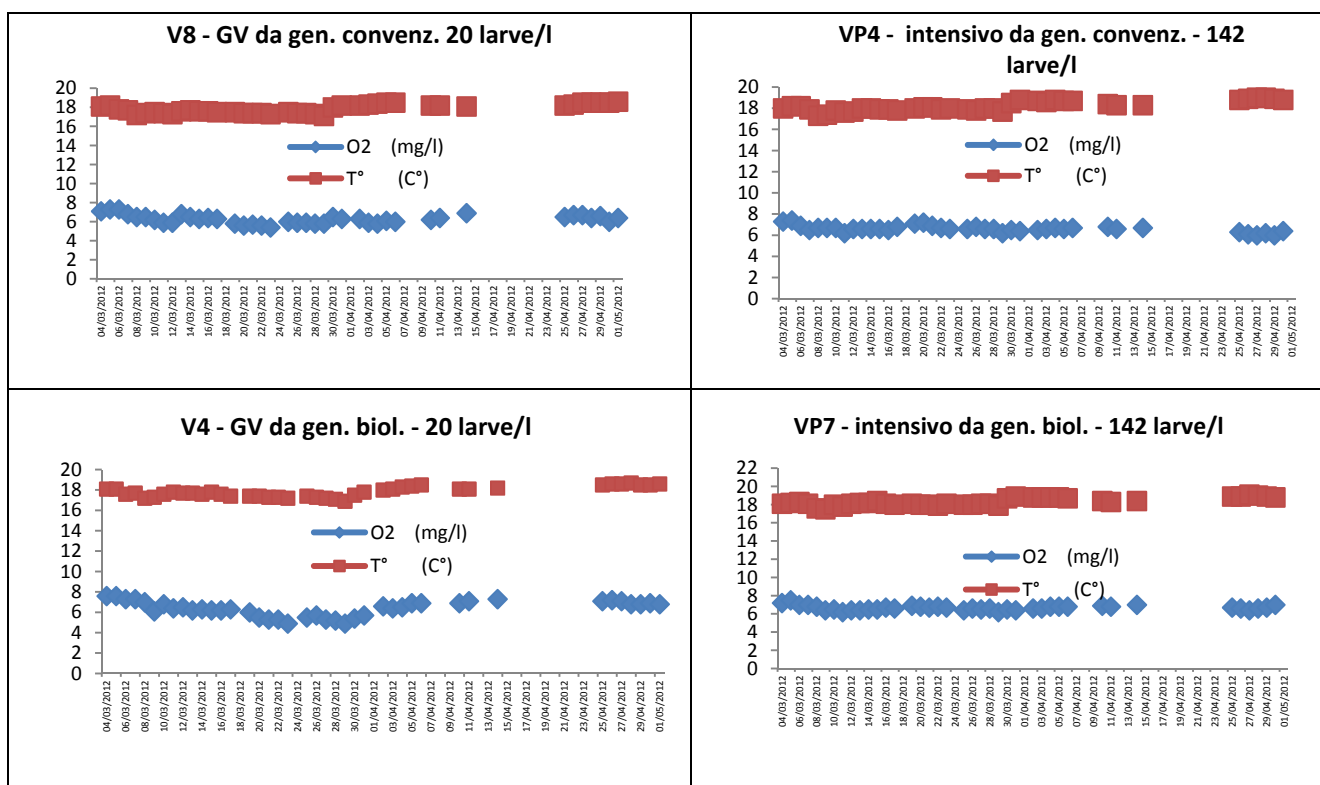


Il giorno 4 marzo sono state seminate le quattro vasche dell'esperimento. La tabella seguente riporta il nome della vasca, lo schiuditoio di origine, il volume e le densità di stoccaggio stimate.

vasca	volume (m ³)	Schiuditoio di origine	densità (larve/litro)
V8	70	S5 (conv)	20
V4	70	S8 (bio)	20
VP4	8	S6 (conv)	142
VP7	8	S7 (bio)	142

L'allevamento larvale è stato svolto in acqua di pozzo (refrigerata), a salinità prossima a quella dell'acqua di mare.

I parametri chimici e fisici sono stati rilevati durante l'intera fase di allevamento larvale; vengono di seguito mostrati l'andamento dei livelli di ossigeno e della temperatura nelle vasche.



Sia per i piccoli (condizioni intensive) che per i grandi volumi (protocollo biologico) il protocollo di allevamento larvale differisce per la quantità di artemia somministrata, leggermente maggiore per la condizione intensiva a causa di una densità di pesci più elevata.

Tale differenza è dovuta ad una mortalità maggiore riscontrata durante le prime fasi di allevamento nella condizione biologica sia per il piccolo che per il grande volume.

I rotiferi e l'artemia arricchiti sono stati somministrati 3 volte al giorno (alle 8:30, alle 12 e alle 15).

In tutte le vasche dell'esperimento è stato osservato copepodi.

La tabella seguente riporta il numero dei pesci stimati presenti nelle diverse vasche alla fine della fase di allevamento larvale:

Vasca	Numero pesci stimati
-------	----------------------

VP7	3.000-4.000
VP4	5.000-6.000
V4	20.000-30.000
V8	30.000-40.000

I pesci sono stati trasferiti in vasche poste all'esterno, in condizione di fotoperiodo naturale, in un unico raceway con delimitazioni interne a formare 3 volumi separati, ognuno di 20 m³ (terra, centro, mare) ed in una vasca circolare (13 m³), posta all'interno dell'impianto; il ricambio idrico, maggiore del 100%/die in tutte le quattro condizioni, è stato effettuato attraverso acqua di pozzo. La tabella seguente riporta il nome della vasca, il volume e la densità iniziale (stimata):

Vasca	Volume (m ³)	Origine	Densità stimata (pesci/litro)
SL6 terra	20	V8 (GV – gen. conv.)	0,3
SL6 centro	20	V4 (GV – gen. biol.)	0,3
SL6 mare	20	VP4 (intensivo – gen. conv.)	1,25
SC8	13	VP7 (intensivo – gen. biol.)	1,75

Il giorno 20 di giugno alla fine del periodo di preingrasso sono stati effettuati i campionamenti finali.

WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci

Questo WP riguarda le attività finalizzate al raggiungimento dell'obiettivo B: in particolare quelle inerenti le attività B.1 (analisi fisiologiche), B.3 (valutazione delle performance produttive del novellame biologico) e B.4 (applicazione di tecniche di intelligenza artificiale (SOMs) e costruzione di un modello globale, multi-approccio e dinamico, dei diversi descrittori di stato e di processo che sono alla base della identificazione/descrizione/sintesi di un protocollo di allevamento larvale "biologico").

Messa a punto del monitoraggio "multidimensionale" di controllo:

1) analisi degli effetti dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità delle uova

La tabella seguente riporta i campionamenti eseguiti sulle uova:

codice campione	ora	origine	fissazione	Peso campionato (g)
OL12_01-03	8.00	conv.	glutaraldeide 2,5%	≈ 1
OL12_04-05	8.00	conv.	bouin	≈ 1
OL12_06-08	15.30	bio	glutaraldeide 2,5%	≈ 1
OL12_09-10	15.30	bio	bouin	≈ 1
OL12_11	15.30	conv.	glutaraldeide 2,5%	≈ 1
OL12_012-14	16.00	conv.	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 3
OL12_15-17	16.00	bio	ghiaccio secco (-80°C)	≈ 3

In questo periodo sono in corso le seguenti analisi sui campioni di uova:

Tipo di fissazione	Analisi in corso
bouin	Morfologiche (anomalie, numero delle gocce lipidiche; diametro

glutaraldeide 2,5%	dell'uovo e del tuorlo; spazio perivitellino)
ghiaccio secco (-80°C)	Qualità delle uova (quantificazione dei livelli di glucosio, proteine totali e trigliceridi e del profilo in acidi grassi, quest'ultimo in collaborazione con l'INRAN)

2) studio della forma e delle anomalie scheletriche

Oltre al campionamento effettuato l'anno precedente (vedi seconda relazione) durante il periodo compreso tra il 29/06/2011 ed il 26/07/2011, relativo a giovanili di orata provenienti da uova deposte da riproduttori mantenuti secondo il protocollo convenzionale e allevati in grandi volumi e in intensivo. I campionamenti effettuati al termine della fase di allevamento larvale sono i seguenti:

Codice	Data	Vasca	giorni	fissazione	n. repliche	n. individui
OL12_30-32	30/04/2012	VP4	60	ghiaccio secco (-80°C)	3	≈ 50
OL12_33	30/04/2012	VP4	60	formalina 5%	1	≈ 200
OL12_34	30/04/2012	VP4	60	bouin	1	≈ 20
OL12_35	30/04/2012	VP4	60	glutaraldeide 2,5	1	≈ 20
OL12_36-38	30/04/2012	VP7	60	ghiaccio secco (-80°C)	3	≈ 50
OL12_39	30/04/2012	VP7	60	formalina 5%	1	≈ 200
OL12_40	30/04/2012	VP7	60	glutaraldeide 2,5	1	≈ 20
OL12_41	30/04/2012	VP7	60	bouin	1	≈ 20
OL12_42-44	01/05/2012	V4	61	ghiaccio secco (-80°C)	3	≈ 50
OL12_45	01/05/2012	V4	61	formalina 5%	1	≈ 200
OL12_46	01/05/2012	V4	61	glutaraldeide 2,5	1	≈ 20
OL12_47	01/05/2012	V4	61	bouin	1	≈ 20
OL12_48-50	01/05/2012	V8	61	ghiaccio secco (-80°C)	3	≈ 50
OL12_51	01/05/2012	V8	61	formalina 5%	1	≈ 200
OL12_52	01/05/2012	V8	61	glutaraldeide 2,5	1	≈ 20
OL12_53	01/05/2012	V8	61	bouin	1	≈ 20

Il giorno 20 di giugno, fine del periodo di preingrasso, sono stati effettuati i campionamenti finali, come illustrato dalla tabella seguente:

Codice campione	Origine	Età	Tipo di fissazione	N. repliche	N. individui
OL12_54-56	SL6 terra	111	ghiaccio secco (-80°C)	3	≈ 30
OL12_57	SL6 terra	111	glutaraldeide 2,5	1	≈ 20
OL12_58	SL6 terra	111	bouin	1	≈ 20
OL12_59	SL6 terra	111	formalina 5%	1	≈ 200
OL12-60-62	SL6 centro	111	ghiaccio secco (-80°C)	3	≈ 30
OL12_63	SL6 centro	111	glutaraldeide 2,5	1	≈ 20
OL12_64	SL6 centro	111	bouin	1	≈ 20
OL12_65	SL6 centro	111	formalina 5%	1	≈ 200
OL12-66-68	SL6 mare	111	ghiaccio secco (-80°C)	3	≈ 30
OL12_69	SL6 mare	111	glutaraldeide 2,5	1	≈ 20
OL12_70	SL6 mare	111	bouin	1	≈ 20
OL12_71	SL6 mare	111	formalina 5%	1	≈ 200
OL12-72-74	SC8	111	ghiaccio secco (-80°C)	3	≈ 30
OL12_75	SC8	111	glutaraldeide 2,5	1	≈ 20
OL12_76	SC8	111	bouin	1	≈ 20
OL12_77	SC8	111	formalina 5%	1	≈ 200

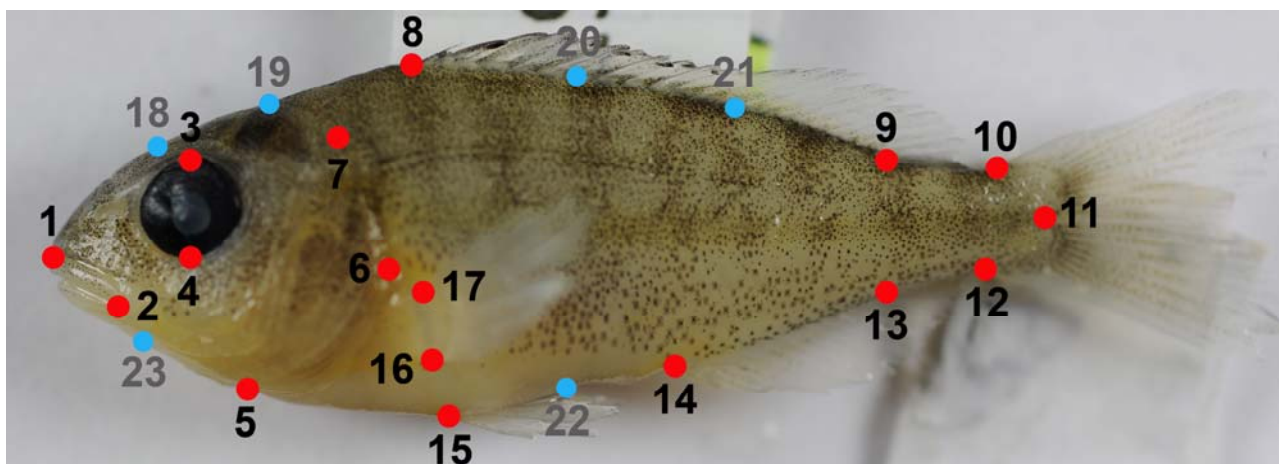
Tali campioni sono stati destinati alle seguenti analisi, ora in corso:

Tipo di fissazione	Analisi in corso
formalina 5%; bouin; glutaraldeide 2,5%	Morfologiche (studio della forma, monitoraggio delle anomalie scheletriche, individuazione di asincronie di sviluppo)
ghiaccio secco (-80°C)	Cortisolo, osmolarità, e contenuto in glucosio, proteine totali e trigliceridi; profilo in acidi grassi, in collaborazione con l'INRAN)

Dopo i campionamenti i pesci sono stati mantenuti nelle rispettive vasche e, a partire dal giorno 25 giugno, sono stati prelevati 28 pesci da ciascuna vasca e analizzati con il fluorimetro. Per quanto riguarda i campioni destinati alle analisi morfologiche, tutti gli individui campionati sono trattati come segue:

- ciascun individuo fissato in formalina al 5-10% (in tampone fosfato 0,1M, pH 7,5) viene fotografato in aspetto laterale sinistro per mezzo di una Nikon D3X montata su uno stativo di precisione, e numerato;
- su ciascun individuo vengono rilevate la lunghezza totale (LT) e standard (LS);
- ciascun esemplare verrà diafanizzato e sottoposto a colorazione selettiva per osso e cartilagine, secondo il metodo di Park e Kim modificato (1984).

L'analisi della forma, attualmente in corso, prevede il rilevamento di 17 *landmarks* omologhi di I e II tipo (Bookstein, 1991) e sei *semi-landmarks* (Zelditch *et al.* 2004; Perez *et al.* 2006); questi ultimi, a differenza dei *landmarks*, vengono automaticamente selezionati lungo il profilo tracciato da due punti di riferimento, rappresentati da *landmarks* omologhi, mediante il programma TpsDig 2.10 (Rohlf, 2006). I *landmarks* dipendenti da altri punti sono detti *semi-landmarks*, poiché possono essere selezionati esclusivamente lungo il profilo specificato, il che comporta una riduzione di un grado di libertà. I *semi-landmarks* utilizzati sono anche detti *sliding landmarks*, poiché ad essi è consentito il movimento lungo il profilo, al fine di minimizzare parametri quali la *bending energy* o le distanze di Procruste (Zelditch *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2006). Il modello utilizzato per il rilevamento di entrambi i tipi di *landmarks* nei giovanili di orata è rappresentato in figura 1.



Modello dei 17 *landmarks* (in rosso, numerati da 1 a 17) e 6 *semi-landmarks* (in blu, numerati da 18 a 23), utilizzato per la descrizione della variazione della forma nei giovanili di orata.

Landmarks e semi-landmarks saranno successivamente convertiti in coordinate della forma mediante una procedura iterativa detta *General Procrustes Superimposition* (Rohlf e Slice, 1990). Le tecniche di *superimposition* realizzano una sovrapposizione iterativa ottimale di ogni individuo (target) su un altro individuo considerato di riferimento, in modo che i loro rispettivi landmarks si allineino il più possibile. I residui sono poi analizzati con la funzione di interpolazione *thin plate spline* (TPS) (Bookstein, 1991), una tecnica di deformazione parsimoniosa che predice le differenze di forma tra la configurazione di riferimento e la configurazione target. Questa funzione minimizza l'energia richiesta per la deformazione (energia di curvatura o *bending energy*). L'energia ideale richiesta per tale deformazione viene espressa mediante la matrice di energia di curvatura (*bending energy matrix*), generata invertendo una matrice ottenuta dalle distanze tra i punti e le coordinate dell'oggetto di riferimento. L'analisi spettrale della matrice di energia fornisce vettori ortogonali (le deformazioni principali o *principal warps*), ovvero costrutti matematici analoghi alle componenti principali. Dalle deformazioni principali vengono derivati i punteggi di deformazione parziale, o *partial warp scores*. Questi punteggi vengono riassunti in un vettore di lunghezza e quindi organizzati nella cosiddetta *Weight matrix* (W), sulla quale sarà poi possibile eseguire le varie tecniche di analisi multivariata.

Oltre alle tecniche di morfometria geometrica, sarà applicata al campione l'analisi della matrice delle distanze euclidee (EDMA - Euclidean Distance Matrix Analysis, Lele & Richtsmeier 1995; 2001), al fine di garantire, come nei più moderni studi sulla forma, un approccio integrato e completo.

Gli stessi individui fotografati sono stati quindi colorati in toto e diafanizzati, e sottoposti alla conta dei caratteri meristici e all'analisi delle anomalie scheletriche. L'osservazione è stata condotta ad uno stereo microscopio WILD, su entrambi i lati del corpo.

I caratteri meristici considerati sono: le vertebre (incluso l'urostilo), gli elementi di sostegno interno delle pinne (epurali, ipurali, paraipurale, pterigiofori, radiali); i raggi delle pinne impari (dorsale, anale e caudale) e pari (pettorali e pelviche). I raggi duri o spine e i raggi morbidi della pinna dorsale sono stati contati separatamente, mentre quelli della pinna anale sono stati contati insieme; per i raggi della pinna caudale sono stati considerati i raggi principali superiori ed inferiori. Nelle conte meristiche sono state considerate anche le ossa predorsali.

Le diverse tipologie malformative sono state registrate utilizzando un riferimento dicotomico (vedi Legenda), nel quale la lettera indica la regione del corpo affetta da anomalie (dalla A ad L), mentre il numero indica il tipo di anomalia (da 1 a 29).

Le anomalie considerate gravi sono quelle la cui presenza altera la forma esterna del pesce e che possono compromettere le performances (alimentazione, nuoto).

E' attualmente in corso il secondo esame dei campioni (ogni rilevazione viene effettuata da 2 operatori diversi).

Legenda delle anomalie considerate. In grassetto sono evidenziate le anomalie considerate gravi

REGIONE	A	Vertebre cefaliche (con coste epipleurali)
	B	Vertebre pre-emali (con coste epipleurali e pleurali e con arco emale aperto, senza emaspina)
	C	Vertebre emali (con arco emale chiuso da emaspina)
	D	Vertebre caudali (con spine modificate in palette natatorie)
	E	Pinna pettorale
	F	Pinna anale
	G	Pinna caudale
	H	Regione dei raggi duri (spine) della pinna dorsale
	I	Regione dei raggi morbidi (lepidotrichi) della pinna dorsale
	L	Pinna pelvica
TIPO	S	Scoliosi
	1	Lordosi

2	Cifosi
3	Parziale fusione vertebrale
3*	Fusione vertebrale completa
4	Deformazione corpo vertebrale
5	Arco neurale e/o neurospina anomala
5*	Arco neurale e/o neurospina soprannumeraria
6	Arco emale e/o emaspina anomalo/a
6*	Arco emale e/o emaspina soprannumeraria
7	Costa pleurale deformata
7*	Costa pleurale soprannumeraria
7	Raggio anomalo (deformato, assente, fuso, soprannumerario)
8	Pterigioforo deformato (assente, fuso, soprannumerario)
9	Ipurale anomalo (deformato, assente, fuso, soprannumerario)
9*	Paraipurale anomalo o fuso oppure spezzato e fuso con ipurale o con emaspina
10	Epurale anomalo (deformato, assente, fuso, soprannumerario)
11	Raggio anomalo(deformato, assente, fuso, soprannumerario)
12	Assenza di vescica natatoria
13	Presenza di calcoli nei dotti urinari
14	Mascellare o premascellare anomalo
15	Dentale anomalo
16	Altre anomalie craniali (glossoiale/neurocranio)
17sx	Opercolo sinistro deformato o ridotto
17dx	Opercolo destro deformato o ridotto
17*sx	Raggi branchiostegi di sinistra deformati, assenti o fusi
17*dx	Raggi branchiostegi di destra deformati, assenti o fusi
18	Osso predorsale anomalo
19	Ipurale con decalcificazioni
20	Pterigiofori con decalcificazioni
21	Setto intercostale
22	Spine miosettali dorsali anomale
23	Spine miosettali ventrali anomale
24sx	Piastra opercolare sinistra con decalcificazioni
24dx	Piastra opercolare destra con decalcificazioni
25	Epurale decalcificato
26	Ossificazione soprannumeraria
27	Urostilo decalcificato
28	Difetti di ossificazione di vertebre
29	Post cleitro deformato
Cl sx	Cleitro sinistro anomalo
Cl dx	Cleitro destro anomalo
Cor sx	Coracoide sinistro anomalo
Cor dx	Coracoide destro anomalo

3) Analisi fisiologiche: Messa a punto del sistema di valutazione dello stato di immunocompetenza acquisito da orate alla fine della fase di allevamento larvale.

Il programma prevedeva la valutazione dello stato di immunocompetenza utilizzando una RT-PCR per evidenziare i geni dell'immunità innata. Nel corso di questo primo anno di attività ci si è resi conto, però, che sarebbe stato molto più utile ed indicativo dell'esistenza di differenze nell'immunità innata tra larve di orata allevate in Grandi Volumi e quelle allevate in intensivo, andare ad esaminare la presenza di differenze nell'attivazione dei geni dell'immunità innata, più che la presenza o meno dei geni stessi. Per questo motivo, si è deciso di andare ad analizzare i livelli di ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*), che vengono normalmente prodotti durante processi infiammatori, infezioni batteriche o virali o in condizioni di stress ossidativo. Uno dei limiti che presenta questo tipo di approccio è che le analisi vanno effettuate su cellule vive, e quindi risulta necessario avere un Fluorimetro, lo strumento che legge i livelli di ROI, nell'impianto di Lampedusa. Il vantaggio risiede nel fatto che la lettura dei livelli di ROI non richiede protocolli sofisticati e quindi risulta facilmente praticabile in impianto.

A questo scopo, è stato acquistato un fluorimetro portatile (Jenway 6280): nel periodo dicembre 2011-gennaio 2012 sono state effettuate una serie di misurazioni comparative utilizzando sullo stesso campione sia il fluorimetro portatile sia uno non portatile presente nella nostra Università, al fine di verificare l'attendibilità delle misurazioni effettuate con lo strumento portatile. Una volta accertata la possibilità di utilizzare lo strumento direttamente *in situ*, sono state avviate una serie di prove per accertare la capacità di lettura dello strumento portatile su quantità molto ridotte di materiale al fine di individuare la taglia minima dei campioni per poter essere analizzati. Sono stati quindi effettuati una serie di prelievi di sangue da individui di tilapia (*Oreochromis niloticus*) di taglia via via decrescente e di omogeneizzati di pool di larve e giovanili di diversa taglia di cefali (*Mugil cephalus*), di cui abbiamo ampia disponibilità nel nostro Laboratorio. I risultati ottenuti hanno dimostrato la possibilità di misurare i ROI sia su quantità di sangue ridotte che su omogenati di pool di larve.

Le analisi sono state quindi condotte su pool di individui provenienti dalle 4 condizioni di allevamento, alla fine della fase di allevamento larvale e del preingrasso. Queste misure sono condotte su singoli individui ed in particolare sono stati esaminati 40 esemplari per vasca di allevamento, per un totale di 160 individui, a 60 gg dalla schiusa e su 28 individui per vasca a 118 gg.

Bibliografia citata

- Bookstein F.L. (1991) Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lele S. & Richtsmeier J.T. (2001) An invariant approach to statistical analysis of shapes. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton.
- Lele S. & Richtsmeier J.T. (1995) Euclidian Distance Matrix Analysis: Confidence intervals for form and growth differences. American Journal of Physical Anthropology 98(1), 73-86.
- Perez S.I., Bernal V. & Gonzalez P.N. (2006) Differences between sliding semilandmark methods in geometric morphometrics, with an application to human craniofacial and dental variation. Journal of Anatomy 208(6), 769-784.
- Rohlf F.J. (2006) TpsDig Ver. 2.10, Digitalized Landmarks and Outlines. Department of Ecology and Evolution, Stony Brook, State University of New York.
- Rohlf, F.J. & Slice, D. (1990). Extension of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. Syst. Zool. 39, 40-59.
- Zelditch M.L., Swiderki D.L., Sheets H. D. & Fink W.L. (2004) Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. Elsevier, Academic Press, San Diego, CA.