



UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in Biologia Marina

Osservazioni in ambiente controllato del ciclo riproduttivo e delle prime fasi di accrescimento di *Chiloscyllium punctatum* (Müller e Henle 1838).

Tesi di laurea in

Evoluzione e diversità degli animali marini

Relatore

Presentata da

Giovanni Rossi

Prof. Fausto Tinti

Correlatore

Dott. Stefano Gridelli

I sessione

Anno Accademico 2014/2015

Al grande atleta *Mauro Sestini*

e

al grande musicista *Andreas De Ruijter*

# INDICE

---

RIASSUNTO.....	I
----------------	---

## CAPITOLO 1

---

1. INTRODUZIONE.....	1
----------------------	---

## CAPITOLO 2

---

2. SCOPI DELLA TESI.....	2
2.1 IPOTESI SPERIMENTALI .....	4

## CAPITOLO 3

---

3. L'ACQUARIO DI CATTOLICA.....	4
---------------------------------	---

## CAPITOLO 4

---

4. CLASSIFICAZIONE E MORFOLOGIA DEGLI SQUALI.....	11
---	----

## CAPITOLO 5

---

5. LA RIPRODUZIONE DEGLI ELASMOBRANCHII.....	21
--	----

## CAPITOLO 6

---

6. GLI ELASMOBRANCHII IN AMBIENTE CONTROLLATO .....	30
6.1 CATTURA.....	31
6.2 ACCLIMATAZIONE.....	33
6.3 QUALITÀ DELLE ACQUE.....	34
6.4 ALIMENTAZIONE .....	39
6.5 STRESS .....	47
6.6 CRESCITA .....	48
6.7 SPAZIO.....	49
6.8 ILLUMINAMENTO E FOTOPERIODO.....	51

<b>6.9 ALLESTIMENTO DI VASCHE TEMATICHE PER LA CRESCITA E LO SVILUPPO DI SQUALI DEMERSALI .....</b>	<b>53</b>
---	-----------

## **CAPITOLO 7**

---

<b>7. LO SQUALO BAMBOO (<i>CHILOSCYLLIUM PUNCTATUM</i>, MÜLLER E HENLE 1838).....</b>	<b>54</b>
<b>7.1 EMBRIOLOGIA .....</b>	<b>55</b>
<b>7.2 MORFOLOGIA E BIOMETRIA.....</b>	<b>55</b>
<b>7.3 RIPRODUZIONE.....</b>	<b>58</b>
<b>7.4 ECOLOGIA .....</b>	<b>58</b>
<b>7.5 DISTRIBUZIONE .....</b>	<b>60</b>
<b>7.6 NUTRIZIONE .....</b>	<b>61</b>
<b>7.7 COMPETIZIONE ALIMENTARE E SPAZIALE .....</b>	<b>61</b>

## **CAPITOLO 8**

---

<b>8. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>63</b>
<b>8.1 AREA DI STUDIO .....</b>	<b>63</b>
<b>8.1.1 “LO SCRIGNO DI NETTUNO” (V5).....</b>	<b>64</b>
<b>8.1.2 “TEMATICHE NURSERY” (TEM5).....</b>	<b>66</b>
<b>8.1.3 VASCHE DI CONTENIMENTO E SEPARAZIONE .....</b>	<b>68</b>
<b>8.2 FILTRAZIONE DELLE ACQUE.....</b>	<b>69</b>
<b>8.3 ILLUMINAZIONE DELLE VASCHE .....</b>	<b>74</b>
<b>8.4 ANALISI DELLE ACQUE .....</b>	<b>78</b>
<b>8.5 DIAGNOSTICA.....</b>	<b>80</b>
<b>8.5.1 MICROSCOPIA DIGITALE.....</b>	<b>81</b>
<b>8.5.2 DETERMINAZIONE DEL SESSO .....</b>	<b>82</b>
<b>8.5.3 MARCATURA E RICONOSCIMENTO (UOVA E NEONATI).....</b>	<b>82</b>
<b>8.6 NUTRIZIONE .....</b>	<b>83</b>
<b>8.7 MISURAZIONI DI PESO CORPOREO (PC) E LUNGHEZZA TOTALE (LT).....</b>	<b>84</b>
<b>8.8 DISEGNI SPERIMENTALI .....</b>	<b>87</b>
<b>8.8.1 PIANO D’AZIONE.....</b>	<b>88</b>
<b>8.8.2 SVILUPPO EMBRIONALE.....</b>	<b>88</b>

<b>8.8.2</b> DIVEZZAMENTO DAL SACCO VITELLINO.....	<b>90</b>
<b>8.8.2.1</b> DIETA VARIATA (N=5).....	<b>90</b>
<b>8.8.2.2</b> GRADIENTE LUMINOSO (N=10).....	<b>90</b>
<b>8.9</b> ANALISI DEI DATI.....	<b>93</b>

## **CAPITOLO 9**

---

<b>9. RISULTATI</b> .....	<b>96</b>
<b>9.1</b> QUALITÀ DELLE ACQUE.....	<b>96</b>
<b>9.2</b> DATI BIOMETRICI.....	<b>99</b>
<b>9.3</b> NUMEROSITÀ E CRESCITA DEI SESSI.....	<b>101</b>
<b>9.4</b> FREQUENZA DI DEPOSIZIONE DELLE UOVA.....	<b>103</b>
<b>9.5</b> TEMPI DI SVILUPPO EMBRIONALE.....	<b>103</b>
<b>9.6</b> DIETA VARIATA (N=5).....	<b>107</b>
<b>9.7</b> GRADIENTE LUMINOSO (N=10).....	<b>115</b>
<b>9.8</b> MORTALITÀ.....	<b>120</b>
<b>9.9</b> ICONOGRAFIA.....	<b>121</b>

## **CAPITOLO 10**

---

<b>10. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI</b> .....	<b>128</b>
--	------------

## **CAPITOLO 11**

---

<b>11. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>135</b>
-------------------------------	------------

<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>152</b>
-----------------------------	------------

# RIASSUNTO

---

La presente tesi tratta delle attività riproduttive e delle prime fasi di crescita dello squalo *Chiloscyllium punctatum*. Da Dicembre 2013 a Giugno 2014, all'Acquario di Cattolica, sono state effettuate osservazioni su una coppia di adulti riproduttori e sui relativi neonati mantenuti in ambiente controllato. Il *Chiloscyllium punctatum* è una specie ovipara che rilascia uova di forma rettangolare, ha un ciclo riproduttivo relativamente rapido ed è molto sfruttata come specie ornamentale dagli acquari di tutto il mondo. Per ottenere una corretta gestione in ambiente controllato, la riproduzione ed estrapolare il maggior numero d'informazioni certe su gli stadi di vita, sulla dieta di divezzamento dei neonati dal sacco vitellino, sull'illuminazione più consona da adottare, sulle dimensioni medie di uova, nascituri e adulti, sulla crescita dei nascituri, sui tempi di sviluppo embrionale, sulla frequenza di deposizione delle uova e sui tempi di schiusa è stato necessario sviluppare un corretta procedura di gestione ordinaria. In 7 mesi, gli adulti di *C. punctatum*, in condizioni ambientali ottimali e costanti, hanno dato vita a 33 neonati. Questi, sono stati sottoposti a misurazioni di lunghezza (LT, cm) e peso corporeo (PC, g) per valutare l'influenza dell'illuminamento e della dieta sulla crescita. Inoltre, sono stati confrontati dati sperimentali (e.g. tempistiche di sviluppo embrionale) con dati bibliografici (Haraush *et al.*, 2007) che hanno evidenziato alcune similitudini e differenze.

### **1. INTRODUZIONE**

Il gruppo dei Neoselaci è molto vasto e diversificato comprendente specie differenti sia per caratteristiche anatomiche e fisiologiche, sia per caratteri ecologici. Tali organismi sono in grado di vivere in svariati habitat come reef corallini, acque oceaniche, costiere, abissali, estuari ed acque fluviali. Gli Elasmobranchii hanno colonizzato le acque di tutto il mondo insediandosi in ambienti temperati, tropicali o glaciali. Queste caratteristiche, unite alla loro capacità di adattamento, hanno permesso loro di essere predatori all'apice della rete trofica, divenire cosmopoliti e popolare le acque di tutto il mondo. Sebbene, nell'immaginario collettivo, questi animali siano descritti come terribili assassini e "mangiatori di uomini", tale descrizione si allontana profondamente dalla realtà. Infatti, solamente pochissime specie delle circa 400 descritte sono pericolose per l'uomo. Per contro, ogni anno, l'uomo uccide milioni di squali; pratiche come il "finning", la pesca sportiva e commerciale ed infine l'inquinamento sono le principali cause di questa carneficina. Tuttavia, questi animali hanno sempre incuriosito il genere umano e proprio per questo sono diventati ospiti abituali in acquari pubblici e parchi zoologici di tutto il mondo. La presenza di squali in ambiente controllato consente a numerosi studiosi di condurre osservazioni sugli esemplari mantenuti in tali strutture. Le conoscenze sugli Elasmobranchii

sono ancora limitate e molti aspetti della loro biologia, ecologia ed etologia sono ancora poco chiari. Per questo motivo vengono condotti sempre più spesso studi in acquari di tutto il mondo che permettono di ovviare alle palesi difficoltà che insorgono nelle osservazioni condotte in natura (Hutchins *et al.*, 2003). Ispirandosi a tali ricerche si è deciso di sviluppare questo elaborato di tesi in collaborazione con l'Acquario di Cattolica nella speranza di ampliare la conoscenze relative a questi animali.

## *Capitolo 2*

---

### **2. SCOPI DELLA TESI**

La riproduzione di tutte le specie ornamentali possibili risulta essere di sempre maggiore interesse, nella filosofia perseguita, ormai da tutti i grandi acquari del mondo. Adottando questa mission, non contemplando il rilascio in natura dei nascituri, i grandi acquari e le istituzioni favoriscono le attività di scambio con conseguente riduzione di prelievo di esemplari dalla natura (Henningsen *et al.*, 2004; Choromanski, 2004).

Lo scopo primario dell'elaborato quindi è quello di cercare di ottenere un efficiente protocollo di gestione della riproduzione della specie *Chiloscyllium punctatum*. Ottenere un protocollo ottimale di riproduzione di questa specie può essere di grande utilità, sebbene la specie in esame sia classificata come “di poco interesse” (“least concern”), dal governo australiano,



che ne protegge gli areali; nonostante ciò il *C. punctatum* ha acquisito negli ultimi anni un sempre maggior valore commerciale, come specie ornamentale, da parte di acquari pubblici e appassionati acquariofili con conseguente aumento delle richieste e derivante declino della risorsa in natura a causa di costanti prelievi (Camhi *et al.*, 2007).

Per questo motivo, all'interno di un ottica di salvaguardia della specie e alle condizioni sperimentali da me determinate, mi sono posto di raggiungere i seguenti obiettivi:

- Determinare il ciclo riproduttivo e gli stadi di vita degli esemplari;
- Determinare la dieta più efficiente per divezzare i neonati dal sacco vitellino;
- Determinare l'illuminazione più consona da adottare;
- Determinare le dimensioni medie di uova, nascituri ed adulti da confrontare con i dati reperibili in bibliografia;
- Determinare la crescita dei nascituri;
- Determinare i tempi di sviluppo embrionale da confrontare con i dati presenti in bibliografia;
- Determinare la frequenza di deposizione delle uova;
- Determinare i tempi di schiusa.

## 2.1 IPOTESI SPERIMENTALI

Una volta posti tali scopi, sono state formulate le seguenti ipotesi:

- 1) Diverse condizioni d'illuminamento condizionano significativamente i normali tempi di sviluppo embrionale e di schiusa?
- 2) Diverse condizioni d'illuminamento condizionano significativamente la crescita dei nascituri?
- 3) Diverse fonti alimentari producono significative differenze di crescita durante il periodo di divezzamento dal sacco vitellino?
- 4) L'assunzione di integratori vitaminici condiziona significativamente la crescita durante il periodo di divezzamento dal sacco vitellino?

## *Capitolo 3*

---

### **3. L'ACQUARIO DI CATTOLICA**

Questo capitolo è dedicato alla descrizione della struttura dell'Acquario di Cattolica, in cui ho svolto il mio progetto di tesi. L'acquario si trova all'interno di una serie di edifici, risalenti agli anni '30, le cui forme richiamano una flotta navale. La struttura era stata originariamente concepita come colonia marina per ospitare i figli degli italiani residenti all'estero. Il progetto fu commissionato all'architetto-ingegnere romano Clemente Busiri Vici, che s'ispirò ad una morfologia

aereonavale, ovvero al mondo delle navi, degli aerei, degli idrovolanti, delle littorine e dei sommergibili (da cui il nome Parco “*Le Navi*”), per realizzare i cinque edifici centrali della struttura. Una volta concluso, il progetto fu inaugurato nel giugno dell’anno 1934, alla fine del quale vennero aggiunti due edifici a forma di siluro, sempre ideati da Busiri Vici.

Tra gli anni 1935 e 1943 la struttura era completamente autosufficiente in grado di ospitare circa duemila bambini (Fig.3.1). Nel 1944, durante il passaggio del Fronte, la colonia fu adibita ad ospedale militare, mentre nel dopoguerra la colonia riprese le sue funzionalità. Negli anni ‘60, venne approvato il *Piano Regolatore di Cattolica*, che escludeva tuttavia dalla pianificazione l’area occupata da “*Le Navi*”, permettendo alla società Maraldi di ottenere l’approvazione del piano di lottizzazione dell’area; così, in seguito vennero demoliti parte degli edifici e nell’area vennero costruiti alberghi e appartamenti. La superficie edificata su cui originariamente si estendeva la colonia viene quasi dimezzata. Verso la metà degli anni ’70 la funzione di colonia marina e il complesso passano all’attuale proprietario, la Regione Emilia Romagna che ne affida la gestione al Comune di Cattolica. Nella metà degli anni ’80 si procede ad un primo recupero dell’intero complesso, con la nuova destinazione a “*Centro Internazionale Giovani Le Navi*”, polo studentesco di vacanza per giovani provenienti da tutta Europa. Dal 1993 al 1997 la struttura è affidata alla Cooperativa “*Le Navi*” di Cattolica.

Nel 1997 il Comune ottiene dalla Regione la concessione del complesso per realizzare un Parco Tematico del Mare. Contemporaneamente il Comune si fa promotore della costituzione di una società a capitale misto, pubblico e privato, denominata Parconavi S.p.A., il cui obiettivo è quello di realizzare un Parco del Mare. Nel 1999 incominciano i lavori per la realizzazione del parco, che il 10 giugno 2000, dopo solo undici mesi dall'inizio del cantiere, viene inaugurato e aperto al pubblico; in questa maniera gli edifici sono stati riportati al loro antico splendore e si è riusciti a valorizzare l'intera area circostante la struttura.



Figura 3.1 – Panoramica della colonia nel 1935, gentilmente fornita dall'Archivio Storico del Centro Culturale Polivalente di Cattolica.

L'Acquario si estende su un'area di 140.000 metri quadrati, affacciata sul mare, perfettamente integrata nel tessuto urbano di Cattolica con grandi spazi verdi, fruibili liberamente come parco pubblico (oltre 49.000 m<sup>2</sup>, Fig. 3.2).



Figura 3.2 – Panoramica attuale dell'Acquario di Cattolica, gentilmente fornita dal personale della struttura.

Nell'ultimo cambio di destinazione d'uso, tutti gli interventi di maggior impatto del nuovo progetto, quali il sistema dei percorsi di collegamento tra i singoli edifici e gli imponenti impianti di filtraggio dell'acqua, sono stati realizzati a 4,7 metri sotto il livello del mare (Fabbri, 2003).

Le 100 vasche e le 30 teche espositive sono state realizzate internamente alla struttura e si snodano lungo un percorso di circa due chilometri. Gli esemplari ospitati all’acquario sono pressoché 3000 rappresentanti di circa 400 specie divise in vertebrati (pesci, anfibi, rettili, uccelli e mammiferi) ed invertebrati (meduse, molluschi, crostacei ed insetti). L’acquario si articola in quattro itinerari, uno per ogni struttura a forma di nave: “*Nave di Ponente*”, “*Nave di Levante*”, “*Nave Maestrale*” e “*Nave Ammiraglia*” (Fig.3.2 e 3.3).



Figuraa 3.3 – Panoramica in 3D degli esterni dell’Acquario di Cattolica.



Figura 3.4 – Panoramica in 3D degli interni dell'Acquario di Cattolica.

I quattro percorsi sono:

- *Percorso blu*, che comprende le riproduzioni degli habitat marini mediterranei e tropicali e si articola con oltre 100 vasche (Fig. 3.4a) ;
- *Percorso verde*, ospita circa 22 specie terrestri e risulta destinato alla scoperta del mondo dei rettili e di specie esotiche (Fig. 3.4b) ;
- *Percorso giallo*, itinerario che ospita la riproduzione dell' habitat fluviale. Abitato da specie esotiche quali: lontre, caimani nani, piranha, arowane, etc.; Fig. 3.4c);

- *Percorso viola*, è un percorso didattico ed interattivo dedicato ai più piccoli per interessarli all'approccio con il mondo sottomarino e i suoni che lo riempiono (Fig.3.4d);



Figura 3.4 – Panoramica in 3D degli interni dei quattro percorsi dell'Acquario di Cattolica. (a) il percorso blu; (b) il percorso verde; (c) il percorso giallo; (d) il percorso viola.



## **4. CLASSIFICAZIONE E MORFOLOGIA DEGLI SQUALI**

Gli squali appartengono alla classe dei Condroitti o pesci cartilaginei, insieme a razze e chimere. Questo gruppo di animali si distingue dal gruppo degli Osteoitti o pesci ossei in quanto possiedono uno scheletro completamente cartilagineo (Notarbartolo di Sciarra *et al.*, 1998).

Tale classe risulta divisa ulteriormente in due sottoclassi, che sembrano essersi distinte all'inizio del Devoniano: gli Olocefali (con un singolo ordine vivente, i Chimeriformi) e gli Elasmobranchii, che comprendono squali e razze propriamente detti; quest'ultima sottoclasse comprende il gruppo dei Neoselaci, che definisce gli squali moderni e comprende le specie attualmente viventi (Compagno, 2002).

La classificazione tradizionale divide il gruppo dei Neoselaci in due ordini: i Selacei o Pleurotremata, che comprendono gli squali, e i Batoidei o Ipotremata, che comprendono razze o batoidei. Più modernamente la classificazione colloca i batoidei come ordine dei Rajiformi (superordine Squaliformi, un sister group dei Pristioforidi; Compagno, 2002).

Di seguito si sintetizza quindi l'organizzazione sistematica dei principali taxa (Compagno, 2002; Paccalet, 2003; Notarbartolo di Sciara *et al.*, 1998 e *Integrated Taxonomy Information System* (ITIS) 2014):

**REGNO:** Animalia (organismi pluricellulari; Linneo, 1758)

**PHYLUM:** Chordata (presenza di notocorda; Bateson, 1885)

---

- **SUBPHYLUM:** Vertebrata (presenza di colonna vertebrale; Cuvier, 1798)
    - **Superclasse:** Gnathostomata (presenza di mascelle; Patterson, 1978)
- 

**Classe:** Chondrichthyes (apparato scheletrico cartilagineo; Huxley, 1880; Cappetta, 1987 e Kriwet, 2004)

- **Sottoclasse:** Holocephala (chimere; Fowler, 1947)
  - **Sottoclasse:** Elasmobranchii (squali; Bonaparte, 1838)
- 

- **Coorte:** Euselachii (squali moderni e relativi fossili; Herman, 1974)
  - **Sottocoorte:** Neoselachii (squali moderni; Duffin, 1983)
-

**Ordine:** Hexanchiformes (è presumibilmente l'ordine più primitivo; Ebert, 1989)

Famiglia: Chlamydoselachidae (squali dal collare; Fowler, 1947)

Famiglia: Hexanchidae (notidiani grigi; Bass, 1975)

---

**Ordine:** Squaliformes (squali dal corpo cilindrico, con 5 fessure branchiali, con due pinne dorsali munita di spina, pinne anali assenti, ovovivipari; Yano, 1985)

Famiglia: Echinorhinidae (ronchi; Herman, 1990)

Famiglia: Squalidae (centrofori; Francis, 1988)

---

**Ordine:** Squatiniiformes (squali dal corpo appiattito, con ampie pinne pettorali dette "ali", assomigliano alle razze, 5 fessure branchiali. Sono molto mimetici e cacciano nascosti nel sedimento sorprendendo le prede, sono ovovivipari; Vaz, 2013)

Famiglia: Squatinaidae (squali angelo; Vaz, 2013)

---

**Ordine:** Pristiophoriformes (squali dal muso lungo, appuntito, ipertrofico, con circa venti denti su ciascun lato, 5 o 6 fessure branchiali, due pinne dorsali con spine, ovovivipari; Gottfried, 1997)

Famiglia: Pristiophoridae (squali sega; White, 2012)

---

**Ordine:** Rajiformes (squali batoidei; Castro-Aguirre, 1996)

**Ordine:** Heterodontiformes (squali testa-toro; Compagno, 2001)

Famiglia: Heterodontidae (Compagno, 2001)

---

**Ordine:** Lamniformes (squali dal corpo affusolato, di forma conica-cilindrica, con 5 fessure branchiali, due pinne dorsali, pinne anali presenti, pinna caudale con lobo dorsale ben sviluppato, mentre il ventrale può essere lungo quanto il dorsale oppure assente, la membrana nittitante risulta assente; Ehret, 2010)

Famiglia: Odontaspidae (Siverson, 1995)

Famiglia: Mitsukurinidae (Hamm, 2002)

Famiglia: Pseudocarchariidae (De Silva, 2006)

Famiglia: Megachasmidae (Shimada, 2007)

Famiglia: Alopiidae (Eitner, 1995)

Famiglia: Cetorhinidae (Welton, 2013)

Famiglia: Lamnidae (Hoese, 2006)

---

**Ordine:** Orectolobiformes (squali appiattiti e con lobi cutanei ai lati del capo e in altre parti del corpo che, assieme a una colorazione marmoreggiata, conferiscono un estremo criptismo; Compagno, 1973).

Famiglia: Parascyllidae (Hoese, 2006)

Famiglia: Brachaeluridae (Stevens, 2005)

Famiglia: Orectolobidae (Corrigan, 2009)

Famiglia: Hemiscyllidae (Gill, 1862)

Famiglia: Stegostomatidae (Nateewathana, 1993)

Famiglia: Ginglymostomatidae (Tòbon-Lopez, 2008)

Famiglia: Rhincodontidae (Paxton, 1989)

---

**Ordine:** Carchariniformes (grandi squali; squali con corpo affusolato, 5 fessure branchiali, le dorsali sono prive di spine, pettorali e pelviche ampie e la caudale è asimmetrica; (Human, 2006)

Famiglia: Scyliorhinidae (Nakaya, 1975)

Famiglia: Proscyllidae (Iglésias, 2005)

Famiglia: Pseudotrikidae (Lòpez, 2006)

Famiglia: Leptocharidae (Goodwin, 2002)

Famiglia: Triakidae (Lòpez, 2006)

Famiglia: Hemigaleidae (Baranes, 1986)

Famiglia: Carcharhinidae (Compagno, 1970)

Famiglia: Sphyrnidae (Gilbert, 1967)

Queste suddivisioni sono state create considerando le caratteristiche anatomiche che i diversi organismi condividono, per questo motivo ogni gruppo comprenderà organismi con connotati analoghi (Fig.4.1, Compagno, 2002; Deacon *et al.*, 1998)

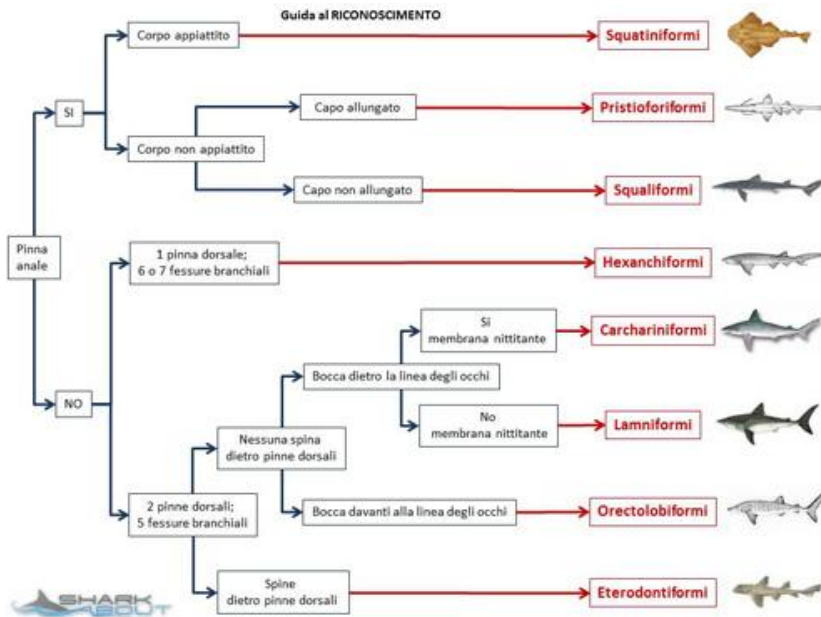


Figura 4.1 – Schema di classificazione degli Elasmobranchi (Immagine di Shark About, 2014)

Gli squali presentano, quindi, conformazioni ed adattamenti molto diversi, funzionali anche al luogo in cui vivono. Dal punto di vista evolutivo le chimere sono più vicine agli squali propriamente detti, in quanto i batoidei risultano essersi diversificati maggiormente; questo ci porta a sottovalutarli come specie di Elasmobranchii (Compagno, 2002). In generale chimere e batoidei ricevono un'attenzione minore dello squalo

propriamente detto, anche se in realtà in molte parti del mondo esse hanno di gran lunga un valore più alto: sono importanti per la pesca e alcune sono fortemente minacciate dallo sfruttamento eccessivo e dalla modificazione degli habitat (ad esempio pesci sega e razze d'acqua dolce; Compagno, 2002).

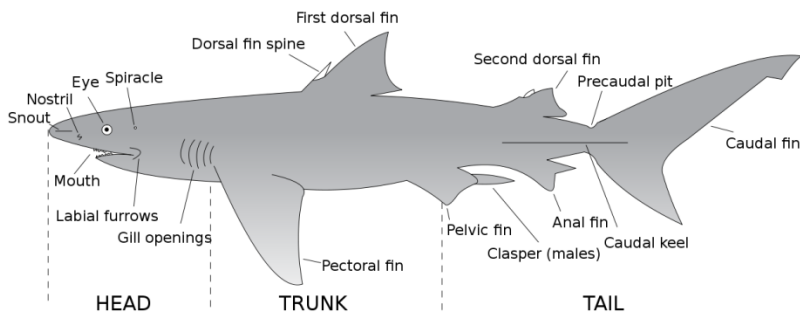


Figura 4.2 – Visione latero-ventrale della struttura anatomica di uno squalo.

Nel corso dell'evoluzione il corpo degli squali (Fig.4.2) si è evoluto in modi differenti per rispondere alle diverse esigenze biologiche ed ai diversi ambienti in cui vivono. Gli squali, infatti, sono praticamente cosmopoliti, avendo colonizzato quasi tutti gli ambienti marini e presentando adattamenti e fisionomie molto diverse tra loro (Compagno, 2002; Deacon *et al.*, 1998; Notarbartolo di Sciara *et al.*, 1998). Il corpo risulta conformato per adattarsi perfettamente alle esigenze del mondo acquatico (Fig. 4.2 e 4.3): il tipico squalo presenta corpo allungato e leggermente conico, con scheletro cartilagineo, muso a punta con cinque fessure branchiali (gli squali dal collare ne possono avere sei o sette e per questo sono considerate le specie più

primitive), la bocca è in posizione ventrale ed è fornita di molteplici file di denti, sul muso si aprono due narici simmetriche, gli occhi risultano laterali (sono dotati di tre palpebre, la terza è la cosiddetta membrana nittitante che si ritrova anche negli uccelli), davanti alle branchie troviamo lo spiracolo, cioè un'apertura collegata al retro della bocca con un canale interno (Notabartolo di Sciara *et al.*, 1998; Baccetti *et al.*, 1991). Le pinne sono solitamente nove: due dorsali, a forma di vessillo, di cui la seconda è più piccola e molto ricca di tessuto adiposo, nella parte ventrale del corpo vi sono due pettorali e due pelviche, tra le cui si apre la fessura della cloaca e le quali possono essere dotate di protuberanze allungate dette pterigopodi (organi sessuali maschili; Trainito, 2004; Ghigi, 1969); le anali che sono sotto la pinna caudale. La caudale risulta asimmetrica (coda eterocerca), con il lobo superiore più pronunciato (Notabartolo di Sciara *et al.*, 1998; Baccetti *et al.*, 1991). Questa asimmetria può risultare molto evidente in alcuni casi, come lo squalo volpe (fam. *Alopiidae*) che la usa come arma di difesa o per cacciare (Paccalet, 2003; Fig.4.3). Le diverse pinne sono conformate a seconda delle varie funzioni che assumono: le dorsali e le anali assicurano l'equilibrio evitando che il corpo si rivolti sul fianco a causa dell'azione del mezzo liquido, le pettorali e le pelviche vengono usate per controllare i movimenti e le virate ed infine la potente caudale assicura la propulsione (Baccetti *et al.*, 1991).



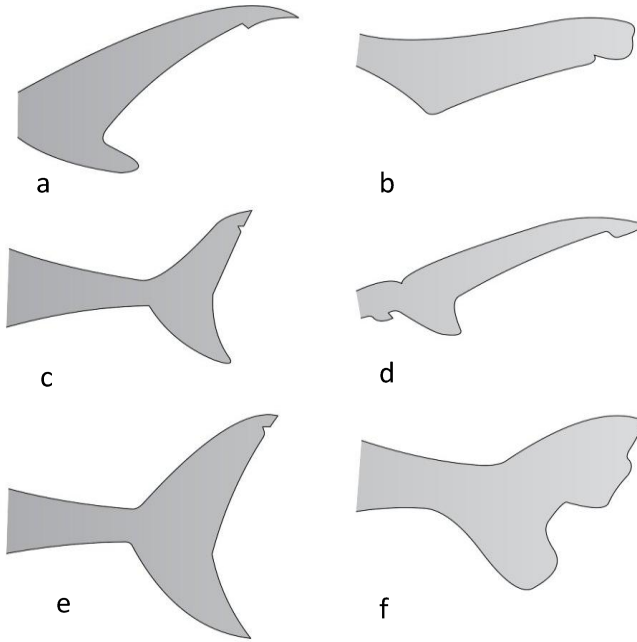


Fig. 4.3 - Tipologie di pinna caudale di squalo. (a) squalo tigre (*Galeocerdo cuvier*); (b) squalo nutrice (*Ginglymostoma cirratum*); (c) smeriglio (*Lamna nasus*); (d) squalo volpe (*Alopias vulpinus*); (e) squalo bianco (*Carcharodon carcharias*); (f) squalo sigaro (*Isistius brasiliensis*).

Riuscire ad ottenere misurazioni precise del corpo di uno squalo è una pratica particolarmente difficoltosa poiché le manipolazioni possono danneggiare l'esemplare e sottoporlo a condizioni di stress. Solitamente vengono utilizzati metodi di stima indiretta con metodi occhiometrici, confronti e fotografie. I metodi di misurazione basati sui parametri identificativi per la

misurazione del corpo (Mohan, 2004; Fig.4.4 e 4.5) sono i seguenti:

- lunghezza totale (LT, total length TL; Fig.4.4 e 4.5): questa tipologia di misurazione prevede che si misuri la lunghezza totale dell'animale partendo dalla punta del muso fino alla coda compresa;
- lunghezza forcilla (LF, fork length FL; Fig.4.4 e 4.5): questa tipologia di misura prevede che la lunghezza dell'animale sia misurata a partire dalla punta del muso fino al punto in cui la coda si biforca;
- lunghezza pre-caudale (LPC, pre-caudal length PCL; Fig.4.4 e 4.5): per ottenere questa misura si parte dalla punta del muso per arrivare fino alla fossetta pre-caudale.

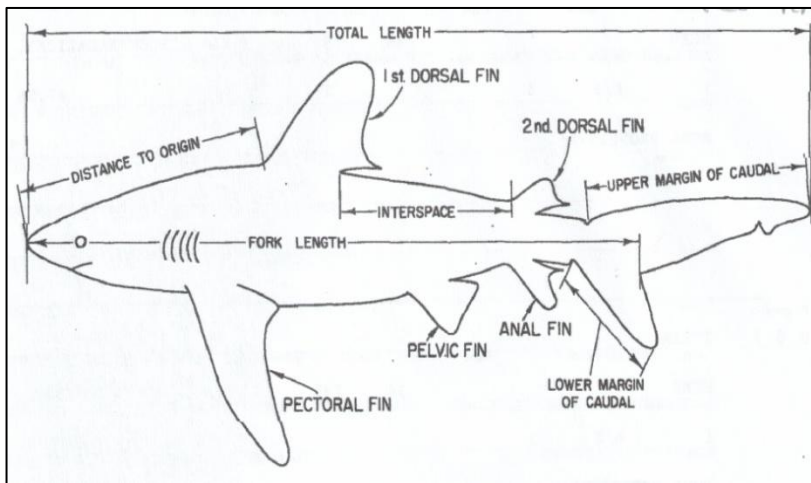


Fig. 4.4 - Immagine illustrante le tre tipologie di misura della lunghezza (Strasburg, 1958).

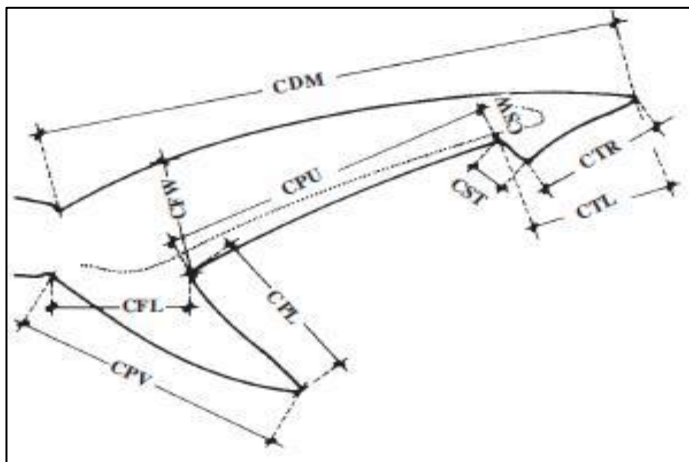


Fig. 4.5 - Immagine che mostra le posizioni dove si possono effettuare le misurazioni (Compagno, 2002).

## Capitolo 5

# 5. LA RIPRODUZIONE DEGLI ELASMOBRANCHII

Gli squali sono pesci caratterizzati da fecondazione interna, con un tasso di riproduttività basso ed uno sviluppo lento (Deacon *et al.*, 1998). Nella maggior parte dei pesci la femmina produce migliaia di uova per volta, ma questo non avviene negli Elasmobranchii, che in generale hanno un tasso di riproduttività basso e uno sviluppo lento (Deacon *et al.*, 1998). I sessi son

sempre separati ed esiste dimorfismo sessuale: i maschi sono generalmente più piccoli e portano due grandi organi copulatori. I principali componenti del tratto riproduttivo maschile negli Elasmobranchi comprendono: i testicoli, epididimo, ghiandola di Leydig, vasi deferenti o dotti di Wolffman, vasi efferenti, vescicole seminali o ghiandola alcalina, il dotto di Müller o utero maschile e lo pterigopodio vero e proprio (Paccalet, 2004; Mojetta, 2004; Conrath, 2005). I testicoli risultano sulla faccia superiore della cavità addominale, davanti ai reni ed uniti ad essi tramite legamenti (Mojetta, 2004); essi sono collegati dall'epididimo con i vasi efferenti, tramite i quali le cellule spermatiche passano dai testicoli all'epididimo. Quest'ultimo risulta in continuo coi dotti deferenti o di Wolffman, i quali a loro volta sono collegati alle vescicole seminferi; entrambi hanno la funzione di trattenere gli spermatozoi (Conrath, 2005). All'interno dell'epididimo viene secreto il fluido spermatico da parte della ghiandola del Leyding, per formare, insieme agli spermatozoi, il liquido spermatico completo. La ghiandola alcalina dei batoidedi sembra essere coinvolta nel mantenimento dello sperma in un ambiente idoneo (Conrath, 2005).

Gli pterigopodi sono il vero e proprio organo riproduttivo maschile che viene inserito nella cloaca femminile durante l'accoppiamento vero e proprio. Sono espansioni cartilaginee (pinne pelviche modificate) che si calcificano e s'induriscono man mano che l'animale diventa adulto (Trainito, 2004).

Le femmine sono generalmente più grandi dei maschi ed i componenti principali del tratto riproduttivo femminile includono le ovaie, *ostium* (permette alle uova appena ovulate di accedere all'apparato riproduttivo), ovidotto, ghiandola del guscio o nidamentale (produce sostanze di riserva come l'albumina utili all'uovo e uno strato corneo per proteggerlo), utero e cervice. Spesso un ovaio (solitamente il destro) è più sviluppato dell'altro (Henningsen *et al.*, 2004; Fig.5.1).

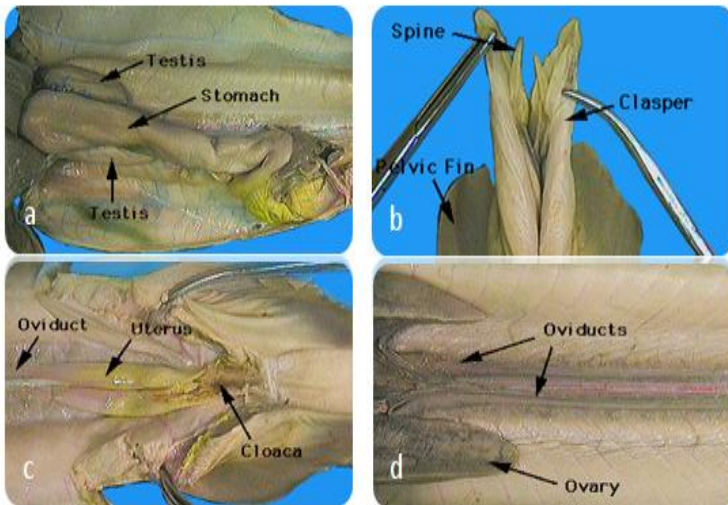


Figura 5.1 – Le quattro immagini mostrano i dettagli anatomici dell'apparato genitale maschile (a;b) e femminile (c;d) di uno squalo appartenente alla famiglia Squalidae. a), i testicoli (Testis); b), gli pterigopodi (o tubi di Clasper); c), l'utero e d), gli ovidutti (Oviducts) con il relativo ovario (Ovary); immagini da Virtual Sharks Lab, Phoenix University, 2013).

La fase di accoppiamento di solito è preceduta da diverse danze e rituali di corteggiamento da parte del maschio che successivamente morde una pinna pettorale della femmina per trattenerla durante l'accoppiamento e si avvolgerà intorno a quest'ultima per portare a termine l'atto copulatorio (Paccalet, 2003; Fig.5.2).

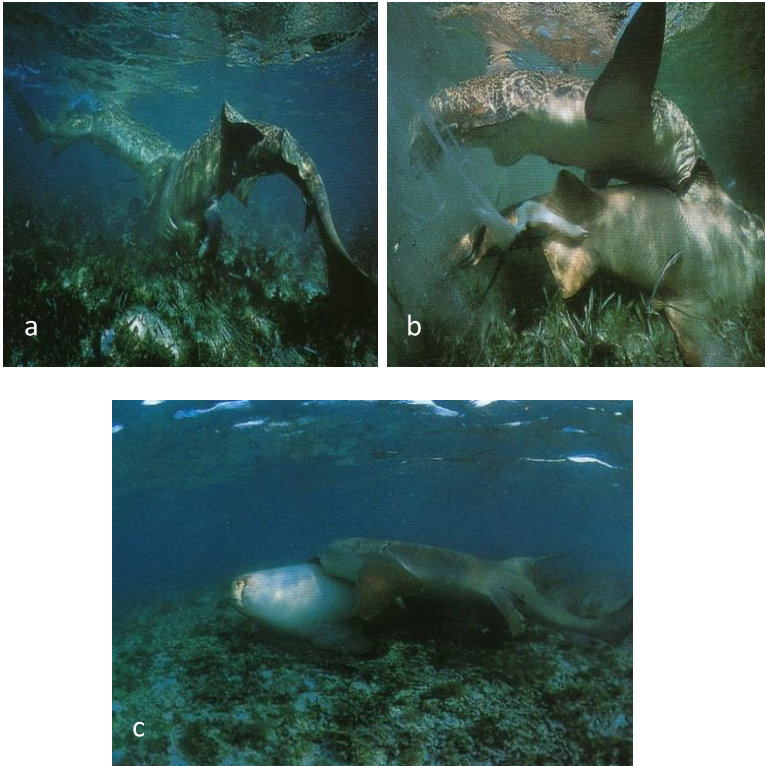


Figura 5.2 – Sequenza (a, b, c) illustrante le fase dell'accoppiamento di squali nutrice (*Ginglymostoma cirratum*; Mojetta, 2004).

Le specie (per esempio: razze, gattucci, squali di Port Jackson, squali bamboo, etc.) che depongono le uova producono un guscio corneo (Fig.5.3), che può assumere forme molto diverse (rettangolari, con geometrie a spirale, Fig.5.4) e che è dotato di filamenti spiraliformi a ciascun angolo, utili per ancorare le uova a supporti quali alghe, gorgonie o rocce (Trainito, 2004). Generalmente, l'embrione possiede, già ad un precoce stadio di sviluppo, delle branchie esterne che consentono di catturare ossigeno e a sali minerali che, dall'acqua, passano attraverso il guscio; questo adattamento ha agevolato l'instaurarsi di condizioni di ovoviviparità, e viviparità in molti gruppi di squali. In molte specie di squalo la femmina è in grado di trattenere lo sperma all'interno dei suoi ovidutti, per lunghi periodi di tempo, al fine di utilizzarlo per la fecondazione in un secondo momento (Henningesen *et al.*, 2004). In casi di ovoviviparità e viviparità lo sviluppo embrionale avviene all'interno del ventre materno, per cui la ghiandola nidamentale risulta regredire, per contro gli squali che sono ovipari presentano un utero poco sviluppato (Henningesen *et al.*, 2004).

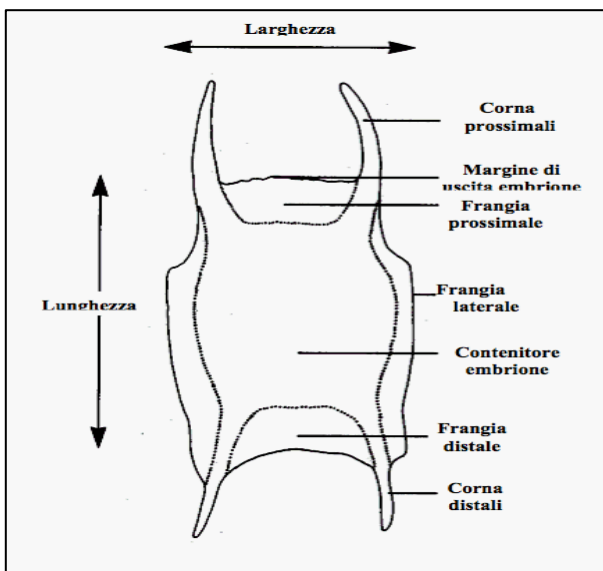


Figura 5.3 – Schema di un uovo di razza (Immagine da SharkMed, 2008)



Fig. 5.4 - Fotografia di un uovo di esemplare di *Heterodontus portjacksoni*, con la sua particolare architettura cornea (Mojetta, 2004).



Le modalità di riproduzione sono molto diverse tra loro (Henningesen *et al.*, 2004):

1) Riproduzione ovipara: al termine della fecondazione viene prodotto un' uovo con un rivestimento corneo che sarà deposto sul substrato. Possiamo dire che tutti gli Holocephali esistenti e i Rajiformi sono ovipari e si verifica anche in alcuni squali, nonostante i due terzi di essi e i batoidei siano vivipari (Paccalet, 2003).

2) Riproduzione vivipara aplacentata tramite sacco vitellino: al termine della fecondazione lo sviluppo embrionale avviene all'interno dell'utero e gli embrioni attingono nutrimento dal sacco vitellino (Hamlett *et al.*, 1998).

3) Riproduzione vivipara aplacentata con villi uterini o trophonemata: gli embrioni si sviluppano nell'utero mediante dipendenza trofica con la madre (trophonemata). Tale dipendenza è effettuata da espansioni cellulari denominate villi-intrauterini. Questi, producono un liquido altamente nutritivo; il latte uterino (Henningesen *et al.*, 2004).

4) Riproduzione vivipara aplacentata con, o senza, oofagia e cannibalismo intrauterino: è tipica dei lamnidi. Oofagia è il fenomeno per cui una parte degli embrioni prodotti degenerano, sotto controllo ormonale, e i pochi feti che invece si sviluppano correttamente se ne cibano. Il cannibalismo intrauterino, fin'ora riscontrato solo nello squalo toro (*Carcharias taurus*) è quel

fenomeno per il quale il primo embrione che si sviluppa si ciba di quelli restanti; per questo motivo è detto anche adelfofagia (Gilmore *et al.*, 1983; Gilmore, 1993).

5) Riproduzione vivipara placentata: prevede lo sviluppo intrauterino, e anche la formazione di una struttura simile alla placenta vera e propria. Quest'ultima risulta derivata dal sacco vitellino e grazie ad un legamento, che ricorda il cordone ombelicale dei mammiferi, al feto viene assicurato il nutrimento e l'eliminazione delle scorie tramite il sangue materno (Hamlett *et al.*, 1998).

Lo sviluppo embrionale ha tempi diversi e seconda della specie, può andare dai cinque a i dodici mesi (Müller e Henle, 1838 e Gilmore, 1993). Di solito le specie più grandi (squali bianchi, squali toro, squali tigre, squali balena, squali mako, verdesche) hanno gestazioni intorno ai dodici mesi. Lo sviluppo termina quando le riserve nutritive finiscono, sia nel caso di oviparità (Fig.5.5), ovoviviparità (Fig.5.6) che di viviparità (Fig.5.7; Henningsen *et al.*, 2004; Hamlett *et al.*, 1998 e Mojetta, 2004). Quando un embrione schiude, fora l'uovo nel margine d'uscita (Fig.5.5) e sguscia fuori. Nell'ovoviviparità la schiusa coincide con il parto (Fig.5.6), mentre per le specie vivipare l'embrione viene espulso tramite contrazioni ventrali come un parto vero e proprio (Henningsen, 2004; Fig.5.7).



Figura 5.5 – Sequenza (a, b, c, d) illustrante le fasi di sviluppo embrionale dello scilliorinide *Cephaloscyllium ventricosum* (Mojetta, 2004).

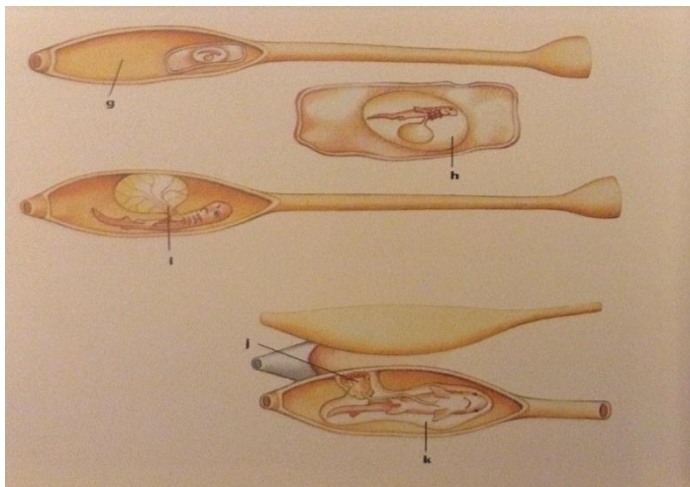


Figura 5.6 – Sequenza (g, h, i, k) illustrante le fasi di sviluppo embrionale di un carcarinide (Mojetta, 2004).

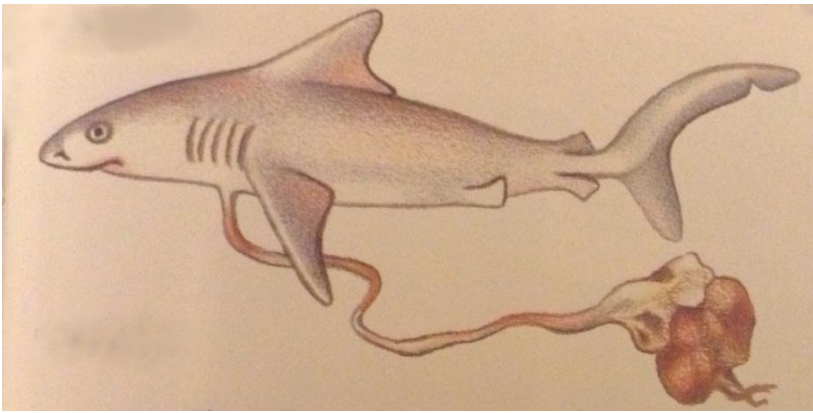


Figura 5.7 – Squalo viviparo con relativo cordone ombelicale collegato intimamente alla placenta della madre (Mojetta, 2004).

## *Capitolo 6*

---

### **6. GLI ELASMOBRANCHII IN AMBIENTE CONTROLLATO**

Le prime esposizioni di specie di squalo negli acquari pubblici e stazioni di biologia marina ebbero inizio nel 1860 ed il loro mantenimento in ambiente controllato fu da subito un successo. Questo successo portò ad un immediato sviluppo delle tecniche di cattura e di trasporto, della messa a punto dei requisiti di qualità dei parametri delle acque, dei regimi alimentari e delle metodiche di esposizione, molte delle quali sono ancora oggi utilizzate. Queste esposizioni rappresentarono alcune delle prime opportunità per poter osservare e documentare la biologia di queste specie (e.g., alimentazione e comportamenti riproduttivi; Koob 2004). Nonostante ciò, solo negli ultimi 10-15 anni i miglioramenti negli impianti di filtrazione hanno permesso di

ottenere maggiori successi (Morris *et al.*, 2010). Il mantenimento di questi animali risulta difficoltoso a causa delle problematiche che possono insorgere nelle diverse fasi del reperimento dell'individuo da esporre. In particolare il trasporto e l'acclimatazione sono dei punti critici, essendo animali molto delicati, soggetti a danni da stress eccessivo e non sempre adattabili alla vita in spazi limitati (Mohan *et al.*, 2004; Gendron *et al.*, 2004; Deahart, 2004; Marshall, 2004).

Per questo motivo è di fondamentale importanza pianificare le operazioni di cattura e trasporto ed assicurarsi che l'ambiente ospitante sia adatto. I punti critici che prenderemo in considerazione sono: cattura, acclimatazione, qualità delle acque, alimentazione, stress, crescita, spazio, illuminamento e fotoperiodo ed allestimento di vasche espositive per la crescita e lo sviluppo di squali demersali.

## **6.1 CATTURA**

La maggior parte dei Selacei marini importati o commercializzati in Europa sono per lo più specie tropicali, che vengono pescati direttamente nel loro ambiente naturale, stabulati in grandi vasche e successivamente spediti ai luoghi di destinazione (Morris *et al.*, 2010).

La cattura delle diverse specie avviene mediante l'utilizzo di particolari tecniche di pesca: in immersione con l'utilizzo di reti, dalle imbarcazioni con l'aiuto di reti a circuizione o a strascico, mediante l'utilizzo dei palangari, con l'uso di "trappole" come

ad esempio nasse, impiegando sostanze chimiche narcotizzanti somministrate nell'acqua nelle strette vicinanze dell'animale oppure iniettate direttamente, o semplicemente con l'uso della canna da pesca (Marshall, 2004). L'impiego di sostanze anestetizzanti viene utilizzato, per lo più, nella cattura di quegli esemplari che, avendo abitudini sedentarie e strettamente legate all'ambiente bentonico, si riescono ad avvicinare facilmente durante l'immersione (Marshall, 2004). Ad ogni specie di Selacei considerata viene abbinata la metodologia più idonea per la cattura (e.g., per i batoidei le metodiche più efficaci sono quelle che prevedono reti a strascico). Per specie appartenenti ad un habitat strutturalmente complesso come la barriera corallina l'utilizzo di singole strutture di cattura come le nasse o le canne da pesca sono metodica più efficace e sicuramente meno invasiva da utilizzare. Per i grandi nuotatori si utilizzano i palangari, reti a circuizione, oppure le canne da pesca (Marshall, 2004).

I Selacei che trovano mercato commerciale fanno parte di quel gruppo, abbastanza ristretto, di specie che possono sopportare la vita in ambiente controllato e soprattutto possono essere spostate dal luogo di cattura al luogo di destinazione. Il fattore che maggiormente incide sulla possibilità e sulla metodica di trasporto è la dimensione dell'esemplare che è stato catturato (Smith *et al.*, 2004).

## 6.2 ACCLIMATAZIONE

Il processo di acclimatazione prevede che gli Elasmobranchii catturati vengano messi in contatto gradualmente con l'acqua della vasca dove saranno destinati; in questo modo possono adattarsi alle nuove condizioni chimico-fisiche dell'acqua. Questo procedimento avviene mediante l'utilizzo di tubicini regolabili che portano l'acqua dell'impianto alla vasca dell'animale (Gendron *et al.*, 2004). Solitamente, prima di essere messi nella vasca di esposizione, gli animali vengono mantenuti per un periodo di tempo in una vasca separata dove passeranno la cosiddetta fase di stabulazione o di quarantena; questa fase è utile per curare eventuali lesioni, individuare organismi parassiti, infezioni e malattie o per assicurarsi che non ve ne siano (Choromanski, 2004). La vasca utilizzata per questo scopo è di solito priva di arredi in modo da facilitare l'osservazione dei soggetti ed individuare quelli eventualmente malati; in questo caso il soggetto malato può essere isolato in un settore preciso della vasca, o se di piccole dimensioni (e.g., un neonato) anche in una vaschetta accessoria, ed essere sottoposto alla terapia (Choromanski, 2004). La quarantena viene terminata quando l'esemplare o gli esemplari presentano condizioni di salute ottimali, stabili, si alimentano e sono attivi; a questo punto sono trasferiti nelle vasche espositive (Choromanski, 2004).

### 6.3 QUALITÀ DELLE ACQUE

Molti esemplari di Elasmobranchii che sono presenti negli acquari di tutto il mondo, sono specie tropicali. Occorre quindi ricreare un habitat simile a quello naturale e per questo motivo appare evidente l'importanza di un corretto mantenimento delle condizioni chimico-fisiche ottimali dell'acqua (Mohan *et al.*, 2004). Considerando che gli Elasmobranchii catturati provengono da regioni geografiche diverse e quindi da acque differenti, diventa difficile poter ricreare artificialmente un tipo di acqua "ideale" per ogni specie. Si cerca quindi di soddisfare, in linea generale, le esigenze delle diverse specie, creando un ambiente stabile che abbia caratteristiche di composizione e qualità dell'acqua che possano andare bene per tutti gli animali allevati. Per farlo occorre monitorare costantemente con analisi chimiche i differenti parametri che concorrono a caratterizzare l'acqua, come la salinità, la quale esprime la quantità di sali disciolti che va confrontata con il valore dell'acqua delle zone di provenienza delle diverse specie.

Il valore dell'ossigeno disciolto, vitale per gli animali ospitati in vasca, deve essere mantenuto sotto controllo mediante sistemi di ossigenazione dell'acqua, tramite insufflazione di aria (eg., areatore) o la semplice movimentazione (Mohan *et al.*, 2004).

Il valore di pH descrive la quantità di ioni  $H^+$ ,  $-\log[H^+]$ , disciolti nell'acqua e in acquario viene influenzato da molti fattori, come la concentrazione di anidride carbonica  $[CO_2]$ ,



acidi organici e capacità tampone, dovuta al contenuto di carbonati (e.g.,  $[\text{HCO}_3^-]$ ). Meno carbonati si formano in acqua, più rapidamente scende il valore di pH, perché si formeranno più ioni  $\text{H}^+$ . Con l'aumentare di processi quali la formazione dei gusci carbonatici dei molluschi e la fotosintesi, si ha un'elevata diminuzione di anidride carbonica; questa condizione causa l'aumento del valore di pH dell'acquario. Diventa, quindi, necessario un controllo, possibilmente quotidiano (Mohan *et al.*, 2004). Per valutare la  $[\text{CO}_2]$  bisogna tenere conto dell'equilibrio del carbonio in acqua e delle sue forme. In condizioni normali, il carbonio è presente come ione bicarbonato  $[\text{HCO}_3^-]$  e come ione carbonato  $[\text{CO}_3^{2-}]$  nell'acqua; la quantità di anidride carbonica legata nei carbonati e nei bicarbonati è cento volte superiore a quella dell'anidride carbonica libera. Il mare dispone così di una grandissima riserva di anidride carbonica, oltre ad essere in equilibrio con l'atmosfera. In condizioni di disequilibrio o di stress il tasso metabolico e l'attività degli organismi aumentano ed aumenta la domanda di ossigeno, aumentando la  $[\text{CO}_2]$  escreta con possibili problematiche legate a fenomeni di ipossia e di anossia (Cognetti *et al.*, 2008). L'anidride carbonica, che proviene dall'aria o dalla respirazione degli organismi acquatici, è sottoposta nell'acqua a diversi cambiamenti quali l'idratazione in carbonati o l'organizzazione per conto delle cellule vegetali tramite il ciclo di Calvin (Cognetti *et al.*, 2008).

Altri valori importanti in acquario sono i nitriti  $[\text{NO}_2^-]$  e i nitrati  $[\text{NO}_3^-]$ , che derivano dall'ammoniaca  $[\text{NH}_3]$  prodotta da

processi di decomposizione della materia organica che avvengono in vasca (e.g., cibo in decomposizione, escrementi, etc.). Se vi è la presenza di nitriti, si può parlare di un disturbo dell'equilibrio batterico o della catena di ossidazione batterica. Questi composti sono, solitamente, rimossi durante il ciclo dell'azoto svolto da batteri delle famiglie *Nitrosomonas* e *Nitrococcus*, che fanno parte del ciclo di filtrazione biologica e che hanno il compito di trasformare l'ammoniaca, in nitriti e nitrati (Mohan *et al.*, 2004). Questi ultimi, normalmente non dannosi se restano entro il limite soglia di 200 mg/l, si presentano in grosse quantità soprattutto in acquari con soli pesci e sono un buon indicatore per l'inquinamento dell'acqua. È possibile ridurli con diversi procedimenti come la decomposizione anaerobica mediante batteri, l'uso di filtro "percolatore" e l'utilizzo di organismi come i coralli vivi, i quali necessitano di nitrati come fonte di energia per il metabolismo (Nistri, 2004).

Per quanto riguarda i fosfati [ $\text{PO}_4^{3-}$ ] essi non devono aumentare troppo poichè possono creare fenomeni di squilibrio o di eutrofizzazione, chiaramente su scala ridotta. Il contenuto di fosfati aumenta in caso di elevata somministrazione di cibo o a causa del numero troppo alto di animali; per ridurli o contenerli vanno limitate le quantità degli alimenti e la numerosità degli esemplari ospitati in vasca (Mohan *et al.*, 2004; Nistri, 2004). Un parametro di particolare importanza, è senza dubbio la

temperatura dell'acqua, che sarà regolata in funzione delle specie che vi andranno a vivere (Mohan *et al.*, 2004).

Le funzioni principali che un sistema acquariologico deve svolgere sono: filtrazione meccanica, debatterizzazione, filtrazione biologica, eliminazione della frazione proteica e controllo automatico della temperatura. Queste funzioni sono svolte da appositi elementi tecnici (pompe per il movimento dell'acqua, filtri biologici, protein-skimmers, filtri UV) che devono essere mantenuti in perfetto funzionamento dagli acquaristi e dai tecnici (Ghittino, 1983). Uno dei compiti principali dell'acquarista (qualifica attribuita alle persone che seguono professionalmente la vita dei pesci o degli animali in generale in un grande acquario) è quello di assicurarsi che le caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua siano ottimali e non pregiudichino lo stato di salute dell'animale, inoltre deve provvedere ad una corretta alimentazione degli animali e all'individuazione, ove possibile, di eventuali principi di malattie.

Sono qui riportati i limiti dei parametri base raccomandati per il mantenimento di specie di Elasmobranchii eccezione fatta per la temperatura che rispecchia un parametro fisico molto soggettivo da specie a specie (Tab.6.1). Gli elementi principali presenti nelle acque (Na, Cl, Mg, K, SO<sub>4</sub> e Ca) devono essere mantenuti entro livelli del  $\pm 15\%$  rispetto ai valori naturali. Per quanto riguarda il valore del potenziale ossido riduttivo (ORP) è da considerarsi adatto se i parametri che lo compongono (e.g. il

totale di ossidanti residui, la concentrazione di ozono, etc.) sono nei limiti definiti di sicurezza (Mohan ed Aiken 2004).

Tabella 6.1 – La tabella mostra i limiti dei parametri delle acque (Mohan ed Aiken 2004).

PARAMETRI	RANGE	UNITÁ
Salinitá	25.0-35.0	g l-1 (ppt)
pH	8.0-8.4	% di saturazione
DO (Ossigeno disciolto)	85-98	NTU
Torbiditá	<0.15	mV
ORP	250-380	mg l-1
Ammoniaca, non-ionizzata (a 10°C)	<0.1	mg l-1
Ammoniaca, non-ionizzata (a 17°C)	<0.2	mg l-1
Ammoniaca, non-ionizzata (a 28°C)	<0.3	mg l-1
Nitriti	<0.1	mg l-1
Nitrati	<70.0	ufc 100 ml-1
Coliformi totali	<1000	mg l-1
Rame	<0.01	mg l-1
Zinco	<0.01	mg l-1
Nickel	<0.01	mg l-1
Ferro	<0.0	g l-1 (ppt)

## 6.4 ALIMENTAZIONE

Un aspetto molto importante nel mantenimento degli Elasmobranchii è la cura dell'alimentazione, che deve essere calibrarla attentamente per evitare deficienza di nutrienti essenziali (Janse *et al.*, 2004). La dieta ottimale è una

riproduzione fedele, per quanto il reperimento del cibo lo permetta, della dieta naturale dell'animale ed è compito dell'acquarista valutarla ed integrarla in caso di mancanza di elementi essenziali (Janse *et al.*, 2004). Una corretta alimentazione rappresenta un fattore fondamentale nell'ottenere buoni risultati nel mantenimento di animali in ambiente controllato (Janse *et al.*, 2004).

Benchè le conoscenze siano scarse, si hanno comunque delle buone basi di partenza, dettate soprattutto dall'esperienza acquisita dal personale specializzato che opera nei grandi acquari. Ogni specie avrà una dieta formulata e studiata appositamente per le proprie esigenze alimentari; bisognerà quindi studiare una serie di procedure esatte che garantiscano il raggiungimento dell'obiettivo (Janse *et al.*, 2004):

1. Stabilire la dieta ideale per i nostri pesci: carboidrati, grassi, lipidi, vitamine, etc.;
2. Individuare gli alimenti idonei che forniscano i requisiti da noi richiesti;
3. Reperire gli alimenti;
4. Individuare la metodologia più corretta per la conservazione;
5. Stabilire la quantità di cibo da somministrare in base alle diverse esigenze degli animali (taglia, numero di individui per vasca, etc.);
6. Stabilire le dimensioni dei pezzi di cibo somministrato e le metodiche di somministrazione;

7. Stabilire la frequenza di somministrazione giornaliera e/o settimanale del cibo e di eventuali integratori;
8. Stabilire una procedura standard per la preparazione del cibo;
9. Stabilire il modo più corretto per l'utilizzazione delle apparecchiature necessarie alla preparazione del cibo.

Questo semplicissimo schema, risulta indispensabile per ottenere un corretto sincronismo tra le varie persone che accudiscono gli animali in acquario e soprattutto è indispensabile per ottenere i migliori risultati nel loro allevamento. Il fattore principale cui prestare attenzione nella composizione della dieta riguarda l'apporto di macromolecole e di nutrienti essenziali, che devono essere bilanciate in modo corretto e mai mancare (Janse *et al.*, 2004; Horn, 1998). Le principali categorie di nutrienti da considerare sono (Janse *et al.*, 2004; Horn, 1998):

Grassi (o lipidi): sono sostanze indispensabili nella dieta e vengono usati per la produzione di energia; sprigionano quasi il doppio dell'energia apportata dalle proteine. Nell'alimentazione naturale della maggior parte degli Elasmobranchii, i grassi hanno una notevole importanza. Essendo predatori, quindi animali soggetti a un grande dispendio energetico durante la caccia, le prede con maggiore tenore in grassi sono, nel limite del possibile, quelle che vengono maggiormente "gradite" (Crow, 2004; Crow *et al.*, 2001; Crow *et al.*, 2004).

Proteine (o catene polipeptidiche): sono sostanze indispensabili nell'alimentazione di ogni essere vivente. Sono composte dai 24 amminoacidi (AA) conosciuti. L'animale ottiene gli amminoacidi essenziali estraendoli dal cibo, mentre gli altri sono prodotti dalle proteine ingerite. La mancanza di AA essenziali può causare gravi disturbi poiché sono indispensabili per la sintesi delle proteine, le quali sono necessarie per la crescita del pesce, essendo il materiale principale per la costruzione e deposizione di nuovi tessuti (Crow, 2004; Crow *et al.*, 2001; Crow *et al.*, 2004).

Zuccheri (o carboidrati): fanno parte di questi gli amidi (e.g., amilosio, amilopectina, etc.) che vengono prodotti solo dalle piante e non dagli animali. I carboidrati vegetali vengono accumulati in parte nel corpo animale come grassi e glicogeno. Anche i pesci devono prelevare il loro fabbisogno di carboidrati dai vegetali, come qualsiasi altro animale, oppure (se sono carnivori o più correttamente zoofagi), attraverso le loro prede che a loro volta si nutrono di vegetali (consumatori primari). Il glucosio viene accumulato come glicogeno, nel fegato e nei muscoli ed è un importante fonte di energia. Un'alimentazione eccessivamente ricca di carboidrati, causa nel pesce un accumulo patologico di grasso intorno agli organi interni (steatosi; Crow, 2004; Crow *et al.*, 2001; Crow *et al.*, 2004).

Sali minerali (o oligoelementi): nella dieta degli Elasmobranchii è particolarmente importante lo ioduro di potassio [KI]. Questa sostanza viene somministrata, come

integratore alimentare, nel cibo, in quanto importante nella prevenzione di problemi alla tiroide, come l'iperplasia della tiroide (gozzo). Queste disfunzioni metaboliche si evidenziano in un gran numero di esemplari mantenuti in ambiente controllato, sintomo evidente di carenza di questo sale (Morris *et al.*, 2010; Crow, 2004; Crow *et al.*, 2001; Crow *et al.*, 2004).

Vitamine: il ruolo delle vitamine è quello di catalizzare i vari processi vitali. Essendo fondamentali per le più importanti attività metaboliche, vanno fornite con la dieta a tutti i pesci che vengono mantenuti in condizioni di ambiente controllato, in quanto essi non sono in grado di sintetizzarle; un eccesso o carenza può causare danni più o meno gravi nell'organismo (Janse *et al.*, 2004).

Una delle patologie frequenti soprattutto in squali di grosse dimensioni sono le deformazioni della spina dorsale, a volte implementate da uno squilibrio vitaminico nell'alimentazione, come quelle che sono state studiate nello squalo toro (Preziosi *et al.*, 2006). Le vitamine si dividono in due gruppi: liposolubili (A, D, E, K) e idrosolubili (B, C). All'interno di quelle liposolubili si possono ricordare la vitamina A, che interviene nello sviluppo del tessuto osseo ed è un efficace epitelioprotettore; la vitamina D<sup>3</sup>, che favorisce il riassorbimento di calcio [Ca<sup>2+</sup>] a livello renale, l'assorbimento intestinale di fosforo [F<sup>-</sup>] e calcio ed i processi di mineralizzazione delle ossa. La vitamina E risulta fondamentale come "antiossidante biologico" (scavenger di membrana), nella respirazione



cellulare, nella biosintesi del DNA, del coenzima Q e del gruppo EME. Infine la vitamina K è un fattore essenziale per la coagulazione del sangue. All'interno delle vitamine idrosolubili si possono citare la vitamina B, che risulta essenziale in numerosi procedimenti metabolici, come ad esempio il metabolismo dei carboidrati e dei grassi; la vitamina C, che gioca un ruolo essenziale nel mantenimento dell'integrità dei tessuti connettivi ed ossei, ed è importante in tutte le reazioni d'idrossilazione. Inoltre svolge la funzione di antiossidante (scavenger citosolico) e concorre alla riparazione dei tessuti (Janse *et al.*, 2004).

Le vitamine sono solitamente aggiunte al cibo tramite integratori prodotti e commercializzati da varie aziende come: Mazuri® Vita-Zu Shark/ray tablets, PMI Nutrition International, Missouri, USA; e Aquavit® tablets, International Zoo Veterinary Group, Keighley, UK. Le vitamine possono essere in forma liquida, in polvere o in compresse, ciascuna formulazione con i propri vantaggi e svantaggi. La scelta della formulazione migliore da utilizzare varia in funzione del tipo e delle dimensioni di cibo somministrato, della specie in oggetto e dell'età degli individui. Le compresse sono la via più comune e di successo per somministrare supplementi vitaminici. Esse possono essere inserite negli alimenti da somministrare e vanno collocate in profondità poiché gli squali possono percepirne il gusto, non palatabile, e non ingoiare il pezzo (Janse *et al.*, 2004).

Il supplemento multi-vitaminico utilizzato all'Acquario di Cattolica è il Nutrazu® Vita-Zu Shark/ray tablets (Fig.6.1) che risulta composto da (Fig. 6.2):



Figura 6.1 – Nutrazu® Shark/ray tablets utilizzate all'Acquario di Cattolica (La scala metrica nell'immagine esprime le dimensioni di 1 cm).

<b>Product Form</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Each tablet is 1.5 grams, elongated and scored in the middle so it can be easily broken in half.</li> <li>• 600 tablets per canister; 12 canisters per case.</li> </ul>	
<b>Guaranteed Analysis</b>	
Vitamin A .....	5,000 IU
Vitamin D <sub>3</sub> .....	625 IU
Vitamin E .....	50 IU
Vitamin C .....	500 mg
Vitamin B <sub>12</sub> .....	3.75 mcg
Thiamin mononitrate .....	75 mg
Riboflavin .....	1.5 mg
Niacin .....	0.00625 mg
Pyridoxine .....	1.0 mg
Pantothenic acid .....	3.75 mg
Calcium .....	60 mg
Iodine (as calcium iodate) .....	250 mg
<b>Ingredients</b>	
Ascorbic acid (source of vitamin C), calcium iodate, dl-alpha tocopheryl acetate (source of vitamin E), dried corn syrup, thiamin mononitrate, biotin, zinc oxide, vitamin A acetate, corn oil, silicon dioxide, magnesium stearate, manganese oxide, calcium pantothenate, nicotinic acid, riboflavin, cholecalciferol (vitamin D <sub>3</sub> ), cobalt sulfate, folic acid, cyanocobalamin (vitamin B <sub>12</sub> ).	

Figura 6.2 – Etichetta illustrante la composizione delle compresse vitaminiche Nutrazu® Vita-Zu (Immagine da Mazuri®).

Per quanto riguarda la formulazione della dieta da somministrare ad animali in ambiente controllato abbiamo già detto che di solito si cerca di riprodurre quella tipica di ogni specie in natura, anche se non sempre vi si riesce fedelmente. Al fine di stabilire le abitudini alimentari di animali in ambiente naturale diventano per tanto molto importanti gli studi condotti sui contenuti stomacali di differenti specie. Questi progetti hanno permesso di capire che vi sono cambiamenti di dieta durante la crescita. Per esempio, molte specie di Carcarini (e.g., *C. limbatus*, *C. amboinensis*, *C. plumbeus*, *C. brevipinna*, *C. amblyrhynchoides*) in età giovanile si nutrono per lo più di invertebrati, come cefalopodi, crostacei, mentre in età adulta l'alimentazione risulta basata principalmente sui pesci teleostei (Janse, Firchau e Mohan, 2004). Quindi il regime alimentare cambia da specie a specie, ma anche a seconda dell'età degli individui e dalla stagione (Janse *et al.*, 2004). Questi studi si sono rivelati utili come linee guida per strutturare un regime alimentare adeguato nelle diverse specie, mantenendo sempre costante il principio per il quale la varietà dovrebbe essere la base della composizione di una dieta ottimale. In un'alimentazione bilanciata sia la componente magra che quella grassa, insieme a crostacei e cefalopodi, ed eventualmente bivalvi e gasteropodi, dovrebbero essere incluse. Inoltre l'uso di diversi alimenti con valori nutritivi differenti aumenterà la probabilità che gli elementi essenziali siano assunti (Janse *et al.*, 2004; Horn, 1998). Le variazioni nella dieta risultano facilmente

attuabili nel caso si adotti un sistema di alimentazione con più sessioni alla settimana. Di solito si cerca di utilizzare un solo tipo di cibo per ogni sessione, in questo modo gli animali saranno incoraggiati a mangiare anche i cibi da cui sono meno attratti, variando così le loro abitudini. Tale metodica viene applicata poiché, esistendo delle preferenze individuali anche all'interno della stessa specie, si cerca di evitare che gli esemplari le assecondino avendo una dieta monotematica (Klay, 1977).

## **6.5 STRESS**

Le problematiche legate a condizioni stressanti non sono delle patologie vere e proprie, ma sono comunque condizioni che possono creare dei disturbi e debilitare l'animale aprendo le porte ad eventuali agenti patogeni. I principali fattori di stress sono: il trasporto, la cattura, le frequenti variazioni di temperatura, valori chimici dell'acqua non rispondenti alle esigenze della specie, eccesso o difetto di gas disciolti (e.g., [O<sub>2</sub>] e [CO<sub>2</sub>]), errato ricircolo dell'acqua, materiale organico in sospensione, elevata densità, competizione alimentare e spaziale, eccesso di cataboliti ed anche l'alimentazione errata (Janse *et al.*, 2004; Choromanski, 2004; Mohan *et al.*, 2004; Gendron *et al.*, 2004; Marshall, 2004; Smith *et al.*, 2004). Tra questi la temperatura e la qualità dell'acqua giocano un ruolo rilevante. Anche la paura è un fattore di stress da non sottovalutare; stati di paura possono essere provocati da lavori di manutenzione

effettuati nella vasca, immersioni, forti rumori, dalla cattura dei pesci con il retino, etc. Uno stress estremo può causare un effetto shockante e portare addirittura alla morte dell'animale. Inoltre i patogeni come virus, batteri e parassiti, trovano spesso un terreno di favorevole impianto in soggetti debilitati dallo stress (Gridelli, 2002).

In generale, le patologie dei pesci sono difficoltose da individuare e curare, diventa pertanto indispensabile la prevenzione. La quarantena è uno strumento importante per la prevenzione delle malattie e dovrebbe essere imposta ogni volta che un animale è trasferito dal suo ambiente naturale o da un'altra struttura ad un ambiente confinato (Choromanski, 2004).

## **6.6 CRESCITA**

In qualsiasi studio che prende in considerazione l'età e la crescita, di uno o più individui della medesima specie è di particolare importanza determinare accuratamente le dimensioni corporee (e.g., lunghezza e/o peso) e l'età di riferimento (Mohan, Clark e Schmid 2004).

Lo storico successo nella gestione di squali e razze in ambiente controllato ha offerto ai ricercatori l'opportunità di raccogliere utili informazioni inerenti la loro storia di vita, che risulterebbero di difficile reperimento studiando i

conspecifici selvatici (Uchida *et al.*, 1990; Van Dykhuizen e Mollet 1992; Schmid e Murru 1990; Henningsen 2004).

Posto ciò, le possibili influenze del mantenimento in ambiente controllato sulla crescita non possono essere ignorate, considerando i dati contrastanti raccolti studiando l'accrescimento nei conspecifici selvatici posti in differenti località (Mohan, Clark e Schmid 2004). Infatti, alcuni parametri come la temperatura dell'acqua (Wass 1973), la quantità dell'ossigeno disciolto (Pauly 1979; Casey *et al.*, 1985) e la pressione da predazione (Branstetter e McEachran 1986), possono influenzare fortemente tale variabile. Per questo motivo è ragionevole assumere che, eccetto la predazione, tali variabili ambientali avranno un importante impatto sulla crescita in ambiente controllato (Branstetter e McEachran 1986).

## **6.7 SPAZIO**

Le costrizioni spaziali in ambiente controllato causano potenziale stress negli Elasmobranchii (Murru 1990). Le dimensioni e la forma di un exhibit hanno infatti un impatto diretto sul comportamento degli animali. Se un exhibit è troppo piccolo la mancanza di spazio limiterà le modalità natatorie e potrà causare fenomeni di aggressività oltre a limitare le attività riproduttive (Murru 1990). Di contro se un

esposizione molto grande possiede angoli di 90° si potranno osservare complicanze nel nuoto (Murru, 1990).

Sono perciò consigliati grandi spazi conformi alle caratteristiche della specie mantenuta, reperibili in bibliografia (Powell, Wisner e Rupp 2004; Fig.6.3).

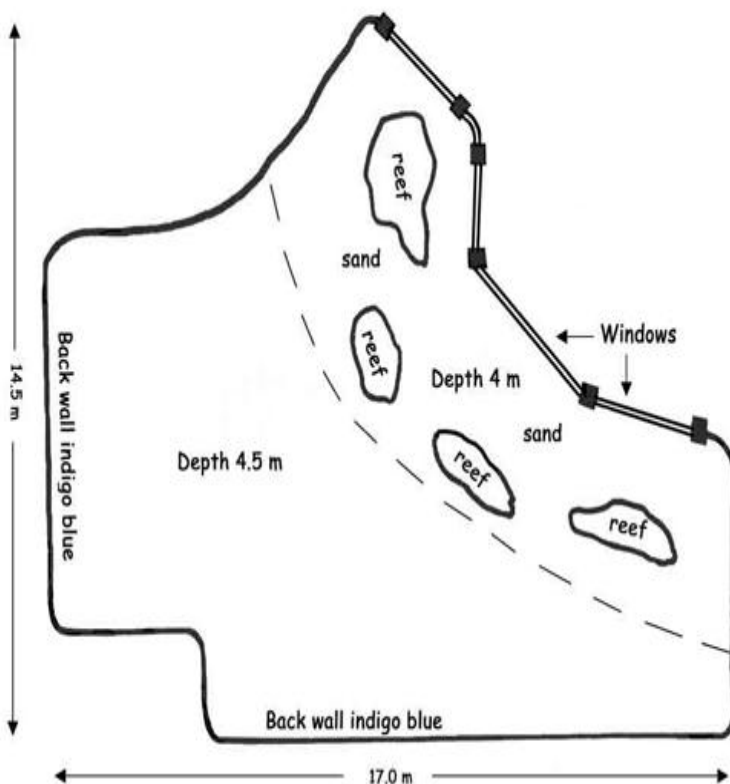


Figura 6.3 – Schema del South Pacific Ocean exhibit. Si tratta di un innovativo design con reef ben illuminati e fondi sabbiosi che promuovono l'illusione di un ambiente senza costrizioni (Point Defiance Zoo, Aquarium, Tacoma, Washington, USA).

## 6.8 ILLUMINAMENTO E FOTOPERIODO

Diversi livelli di luce potrebbero presentare un potenziale stress per gli elasmobranchii ospitati in acquario (Moe 1992). L'intensità luminosa, la qualità della luce ed il fotoperiodo influenzano infatti la capacità di un pesce di produrre vitamine, nuotare e riprodursi (Moe 1992). Sebbene non vi siano studi scientifici a supporto di questa affermazione, è possibile che inappropriati fotoperiodi e/o una mancanza di periodi crepuscolari a bassa illuminazione, potrebbero causare eventi di stress negli elasmobranchii. Cambi repentini d'illuminazione, dalla completa oscurità ad un'alta luminosità, o viceversa, sono certamente non raccomandati, in quanto gli squali potrebbero reagire improvvisamente ed in maniera irregolare (Moe 1992). Quando si vuole effettuare osservazioni in ambiente controllato sul ciclo vitale degli elasmobranchii, è importante considerare la loro attività giornaliera, che per squali demersali come *Heterodontus francisci* (horn shark) e *Cephaloscyllium ventriosum* (swell shark), ha uno spiccato carattere notturno (Nelson e Johnson, 1970). Tenere in considerazione le abitudini delle varie specie da osservare è di fondamentale importanza. Specie diurne e specie notturne andrebbero approcciate in maniera molto differente (Fig.6.4; Nelson e Johnson, 1970).



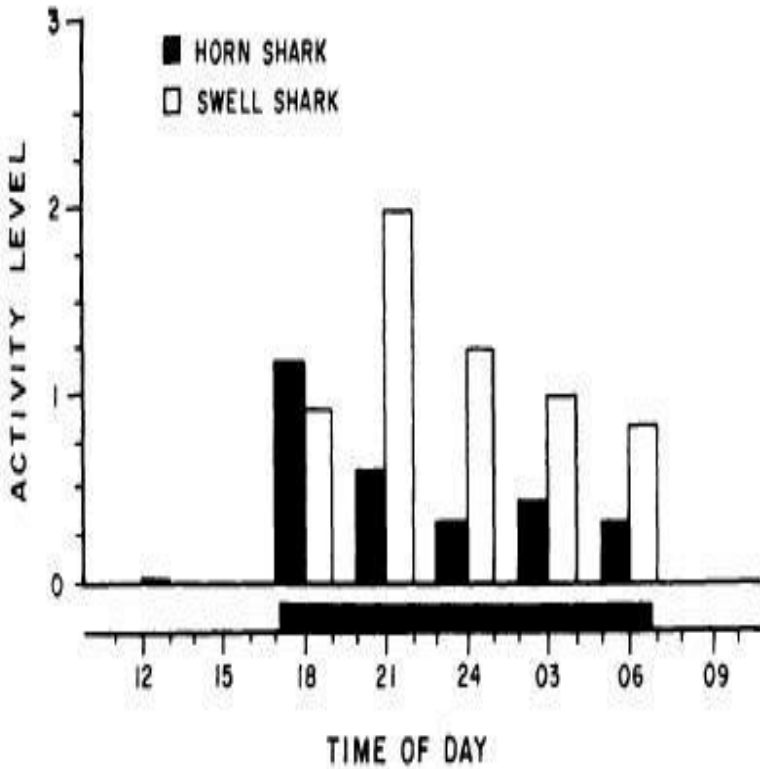


Figura 6.4 – Il grafico (Nelson e Johnson, 1970) mostra la relazione del livello di attività (activity level), in ordinata, con le ore del fotoperiodo giornaliero (time of day), in ascissa; così evidenziando la spiccata attività notturna degli squali demersali (qui: *Heterodontus francisci* (horn shark) e *Cephaloscyllium ventriosum* (swell shark).

## **6.9 ALLESTIMENTO DI VASCHE TEMATICHE PER LA CRESCITA E LO SVILUPPO DI SQUALI DEMERSALI**

Vasche espositive di piccoli squali demersali di barriera dovranno simulare, il più possibile, il loro ambiente naturale incorporandovi rocce vere o artificiali, pesci compatibili, invertebrati e alghe senza che ciò possa compromettere i loro bisogni fisiologici. Una exhibit adatta a questo tipo di specie dovrebbe essere dotata di dolci flussi di corrente con lunghe zone di apertura, possibilmente sabbiose, tra affioramenti rocciosi (Powell, Wisner e Rupp 2004). Inoltre, se si ha la possibilità di avere embrioni di squalo in via di sviluppo e neonati appena schiusi, si possono ottenere vasche espositive con un elevato potere didattico-informativo (Powell, Wisner e Rupp 2004). Gli embrioni possono rimanere all'interno dell'uovo, dai 6 a i 24 mesi prima della schiusa (Powell, Wisner e Rupp 2004). Per questo motivo le exhibit di riferimento dovranno possedere: un'adeguata illuminazione che favorisca la visualizzazione degli embrioni all'interno delle uova (pulite) e tutta una serie di accorgimenti tecnico-impiantistici che permettano di mantenere costanti le condizioni ambientali favorevoli al mantenimento e allo sviluppo dei piccoli. Tali accorgimenti tecnico impiantistici possono essere riassunti come segue: 1) impianti di filtrazione: filtri biologici, meccanica e protein-skimmer; 2) sterilizzazione: lampade UVC; 3) ricircolo: mandate regolate ad una medio-bassa portata di flusso; 4)

illuminazione: verticale tenue, trasversale accessoria per evidenziare gli embrioni nelle uova; 5) arredamento: scarno, possibilmente evitando oggetti instabili, appuntiti, particolarmente appiccicosi e/o limitanti il nuoto, ma con oggetti, o anche animali compatibili (e.g., coralli), che garantiscano rifugio agli esemplari appena nati; 6) fondale: ampio con granulometrie fini; 7) forma della vasca: possibilmente circolare per non disorientare il nuoto degli animali (West e Carter, 1990; Croft, 1997).

## *Capitolo 7*

---

### **7. LO SQUALO BAMBOO (*Chiloscyllium punctatum*, Müller e Henle 1838)**

La classificazione dello squalo bamboo dalle bande marroni viene rappresentata come segue: Condroitti (Classe, Huxley 1880), Elasmobranchii (Sottoclasse, Bonaparte 1838), Orectolobiformi (Ordine, Compagno 1973), Hemiscyllidae (Famiglia, Gill 1862), *Chiloscyllium* (Genere, Müller ed Henle 1837) e *Chiloscyllium punctatum* (Specie, Müller ed Henle 1838).

Il gruppo, comunemente denominato squali bamboo, si riferisce alla famiglia degli Hemiscyllidae (Gill 1862). Allo stato attuale sono conosciute ben 15 specie appartenenti

a questa famiglia distribuite in due generi differenti: *Hemiscyllium* (Müller ed Henle 1837) e *Chiloscyllium* (Müller ed Henle 1837).

## 7.1 EMBRIOLOGIA

La durata d'incubazione di un embrione di *C. punctatum* varia tra i 77 ed i 123 giorni dopo la deposizione (gdd, o days post deposition, dpd, Harahush *et al.*, 2007), con una media di  $98.4 \pm 6.77$  gdd (Harahush *et al.*, 2007). Harahush *et al.* hanno stabilito che la percentuale di schiusa si attesta intorno al 73% a temperature tra i 21 e i 25°C. L'embrione diventa visibile ad occhio nudo a partire dal 18° gdd (Fig.7.1). La crescita embrionale è più rapida dal 99° gdd in poi (Harahush *et al.*, 2007).



Figura 7.1 - L'immagine mostra un embrione di *Chiloscyllium punctatum* al 18° gdd. L'embrione è ben visibile ad occhio nudo insieme al relativo sacco vitellino (Foto di Giovanni Rossi, 2014).

## 7.2 MORFOLOGIA E BIOMETRIA

Dopo la schiusa, i neonati di *C. punctatum* (Fig.7.2), presentano caratteristiche bande scure trasversali e solitamente alcune piccole macchie scure; le bande non sono sempre unicamente nere, possono essere anche marrone chiaro o scuro. Gli adulti invece (Fig.7.3), sono di colore marrone chiaro e solitamente non possiedono un preciso modello di colorazione (Compagno e Niem 1998). La morfologia generale è caratterizzata da narici sub-terminali sul muso dotate di barbigli, molto peculiari in questa specie; allungata porzione pre-orale del muso; bocca più vicina agli occhi rispetto l'apice del muso; occhi e cresta supra-orbitale marcatamente elevati. La pinna caudale possiede una pronunciata incisione sub-terminale, ma senza lobo ventrale. Le due pinne dorsali sono più larghe del paio pelvico, con punte proiettate posteriormente e libere (Compagno 2001).



Figura 7.2 – Neonati di squalo bamboo. L'immagine mostra due neonati di *Chiloscyllium punctatum* (Foto di Giovanni Rossi, 2014).

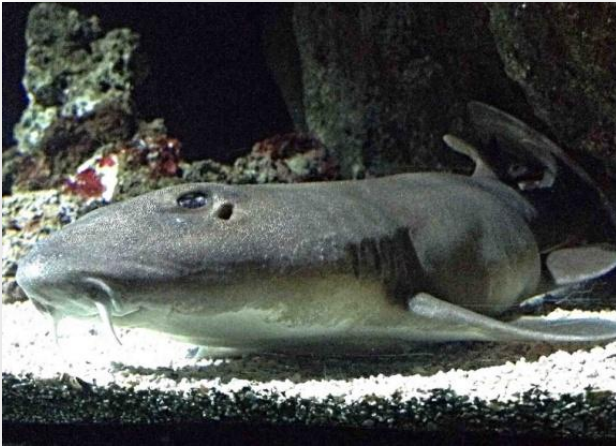


Figura 7.3 – Adulto di squalo bamboo. L'immagine mostra una femmina di *Chiloscyllium punctatum* (Foto di Giovanni Rossi, 2014).

Le uova si presentano di colore giallo ocra con forma ovoidale appiattita dorso-ventralmente e completa assenza di corna distali e prossimali (Fig.5.3 e 7.1). Presentano una spiccata polarità morfo-funzionale: la porzione apicale dell'uovo, con ampia frangia distale da cui si protende un lungo filamento costituito da una particolare sostanza colloidale, ricoprente l'uovo, mentre il margine basale è caratterizzato da una pressoché assente frangia prossimale e guscio corneo assottigliato. Le dimensioni medie di un uovo fresco (Fig.7.1) sono:  $4.3 \pm 0.25$  cm (media  $\pm$  SD) in larghezza,  $9.5 \pm 0.62$  cm in lunghezza,  $2.2 \pm 0.13$  cm di spessore e  $30.1 \pm 4.01$  g in peso (Harahush *et al.*, 2007). Le dimensioni medie di un neonato sono:  $14.8 \pm 0.67$  cm in lunghezza e  $11.2 \pm 1.34$  g in peso (Harahush *et al.*, 2007). Gli adulti raggiungono dimensioni massime in lunghezza di circa 118 cm (LT; Harahush *et al.*, 2007). Le informazioni biometriche sono di grande utilità negli studi di riproduzione, poiché permettono di stimare la maturità sessuale degli individui. Gli esemplari di sesso maschile raggiungono la maturità sessuale tra i 68 ed i 76 cm (LT), mentre le femmine intorno ad i 63 cm (LT; Compagno 2001).

### **7.3 RIPRODUZIONE**

Il *C. punctatum* è una specie ovipara con attività di accoppiamento e deposizione presumibilmente notturne (Harahush *et al.*, 2007). Durante il giorno sono stati osservati

(Harahush *et al.*, 2007) eventi di corteggiamento, durante i quali il maschio usava la propria bocca per afferrare la pinna dorsale della femmina. Durante l'accoppiamento il maschio sottomette la femmina a viva forza e la copula avviene lungo la colonna d'acqua, con penetrazione della cloaca da parte di uno solo dei due pterigopodi (Harahush *et al.*, 2007, Compagno 1984).

## 7.4 ECOLOGIA

È stimato che l'ambiente di vita di *C. punctatum* si estenda dalla superficie fino a 85 m di profondità, prossimo al limite della zona eufotica (100 m; Compagno 1984). Nei primi stadi di vita, i neonati di *C. punctatum*, trovano riparo in fessure rocciose e tra i coralli, mimetizzandosi sfruttando la loro tipica livrea bandata (Bennet 2003). Di conseguenza il *C. punctatum* viene comunemente osservato in stretta vicinanza delle barriere coralline e spesso nelle relative pozze di marea (Compagno 1984). Le aree nursery sono individuate anche in zone dove vi sono fitte forme di vegetazione (e.g., praterie di fanerogame marine e/o alghe a canopy), che garantiscono abbondante disponibilità di cibo e protezione per la crescita dei giovanili (Branstetter 1990). Sebbene l'uso delle stesse aree nursery incrementa l'opportunità che si verifichino eventi competitivi per le risorse nutritive, le barriere coralline sono zone altamente produttive e possono perciò supportare la nutrizione di molte specie diverse di elasmobranchii



(Robertson e Duke 1987, Simpfendorfer e Milward 1993). Il *C. punctatum* è una specie estremamente resistente a diversi livelli di ipossia; tale peculiarità gli permette di vivere ed occupare ambienti sottoposti a cicliche condizioni di anossia (e.g., piane delle barriere coralline; Bennet 2003). Sono infatti state documentate catture di *Chiloscyllium punctatum* in zone occupate da praterie di fanerogame marine, delineando una stretta associazione con la specie *Posidonia australis* (White e Potter 2004).

## 7.5 DISTRIBUZIONE

*C. punctatum* vive nell'oceano indo-pacifico occidentale (Fig.7.4): nei pressi dell'isola di Andaman e dall'India orientale fino alle Filippine, quindi dal nord del Giappone all'Australia (Compagno 1984).



Figura 7.4 – Mappa rilasciata da IUCN red list 2013, riguardante l'areale di *Chiloscyllium punctatum*. L'area gialla mostra il suo range spaziale; creato mediante l'integrazione delle osservazioni registrate.

## 7.6 NUTRIZIONE

La dieta specifica in natura di *C. punctatum* non è del tutto chiara, tuttavia, in letteratura si trova una relazione con due diverse categorie di prede: invertebrati bentonici e piccoli pesci (Compagno 2001). In seguito ad osservazioni effettuate a Moreton Bay (Australia) si è scoperto che la loro dieta naturale è a base di: granchi, vermi policheti, gamberetti e piccoli pesci ossei (Bennet 2003).

## 7.7 COMPETIZIONE ALIMENTARE E SPAZIALE

In letteratura non si trovano precisi riferimenti sull'argomento, tuttavia, sono presenti utili informazioni sulla competizione alimentare delle specie ittiche in genere e nello specifico si trova un caso studio dove è compresa anche la specie studiata (White e Potter 2004).

Helfman 1978, Schoener 1993 e Ross 1986 affermano che quando una certa quantità di pesci si concentra nello stesso ambiente, il potenziale di competizione alimentare e spaziale in aumento è ridotto da un'equa ripartizione delle risorse alimentari sia in termini quantitativi che temporali (Helfman 1978, Schoener 1993 e Ross 1986). Un esempio di un'equa ripartizione delle risorse alimentari e di spazio in ambienti densamente popolati da

pesci ci è fornito da uno studio effettuato in Shark Bay (Australia) da W. T. White e I. C. Potter. I due scienziati arrivarono alla conclusione che le risorse spaziali e di cibo, nelle acque costiere e superficiali, erano equamente ripartite tra alcune specie di elasmobranchii (*C. punctatum* compreso), che riducevano così il potenziale di competizione (White e Potter 2004). Queste risorse possono inoltre essere ripartite a livello temporale, e.g. durante i cambi stagionali quando i pesci occupano un dato habitat rispetto ad un altro o da differenze di regime alimentare tra il giorno e la notte (Piet e Guruge 1997, Platell e Potter 2001, Linke *et al.* 2001). Anche l'aspetto dimensionale del cibo diventa basilare perché le dimensioni cambiano con il cambiare delle dimensioni corporee dei consumatori, quindi la misura in cui sia probabile e possibile una competizione per le risorse alimentari e spaziali dipenderà dalle dimensioni relative degli individui (Werner e Gilliam 1984, Schafer *et al.* 2002).

## 8. MATERIALI E METODI

Nel corso dello svolgimento della tesi sono state analizzate le attività riproduttive di una coppia di adulti di squalo bamboo (*Chiloscyllium punctatum*) e la crescita dei relativi nascituri durante i primi due mesi di divezzamento dal sacco vitellino. Gli esemplari presi in esame durante il periodo di tesi, un maschio ed una femmina adulti e quindici neonati, sono stati mantenuti in un unico sistema di vasche (Fig.8.1; 8.2; 8.3; 8.4) composto da una vasca principale denominata “*Lo scrigno di Nettuno*” (per gli addetti ai lavori: *Vasca 5* (V5)), che ospitava la coppia di *C. punctatum* insieme a numerosi pesci tropicali e cinque vaschette secondarie denominate “*Tematiche Nursery*” (per gli addetti ai lavori: *Tematiche Vasca 5* (Tem5)), che ospitavano solo i neonati.

### 8.1 AREA DI STUDIO

La V5, localizzata all’entrata del tunnel tropicale di ponente e le relative Tem5, poste immediatamente dopo, sono parti integranti del percorso blu dell’Acquario di Cattolica.

## 8.1.1 “Lo scrigno di Nettuno” (V5)

La vasca principale (V5; Fig.8.1 e 8.2) ha una capacità di 40.000 litri (40mc) di acqua ed è composta di due parti messe in comunicazione come si evince in Fig. 8.1 e 8.2.

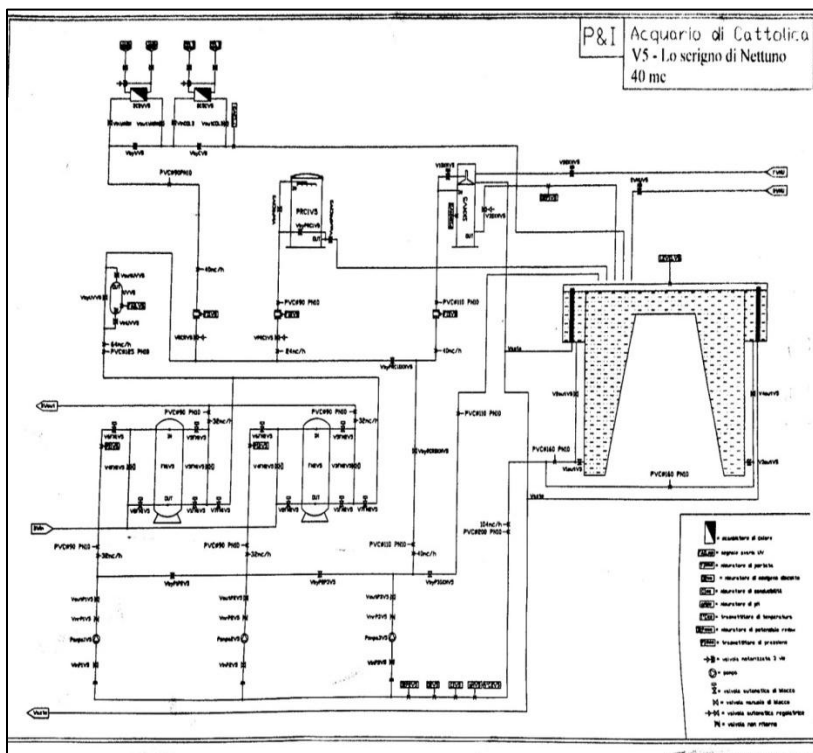


Figura 8.1 – Schema dell’impianto della vasca: “Lo scrigno di Nettuno” (Schema concesso gentilmente dal personale dell’Acquario di Cattolica, 2014).

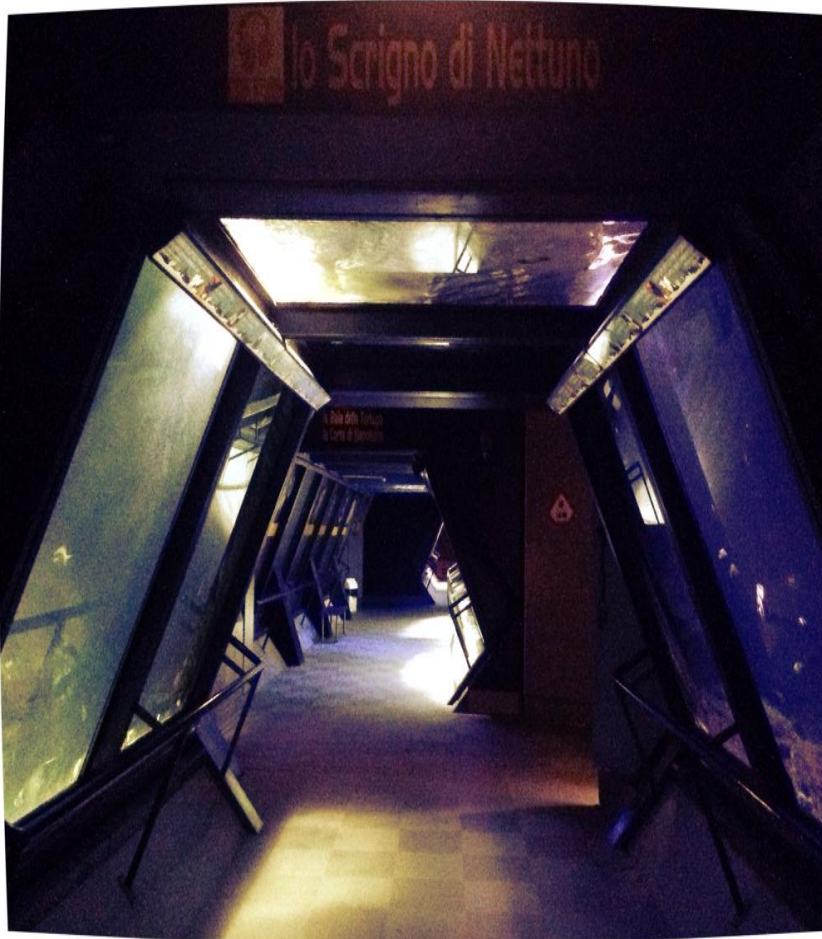


Figura 8.2 – Exhibit della vasca “*Lo scrigno di Nettuno*” all’interno del tunnel tropicale del percorso blu dell’Acquario di Cattolica (Foto di Giovanni Rossi, 2014).

### 8.1.2 “*Tematiche Nursery*” (Tem5)

Le uova ed i neonati erano ospitati in un sotto-sistema di vasche espositive denominato: “*Tematiche Nursery*” (Fig. 8.3 e 8.4). Tale sistema di vasche è stato messo in funzione ed allestito *ex novo* proprio per ospitare gli esemplari oggetto di tesi. Le cinque vaschette espositive, ciascuna con una capacità di 27 litri d’acqua, sono state numerate da 1 a 5 e dotate ciascuna di un anti-salto a protezione della vasca, per evitare che i neonati saltassero fuori. Il retro (Fig.8.3a) è stato allestito come zona di lavoro, mentre il fronte delle vasche si trova rivolto verso il percorso espositivo attraverso 5 oblò (Fig.8.3b). Tale soluzione ha permesso al pubblico di poter vedere gli embrioni in via di sviluppo ed i piccoli squali appena nati e a pochi giorni dalla schiusa.

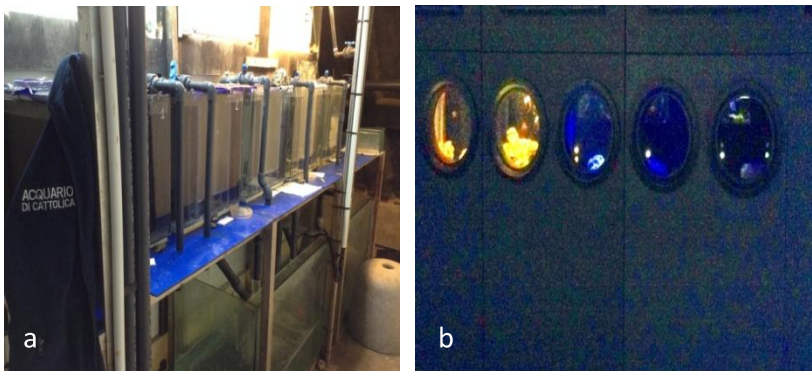


Figura 8.3 – Le immagini mostrano: (a) il retro (zona di lavoro) e (b) la facciata composta da i 5 oblò espositivi delle “*Tematiche Nursery*” (Foto di Giovanni Rossi, 2014).

In Figura 8.4 si può osservare schematicamente il sistema delle vasche nella sua interezza. Al centro del sistema vi è l'impianto principale: "Lo scrigno di Nettuno", collegato con le sottostanti 5 vasche tematiche: "Tematiche Nursery" (V1,2,3,4,5). Le frecce blu tratteggiate mostrano i collegamenti diretti tra l'impianto principale e le vasche tematiche. Mentre le frecce rosse indicano gli scarichi di ciascuna vasca tematica nella riserva, collegata alla vasca principale tramite due pompe di rilancio gestite da un sistema a 3 galleggianti per l'accensione e lo spegnimento automatico.

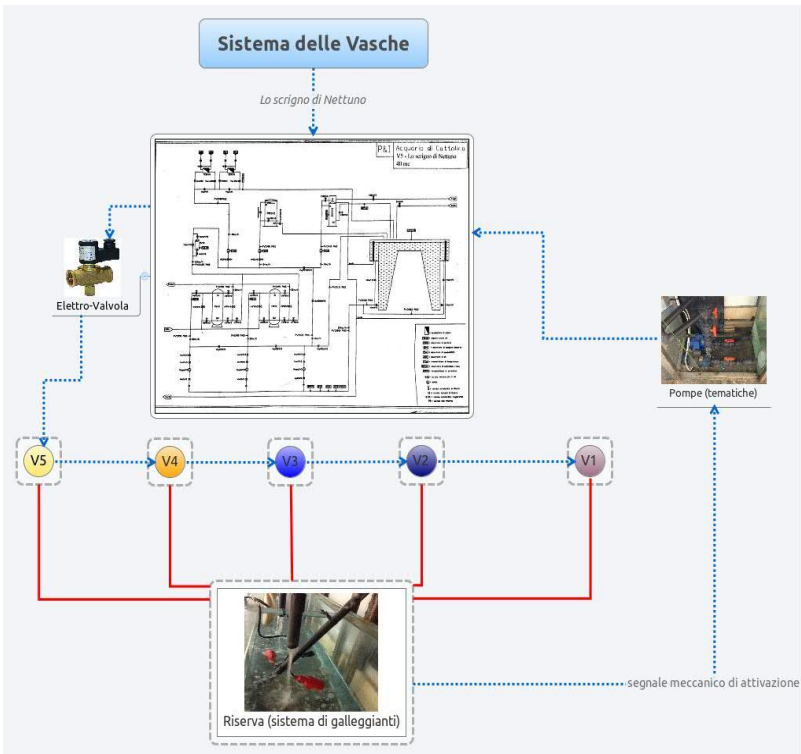


Figura 8.4



### 8.1.3 Vasche di contenimento e separazione

Un'altra vasca è stata allestita sul tetto della V5 in prossimità della mandata del protein-skimmer (PSK; acqua purificata, vd. paragrafo 8.1.4) per ospitare i neonati cresciuti eccessivamente in dimensione e non più idonei ad essere ospitati nel sistema di nursery. In aggiunta sono state allestite alcune vaschette di separazione che venivano utilizzate per ulteriori separazioni di uova e nascituri e per osservazioni di quarantena (Fig.8.5).



Figura 8.5 – Vasca di contenimento in prossimità della mandata del protein-skimmer (vista da due diverse angolazioni) insieme ad una vaschetta di separazione. In questo specifico caso la separazione era effettuata su un neonato in affanno respiratorio monitorato di continuo (Foto di Stefano Gridelli, 2014).

## 8.2 FILTRAZIONE DELLE ACQUE

L'acqua prelevata sia dal fondo della vasca (V5) che dagli skimmer superficiali, è inviata agli impianti di trattamento per mezzo di tre pompe esterne (Pompa 1, 2 e 3) aventi una portata di 32 mc/h/cad. P1 e P2 costringono l'acqua ad attraversare due filtri meccanici (Fig.8.6 e 8.1) a sabbia quarzifera di Ø 120. Successivamente, l'acqua attraversa uno sterilizzatore a raggi UVC (Fig.8.8 e 8.1), uno scambiatore di calore (Fig.8.9 e in Fig.8.1 con un ulteriore scambiatore di backup) ed alimenta un filtro biologico (Fig.8.7a,b e 8.1) di Ø 150 cm. P3 conduce una porzione d'acqua predeterminata ad uno schiumatore di proteine (protein-skimmer; Fig.8.10a,b) di Ø 120 cm.



Figura 8.6 – Il doppio filtro meccanico della V5 e le tre pompe (Foto di Giovanni Rossi, 2014).



Figura 8.7 – Il filtro biologico della V5. (a) contenitore del filtro; (b) l'interno del filtro biologico con le otto mandate che distribuiscono l'acqua sulle "bio-balls" ospitanti le colonie dei batteri nitrificanti (Foto di Giovanni Rossi, 2014).



Figura 8.8 – Sterilizzatore a raggi UVC della V5 (Foto di Giovanni Rossi 2014).

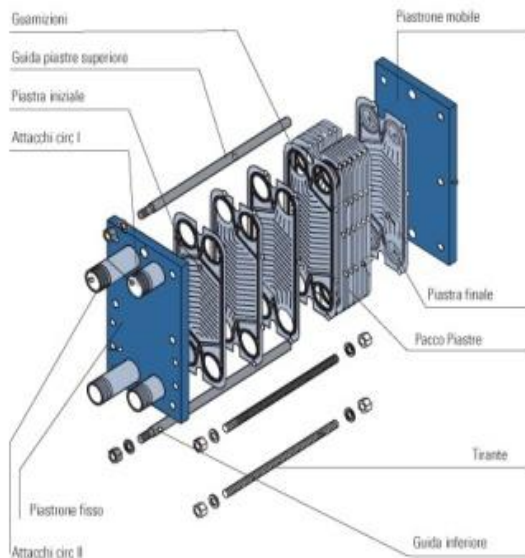


Figura 8.9 – Schema di un generico scambiatore di calore a piastre (Immagine di CORDIVARI®, 2014).

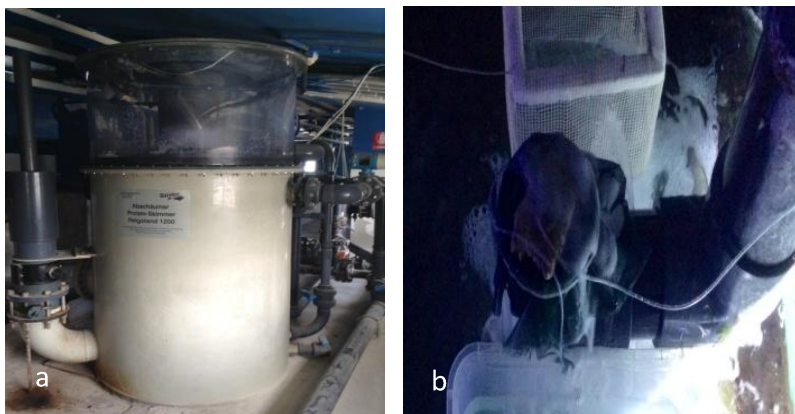


Figura 8.10 – Protein-skimmer. (a) il protein-skimmer della V5; (b) la mandata del protein-skimmer sul tetto della V5 (Foto di Giovanni Rossi, 2014)

La filtrazione meccanica permette di trattenere particelle non inferiori a 20  $\mu\text{m}$  con una velocità di filtrazione di 20  $\text{m}^3/\text{h}/\text{m}^2$  che può essere aumentata fino a 40  $\text{m}^3/\text{h}/\text{m}^2$  per ottenere una filtrazione di particelle non inferiori a 30-40  $\mu\text{m}$  diminuendo però l'efficienza di filtrazione.

La pressione di esercizio del filtro è compresa tra 2 e 3 bar e quando il  $\Delta\text{P}$  tra ingresso e uscita supera 1 bar, si procede al controlavaggio (*back-wash*), procedura che permette la rimozione del particolato accumulatosi sullo strato più superficiale del letto di sabbia, tramite il pompaggio di acqua in senso opposto al normale flusso di filtrazione, a circa 50  $\text{m}^3/\text{h}/\text{m}^2$ . All'uscita del filtro l'acqua viene convogliata in un sistema di sterilizzazione a raggi UVC (Fig.8.8) provvisto di lampade di Wood da 65 W/cad. Questa sezione è necessariamente inserita dopo la filtrazione meccanica (Fig.8.6) perché, per un'applicazione corretta, l'acqua deve essere priva di particolato in sospensione per consentire la massima penetrazione dei raggi UVC e ridurre al minimo il fenomeno di scattering. I vantaggi di questo metodo di sterilizzazione sono: la semplicità dello strumento, il grande potere germicida legato alla capacità dei raggi UVC di determinare mutazioni negli acidi nucleici come i dimeri di timina nel DNA, l'assenza di effetti collaterali residui o da sovra-dosaggio; l'apparato è in grado di fornire una dose media di 30  $\text{mj}/\text{cm}^2$ . L'acqua così priva di eventuali agenti patogeni (batteri e virus) giunge al filtro

biologico (Fig.8.7) di tipo in pressione. Questo filtro è riempito con alcuni metri cubi di biosfere in plastica (“bio-balls”, Fig.8.7b). Quest’ultime sono un ottimo substrato per la crescita di microorganismi utili per il processo di nitrificazione (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*); per 1 m<sup>3</sup> di bio-balls si ottengono 350 m<sup>2</sup> di superficie filtrante. All’interno del filtro biologico, colonie di batteri nitrificanti effettuano l’ossidazione dei composti ammoniacali (NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), tossici per gli animali acquatici. Per l’insediamento di tali colonie batteriche nel filtro biologico occorre una fase di maturazione, che prevede un inoculo con sospensione di microorganismi concentrati (spore batteriche in criptobiosi). Durante questa fase l’apparato UVC viene mantenuto spento. All’ingresso del biofiltro si trova un flussometro digitale che monitorizza costantemente il flusso in entrata, che non dovrebbe superare i 10 m<sup>3</sup>/h/m<sup>2</sup> per non danneggiare le colonie batteriche. In parallelo con il flusso al biofiltro si trova il sistema di riscaldamento o raffreddamento dell’acqua. Questo sistema è costituito da uno scambiatore di calore a piastre (Fig.8.9) collegato ad un sistema primario refrigerante o scaldante. La temperatura in ingresso e in uscita dallo scambiatore e la temperatura dell’acqua in vasca viene costantemente misurata (mattina e sera) con apposite sonde. La temperatura dell’acqua in vasca viene costantemente mantenuta a  $24.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

Lo schiumatoio, schiumatore di proteine o protein-skimmer è dotato di pompe di ricircolo interno collegate in uscita a dei tubi Venturi per l'insufflazione di aria. Le minuscole bolle forzate nella colonna d'acqua riescono a catturare le molecole proteiche, derivate dal catabolismo degli animali e dalla decomposizione organica e a convogliarle verso un'apertura a forma di imbuto rovesciato posta sulla sommità dell'apparato dalla quale, sotto forma di schiuma, sono scaricate. Questo apparato necessita di una precisa regolazione che viene effettuata ogni qual volta si noti un cattivo funzionamento.

### **8.3 ILLUMINAZIONE DELLE VASCHE**

L'illuminazione de “*Lo scrigno di Nettuno*” è garantita da due fari di stessa potenza, pari a 400 W/cad., ma con temperature di colore (K) differenti. Il faro che illumina il lato più scuro ha una temperatura di colore pari a 20.000°K e relativo valore d'illuminamento pari a 2.5 lx (Fig.8.11a), mentre il faro che illumina il lato più luminoso ha temperatura di colore pari a 10.000°K e relativo valore d'illuminamento pari a 5 lx (Fig.8.11b).

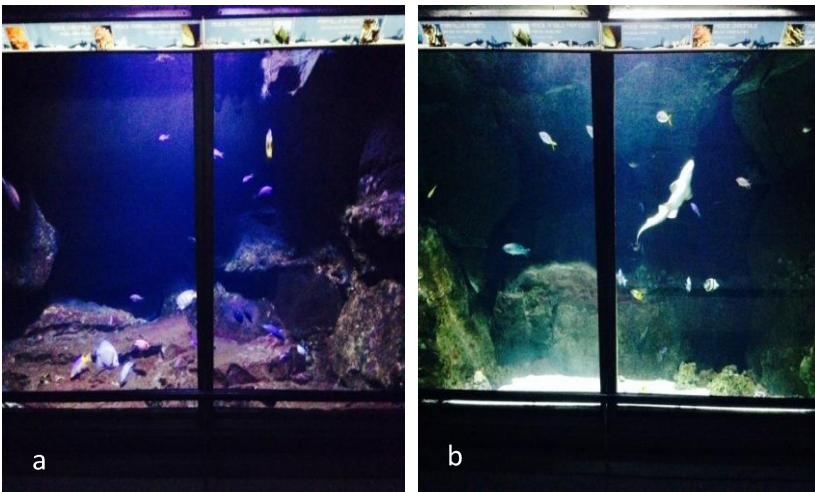


Figura 8.11 – I due lati espositivi de “Lo scrigno di Nettuno”. I lati della vasca erano diversamente illuminati: (a) il lato scuro a 2.5 lx con faro a 20.000°K e (b) il lato luminoso a 5 lx con faro a 10.000°K (Foto di Giovanni Rossi, 2014).

Le “*Tematiche Nursery*” erano illuminate da quattro lampade al neon con potenze pari a 36 W cadauna (144 W in totale). Per ottenere i valori ottimali richiesti sono state adottate delle gelatine blu, integrate agli anti-salto, che hanno permesso di ottenere i valori in lux (lx) specifici per ogni vaschetta. Tali valori sono stati ottenuti con misurazioni effettuate sulla superficie degli oblò, da un Lux-metro (Fig.8.12, utile strumento che misura l’illuminamento di una data superficie in lux [lumen/m<sup>2</sup>]).

È stato predisposto un gradiente luminoso assegnando alle vasche tematiche i valori d’illuminamento di seguito



riportati:  $V1 = 1\text{lx}$ ;  $V2 = 2.5\text{lx}$ ;  $V3 = 3.7\text{lx}$ ;  $V4 = 5\text{lx}$ ;  $V5 = 10\text{lx}$  (Fig.8.14). Questi valori sono stati determinati prendendo come riferimento l'illuminazione dei due lati dello “*Scrigno di Nettuno*” (Fig.8.11), riprodotti in  $V2$  e  $V4$ , e assegnando: a  $V3$  il valore medio d'illuminazione tra i due lati della vasca principale, a  $V5$  il valore doppio rispetto a  $V4$  (o lato scuro de “*Lo scrigno di Nettuno*”; Fig.8.11a) e  $V1$  l'1% di  $V5$  (o lato luminoso de “*Lo scrigno di Nettuno*”; Fig.8.11b). Questo perché, essendo *C. punctatum* uno squalo demersale e vivendo all'interno della zona eufotica, il gradiente luminoso naturale ha un range con  $\text{lux}_{\text{min}} = 1\%$  di  $\text{lux}_{\text{max}}$  (Fig.8.13 da Thurman, 1983). L'ambiente di vita di *C. punctatum* è fortemente caratterizzato da variazioni d'illuminamento (Gordon 2002 e Compagno 1991).



Figura 8.12 – Luxmetro. Strumento che misura l'illuminamento di una data superficie, esprimendo valori d'illuminamento in lux (lx). Il lux è un unità di misura riconosciuta dal *Sistema Internazionale* (SI), che definisce 1 lx pari a 1 lumen/ m<sup>2</sup>.

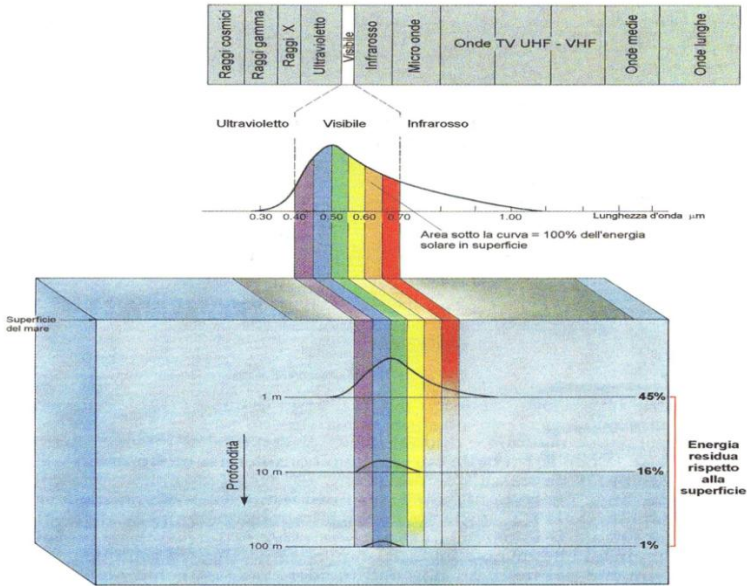


Figura 8.13 – Struttura della radiazione elettromagnetica e trasmissione della luce nell'intervallo del visibile (380-760 nm) in mare (Thurman, 1983).

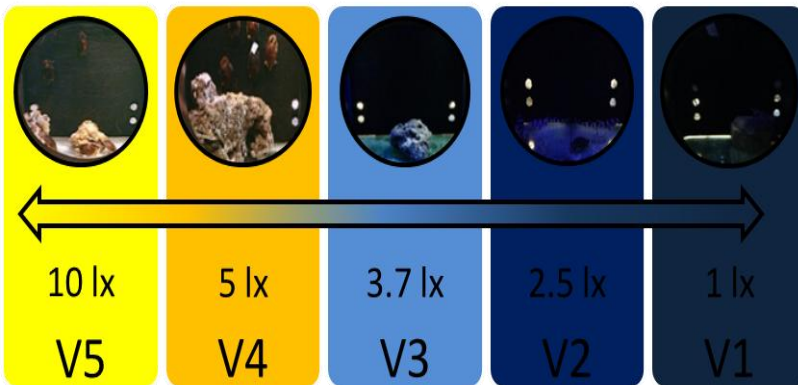


Figura 8.14 – Gradiente luminoso ottenuto nei 5 oblò delle “*Tematiche nursery*”. Il viraggio, tra luce gialla e luce blu, avveniva tra i 5 lx ed i 3.7 lx (Immagine di Giovanni Rossi, 2014)

## 8.4 ANALISI DELLE ACQUE

I parametri dell'acqua sono stati mantenuti costanti tramite procedure di ricambio periodiche (*make-up*, M.U.), che prevedevano l'aggiunta di acqua pre-filtrata e proveniente dalla presa a mare dell'acquario o di acqua dolce (M.U.dolce) come sistema di controllo per i valori di salinità. Le analisi dell'acqua sono state svolte settimanalmente, prendendo in considerazione i seguenti parametri:

- Temperatura  $\longrightarrow$   $T^{\circ}\text{C}$ ;
- Salinità  $\longrightarrow$  ‰;
- pH  $\longrightarrow$   $-\log [\text{H}^+]$ ;
- Ammoniaca  $\longrightarrow$   $[\text{NH}_3]$ ;
- Nitriti  $\longrightarrow$   $[\text{NO}_2^-]$ ;
- Nitrati  $\longrightarrow$   $[\text{NO}_3^-]$ ;
- Fosfati  $\longrightarrow$   $[\text{PO}_4^{3-}]$ .

Gli strumenti utilizzati per la raccolta dati sono stati:

- sonda multiparametrica (Fig.8.15),
- spettrofotometro (Fig.8.16a,b),

i dati sono espressi in mg/l.



Figura 8.15 – Sonda multi-parametrica. Il kit comprende tre sonde con differenti funzioni analitiche: il ph-metro, il termometro ed il salinometro, o densimetro.

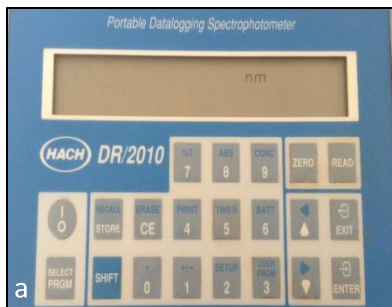


Figura 8.16 – Schermata principale dello Spettrofotometro utilizzato (a) ed i relativi reagenti (b).

## 8.5 DIAGNOSTICA

La documentazione degli eventi riproducibili si è focalizzata sull'individuazione di precisi comportamenti: corteggiamento, copula, deposizione delle uova. Questi comportamenti sono stati documentati tramite la raccolta di materiale multimediale foto/video. È stato possibile documentare direttamente il corteggiamento e la copula, mentre non è stato possibile documentare fotograficamente la deposizione delle uova in quanto evento di carattere notturno.

Per poter effettuare le osservazioni inerenti gli stadi di vita e l'evoluzione degli embrioni abbiamo dovuto pulire accuratamente le uova deposte in vasca in modo da renderle traslucide. Per prima cosa un subacqueo (Fig.8.17) raccoglieva le uova e rimuoveva la sostanza colloidale, poi, la patina cornea caratteristica, rendendo così visibile il tuorlo. Le uova così preparate sono state poi portate nelle vaschette sperimentali. Durante il corso delle osservazioni sullo sviluppo embrionale, sono stati definiti ed adottati 6 differenti stadi di vita di riferimento: uovo [tuorlo], embrione piccolo [1], medio [2] e grande [3], neonato e adulto, in base a differenti caratteristiche morfo-dimensionali e biometriche reperite in bibliografia e di seguito riportate:

- presenza\assenza dell'embrione visibile ad occhio nudo (Harahush *et al.*, 2007),

- dimensione dell'embrione relativa al sacco vitellino (Mojetta 2004),
- presenza\assenza del pattern tegumentale bandato (Compagno e Niem 2001),
- lunghezza e peso degli esemplari (Compagno e Niem 2001),

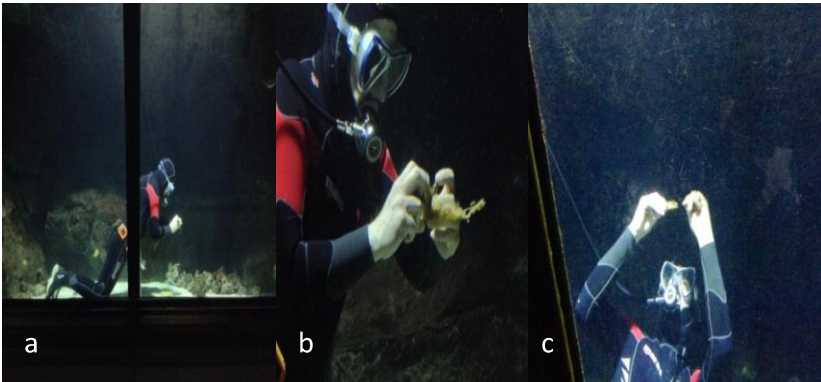


Figura 8.17 – L'operatore subacqueo durante le attività di: raccolta (a), di prima pulizia (b) e di controllo di fecondità (c) delle uova deposte nella V5 ("Lo scrigno di Nettuno", foto di Giovanni Rossi, 2014).

### 8.5.1 Microscopia digitale

Utilizzando un microscopio digitale (Skandarajah, Reber, Switz e Fletcher, 2014), ottenuto combinando la tecnologia di Apple® (iPhone, iPad, etc.) con una piccola lente d'ingrandimento e un apposito supporto di compensato e plexiglass (Fig.8.18), sono stato in grado di raccogliere importanti dati, che hanno permesso di confermare documentazione reperita in bibliografia (Gilmore 1983), riguardo lo sviluppo embrionale negli elasmobranchii

(vd. Paragrafo 9.9: Fig.9.32b,c,d,e,f; Fig.9.33a,b), analizzando alcuni embrioni di *C. punctatum* deceduti durante lo sviluppo.



Figura 8.18 – Microscopio digitale. Tale strumento sfrutta la tecnologia di Apple combinata ad un semplice ed economico supporto di compensato e plexiglass (Skandarajah, Reber, Switz e Fletcher, 2014).

### **8.5.2 Determinazione del sesso**

La determinazione del sesso degli esemplari avveniva tramite l'osservazione della presenza\assenza degli pterigopodi. Tale carattere è evidente negli esemplari adulti con gonadi mature ma anche nei neonati sottoforma di abbozzi, individuabili, già allo stadio di embrione grande [3], nella porzione pelvico-ventrale.

### **8.5.3 Marcatura e riconoscimento (uova e neonati)**

La marcatura delle uova è stata effettuata tramite l'applicazione di apposite targhette di plastica identificative, con sovrainpressa la data di deposizione. L'etichetta è stata posizionata sulla

porzione apicale dell'uovo. La marcatura dei nascituri è stata effettuata mediante l'utilizzo della colla Attack<sup>®</sup> che veniva applicata in piccole gocce sulle pinne dei neonati ad ogni cattura (Cx, vd. paragrafo 8.8.3).






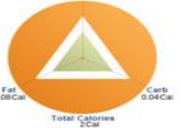

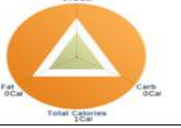
## 8.6 NUTRIZIONE

Gli adulti di squalo bamboo sono stati alimentati durante tutto il periodo di studio seguendo le schede alimentari preparate dal settore acquariologico dell'Acquario di Cattolica. L'alimentazione avveniva tre volte alla settimana con merluzzo, gamberetti, sgombro e totano alternati in dosi pari al 4 - 6% del peso vivo a settimana (Janse, Firchau e Mohan 2004). Per divezzare i neonati dal sacco vitellino invece sono state utilizzate quattro tipologie di cibo molto impiegate in campo acquariologico: *Pandalus borealis*, *Scomber scombrus*, *Merluccius merluccius* e *Mallotus villosus* (Tab.8.1). La quantità di cibo somministrata ai piccoli era pari al 5% del loro peso coporeo (PC) moltiplicato per un modificatore pari a 3 volte il PC per settimana (Janse, Firchau e Mohan 2004).

Per sopperire alle carenze vitaminiche del cibo congelato ogni settimana veniva somministrato l'integratore vitaminico per squali della Nutrazu<sup>®</sup> Shark/ray (per visualizzare la composizione chimica di 1.5 g vd. Fig.6.2).



Tabella 8.1 – La tabella mostra gli alimenti utilizzati durante il periodo di divezzamento dei neonati. I relativi valori energetici di proteine, grassi, carboidrati e totali si riferiscono ad 1g di alimento (*Calorie Slism database 2014*); perché le quantità somministrate erano esigue.

Alimento	Valori nutrizionali	
 <p><i>Pandalus borealis</i></p>	 <p>Fat 0.36Cal Total Calories 3Cal Carb 0Cal</p>	TOT= 3 Cal/g
 <p><i>Scomber scombrus</i></p>	 <p>Fat 1.08Cal Total Calories 2Cal Carb 0Cal</p>	TOT= 2 Cal/g
 <p><i>Mallotus villosus</i></p>	 <p>Fat 1.08Cal Total Calories 2Cal Carb 0.04Cal</p>	TOT= 2 Cal/g
 <p><i>Merluccius merluccius</i></p>	 <p>Fat 0Cal Total Calories 1Cal Carb 0Cal</p>	TOT= 1 Cal/g

## 8.7 MISURAZIONI DI PESO CORPOREO (PC) E LUNGHEZZA TOTALE (LT)

Ogni misurazione eseguita sui piccoli di *C. punctatum* è stata effettuata in triplicato (n=3) ed in tempi differenti nell'arco della giornata (r1,r2 ed r3). Questa metodica è stata adottata sia per quanto concerne il peso corporeo (PC), che per quanto riguarda la lunghezza totale (LT). Gli adulti, invece, sono stati pesati e misurati in un'unica soluzione.

Le modalità di misurazione del peso corporeo (PC) sono le seguenti:

- Pesata dei neonati: sono stati pesati tramite una bilancia di precisione (Fig.8.18a;  $d = 0.001 \text{ g}$ ), tarando una vaschetta con acqua.
- Pesata degli adulti: sono stati pesati tramite un dinamometro (Fig.3.18b;  $d = 0.01 \text{ g}$ ), tarando una cesta con acqua.

La lunghezza totale (LT) è stata anch'essa misurata utilizzando due metodiche differenti ed ogni replica è stata processata fotograficamente:

- Misura dei neonati (Fig.8.19a): sono stati misurati tramite un comune metro millimetrato, posto all'interno di una vaschetta trasparente con acqua.
- Misura degli adulti (Fig.8.19b): gli adulti sono stati misurati all'interno di una cesta centimetrata.

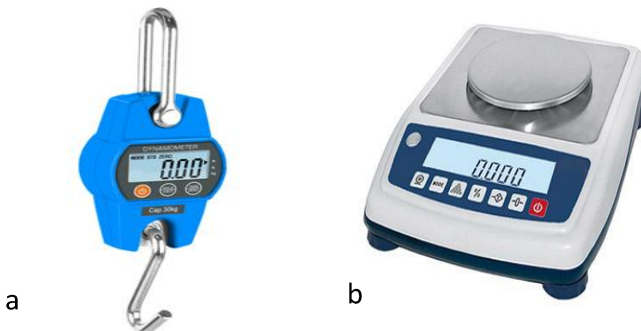
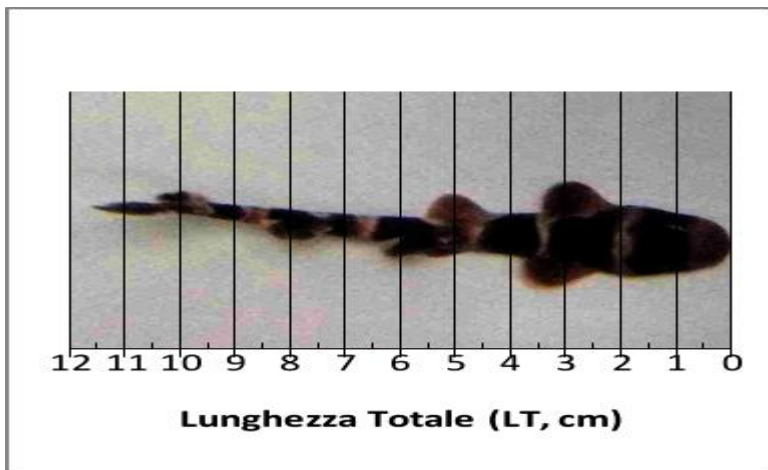


Figura 8.18 – Strumentazioni utilizzate per raccogliere i dati del peso corporeo (PC). (a) dinamometro ( $d = 0.01 \text{ g}$ ) e (b) bilancia di precisione ( $d = 0.001 \text{ g}$ ).

a



b

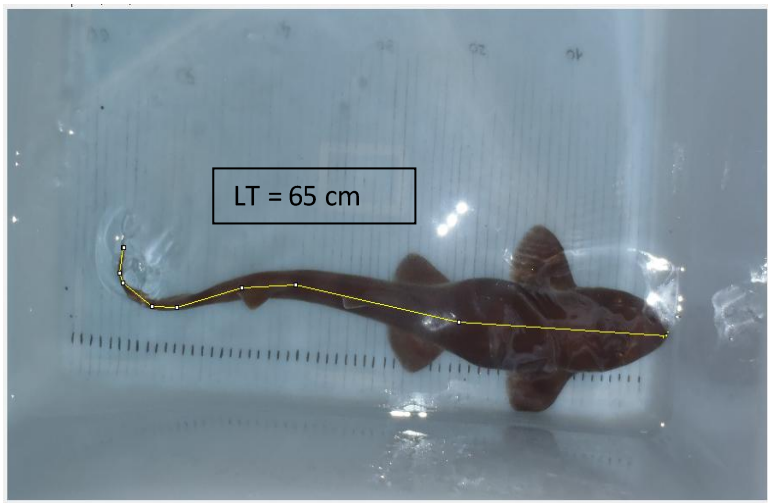


Figura 8.19 – Le due immagini mostrano le misurazioni di lunghezza totale (LT) effettuate sugli esemplari. (a) un neonato di  $11.5 \pm 0.6$  cm e (b) uno dei due adulti; qua l'esemplare femminile di  $61.5 \pm 1$  cm (Foto di Giovanni Rossi, 2014, ottenuta tramite il software ImageJ, piattaforma linux).

## 8.8 DISEGNI SPERIMENTALI

Al fine di testare le ipotesi elencate nel *Capitolo 2*, sono stati impostati i seguenti schemi logico-operativi (Fig. 8.20, 8.21, 8.22 e 8.23).

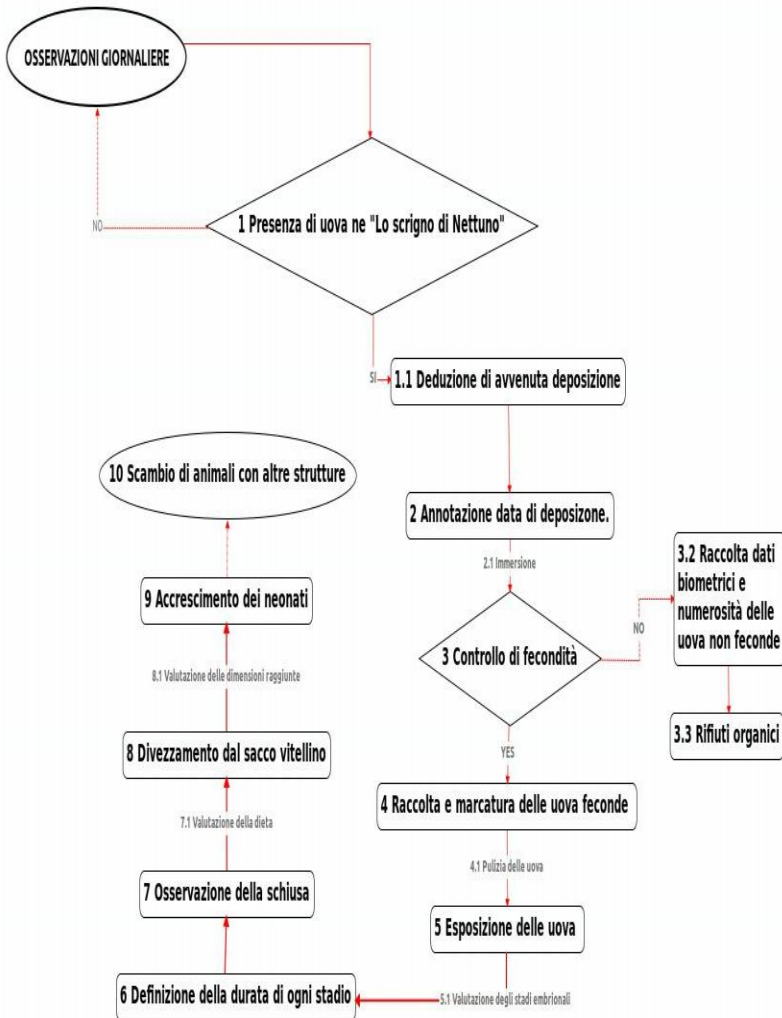


Figura 8.20 – Diagramma a flusso mostrante il *modus operandi* adottato durante le osservazioni (Immagine di Giovanni Rossi, 2014).

### **8.8.1 Piano d'azione**

Il monitoraggio della coppia di riproduttori ospitata ne “*Lo scrigno di Nettuno*” è stato impostato sul cruciale evento della deposizione delle uova. A partire da tale dato certo sono stati definiti tutti i diversi passaggi espletati in Fig.8.20 per gestire al meglio il ciclo riproduttivo.

### **8.8.2 Sviluppo embrionale**

Al fine di testare l'ipotesi (1), delle cinque vasche allestite, sono state prese in esame le due vasche con valori d'illuminamento pari a: 2.5 lx e 5 lx. Queste vasche ospitavano, ciascuna, tre uova (u1, u2 ed u3), per un totale di 6 uova esaminate. In Fig.8.21 il valore “d” rappresenta la data di deposizione dalla quale iniziava il conteggio dei giorni fino al momento della schiusa. Per definire i tempi di sviluppo dei tre stadi embrionali e1, e2 ed e3 (definiti tramite caratteristiche morfo-dimensionali da Harahush *et al.*, 2007 e Mojetta 2004) le uova sono state costantemente monitorate durante l'evoluzione e misurato il tempo in giorni dopo la deposizione (gdd); H (“hatching”) rappresenta il momento della schiusa anch'esso misurato in gdd (Fig.8.21).

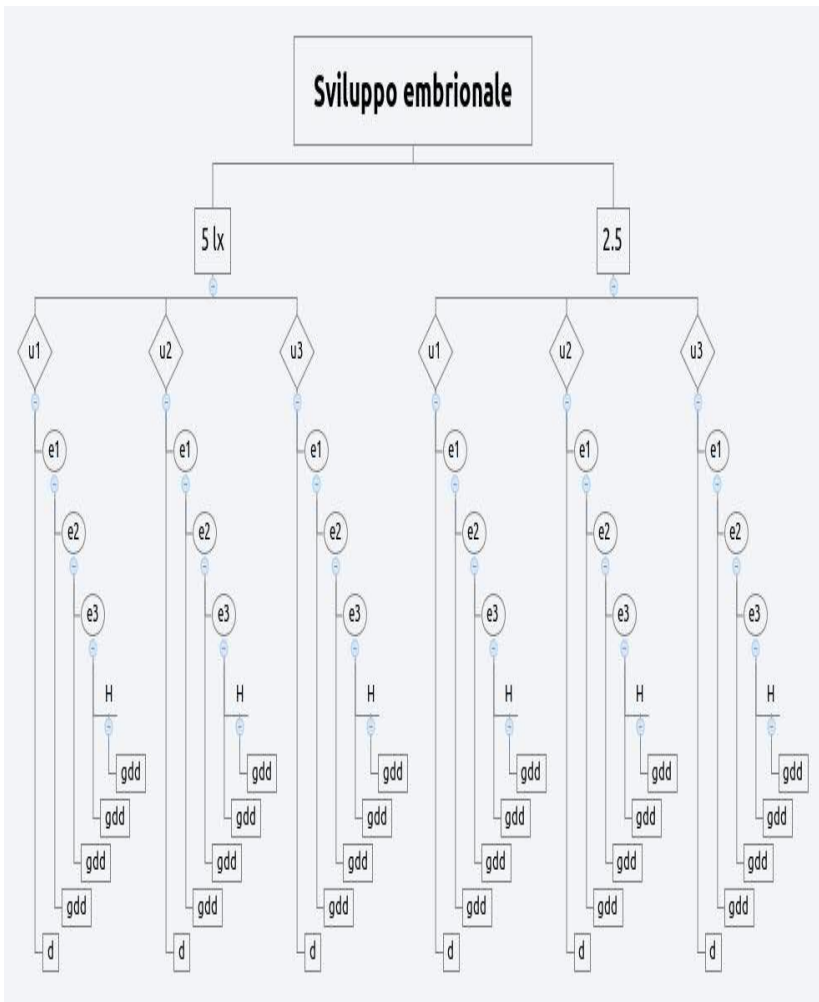


Figura 8.21 – Il diagramma mostra l’organizzazione logica dell’esperimento inerente lo sviluppo embrionale (Immagine di Giovanni Rossi, 2014).

## 8.8.3 Divezzamento dal sacco vitellino

### 8.8.3.1 Dieta variata ad illuminamento costante

Per testare le ipotesi (3) e (4), sono stati esaminati cinque neonati di *C. punctatum* (n=5), di cui tre femmine (n=3) e due maschi (n=2). La dieta è stata impostata somministrando l'integratore vitaminico unicamente agli esemplari (n=5) testati nel disegno sperimentale in Fig.8.22 (V= +vitamine; NV= -vitamine), con alternanza mensile, mentre, i quattro cibi *Pandalus borealis*, *Scomber scombrus*, *Merluccius merluccius* e *Mallotus villosus* sono stati somministrati con alternanza settimanale. Durante le prime catture (Cx), effettuate all'inizio di ogni settimana e le ricatture successive (Rx e Rx.y), effettuate rispettivamente durante e a fine settimana, sono state campionate tre differenti repliche tecniche (1, 2 e 3), sia di peso corporeo (PC) che di lunghezza totale (LT), per ciascun neonato (Fig.8.22).

### 8.8.3.2 Gradiente luminoso a dieta costante

L'ipotesi (2) è stata testata assegnando due neonati per ogni vasca (10 lx; 5 lx; 3.7 lx; 2.5 lx ed 1 lx) per un totale di dieci nascituri (n=10); dei due esemplari uno rappresentava il controllo (CTx), mentre l'altro (Nx) era lo squalo replica. Sono state quindi raccolte misure di peso corporeo (PC) e lunghezza

totale (LT) in tre repliche tecniche (n=3) per ognuna delle catture (Cx), effettuate ad inizio settimana e per le ricatture (Rx e Rx.y), effettuate rispettivamente durante e a fine settimana per le otto settimane successive all'evento di schiusa (s1,...(sx)...s8; Fig.8.23).

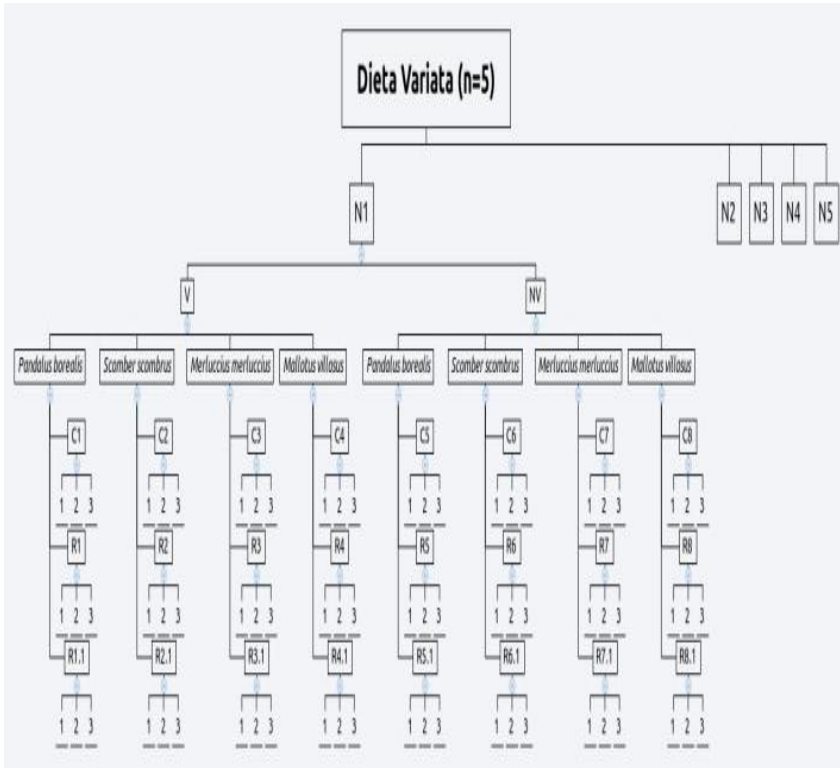


Figura 8.22 – Il diagramma mostra l'organizzazione logica seguita per determinare il cibo più adatto al divezzamento dei neonati (Immagine di Giovanni Rossi, 2014)



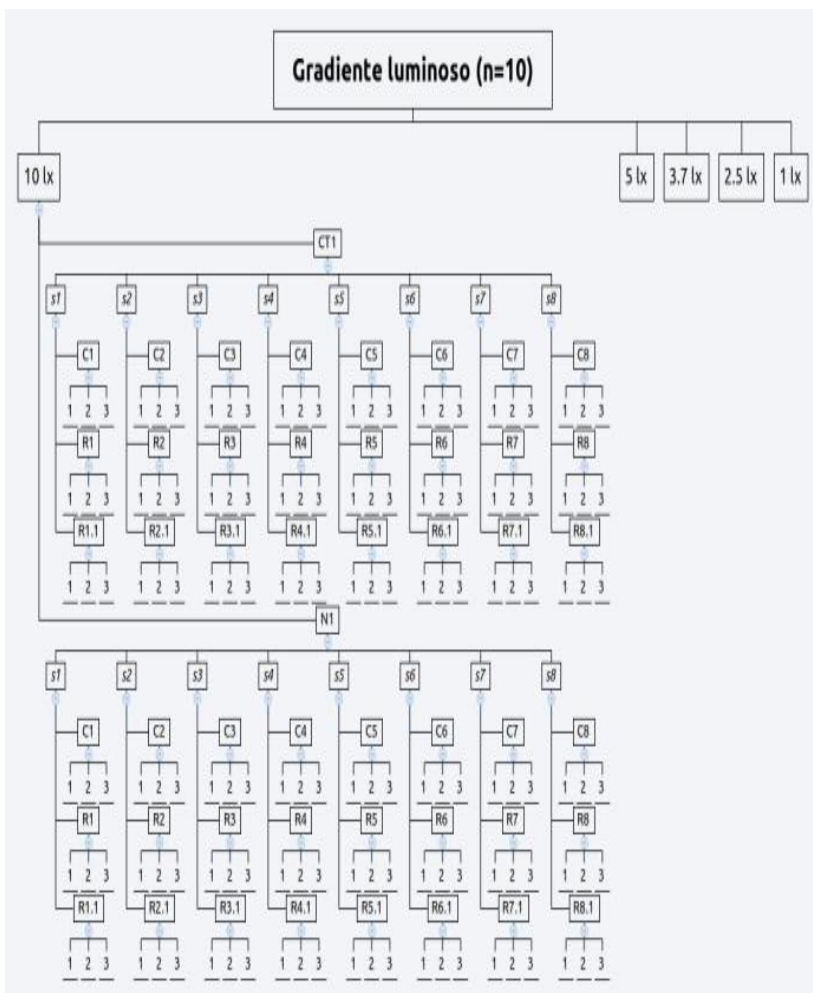


Figura 8.23 – Il diagramma mostra l’organizzazione logica dell’esperimento riguardante l’influenza dell’illuminazione sulla crescita degli squali studiati a dieta costante (Immagine di Giovanni Rossi, 2014).

## 8.9 ANALISI DEI DATI

L'analisi statistica dei dati è stata svolta mediante l'utilizzo di due software open source: *FiSAT II (FAO)* ed *OpenStat*. Per l'analisi grafica è stato utilizzato il software: Microsoft Excel e RKWard.

I metodi analitici utilizzati sono stati:

- la *Von Bertalanffy Growth Function* (VBGF, Von Bertalanffy 1938; 1):

1)

$$l_t = L_{\infty} \left( 1 - e^{-K(t-t_0)} \right)$$

per descrivere la crescita, è stato necessario stimare tre differenti parametri, quali:

- $L_{\infty}$  (lunghezza massima prevista);
- $K$  (costante di crescita);
- $t_0$  (tempo al quale la crescita di un organismo è nulla).

- Il *GH plot* (Gulland e Holt 1959 e Pauly 1984):

Questo metodo descrive una retta ( $y = mx + q$ ) di regressione lineare relazionando la *Rata di crescita* (RC), ottenuta dall'equazione 2), con la *Lunghezza totale media* ( $LT_{media}$ ), ottenuti dall'equazione 3), per ogni dato campionato e acquisito dalle catture e ricatture.

2)

$$RC = \frac{Rx(LT) - Cx(LT)}{(gg \text{ di distanza tra } Rx \text{ e } Cx)};$$

3)

$$LT_{media} = \frac{Cx(LT) + Rx(LT)}{2};$$

Il GH plot rappresenta un metodo molto utile per ottenere i tre parametri fondamentali alla descrizione della VBGF:

- $L_{\infty}$ , è stato stimato dal valore dell'intercetta in x della retta di regressione lineare;
- K, è stato stimato dal valore della pendenza (m) della retta di regressione lineare;

quindi, avendo le stime di  $L_{\infty}$ , di K e le dimensioni alla nascita è stato possibile ricavare la formula (4) per la stima di  $t_0$ , ricavata dall'equazione (1) della VBGF, come segue:

4)

$$t_0 = \ln \frac{(1 - \frac{\text{dimensioni alla nascita}}{L_{\infty}})}{-K} .$$

- Il *Residual plot* (Gulland e Holt 1959 e Pauly 1984):

Tale metodo utilizza il t-test per identificare significative differenze tra le medie ed ottenere una preliminare stima del parametro C (5):

5)

$$C \geq \Delta d \left( \frac{\pi}{2} \right);$$

dove  $\Delta d$  relaziona le differenze delle medie dei due set di residui standardizzati (del *GH plot*) all'amplitudine delle oscillazioni della crescita sinusoidale nel tempo. Perciò:

- se  $C > 1$ , le oscillazioni saranno grandi e significative;
- se  $1 \geq C \geq 0$ , le oscillazioni saranno piccole e significative;
- se  $C = 0$ , le oscillazioni non saranno significative.

Il metodo utilizzato, per l'inferenza statistica, è stato: l'Analisi della varianza (ANOVA) tra trattamenti e soggetti (AxS); seguita dal metodo post-hoc di Tukey (HSD).

## 9. RISULTATI

### 9.1 QUALITÀ DELLE ACQUE

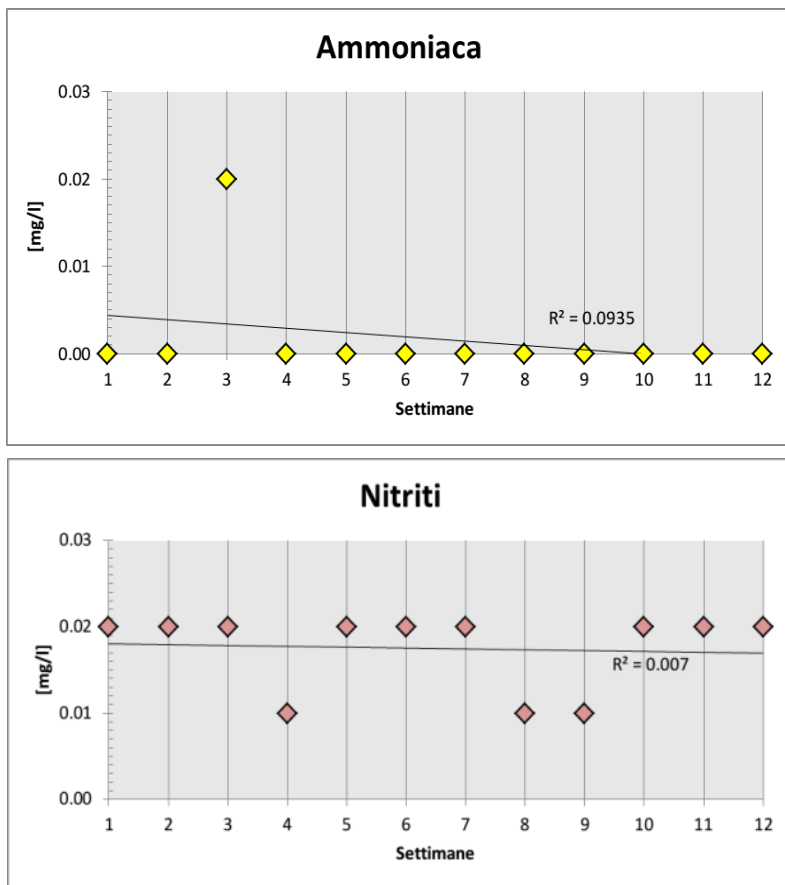


Figura 9.1 – I grafici mostrano, dall'alto verso il basso, gli andamenti di ammoniaca [NH<sub>3</sub>] e nitriti [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] durante 12 settimane di monitoraggio del sistema delle vasche.

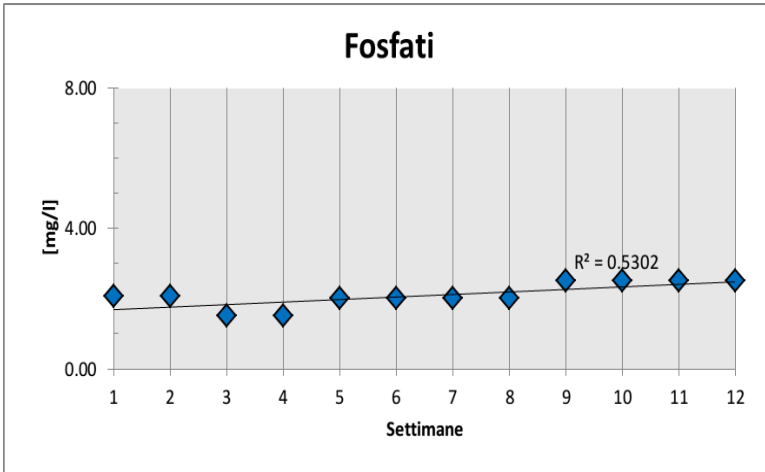
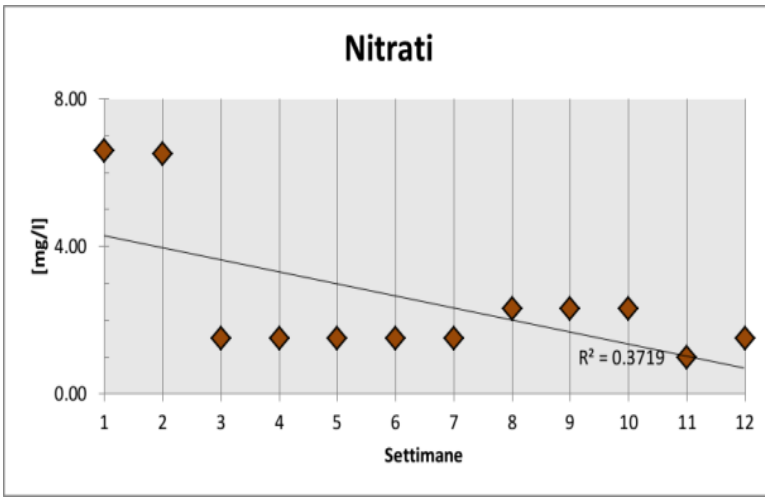


Figura 9.2 – I grafici mostrano, dall’alto verso il basso, gli andamenti dei nitrati [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] e dei fosfati [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>] durante 12 settimane di monitoraggio del sistema delle vasche.

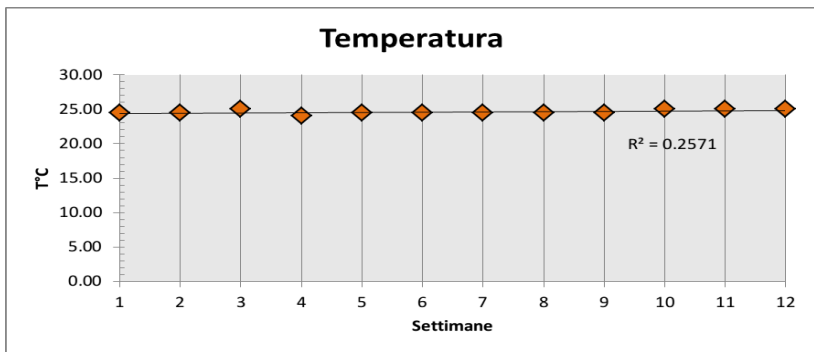
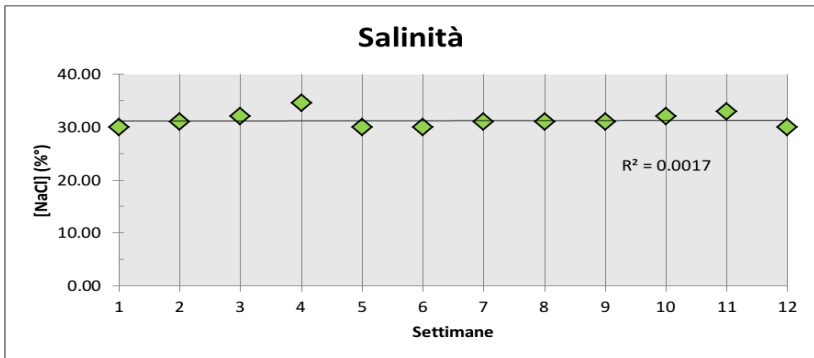
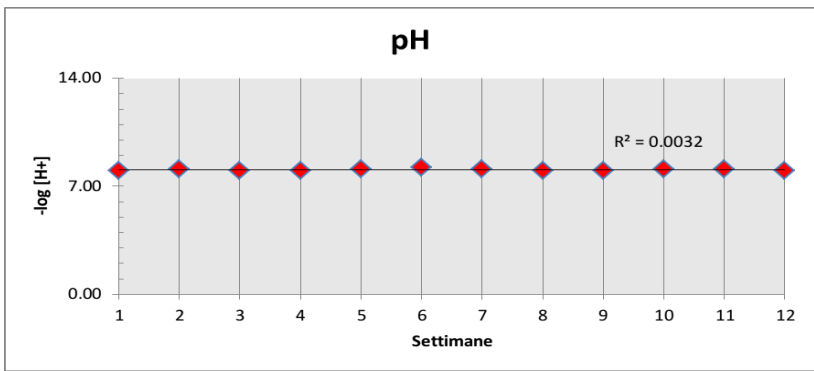


Figura 9.3 – I grafici mostrano, dall'alto verso il basso, gli andamenti di pH ( $-\log[H^+]$ ), salinità (‰) e temperatura (T°C) durante 12 settimane di monitoraggio del sistema delle vasche.

## 9.2 DATI BIOMETRICI

Tabella 9.1 – Valori biometrici medi per LT e PC di 23 uova di *C. punctatum* misurate “a secco”.

Uova (n=23)			
LT <sub>secca</sub> (cm)		PC <sub>secco</sub> (g)	
media	± SD	media	± SD
5.36	0.17	1.39	0.16

Tabella 9.2 – Valori biometrici medi per LT e PC di 18 neonati di *C. punctatum* misurati dopo la schiusa.

Neonati (n=18)			
LT (cm)		PC (g)	
media	± SD	media	± SD
12.17	0.36	8.07	0.41

Tabella 9.3 – Valori biometrici medi per LT e PC di 8 neonati maschi di *C. punctatum* misurati dopo la schiusa.

Neonati ♂ (n=8)			
LT (cm)		PC (g)	
media	± SD	media	± SD
12.25	0.35	7.98	0.54



Tabella 9.4 – Valori biometrici medi per LT e PC di 10 neonati femmine di *C. punctatum* misurati dopo la schiusa.

Neonati ♀ (n=10)			
LT (cm)		PC (g)	
media	$\pm$ SD	media	$\pm$ SD
12.13	0.32	8.13	0.38

Tabella 9.5 – Valori biometrici medi per LT e PC della coppia di riproduttori di *C. punctatum*.

Adulti (n=2; ♀*; ♂**)			
LT (cm)		PC (kg)	
media	$\pm$ SD	media	$\pm$ SD
68	1	1.3	0.28

- \*Femmina adulta (n=1):
  - LT =  $65 \pm 0.5$  cm
  - PC =  $1.1 \pm 0.14$  kg
  
- \*\*Maschio adulto (n=1):
  - LT =  $71 \pm 0.5$  cm
  - PC =  $1.5 \pm 0.14$  kg.

### 9.3 NUMEROSITÀ E CRESCITA DEI SESSI

Durante la raccolta dei dati sono nati 33 esemplari di *C. punctatum*, il 60.61% femmine e il 39.39% maschi. Il grafico in Fig.9.4 mostra i valori percentuali di tale numerosità. 15 esemplari su 33, sono stati misurati durante il periodo di studio e i dati raccolti hanno permesso di realizzare il grafico in Fig.9.5, che mostra l'andamento di crescita (LT). Si può notare la grande differenza tra la crescita dei maschi e delle femmine.

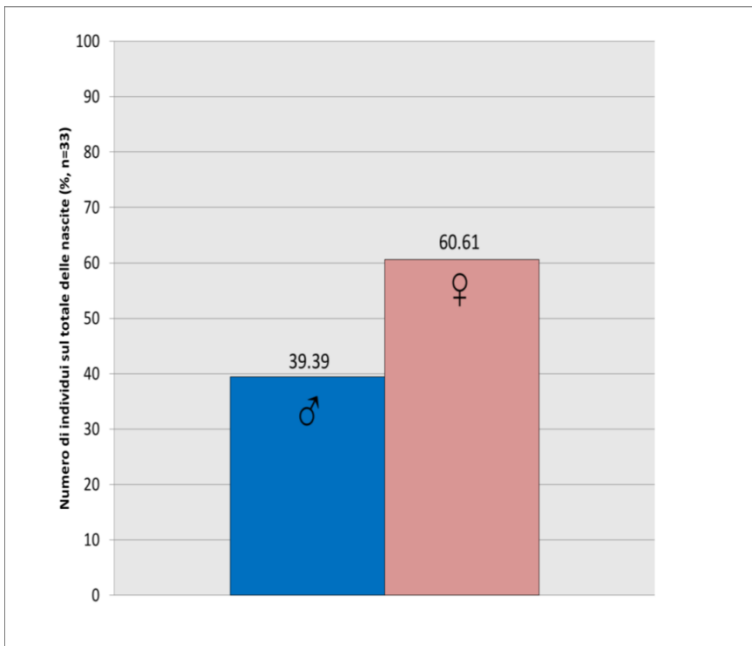


Figura 9.4 – Sex-ratio dei neonati di *C. punctatum* (n=33). Il grafico mostra i valori percentuali della numerosità dei neonati maschili (colonna blu) e di quelli femminili (colonna rosa) determinati sul totale delle nascite osservate.

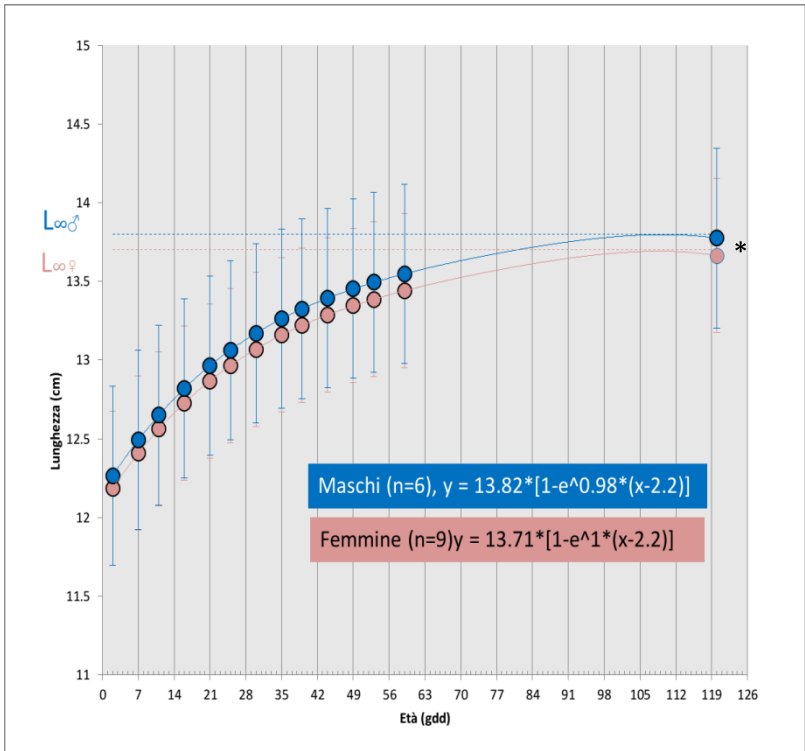


Figura 9.5 – VBGF(LT) di tutti i neonati femmine e maschi presi in esame (n=15, ♂=6 e ♀=9; \*P<0.01 vs femmine, ANOVA tra trattamenti e soggetti seguita dall’HSD test).).

## 9.4 FREQUENZA DI DEPOSIZIONE DELLE UOVA

Dal 27/01/2014 al 17/6/2014, per un totale di 139 giorni, sono stati datati tutti gli eventi di deposizione avvenuti ne “*Lo scrigno di Nettuno*” (Fig.9.6).

Durante tale periodo, la femmina ha deposto 35 uova. La frequenza di deposizione media settimanale era di  $2.19 \pm 1$  (ES) uova, mentre quella mensile era pari a  $8.75 \pm 1$  (ES) uova (Fig.9.6 e 9.7).

## 9.5 TEMPI DI SVILUPPO EMBRIONALE

Alle condizioni volute, lo stadio di uovo (U) durava in media  $10.5 \pm 4.4$  gg (n=35), da questo valore in poi si poteva visualizzare ad occhio nudo l’embrione. Lo stadio di embrione piccolo (E1) durava in media  $16.5 \pm 4$  gg (n=23), mentre il successivo stadio di embrione medio (E2) durava in media  $43 \pm 5.5$  gg (n=15) ed infine l’ultimo stadio embrionale grande (E3) durava in media  $48 \pm 2.5$  gg (n=5). Di conseguenza la durata media d’incubazione dell’uovo durava  $117.5 \pm 3.5$  gg (circa 4 mesi; n=5). Di seguito sono riportati i risultati ottenuti secondo il disegno sperimentale inerente lo sviluppo embrionale (Fig.9.8).

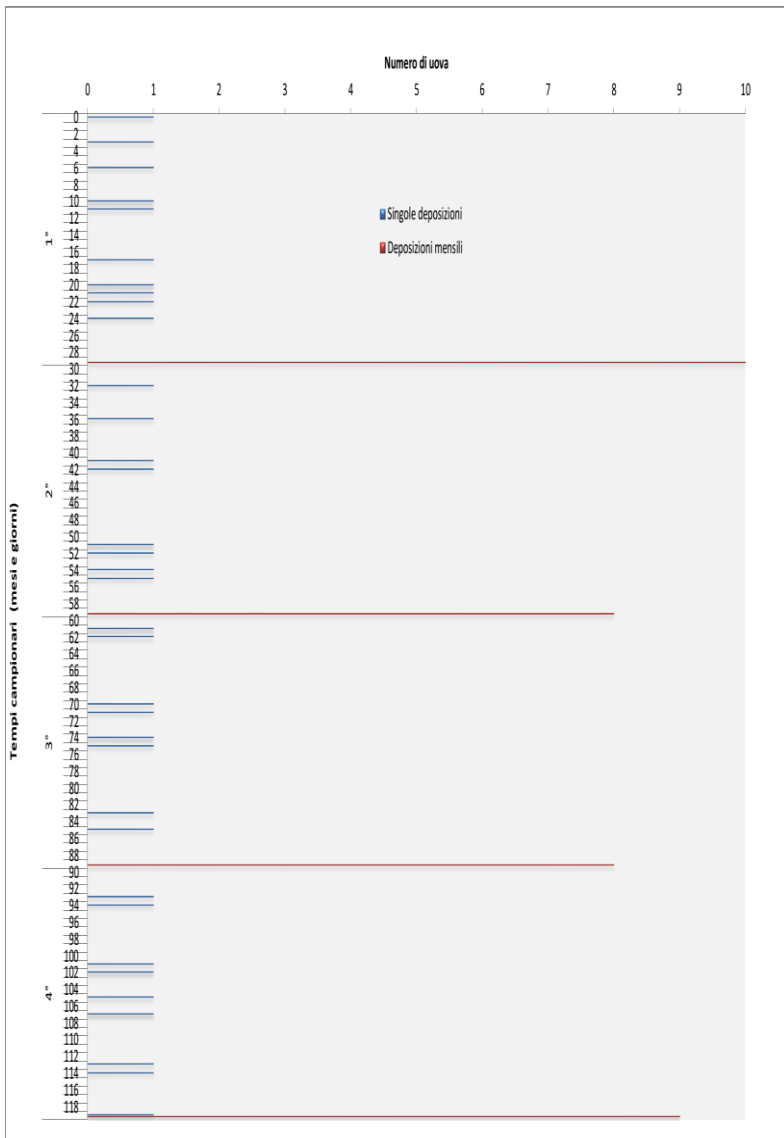


Figura 9.6 – Frequenza di deposizione. Il grafico mostra gli eventi di deposizione (barre blu), espressi in giorni dopo to (27/01/2014), e la frequenza media mensile di deposizione delle uova (barre rosse, n=35).

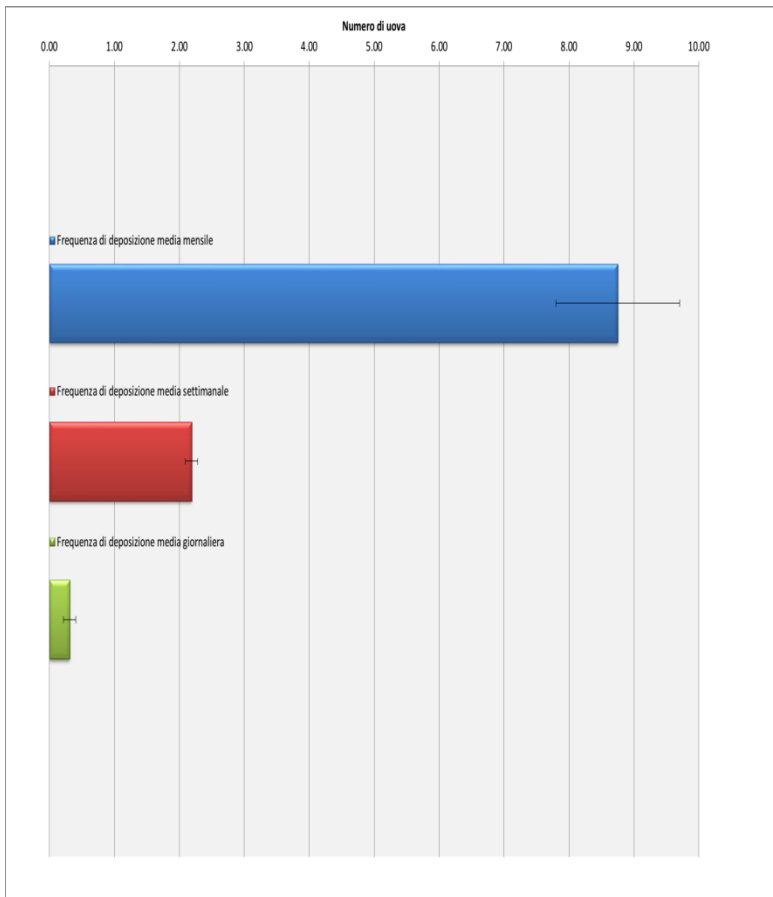


Figura 9.7 – Frequenze di deposizione medie. Verde, frequenza media giornaliera; Rosso, frequenza media settimanale; Blu, frequenza media mensile.

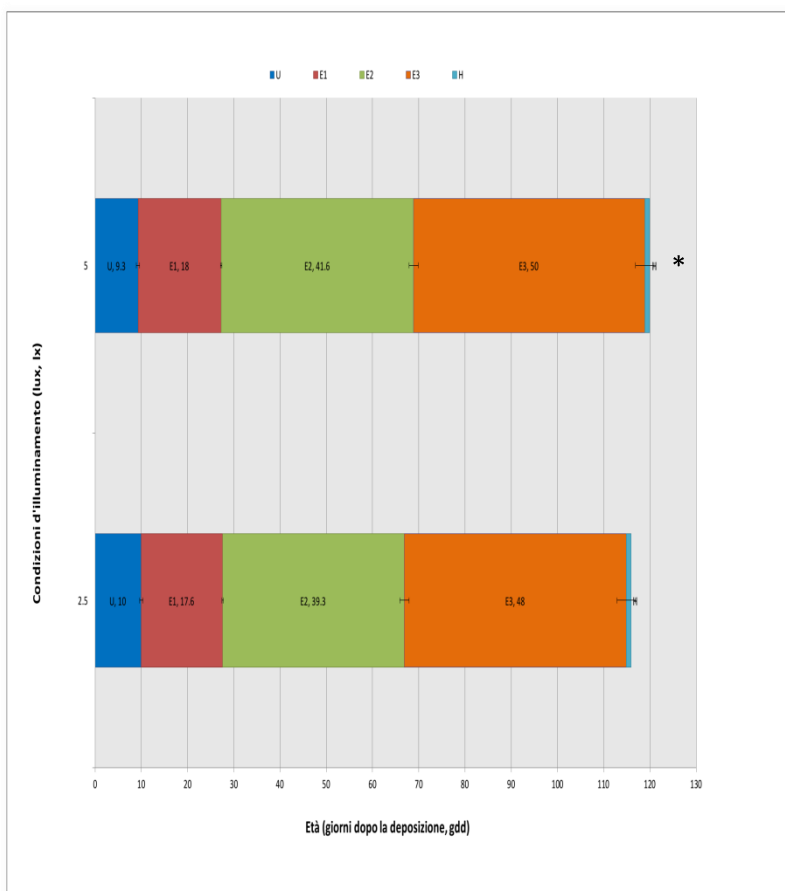


Figura 9.8 – Tempi di sviluppo embrionale medi a differenti condizioni d'illuminamento. Il grafico mostra i tempi di sviluppo embrionale medi  $\pm$  ES, stimati per differenti uova ( $n=6$ ) poste a due differenti condizioni d'illuminamento: 5 lx ( $n=3$ ) e 2.5 lx ( $n=3$ ). U, stadio di uovo, E1, embrione piccolo, E2, embrione medio, E3, embrione grande ed H, la schiusa (\* $P>0.05$  vs 2.5 lx, ANOVA tra trattamenti e soggetti (A x S) seguita dall'HSD test).

## 9.6 DIETA VARIATA (n=5)

Di seguito sono riportati i risultati (Fig.9.9, 9.10, 9.11, 9.12, 9.13, 9.14, 9.15 e 9.16) ottenuti dall'esperimento condotto con dieta variata (Fig.8.22) su 5 neonati di *C. punctatum*.

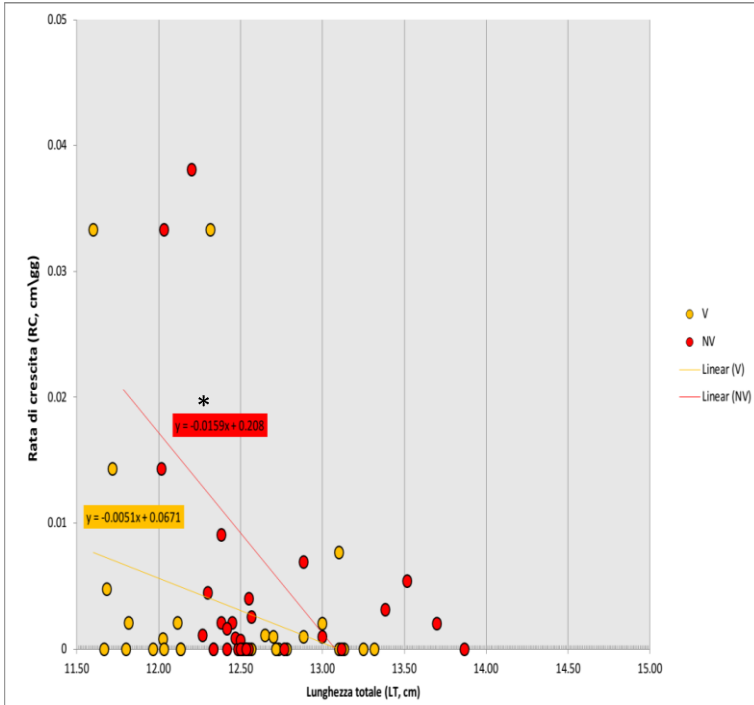


Figura 9.9 – Influenza dell'integratore vitaminico sulla crescita. V (presenza di vitamine nella dieta) e NV (assenza di vitamine nella dieta; \* $P > 0.05$  vs pendenza di V, ANOVA tra trattamenti e soggetti, seguita dall'HSD test).



*Residual plot* di Gulland e Holt (1957). Il grafico mostra le oscillazioni dei dati di rata di crescita (RC, cm/gg) di 5 individui, sottoposti a dieta variata (*Pandalus borealis*, *Scomber scombrus*, *Merluccius merluccius* e *Mallotus villosus*), durante il periodo di campionamento. La linea rossa rappresenta il parametro  $C > 1$ , che suggerisce una significativa ed ampia oscillazione dei dati nel tempo.

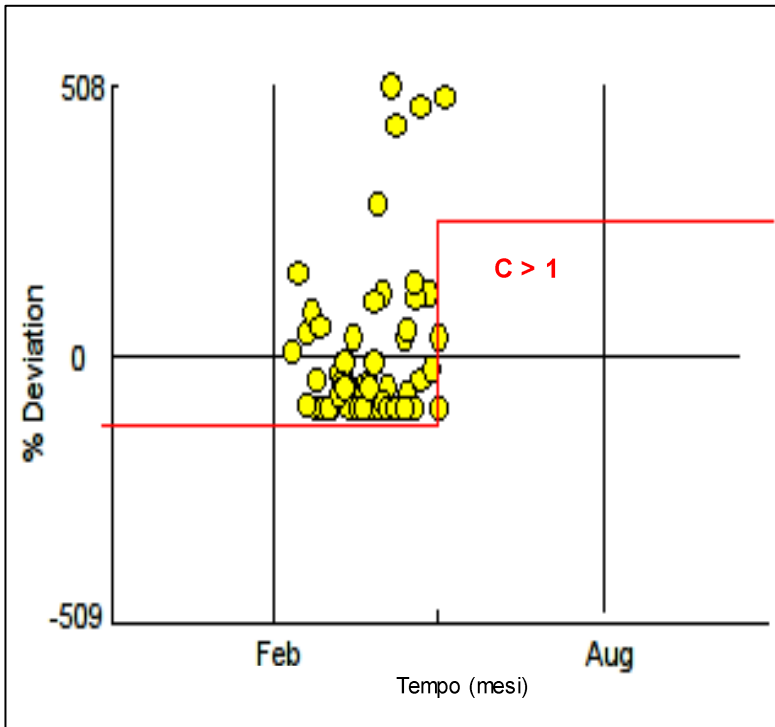


Figura 9.10 – *Residual plot* di Gulland & Holt (1957). La deviazione tra i punti gialli, rate di crescita (RC), evidenzia differenze ampie e significative ( $C > 1$ ) osservate durante la somministrazione della dieta variata.

In Fig.9.11 è mostrato il contributo percentuale dei quattro diversi alimenti alla crescita dei 5 nascituri di *C. punctatum* (n=5) durante il divezzamento dal sacco vitellino. Il grafico a torta mostra la rata di crescita percentuale media prodotta da ogni diverso alimento (*Mallotus villosus* = capelin, *Merluccius merluccius* = merluzzo, *Scomber scombrus* = sgombro e *Pandalus borealis* = gamberetti) somministrato durante i due mesi di divezzamento dal sacco vitellino dei neonati misurati (n=5; \*P<0.05 vs capelin, merluzzo e sgombro, ANOVA tra trattamenti e soggetti seguita dall'HSD test).

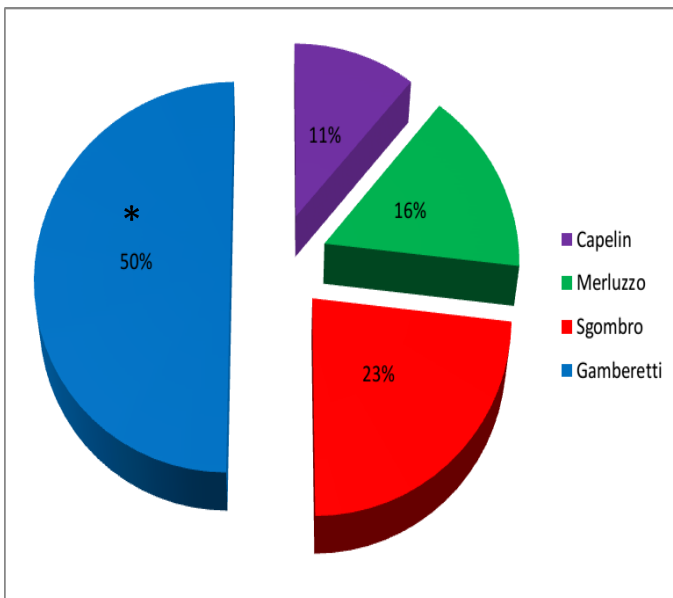


Figura 9.11 Contributo percentuale alla crescita di ognuno dei 4 differenti alimenti somministrati durante i due mesi dopo la schiusa. (n=5; \*P<0.05 vs capelin, merluzzo e sgombro, ANOVA tra trattamenti e soggetti seguita dall'HSD test).

Il GH plot dei cinque neonati a dieta variata in Fig.9.12 mostra la retta di regressione lineare ottenuta dai dati di RC su  $LT_{media}$ . L'x-intercetta stima il valore di  $L$ , mentre il coefficiente angolare della retta stima la costante di crescita  $K$ .

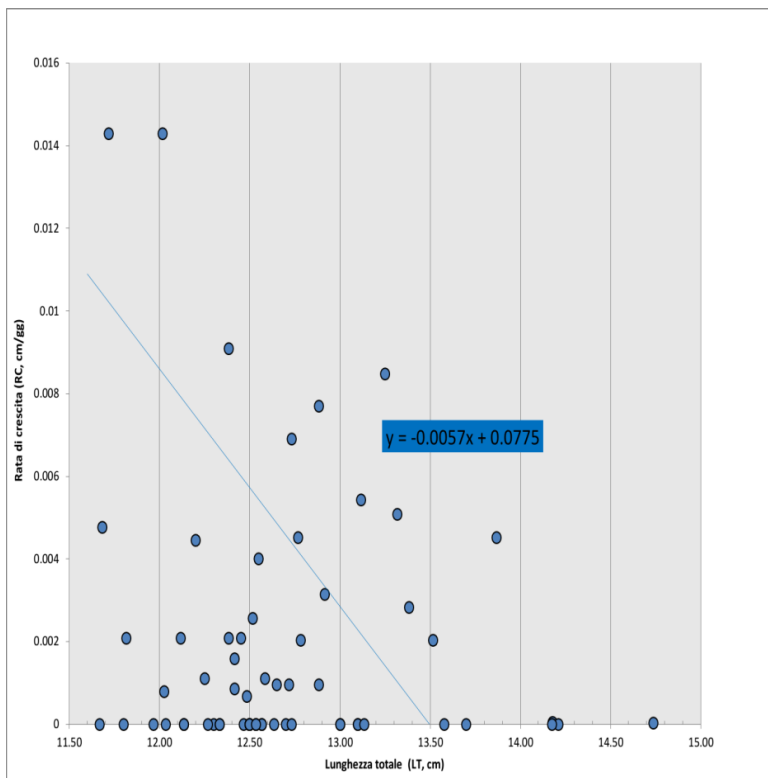


Figura 9.12 – GH plot di 5 neonati divezzati dal sacco vitellino a dieta variata.

La  $VBGF_{(LT)}$  media  $\pm$  SD dei neonati divezzati dal sacco vitellino con dieta variata mostrata in Fig.9.13, mostra graficamente i parametri stimati in precedenza. La linea rossa tratteggiata rappresenta il parametro:  $L_{\infty}$  La funzione  $y$  era, perciò, descritta da  $L_{\infty}$  (cifra in rosso);  $K$  (cifra in blu);  $t_0$  (cifra in verde). L'ultimo punto vuoto è un dato fittizio utilizzato per ottenere la previsione dimensionale a dati valori di  $K$ .

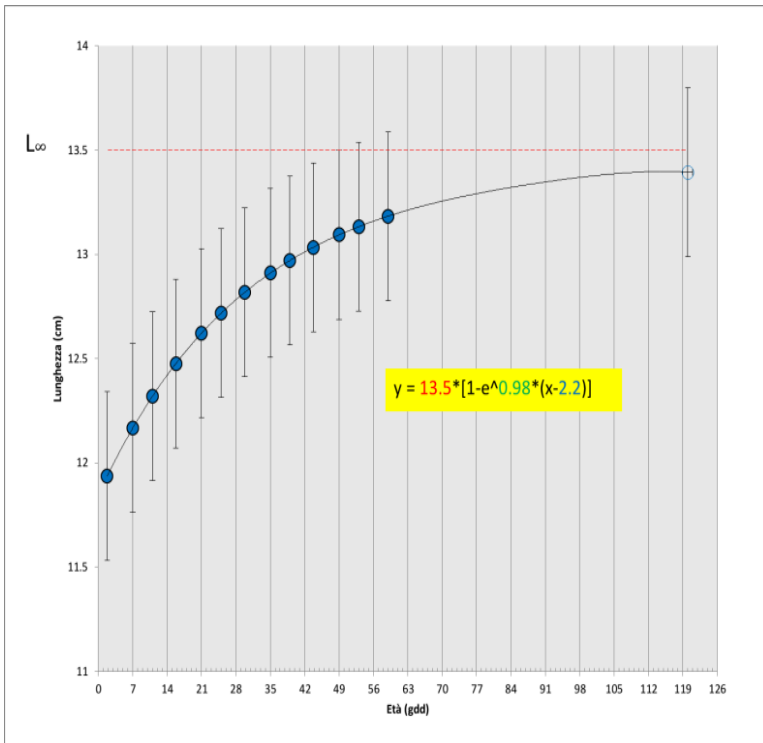


Figura 9.13 –  $VBGF_{(LT)}$  media di 5 neonati divezzati dal sacco vitellino a dieta variata.

In Fig.9.14 è mostrato l'andamento del peso corporeo (PC) medio  $\pm$  SD dei neonati divezzati dal sacco vitellino con dieta variata (n=5) nei primi 2 mesi dopo la schiusa.

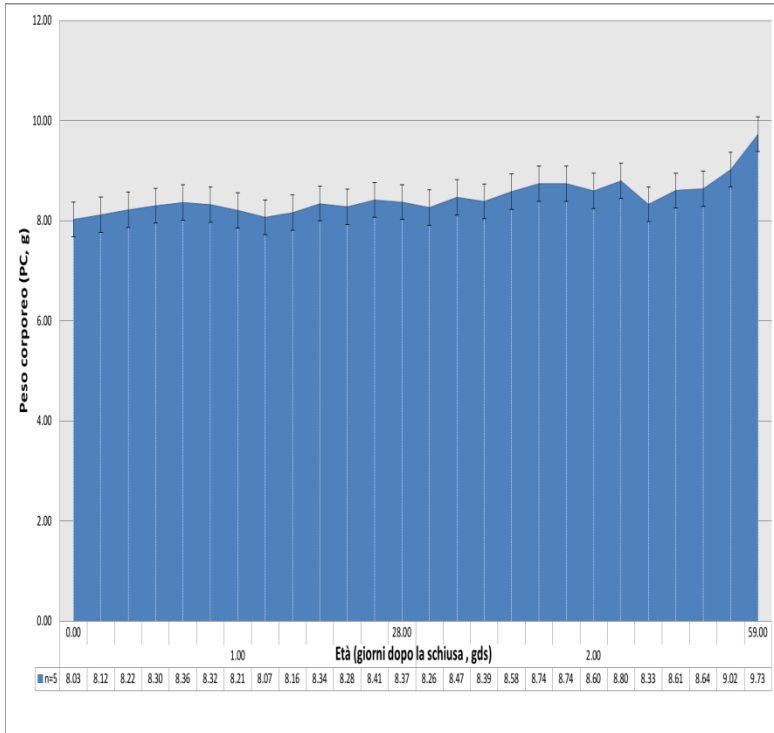


Figura 9.14 – Andamento del PC  $\pm$  SD a dieta variata (n=5).

Fig. 9.15 mostra la variabilità della lunghezza totale (LT) dei 5 neonati divezzati dal sacco vitellino a dieta variata. Le barre nere orizzontali indicano il valore di mediana (Q3).

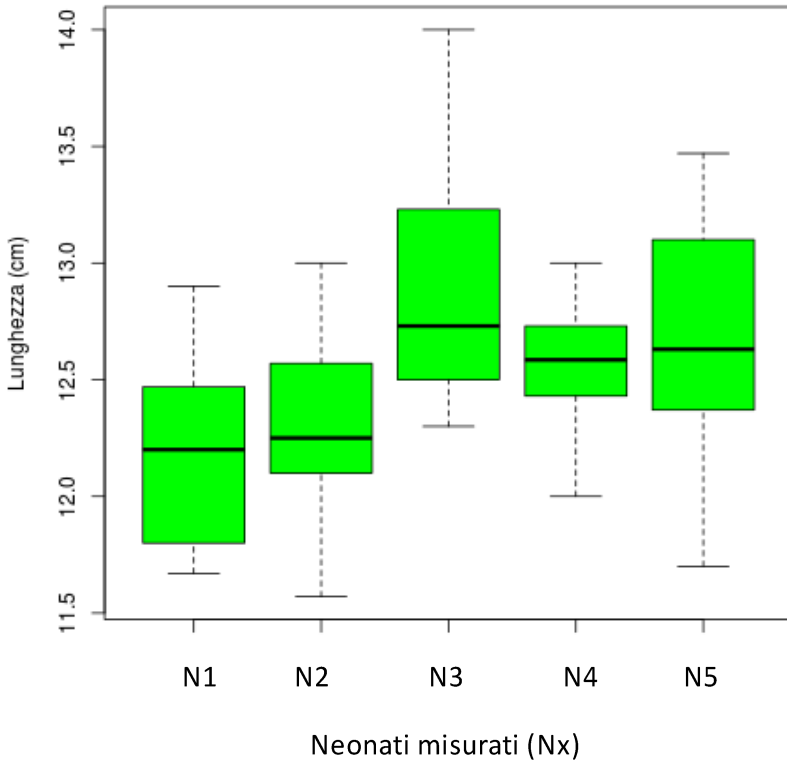


Figura 9.15 - Variabilità della Lunghezza totale (LT) di 5 neonati divezzati con dieta variata.

Fig. 9.16 mostra la variabilità della peso corporeo (PC) dei 5 neonati divezzati dal sacco vitellino a dieta variata. Le barre nere orizzontali indicano il valore di mediana (Q3).

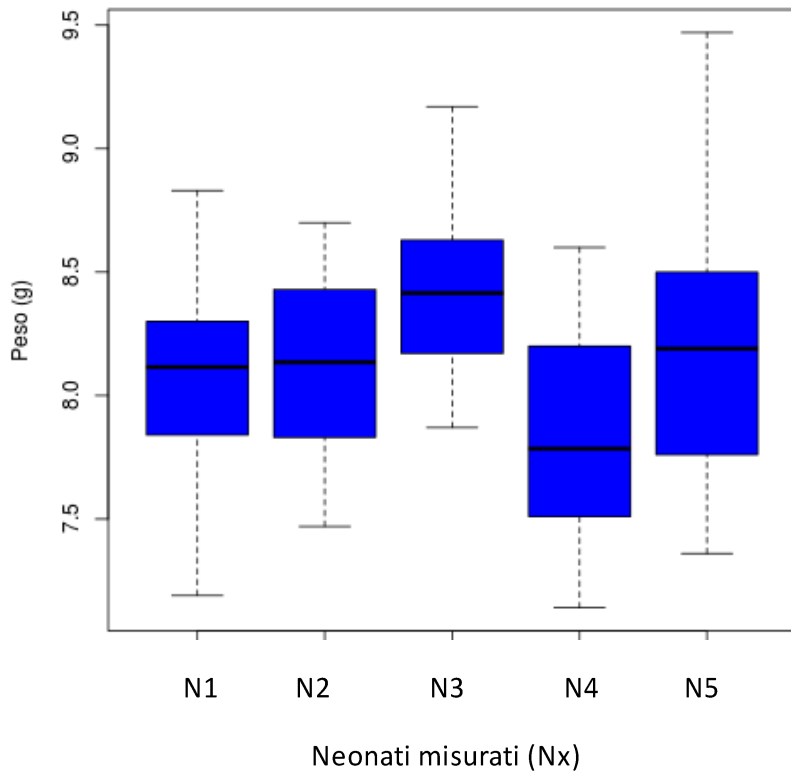


Figura 9.16 – Variabilità del peso corporeo (PC) di 5 neonati divezzati con dieta variata.

## 9.7 GRADIENTE LUMINOSO (n=10)

Viene qui riportato il grafico delle VBGF medie (Fig.9.17) dei 10 neonati divezzati dal sacco vitellino a dieta costante (gamberetti), ma a differenti condizioni d'illuminamento. Di seguito sono riportate le VBGF<sub>(LT)</sub> ottenute per ogni squalo CTx ed ogni squalo Nx (9.18, 9.19, 9.20, 9.21 e 9.22) dall'esperimento condotto sul gradiente luminoso a dieta costante sui neonati (n=10) di *C. punctatum*.

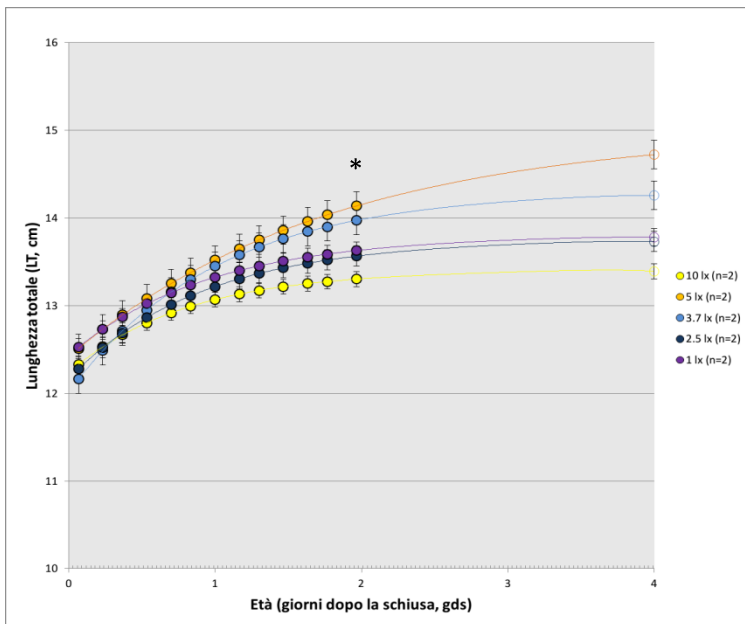


Figura 9.17 – VBGF<sub>(LT)</sub> medie (n=10)  $\pm$  ES dei neonati divezzati dal sacco vitellino a diverse condizioni d'illuminamento. Ogni VBGF è rappresentativa della crescita di neonati (n=2) cresciuti, ognuno, al valore d'illuminamento prestabilito (\*P>0.05 vs 3.7 lx, 1 lx, 2.5 lx e 10 lx, ANOVA tra trattamenti e soggetti seguita dall'HSD test).



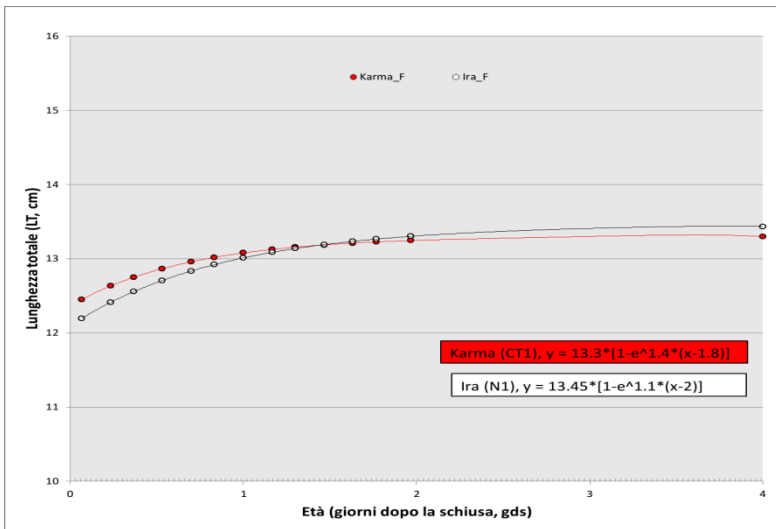


Figura 9.18 – VBG<sub>F(LT)</sub> dei neonati denominati Karma<sub>♀</sub> (CT1) e Ira<sub>♀</sub> (N1) divezzati dal sacco vitellino a 10 lx

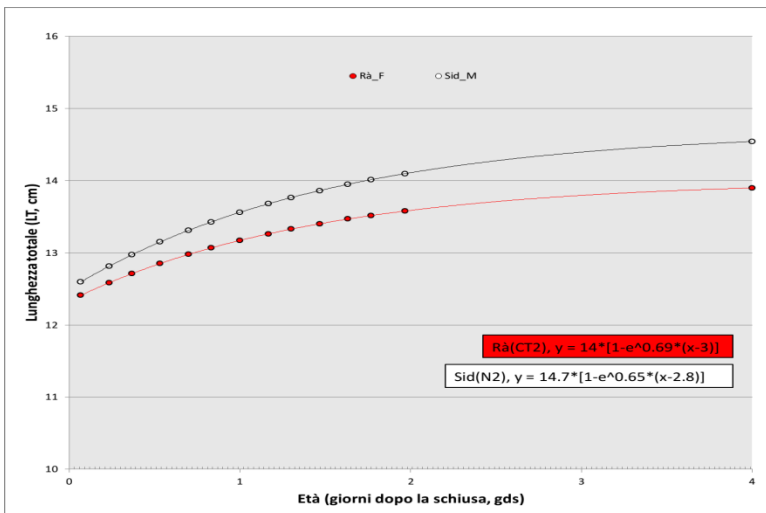


Figura 9.19 – VBG<sub>F(LT)</sub> dei neonati denominati Rà<sub>♀</sub> (CT2) e Sid<sub>♂</sub> (N2) divezzati dal sacco vitellino a 5 lx

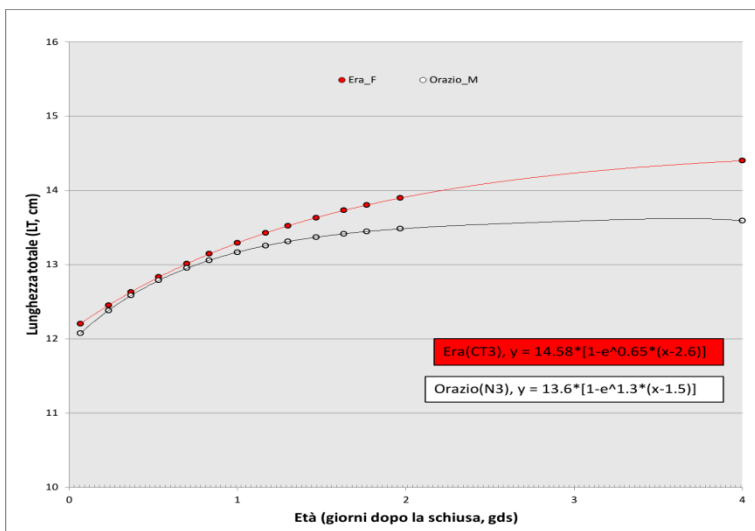


Figura 9.20 – VBG<sub>F(LT)</sub> dei neonati denominati Era♀ (CT3) e Orazio♂ (N3) divezzati dal sacco vitellino a 3.7 lx.

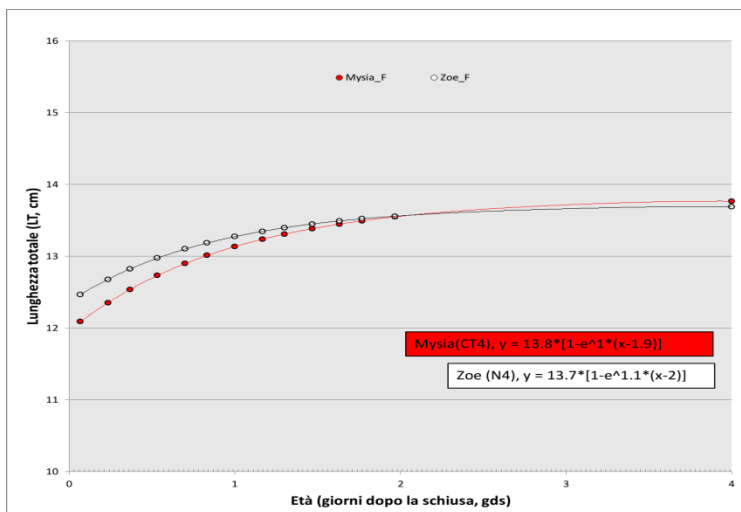


Figura 9.21 – VBG<sub>F(LT)</sub> dei neonati denominati Mysia♀ (CT4) e Zoe♀ (N4) divezzati dal sacco vitellino a 2.5 lx.

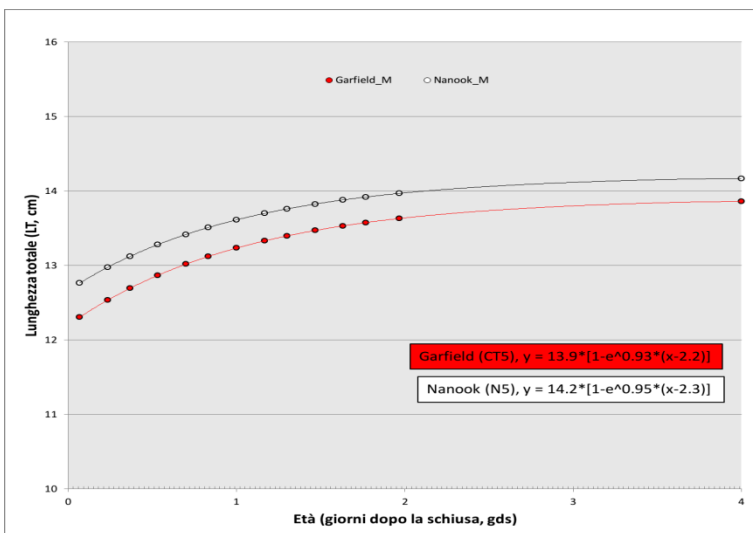


Figura 9.22 –  $VBGF_{(LT)}$  dei neonati denominati Garfield♂ (CT5) e Nanook♂ (N5) divezzati dal sacco vitellino a 1 lx.

Come Fig.9.14, viene riportato, in Fig.9.23, l'andamento del peso corporeo (PC) medio  $\pm$  SD dei neonati divezzati dal sacco vitellino a dieta costante (n=10) durante i primi 2 mesi dopo la schiusa.

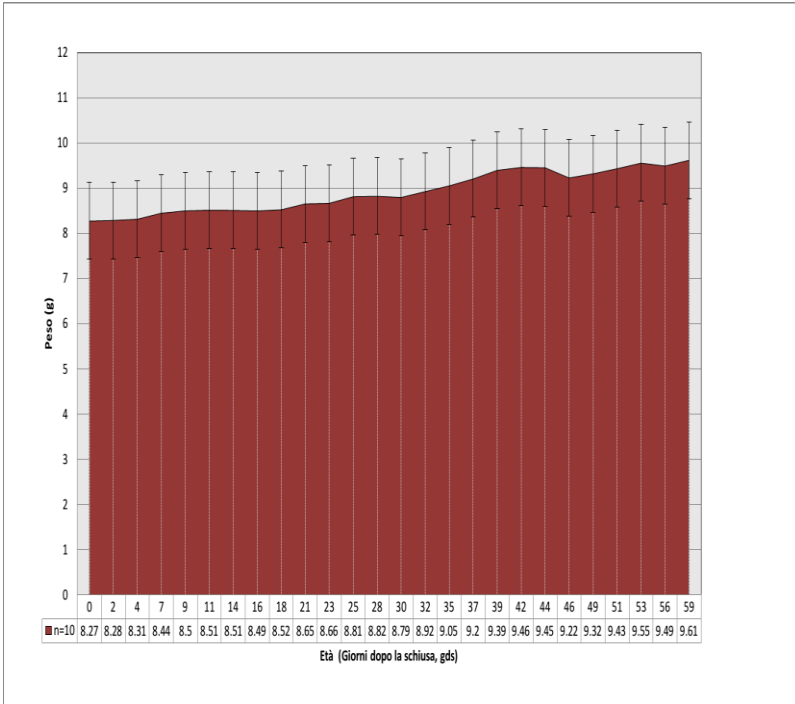


Figura 9.23 – Andamento del PC  $\pm$  SD a dieta costante (n=10).

## 9.8 MORTALITÀ

Durante il periodo di mantenimento dei neonati è stata registrata una patologia non ancora identificata al momento della stesura di tale elaborato che ha alzato i tassi di mortalità post-natali (vd. paragrafo 9.9, Fig.9.34) Qui sono riportati i relativi tassi di mortalità per ogni stadio.

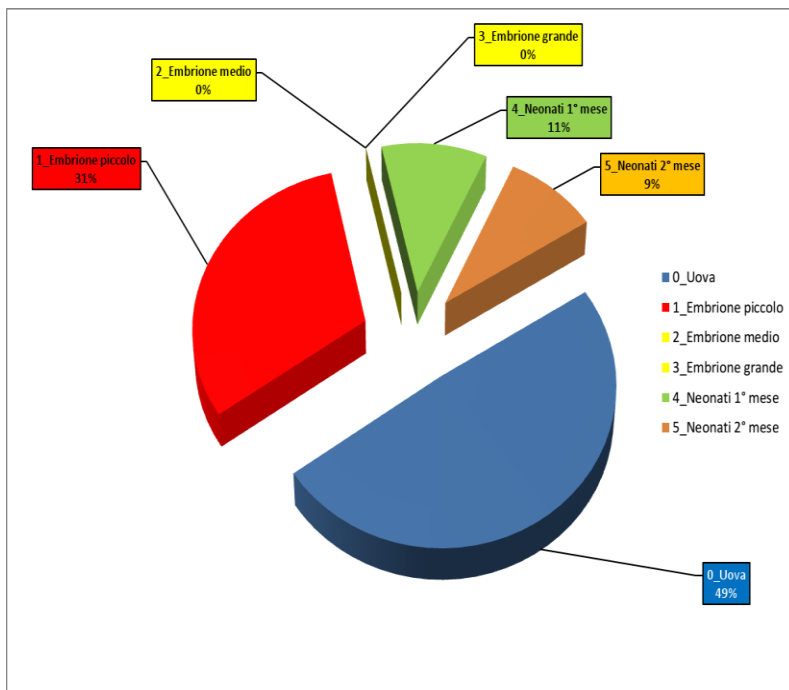


Figura 9.24 – Tassi di mortalità dei nati. Tassi pre-natali: 0\_Uova, 1\_Embrione piccolo, 2\_Embrione medio, 3\_Embrione grande e tassi post-natali: 4\_Neonati 1°mese e 5\_Neonati 2°mese,

## 9.9 ICONOGRAFIA

Sono qui riportate le immagini più significative.

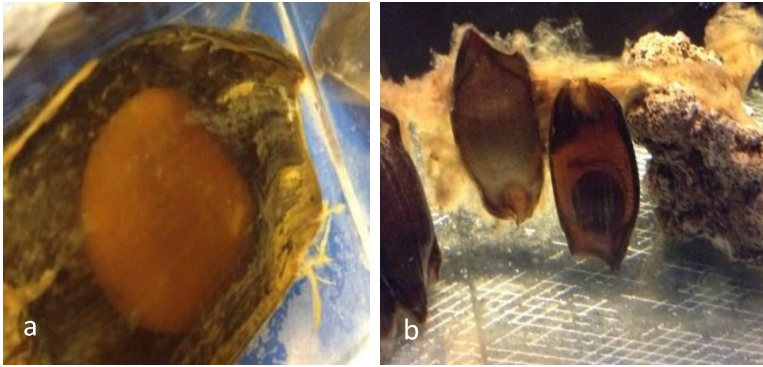


Figura 9.25 – Uovo (U). (a) il tuorlo di un uovo ( $0^{\circ}$  gdd) a cui è stata rimossa la patina esterna e (b) come appare un uovo appena deposto (uovo di sinistra in b) e come appare un uovo ripulito con l'embrione *in vivo* (uovo di destra in b al  $18^{\circ}$  gdd).

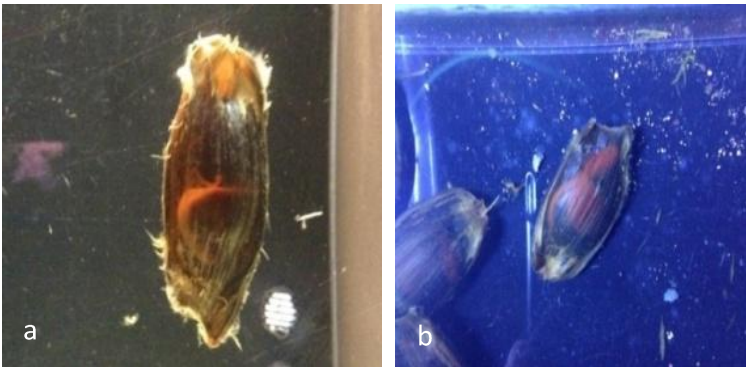


Figura 9.26 – Embrione piccolo (E1) ed embrione medio (E2). (a) un embrione piccolo al  $10^{\circ}$  gdd; (b) un embrione medio al  $32^{\circ}$  gdd.



Figura 9.27 – Embrione grande (E3) e un neonato. (a) un embrione grande (E3) al 70° gdd e (b) un neonato appena schiuso al 120° gdd.

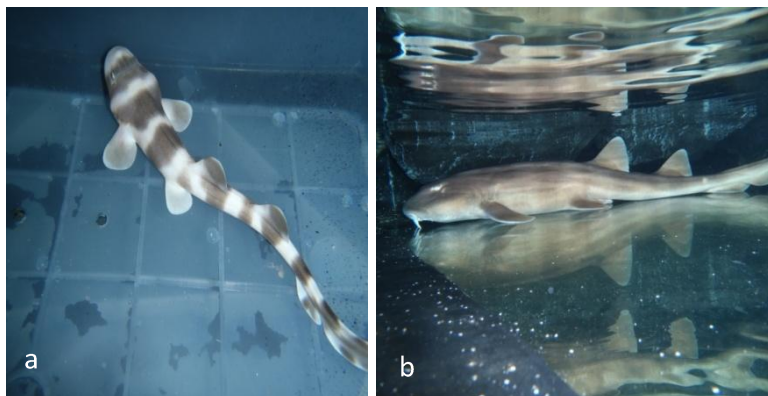


Figura 9.28 – Neonato al 2° mese ed adulto. (a) un giovanile al 4° mese dopo la schiusa (mds) e (b) l'adulto maschio riproduttore.



Figura 9.29 – Riparo e zona di nursery. (a) l'adulto femmina riproduttore all'interno della propria tana nel lato scuro de “*Lo scrigno di Nettuno*” a 2.5 lx; (b) la zona di nursery, di carattere prevalentemente roccioso si trovava nel lato luminoso a 5 lx dove avveniva il ritrovamento delle uova deposte.

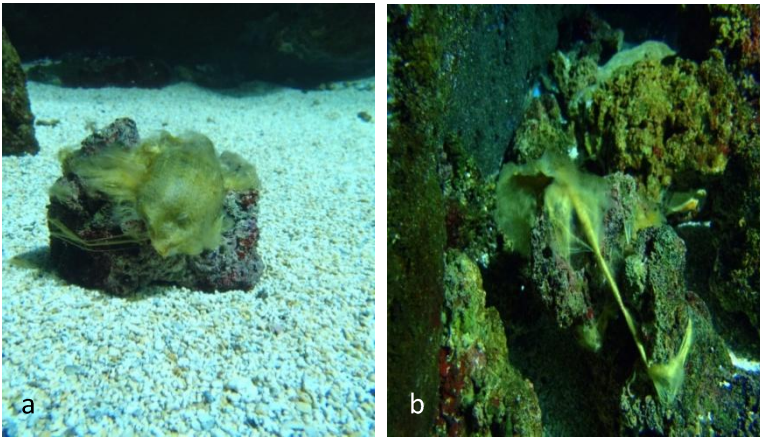


Figura 9.30 – Modalità di deposizione. (a) un uovo appena deposto saldamente legato ad una roccia; (b) un dettaglio dei caratteristici filamenti colloidali dell'uovo corneo che vanno a formare un “cappio” attorno la roccia.



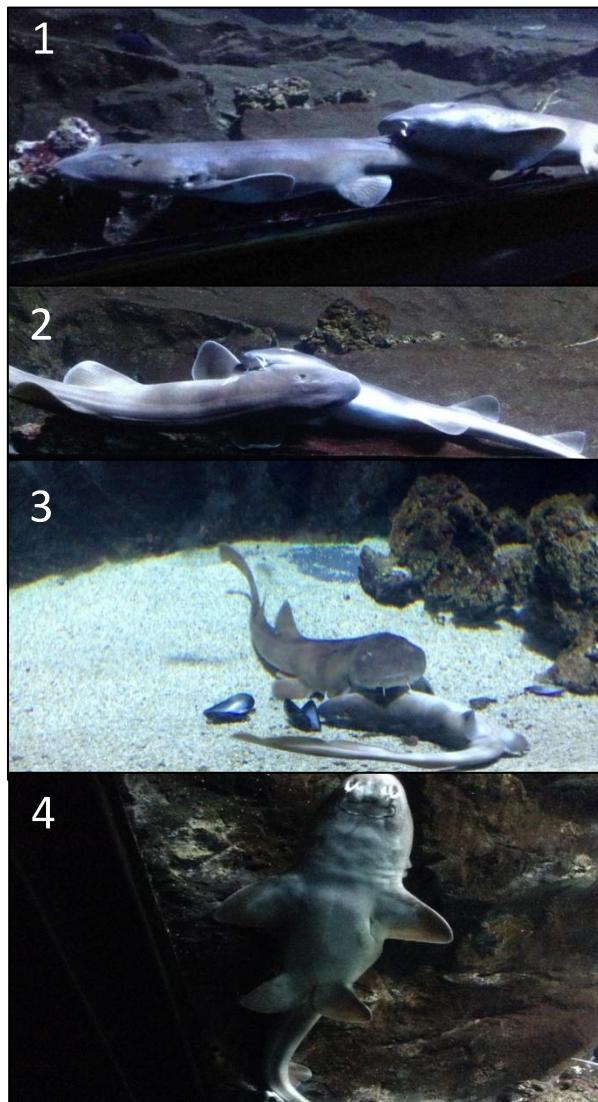


Figura 9.31 – Sequenza di accoppiamento di *C. punctatum*. 1, tentativo di corteggiamento (presa della pinna dorsale da parte del maschio); 2, corteggiamento corrisposto (la femmina corrisponde mordendo una delle due pettorali del maschio, che si posiziona ortogonalmente); 3, momento pre-copula (quando il maschio adulto rimane in posizione dorsale, mentre capovolge la femmine in posizione ventrale); 4, la femmina incinta durante il nuoto.

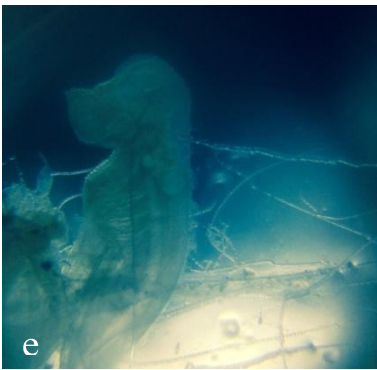
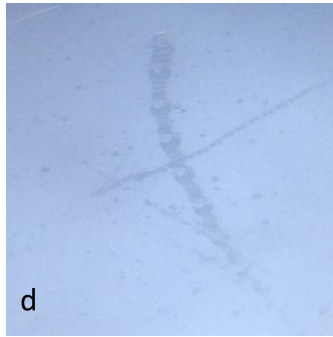
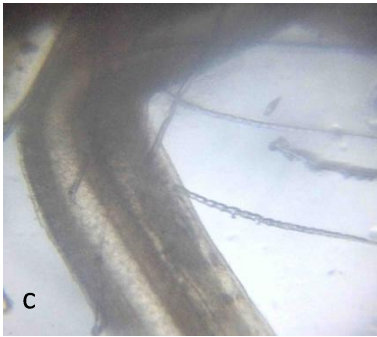
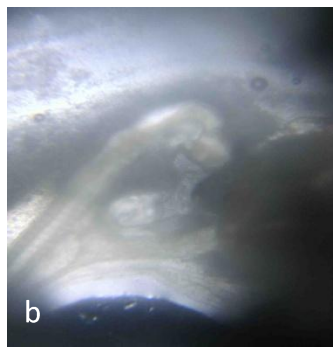
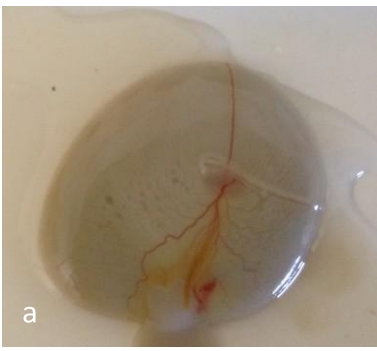


Figura 9.32 - Strutture embrionali.(a) sacco vitellino e relativo embrione in via di sviluppo deceduto ed estratto dall'uovo; (b, c, d, e, f) immagini ricavate tramite microscopia digitale; (b) embrione al 10° gdd; (c) sezione longitudinale, non trattata, di un embrione al 10° gdd, con particolari strutture regolari non identificate connesse ai tessuti; (d), struttura regolare non identificata, ma isolata dal gel embrionale di cui era caratterizzante e abbondante; e, embrione sviluppato prematuramente al 2° gdd era già visibile ad occhio nudo, apprezzabile collegamento tissutale con il sacco vitellino; f, arcate branchiali in via di sviluppo al 10° gdd.

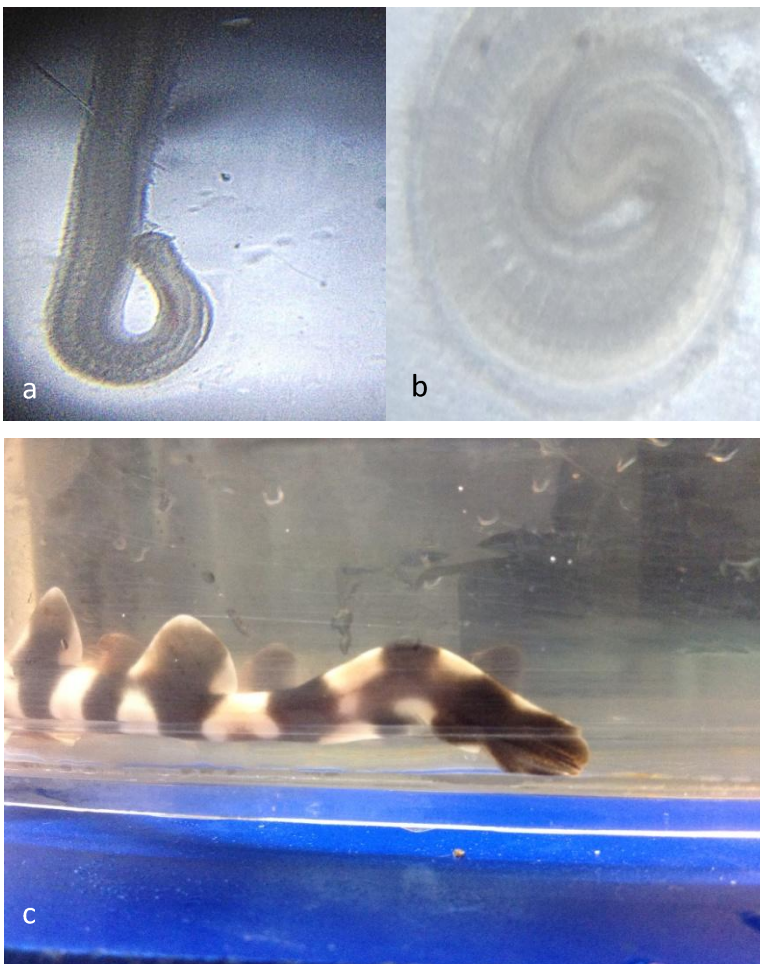


Figura 9.33 – Sviluppo della pinna caudale e mutazioni. Le immagini (a, b) sono state ricavate tramite microscopia digitale. (a) la notocorda in via di sviluppo al 10° gdd; (b) dettaglio della porzione estrema della pinna caudale in via di sviluppo al 5° gdd; (c) mutazione della notocorda di un neonato a livello della pinna caudale con lobo apicale rivolto verso il basso (n=1).

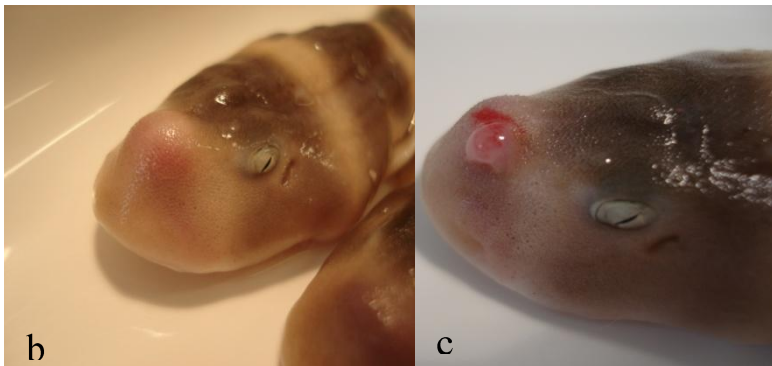


Figura 9.34 – Patologia non identificata in *C. punctatum*. (a,b,c) tale patologia ha colpito i piccoli nascituri di *C. punctatum* durante il divezzamento dal sacco vitellino. Alcuni dei sintomi osservati sono stati: marcato gonfiore nella porzione inter-orbitale, affanno respiratorio, rollio, rifiuto totale del cibo. (a) due neonati deceduti al 2° mese; (b) dettaglio del gonfiore inter-orbitale; (c) dettaglio del “bozzo” inter-orbitale perforato, contenente solamente eritrociti emorragici.

## **10. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI**

L'obiettivo finale della ricerca da me svolta presso l'Acquario di Cattolica era quello di raccogliere il maggior numero possibile di dati certi inerenti la riproduzione di *C. punctatum*, in ambiente controllato, da poter utilizzare come base di studio per la realizzazione di un protocollo ottimale di gestione della riproduzione di questa specie.

Durante questo periodo di studio ho potuto constatare come i limiti posti da Mohan e Aiken, 2004 Tab.6.1, siano corretti e ho potuto constatare inoltre come sia necessario un approccio preciso e specifico per il raggiungimento di ottimi risultati nel caso si voglia cominciare un programma di riproduzione di questa specie.

Gli esemplari adulti di *C. punctatum* (Fig.7.3; 8.19b; 9.28b; 9.29a; 9.31) non possono convivere con i propri piccoli all'interno della stessa vasca; i piccoli di *C. punctatum* (Fig.7.2; 8.19a; 9.27b; 9.28a; 9.30a,b) vengono attaccati e uccisi dagli adulti (affermazione che trova fondamenti nelle osservazioni effettuate in acquario al momento della liberazione di n = 4 esemplari di 20 cm/cad che gli acquaristi volevano introdurre in vasca espositiva.). Gli adulti tuttavia possono convivere tranquillamente con le uova appena deposte (Fig.7.1; 9.25a,b; 9.26a,b; 9.27a; 9.30a,b). Di contro i piccoli di *C. punctatum*

possono convivere a concentrazioni elevate anche in spazi relativamente piccoli. Questa condizione non è più valida quando viene inserito, nella stessa vasca, un uovo appena deposto. La presenza dei filamenti protettivi (Fig.9.25b e 9.30) è un fattore di grande pericolo per i piccoli che vi si possono impigliare e morire per asfissia. Uova accuratamente pulite dai filamenti colloidali possono invece maturare ed arrivare alla schiusa senza problemi in vasche che ospitano sia adulti che piccoli. Ho potuto constatare che le uova venivano deposte sempre fra le rocce presenti in vasca accuratamente legate o inserite in anfratti protetti (Fig.9.30a,b e Fig.9.29b). Tale osservazione risulta di grande interesse tanto che accumuli rocciosi vanno considerati di fondamentale importanza per la preparazione di vasche *ex novo* come inizio di un programma di riproduzione.

La costante osservazione delle uova mi ha permesso di valutare correttamente la tempistica di riferimento delle varie fasi di sviluppo dell'embrione (Fig.9.25; 9.26; 9.27; 9.28 e 9.8) e del piccolo squalo appena nato (Fig.9.27b). Il valore di tali dati consente una pianificazione delle fasi di evoluzione dell'embrione e una corretta gestione delle vasche utilizzate. La distinzione degli stadi embrionali è stata possibile tramite la combinazione dei riferimenti bibliografici (vd. paragrafo 8.5, Mojetta, 2004; Compagno e Niem, 2001; Harahush *et al.*, 2007) con i dati osservati durante lo sviluppo. Harahush *et al.*,

registrano che gli embrioni (Fig.7.1; 9.25b; 9.26a,b; 9.27a; 9.32a,b,c,d,e,f; 9.33a,b) sono visibili, per la prima volta, ad occhio nudo al 18° gdd. Questo dato contrasta con i risultati ottenuti (Fig.9.8), in quanto alle condizioni volute (Fig.9.1, 9.2 e 9.3) gli embrioni erano visibili intorno al 10° gdd. Harahush *et al.*, definirono inoltre gli stadi embrionali: i più maturi, di “pre-hatching” (pre-schiusa) individuabili intorno al 35° gdd, non corrispondono con i dati da me raccolti alle condizioni volute (Fig.9.8); in questo caso la pre-schiusa è stata osservata con l'avvicinarsi del 70° gdd. Riguardo la tempistica di schiusa (Fig.9.8), Harahush *et al.* lavorando a temperature tra i 21 e i 25°C la fissano intorno al 153° gdd, mentre alle condizioni volute, costanti a 24.5°C, si è ottenuta la schiusa intorno al 117° gdd. Queste tempistiche di sviluppo non sono state significativamente condizionate dalle diverse condizioni d'illuminamento a cui erano poste le uova (Fig.9.8,  $P>0.05$ ). La quasi totalità delle uova deposte si trovava nella parte luminosa della V5. Questa constatazione è anch'essa molto importante e permette ai tecnici di poter realizzare un ambiente il più idoneo possibile alla deposizione. Tenendo in considerazione il fattore illuminazione e la presenza di accumuli rocciosi: su 33 neonati, il rapporto di numerosità tra i sessi (sex-ratio) è stato di 6:4 in favore del sesso femminile (Fig.9.4), che risultava numericamente dominante. Di 6 maschi e 9 femmine ( $n=15$ ) sono state anche calcolate le rispettive funzioni di crescita medie (VBGF) che risultavano essere significativamente

differenti tra loro (Fig.9.5;  $P < 0.01$ ). Tale dato, insieme ai dati registrati dalla coppia di adulti (Tab.9.5), è in accordo con i dati dimensionali dei sessi di *C. punctatum*, espressi da Harahush *et al.*, 2007, dove i maschi, che raggiungono maturità sessuale intorno ad i 68 - 73 cm LT, hanno dimensioni maggiori rispetto alle femmine, che raggiungono la maturità sessuale intorno ad i 63 cm LT.

Al momento della schiusa è stata somministrata una dieta varia a 5 neonati di *C. punctatum*. Tramite il *Residual plot* di Gulland e Holt 1959 è stato possibile mostrare le oscillazioni dei valori delle rate di crescita sul tempo (Fig.9.10). Il parametro  $C > 1$ , evidenzia come le differenze tra le rate di crescita prodotte dai diversi cibi somministrati settimanalmente siano ampie e significativamente differenti. Siccome ogni settimana è stato variato il tipo di alimento, i neonati crescevano diversamente a seconda del cibo somministrato. Infatti, i dati ottenuti dalla somministrazione di gamberetti del genere *Pandalus* spp., hanno fornito un contributo alla crescita maggiore (Fig.9.11;  $P < 0.05$ ) rispetto agli altri cibi somministrati, sgombro (*S. scomber*), capelin (*M. Villosus*) e merluzzo (*M. merluccius*; Fig.9.11). Questo concorda con l'alto gradimento espresso da parte dei neonati rispetto a questo cibo e con i valori energetici espressi in Tab.8.1. Per 1 g di alimento: Gamberetti: 3 cal; Sgombro e Capelin: 2 cal; Merluzzo 1 cal. Tali valori sono concordi con i riferimenti bibliografici riguardo la dieta dei conspecifici



selvatici di *C. punctatum*, che si nutrono di piccoli invertebrati come granchi o gamberetti (Bennet 2003 e Compagno 2001).

Successivamente sono stati presi in considerazione 10 neonati che sono stati divezzati a dieta costante, per valutare l'influenza dell'illuminamento sulla crescita; in questo caso sono stati utilizzati i gamberetti (3cal; Fig.9.11) I dieci neonati (n=10) posti a coppie (CTx e Nx) e sotto cinque differenti condizioni d'illuminamento (Fig.8.13), non hanno mostrato essere influenzati della luce durante la loro crescita. Perché le differenze osservate sono non significative (Fig.9.17;  $P > 0.05$ ). Durante questa prova, è stata comunque osservata una maggiore frequenza di comportamenti legati allo stress, all'affanno e alla frenesia alimentare negli squali ospitati nelle vaschette con valori d'illuminamento maggiori: V5 (10lx) e V4 (5lx). Nelle altre vaschette gli esemplari assumevano comportamenti più naturali e nella norma. Per questo motivo possiamo dire che valori d'illuminamento modesto ( $L_x < 5 \text{ lx}$ ) mantengono gli individui appena nati in condizioni migliori rispetto a forti condizioni d'illuminamento ( $L_x > 3.7 \text{ lx}$ ) che possono disorientare l'animale.

Considerando i dati ottenuti riguardo il peso corporeo (PC) quindi ponendo il confronto tra le figure 9.14 e 9.23 si nota come i cinque piccoli divezzati dal sacco vitellino a dieta variata, presentino un trend di PC instabile (Fig.9.14 ) ed irregolare rispetto al trend di PC dei 10 nascituri esaminati a dieta costante

(Fig.9.23). La somministrazione di una dieta qualitativamente costante durante le prime fasi di accrescimento è quindi consigliabile al fine di ottenere una maggiore equilibrio nutrizionale ed evitando, così, ai piccoli neonati eccessive oscillazioni in PC.

L'accoppiamento (Fig.9.31) avveniva di continuo. I due squali, infatti, vivevano in condizioni ottimali sia per le condizioni delle acque (vd. paragrafo 9.1), sia per le condizioni di spazio e luce: a 5lx venivano deposte le uova sul cumulo di rocce (Fig.9.29b e 9.30), mentre a 2.5 lx la femmina aveva la sua zona di riparo (9.29a). La deposizione è stata regolare per tutto il periodo di osservazione con frequenze medie intorno a 2 uova per settimana (Fig.9.6 e 9.7) e circa 9 uova per mese (Fig. 9.6 e 9.7). Ritengo pertanto che le condizioni di mantenimento degli esemplari adulti (Fig.8.1; 8.2; 8.11a,b; 9.1; 9.2 e 9.3) siano ottimali.

La mortalità pre-natale riscontrata (Fig.9.24), quindi comprensiva di tutti gli stadi embrionali, si è manifestata in maniera preponderante durante le prime fasi di sviluppo ( $U = 49\%$  ed  $E1 = 31\%$ ). L'uovo appena deposto e il 1° stadio embrionale (E1) sono state le due fasi di sviluppo più delicate, ove si concentrava il maggior numero di eventi di mortalità. La soglia temporale passata la quale non si sono registrati più eventi di mortalità pre-natale è stata intorno al 27° gdd, quando l'embrione piccolo (E1) evolveva in embrione medio (E2). Alle

condizioni volute lo sviluppo ha avuto una durata di circa 4 mesi a partire dalla data di deposizione (Fig.9.6), passati i quali avveniva la schiusa. Infine, prendendo in esame le Fig.9.5, 9.14, 9.17, 9.18, 9.19, 9.20, 9.21 e 9.22 e le Tab.9.2, 9.3, 9.4 possiamo notare le dimensioni medie dei nascituri e l'andamento della loro crescita a tali condizioni sperimentali. Quindi, riproponendo le ipotesi sperimentali poste si conclude che:

1. I normali tempi di sviluppo embrionale e di schiusa non sono influenzati in maniera significativa da differenti condizioni di luce.
2. La crescita dei nascituri non è condizionata significativamente dall'illuminamento. In Fig.9.17 si possono apprezzare le curve di crescita ottenute, dove le differenze sono date dal caso ( $P > 0.05$ ).
3. La somministrazione di cibi differenti condiziona significativamente la crescita dei neonati. Il miglior cibo utilizzato per il divezzamento dal sacco vitellino è risultato essere *P. borealis* rispetto a *S. Scomber*, *M. villosus* e *M. merluccius*
4. L'integratore vitaminico non influenza significativamente la crescita dei neonati di *C. punctatum* durante il periodo di divezzamento dal sacco vitellino, che si ritiene essere un periodo probabilmente troppo breve per essere espressa una variazione apprezzabile.

In conclusione, per ottenere una corretta gestione e riproduzione di *C. punctatum* si suggerisce fortemente l'utilizzo di due diverse tipologie di vasca. Una vasca di grandi dimensioni che ospiterà la coppia di riproduttori ed una seconda di dimensioni ridotte che ospiterà i neonati. Le uova dovranno essere ragionevolmente gestite tra i due sistemi, accuratamente preparate e monitorate durante lo sviluppo embrionale. Una differente illuminazione della vasca dei riproduttori sembra essere un importante fattore influenzante i comportamenti riproduttivi allo stadio adulto. Mentre non sembra influire nè la crescita nè lo sviluppo embrionale. Per alimentare i neonati durante le prime fasi di crescita è consigliato l'utilizzo di una sola tipologia di cibo, ed i gamberetti risultano essere un ottima ed economica fonte alimentare. Questi, pur non essendo condizionati dalle diverse condizioni di illuminamento durante la crescita, hanno bisogno di un illuminazione inferiore a 5 lx per non incorrere in eccessivi eventi di stress. Più in generale posso affermare che il *C. punctatum* è una specie con comportamento schivo, con elevata resistenza a variazioni dei parametri delle acque (vd. resistenza ad ambienti ipossici), di facile mantenimento e con alte potenzialità di riproduzione in ambiente controllato prestandosi così ad eventuali progetti di riproduzione controllata che deve però essere supervisionata e gestita in maniera appropriata tenendo in considerazione quanto da me riportato.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Baccetti B., Baldacchini N.E., Bedini C., Brandmayer P., Capanna E., Chieffi G., Coboldi M., Ferraguti M., Ghirardelli E., Ghiretti F., Giusti F., Grigoli A., Mainardi D., Minelli A., Papi F., Parrinello N., Ricci N., Ruffo S., Sarà M., Scali V., Zullini A. (1991). *Zoologia* 2. Grasso ed., Bologna, 704 pp.
- Baranes A. e Shahrabany-Baranes O. (1986). *A numerical taxonomic study of the northern Red Sea carcharhinids*. In 2nd International Conference on Indo-Pacific Fishes, 29 pp.
- Bass A.J., D'Aubrey J.D. e Kistnasami N. (1975). *Sharks of the east coast of southern Africa. III. The families Carcharinidae (excluding Mustelus and Carcharinus) and Sphyrnidae*. The oceanographic research institute, 8: 1-101 pp.
- Bateson W. (1885). *Memoirs: The Later Stages in the Development of Bala-noglossus Kowalevskii, with a Suggestion as to the Affinities of the Enteropneusta*. Quarterly Journal of Microscopical Science, 25: 81-122 pp.
- Bennett M.B. e Kyne P.M. (2003). *Chiloscyllium punctatum*. SSG Australia e Oceania Regional Workshop di IUCN Red List of Threatened Species, 1: prt. 2 pp.
- Bonaparte C.L. (1838) *Selachorum tabula analytica*. Nuovi Annali delle Scienze Naturali, 2: 195-214 pp.

- Branstetter S. (1990). *Early life-history implications of selected carcharhinoid and lamnoid sharks of the northwest Atlantic*. NOAA Tech. Rep. NMFS, 90: 17-28 pp.
- Branstetter S. e McEachran J.D. (1986). *A first record of the *Odontaspis noronhai* (Lamniformes: Odontaspidae) for the western North Atlantic, with notes on two uncommon sharks from the Gulf of Mexico*. NEast Gulf Sci., 8(2): 153 – 160 pp.
- Camhi M.D., Valenti S.V., Fordham S.V., Fowler S.L. e Gibson C. (2007). *The Conservation Status of Pelagic Sharks and Rays*. Tubney House, 1: 1 – 78 pp.
- Cappetta H. (1987). *Chondrichthyes II: mesozoic and cenozoic elasmobranchii*. G. Fischer Verlag., 2 vol.
- Casey J.G., Pratt Jr. H.L. e Stillwell C.E. (1985). *Age and growth of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) from the western North Atlantic*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42(5): 963-975 pp.
- Castro-Aguirre J.L. e Pérez H.E. (1996). *Catálogo sistemático de las rayas y especies afines de México: Chondrichthyes: Elasmobranchii: Rajiformes: Batoideiomorpha*. Unam., 7 vol.
- Choromanski J.M. (2004). *Chapter 4 Quarantine and Isolation Facilities for Elasmobranchs: Design and Contruction*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 43 – 51 pp.

- Cognetti G., Sarà M., Magazzù G. (2008). *Biologia Marina*. Calderoni ed., Bologna, 606 pp.
- Compagno L.J.V. (1970). *Systematics of the genus Hemitriakis (Selachii, Carcharhinidae), and related genera*. California Academy of Sciences, 53 – 61 pp.
- Compagno L.J.V. (1973). *Interrelationships of living elasmobranchs*. Zool. J. Linn. Soc., 53(1): 15 – 61 pp.
- Compagno L.J.V. (1984). *Sharks of the World: An Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date*. FAO Species Catalogue, 4: prt. 2.
- Compagno L.J.V., Ebert D.A. e Cowley P.D. (1991). *Distribution of offshore demersal cartilaginous fish (Class Chondrichthyes) off the west coast of southern Africa, with notes on their systematics*. South African Journal of Marine Science, 11(1): 43 – 139 pp.
- Compagno L.J.V. e Niem V.H. (1998). Hemiscylliidae - *FAO identification guide for fishery purposes: The Living Marine Resources of the Western Central Pacific, Long carpetsharks*, FAO, 1249 – 1259 pp.
- Compagno L.J.V. (2001). *Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date*. Food & Agriculture Org., 2 (1) vol.
- Compagno, L.J.V. e Niem, V.H. (2002). *Carcharhinidae. The living marine resources of the Western Central Atlantic*, FAO, 1 vol.
- Conrath C.L. (2005). *Reproductive Biology Management Techniques for elasmobranch fisheries*. FAO, 103 – 126 pp.

- Corrigan S. e Beheregaray L.B. (2009). *A recent shark radiation: molecular phylogeny, biogeography and speciation of wobbegong sharks (family: Orectolobidae)*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 52(1): 205-216 pp.
- Croft G.S. (1997). *Maintenance of pre-term embryos of the lesser dogfish, Scyliorhinus canicula, in artificial egg cases*. *Drum & Croaker*, 28: 11 – 12 pp.
- Crow G.L., Luer W.H., Harshbarger J.C. (2001). *Histological Assessment of Goiter in Elasmobranch Fishes*. *Journal of aquatic Animal Health*, 13: 1 – 7 pp.
- Crow G.L. (2004). *Chapter 28 Goiter in Elasmobranchs*. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives* (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 441 – 446 pp.
- Crow G.L., Brock J.A. (2004). *Chapter 30 Necropsy Methods and Procedures for Elasmobranchs*. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives* (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 467 – 472 pp.
- Cuvier G. (1798). *Primer registro fósil de Procyon cancrivorus (Carnivora, Procyonidae) en la Argentina*. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 27 (2): 313-319 pp.
- Deacon K., Last P., McCosker J.E., Taylor L., Tricas T.C., Walker T.I. (1998). *Gli squali*. Deagostini ed., 288 pp.



- Dehart A. (2004). *Chapter 2 Species Selection and Compatibility*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 15 – 23.
- De Silva, R.I. (2006). *Taxonomy and Status of the Sharks and Rays of Sri Lanka*. Fauna of Sri Lanka: Status of, 294 pp.
- Duffin C.J. e Ward D.J. (1983). *Neoselachian sharks' teeth from the Lower Carboniferous of Britain and the Lower Permian of the USA*. Palaeontology, 26(1): 93-110 pp.
- Ebert D. A. (1989). *The taxonomy, biogeography, and biology of cow and frilled sharks (Chondrichthyes: Hexanchiformes)*. Rhodes University, Doctoral dissertation
- Ehret D.J. (2010). *Paleobiology and taxonomy of extinct lamnid and otodontid sharks (Chondrichthyes, Elasmobranchii, Lamniformes)*. University of Florida, Doctoral dissertation.
- Eitner B.J. (1995). *Systematics of the genus Alopias (Lamniformes: Alopiidae) with evidence for the existence of an unrecognized species*. Copeia, 562-571 pp.
- Fabbri D. (2003). *Abbiamo fatto 13? Anni di idee, progetti, cantieri, lavori che hanno cambiato l'aspetto e l'uso della città di Cattolica*. Design Republic.
- Fowler H.W. (1947). *New Taxonomic Names of Fish-like Vertebrates*. Academy of Natural Sciences, 1 – 16 pp.

- Francis M. P., Stevens J. D. e Last P.R. (1988). *New records of Somniosus (Elasmobranchii: Squalidae) from Australasia, with comments on the taxonomy of the genus*. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 22(3): 401- 409 pp.
- Gendron S., Menzies S. (2004). *Chapter 11 Elasmobranch Acclimatization and Introduction*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 151 – 162 pp.
- Ghigi A. (1969). *Zoologia Generale*. Cappelli ed., Bologna, 584 pp.
- Ghittino P. (1983). *Tecnologia e Patologia in Acquacoltura*. Tipografia Emilio Bono ed., Torino, 1: 99 pp.
- Gilbert C.R. (1967). *A revision of the hammerhead sharks (family Sphyrnidae)*. 119: 1 – 88 pp.
- Gill F.H. (1862). *Subfamily Hemiscylliinae Gill, 1862 (Family Scylliorhinoidea)*. Ann. Lyceum Nat. Hist. NY, 7(32): 408 pp.
- Gilmore R.G., Dodrill J.W. e Linley P.A. (1983). *Reproduction and embryonic development of the sand tiger shark, Odontaspis taurus (Rafinesque)*. Fishery Bulletin 81 (2) vol.
- Gilmore R. G. (1983). *Observations on the embryos of the longfin mako, Isurus paucus, and the bigeye thresher, Alopias superciliosus*. Copeia, 375 – 382 pp.

- Gilmore R.G. (1993). *Reproductive biology of lamnoid sharks*. Environmental biology of fishes, 38: 95 -115 pp.
- Goodwin N.B., Dulvy N.K. e Reynolds J.D. (2002). *Life-history correlates of the evolution of live bearing in fishes*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 357(1419): 259 pp.
- Gordon J.D.M., Bergstad O.A. e Pascoe P.L. (2002). *The influence of artificial light on the capture of deep-water demersal fish by bottom trawling*. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 82(02): 339-344 pp.
- Gottfried M.D. e Rabarison J.A. (1997). *First Mesozoic Gondwanan record of a sawshark (Chondrichthyes, Pristiophoriformes), from the Late Cretaceous of Madagascar*. Journal of Vertebrate Paleontology, 17(4): 750-751 pp.
- Gridelli S. (2002). *Acquacoltura e Ittiopatologia: Problematiche sanitarie in Elasmobranchii stabulati in cattività*. Università degli studi di Bologna, Tesi di laurea.
- Gulland J.A. e Holt J. (1959) Estimation of growth parameters for data at unequal time intervals. Journal Conservation, 47 – 9 pp.
- Hamlett W.C., Hysell M.K. (1998). *Uterine Specializations in Elasmobranchs*. The Journal of Experimental Zoology, 282: 438 – 459 pp.
- Hamm S.A. e Shimada K. (2002). *Associated tooth set of the Late Cretaceous lamniform shark, Scapanorhynchus raphiodon (Mitsukurinidae), from the Niobrara Chalk of western Kansas*. Transactions of the Kansas Academy of Science, 105(1): 18-26 pp.

- Harahush B.K., Fischer A.B.P. e Collin, S.P. (2007). *Captive breeding and embryonic development of *Chiloscyllium punctatum* Muller & Henle, 1838 (Elasmobranchii: Hemiscyllidae)*. *Journal of Fish Biology*, 71(4): 1007-1022 pp.
- Helfman G.S. (1978). *Patterns of community structure in fishes: summary and overview*. *Environmental Biology of Fishes*, 3(1): 129-148 pp.
- Henningsen A.D., Smale M., Garner R., Kinnunen N. (2004). *Chapter 16 Reproduction, Embryonic Development and Reproductive Physiology of Elasmobranchs*. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives* (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 227 – 236 pp.
- Herman J., Crochard M. e Girardot M. (1974). *Quelques restes de sélaciens récoltés dans les sables du Kattendijk à Kallo*. I. *Selachii–Euselachii*. *Bulletin de la Société belge de Géologie*, 83(1): 15-31 pp.
- Herman J. S., Hovestadt-Euler M. e Hovestadt D. C. (1990). *Contributions to the study of the comparative morphology of teeth and other relevant ichthyodorulites in living supra-specific taxa of Chondrichthyan fishes: part A: Selachii. 3: Order: Squaliformes-Families: Echinorhinidae, Oxynotidae and Squalidae*. *Bulletin-Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Mededelingen-Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen*, 59 pp.

- Hoese D.F. e Gates J.E. (2006). *Mackerel Sharks, Makos, Porbeagles, White Sharks (CAAB: 37010000)*. Zoological catalogue of Australia: Fishes, Myxini, Petromyzontida, Chondrichthyes, Sarcopterygii, Actinopterygii (in part), 35: 76 pp.
- Horn M.H. (1998). *Chapter 3 Feeding and Digestion*. The Physiology of Fishes. Evans D. ed., 519 pp.
- Human B. (2006). *A taxonomic revision of the catshark genus Poroderma Smith, 1837 (Chondrichthyes: Carchariniformes: Scyliorhinidae)*. Zootaxa, 1229: 1-32 pp.
- Hutchins M. (2003). *Zoo and aquarium animal management and conservation: current trends and future challenges*. International Zoo Yearbook, 38(1): 14-28 pp.
- Huxley T. H. (1880). *On the application of the laws of evolution to the arrangement of the Vertebrata, and more particularly of the Mammalia*. Zoological Society of London, 1880:649–662 pp.
- Iglésias S.P., Lecointre G. e Sellos D.Y. (2005). *Extensive paraphyly within sharks of the order Carcharhiniformes inferred from nuclear and mitochondrial genes*. Molecular phylogenetics and evolution, 34(3): 569-583 pp.
- Janse M. (2003). *Consideration on the Diet Composition and Feeding Rate of Demersal Sharks in 15 European Public Aquaria*. Zoo Biology, 22: 203 – 226 pp.

- Janse M., Firchau B., Mohan P.J. (2004). *Chapter 14 Elasmobranch Nutrition, Food Handling and feeding techniques*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 183 – 200 pp.
- Klay G. (1977). *Shark nutritional requirement in captivity*. Drum and Croaker, 2: 147 – 150 pp.
- Koob T.J. (2004). *Chapter 1 Elasmobranchs in the Public Aquarium: 1860 to 1930*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 1 – 16 pp.
- Kriwet J. e Benton M.J. (2004). *Neoselachian (Chondrichthyes, Elasmobranchii) diversity across the Cretaceous–Tertiary boundary*. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 214(3): 181-194 pp.
- Linke T.E., Platell M.E. e Potter I.C. (2001). *Factors influencing the partitioning of food resources among six fish species in a large embayment with juxtaposing bare sand and seagrass habitats*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 266(2): 193-217 pp.
- Linneo C. (1758). (*X ed.*) *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Holmiae, Impensis Laurentii Salvii, 2 vol.

- López J.A., Ryburn J.A., Fedrigo O. e Naylor G.J. (2006). *Phylogeny of sharks of the family Triakidae (Carcharhiniformes) and its implications for the evolution of carcharhiniform placental viviparity*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(1): 50-60 pp.
- Marshall A. (2004). *Chapter 7 Elasmobranch Capture Techniques and Equipment*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 89 – 103 pp.
- Moe M.A. (1992). *The marine aquarium handbook: beginner to breeder*. Green Turtle Publications, 320 pp.
- Mohan P.J., Clark S.T. e Schmid T.H. (2004). *Chapter 15 Age and Growth of Captive Sharks*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 201 – 226 pp.
- Mohan P.J. e Aiken A. (2004). *Chapter 6 Water Quality and Life Support Systems for Large Elasmobranch Exhibits*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 69 – 88 pp.
- Mojetta A. (2004). *Squali*. Le Guide White Star Immersioni ed., Vercelli, 167 pp.

- Morris L.A., Livengood J.E., Chapman A.F. (2010). *Sharks for the Aquarium and Considerations for their selection*. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1 – 7 pp.
- Murru F.L. (1990). *The care and maintenance of elasmobranchs in controlled environments. Elasmobranchs as Living Resources: Advances in Biology, Ecology, Systematics, and the Status of Fisheries*. (Pratt, Gruber, and Taniuchi ed.) NOAA Technical Report NMFS, 90: 203-209 pp.
- Müller J. e Henle F.G.J. (1837). *Ueber die Gattungen der Plagiostomen*. Archiv für Naturgeschichte, 3: 394-401 pp.
- Müller J. e Henle F.G.J. (1838). *On the generic characters of cartilaginous fishes, with descriptions of new genera*. Magazine of Natural History, 2(3) vol.
- Nakaya K. (1975). *Taxonomy, comparative anatomy and phylogeny of Japanese catsharks, Scyliorhinidae. Memoirs of the Faculty of Fisheries*. Hokkaido University, 23(1): 1-94 pp.
- Nateewathana A., Aungtonya C., e Sirivejabandhu R. (1993). *Revised checklist of fishes in the reference collection of Phuket marine biological center, department of fisheries*. Thailand. Phuket mar. biol. Cent. Spec. Publ., 12: 9-33 pp.
- Nelson D.R. e Johnson R.H. (1970). *Diel activity rhythms in the nocturnal, bottom-dwelling sharks, Heterodontus francisci and Cephaloscyllium ventriosum*. Copeia, 732 – 739 pp.



- Nistri R. (2004). *Pesci marini tropicali d'acquario*. Mondadori ed., Milano, 256 pp.
- Notarbartolo di Sciara G. e Bianchi I. (1998). *Guida degli squali e delle razze del Mediterraneo* (Guide of sharks and rays from the Mediterranean). Franco Muzzio ed., 388 pp.
- Paccalet Y. (2003). *La vita segreta degli squali*. Gruppo editoriale Armenia ed., 310 pp.
- Patterson C. (1978). *Verifiability in systematics*. Systematic zoology, 218-222 pp.
- Pauly D. (1979). *Theory and management of tropical multispecies stocks*. ICLARM studies and reviews, 1: 35 pp.
- Pauly D. (1984). *Length-converted catch curves: a powerful tool for fisheries research in the tropics (III: conclusion)*. Fishbyte, 2(3): 9 – 10 pp
- Paxton J.R. (1989). *Zoological catalogue of Australia: Pisces*. Australian Govt. Pub. Service, 7 vol.
- Piet, G.J. e Guruge W.A. (1997). *Diel variation in feeding and vertical distribution of ten co-occurring fish species: consequences for resource partitioning*. Environmental Biology of Fishes, 50(3): 293-307 pp.
- Platell M.E. e Potter I.C. (2001). *Partitioning of food resources amongst 18 abundant benthic carnivorous fish species in marine waters on the lower west coast of Australia*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 261(1): 31-54 pp.

- Powell D.C., Wisner M. e Rupp J. (2004). *Chapter 5 Design and Construction of Exhibits for Elasmobranchs*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 54 – 69 pp.
  
- Preziosi R., Gridelli S., Borghetti P., Diana A., Parmeggiani A., Fioravati M.L., Marcer F., Bianchi I., Walsh M., Berzins I. (2006). *Spinal deformity in a sandtiger shark, Carcharias taurus (Rafinesque): a clinical-pathological study*. Journal of fish Diseases, 29: 49 – 60 pp.
  
- Robertson A.I. e Duke N. C. (1987). *Mangroves as nursery sites: comparisons of the abundance and species composition of fish and crustaceans in mangroves and other nearshore habitats in tropical Australia*. Marine Biology, 96(2): 193 – 205 pp.
  
- Ross S.T. (1986). *Resource partitioning in fish assemblages: a review of field studies*. Copeia, 352 – 388 pp.
  
- Schmid T.H., Murru F.L., McDonald F. (1990). *Feeding habits and grow rates of bull (Carcharinus leucas (Valenciennes)), sanbar (Carcharinus plumbeus), sandtiger (Eugomphodus taurus (Rafinesque)) and nurse (Ginglymostoma cirratum (Bannaterre)) sharks maintained in captivity*. Journal of Acquaculture & Aquatic Sciences, 5(4): 1 – 8 pp.
  
- Schoener T.W. (1993). *On the relative importance of direct versus indirect effects in ecological communities. Mutualism and community organization: behavioral, theoretical and food web approaches*. Oxford University Press, 365-411 pp.

- Schafer L.N., Platell M.E., Valesini F.J. e Potter, I.C. (2002). *Comparisons between the influence of habitat type, season and body size on the dietary compositions of fish species in nearshore marine waters*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 278(1): 67 – 92 pp.
- Shimada K. (2007). *Mesozoic origin for megamouth shark (Lamniformes: Megachasmidae)*. Journal of Vertebrate Paleontology, 27(2): 512-516 pp.
- Simpfendorfer C.A. e Milward N.E. (1993). *Utilisation of a tropical bay as a nursery area by sharks of the families Carcharhinidae and Sphyrnidae*. Environmental Biology of Fishes, 37(4): 337-345 pp.
- Siverson M. (1995). *Revision of the Danian cow sharks, sand tiger sharks, and goblin sharks (Hexanchidae, Odontaspidae, and Mitsukurinidae) from southern Sweden*. Journal of Vertebrate Paleontology, 15(1): 1-12 pp.
- Skandarajah A., Reber C.D., Switz N.A., Fletcher D.A., (2014). *Quantitative Imaging with a Mobile Phone Microscope*. PLoS One, 13: 9 pp.
- Smith M.F.L., Marshall A., Correia J.P., Rupp J. (2004). *Chapter 8 Elasmobranch Transport Techniques and Equipment*. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives (ed. by Smith M., Warmolts D., Thoney D. e Hueter R. Special publication of the Ohio Biological Survey, Columbus, Ohio, USA): 105 – 131 pp.
- Strasburg D.W. (1958). *Distribution, abundant and habits of pelagic sharks in the Central Pacific Ocean*. Fishery Bulletin of the fish and Wildlife Service, United States Department of the Interior, 58: 335 – 361 pp.

- Stevens J.D. (2005). *Taxonomy and field techniques for identification and available regional guides*. FAO Fisheries Technical Paper, 474: 15 pp.
- Thurman E.M. (1983). *Determination of aquatic humic substances in natural waters*. U.S. Geol. Surv. Pap. Hydrol. Sci., 2262: 47 – 52 pp.
- Tobón-López A., Rubio E.A. e Giraldo A. (2008). *Composition and taxonomic analysis of the fish fauna in the Gulf of Tribugá, northern Colombian Pacific*. Latin American Journal of Aquatic Research, 36(1) vol.
- Trainito E., (2004). *Atlante di Flora e Fauna del Mediterraneo*. Il Castello ed., 336 pp.
- Uchida S.E.N.Z.O., Toda, M.I.N.O.R.U. e Kamei Y.O.S.H.I.A.K.I. (1990). *Reproduction of elasmobranchs in captivity. Elasmobranchs as Living Resources: Advances in the Biology, Ecology, Systematics, and the Status of the Fisheries*. NOAA Technical Report NMFS, 90: 211-237 pp.
- Van Dykhuizen G. e Mollet H.F. (1992). *Growth, age estimation and feeding of captive sevengill sharks, *Notorynchus cepedianus*, at the Monterey Bay Aquarium*. Marine and Freshwater Research, 43(1): 297-318 pp.
- Vaz D.F. e De Carvalho M.R. (2013). *Morphological and taxonomic revision of species of *Squatina* from the Southwestern Atlantic Ocean (Chondrichthyes: Squatiniformes: Squatinidae)*. Zootaxa, 3695(1): 1-81 pp.
- Von Bertalanffy L. (1938). *A quantitative theory of organic growth (inquiries on growth laws. II)*. Human biology, 10(2): 181-213 pp.

- Wass R.C. (1973). *Size, growth, and reproduction of the sandbar shark, Carcharhinus milberti, in Hawaii*. Pac Sci 27(4): 305-318 pp.
- Welton B.J. (2013). *Cetorhinus cf. C. maximus (Gunnerus)(Lamniformes: Cetorhinidae), A Basking Shark from the Late Miocene Empire Formation, Coos Bay, Oregon*. Bulletin, Southern California Academy of Sciences, 112(2): 74-92 pp.
- Werner E.E. e Gilliam, J.F. (1984). *The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations*. Annual review of ecology and systematics, 393-425 pp.
- West J.G. and Carter S. (1990). *Observations on the development and growth of the epaulette shark Hemiscyllium ocellatum (Bonnaterre) in captivity*. Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences, 5: 111-117 pp.
- White, W.T. e Potter I.C. (2004). *Habitat partitioning among four elasmobranch species in nearshore, shallow waters of a subtropical embayment in Western Australia*. Marine Biology, 145(5): 1023-1032 pp.
- White W.T. e Last P.R. (2012). *A review of the taxonomy of chondrichthyan fishes: a modern perspective*. Journal of fish biology, 80(5): 901-917 pp.
- Yano K. (1985). *Studies on morphology, phylogeny, taxonomy and biology of Japanese squaloid sharks, order Squaliformes*. Tokai University, Doctoral dissertation, 335 pp.

## RIGRAZIAMENTI

---

La realizzazione del progetto è stata possibile, unicamente, grazie alla grande fiducia ricevuta dal Dr. *Stefano Gridelli* e da parte di tutto lo staff dell'Acquario “*Le Navi*” di Cattolica.

É riduttivo esprimere in una sola pagina la mia gratitudine per tutte quelle persone con cui ho avuto il piacere e l'onore di lavorare in questi mesi. Mi limiterò, perciò, a riportare i nominativi dei membri dello staff, che hanno arricchito la mia esperienza di tesi con la loro grande professionalità e umanità: la Dr.essa *Daniela Florio* (veterinaria), il Dr. *Massimiliano Donadi* (resp. area tecnica), *Davide Gori* (tecnico idroelettrico), il Dr. *Paolo Bordoni*, *Luca Zarpellon* (tecnico elettromeccanico), il Dr. *Stefano Gridelli* (resp. sez. Trop.), il Dr. *Antonio Ferri* (resp. attiv. sub.), *Nicoletta Giuliani* (acquarista), il Dr. *Simone Canini*, la Dr.essa *Alessandra Trappetti*, il Dr. *Filippo Bargnesi*, il Dr. *Cristiano Da Rugna* (resp. sez. Medit.), *Simone Fuzzi* (acquarista), *Federico Domenichelli* (acquarista), la Dr.essa *Valentina Tamburelli*, la Dr.essa *Chiara Calcinelli* (resp. area cult.), la Dr.essa *Daniela Pascucci* e *Tiziano Farroni* (resp. area marketing). Concludo ringraziando il Prof. *Oliviero Mordenti* per l'essenziale aiuto fornito durante la marcatura dei neonati, il Dr. *Simone Canini*, *Davide Gori* e il Dr. *Paolo Bordoni* per essere stati dei valorosi compagni di lavoro e in fine il Dr. *Antonio Ferri* che, durante i primi giorni, mi disse: “*Non ti preoccupare. Non ti lasciamo solo.*”. Grazie.