



Università degli Studi di Palermo
Dipartimento di Biologia Ambientale e biodiversità,
Dottorato di Biologia Animale Ciclo XXIII (2009-2012)
BIO/07

Biologia ed ecologia riproduttiva di *Arbacia lixula* (Linneo, 1758)



Dottoranda: Dott. Giulia Visconti

Tutor: Prof. Silvano Riggio

Coordinatore: Prof. Nicolò Parrinello



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dipartimento di Biologia ambientale e biodiversità

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE

XXIII CICLO

BIO/07

**Biologia ed ecologia riproduttiva di *Arbacia
lixula* (Linneo, 1758)**

Tutor:

Prof. S. Riggio

Dottoranda:

Giulia Visconti

Coordinatore:

Prof. N. Parrinello

Indice

1. Introduzione

| | | | |
|-----|---|------|----|
| 1.1 | Introduzione generale | pag. | 1 |
| 1.2 | Strategie riproduttive negli organismi bentonici marini | pag. | 5 |
| 1.3 | Il successo riproduttivo negli organismi bentonici marini | pag. | 8 |
| 1.4 | Lo sviluppo embrionale e larvale negli organismi bentonici marini | pag. | 7 |
| 1.5 | Relazioni tra variabili ambientali e successo riproduttivo negli organismi bentonici marini | pag. | 12 |
| 1.6 | Obiettivi della tesi | pag. | 15 |

2. Note sulla specie

| | | | |
|-----|--------------------------------------|------|----|
| 2.1 | <i>Arbacia lixula</i> (Linneo, 1758) | pag. | 19 |
|-----|--------------------------------------|------|----|

3. Area di studio

| | | | |
|-----|--------------------------------|------|----|
| 3.1 | L'Isola di Ustica | pag. | 24 |
| 3.2 | Capo Gallo Isola delle Femmine | pag. | 25 |

4. Il ciclo riproduttivo di *A. lixula*

| | | | |
|---------|--|------|----|
| 4.1 | Introduzione | pag. | 28 |
| 4.2 | Primo anno di studio: descrizione del ciclo riproduttivo di <i>A. lixula</i> su piccola scala spaziale | | |
| 4.2.1 | Materiali e metodi | pag. | 31 |
| 4.2.1.1 | Tecniche usate | pag. | 31 |
| | <i>L'indice Gonado-Somatico (IGS)</i> | pag. | 31 |
| | <i>L'esame istologico delle gonadi</i> | pag. | 32 |
| 4.2.1.2 | Raccolta dati | pag. | 35 |
| 4.2.2. | Risultati primo anno di studio: il ciclo riproduttivo di <i>A. lixula</i> su piccola scala spaziale | pag. | 38 |
| | <i>Analisi dell'IGS</i> | pag. | 38 |
| | <i>Analisi istologiche</i> | pag. | 38 |
| | <i>Distribuzione delle frequenze di classi di taglia degli ovociti</i> | pag. | 42 |

| | | |
|--|-----|----|
| <i>Analisi dello strato nutritivo</i> | pag | 45 |
| 4.3 Secondo anno di studio: osservazioni sul ciclo riproduttivo di <i>A. lixula</i> condotte su scala spaziale ampia | | |
| 4.3.1 Materiali e metodi | pag | 47 |
| 4.3.1.1 Raccolta dei dati | pag | 47 |
| 4.3.1.2 Risultati secondo anno di studio: il ciclo riproduttivo di <i>A. lixula</i> su scala spaziale ampia | | |
| <i>Analisi dell'IGS</i> | pag | 48 |
| <i>Analisi istologiche</i> | pag | 50 |
| <i>Distribuzione delle frequenze di classi di taglia degli ovociti</i> | pag | 50 |
| <i>Analisi dello strato nutritivo</i> | pag | 50 |
| 4.4 Discussione | pag | 54 |

5. Il successo di fecondazione in *A. lixula*

| | | |
|---|------|----|
| 5.1 Introduzione | pag. | 57 |
| 5.1.2 Il successo di fecondazione negli organismi marini a fecondazione esterna | pag. | 59 |
| 5.1.3 Lo sperma: limitazione e funzionalità | pag. | 61 |
| 5.1.4 L'uovo: taglia e funzionalità | pag. | 63 |
| 5.2 Primo anno di studio: analisi della capacità di fecondazione dei gameti di <i>A. lixula</i> | | |
| 5.2.1 Materiali e metodi | pag | 65 |
| 5.2.1.1 Disegno sperimentale | pag | 65 |
| 5.2.1.2 | | |
| <i>Esperimento I: capacità di fecondazione dello sperma di <i>A. lixula</i></i> | pag | 66 |
| <i>Esperimento II: capacità di fecondazione delle uova di <i>A. lixula</i></i> | pag | 67 |
| 5.2.1.3 Raccolta dei dati | pag | 68 |
| 5.2.2 Risultati primo anno di studio: analisi della capacità di fecondazione dei gameti di <i>A. lixula</i> | | |
| 5.2.2.1 Capacità di fecondazione dello sperma di <i>A. lixula</i> | pag | 69 |
| 5.2.2.2 Capacità di fecondazione delle uova di <i>A. lixula</i> | pag | 71 |

| | | |
|---------|---|--------|
| 5.3 | Secondo anno di studio: analisi del successo di fecondazione di <i>A. lixula</i> durante la stagione riproduttiva | |
| 5.3.1 | Materiali e metodi | pag 72 |
| 5.3.1.1 | Tecniche usate | pag 72 |
| 5.3.1.2 | Raccolta dei dati | pag 73 |
| | <i>Concentrazione e taglia delle uova di A. lixula</i> | pag 73 |
| | <i>Successo di fecondazione di A. lixula durante la stagione riproduttiva</i> | pag 73 |
| 5.3.2 | Risultati secondo anno di studio: analisi del successo di fecondazione di <i>A. lixula</i> durante la stagione riproduttiva | |
| 5.3.2.1 | Analisi della taglia e della concentrazione delle uova di <i>A. lixula</i> | pag 74 |
| 5.3.2.2 | Successo di fecondazione di <i>A. lixula</i> durante la stagione riproduttiva | pag 76 |
| 5.4 | Discussione | pag 78 |

6. Il successo di sviluppo embrionale e larvale di *A. lixula*

| | | |
|---------|---|---------|
| 6.1 | Introduzione | pag. 80 |
| 6.1.1 | Lo sviluppo embrionale e larvale negli invertebrati marini, con riferimento agli echinidi regolari | pag 81 |
| 6.2 | Prima fase di studio: descrizione dello sviluppo embrionale e larvale di <i>A. lixula</i> | |
| 6.2.1 | Materiali e metodi | pag. 67 |
| 6.2.1.1 | Preparazione delle colture per l'osservazione dello sviluppo embrionale e larvale di <i>A. lixula</i> | pag 84 |
| 6.2.1.2 | Raccolta dei dati | pag 85 |
| 6.2.2 | Risultati prima fase dello studio: descrizione dello sviluppo embrionale e larvale di <i>A. lixula</i> | pag. 86 |
| 6.3 | Seconda fase dello studio: successo embrionale e larvale di <i>A. lixula</i> durante la stagione riproduttiva | |
| 6.3.1 | Materiali e metodi | pag 88 |
| 6.3.1.1 | Disegno sperimentale | pag 88 |
| 6.3.1.2 | Raccolta dei dati | pag 89 |

| | | | |
|---|--|---------|-----|
| 6.3.2 | Risultati seconda fase dello studio: successo di sviluppo embrionale e larvale di <i>A. lixula</i> durante la stagione riproduttiva | pag | 89 |
| 6.4 | Discussione | pag. | 93 |
| 7. Risposte riproduttive di <i>A. lixula</i> alle variabili ambientali, aumento della temperatura ed acidificazione dell'acqua | | | |
| 7.1 | Introduzione | pag. | 95 |
| 7.2 | Materiali e metodi | pag. | 101 |
| 7.2.1 | Allestimento delle colture sperimentali | pag | 101 |
| 7.2.2 | Disegno sperimentale | pag | 103 |
| | <i>Valutazione del successo di fecondazione e di sviluppo di <i>A. lixula</i> in differenti condizioni di temperatura e pH</i> | pag | 103 |
| | <i>Analisi morfometrica delle larve di <i>A. lixula</i> poste in differenti condizioni di temperatura e pH</i> | pag | 104 |
| 7.3 | Risultati | pag. | 106 |
| 7.3.1 | Valutazione del successo di fecondazione e di sviluppo di <i>A. lixula</i> in differenti condizioni di temperatura e pH | pag | 106 |
| 7.3.2 | Effetti della variazione di temperatura e pH sulla morfologia larvale di <i>A. lixula</i> | pag | 110 |
| 7.4 | Discussione | pag. | 114 |
| 7.4.1 | Risposta del successo di fecondazione e di sviluppo embrionale e larvale di <i>A. lixula</i> all'aumento di temperatura e diminuzione del pH | pag pag | 114 |
| 7.4.2 | Effetti della variazione di temperatura e pH sulla morfologia larvale di <i>A. lixula</i> | pag | 116 |
| 8. | Conclusioni | pag | 119 |
| 9. | Bibliografia | pag | 130 |
| 10. | Ringraziamenti | pag | 148 |

1. Introduzione

La modalità e la regolazione della riproduzione sono la chiave per comprendere le caratteristiche di una specie ovvero la sua evoluzione biologica ed ecologica (Stearns, 1992).

1.1 Introduzione generale

Se vi è un processo che si può considerare essenziale per la vita, questo è quello riproduttivo. La riproduzione non è necessaria al singolo individuo, ma senza di essa le specie andrebbero incontro ad estinzione. Lo stesso Darwin, che scardinò il fissismo delle specie proponendone un'evoluzione tramite selezione naturale (Darwin, 1859), si rese conto del ruolo fondamentale giocato dalla selezione sessuale nell'influenzare la fitness. Nel 1871, per spiegare il dimorfismo sessuale, Darwin propose quindi una seconda teoria: quella della selezione sessuale. Darwin si accorse che, in molte specie, i maschi esibiscono tratti morfologici e comportamentali molto elaborati e vistosi, che non sono condivisi dalle femmine.

Darwin fu ossessionato dal paradosso della coda del pavone: che vantaggio avrebbe mai potuto trarne dal punto di vista della sopravvivenza rispetto a ipotetici pavoni che avessero sviluppato livree più dimesse e funzionali e tra l'altro meno visibili ai possibili predatori? Era questo che la selezione naturale intendeva come migliore? E perché mai l'usignolo non componeva di notte piuttosto che di giorno le sue sinfonie, utili solo a farlo individuare dai suoi predatori? Partendo da questi e altri esempi che sembrano negare la selezione naturale, Darwin formulò la sua seconda teoria, quella della selezione sessuale, nella quale la pressione selettiva era fornita non già dalla capacità di sopravvivenza dell'individuo quanto dalla competizione per l'accoppiamento, dove i maschi (soggetti alla scelta) tendono a sviluppare dei tratti sessuali secondari più visibili

per essere scelti dalle esigenti platee femminili. La selezione sessuale secondo Darwin è la lotta tra gli individui di un sesso, generalmente quello maschile, per il possesso dell'altro sesso. I maschi combattono tra di loro per potersi accoppiare con le femmine, le quali effettueranno una scelta, selezionandone alcuni rispetto ad altri. Ciò conduce ad una selezione sessuale che aumenta il successo riproduttivo del maschio che possiede il fenotipo più attraente e quindi vincente. La selezione naturale, invece, influenza la *fitness* cioè i caratteri che promuovono la sopravvivenza e la vitalità della specie.

Secondo Darwin i due processi sono in conflitto tra loro ed, inoltre, alcune strutture destinate ad attrarre le compagne o a competere per esse sono gravate da costi altissimi. Il paradosso della coda del pavone viene così spiegato: i costi dell'estrema appariscenza, vengono bilanciati da un maggior numero d'incontri sessuali (benefici). La bizzarra ipotesi di Darwin che le femmine possedessero quasi un senso "del bello" e, attraverso questo, potessero influenzare l'evoluzione della morfologia e del comportamento maschile è stata verificata in numerose specie di vertebrati e invertebrati e può essere considerata un fatto acquisito se leggano in tal senso i lavori di Julien Huxley.

Dopo Darwin, il concetto di selezione sessuale fu largamente ignorato fino al 1972, quando Robert Trivers riscoprì l'argomento richiamando l'attenzione su uno studio di A.J. Bateman (1948). Quest'ultimo asseriva che la selezione sessuale avrebbe dovuto produrre diversi livelli di variazione nel successo riproduttivo dei maschi e delle femmine. Il successo riproduttivo di sesso femminile è condizionato dalla quantità di risorse riposte nelle uova, mentre quello di un individuo di sesso maschile è legato alla disponibilità delle femmine. Studiando il successo riproduttivo di maschi e femmine di *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830), Bateman notò che a differenza delle femmine, la cui *fitness* non necessariamente aumentava all'aumentare del numero di maschi con cui esse si accoppiavano, i maschi generalmente aumentavano la loro *fitness*

in funzione del numero di femmine che riuscivano a fecondare. Si conclude che la variazione riproduttiva maschile è maggiore di quella femminile.

Alla base di questa osservazione sta l'ipotesi, ormai più volte verificata, che i costi ed i benefici dell'accoppiamento hanno differenti valori energetici per i due sessi (Chapman *et al.*, 2003). Secondo Dawkins (1989) l'origine del conflitto sessuale è da ricercare nell'anisogamia, uova grandi *vs* spermatozoi piccoli, e nel costo energetico della produzione dei gameti maschili rispetto a quelli femminili. I maschi producono i gameti con ritmi più veloci delle femmine per produrre le uova (Baker & Parker, 1973) e ciò porterebbe alla possibilità per il maschio di accoppiarsi potenzialmente con il maggior numero possibile di femmine. I maschi sono inoltre portati ad investire, rispetto alle femmine, più parte del loro tempo nella ricerca e nella conquista delle loro partner (Parker, 1978). Siamo di fronte a quello che viene chiamato conflitto sessuale, che si origina per l'appunto dal conflitto di interesse tra maschi e femmine e innesca un processo coevolutivo di tipo antagonistico. Il conflitto sessuale in molte specie continua anche dopo l'accoppiamento attraverso meccanismi che coinvolgono direttamente i gameti maschili (competizione spermatica) o il comportamento post-copula delle femmine (scelta criptica femminile).

Il discorso sulla selezione sessuale di Trivers, continua con la teoria degli investimenti parentali secondo cui quando uno dei due sessi investe considerabilmente più tempo dell'altro nelle cure parentali, gli individui del sesso opposto che competeranno fra di loro per accaparrarsi i riproduttori che investono maggiormente nelle cure parentali. Le femmine generalmente investono più dei maschi nelle cure parentali, questo spiega perché solitamente sono i maschi a competere per le femmine e ad esibire un maggior numero di caratteri riproduttivi secondari.

Le diverse strategie riproduttive adottate dalle specie diventano quindi strumentali ai meccanismi evolutivi. Le pressioni selettive legate alla riproduzione, influenzano direttamente la velocità di evoluzione delle specie e le loro risposte alle pressioni ambientali

Un primo lavoro, di sintesi fra le strategie riproduttive, le teorie genetiche e le conseguenze sul successo riproduttivo, viene pubblicato nel 1930 da Fisher. Secondo l'autore, è importante capire non solo il meccanismo fisiologico che porta alla ripartizione dei nutrienti fra le gonadi e le altre componenti somatiche degli organismi, ma anche quali sono le condizioni ambientali durante il ciclo vitale, che possono favorire o meno l'accumulo e l'allocazione delle risorse utili alla riproduzione.

Il successo riproduttivo, modellizzato dallo stesso Fisher, viene scomposto e interpretato nelle sue varie parti: la sex ratio, la selezione dei riproduttori al momento dell'accoppiamento, la produzione di prole, lo sviluppo ed infine l'efficienza delle nuove generazioni.

Le varie componenti sono a loro volta messe in relazione alle condizioni ambientali, identificando quelle più sensibili e determinanti per il raggiungimento del successo riproduttivo (Thorson, 1950). Di fatto, la selezione sessuale agisce contemporaneamente sui riproduttori (raggiungimento della sopravvivenza e maturità) e sulle generazioni future (produzione della prole e successo d'insediamento) (Vance, 1973). L'adozione e l'investimento energetico in una determinata strategia riproduttiva avrà quindi ricadute decisive sul successo riproduttivo delle nuove generazioni.

La relazione che intercorre fra l'accumulo energetico e il successo riproduttivo di una specie diventa un altro punto cruciale nello studio delle strategie riproduttive.

L'organismo riproduttore dovrà essere in grado di allocare l'energia necessaria per massimizzare la propria *fitness*, in relazione alle condizioni ambientali, e produrre una

prole altrettanto capace di sopravvivere e utilizzare le risorse a sua disposizione durante tutte le fasi di sviluppo (Pianka, 1976).

La distribuzione e temporale delle risorse trofiche utili al raggiungimento del successo riproduttivo, influenza direttamente la distribuzione stessa delle specie.

A questo punto, lo studio dell'ecologia riproduttiva risulta essenziale per comprendere la distribuzione spaziale e temporale, l'abbondanza e l'adattamento morfologico delle specie (Kojis, 1982; Mori, 1987; Chelappa *et al.*, 2003; Almansa, 2004; Smith *et al.*, 2004; Markow & O'Grady, 2008; Feriche *et al.*, 2008). In sintesi, la riproduzione può essere profondamente influenzata da vari fattori ecologici che vanno dalla distribuzione geografica della specie, presenza delle risorse trofiche, struttura della comunità, etc. Come momento cruciale del ciclo vitale di una specie, la riproduzione rappresenta la base per la comprensione non solo dei meccanismi biologici ma anche ecologici ovvero delle risposte a breve e lungo termine delle specie alle variabili ambientali.

1.2 Strategie riproduttive negli organismi bentonici marini

Le origini della riproduzione risalgono ai primordi della vita: da allora se ne sono evoluti molti tipi (Ghiselin, 1974). La riproduzione asessuale è il processo riproduttivo più semplice ed indubbiamente più primitivo¹: un genitore si scinde, produce gemme o si frammenta per dare origine a due o più parti, ciascuna delle quali può svilupparsi in un nuovo individuo. Poiché il processo comporta solo la moltiplicazione di cellule per mitosi, i discendenti hanno caratteri ereditari identici a quelli del genitore: sono cioè dei cloni (Dorit *et al.*, 1991). La divisione del corpo in due e talvolta più parti uguali, da ciascuna delle quali si genera un individuo è detta scissione. Avviene principalmente negli organismi unicellulari (protozoi, ciliati, cianofite) ma anche in alcuni Metazoi. Le

¹ metodo **primitivo** = il termine in questo caso è da intendere come metodo che si è evoluto per prima e non presuppone alcun rapporto filietico.

spugne, le idre e certi altri Cnidari si riproducono per gemmazione: una piccola parte del corpo del genitore si accresce, si separa da esso, e si differenzia in un nuovo individuo che inizia un'esistenza indipendente; oppure le gemme possono rimanere attaccate al genitore e formare una colonia composta da molti individui.

Il passo successivo è la riproduzione sessuata, in cui si assiste allo scambio di informazioni genetiche tra due individui differenti (maschio e femmina). Essa dà origine a nuove combinazioni genetiche, alcune delle quali possono essere superiori per successo biologico (o *fitness*) alle combinazioni originali.

La sessualità, evolutasi per la prima volta tra i Protisti, non comporta necessariamente la riproduzione. Nel protozoo *Paramecium sp.*, per esempio, i due individui che si uniscono durante la coniugazione si scambiano materiale nucleare ma non si ha nessuna riproduzione (Dorit *et al.*, 1991). Gli individui si possono riprodurre più tardi per scissione.

Nei vegetali marini accanto alla riproduzione sessuale si verifica una riproduzione vegetativa (asessuale) che nelle alghe pluricellulari si manifesta con fasi nucleari diverse, una aploide e una diploide (Cognetti *et al.*, 2002). Questa alternanza di fasi molto comune è detta metagenesi.

I maschi, per definizione, sono quegli individui che producono gli spermatozoi, i gameti (aploidi) più piccoli, portatori dei geni maschili e dell'energia necessaria per condurli fino alla cellula uovo. Le femmine, per definizione, sono quegli individui che producono le uova, gameti generalmente più grandi rispetto di quelli maschili. Un maschio passa molto del suo tempo e, consuma quindi una quantità notevole d'energia, a cercare di fecondare le uova. Solo un piccolo numero di maschi riesce ad accoppiarsi più volte durante la "stagione degli amori" mentre quasi tutte le femmine mature della

popolazione si accoppiano, e investono la maggior parte delle proprie energie nella cura della prole.

Per le femmine sarebbe assai più semplice riprodursi in maniera asessuata secondo partenogenesi. La proporzione di femmine partenogenetiche² in una popolazione inizialmente gonocorica³, dovrebbe quindi rapidamente aumentare. In molte specie i maschi offrono cure parentali o benefici alimentari alla propria prole.

In tal caso, quando una femmina accetta lo sperma di un maschio per avere fecondate le proprie uova, si accinge a ricevere da esso qualcosa di più che un semplice pacchetto di geni. Questi benefici aggiuntivi apportati dall'attività maschile possono più che raddoppiare il numero della prole che una femmina riesce ad avere, in modo tale da portare ad una riproduzione più efficace rispetto a una competitorice che si riproduca partenogeneticamente (Alcock, 1992). Se però queste stesse cure maschili venissero dedicate ad una femmina partenogenetica, essa trarrebbe ancora più vantaggio rispetto alla "femmina gonocorica", a questo punto la partenogenesi diverrebbe nuovamente la strategia riproduttiva più vantaggiosa (Alcock, 1992). In realtà la riproduzione sessuale tramite fecondazione porta alla continua formazione di nuovi genotipi grazie al *crossing-over*⁴ meiotico e alle mutazioni. Il fatto che, in una specie a riproduzione sessuale, ogni individuo possieda differenti combinazioni di geni, le assicura una notevole dose di variabilità genetica (eterozigotità). Quindi la riproduzione sessuale produce degli individui che possono adattarsi meglio (sopravvivono e si riproducono) ad un ambiente mutabile nello spazio e nel tempo (Alcock, 1992).

² **Partenogenetico** = organismo dioico nel quale si realizza il processo di divisione e sviluppo di uova non fecondate.

³ **Gonocorica** = popolazione, con specie a sessi tipicamente separati, nella quale la fecondazione avviene grazie alla fusione dei gameti maschili in quelli femminili.

⁴ **Crossing-over** = processo di ricombinazione in cui l'informazione genetica contenuta nella cellula riproduttiva originale viene completamente rimaneggiata.

Esistono numerose ipotesi che spiegano perché gli individui possano trarre dei benefici dalla riproduzione sessuale. Ad esempio, la teoria della selezione di gruppo (Williams, 1966) sostiene che gli individui forniscono un certo numero di prole diversificata, unicamente con lo scopo di formare una banca di geni, che, a lungo andare, possa essere utile alla popolazione.

L'ipotesi, ad essa antitetica, è quella della co-evoluzione (Alcock, 1992): la riproduzione sessuata è favorita dall'interazione evolutiva tra una specie e le altre, dove ognuna di esse fa del suo meglio per sfruttare le altre specie. L'ambiente biotico, inteso come insieme di relazioni (competizione, mutualismo, predazione, parassitismo, ecc.) che una specie può instaurare con altre che vivono nel medesimo biotopo⁵, può co-evolvere assieme ad una specie "A" mentre i cambiamenti di quest'ultima portano a conseguenze selettive su una specie "B". Generalmente quest'ultima ipotesi appare più convincente (Alcock, 1992).

1.3 Il successo riproduttivo negli organismi bentonici marini

Una specie alloca gran parte delle risorse a sua disposizione nella riproduzione (*sforzo riproduttivo*) nell'intento di migliorare la propria *fitness* (successo biologico) (Ficher, 1930; Thompson, 1982). Durante il ciclo vitale di una specie, è possibile valutarne lo *sforzo riproduttivo* dato dalla somma della riproduzione in atto e dal valore riproduttivo residuo. Questo inevitabilmente varia con l'età dell'individuo (Ficher, 1930; Williams, 1966; Charnov, 2005): generalmente, lo sforzo riproduttivo risulta basso negli individui giovani, con scarsa possibilità di sopravvivenza e maturità sessuale; così come risulterà basso in individui adulti poiché la fecondità o la sopravvivenza declinano nel tempo

⁵ **Biotopo** = area, con determinate condizioni ambientali, in cui vive una comunità.

(Begon, 1985). In linea generale, si può affermare che il potere riproduttivo di un individuo è inversamente proporzionale alla durata della sua vita (Charnov, 2005).

In questo contesto, un ruolo fondamentale lo giocano le risorse trofiche disponibili. Queste diventano spesso *fattore limitante* per la specie, procurando un *costo di riproduzione* che si ripercuote nella riduzione del valore riproduttivo residuo, mediato da una riduzione nelle *dimensioni* dell'individuo in relazione al suo habitat (Begon, 1989). Le *dimensioni* dell'individuo, in una visione generalizzata della biologia di popolazione, determinano il *successo riproduttivo*: ad una taglia maggiore corrisponde un miglior *successo riproduttivo* migliore (Williams, 1975) ovvero la massimizzazione della *fitness*. Stimare la fecondità di una specie basandosi esclusivamente sulla relazione taglia e numero di gameti emessi sarebbe un errore (Paine, 1969); infatti, questa relazione potrebbe anche essere il risultato di una variazione nel *reclutamento* e nella capacità di *sopravvivenza* della prole prodotta.

In una popolazione, il successo riproduttivo è, spesso, *densità dipendente*. Questo comporta a sostenere che, ad alte densità piccoli individui possano avere una produzione gametica simile a quella riscontrata in grandi individui a basse densità (Levitan, 1989, 1991). E' stato anche riscontrato che spesso un individuo di grossa taglia, isolato nella popolazione, avrà tendenzialmente un potere riproduttivo assai ridotto (Levitan, 1992).

L'adozione di una determinata strategia riproduttiva per una specie dipende anche dalle variazioni dei fattori ambientali, abiotici e biotici, che possono influenzare direttamente o indirettamente le fasi principali della riproduzione.

Gran parte degli organismi marini sono sensibilmente influenzati dall'ambiente e dalle sue variabili; il mezzo acquoso complica ulteriormente l'analisi di un ciclo biologico di una specie. Se poi, la specie presenta una *fecondazione esterna* e cicli vitali bi- o tri-fasici, durante i quali la prole deve fare fronte a continui cambiamenti ambientali (Olive,

1995), lo studio del successo riproduttivo di una specie diventa ancora più difficile da analizzare. La comprensione del successo riproduttivo contempla, quindi, l'analisi dei meccanismi riproduttivi legati ai riproduttori e necessariamente il successo della prole prodotta (Ficher, 1930; Olive, 1995). Non basta avere una popolazione di riproduttori efficienti, ma è necessario che questi siano in grado di produrre una prole sia quantitativamente che qualitativamente efficiente per ottenere un buon successo riproduttivo.

1.4 Lo sviluppo embrionale e larvale negli organismi bentonici marini

Lo sviluppo embrionale e larvale in generale è un processo multifasico, che procede secondo differenti tappe.

In funzione della strategia riproduttiva e modalità di fecondazione adottate dalla specie, lo sviluppo embrionale del nuovo individuo procede in modi differenti, in generale potrà essere diretto o indiretto. Inoltre, le varie fasi di sviluppo sono naturalmente soggette ad una serie di pressioni esercitate dall'ambiente nel quale questo avviene (all'interno del corpo del genitore o nell'ambiente esterno).

La maggior parte degli invertebrati marini presenta uno sviluppo indiretto, con stadi larvali planctonici il cui successo dipende dalla riserva energetica contenuta nelle uova, o dalla capacità di acquisire l'energia dall'ambiente. Sulla base delle modalità di nutrizione si possono distinguere due tipi di larve: larve *lecitotrofiche* e larve *planctotrofiche*. Le prime sfruttano le risorse embrionali nutrendosi del vitello contenuto nelle uova. Questa strategia non permette una vita planctonica lunga e la dispersione delle larve risulta limitata. Le larve planctotrofiche, invece, presentano un apparato boccale ed un sistema digerente che permettono loro di alimentarsi in maniera autonoma. Di conseguenza queste hanno una maggiore autonomia nella colonna

d'acqua. Larve di questo tipo hanno capacità di dispersione notevolmente maggiore e la loro sopravvivenza sarà determinata dall'adeguata presenza nell'ambiente di disponibilità trofica (Thorson, 1950; Vance, 1973). La maggior permanenza nella colonna d'acqua fa sì che le larve planctotrofiche siano in balia di fattori biotici e abiotici che ne influenzano la sopravvivenza e la successiva metamorfosi (Vance, 1973). I due modelli di sviluppo larvale differiscono anche da un punto di vista energetico e di costo di produzione parentale, in particolare per la madre. Lo sviluppo lecitotrofico implica un dispendio energetico elevato per ciascun gamete prodotto a discapito della quantità di prole, rcontrariamente allo sviluppo planctotrofico dove la madre investe la maggior parte dell'energia nella quantità di prole (Thorson, 1950; Vance, 1973; Marshall & Kenough, 2008; Marshall *et al.*, 2009).

La quantità di energia che un organismo riceve dalla propria madre, può avere numerose conseguenze sulla sua sopravvivenza e *performance* di vita (Bertram & Strathmann, 1998). Negli invertebrati marini si registra una marcata variabilità nell'efficienza di produzione zigotica, non solo a livello interspecifico ma anche intraspecifico, portando a drastiche variazioni nelle dinamiche di popolazione.

Secondo Marshall & Keough (2008), la quantità e qualità di prole prodotta, influenza il ciclo vitale degli invertebrati marini, dal momento della produzione dei gameti alla tipologia di sviluppo adottata, nonché al momento dell'insediamento e successo dei nuovi individui.

Per un organismo con un ciclo vitale complesso, l'incremento della qualità della prole potrebbe aumentare la sua performance in una determinata fase di sviluppo ma al contempo diminuirla in fasi successive (Marshall *et al.*, 2003), influenzando la *fitness* della prole prodotta e quindi il successo riproduttivo.

La fase successiva a quella larvale è quella dell'insediamento che comprende la scelta del substrato e la metamorfosi delle larve. Per quanto riguarda le specie bentoniche, è molto importante mantenere distinti i concetti di insediamento e di reclutamento. Con il termine “*settlers*” vengono indicati gli individui appena insediati, mentre con il termine “*recruits*” quelli sopravvissuti fino ad una certa taglia o età (Connel, 1985; Jenckins *et al.*, 2009).

La dimensione e l'esistenza a lungo termine di una popolazione di invertebrati marini saranno fortemente dipendenti sia da fattori endogeni (tipologia di fecondazione, caratteristiche materne, *quantità e qualità* delle larve e tipologia di sviluppo), sia da fattori esogeni (Vance, 1973; Bertam & Strathmann, 1998; Emlet, 2003; Marshall & Keough, 2008).

La strategia riproduttiva e il successo riproduttivo risultano essere determinanti nel successo biologico di una specie regolandone direttamente e indirettamente, a vari livelli, le dimensioni della popolazione esistente e delle successive generazioni.

1.5 Relazioni fra variabili ambientali e successo riproduttivo negli organismi bentonici marini.

Durante il suo ciclo vitale, una specie è influenzata da una serie di fattori biotici e abiotici ambientali che ne riescono a regolare i comportamenti e la distribuzione. Tra questi la temperatura, fotoperiodo, idrodinamismo, disponibilità delle risorse trofiche, presenza di sostanze tossiche sono tra le più note variabili ambientali in grado di influenzare le specie marine (Thorson, 1950; Vance, 1973; Olive, 1995). Molte di queste variabili ambientali riescono ad influenzare direttamente alcune fasi fondamentali della riproduzione (Grange, 2005; Emlet, 2003; Lamare *et al.*, 2002; Kelly, 2001; Levitan, 1991; Byrne, 1990).

I cicli di marea legati alle fasi lunari scandiscono le fasi di *spawning* sia in invertebrati (Fox, 1924; Iliffe&Pearse, 1982; Richmond&Hunter, 1990) che vertebrati marini (Bentley *et al.*, 2001).

L'idrodinamismo modula il tasso di fecondazione influenzando direttamente la capacità di dispersione dei gameti (Denny & Shibata, 1989; Pennington, 1985).

La presenza di sostanze tossiche nell'ambiente, come metalli pesanti, influenza negativamente la cinetica di fertilizzazione e l'efficienza di sopravvivenza della prole (Quiniou, 1999).

Il fotoperiodo giocherebbe un ruolo fondamentale nell'orologio biologico di molte specie di invertebrati e vertebrati marini agendo sia sul tempo che sulla concentrazione dei gameti emessi (Kelly, 2001; Sphigel *et al.*, 2004), ruolo che gli stessi autori attribuiscono alla temperatura. Proprio la temperatura risulta essere, per la maggior parte degli organismi marini, un fattore determinante, e spesso limitante, nella gran parte dei meccanismi biologici e comportamentali. L'aumento della temperatura è per molte specie marine, non soltanto il segnale di innesco del periodo riproduttivo e del suo termine (Lozano *et al.* 1995; Byrne, 1990), ma è considerato il principale fattore in grado di influenzare i tassi di sviluppo embrionale e larvale (Francour, 1994; Müller, 1776; Emlet, 2003). In generale un'innalzamento della temperatura causa un rapido sviluppo e aumenta le possibilità di reclutamento ed espansione delle popolazioni (Byrne, 2009). Di contro, improvvisi e forti aumenti della temperatura sono in grado di causare una mortalità massiva in comunità bentoniche e cambiamenti nei pattern di distribuzione delle specie (Orton, 1920; Bhaud *et al.*, 1985; Olive, 1995). Infine la temperatura è in grado di variare la solubilità di alcuni componenti chimici presenti nell'acqua, come ad esempio l'acido carbonico portando così ad una diminuzione del pH

e aumentando la possibilità di uno stato di ipossia dell'ambiente (Clark *et al.*, 2009; Fabry, 2008; Kurihara, 2008; Pörtner, 2008; Wood, 2008).

Quest'ultimo aspetto, oggi, porta inevitabilmente ad includere nello studio e analisi del successo riproduttivo di una specie la possibile influenza, negativa o positiva, degli scenari proposti dai modelli sui cambiamenti climatici (*"Intergovernmental Panel on Climate Change"*, 2007). Gli scenari proposti nella relazione della IPCC si basano principalmente sulle variazioni legate all'aumento della temperatura media degli oceani e all'acidificazione progressiva degli oceani nei prossimi 100 anni. In particolare, l'acidificazione degli oceani viene imputata all'elevato apporto nell'ambiente di CO₂ di natura antropica. Essendo temperatura e pH due fattori fondamentali nella regolazione dei meccanismi fisiologici e biologici degli organismi, ci si pone il problema di quali possano essere le risposte delle specie alle future variazioni climatiche e alle possibili ripercussioni a livello ecosistemico.

Uno degli approcci più utilizzati per comprendere la risposta delle specie ai cambiamenti climatici, rimane lo studio della biologia riproduttiva. Secondo Grange (2005) è il *successo riproduttivo* di una specie a rappresentare una delle chiavi di lettura per l'identificazione della sua vulnerabilità a possibili cambiamenti climatici. Tuttavia, il successo riproduttivo nell'ambiente marino, coinvolge specie che mostrano storie vitali bifasiche, con stadi bentonici e planctonici che differiscono nella loro sensibilità alle perturbazioni ambientali (Kurihara, 2008). Questo complica ulteriormente l'interpretazione delle risposte, quindi la possibilità di avere una previsione a lungo termine della possibile evoluzione, di adattamento delle singole specie (Dupont & Thorndyke, 2009; Fabry, 2008).

1.6 Obiettivi della tesi

Il successo riproduttivo di una specie è una caratteristica che indica la capacità di sopravvivenza ai cambiamenti ambientali.

Alla luce di queste considerazioni l'approfondimento della biologia riproduttiva, attraverso lo studio della strategia riproduttiva, modalità di fecondazione, dello sviluppo embrionale e larvale e della capacità di adattamento di una specie ai possibili cambiamenti ambientali, è la chiave per poter comprendere al meglio la dinamica e il ruolo ecologico della specie stessa.

Gli organismi bentonici marini presentano spesso un ciclo vitale molto complesso, influenzato fortemente da fattori esogeni di varia natura. Queste caratteristiche li mettono al centro della maggior parte degli studi ecologici e biologici volti a descrivere e comprendere le dinamiche delle singole popolazioni ed ecosistemiche.

Gli echinodermi sono fra gli organismi bentonici marini più studiati poiché, oltre a presentare una struttura estremamente semplice da un punto di vista morfo-strutturale, sono da sempre un modello di studio per la ricerca embriologica e genomica in quanto occupano una posizione filogenetica non molto lontana da quella dei cordati, essendo, come questi, deuterostomi.

La facile reperibilità degli esemplari per gli esperimenti in laboratorio unita alla semplicità con la quale può essere seguito sia lo sviluppo embrionale che larvale nei primi stadi, ha fatto sì che questi organismi diventassero il modello biologico finalizzato a studi embriologici, molecolari, fisiologici e di evoluzione più utilizzato. Nell'ultimo decennio un progetto internazionale ha portato avanti il sequenziamento dell'intero DNA della specie *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson, 1857) per utilizzarlo come parametro di confronto con il sequenziamento di altri organismi tra i quali l'uomo (Sodergren *et al.*, 2006).

Anche da un punto di vista ecologico, gli echinodermi sono diventati un interessante oggetto di studio poiché si sono rivelati, soprattutto i ricci e le stelle di mare, capaci di alterare la struttura dell'ambiente e /o di una comunità attraverso i propri comportamenti. Presentano una notevole plasticità fenotipica che gli permette di occupare ed adattarsi a differenti tipi di habitat (Paine, 1969). È stato ampiamente dimostrato che la maggior parte delle specie esibiscono una plasticità molto elevata dettata dai diversi fattori ambientali quali: temperatura, idrodinamismo, disponibilità di cibo e predazione, fattori che condizionano fortemente il ciclo vitale anche di altri organismi (Ebert, 1968; Fenaux, 1968; Gonor, 1973; Regis, 1979; Himmelman, 1986; Kenner&Lares, 1991; Levitan, 1991; Lozano *et al.*, 1995).

Ad esempio, in alcuni studi condotti su specie differenti di ricci di mare, sono risultati evidenti gli effetti dati dalla scarsa disponibilità di cibo che si manifestano in modo evidente nel soma di questi organismi come la variazione di taglia in condizioni ambientali differenti (Ebert, 1996; Levitan, 1989; Walker, 1981).

Le possibili relazioni fra il ciclo riproduttivo e questi fattori invece sono stati ad oggi poco indagati (Regis, 1979; Levitan, 1991; Byrne, 1990; Lamare *et al.*, 2002, Tomas *et al.*, 2005, Kenner & Lares, 1992).

Lungo le coste del Mediterraneo gli echinidi regolari, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) e *Arbacia lixula* (Linneo, 1758), hanno assunto un importante ruolo negli studi ecologici degli habitat costieri, (Guidetti *et al.* 2004; Gianguzza *et al.* 2006; Privitera *et al.* 2005, 2008; Sala *et al.*, 1994, 1998).

Nonostante già Kempf (1962) indicava *A. lixula* come specie in forte espansione lungo le coste del Mediterraneo, solo negli ultimi anni ne è stato messo in evidenza il suo possibile coinvolgimento nel mantenimento del *barren habitat*. Secondo alcuni studi condotti in aree marine protette, l'aumento del pascolo di *P. lividus* e *A. lixula*

determinerebbe, nelle comunità algali rocciose mediterranee, il passaggio da sistemi altamente complessi e ricchi di biodiversità come quelli delle macroalghe erette a sistemi semplificati e a bassa biodiversità, dominati da alghe coralline incrostanti e ricci denominati “*sea urchin barrens*”.

Inoltre l’abbondanza di *A. lixula*, sembrerebbe essere positivamente correlata all’estensione del *barren*.

Ad oggi però, i dati biologici su *A. lixula* sono veramente scarsi e dilatati nel tempo (Lo Bianco, 1909; Lillie, 1915; George *et al.*, 1990). Infine recentemente la specie è stata indicata come una specie fortemente termofila in grado di espandere il suo areale di distribuzione molto velocemente (Francour *et al.*, 1994; Sala *et al.*, 1998; Gianguzza *et al.*, 2011).

Le poche caratteristiche, biologiche ed ecologiche, messe in luce da questi studi non permettono ancora di comprendere l’ecologia e il comportamento di questa specie.

In questo contesto, risulta estremamente importante studiare la biologia riproduttiva di *A. lixula*, una specie *habitat determiner*, il cui pascolo sembra avere un forte impatto sulla comunità algale dell’infralitorale roccioso mediterraneo.

Risulta quindi necessario approfondire quei meccanismi biologici che regolano la dinamica di popolazione, come la biologia riproduttiva, senza tralasciare l’aspetto ecologico di tali meccanismi.

Obiettivo principale della tesi è stato quello di analizzare e interpretare la biologia ed ecologia riproduttiva di *A. lixula*, al fine di dare una visione più chiara di quello che è il ruolo ecologico di una specie che negli ultimi decenni va aumentando lungo le coste del Mediterraneo (Kempf, 1962; Francour *et al.* 1994).

La biologia riproduttiva è in grado di dare gli spunti necessari per la comprensione della dinamica di una popolazione: qualsiasi organismo spende infatti la maggior parte

delle sue energie nella riproduzione quindi nella produzione gametica, nel successo di fecondazione e nel successo riproduttivo per il raggiungimento della massima *fitness*.

L'ecologia riproduttiva, ovvero lo studio delle relazioni che intercorrono fra meccanismi biologici e fattori esogeni (temperatura, fotoperiodo, pH, disponibilità trofica, idrodinamismo etc.), permette di comprendere il successo di una specie in determinate condizioni fisico-chimiche ambientali.

Lo studio affronterà tre aspetti fondamentali della riproduzione di *A. lixula*:

- 1) La descrizione del ciclo riproduttivo di *A. lixula* (cap. 4), attraverso il quale verranno identificati i momenti principali di *spawning* (emissione dei gameti) e i momenti di accumulo delle energie necessarie alla riproduzione;
- 2) Il successo riproduttivo, analizzato attraverso il successo di fecondazione (cap. 5) e il successo larvale (cap. 6) (modalità di fecondazione, di sviluppo embrionale e larvale nel tempo);
- 3) L'analisi dei possibili effetti di variabili ambientali sul successo riproduttivo di *A. lixula* (fecondazione e sviluppo) (cap. 7), quali l'aumento della temperatura e l'acidificazione dell'ambiente.

2. Note sulla specie

***Arbacia lixula* (Linneo, 1758).**

Il genere *Arbacia* (Gray, 1835) fa parte della Classe *Echinoidea*, Famiglia *Arbaciidea* costituita da sei specie (Tab.1), termofile. Questo è l'unico fra i generi degli echinidi regolari dell'infralitorale a comprendere specie distribuite sia ad alte sia a basse latitudini. Questo, conferisce al genere, nella sua totalità, un carattere altamente termotollerante (Lessios *et al.*, 2011).

Si tratta di specie di scarso interesse commerciale e per tale ragione, i pochi studi, tra l'altro datati e distanziati nel tempo, poco informano riguardo la loro biologia, ecologia e dinamica di popolazione (Uthicke *et al.*, 2009).

Le uniche notizie sulla biologia riproduttiva del genere, si hanno per *Arbacia punctulata* (Lamarck, 1816), specie studiata lungo le coste del Nord America (Harvey, 1956).

La stagione riproduttiva si concentra tra luglio ed agosto, anche se è stato osservato come in realtà, annualmente sia estremamente variabile in funzione della temperatura. Lo sviluppo embrionale di questa specie sembra essere più rapido rispetto ad altre specie di echinidi regolari, ma anche questa caratteristica varia in funzione della stagione riproduttiva e della località di provenienza (Harvey, 1956).

Arbacia lixula (Linneo, 1758) presenta un'elevata plasticità fenotipica che le permette di occupare differenti tipologie di habitat (Gianguzza *et al.*, 2006; Privitera *et al.*, 2005; Pinnegar *et al.*, 2000; Paine & Vadas, 1969; Harrold & Reed, 1985) e sopravvivere a differenti condizioni di temperatura, disponibilità trofica, idrodinamismo e predazione (Uthicke *et al.*, 2009; Bonaviri *et al.*, 2005; Privitera *et al.*, 2005; Ebert,

1996; Lozano *et al.*, 1995; Francour *et al.*, 1994; Strathmann *et al.*, 1992; Levitan, 1991; Gonor, 1973).



Figura 2.1 Iconografia di *A. lixula*.



Figura 2.2 Distribuzione di *A. lixula*.

Da un punto di vista ecologico tutte le specie appartenenti al genere *Arbacia* prediligono ambienti rocciosi (Fig. 2.5) con una copertura algale prevalentemente a corallinacee incrostanti, e non sembrano esibire un comportamento criptico (Bonaviri *et al.*, 2005).

Le possibili relazioni fra il ciclo riproduttivo e i diversi fattori abiotici sono stati poco indagati (Levitan, 1991; Byrne, 1990; Lamare *et al.*, 2002).

Harvey (1956) e George *et al.*, (1990), riportano per *A. lixula*, conosciuta come *A. pustulosa*, solo informazioni riguardo le dimensioni e qualità delle uova che sembrano essere più larghe in diametro e ricche di pigmenti rispetto ad *A. punctulata*.

Dal 1960 ad oggi, si è assistito lungo le coste occidentali del Mediterraneo ad un aumento significativo delle densità di *A. lixula* probabilmente dovuto al progressivo incremento della temperatura superficiale (Kempf, 1962; Francour *et al.* 1994; Sala *et al.* 1998).

La specie presenta alcune caratteristiche morfologiche peculiari, come la teca schiacciata (Fig. 2.4) e i pedicelli ambulacrali presenti esclusivamente attorno alla porzione boccale (Fig. 2.3) a differenza della specie co-occurrent *P. lividus* che presenta una teca tondeggiante con pedicelli e pedicellarie distribuiti sulla quasi totalità del corpo.

Poco si conosce sulla riproduzione di *A. lixula*, questa presenta un ciclo complesso e sia in Mediterraneo che lungo le coste del Brasile si pensa che, sia in grado di riprodursi durante gran parte dell'anno (Lo Bianco, 1909; Tavares *et al.*, 2004) situazione che, viene riportata raramente solo per alcune specie tropicali (Harvey, 1956). Lo Bianco (1909) ipotizza che i vari momenti riproduttivi possano differire nell'efficienza ovvero nella produzione gametica e nell'efficienza dei gameti emessi.

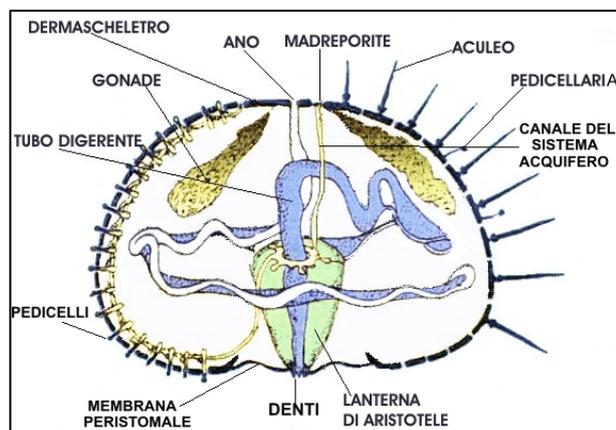


Figura 2.3 Sezione di un riccio di mare



Figura 2.4 Teca di *A. lixula*



Figura 2.5 *A. lixula* su substrato roccioso.

Secondo Olive (1995) la regolarità degli andamenti termici permette agli invertebrati marini di riprodursi con continuità e sincronia. Ad oggi, nessun'altra specie di echinide presente in Mediterraneo mostrerebbe una tale strategia riproduttiva.

Solo negli ultimi anni si è approfondito il ruolo ecologico di questa specie, in una visione di conservazione e tutela dall'ambiente costiero, studiandone la distribuzione e i comportamenti alimentari, attribuendole anche un possibile ruolo chiave nel mantenimento del *barren habitat* (Gianguzza *et al.*, 2006; Bonaviri *et al.*, 2005; Privitera *et al.*, 2005), caratterizzato da un popolamento algale poco diversificato e dominato da

alghe incrostanti (Sala *et al.*, 1998; Boudouresque & Verlaque, 2001; Hereu *et al.*, 2004). Inoltre la specie sembra avere pochi predatori. Sala (1996) ha trovato raramente frammenti di *A. lixula* nei contenuti stomacali di pesci, e dati recenti sull'attività predatoria di un potenziale predatore come la stella marina *Marthasterias glacialis* (Linneo, 1758) ci indicano che non sarebbe essere una preda preferenziale (Di Trapani, PhD Thesis 2011). La particolare distribuzione dei pedicelli, rendono la specie particolarmente adesa al substrato (Gianguzza *et al.*, 2010), la teca robusta e un numero elevato di aculei la renderebbe meno vulnerabile agli attacchi di predatori se paragonati a *P. lividus* (Gianguzza *et al.*, 2011).

Tabella 2.1 Specie appartenenti al genere *Arbacia* e loro distribuzione.

| Specie | Distribuzione |
|--|--|
| <i>Arbacia lixula</i> (Linneo, 1758) | Mediterraneo, Sud-Ovest Spagna e Portogallo, Azzorre, Madeira, Canarie, Nord-Ovest Africa, Marocco, Mauritania, Ovest Sahara, Capo Verde, Brasile, Paraná. |
| <i>Arbacia crassispina</i> (Mortensen, 1910) | Brasile isola di Fernando de Noronha. |
| <i>Arbacia dufresnei</i> (Blainville, 1825) | Argentina, Chile, Terra del Fuoco. |
| <i>Arbacia stellata</i> (Blainville, 1825) | Nord-Ovest America del Nord, California, Messico Pacifico, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panama e Ovest Colombia. |
| <i>Arbacia punctulata</i> (Lamarck, 1816) | Est del Nord America e Caraibi. |
| <i>Arbacia spatuligera</i> (Valenciennes, 1846) | Ecuador, Peru e Chile. |

3. Le aree di studio

3.1 Isola di Ustica

L'isola di Ustica si trova a circa 67 Km a nord-nord-ovest di Palermo (10°43'43" E-38°42'20" N). Occupa una superficie di circa 8.65 Km² con una circonferenza di 12 Km (Fig. 3.1). Posizione privilegiata nel basso Tirreno, lungo il flusso della corrente Atlantica, che le garantisce un apporto costante di plancton, e rappresentando inoltre un punto di attrazione per le popolazioni nectoniche (pesci e cefalopodi) che ne vengono richiamati sia per l'habitat favorevole che per le risorse trofiche (Riggio & Milazzo, 2004).

L'isola è di origine vulcanica, con un substrato molto articolato e complesso, ed in cui si rileva un'elevata eterogeneità (Ruggeri e Buccheri, 1968).

La conformazione della roccia determina la distribuzione delle comunità algali, dal mesolitorale all'infralitorale. Il mesolitorale e l'infralitorale si presentano ricchi di insenature ombrose, grotte, massi franati e strapiombi costituendo, così, il substrato ideale per lo sviluppo di alghe appartenenti ai generi *Rhodophyta* e *Phaeophyta*, associate a componenti di sottostrato ed alghe sciafile; importante, inoltre, è la fascia a *Cystoseira spp.*, che raggiunge i 10-20 m di profondità (Milazzo *et al.*, 2000).

La comunità a *Posidonia oceanica*, pur essendo mediamente strutturata, non è presente in estese formazioni per la limitata estensione dei fondali sabbiosi (Giaccone *et al.*, 1985). Attualmente l'infralitorale è caratterizzato da popolamenti ad alghe fotofile, frammisti a *P. oceanica* e chiazze sporadiche a sabbie fini.

A partire dai due metri fino a circa otto metri di profondità il fondale è caratterizzato dalla presenza del *barren habitat* e da alghe calcaree incrostanti.

3.2 Capo Gallo-Isola delle Femmine

L'Area di Capo Gallo - Isola delle Femmine interessa l'area antistante le falesie del promontorio di Capo Gallo e il tratto di mare che circonda l'isolotto di Isola delle Femmine, ricadendo tra i Comuni di Palermo e Isola delle Femmine ($38^{\circ}11'45''N-013^{\circ}14'58''E$ ed $38^{\circ}12'80''N-013^{\circ}19'80''E$) (Fig. 3.2).

Occupava un' area complessiva di circa 2.173 ettari. I fondali importanti per le caratteristiche morfologiche e geologiche che rendono l'area altamente eterogenea, ospitano una grande varietà di comunità algali, e una ricca fauna ittica.

Da un punto di vista geologico, Monte Gallo è un massiccio montuoso di natura calcareo-dolomitica. Le rocce carbonatiche che lo costituiscono denunciano un ambiente di mare poco profondo, una piattaforma carbonatica. Su queste rocce solubili, l'azione delle acque meteoriche ha determinato la presenza di formazioni carsiche superficiali e profonde. L'azione congiunta del moto ondoso e del carsismo ha modellato le numerose grotte e gli antri che si aprono sulle pareti del rilievo e lungo il litorale.

Lungo la costa, in generale, è possibile identificare una zona di piattaforma esterna, caratterizzata da una morfologia regolare, ed una zona interna più accidentata a causa probabilmente dell'erosione subaerea.

Anche la parte subacquea del litorale, presenta un fondale variamente articolato che va da zone caratterizzate da substrati che degradano dolcemente, a crepe e buche profonde e grotte semisommerse. Spesso il substrato roccioso si presenta frammisto a ciottoli di varie dimensioni, massi e zone sabbiose. Inoltre gran parte del fondale è ricoperto da un sottile strato di sedimento, dovuto probabilmente al forte idrodinamismo, che interessa quest'area, ma anche all'apporto di materiale terrigeno dilavato dalle piogge e dallo stesso moto ondoso.

I primi metri di fondale sono caratterizzati da biocenosi ad alghe fotofile (in gran parte *Cystoseira spp.*) cui seguono ricche facies sciafile di precoralligeno e coralligeno tipico di falesia e piattaforma.

Da una profondità di circa 7m, sono presenti posidonieti non sempre ben sviluppati probabilmente a causa delle attività antropiche. È da sottolineare la presenza lungo la costa di formazioni a “reef” tipiche del Mediterraneo costituite da marciapiedi a vermeti. Questa biocostruzione (*Dendropoma paetreum*) è in grado di modificare completamente il paesaggio e di aumentarne l’eterogeneità spaziale questo porta ad un incremento della diversità sia faunistica sia floristica associata al piano mesolitorale e infralitorale superiore.

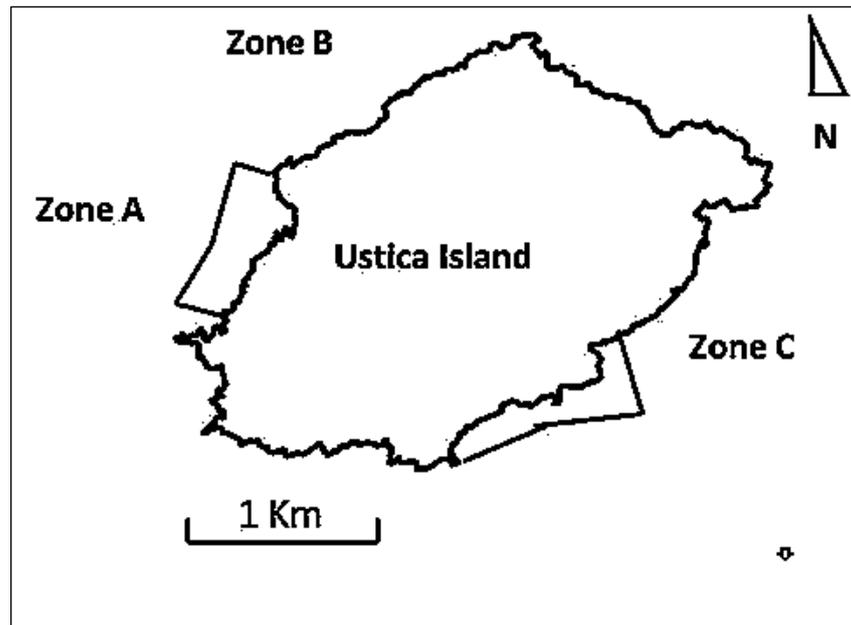


Figura 3.1 Isola di Ustica.

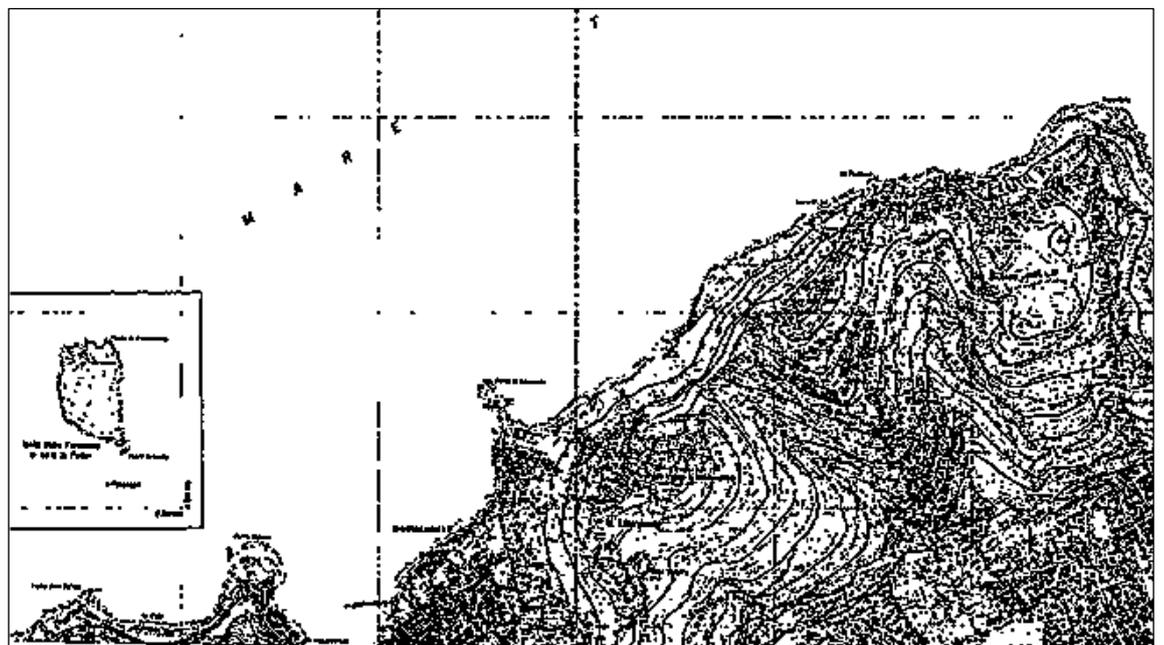


Figura 3.2 Capo Gallo-Isola delle Femmine

4. Il ciclo riproduttivo di *Arbacia lixula*

4.1 Introduzione

Nel ciclo riproduttivo degli echinidi, il processo di gametogenesi e l'accumulo delle sostanze nutritive risultano due processi strettamente legati fra loro.

Nelle gonadi si possono identificare due componenti cellulari, una germinale (gameti) e una somatica costituita in gran parte dai fagociti nutritivi (NP: *nutritive phagocytes*) (Walker, 2005). La crescita delle gonadi dipende, non tanto dall'incremento numerico dei gameti o dall'avanzamento delle fasi gametiche, quanto piuttosto dall'accumulo delle sostanze nutritive da parte dei fagociti nutritivi prima che inizi la gametogenesi. I fagociti nutritivi svolgono funzioni multiple: dall'incubazione delle cellule sessuali immature, al loro nutrimento durante la crescita, ed infine sono in grado di fagocitare le uova residue (mature ma non in grado di essere emesse) riciclandone l'energia per renderla disponibile per la successiva gametogenesi (Walker *et al.*, 1998; 2005; 2007). L'andamento temporale e il cambiamento strutturale delle due popolazioni cellulari presenti nelle gonadi definiscono il ciclo riproduttivo dell'organismo. La maggior parte degli invertebrati marini presenta un ciclo riproduttivo annuale scandito da una fase di maturazione, di accrescimento dei gameti associati a cellule germinali, e da una fase di emissione dei gameti (*spawning*) (Booolootian, 1966).

Il modello di ciclo riproduttivo proposto da Giese & Pearse (1974) per gli organismi a fecondazione esterna, prevede sei fasi principali:

- 1) sviluppo pre-pubescente;
- 2) attivazione delle gonadi e/o proliferazione dei gameti;
- 3) sviluppo dei gametofiti;
- 4) preparazione all'emissione dei gameti (*pre-spawning*);
- 5) emissione dei gameti (*spawning*);
- 6) riposo e/o accumulo di nutrienti ed energia.

In questo modello di ciclo riproduttivo, che presenta generalmente un andamento stagionale, non sono escluse le possibili relazioni con elementi esogeni come temperatura e fotoperiodo che presentano normalmente dei trend annuali (Olive, 1995). A sostegno di questa tesi è stato osservato che in più specie il momento riproduttivo si concentra in genere in alcuni mesi dell'anno durante i quali si registra la fase di *spawning* e contemporaneamente un brusco abbassamento dell'Indice Gonado-Somatico (IGS) (Olive, 1995). In questi casi è stata anche osservata una forte relazione fra la variazione di temperatura e l'innesco delle fasi sia di *pre-spawning* sia di effettivo *spawning* (Thorson, 1950; Byrne 1990; Lozano *et al.*, 1995).

Molte specie, marine e non, sono influenzate dalla variazione della temperatura durante le fasi cruciali della riproduzione. Spesso la temperatura agisce da stimolo di innesco per l'emissione dei gameti e risulta specie-specifica (Orton, 1920). Specie sistematicamente vicine mostrano, in ambienti uguali, periodi riproduttivi differenti correlabili alla variazione della temperatura. Inoltre, se il ciclo riproduttivo dipendesse solo da fattori endogeni, allora questo dovrebbe operare allo stesso modo nel caso in cui gli organismi venissero spostati geograficamente, mentre si assiste ad una marcata variazione della stagione riproduttiva lungo gradienti latitudinali in molte specie marine (Harvey, 1956; Giese, 1959).

L'elevata variabilità negli eventi temporali di *spawning*, e dunque del periodo riproduttivo, all'interno di un taxon è legata alla distribuzione geografica delle specie (Orton, 1920; Thorson, 1950; Harvey, 1956; Giese, 1959).

In alcuni invertebrati marini sono stati osservati più momenti riproduttivi (specie multi-voltine) durante una stagione riproduttiva, che solitamente si protrae per lunghi periodi (es. molluschi, crostacei e cnidari), dando l'impressione di una emissione potenzialmente continua (Giese, 1959; Bauer, 1989; Maxwell *et al.*, 1998; Palacios *et al.*, 1999; Garcia-Lopez *et al.*, 2006; Hellstrom *et al.*, 2010). Più eventi riproduttivi danno vita ad un processo che è stato descritto e denominato da Lumare (1979) "*Reproductive Exhaustion*". L'autore ha osservato

che le femmine del gambero appartenenti al genere *Paeneus* ssp., che attuavano uno *spawning* ripetuto, erano caratterizzate da ovari non molto grandi e con sviluppo non uniforme. Una delle possibili conseguenze di questa strategia riproduttiva è quella che una femmina soggetta a vari e consecutivi eventi di *spawning* non dispone di un tempo sufficiente per accumulare i nutrienti necessari al successivo evento riproduttivo, con possibili ricadute negative sulla produzione di una prole efficiente.

Inoltre, nell'ambito dello studio del ciclo riproduttivo di una specie risulta estremamente importante identificare la taglia (età) alla quale un individuo diventa un riproduttore efficiente ossia stabilire l'evento di prima maturazione nei due sessi. Il raggiungimento della prima maturazione influenza direttamente la dinamica di una popolazione agendo sia sulla capacità riproduttiva annuale che sul tasso di crescita della popolazione stessa (Levitan & Young, 1995; Kenner & Lares, 1991) quindi sul successo riproduttivo dell'intera popolazione.

Infine, in molti invertebrati marini è stata osservata una correlazione negativa fra la densità della popolazione e la capacità riproduttiva. Si è osservato che, in popolazioni ad elevate densità le gonadi risultano essere meno produttive rispetto a quelle a bassa densità (Tomas *et al.*, 2005). Di contro l'efficienza riproduttiva cresce all'aumentare della densità degli individui sessualmente maturi (Levitan, 1991).

Obiettivi principali della prima parte della ricerca sono stati:

- 1- Durante il primo anno di studio, descrivere per la prima volta il ciclo riproduttivo annuale di *A. lixula* su piccola scala spaziale (centinaia di metri, Isola di Ustica);
- 2- durante il secondo anno di ricerca, replicare il suddetto studio su una scala spaziale più ampia (centinaia di km, Isola di Ustica e Capo Gallo).

4.2. Primo anno di studio: descrizione del ciclo riproduttivo di *A. lixula* su piccola scala spaziale

4.2.1 Materiali e metodi

4.2.1.1 Tecniche usate

Al fine di descrivere il ciclo riproduttivo di *A. lixula* sono stati usati: l'Indice Gonadosomatico e l'analisi istologica delle gonadi di entrambi i sessi.

L'indice gonado-somatico (IGS)

L'indice gonado-somatico (IGS) è il rapporto tra il peso delle gonadi ed il peso corporeo di un individuo: quindi un dato oggettivo del suo stato di maturità (Kingsford & Battershill, 2000).

L'IGS può essere calcolato sia usando i pesi umidi che i pesi secchi delle gonadi dell'organismo, ossia:

- WGI (Wet-Gonadic Index)= $\frac{\text{peso umido delle gonadi} \times 100}{\text{peso umido totale dell'organismo}}$ (Sanchez *et al.*, 2000; Byrne, 1990)
- DGI (Dry-Gonadic Idex)= $\frac{\text{peso secco delle gonadi} \times 100}{\text{peso secco totale dell'organismo}}$ (Lozano *et al.*, 1995).

L'indice gonado-somatico può essere anche ottenuto in rapporto al volume dell'organismo.

Dall'IGS è possibile inoltre ricavare il *gamete output*:

- $\frac{\text{Pre-spawning GI} - \text{Post-spawning GI}}{100}$ (Brewin *et al.*, 2000)

L'IGS restituisce in modo veloce e statistico un dato sullo stato riproduttivo di una popolazione e per questo è largamente utilizzato nella descrizione e valutazione del ciclo riproduttivo di una specie.

L'esame istologico delle gonadi

L'esame istologico consiste nell'osservazione al microscopio ottico delle sezioni delle gonadi e fornisce informazioni su: la condizione gameto-genetica, l'indice di maturità, la distribuzione di frequenza del diametro delle uova e lo stato dello stato nutritivo dei singoli individui. La condizione istologica dei gameti è ottenuta attribuendo alle gonadi un numero o una sigla corrispondente ad uno stadio indicativo del livello di maturazione delle stesse.

In particolare per quanto riguarda gli echinodermi è possibile riconoscere, su base descrittiva della morfologia delle strutture gonadiche e dei gameti, 6 fasi fondamentali determinate in base alla morfologia dello stato delle gonadi, dei gameti e dello stato nutritivo (Fuji, 1960; Byrne, 1990; Brewin *et al.*, 2000; Oyarzun *et al.*, 1999):

1. Stadio di recupero
2. Stadio di crescita,
3. Stadio prematuro
4. Stadio maturo
5. Stadio di emissione dei gameti (*Spawning*)
6. Stadio spento.

Sanchez *et al.* (2000) ne individuano invece 4 per le femmine:

H1) spente

H2) fase di maturazione degli oociti

H3) Stadio maturo con uova

H4) fase di ricostituzione delle uova, con massima presenza del tessuto nutritivo

e 2 per i maschi:

M0) senza spermatozoi

M1) con spermatozoi

Dai dati sulla condizione gameto-genetica è possibile ricavare l'indice di maturità:

- n° individui appartenenti alle classi IV e V x 100 / n° totale individui (Oyarzun *et al.*, 1999).

La distribuzione di frequenza è calcolata dall'elaborazione delle misure dei diametri delle uova. Quando le uova non hanno forma ovoidale, il diametro è calcolato mediando le misure dei due assi maggiori (Byrne 1990). Le uova sono scelte in maniera del tutto casuale: Lozano *et al.* (1995) ne misurano 100, Byrne e Brewin *et al.* (1990; 2000) 50 mentre Oyarzun *et al.* (1999) solo 40.

Lo strato nutritivo, costituito dalle cellule somatiche ovvero dai fagociti nutritivi (NP), è determinato dalla misura del suo spessore. Il dato finale è ottenuto dalla media delle misure di 5 diversi acini dello stesso individuo (Lozano *et al.*, 1995).

Alcuni autori affiancano a questi dati anche l'indice di maturità :

- n° individui appartenenti alle classi IV e V x 100 / n° totale individui (Oyarzun *et al.*, 1996).

Colorazioni istologiche

Per mettere in evidenza al meglio le componenti strutturali delle gonadi, maschili e femminili, è stata utilizzata la tecnica di colorazione PAS (*Periodic Acid Schiff*). Questa è in grado di mettere in evidenza i carboidrati presenti nei tessuti colorandoli di un rosso-magenta. In generale la PAS è in grado di colorare strutture contenenti gruppi aldeidici come glicoproteine e mucopolisaccaridi. È quindi possibile valutare la distribuzione di questi gruppi all'interno della gonade e discriminare tra le strutture che li contengono. Le strutture positive alla PAS, principalmente basofile, risulteranno colorate più o meno di un rosso-magenta intenso, mentre le strutture negative di natura più acidofila si presenteranno colorate in violetto-blu. Nel nostro caso sarà possibile evidenziare la migrazione delle sostanze nutritive principali (per lo più basofile) dai fagociti nutritivi, che accumulano le sostanze prima dell'inizio della

gametogenesi, ai gameti in maturazione, particolarmente evidente nei gameti femminili. In questo modo, durante il ciclo riproduttivo, sarà possibile diversificare le fasi di crescita dei gameti femminili da un punto di vista non solo morfologico ma anche di accumulo energetico: i nuclei degli oociti primari si coloreranno in gialloscuro-grigio, il citoplasma degli oociti primari in viola ancora immaturi e acidofili, l'oocita secondario e l'uovo maturo in magenta ormai completamente carico di sostanze basofile e con nucleo violetto-bianco, infine il citoplasma di altri tipi di cellule, il collagene e il muscolo in varianti di giallo. Per quanto riguarda la spermiogenesi questa sarà caratterizzata da una meno positività alla reazione PAS visto il carattere prettamente acidofilo che assume lo sperma durante la sua maturazione. Osserveremo uno strato nutritivo fortemente positivo alla PAS all'inizio della gametogenesi che scemerà durante la maturazione dello sperma completamente negativo alla PAS e di colore viola-blu intenso che occuperà gran parte degli acini durante tutta la gametogenesi.

Descrizione istologica degli stadi gametici

Gonade femminile

- I. Nella prima fase troveremo oociti primari e oogoni distribuiti lungo le pareti dell'acino, caratterizzati da una colorazione viola scuro. Le gonadi potrebbero contenere anche frammenti di uova mature, lisate dai fagociti, che non sono state emesse.
- II. Nella seconda fase si assiste ad un incremento delle dimensioni degli oociti primari, circondati dai fagociti nutritivi, di colore viola più chiaro. In questa fase possiamo ancora trovare frammenti di uova lisate e oogoni.
- III. Nella terza fase avremo oociti sempre più grandi, che andranno occupando la zona centrale dell'acino, caratterizzati da una colorazione rosea.

- IV. Nella quarta fase avremo uova mature di colore viola pronte allo *spawning*, e uova di minori dimensioni lungo le pareti dell'acino. I fagociti nutritivi sono presenti in ridottissime quantità e possono essere presenti ancora oogoni.
- V. La quinta fase evidenzia uova mature impacchettate nel lume dell'acino. Le uova mature possono essere quindi presenti anche nell'ovidotto. In questa fase i fagociti nutritivi sono pressoché inesistenti.
- VI. In quest'ultima fase, gli acini appaiono vuoti o semivuoti. In alcuni casi sarà possibile notare, lungo le pareti, dei nuovi oogoni.

Lo stato di maturazione degli oociti è evidenziato non solo dalla taglia ma anche dal percorso che questo effettua dalla periferia dell'acino, dove lo ritroviamo associato ai fagociti nutritivi, verso il centro del lume dove questi si “impacchettano” prima dell'emissione nell'ovidotto pronti per la fase di *spawning*.

Gonade maschile

- I. Nella prima fase troveremo spermatoziti primari lungo le pareti dell'acino distribuiti in colonne sparse.
- II. Nella seconda fase le colonne di spermatoziti le ritroviamo più allungate verso il lume dell'acino e saranno presenti numerosi fagociti nutritivi.
- III. Nello stadio prematuro troveremo le colonne di sperma ormai a ridosso del lume e già parte degli spermatozoi distribuiti nel lume. I fagociti nutritivi sono quasi assenti.
- IV. Nel quarto stadio lo sperma occuperà gran parte dell'acino. Pochi fagociti nutritivi occuperanno le pareti.
- V. Fase molto simile alla quarta, se non per il fatto che parte dello sperma sarà stato espulso creando nella zona centrale dell'acino dei vuoti, segno del momento di *spawning*.

VI. La sesta fase, o fase “*spenta*”, evidenzia una sottile parete dell’acino con una scarsa presenza di fagociti nutritivi lungo la periferia e la completa assenza di sperma.

4.2.1.2 Raccolta dei dati

Durante il primo anno di studio, per verificare la stagionalità ed identificare i periodi principali di *spawning* e accumulo di sostanze nutritive, di *A. lixula*, lungo la costa dell’Isola di Ustica, sono state scelte due aree random (A e C), distanti tra loro centinaia di metri. Da ciascuna area (Fig.2.6) mensilmente sono stati prelevati 20 individui (40-50 mm, aculei esclusi) ad una profondità di 3-5 m.



Figura 4.1 Isola di Ustica, aree di campionamento.

Di ciascun individuo prelevato è stato determinato il sesso e calcolato l’indice gonadosomatico (IGS), come peso umido delle gonadi in relazione al peso totale dell’individuo. Su 10 esemplari femmina per area sono state effettuate le analisi istologiche (Byrne, 1990) tenendo conto anche dello strato nutritivo (NP) (Walker *et al.*, 2005). Su i restanti esemplari maschi le analisi istologiche hanno tenuto conto del solo NP. I campioni di gonade prelevati da ciascun individuo sono stati conservati in fissativo Bouin, successivamente inclusi in paraffina, sezionati (7 μ m) e trattati con la tecnica PAS. Scelta una sezione in maniera random

per ciascun individuo è stata effettuata una foto al microscopio e sono state effettuate delle misurazioni sia sui gameti sia sulle strutture delle gonadi per attribuire la fase gametica.

Il campo da fotografare è stato scelto casualmente e fotografato con un ingrandimento 10x, con l'ausilio di una macchina fotografica digitale (CAMEDIA C30330 Zoom, 3,3 megapixel) collegata al microscopio (Olympus BX50). Le immagini ottenute sono state successivamente acquisite sul computer (CAMEDIA MASTER 2.0) per poi essere analizzate tramite il software *Image J* un software di elaborazione digitale delle immagini, in dotazione gratuita sul sito <http://rsbweb.nih.gov/ij/> . Questo consente la visualizzazione e la modifica di immagini digitali, offrendo la possibilità di calcolare valori di diversa natura (perimetro, area, diametro etc.).

Per le femmine è stato misurato il diametro di 50 oociti, per immagine, e lo spessore dello strato nutritivo (10 repliche per immagine).

Per quanto riguarda i maschi è stato misurato solo lo strato nutritivo (10 repliche per immagine).

4.2.2 Risultati primo anno di studio: il ciclo riproduttivo di *A. lixula* su piccola scala spaziale

Analisi dell'IGS.

Nelle due aree di studio, A e C, l'IGS mostra un *trend* simile con picchi registrati nei mesi di Giugno 2007, Gennaio e Luglio 2008. A questi picchi segue sempre un brusco decremento dell'IGS, attribuibile probabilmente a momenti di *spawning*. Dal grafico è deducibile un pattern stagionale che si ripete nei due anni campionati, anche se i picchi mostrano valori leggermente differenti (Fig. 4.2). Si registra, ad ogni modo, un valore di IGS maggiore nell'area C rispetto alla A nei mesi di Aprile e Maggio e di Luglio e Agosto: mesi identificabili come quelli di *spawning*.

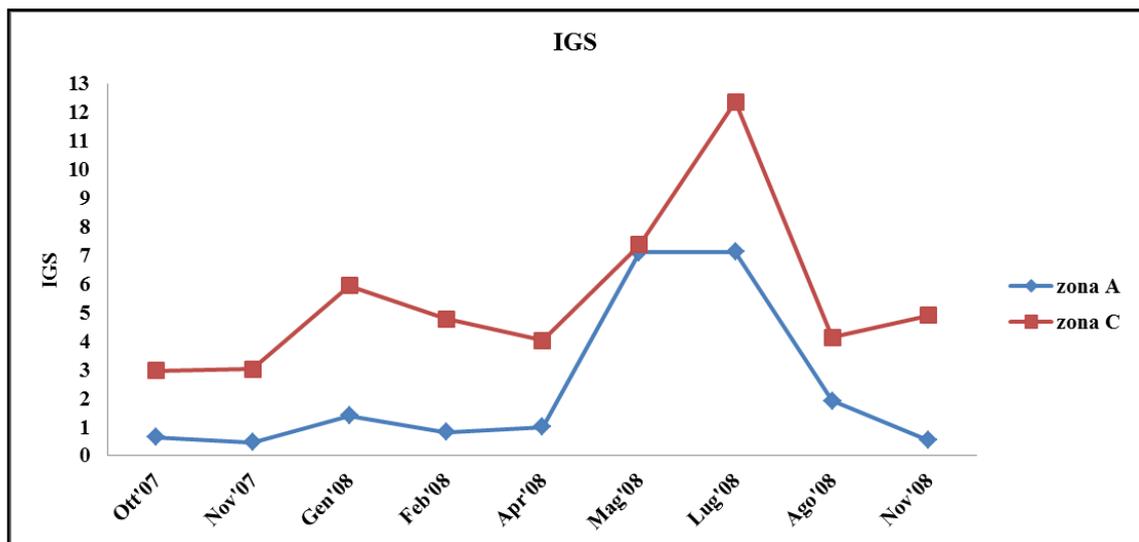


Figura 4.2 Andamento dell' IGS in *A. lixula* nelle due aree di campionamento ad Ustica.

Analisi istologiche

Identificazione delle fasi gametiche

L'andamento delle fasi gametiche, in entrambe le aree, evidenzia un *pattern* stagionale, con le fasi di riposo e ricostituzione gonadica tra il mese di Agosto e di Novembre, e le fasi di maturazione e *spawning* tra Gennaio e Luglio.

Dalle analisi si delinea un ciclo riproduttivo complesso, le cui fasi gametiche risultano spesso sovrapposte e di difficile interpretazione.

Nonostante ciò, sono state determinate le fasi di principale interesse (Fig. 4.3 e 4.4), che mettono in luce l'andamento stagionale del ciclo e soprattutto i momenti principali di *spawning* della popolazione.

Rispetto alle sei fasi descritte per altri echinidi (Byrne,1990; Lozano *et al.*1995; Walker *et al.* 2005), sia per i maschi che per le femmine di *A. lixula*, sono state identificate cinque fasi. Questo è dovuto al fatto che, spesso, è risultato difficile assegnare a ciascun individuo una sola fase, poiché la struttura gonadica presentava una stessa percentuale di oociti primari e secondari, o addirittura uno strato nutritivo abbastanza alto e contemporaneamente una elevata presenza di uova mature.

Sono state così definite e descritte le fasi: ricostruzione, crescita, maturità, emissione dei gameti e post-emissione, seguendo le descrizioni morfologico descrittive del modello proposto da Byrne (1990).

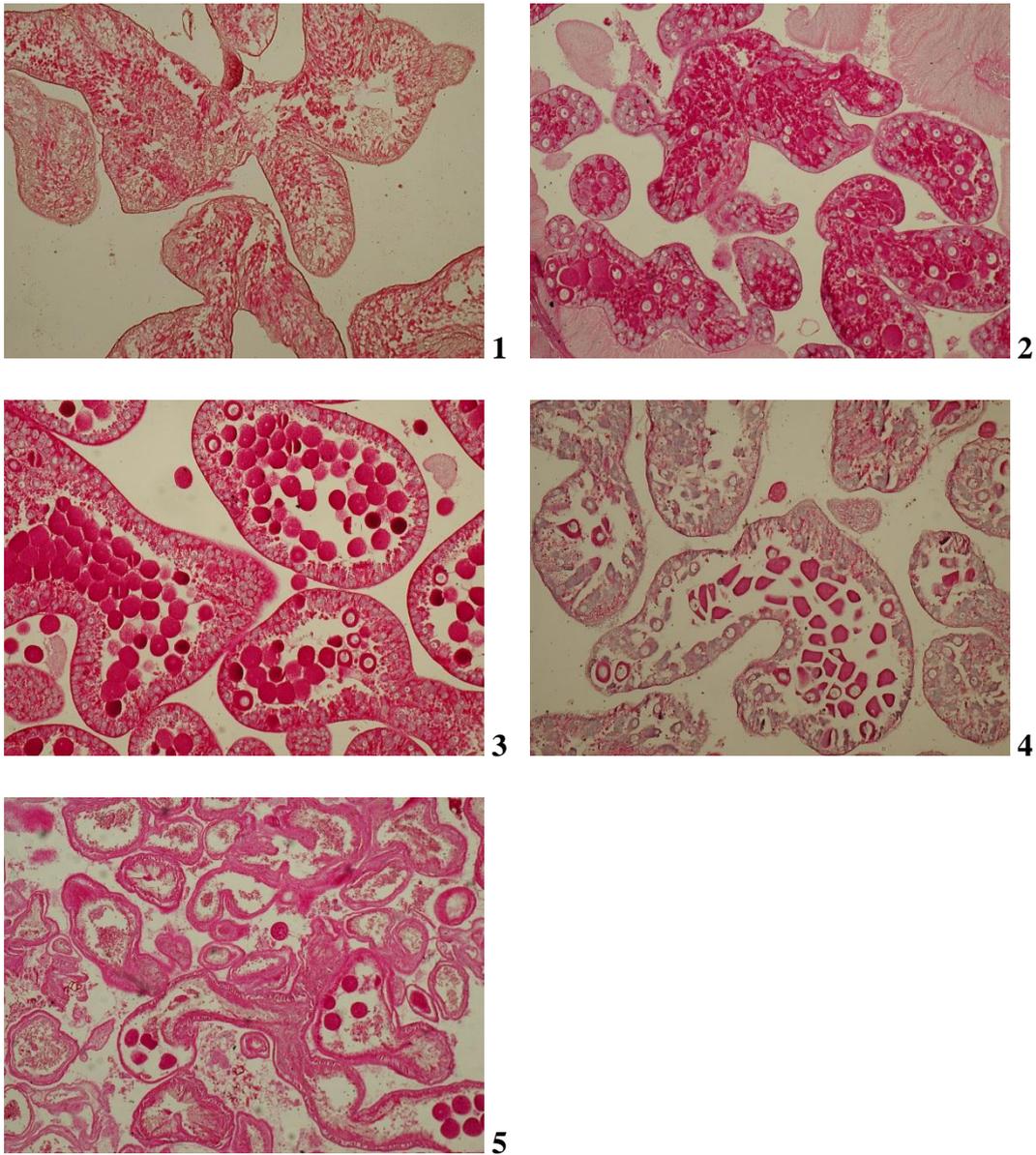


Figura 4.3 Fasi gametiche delle femmine di *A. lixula*: 1) ricostruzione (recovery), 2) crescita (growing), 3) maturazione (maturity), 4) emissione dei gameti (spawning), 5) post-emissione (post-spawning).

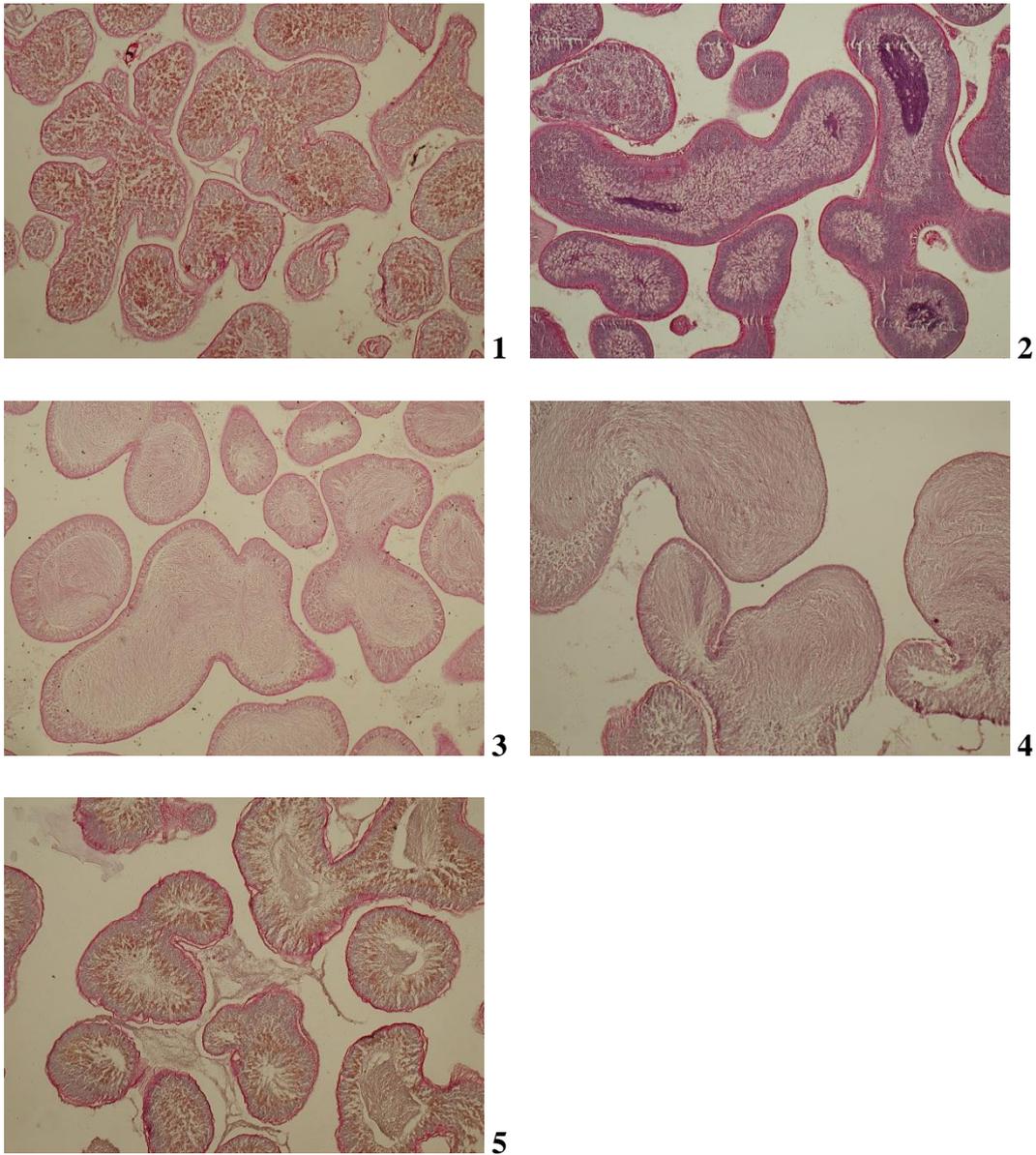


Figura 4.4 Fasi gametiche dei maschi di *A. lixula*: 1) ricostruzione (recovery), 2) crescita (growing), 3) maturazione (maturity), 4) emissione dei gameti (spawning), 5) post-emissione (post-spawning).

Dalle immagini delle gonadi, sia femminili che maschili, si può notare come il tipo di colorazione scelta (metodo PAS), metta anche in luce la dinamica della trasformazione delle strutture e delle componenti presenti nelle stesse. In uno stadio di riposo (*recovery*) o spento (*post-spawning*) la gonade si presenta per lo più colorata in rosa tenue, ad indicare la quasi totale assenza di sostanze basiche o acide, di solito associabili alla presenza di sostanze nutritive o gameti. Mentre nelle fasi di maturazione dei gameti, quindi dalla fase di crescita (*growing*) a quella di emissione (*spawning*), le gonadi sono fortemente colorate in magenta o blu ad indicare la presenza di un'elevata percentuale di gameti maturi, rispettivamente uova e sperma.

Distribuzione delle frequenze di classi di taglia degli ovociti.

L'analisi della distribuzione delle classi di taglia degli ovociti ha messo in evidenza, in entrambe le aree, un andamento di tipo stagionale. In base alle fasi gametiche identificate, sono state definite le classi di taglia da prendere in considerazione nell'attribuzione di oociti primari e uova mature.

In tutto sono state identificate quattro classi: da 1 a 10 μm , da 11 a 30 μm , da 31 a 40 μm e oltre i 41 μm . Le prime due classi comprendono gli oociti in stadio primario e in stadio di accrescimento, mentre le ultime due comprendono uova mature e uova in fase di emissione.

Dai grafici sulla frequenza di distribuzione delle classi di taglia degli oociti, nella zona A e C (Fig. 4.5 e 4.6), gli oociti maturi (31-40 μm e >41 μm) mostrano picchi più alti nei mesi fra Gennaio e Maggio, quindi tra l'inverno e la primavera. Di contro, gli oociti immaturi (0-10 μm e 11-30 μm) si concentrano in autunno e inverno, tranne nella zona A dove si registra un ulteriore picco in Agosto. Si nota inoltre, in entrambe le aree tra Aprile e Luglio, un'elevata frequenza della classe di taglia 11-30 μm (30-40%).

E' comunque interessante notare come, tutte e quattro le classi di oociti, siano rappresentate in tutte le date di campionamento, sia gli oociti maturi sia quelli immaturi. Questo ultimo dato, ci

indica come la popolazione sia potenzialmente capace di produrre uova mature durante gran parte dell'anno. Infine, il test di Kolmogorov-Smirnov eseguito sugli oociti maturi delle due aree (Tab. 4.1), non mostra, tranne in Aprile e Maggio, una differenza significativa nella distribuzione di frequenza degli oociti ($p < 0,001$).

È stato quindi possibile delineare un andamento dell'ovogenesi generale (Fig. 4.7) che vede gli stadi di maturazione e *spawning* (IV e V) concentrati nei mesi compresi tra Gennaio ed Agosto, e quelli di accrescimento degli ovociti (da I a III) tra Novembre e Febbraio.

Tabella 4.1 K-S test: Zona A vs Zona C.

| A vs C | <i>p</i> |
|---------------|-----------------|
| Ott'07 | 0,01 |
| Nov'07 | <i>n.s.</i> |
| Gen'08 | 0,001 |
| Feb'08 | 0,05 |
| Apr'08 | <i>n.s.</i> |
| Mag'08 | <i>n.s.</i> |
| Lug'08 | 0,05 |
| Ago'08 | 0,001 |
| Nov'08 | 0,01 |

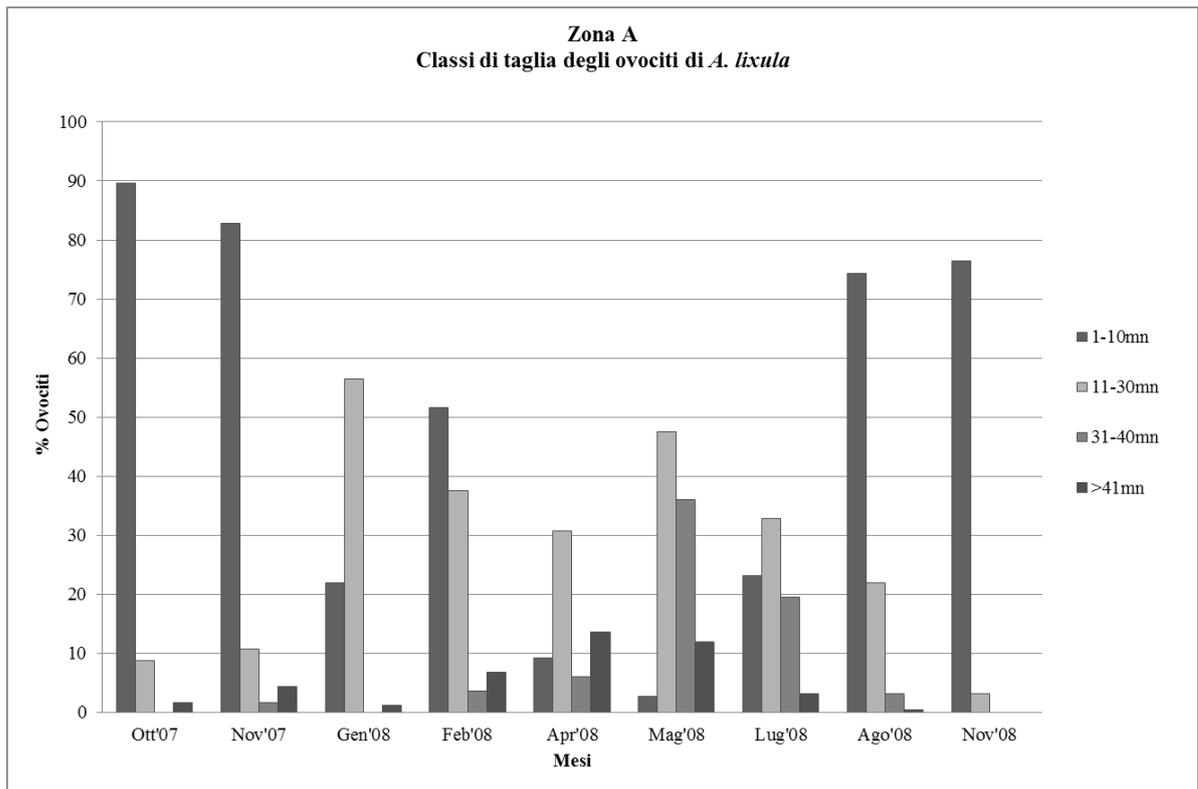


Figura 4.5 Frequenza delle classi di taglia degli ovociti ($n= 250$) di *A. lixula*, nella zona A da Ottobre 2007 a Novembre 2008.

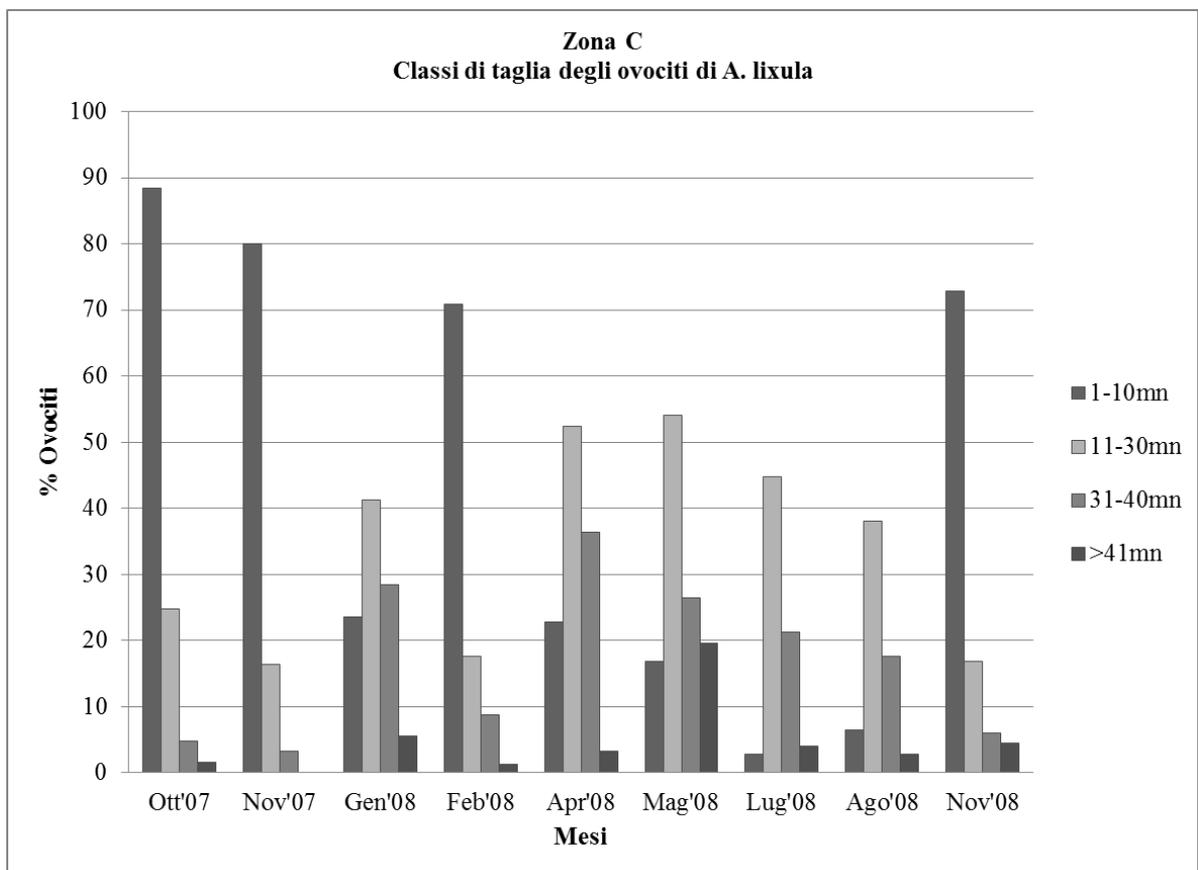


Figura 4.6 Frequenza delle classi di taglia degli ovociti ($n= 250$) di *A. lixula*, nella zona C da Ottobre 2007 a Novembre 2008.

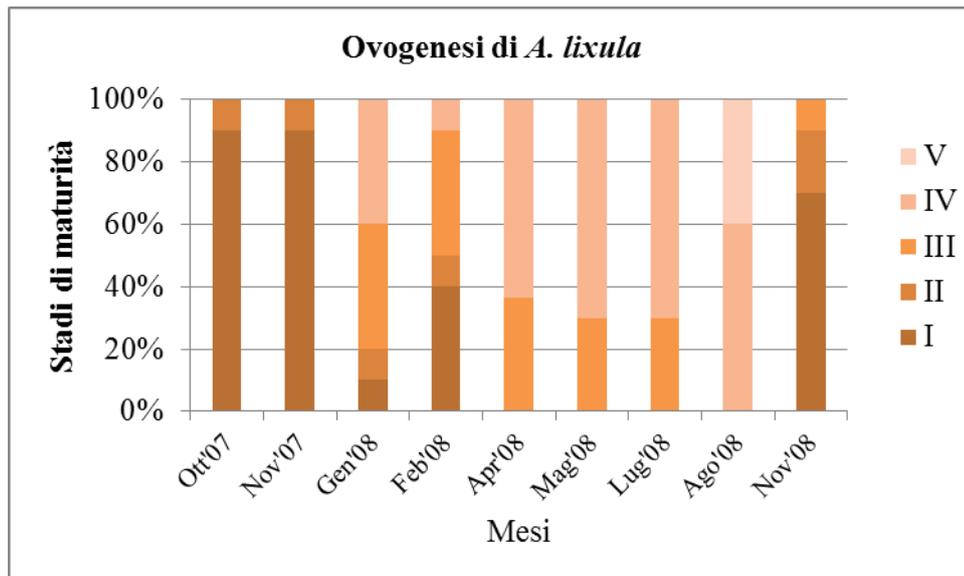


Figura 4.7 Ovogenesi della popolazione di *A. lixula* ($n=10$) ad Ustica: ricostruzione (I), crescita (II), maturazione (III), emissione (IV) e post-emissione (V).

Analisi dello strato nutritivo

Anche per quanto riguarda l'andamento dello strato nutritivo (NP), sia per le femmine sia per i maschi, si osserva un pattern prettamente stagionale (Fig. 4.8 e 4.9).

I picchi si registrano tra Ottobre e Gennaio, ovvero in corrispondenza delle fasi di riposo e ricostruzione del tessuto gonadico, quindi di accumulo energetico. Si assiste, invece, alla sua diminuzione tra Aprile e Agosto, durante le fasi finali della gametogenesi e di completa maturazione dei gameti che ormai occupano gran parte della struttura gonadica.

Infine, grazie al tipo di colorazione istologica adottata, è stato anche possibile osservare come sia differente l'accumulo e la distribuzione di sostanze nutritive fra i due sessi durante la gametogenesi.

Per le femmine si osserva uno strato nutritivo altamente compatto e intensamente basico che va creare, nelle prime fasi della gametogenesi, delle vere e proprie camere nutritive di sostegno agli oociti (Walker *et al.*, 2005). Finita la fase di emissione, lo strato nutritivo,

formato per lo più da fagociti nutritivi, rimane in una certa quantità e si possono già osservare i primi oociti pronti per la successiva gametogenesi.

Di contro nei maschi si osserva una colorazione più violetta, ovvero acida, ed uno strato nutritivo più lasso che lascia più spazio alla formazione delle colonne spermatiche e successivamente allo sperma.

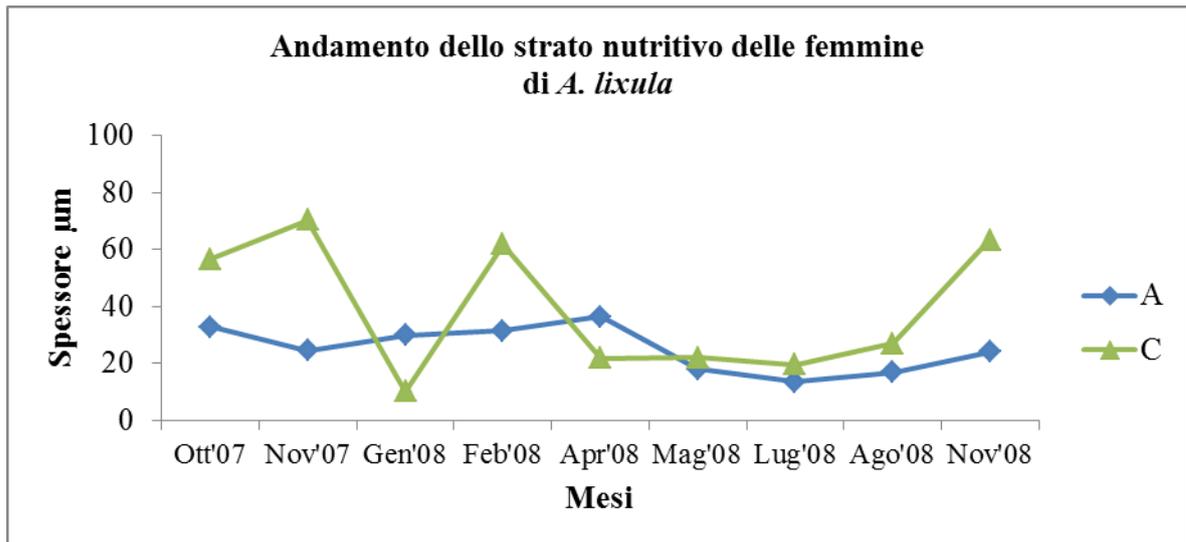


Figura 4.8 Andamento dello strato nutritivo (NP) ($n=10$) nelle femmine di *A. lixula* da Ottobre 2007 a Novembre 2008 nelle due zone A e C.

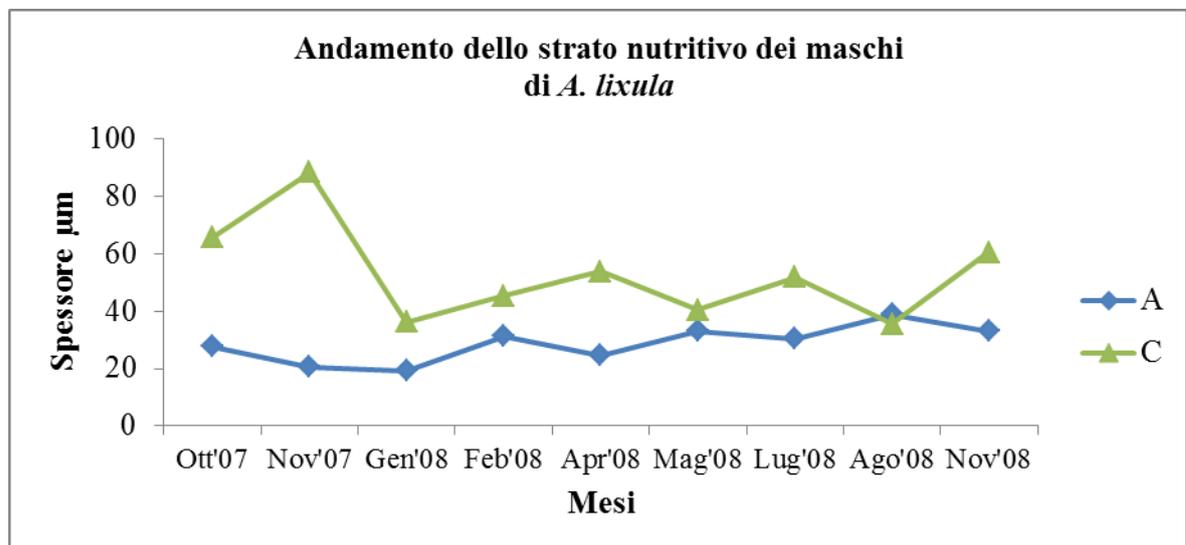


Figura 4.9 Andamento dello strato nutritivo (NP) ($n=10$) nei maschi di *A. lixula* da Ottobre 2007 a Novembre 2008 nelle due zone A e C.

4.3 Secondo anno di studio: osservazioni sul ciclo riproduttivo di *A. lixula* condotte su scala spaziale ampia

4.3.1 Materiali e metodi

4.3.1.1 Raccolta dei dati

Una volta stabilite le fasi principali del ciclo riproduttivo di *A. lixula* e il pattern stagionale delle fasi gametiche, per verificare se l'IGS e la gametogenesi potessero essere generalizzate, sono state scelte due popolazioni, soggette alle stesse condizioni ambientali, su una scala spaziale più ampia, centinaia di Km, Isola di Ustica e Capo Gallo (Fig. 4.10).

Queste sono state scelte poiché presentavano delle caratteristiche simili, quali:

- I) Densità della specie conosciute e paragonabili;
- II) Omogeneità del ricoprimento dei substrati;
- III) Orientamento e flusso delle correnti (WNW).

Mensilmente da ciascuna area sono stati prelevati 10 individui (40-50 mm, aculei esclusi) ad una profondità compresa fra 3 e 5 metri. Su ciascun individuo sono state effettuate le analisi sull'IGS e istologiche (paragrafo 4.2.2).

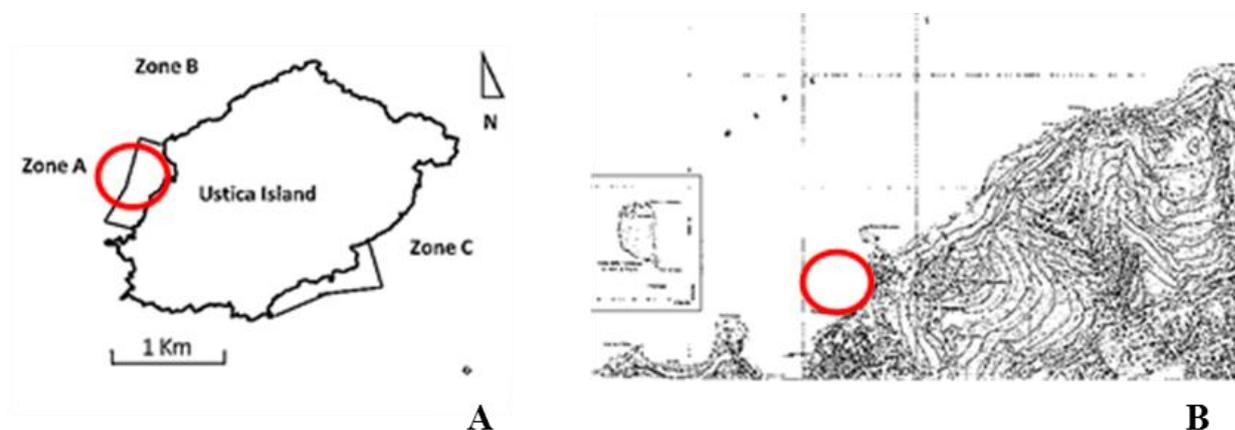


Figura 4.10 Aree di studio: Ustica (A) e Capo Gallo (B) in ciascuna è segnalato con un cerchio l'area di campionamento.

4.3.1.2 Disegno sperimentale

Il ciclo riproduttivo di *A. lixula* analizzato su piccola scala spaziale è caratterizzato da una stagione riproduttiva molto lunga e da più momenti di accumulo dei nutrienti durante l'arco di un anno.

È stato dunque ipotizzato che il ciclo riproduttivo di *A. lixula* varia ad una scala spaziale più ampia (centinaia di km).

L'analisi della varianza, ANOVA, sull'indice gonado-somatico è stata valutata attraverso due fattori: l'Area (fattore random) con due livelli (Ustica e Capo Gallo) e il Tempo (fattore random) con sette livelli (mese). Il C-test di Cochran è stato utilizzato per verificare l'omogeneità della varianza. Le analisi statistiche sono state eseguite con il software GMAV 5.0 (Università di Sidney).

4.3.2 Risultati del secondo anno di studio: il ciclo riproduttivo di *A. lixula* su scala spaziale ampia

Analisi dell'IGS.

Le due aree hanno mostrato un andamento dell'IGS simile. In generale, nelle due aree l'IGS si è mantenuto elevato da Maggio a Settembre 2010 e da Marzo a Luglio 2011, periodi corrispondenti alla stagione riproduttiva. Di contro, i valori più bassi si sono registrati nei mesi di Settembre e Novembre 2010, mesi indicati nella prima parte dello studio come mesi di *recovery* (Fig. 4.11).

Dall'osservazione dell'andamento dell'IGS si nota comunque che, durante i mesi riproduttivi principali (Marzo, Maggio, Giugno e Luglio) l'area di Capo Gallo risulta avere un IGS maggiore rispetto a quello registrato ad Ustica.

L'ANOVA (Area random e Mese random) ha messo in evidenza una differenza significativa per l'interazione AreaxMese ($p < 0,001$) a favore, in entrambe le aree, per i mesi principali di *spawning* (Marzo, Maggio, Giugno e Luglio) (Tab. 4.2).

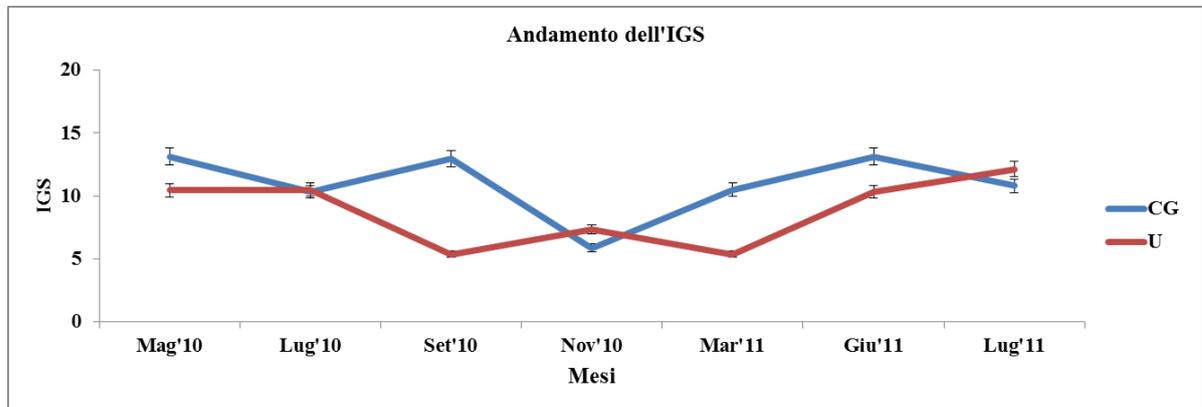


Figura 4.11 IGS: andamento nelle due aree di studio, Capo Gallo (CG) ed Ustica (U).

Tabella 4.2 ANOVA sull'IGS

| Source | DF | MS | F | P |
|-----------|-----|--------|-------|--------------|
| Area (Ar) | 1 | 262,86 | 1,38 | 0,2847 |
| Mese (Me) | 6 | 158,63 | 0,83 | 0,5852 |
| ArxMe | 6 | 190,56 | 10,96 | 0,001 |
| RES | 266 | 17,38 | | |
| TOT | 279 | | | |

Cochran's test = 0,1527 (Not Significant)

Analisi istologiche

Nelle due aree è stato riscontrato un *trend* gametogenetico simile. Le fasi di recupero sono state registrate tra Settembre e Novembre e quelle di maturazione e *spawning* tra Maggio e Settembre, 2010 e 2011. È stato messo in evidenza un pattern stagionale per entrambi i sessi con gli stadi riproduttivi concentrati nei mesi tra Marzo e Settembre, mentre, quelli di accumulo dei nutrienti e inspessimento dello strato nutritivo nei mesi tra Settembre e Novembre.

Distribuzione delle frequenze di classi di taglia degli ovociti.

Per quanto riguarda la distribuzione delle frequenze di taglia degli ovociti, le due aree hanno mostrato un *trend* assolutamente simile. Dalla distribuzione delle quattro classi di taglia di ovociti nel tempo, si può osservare come in entrambe le aree gli ovociti maturi ed in fase di emissione sono presenti da Marzo a Settembre (20-80%). Di contro, gli ovociti primari e in crescita si concentrano tra Settembre e Novembre (10-70%), per essere presenti in notevole quantità nei restanti mesi dell'anno (Fig. 4.12).

Analisi dello strato nutritivo

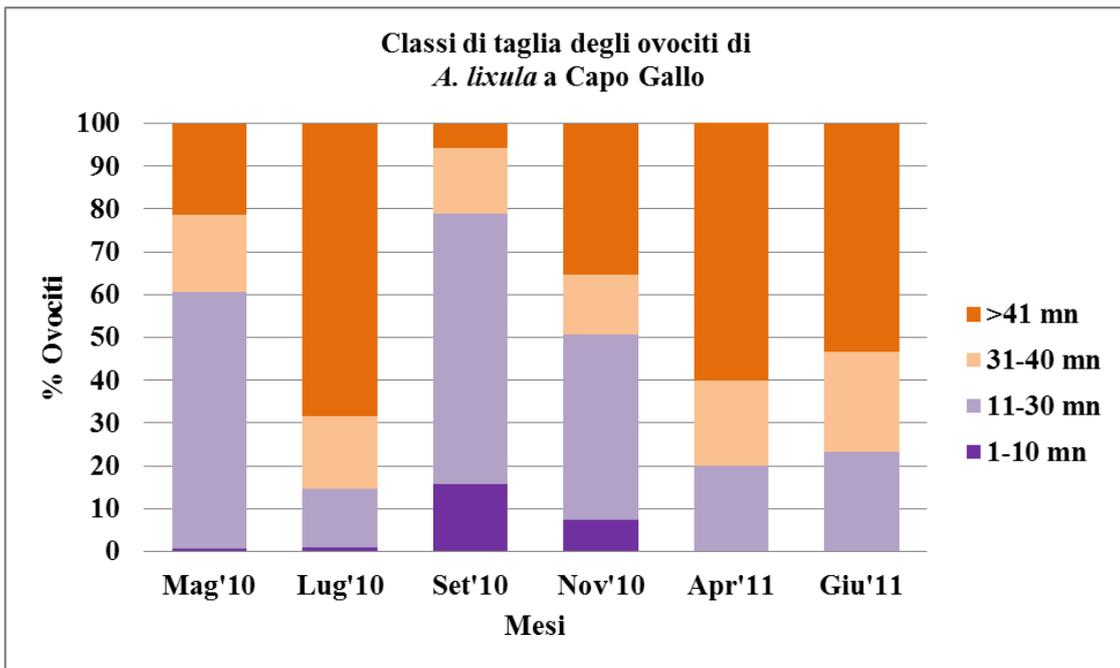
Le due aree presentano anche nel caso dello strato nutritivo un *trend* simile (Fig. 4.13). È possibile riconoscere due fasi principali: una d'incremento dello spessore fra Settembre e Marzo, una di decremento fra Marzo e Luglio.

Nelle femmine di *A. lixula*, l'andamento dello strato nutritivo si mostra nel complesso abbastanza lineare. Si registra un forte decremento dello strato nutritivo tra Luglio e Novembre 2010, mentre a Maggio 2010 e uno a Marzo 2011 si registrano due picchi uno. Si nota comunque che, lo strato nutritivo delle femmine campionate ad Ustica risulta essere per

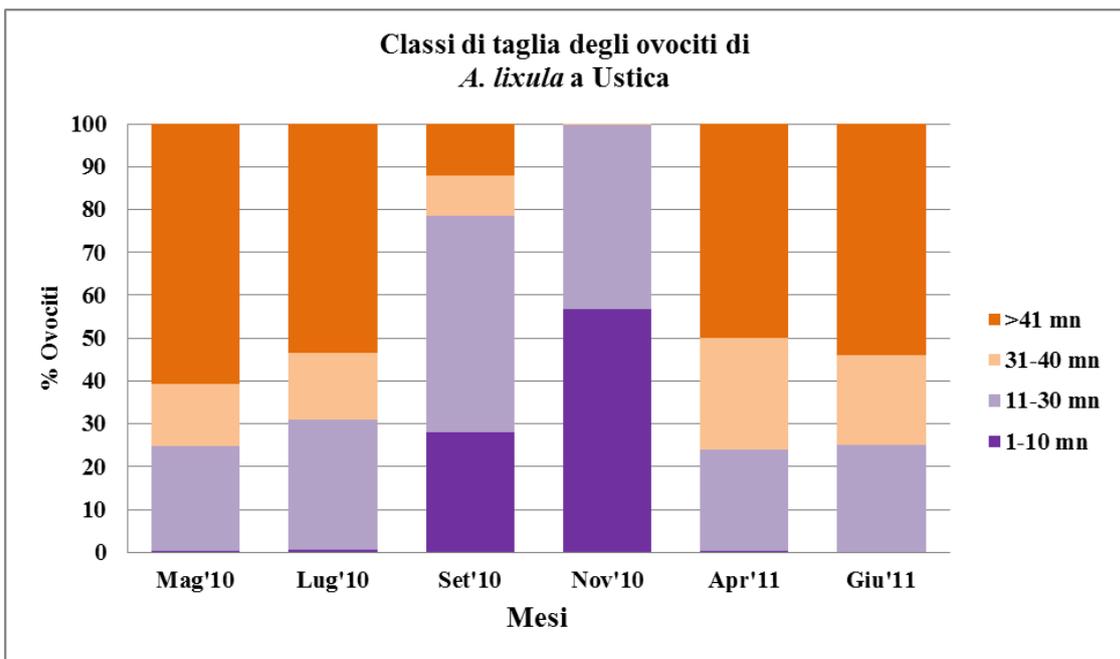
la maggior parte dei mesi più basso rispetto a quello riscontrato a Capo Gallo, in particolare nel mese di Maggio 2010.

Nei maschi si registrano due picchi di decremento dello strato nutritivo nei mesi di Settembre 2010 e Marzo 2011, mentre sono due i picchi massimi registrati uno a Luglio 2010 e uno a Novembre 2010.

In generale, il decremento dello strato nutritivo corrisponde nell'analisi istologica alle fasi di completa maturazione e *spawning*, mentre i periodi di incremento corrispondono al periodo di *post-spawning* e *recovery* quindi accumulo delle sostanze nutritive.



A



B

Figura 4.12 Frequenza delle classi di taglia degli ovociti di *A. lixula* a: Capo Gallo (A) ed Ustica (B)

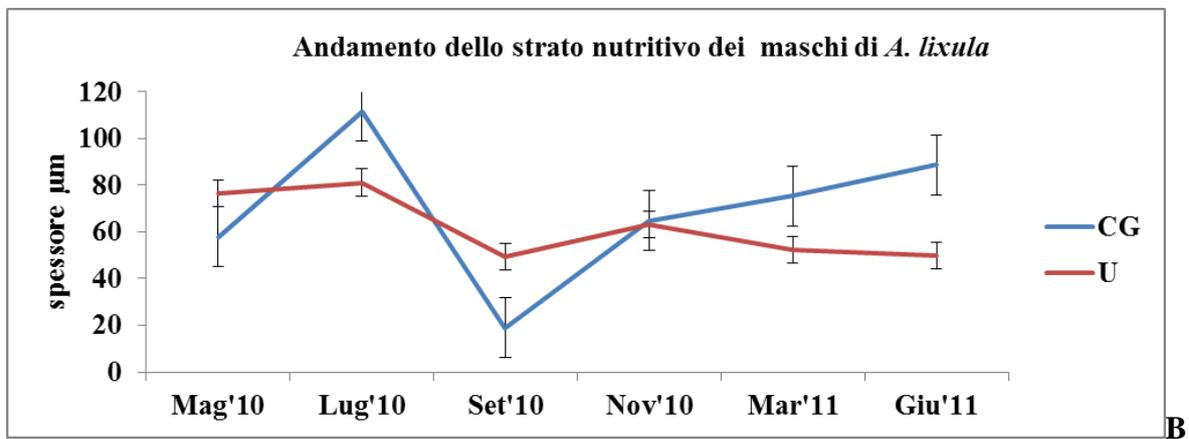
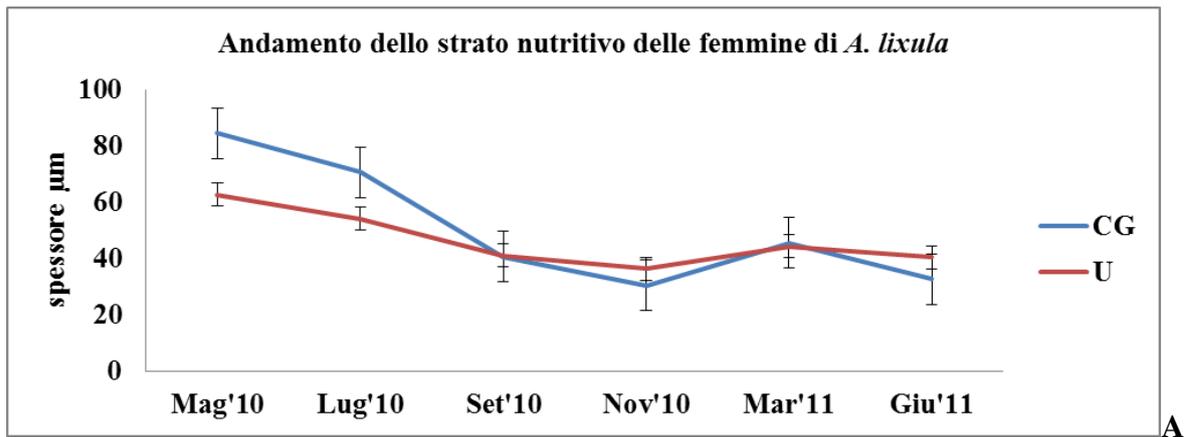


Figura 4.13 Andamento dello strato nutritivo ($n=10$) di *A. lixula* nelle due aree Capo Gallo (CG) ed Ustica (U) nei due sessi: femmine (A) e maschi (B).

4.4 Discussione

L'analisi istologica delle gonadi di *A. lixula*, ha permesso di descrivere e valutare con estrema accuratezza il ciclo riproduttivo e le fasi di *spawning* della specie.

Nonostante le difficoltà riscontrate nell'identificazione di ciascuna fase gametica, dovuta alla frequente sovrapposizione di queste, è stato possibile sia attraverso l'analisi dello stadio di maturità dei gameti che all'andamento dello strato nutritivo, identificare nel tempo le fasi principali di *spawning* e di accumulo delle sostanze nutritive.

In generale la stagione riproduttiva, ovvero quella in cui si assiste all'emissione dei gameti, abbraccia un *range* di temperature medie superficiali ampio (dai 14°C ai 26-27°C). Di contro, il periodo di riposo, ovvero fine emissione, e accrescimento dello strato nutritivo si concentra fra Settembre e Gennaio, anche se spesso è stata riscontrata la presenza, nelle gonadi di entrambi i sessi, di gameti maturi e in grado di essere emessi. Inoltre è stata riscontrata una variabilità temporale nel periodo di accumulo di sostanze nutritive a livello dei due sessi. Nel corso della stagione estiva, durante la quale le femmine non sembrano accumulare nuove sostanze nutritive, i maschi presentano uno dei picchi principali di inspessimento dello strato nutritivo.

Dall'analisi del ciclo riproduttivo di *A. lixula* si evince che questa specie, rispetto alle specie affini delle quali conosciamo il ciclo riproduttivo e la stagione riproduttiva (Guillou & Lumingas, 1998), è in grado di riprodursi più volte l'anno. La maggior parte degli echinidi regolari pan-tropicali presenta un ciclo riproduttivo scandito da una fase riproduttiva limitata nel tempo e una lunga stagione di accumulo dei nutrienti a discapito della produzione gametica. Solitamente, come ben documentato per *P. lividus*, i ricci presentano un unico picco riproduttivo durante l'anno. Solo in alcuni studi è stato messo in evidenza un secondo picco di maturità, ma molto meno importante e distanziato nel tempo rispetto al primo (Byrne, 1990; Lozano *et al.*, 1995).

Nel caso di *A. lixula*, al contrario, le gonadi presentano una produzione gametica quasi continua che tende a protrarsi per tutto l'anno, con gameti maturi presenti durante tutte le stagioni. La strategia riproduttiva di *A. lixula* si discosta molto da quella adottata dalle specie affini presenti in Mediterraneo, ma anche, come riportato da Tavares *et al.* (PhD Thesis, 2004) da quella adottata da echinidi prettamente tropicali come *Echinometra lucunter* (Linneo, 1758). La possibilità di riprodursi in modo quasi continuo durante tutto l'anno, come avviene in specie a strategia "r", potrebbe aumentarne il successo riproduttivo e renderla più "forte" delle specie co-occurring, come *P. lividus* in Mediterraneo. La specie sembra allocare la maggior parte delle energie accumulate nella produzione gametica nell'intento di aumentare il suo potenziale riproduttivo riuscendo a sfruttare tutti momenti idonei alle sue esigenze riproduttive. Questo tipo di strategia negli echinidi regolari è stata riscontrata, ad oggi, solo in alcune specie con una distribuzione latitudinale molto ampia e che sono quindi soggette a condizioni ambientali molto differenti (Tab. 4.3).

Con questo studio, è stato possibile confermare la strategia riproduttiva adottata da *A. lixula* attraverso l'utilizzo di una scala spaziale ampia.

Dall'analisi dell'IGS condotto su due aree di studio, paragonabili a livello di condizioni ambientali, si denota un *trend* paragonabile, con: una stagione di maturazione e *spawning* concentrata nel periodo compreso tra i mesi di Gennaio e Settembre e una stagione di accumulo di nutrienti e *recovery* tra Ottobre e Gennaio.

Ad ogni modo sono state messe in luce alcune differenze qualitative tra le due aree. In particolare, nella distribuzione delle classi di taglia di ovociti maturi e nello spessore dello strato nutritivo.

L'area di Capo Gallo sembra essere favorita qualitativamente rispetto all'area di Ustica. Mentre a Capo Gallo individui maturi, ovvero in grado di emettere gameti maturi, sono stati riscontrati durante tutto l'anno. Di contro, ad Ustica, come già riscontrato nello studio

preliminare, si registra un periodo privo di individui maturi che si concentra puntualmente tra Ottobre e Novembre. Queste differenze potrebbero avere delle conseguenze sulla qualità del successo riproduttivo delle due popolazioni.

Dallo studio sul ciclo riproduttivo di questa specie è stata messa in luce la necessità, nonché l'importanza del dovere analizzare la maturità degli individui contemporaneamente attraverso l'IGS e l'analisi istologica. È risultato evidente che, la sola analisi dell'IGS può, a seconda della scala spaziale e temporale utilizzata nel disegno sperimentale, forviare il risultato se questo non viene accompagnato da un'analisi istologica accurata e puntuale dello stato gametico degli individui. Spesso, infatti, a un elevato valore di IGS può corrispondere uno stadio gametico di immaturità.

Tabella 4.3 Periodi di *spawning* negli echinidi regolari pan-tropicali più studiati.

| Specie | Periodo di <i>spawning</i> (mesi) | Autori |
|--|-----------------------------------|--|
| <i>Evechinus chloroticus</i> (Valenciennes, 1846) | 2-3 | Lamare et al., 2002; Dix, 1969 |
| <i>Sphaerechinus granularis</i> (Lamarck, 1816) | 2 | Guillou e Lumingas, 1998 |
| <i>Psammechinus miliaris</i> (Gmelin, 1778) | 3 | Hughes <i>et al.</i> , 2006; Kelly, 2001 |
| <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816) | 3-4 | Byrne, 1990; Lozano <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Centrostephanus rogersii</i> (Agassiz, 1863) | 1-2 | Andrew e Byrne, 2007 |
| <i>Strongylocentrotus nudus</i> (Agassiz, 1863) | 2 | Agatsuma, 2007 |
| <i>Strongylocentrotus droebachinsis</i> (Muller, 1776) | 1-2 | Scheibling e Hatcher, 2007 |
| <i>Tripneustes gratilla</i> (Linneo, 1758) | 2-3 / continuo* | Vailingon <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Diadema antillarum</i> (Philippi, 1845) | 3-4 / continuo* | Muthiga e McClannan, 2007 |
| <i>Lytechinus variegatus</i> (Lamarck, 1816) | 3 / continuo* | Lessios, 1984; McCarty e Young, 2002 |
| <i>Tripneustes ventricotus</i> (Lamarck, 1816) | continuo | Lessios, 1984 |
| <i>Loxechinus albus</i> (Molina, 1782) | continuo | Oyarzun <i>et al.</i> , 1999 |
| * dipendente dalle condizioni termali | | |

5. Successo di fecondazione in *A. lixula*

5.1 Introduzione

Tra gli invertebrati marini le strategie riproduttive adottate sono tanto quella asessuata quanto quella sessuata. Queste vengono attuate dalle singole specie con diverse modalità. In particolare per la riproduzione sessuata è possibile osservare tre diverse strategie di fecondazione dei gameti:

- 1- Interna, con copulazione diretta durante la quale i maschi rilasciano lo sperma all'interno dell'apparato riproduttore femminile;
- 2- Guidata dallo sperma (spermcasting) durante la quale i maschi rilasciano liberamente nel mezzo acquoso lo sperma che viene a contatto con le uova ancora associate alle femmine grazie alle capacità di nuoto e alle correnti;
- 3- Esterna (broadcasting) con entrambi i gameti rilasciati nel mezzo acquoso dove avviene la fecondazione.

L'adozione di una di queste strategie da parte di un organismo dipende dalla sua storia evolutiva e da una serie di fattori biotici e abiotici che la hanno influenzata. La scelta è sempre finalizzata ad ottimizzare e migliorare la propria *fitness* che quindi risulta essere indissolubilmente legata all'ottimizzazione degli eventi riproduttivi nonché al successo riproduttivo della specie.

Il successo riproduttivo diventa quindi la chiave per comprendere, non solo il potere di dispersione ma anche, la storia evolutiva e le sue possibili risposte a cambiamenti più o meno drastici dell'ambiente nel quale vive una specie.

Gli eventi biologici e fisiologici più importanti di una specie sono quindi da ricercare nella strategia riproduttiva che questo adotta e nell'attuazione dei vari meccanismi riproduttivi quali:

- 1) l'aggregazione spazio/temporale degli individui sessualmente maturi durante il periodo riproduttivo;
- 2) il miglioramento delle caratteristiche dei gameti (attività motoria, galleggiamento e taglia);
- 3) la longevità dei gameti;
- 4) meccanismi di riconoscimento chimico specie-specifico tra i gameti (proteine e ormoni);
- 5) meccanismi anti-polispermia.

Il successo riproduttivo è dunque funzione della distribuzione, abbondanza, della qualità dei riproduttori, dei gameti emessi da ciascun sesso, quanto delle condizioni ambientali chimico-fisiche dove avvengono gli eventi riproduttivi principali (Levitan, 2005).

I momenti riproduttivi fondamentali sono: la produzione gametica, la fecondazione e la produzione di una prole efficiente. Quindi il successo riproduttivo sarà a sua volta funzione diretta della produzione gametica, del successo di fecondazione e infine della produzione di una prole efficiente (*offspring size*).

Il successo riproduttivo quindi risulta altamente variabile, non solo a livello dei taxa ma anche a livello di popolazioni, individui, stagioni e a scale temporali più o meno ampie, ma anche dalle condizioni ambientali.

Assume un'importanza strategica studiare il successo di fecondazione, nel successo riproduttivo, che in organismi a fecondazione esterna rappresenta un momento cruciale a causa delle interazioni dirette dei gameti e degli embrioni con l'ambiente acquoso che comporta una serie di "pericoli" quali la dispersione e la predazione.

5.1.2 Il successo di fecondazione negli organismi marini a fecondazione esterna.

I principali processi che determinano la formazione di un nuovo individuo sono: il riconoscimento specie – specifico, tra due individui di sesso opposto, il contatto tra i rispettivi gameti; la plasmogamia, ovvero la fusione delle membrane plasmatiche; la cariogamia, ovvero la fusione dei due nuclei; l'attivazione del metabolismo dell'uovo; embriogenesi e sviluppo finale del nuovo individuo.

Negli ultimi decenni un'attenzione particolare è stata rivolta ai meccanismi di fecondazione degli organismi marini con fecondazione esterna (Levitan & Sewell 1998, Levitan & Petersen 1998, Yund 2000, Petersen & Levitan 2001, Podolsky 2002, Lauzon-Guay & Scheibling 2007).

Per questi, il successo riproduttivo non è altro che funzione diretta del successo di fecondazione, ovvero della percentuale di uova, rilasciate da ciascuna femmina, che viene fecondata dai maschi (Levitan 1991, Levitan *et al.*, 1992, Levitan & Young, 1995). Il successo di fecondazione è cruciale per la produzione zigotica ovvero nella formazione delle generazioni successive.

Numerosi sono i fattori che contribuiscono al successo di fecondazione di una specie. In particolare, per gli organismi a fecondazione esterna possono essere classificati e variano a seconda della scala alla quale stiamo studiando il meccanismo di fecondazione (Tab. 3.1): dai gameti alla popolazione.

L'accoppiamento fra individui dipende direttamente, non solo dal successo riproduttivo del singolo individuo, e quindi dalla sua produzione gametica, ma da tutti quei fattori ambientali che interagiscono con le fasi della fecondazione, le caratteristiche dei gameti e ai loro rapporti (Denny & Shibata, 1989; Levitan, 2005; Marshall *et al.*, 2004).

Le caratteristiche intrinseche dei gameti (taglia, longevità, capacità motoria, concentrazione) e la probabilità d'incontro fra i due diventano elementi fondamentali nella comprensione sia dei meccanismi di fecondazione che del raggiungimento della *fitness*.

Lo studio dei meccanismi e del successo di fecondazione e la sua variabilità interspecifica ed intraspecifica, e all'interno delle stesse, è un valido strumento per comprendere anche quale potrebbe essere la produzione larvale e quindi il reclutamento in una popolazione (Hodgson, 2007).

Tabella 5.1 Fattori che influenzano i meccanismi di fecondazione negli organismi a fecondazione esterna (tabella riadattata da Grange, 2005)

| Gameti | Individuo | Popolazione | Ambiente |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|
| 1. Sperma | 1. Comportamento | 1. Densità | 1. Complessità |
| <i>Morfologia</i> | <i>Aggregazione</i> | 2. Taglia | topografica |
| <i>Comportamento</i> | <i>Sincronismo</i> | 3. Distribuzione | 2. Flusso |
| <i>Velocità</i> | <i>Spawning</i> | 4. Struttura di taglia | <i>Idrodinamismo</i> |
| <i>Longevità</i> | 2. Capacità riproduttiva | 5. Struttura d'età | <i>Turbolenza</i> |
| 2. Uovo | <i>Tasso di spawning</i> | 6. Sex ratio | 3. Profondità |
| <i>Taglia</i> | 3. Morfologia | | 4. Qualità dell'acqua |
| <i>Jelly coat</i> | <i>Taglia</i> | | <i>Temperatura</i> |
| <i>Chemiotassi</i> | <i>Produzione gametica</i> | | <i>Salinità</i> |
| <i>Recettori per lo sperma</i> | 4. Età | | <i>pH</i> |
| | 5. Allocazione energetica | | 5. Nutrienti |
| 3. in genere | | | 6. Agenti tossici naturali |
| <i>Longevità</i> | | | |
| <i>Compatibilità</i> | | | 7. Inquinamento |

5.1.3 Lo sperma: limitazione e funzionalità

Una delle teorie più accreditate sul successo di fecondazione, ovvero sul successo riproduttivo negli organismi a fecondazione esterna, riguarda la limitazione spermatica. La più ovvia conseguenza di una limitazione di sperma è che alla produzione di un uovo non corrisponderà necessariamente la produzione di uno zigote. Il tasso di fecondazione, quindi l'interazione fra i gameti femminili e maschili, dipenderà direttamente dalla distribuzione, taglia, diffusione e concentrazione dello sperma disponibile nell'ambiente al momento della riproduzione (Levitan & Petersen, 1995).

Il rilascio dello sperma è funzione delle caratteristiche biologiche dei riproduttori (successo riproduttivo, taglia e comportamento riproduttivo) e la sua diffusione, funzione dei fattori ambientali (profondità, velocità e turbolenza dell'acqua) e della qualità dell'emissione (Thomas, 1994). Pennington (1985) ha dimostrato che la fecondazione in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller, 1776) decresce sensibilmente con la distanza del maschio dalla sorgente di uova, quindi di fatto si sostiene che lo sperma sia un forte fattore limitante durante la riproduzione. Studi effettuati sulla limitazione da sperma in vari organismi marini a fecondazione esterna, riportano che generalmente a basse densità di popolazione la concentrazione dello sperma diventa fattore limitante, mentre ad alte densità la concentrazione dello sperma potrebbe subire delle forti oscillazioni legate ad una competizione intraspecifica che si evince principalmente dalla capacità dei riproduttori maschi di potere controllare il rilascio quantitativo dello sperma durante la stagione riproduttiva in modo da minimizzare lo spreco di sperma (Levitan, 2005; Marshall & Bolton, 2007). Da uno studio condotto su una specie di ascidia si evince che lo sperma rilasciato liberamente nell'acqua viene richiamato per filtrazione all'interno della femmina. In questo caso il fattore fortemente limitante è risultato essere la diluizione dello sperma nel mezzo acquoso e la sua longevità ovvero la sua capacità di rimanere attivo per il periodo necessario a raggiungere le uova all'interno della femmina.

Studi sui meccanismi di fecondazione degli echinidi (Tab. 3.2), hanno più volte messo in evidenza una forte correlazione fra la concentrazione e la longevità dello sperma. Probabilmente questa è legata alle condizioni di consumo dell'ossigeno da parte dello stesso sperma durante la sua attivazione (Chia & Bicknell, 1983): meno lo sperma è diluito meno ossigeno viene consumato e questo ne aumenta la longevità.

In conclusione, una bassa densità di sperma nel mezzo acqueo, si traduce generalmente in un basso livello di successo di fecondazione e in un elevato livello di variabilità riproduttiva sia maschi che nelle femmine. In generale, è stato osservato che un'eccessiva densità spermatica comporta uno scarso successo di fecondazione, probabilmente imputabile all'attivazione di meccanismi anti-polispermia da parte dell'uovo (Tab. 3.3) (Yund,2000; Levitan 2008).

Tabella 5.2 Meccanismi di blocco per la polispermia nell'uovo di riccio di mare

| Meccanismi di blocco polispermia | Modalità |
|---|--|
| Rapido e transitorio | <i>Il legame o fusione del primo spermatozoo determina una variazione del potenziale elettrico di membrana, mediante ingresso di Na^+, bloccando l'attività degli altri spermatozoi</i> |
| Lento | <i>Prevede la formazione della membrana di fecondazione, attraverso una cascata di reazioni mediate da enzimi. È completa circa 1' dopo la fusione del primo spermatozoo.</i> |

Tabella 5.3 Studi sul successo di fecondazione in alcuni echinidi.

| Specie | Referenza |
|--|--|
| <i>Paracebtrotus lividus</i> | Vogel <i>et al.</i> , 1982 |
| <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> | Pennington, 1985; Meidel and Yound, 2001 |
| <i>Strongylocentrotus franciscanus</i> | Levitan <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | Mead and Denny, 1995 |
| <i>Echinometra lacunter</i> | Sewell and Young, 1999 |

5.1.4 L'uovo: taglia e funzionalità

Le caratteristiche morfologiche e chimico fisiche delle uova sono determinanti nel successo di fecondazione negli organismi a fecondazione esterna. L'analisi della variabilità della taglia dell'uovo nella fecondazione esterna ha assunto negli ultimi decenni una forte importanza poiché da questa è determinata la maturità di uno zigote efficiente.

Secondo Levitan (1993) uova grandi sono un buon bersaglio per lo sperma e aumentano il tasso di fecondazione rispetto a uova di piccola taglia, aumentando di conseguenza la fitness della prole. Il successo della fecondazione quindi dipende direttamente dalla taglia delle uova in quanto è questa che determina il target per il contatto con lo sperma (Levitan, 1996; Marshall *et al.*, 2000).

Quando lo sperma è scarso, le uova di grande taglia sono più facilmente fecondabili, mentre ad elevata concentrazione spermatica le uova di piccola taglia vengono fecondate con maggiore facilità (Vogel, 1982; Levitan, 1996; Styan, 1998; Marshall *et al.*, 2002).

Dagli studi effettuati, su altri echinidi, risulta che la concentrazione delle uova nel mezzo acqueo non è determinante per il successo riproduttivo tanto quanto la taglia.

Tuttavia, in condizioni di elevata concentrazione spermatica nell'ambiente, le uova di grande taglia sono più soggette a fenomeni di polispermia probabilmente perché i meccanismi antipolispermia vengono attivati in ritardo se paragonati alle uova di piccola taglia (Styan, 1998; Marshall *et al.*, 2002; Marshall & Keough, 2003).

Anche la longevità dell'uovo come quella dello sperma sembra giocare un ruolo fondamentale al fine del successo di fecondazione, soprattutto in specie a fecondazione esterna. Questo carattere è legato sia al meccanismo di riproduzione adottato dalla specie ma anche dalle condizioni energetiche dell'uovo al momento del suo rilascio.

Williams e Bentley (2002) trovano che l'elevata longevità dell'uovo di un polichete (5 giorni), dipende essenzialmente dallo sperma che viene deposto sul substrato in modo casuale e quindi non tutte le uova riescono ad essere fecondate in breve tempo. In questo caso quindi il successo di fecondazione dipende direttamente dal comportamento adottato dalla specie durante il periodo riproduttivo e dalla longevità del gamete femminile, le femmine probabilmente rilasciano le uova all'inizio del periodo riproduttivo per aumentare la probabilità di incontro con lo sperma.

In generale, nella maggior parte degli organismi il successo e l'efficienza delle uova risiede nell'apporto energetico che queste posseggono al momento dell'emissione, quindi sono direttamente legate alle condizioni trofiche delle madri. L'apporto nutritivo che consegnano le madri alle proprie uova è il risultato di una condizione trofica e di una strategia di allocazione energetica finalizzata a massimizzare la *fitness*.

George *et al.* (1990) riportano una possibile relazione fra la condizione trofica delle femmine di *A. lixula* e lo stato nutritivo ed energetico delle uova: in ambienti caratterizzati da un'elevata abbondanza di specie algali le femmine producono uova con un alto contenuto lipidico e proteico, contrariamente a quanto accade in ambienti poveri di risorse dove le uova hanno bassi valori lipidici e proteici.

La produzione di determinate tipologie di uova, da un punto di vista qualitativo, avrà naturalmente delle ripercussioni sulla quantità e sull'efficienza della prole e del suo sviluppo ovvero con il potenziale reclutamento nella popolazione.

Infine la taglia e le caratteristiche intrinseche all'uovo, sono in grado di influenzare sia la fitness del singolo individuo sia il numero di zigoti efficienti prodotti. La relazione tra produzione e la taglia dell'uovo è cruciale nella riproduzione e nell'investimento per potenziare la propria *fitness* durante il periodo riproduttivo (Levitan, 2006).

Obiettivi del presente studio sono stati:

- 1- Durante il primo anno di studio, analizzare il successo di fecondazione in base alle caratteristiche intrinseche di ciascun gamete di *A. lixula*, maschile e femminile;
- 2- Durante il secondo anno, verificare il successo di fecondazione di *A. lixula* durante la stagione riproduttiva.

5.2 Primo anno di studio: analisi della capacità di fecondazione dei gameti di

A. lixula

5.2.1 Materiali e metodi

5.2.1.1 Disegno sperimentale

L'echinide regolare *A. lixula* è un organismo *free – spawner*, per cui le femmine emettono nel mezzo acquoso le uova che verranno fecondate dallo sperma emesso dai maschi. La specie presenta una lunga stagione riproduttiva con più momenti di *spawning* (vedi cap.2).

La fecondazione esterna dipende dalla distribuzione e densità dei riproduttori, da fattori esogeni che inducono questi ad emettere i gameti nello stesso momento, dalle condizioni ambientali e dalle caratteristiche dei gameti stessi al momento dell'emissione.

Se la fecondazione avviene nel mezzo acquoso, la possibilità d'incontro tra i gameti, e quindi il successo di fecondazione, saranno condizionati dalla quantità di sperma

emesso, dalla sua longevità e dalla longevità dell'uovo (Levitan, 2005; Marshall & Bolton, 2007; Williamns e Bentley, 2002).

Nel caso in cui lo sperma sia poco concentrato, questo si attiverà prima compromettendo la sua longevità; mentre in condizioni poco diluite potrebbe inficiare il successo di fecondazione causando fenomeni di polispermia (Yund, 2000; Levitan, 2008). Inoltre il tempo impiegato dallo sperma nella ricerca delle uova nel mezzo sarà maggiore, dunque anche la longevità delle uova sarà determinante nel successo di fecondazione.

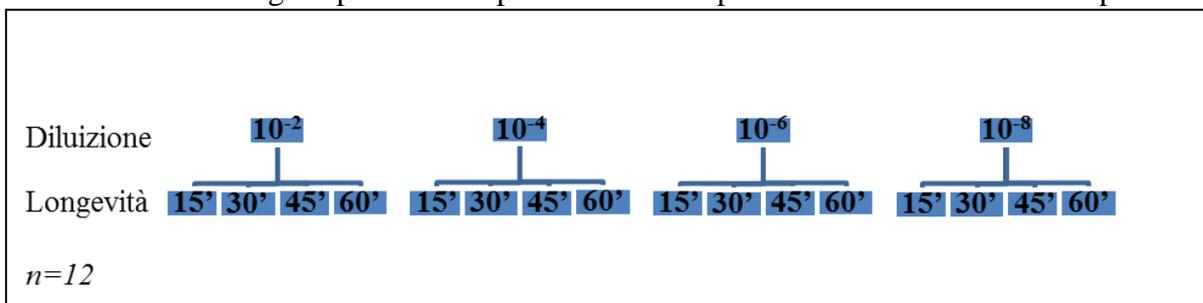
Sulla base di queste considerazioni, si ipotizza che il successo di fecondazione sia influenzato sia dalla concentrazione dello sperma che dalla longevità di ciascun gamete (maschile e femminile).

5.2.1.2

Esperimento I: Capacità di fecondazione dello sperma di *A. lixula*

La capacità di fecondazione dello sperma di *A. lixula* è stata valutata attraverso l'analisi della varianza di due fattori fissi: 1) la diluizione (4 livelli) e 2) la longevità gametica (4 livelli: t_0, t_1, t_2, t_3) (Tab. 5.4).

Tabella 5.4 Disegno sperimentale per valutare la capacità di fecondazione dello sperma.



Per quanto riguarda la concentrazione, lo sperma fresco è stato diluito in serie di 10, per un totale di 4 diluizioni (Tab. 5.5).

Tabella 5.5 Diluizione dello sperma.

| Grado di diluizione | Soluzione (sperma / ml) |
|----------------------------|---------------------------------|
| 10^2 | 80 μ l /40 ml |
| 10^4 | 40 μ l /40 ml |
| 10^6 | 20 μ l /40 ml |
| 10^8 | 10 μ l /40 ml |

La longevità è stata valutata nell'arco di un'ora a partire dall'attivazione dello sperma fresco. Ad intervalli di 15 minuti ciascuno. Ogni 15 minuti dal momento della sua attivazione, 1ml di sperma diluito veniva aggiunto a colture di uova (10ml), a concentrazione di 50.000 uova/litro ($50 \text{ uova} \times \text{ml}^{-1}$) (Pennington,1985). La coltura veniva incubata per 15 minuti e allo scadere 1 ml di soluzione veniva fissato con qualche goccia di formalina al 10% per le successive analisi.

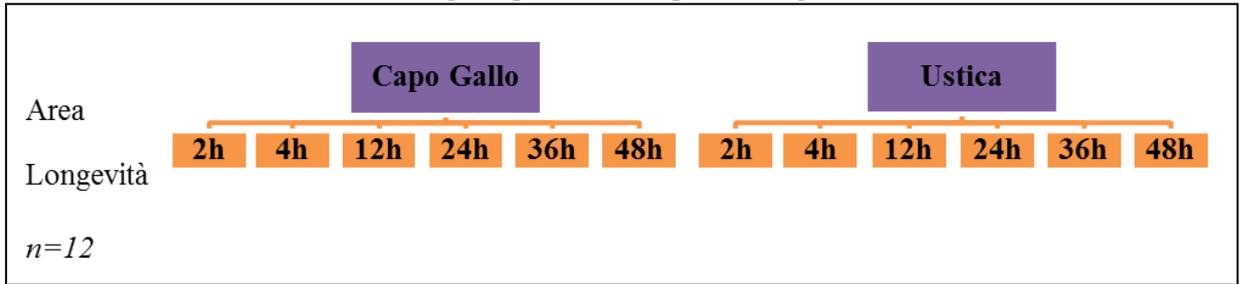
Il successo di fecondazione veniva valutato su un campione di 100 μ l, replicato tre volte per un totale di 300 μ l, dal millilitro prelevato. È stato valutato il numero di uova fecondate e di quelle non fecondate. Il successo di fecondazione veniva così espresso in dati percentuali per ciascun trattamento.

Esperimento II: Capacità di fecondazione delle uova di *A. lixula*

La longevità dell'uovo, intesa come periodo di tempo che intercorre tra la sua emissione e la cessazione della sua funzionalità, è stata valutata nelle 48h successive alla sua ipotetica emissione.

La capacità di fecondazione delle uova di *A. lixula* è stata valutata attraverso l'analisi della varianza di due fattori: Area fattore random (2 livelli: Ustica e Capo Gallo) e Longevità gametica fattore fisso (4 livelli: t_0, t_1, t_2, t_3) (Tab. 5.6).

Tabella 5.6 Disegno sperimentale per la longevità dell'uovo.



Le uova venivano mantenute in becher separati in FSW a temperatura costante (20°C) per le 48h successive alla loro emissione.

Per ciascuna femmina, 20 µl di uova prelevate dalla soluzione iniziale, diluite in 3 ml di FSW, venivano fecondate con 2 µl di sperma fresco ad intervalli prestabiliti di 2h, 4h, 12h, 24h, 36h, e 48h. Le soluzioni venivano incubate per 15 minuti dall'aggiunta dello sperma fresco. Infine, 1 ml di soluzione si fissava in formalina al 10% per le successive analisi sul successo di fecondazione. Gli esperimenti, condotti in laboratorio, sono stati effettuati in due aree di studio differenti scelte in modo random, per generalizzare il dato.

5.2.1.3 Raccolta dei dati

Dalle 2 aree di studio, Capo Gallo ed Ustica, sono stati prelevati 30 ricci (40 e 50 mm, aculei esclusi) ad una profondità di 3 – 5 metri.

Per evitare di stressare i ricci campionati, questi venivano trasportati velocemente in laboratorio all'interno di un contenitore dotato di ossigenatore e ad una temperatura di circa 19°C.

Per ciascun area, sono stati scelti in modo casuale 12 maschi e 12 femmine per gli esperimenti sul successo di fecondazione.

5.2.2 Risultati primo anno di studio: analisi della capacità di fecondazione dei gameti di *A. lixula*

5.2.2.1 Analisi della capacità di fecondazione dello sperma di *A. lixula*

Tutte le diluizioni considerate nello studio hanno mostrato, per entrambe le aree di studio, una capacità di fecondazione simile.

Mentre nelle diluizioni maggiori la percentuale di fecondazione risultava generalmente invariata nel tempo considerato, nelle diluizioni più basse si osservava un decremento di questa all'aumentare del tempo di prima attivazione (Fig. 5.1 e 5.2).

L'ANOVA a due vie (fattori diluizione e longevità fissi) ha messo in evidenza, in ciascuna delle aree, una differenza significativa per il fattore tempo (Tab. 5.7 e 5.8). Per il fattore diluizione è risultata una significatività solo per l'area di Ustica.

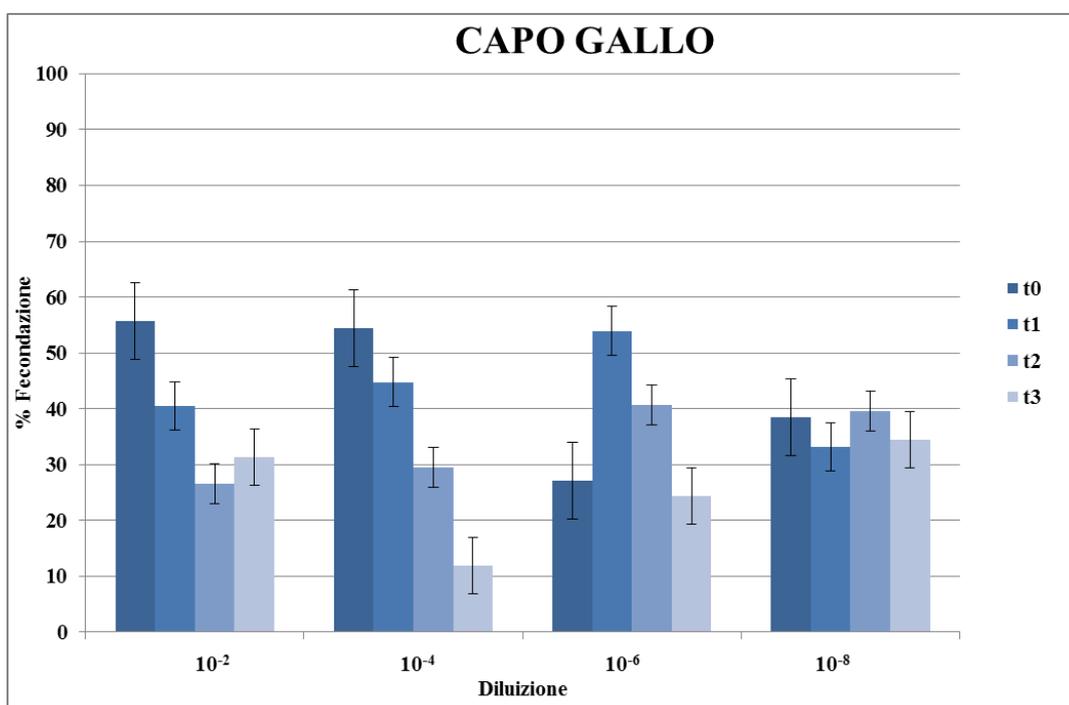


Figura 5.1 Percentuale di fecondazione in relazione alla diluizione e longevità dello sperma a Capo Gallo.

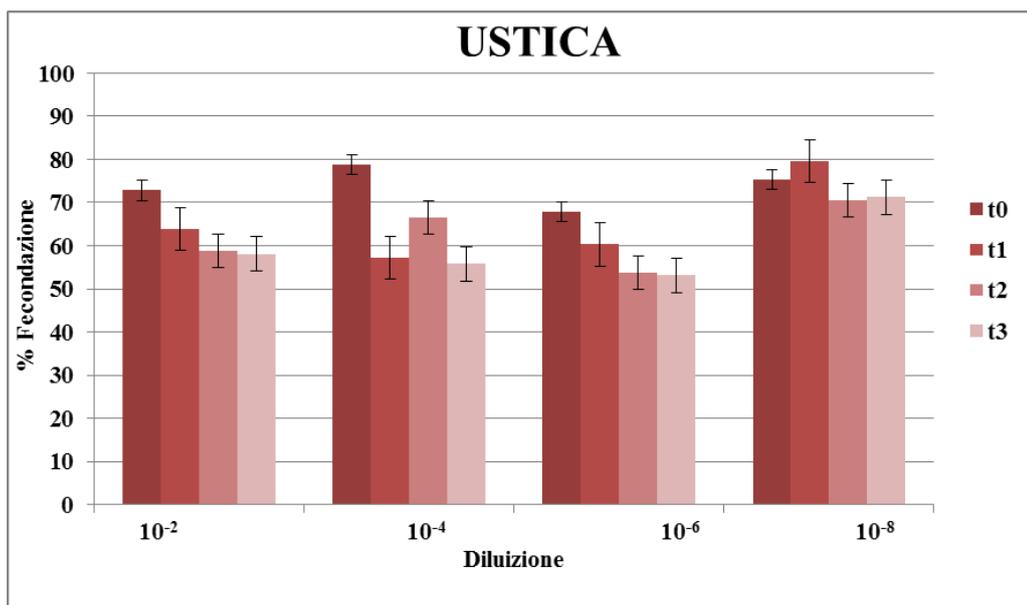


Figura 5.2 Percentuale di fecondazione in relazione alla diluizione e longevità dello sperma a Ustica.

Tabella 5.7 ANOVA sulla percentuale di fecondazione in relazione alla concentrazione e longevità dello sperma a Capo Gallo.

| Source | DF | MS | F | P | F versus |
|------------------|-----|---------|------|---------------|----------|
| Diluizione (Dil) | 3 | 83,99 | 0,11 | 0,956 | RES |
| Tempo (Te) | 3 | 2371 | 3,02 | 0,0313 | RES |
| DilxTe | 9 | 1002,05 | 1,28 | 0,253 | RES |
| RES | 176 | 785,49 | | | |
| TOT | 191 | | | | |

Cochran's test = 0,1150 (not significant)

Tabella 5.8 ANOVA sulla percentuale di fecondazione in relazione alla concentrazione e longevità dello sperma a Ustica.

| Source | DF | MS | F | P | F versus |
|------------------|-----|--------|------|---------------|----------|
| Diluizione (Dil) | 3 | 866,02 | 2,76 | 0,0438 | RES |
| Tempo (Te) | 3 | 873,08 | 2,78 | 0,0426 | RES |
| DilxTe | 9 | 175,01 | 0,56 | 0,8305 | RES |
| RES | 176 | 314,07 | | | |
| TOT | 191 | | | | |

Cochran's test = 0,1218 (not significant)

5.2.2.2 Analisi della capacità di fecondazione delle uova di *A. lixula*

Dopo avere controllato la morfologia delle uova (Fig. 5.3A) e la possibile contaminazione della coltura, si è proceduto all'allestimento delle colture per gli esperimenti di fecondazione.

Una volta aggiunto lo sperma alla coltura di uova, per ciascun tempo stabilito, è stata valutata la percentuale di uova fecondate dopo 15 minuti di incubazione.

L'uovo veniva considerato fecondato nel momento in cui la membrana di fecondazione risultava visibile (Fig. 5.3B). Se l'uovo presentava malformazioni (bolle interne, frammentazione, schiacciamenti) veniva considerato non fecondato.

In entrambe le aree di studio la capacità di fecondazione delle uova ha mostrato un *trend* simile. Questo si manteneva fra il 15% e il 50% fino alle 36h, per poi decrescere durante le successive ore (48h<10%) (Fig. 5.4). L'ANOVA (fattori Area random e Tempo fisso) ha mostrato una significatività per il fattore Area (Tab. 3.11). Il test SNK indica una maggiore capacità di fecondazione per le uova provenienti da Capo Gallo.

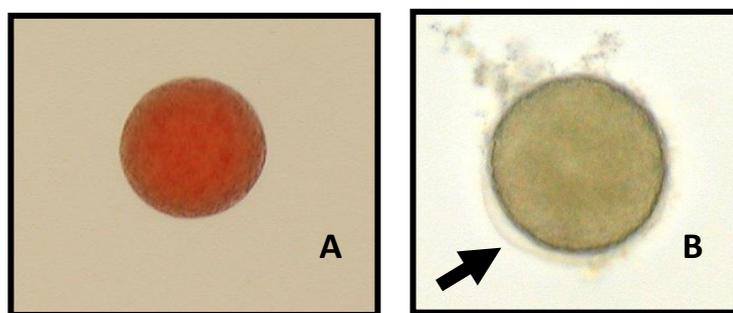


Figura 5.3 *A. lixula*: A) uovo appena emesso; B) uovo fecondato, la freccia indica la membrana di fecondazione.

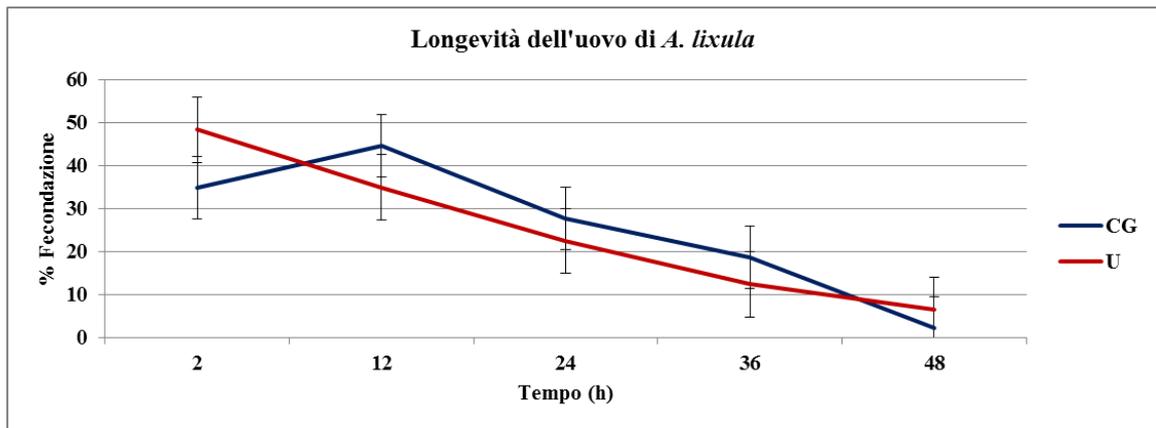


Figura 5.4 Longevità dell'uovo di *A. lixula* nelle due aree di studio, Capo Gallo (CG) e Ustica (U).

Tabella 5.9 ANOVA sulla longevità dell'uovo di *A. lixula* nelle due aree di studio.

| Source | DF | MS | F | P | F versus |
|------------|-----|----------|-------|---------------|----------|
| Area (Ar) | 1 | 219,2632 | 43,68 | 0,0001 | RES |
| Tempo (Te) | 4 | 15,5774 | 2,33 | 0,2165 | ArxTe |
| ArxTe | 4 | 6,6875 | 1,33 | 0,2626 | RES |
| RES | 110 | 5,0203 | | | |
| TOT | 119 | | | | |

Cochran's test = 0,2006 (not significant)

5.3 Secondo anno di studio: analisi del successo di fecondazione di *A. lixula* durante la stagione riproduttiva

5.3.1 Materiali e metodi

5.3.1.1 Tecniche usate

Per ottenere la soluzione di uova di partenza, da ciascuna femmina sono state prelevate le uova con lavaggi delle gonadi in acqua di mare filtrata (FSW) (0.45 μm) e l'ausilio di una membrana di maglia di 100 μm . La soluzione concentrata di uova veniva portata ad un volume di 25 ml, per tutte le femmine. Da queste soluzioni, veniva prelevato 1 ml, aggiunta qualche goccia di formaldeide al 10%, per la determinazione della concentrazione e della taglia delle

uova. I maschi erano invece mantenuti in stato di *dry sperm*, concentrato, per evitarne l'attivazione (Conway *et al.*, 1984; Pennington, 1985).

5.3.1.2 Raccolta dei dati

Lo studio è stato effettuato tra Maggio e Settembre 2010, periodo corrispondente alla stagione riproduttiva di *A. lixula*.

Da due aree di studio, Ustica e Capo Gallo, sono stati prelevati 15 esemplari riproduttori e tra questi, scelti in modo random, 6 femmine e 6 maschi.

Concentrazione e taglia delle uova di *A. lixula*.

La determinazione della concentrazione delle uova è stata effettuata, su tre femmine per ciascuna area, utilizzando un microscopio ottico ad ingrandimento 20X. È stato utilizzando un volume di 10 µl replicato per ogni femmina tre volte, e riportato il numero di uova per 1L di soluzione, in accordo a Levitan *et al.*, (1991). Per quanto riguarda la taglia dell'uovo è stato misurato il diametro di 100 uova, per sei femmine per area. Entrambe le analisi sono state condotte durante la stagione riproduttiva. Le due variabili, taglia e concentrazione gametica, sono state valutate durante la stagione riproduttiva.

L'analisi della varianza delle due variabili è stata condotta attraverso due fattori: Area fattore random (2 livelli: Ustica e Capo Gallo) e Tempo fattore random (3 livelli: mesi ricadenti all'interno della stagione riproduttiva).

Successo di fecondazione di *A. lixula* durante la stagione riproduttiva

Le uova di ogni femmina venivano fecondate con sperma proveniente dai maschi della stessa area, per evitare una variabilità di risposta dei singoli esperimenti. Quindi colture di uova, a concentrazione 5×10^4 , venivano fecondate con una soluzione di sperma, a concentrazione 10^{-2} .

La fecondazione è stata replicata, così da avere in totale 6 colture indipendenti per area. Infine, la temperatura è stata mantenuta costante per tutta la durata dell'esperimento (Falugi & Angelini, 2003).

Per valutare il successo di fecondazione di *A. lixula* durante la lunga stagione riproduttiva, sono stati effettuati dei saggi di fecondazione in tre tempi (fattore random) ricadenti nella stagione riproduttiva su individui prelevati, da due aree di studio (fattore random) attraverso l'analisi della varianza di tipo ANOVA. Il C-test di Cochran è stato utilizzato per verificare l'omogeneità della varianza. Le analisi statistiche sono state eseguite con il software GMAV 5.0 (Università di Sidney).

5.3.2 Risultati secondo anno di studio: analisi del successo di fecondazione di *A. lixula* durante la stagione riproduttiva

5.3.2.1 Analisi della taglia e concentrazione delle uova di *A. lixula*

L'ANOVA sulla taglia delle uova (fattore Area random, fattore Tempo random) di *A. lixula*, provenienti da individui prelevati durante la presunta stagione riproduttiva, mostra una forte significatività nell'interazione fra i due fattori ($p < 0,001$) (Tab. 5.10). In particolare test SNK confermano una differenza significativa durante i tempi di campionamento a carico dell'area di Ustica (SNK: Settembre < Maggio = Luglio). Nell'area di Capo Gallo di contro non si registra alcuna differenza fra i mesi.

In generale, la taglia media dell'uovo, emesso durante la stagione riproduttiva, è di circa 55 μm (Fig.5.5).

Tabella 5.10 ANOVA Taglia dell'uovo di *A. lixula*

| Source | DF | MS | F | P | F versus |
|------------|-----|--------|------|---------------|----------|
| Area (Ar) | 1 | 135,37 | 1,53 | 0,3416 | ArxTe |
| Tempo (Te) | 2 | 98,7 | 1,12 | 0,4726 | ArxTe |
| ArxTe | 2 | 88,44 | 5,98 | 0,0027 | RES |
| RES | 594 | 14,79 | | | |
| TOT | 599 | | | | |

Cochran's test = 0,2104 (not significant)

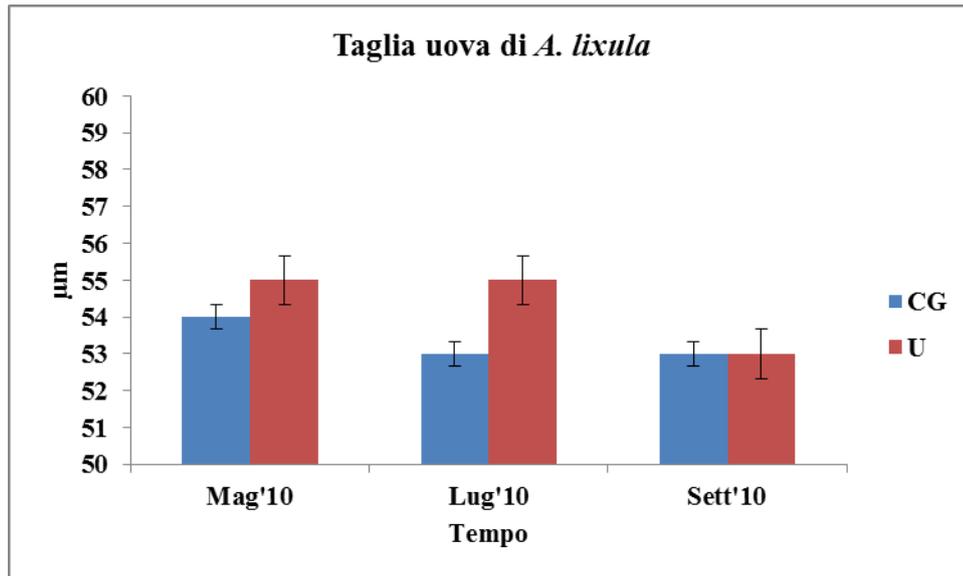


Figura 5.5 Taglia dell'uovo ($n=100$) di *A. lixula* nelle due aree di studio, Capo Gallo (CG) ed Ustica (U).

Per quanto riguarda la concentrazione gametica media delle femmine, durante la stagione riproduttiva, l'ANOVA (Area random, Tempo random) non ha messo in luce alcuna differenza significativa. In ogni caso, dall'istogramma (Tab.5.11, Fig.5.6) si nota una differenza nella concentrazione gametica femminile tra le due aree nell'ultimo tempo campionato.

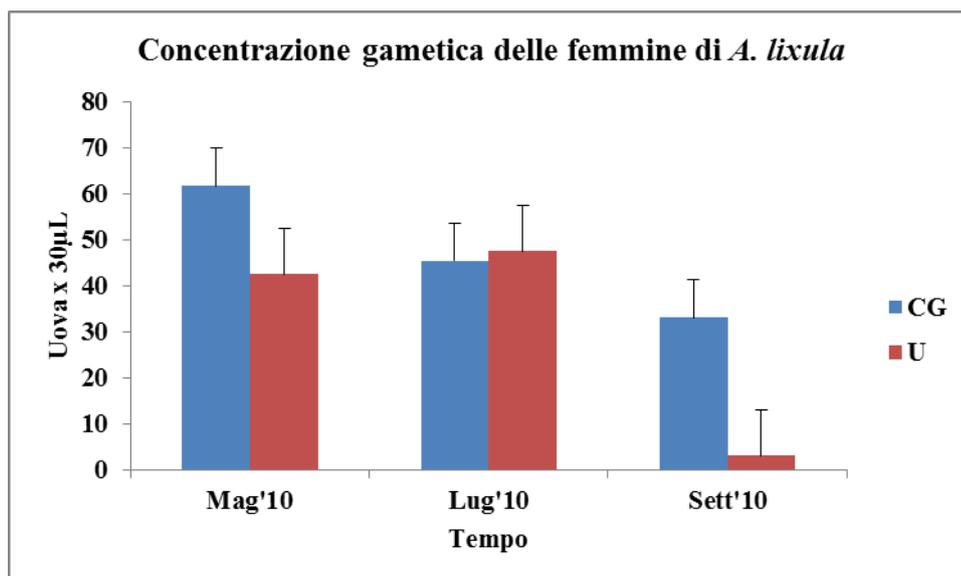


Figura 5.6 Concentrazione gametica delle femmine ($n=6$) di *A. lixula* nelle due aree Capo Gallo (CG) ed Ustica (U) durante la stagione riproduttiva

Tabella 5.11 ANOVA Concentrazione gametica delle femmine di *A. lixula* nelle due aree di studio durante la stagione riproduttiva

| Source | DF | MS | F | <i>P</i> | F versus |
|------------|-----|----------|-------|---------------|----------|
| Area (Ar) | 1 | 16608,01 | 9,35 | 0,0924 | ArxTe |
| Tempo (Te) | 2 | 18081,51 | 10,18 | 0,0895 | ArxTe |
| ArxTe | 2 | 1776,7 | 2,52 | 0,0832 | RES |
| RES | 174 | 704,21 | | | |
| TOT | 179 | | | | |

Cochran's test = 0,3159 (not significant)

5.3.2.2 Successo di fecondazione di *A. lixula* durante la stagione riproduttiva

Durante la stagione riproduttiva, da Maggio a Settembre 2010, nelle due aree di studio si è registrato un buon successo di fecondazione.

La fecondazione si mantiene elevata in entrambe le aree fino al mese di Luglio (30-40%) per poi scemare gradualmente a fine stagione (Fig. 5.7).

In realtà, per l'area di Ustica si registra un completo fallimento della fecondazione a fine stagione riproduttiva, ma questo non è stato registrato per l'area di Capo Gallo dove la percentuale di fecondazione si mantiene intorno al 20%.

L'ANOVA (Area random, Tempo random) non mette in evidenza alcuna differenza significativa tra le aree (Tab. 5.12), ma il test SNK *a posteriori* ci indica che dal mese di Luglio vi è una leggera differenza fra le due aree a favore dell'area di Capo Gallo.

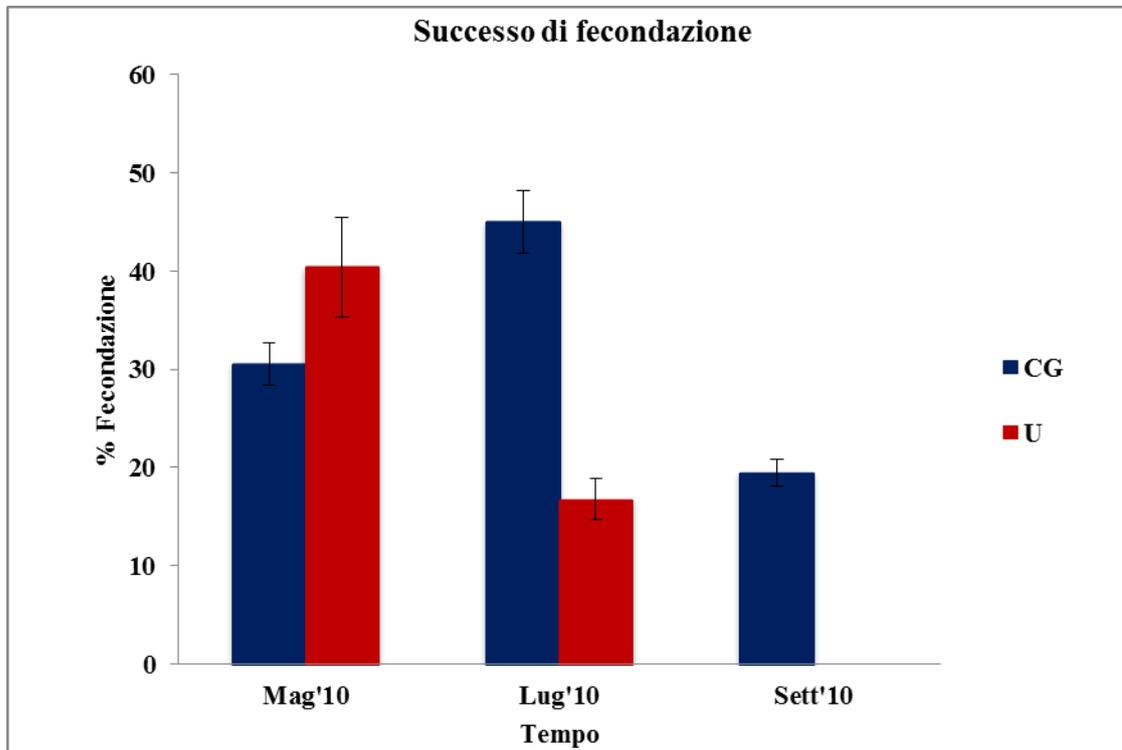


Figura 5.7 Successo di fecondazione durante la stagione riproduttiva ($n=6$) di *A. lixula* nelle aree di studio Capo Gallo (CG) e Ustica (U).

Tabella 5.12 ANOVA sul successo di fecondazione di *A. lixula* durante la stagione riproduttiva nelle aree di studio.

| Source | DF | MS | F | P | F versus |
|------------|----|---------|------|--------|----------|
| Area (Ar) | 1 | 1431,36 | 1,22 | 0,38 | ArxTe |
| Tempo (Te) | 2 | 2249,69 | 1,92 | 0,34 | ArxTe |
| ArxTe | 2 | 1170,86 | 2,23 | 0,1252 | RES |
| RES | 30 | 525,461 | | | |
| TOT | 35 | | | | |

Cochran's test = 0,4008 (not significant)

5.4 Discussione

Comprendere quale fosse la capacità riproduttiva di *A. lixula* durante la sua ampia stagione riproduttiva, è stato il secondo obiettivo della tesi.

Da uno studio preliminare, per quanto riguarda il successo di fecondazione in relazione alla concentrazione e alla longevità dello sperma, è risultato che, alle diluizioni più basse la percentuale di fecondazione si manteneva intorno al 50% ma decrementava all'aumentare del tempo di attivazione considerato (60 minuti). Di contro le soluzioni più diluite hanno mostrato una percentuale di fecondazione abbastanza elevata e invariata nel tempo (circa 70-80%). Una possibile interpretazione dei risultati fin qui ottenuti, è che l'elevata quantità di sperma, nelle soluzioni più concentrate, determini nelle uova l'attivazione prematura dei meccanismi anti-polispermia, limitando la fecondazione. In condizioni di sperma molto diluito, probabilmente, le uova non attivano, o rallentano, l'attivazione dei sistemi anti-polispermia, mantenendo in questo modo un successo di fecondazione più elevato.

La capacità delle uova di essere fecondate rappresenta un fattore cruciale per il successo riproduttivo degli invertebrati, ed è legata alla loro longevità (Grange, 2005). Dall'analisi della longevità delle uova, la percentuale di uova fecondate in entrambe le aree si è mantenuta elevata (circa 50%) fino alle 12h successive alla loro emissione. Successivamente, si è registrato un drastico decremento della percentuale di fecondazione (48h<10%). Una differenza significativa fra le aree nel successo di fecondazione è stata messa in evidenza, soprattutto nell'analisi della longevità dell'uovo. Questa potrebbe essere attribuita ad una possibile differenza a livello energetico dei gameti provenienti dalle due aree (George *et al.*, 1990).

Il successo di fecondazione di *A. lixula*, valutato durante la stagione riproduttiva, è da considerarsi basso (<50%) se paragonato a quello riscontrato in altri echinidi, di zone temperate e/o tropicali (Grange, 2005; Levitan, 1991-1995; Pennington, 1985) ma questo

sembra mantenersi inalterato, o in ogni caso positivo, durante l'intera stagione riproduttiva. Da queste prime analisi sul successo riproduttivo di *A. lixula* attraverso il successo di fecondazione, si può dedurre che la specie in effetti possa adottare un strategia molto simile a quelle di specie multivoltine.

A. lixula presenta un successo di fecondazione costante e continuo, qualitativamente, durante l'intera stagione riproduttiva individuata attraverso l'analisi del ciclo riproduttivo (vedi cap.2).

Ad oggi, le specie di echinidi che sappiamo avere una stagione riproduttiva prolungata o continua nel tempo sono poche (Lessios, 1984; Oyarzun et al., 1999; Vailington et al., 2005; Muthiga e McClannan, 2007). Inoltre di queste specie non si conosce nulla sulle capacità e il successo riproduttivo effettivo durante la lunga stagione riproduttiva.

6. Successo dello sviluppo embrionale e larvale in *A. lixula*

6.1 Introduzione

La relazione fra l'investimento parentale nella prole e la *fitness* di quest'ultima è uno degli argomenti centrali nell'analisi del successo riproduttivo degli organismi e soprattutto nella comprensione della dinamica di una popolazione (McEdward & Morgan, 2001).

La produzione di zigoti efficienti è di fatto funzione diretta della concentrazione di entrambi i gameti al momento della riproduzione e dell'effettiva fecondazione di un certo numero di uova ovvero è il risultato dell'interazione fra il tasso di fecondazione e alcuni fattori esogeni (Meidel & Scheibling, 1998).

È stato dimostrato che lo stato nutrizionale della madre è direttamente correlato, sia quantitativamente che qualitativamente, alla produzione di una prole efficiente (Emlet, 1987; George, 1990; Grange, 2005; Marshall, 2005). Quindi il successo riproduttivo delle femmine è direttamente correlato a fattori esogeni che controllano e variano la produzione gametica che, a sua volta, avrà un effetto sul successo della prole.

Un rapporto inversamente proporzionale è stato, invece, osservato fra la taglia dello zigote e il tempo di sviluppo della larva: zigoti di taglie più piccole si sviluppano più velocemente rispetto a zigoti più grandi. È probabile che questa relazione sia dovuta in parte all'apporto energetico iniziale delle uova e quindi alla loro taglia (Levitan, 2006).

È stato osservato che la taglia del riproduttore può avere un'influenza anche sulla qualità della prole prodotta (Levitan, 2000). In genere a taglie grandi corrispondono uova grandi e a taglie piccole uova piccole; anche se Emlet (1987) riporta che in alcune specie si ritrovano produttori di piccola taglia che tendono a produrre uova di grossa taglia per aumentare il tasso d'incontro con lo sperma ovvero aumentare la *fitness*.

Da queste considerazioni è possibile dedurre che l'efficienza e resistenza della prole prodotta è un'altra componente fondamentale del successo riproduttivo di una specie. A sua volta questa è legata alla condizione iniziale dei riproduttori e alla capacità riproduttiva degli stessi.

6.1.1 Lo sviluppo embrionale negli invertebrati marini con riferimento agli echinidi regolari

La strategia di sviluppo degli echinidi è tipicamente indiretta. In seguito ad appropriati stimoli, i gameti vengono rilasciati in acqua: lo sperma è piccolo e dotato di capacità motorie, le uova generalmente sono più grandi dello sperma, presentano un piccolo tuorlo e una sottile protezione trasparente (*jelly coat*) e non posseggono capacità motoria.

In condizioni ideali, lo sviluppo in genere è sincrono fra gli embrioni e segue tempi e fasi prestabiliti. In generale, a seguire la fase di fecondazione si ha un periodo di sviluppo embrionale a sua volta seguito da uno periodo di sviluppo larvale, in genere dalle 2 alle 6 settimane, che porta infine alla metamorfosi e quindi alla forma adulta (Conwey *et al.*, 1984).

Lo sviluppo embrionale è un processo multifasico, che procede secondo delle tappe ben precise. Basta una piccola alterazione, per avere effetti negativi e/o anomalie sul corretto sviluppo dell'organismo (Falugi & Angelini, 2003).

In seguito all'incontro dei gameti e alla fecondazione, possono essere descritte quattro fasi principali che precedono la metamorfosi (Fig.4.1):

1) Segmentazione: è la fase in cui lo zigote, a singola cellula, da una singola cellula in seguito a rapide divisioni mitotiche diventa un embrione pluricellulare. Il periodo di segmentazione va da circa un minuto dopo la fecondazione fino ai 130 minuti. Entro le 6h dalla prima fase di divisione, si arriva alla fase di *blastula* caratterizzata dalla presenza di

un blastocele (cavità) circondato da un unico strato di cellule con ciglia esterne, che conferiscono all'embrione la capacità di movimento;

2) Gastrulazione: è la prima fase fondamentale che segna il passaggio dallo sviluppo propriamente embrionale a quello propriamente larvale. Questa fase viene, di fatto, considerata da diversi autori (Conwey *et al.*, 1984; Falugi & Angelini, 2003; Kurihara, 2008) come punto di partenza per l'arrangiamento cellulare con la formazione dei 3 strati germinativi- ectoderma, mesoderma ed endoderma- nonché fase in cui inizia il differenziamento della larva. Questa fase, in generale, si sviluppa durante le prime 12, al massimo 24 ore successive alla fecondazione;

3) Differenziamento della larva: ultimata la gastrulazione, la larva si appiattisce e iniziano a formarsi l'apertura anale e il vestibolo orale. Nella maggior parte degli echinodermi, la larva acquista una forma transitoria definita *dipleurula*, che si svilupperà in *auricularia* negli Oloturoidi, *bipinnaria* negli Asteroidei, *ofiopluteo* nelle Ofiure ed *echinopluteo* negli Echinidi;

4) Sviluppo larvale: negli Echinidi dalla *dipleurula* si sviluppa, nell'arco delle 30-48h dopo la fecondazione, un pluteo (*echinopluteo*). Si tratta di una larva pelagica, in genere trasparente, fornita di braccia rigide (da 2 a 8) per la presenza di spicole scheletriche di natura calcitica, che servono a supportare la larva nelle funzioni di nuoto e ricerca del cibo grazie alla presenza di bande ciliate (Emlet, 2003).

Se i plutei vengono alimentati in modo corretto, vanno incontro ai successivi stadi larvali, fino alla metamorfosi in genere in un arco di tempo compreso fra i 20 e i 25 giorni (Conwey *et al.*, 1984; Falugi & Angelini, 2003; Emlet, 2003).

L'intero sviluppo larvale è completamente portato a termine in diretto contatto con l'ambiente. Proprio per tale ragione, lo sviluppo in generale viene usato come *biomarker* in studi ecotossicologici e di monitoraggio ambientale (Quinou, 1999; Byrne *et al.*, 2010).

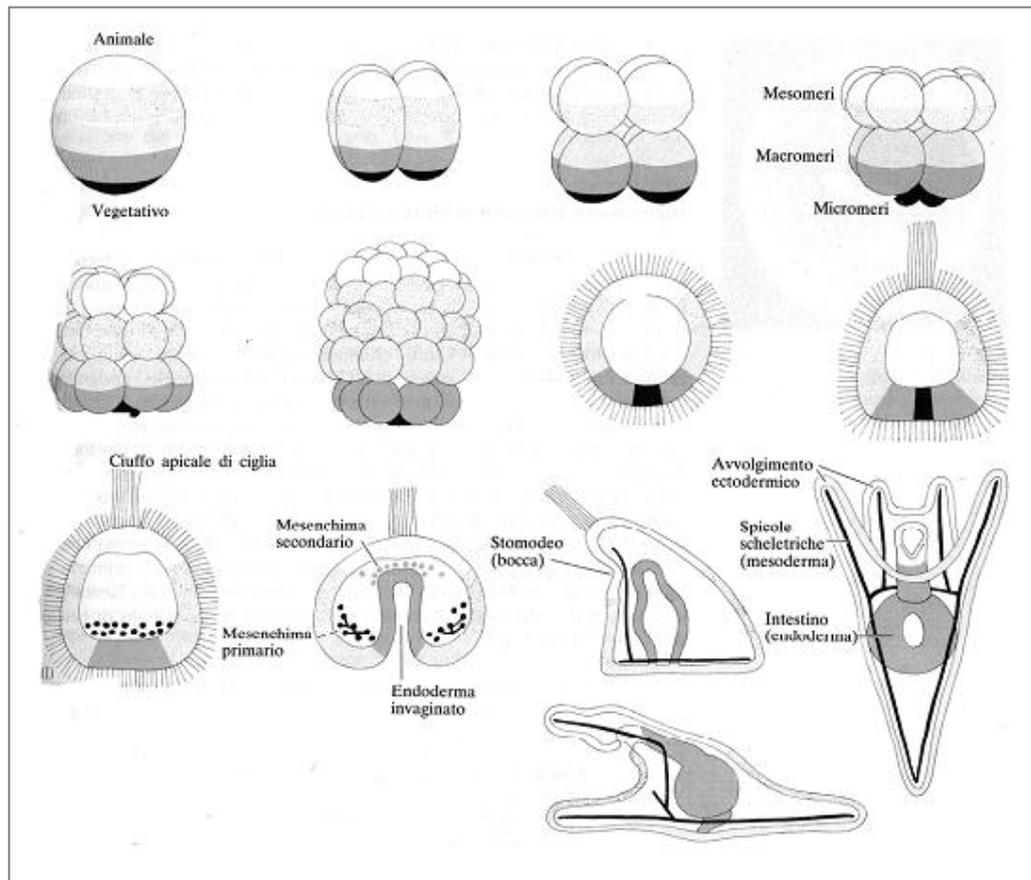


Figura 6.1 Principali stadi dello sviluppo embrionale degli echinidi regolari.

Obiettivi del presente studio sono stati quindi :

- 1- Descrivere per la prima volta lo sviluppo embrionale e larvale, fino allo stadio di pluteo, di *A. lixula*;
- 2- Verificare se alla lunga stagione riproduttiva segue un adeguato e positivo sviluppo larvale.

6.2 Prima fase di studio: descrizione dello sviluppo embrionale e larvale di *A. lixula*

6.2.1 Materiali e metodi

6.2.1.1 Preparazione delle colture per l'osservazione dello sviluppo embrionale e larvale di *A. lixula*.

Dopo avere scelto in modo casuale, 6 femmine, utilizzate come repliche indipendenti (Brennand *et al.*, 2010; Byrne *et al.*, 2009; Kurihara & Shirayama, 2004; Pennington, 1985), e 6 maschi di *A. lixula*, si è proceduto all'approvvigionamento dei gameti per l'allestimento delle colture. Prima di procedere con gli esperimenti, veniva controllata la forma e l'integrità delle uova e la motilità degli spermatozoi.

Le uova di ogni femmina venivano fecondate con sperma proveniente dai maschi della stessa area, per evitare, come riscontrato in *H. erythrogramma* (Valenciennes, 1846), una variabilità di risposta dei singoli esperimenti (Evans & Marshall., 2005).

In un becher da 1L, in accordo a Pennington (1985) e Levitan *et al.*, (1991), si preparava in maniera indipendente per ogni femmina, una soluzione di 900 ml di FSW contenente ~4 ml di uova, così da ottenere una concentrazione finale di 5×10^4 uova per litro, ~50 uova per ml^{-1} . La soluzione di uova veniva fecondata con 200 μl di sperma (pari ad una diluizione di 10^2), in grado di garantire l'attivazione dello sperma e allo stesso tempo minimizzare l'attivazione di blocco per la polispermia (Pennington, 1985; Levitan *et al.*, 1991).

Le colture di fecondazione sono state replicate, così da avere in totale 6 colture indipendenti per area.

In generale per gli echinidi, la temperatura ottimale per uno sviluppo embrionale corretto e sincrono è compresa tra i 18 e i 20 °C e deve essere mantenuta costante per tutta la durata dell'esperimento (Falugi & Angelini, 2003).

La temperatura di controllo scelta per lo studio è stata quella dei 20°C in quanto coincidente con la temperatura media registrata in campo durante la stagione riproduttiva di *A. lixula* (media $T^{\circ}=18.9\pm 1.3^{\circ}\text{C}\pm\text{E.S.}$), e quindi considerata in accordo a Byrne *et al.*, (2009) “storia termica” recente per gli adulti.

Le colture sono state poste in una camera termostata e mantenute a temperatura costante, per l'intera durata degli esperimenti.

Per garantire l'omogeneità del mezzo ed un'appropriata ossigenazione, in accordo a Strathmann *et al.* (1992), è stato inserito in ciascun becher un sistema di agitazione di pale rotanti (passo-passo da 3,5 Watt-230 Volt a 30 rpm).

6.2.1.2 Raccolta dei dati

Dalle colture, ad intervalli regolari di tempo (2h, 4h, 12h, 24h, 36h e 48h), venivano prelevati campioni da 1ml dalla coltura embrionale e fissati in formaldeide (10%), per le successive analisi.

Per i primi due intervalli di tempo (2h e 4h) venivano contati ed espressi in percentuale: il numero di uova fecondate (uova in cui era visibile la presenza della membrana di fecondazione) o di embrioni alle prime divisioni, considerate indice di normalità e percentuale di uova, zigoti ed embrioni che mostravano la presenza di bolle, rotture o numero dispari di blastomeri (frammentazione del citoplasma = indice di stress o deformità). Per il terzo intervallo (12h) venivano contati il numero e lo stadio embrionale, in particolare la percentuale di gastrule presenti.

Lo stadio a gastrula è stato considerato, come riportato in letteratura, come momento di *shift* fra il completamento dello sviluppo embrionale, quindi del successo embrionale, e l'inizio dello sviluppo larvale.

Per gli intervalli delle 24h e 36h venivano contati gli embrioni allo stadio di prisma e di pluteo iniziale e gli embrioni deformi. Per le analisi sono stati riportati dati in percentuali. Per l'ultimo intervallo (48h) veniva valutata la percentuale delle larve allo stadio di pluteo.

In accordo a quanto descritto da Brennan *et al.* (2010), venivano considerate larve "normali", gli echino-plutei con due braccia orali lunghe, due braccia postorali corte e con corpo trapezoidale/triangolare, includendo anche le larve con un minimo di asimmetria (quando una delle due braccia è più lunga dell'altra < 30).

6.2.2 Risultati prima fase di studio: descrizione dello sviluppo embrionale e larvale di *A. lixula*

Sono stati osservati i principali stadi embrionali, dall'uovo fecondato fino allo stadio di echino-pluteo a 4 braccia (Fig. 6.2).

Le fasi di prima divisione embrionale sono state osservate durante le prime 4h successive alla fecondazione, raggiungendo la fase di gastrula mediamente dopo le 12h.

Le prime fasi di sviluppo larvale sono state così registrate dalle 12h in poi. La fase di prisma è stata raggiunta dopo 24h mentre i primi plutei completi e con le braccia orali ben sviluppate sono stati rinvenuti dopo almeno 36h. Alla fine dell'esperimento, 48h, è stata registrata la massima presenza di echino-plutei a 4 braccia. In un solo caso è stata registrata la presenza di echino-pluteo a 6 braccia nel campione delle 48h, un'anomalia dato che le larve non erano alimentate.

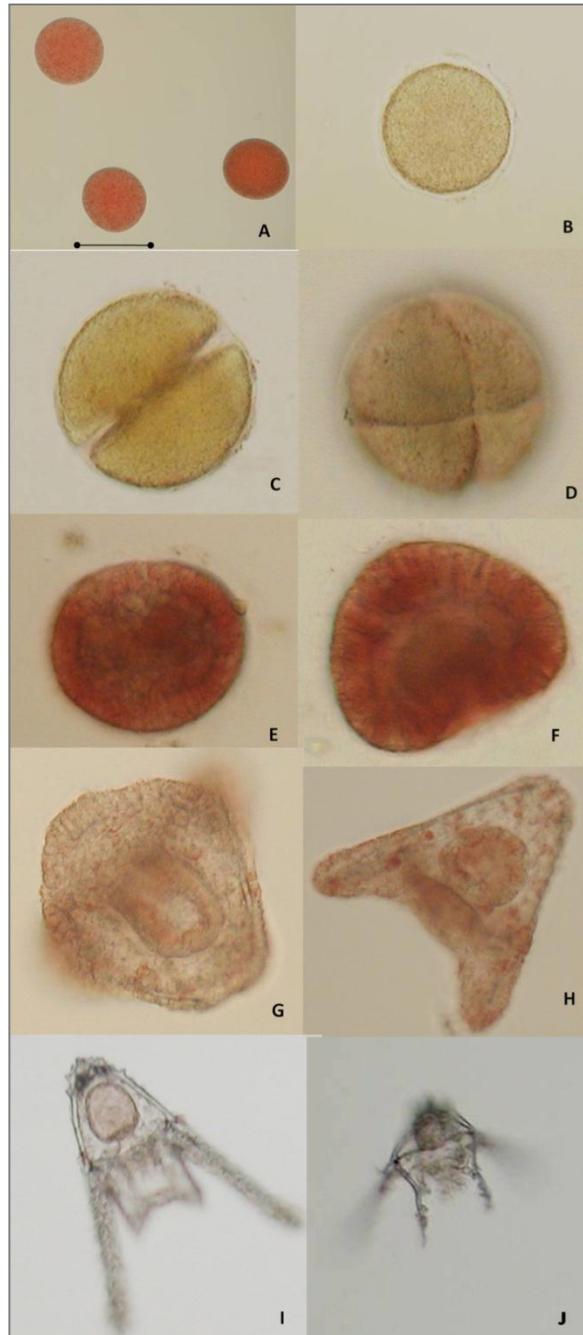


Figura 6.2 Stadi di sviluppo delle uova fecondate di *A. lixula* a 20°C: A- Uova non fecondate (scala = 200 μm); B- 15 minuti dopo la fecondazione; C- Prima divisione (~2h), stadio a due cellule; D- Seconda divisione (~2h), stadio a 4 cellule; E- Prima blastula (~6-12h); F- Gastrula (~12h); G- Prisma (~24h); H- Primo pluteo (~36h); I- Echino-pluteo a 4 braccia (~48h); J- Echino-pluteo a 6 braccia (48h).

6.3 Seconda fase di studio: successo embrionale e larvale di *A. lixula* durante la stagione riproduttiva

6.3.1 Materiali e metodi

6.3.1.1 Raccolta dei dati

Durante la stagione riproduttiva di *A. lixula*, tra Maggio e Settembre 2010, sono stati prelevati da due aree, Ustica e Capo Gallo, 15 ricci (40-50 mm, aculei esclusi) per ciascun campionamento. Di questi sono stati scelti in modo casuale, per ciascuna replica temporale, 6 femmine e 6 maschi per allestire le colture sperimentali (vedi paragrafo 6.2.1.1). Lo sviluppo embrionale e larvale è stato monitorato e analizzato come descritto nel paragrafo 6.2.1.2.

6.3.1.2 Disegno sperimentale

Questa specie sembra essere in grado di emettere gameti efficienti durante tutta questa stagione riproduttiva. Se dall'analisi del successo di fecondazione è stato osservato che ai gameti emessi durante l'intera stagione riproduttiva, corrisponde un buon successo di fecondazione, poche sono ad oggi le nostre conoscenze sulle fasi di sviluppo sia embrionale sia larvale di questa specie.

Il successo riproduttivo di un organismo è direttamente correlato alla produzione gametica, al successo di fecondazione e di conseguenza al successo di sviluppo embrionale.

Una volta stabilito il pattern temporale di sviluppo embrionale e larvale di *A. lixula*, si è ipotizzato che durante la lunga stagione riproduttiva ogni evento di spawning era seguito da un corretto sviluppo larvale (stato di pluteo).

Quindi, scelte due aree, in modo random, e tre tempi random all'interno della stagione riproduttiva (Fig. 6.3), è stato valutato lo sviluppo embrionale e larvale sulla: (a) percentuale di embrioni in divisione fino a stadio di gastrula e (b) percentuale di plutei ritrovata nelle 48h di indagine. L'analisi della varianza delle singole variabili è stata valutata secondo due fattori: Area (random) con due livelli (Ustica e Capo Gallo) e Tempo (random) con tre livelli (mese) (Fig. 6.3).

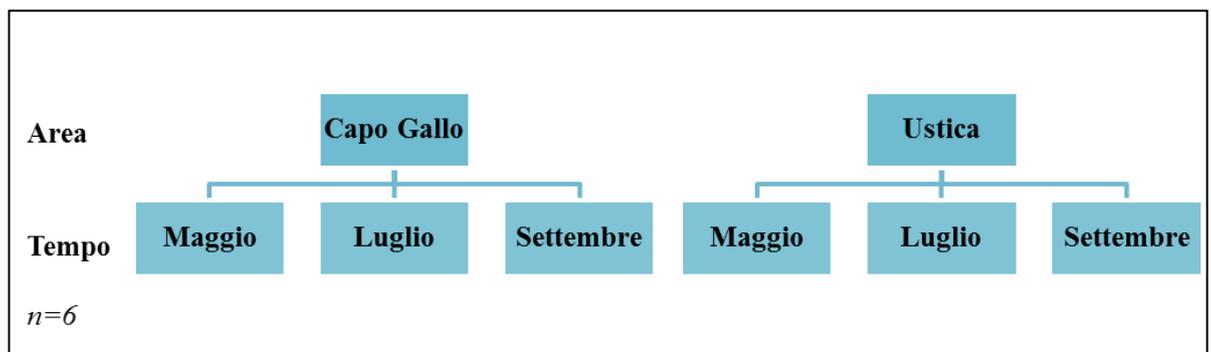


Figura 6.3 Schema del disegno sperimentale utilizzato per la valutazione del successo di fecondazione e divisione embrionale di *A. lixula* in due differenti aree durante la stagione riproduttiva.

6.3.2 Risultati seconda fase di studio

Successo di sviluppo embrionale e larvale di *A. lixula* durante la stagione riproduttiva

In entrambe le aree lo sviluppo sia embrionale che larvale di *A. lixula* si è svolto correttamente durante l'intera stagione riproduttiva.

Le percentuali di embrioni ritrovati a stadio di gastrula sia quella dei plutei risultano significativamente influenzati dall'interazione Area x Tempo ($p < 0,001$) (Tab. 6.1 e 6.2). I

test SNK a posteriori mostrano che la percentuale di embrioni e di plutei è significativamente più alta nei primi tempi riproduttivi rispetto all'ultimo, in entrambe le aree.

È stato inoltre analizzato il tempo di comparsa della fase di pluteo (tra le 12h e le 48h), espressa in percentuale di plutei, tra le due aree nel tempo, per verificare se ci fossero o meno ritardi nello sviluppo.

La comparsa dello stadio di pluteo segue un *trend* simile tra le due aree e nel tempo. Tuttavia, mentre a Capo Gallo questo stadio viene osservato già a partire dalle 24h, ad Ustica, lo si ritrova solo dalle 36h successive alla fecondazione (Fig. 6.5).

Infine, è stata valutata, durante la stagione riproduttiva, la percentuale di plutei malformati per ciascun area. Questa si è mostrata sempre più elevata nell'area di Ustica rispetto a quella di Capo Gallo (Fig. 6.7). Inoltre alla fine della stagione riproduttiva, ad Ustica, non solo non sono stati rinvenuti embrioni allo stadio di pluteo, ma nemmeno plutei malformati. Ad Ustica, gli embrioni a fine stagione riproduttiva si mostravano per lo più malformati già allo stadio di gastrula e prisma, e la maggior parte già in fase necrotica.

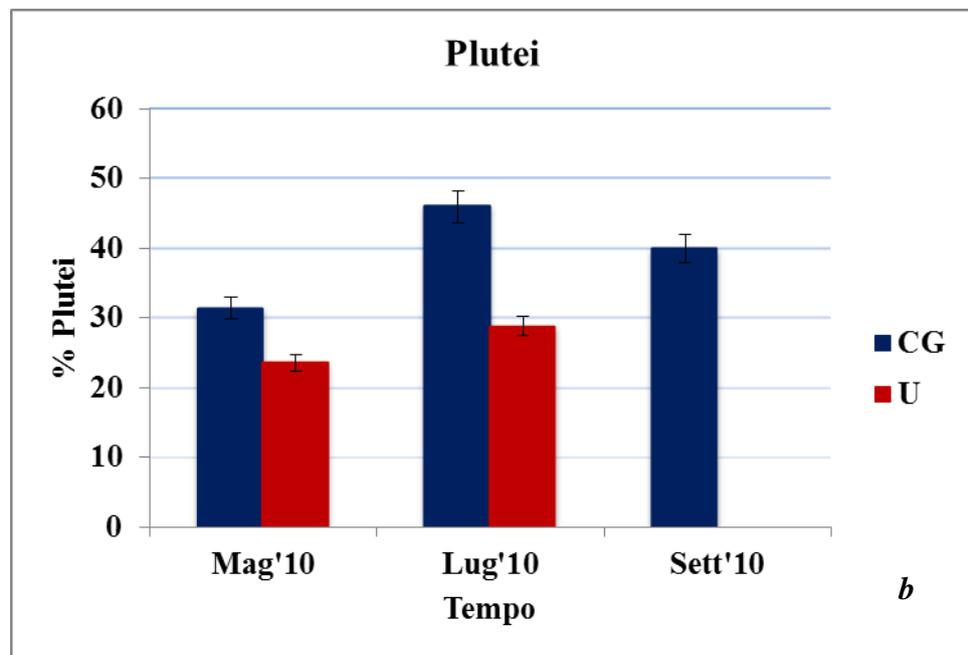
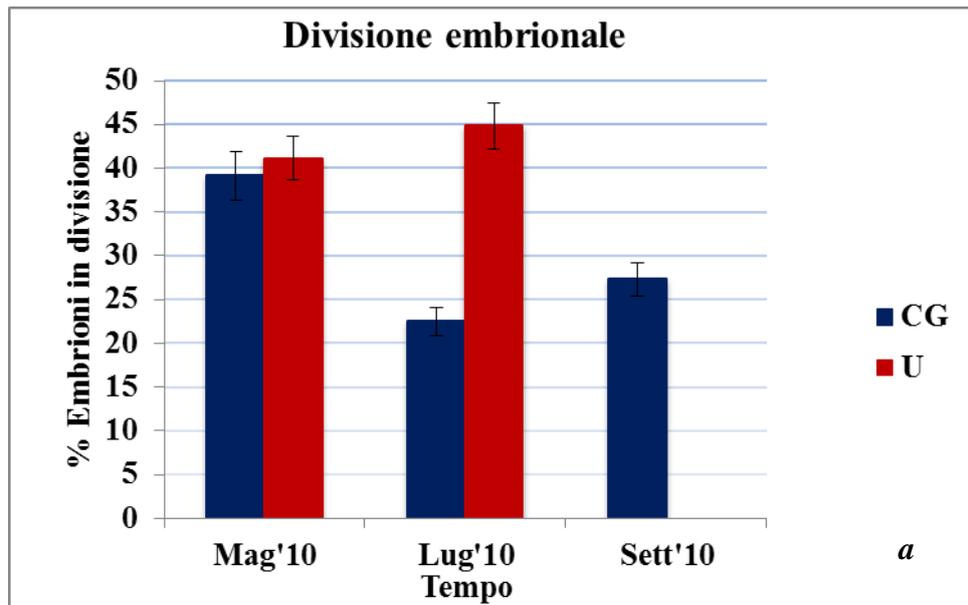


Figura 6.4 Percentuale di embrioni in divisione embrionale (a) e percentuale di plutei (b) di *A. lixula* nei tre tempi e nelle due aree.

Tabella 6.1 ANOVA successo di divisione embrionale in *A. lixula*

| Source | DF | MS | F | <i>P</i> | F versus |
|------------|----|---------|------|---------------|----------|
| Area (Ar) | 1 | 4 | 0 | 0,9674 | ArxTe |
| Tempo (Te) | 2 | 222,4 | 1,18 | 0,4581 | ArxTe |
| ArxTe | 2 | 1880,33 | 9,5 | 0,0006 | RES |
| RES | 30 | 197,84 | | | |
| TOT | 35 | | | | |

Cochran's test = 0,4271 (not significant)

Tabella 6.2 ANOVA sul successo larvale (stadio di pluteo) in *A. lixula*

| Source | DF | MS | F | <i>P</i> | F versus |
|------------|----|-------|-------|---------------|----------|
| Area (Ar) | 1 | 76,72 | 5,07 | 0,1531 | ArxTe |
| Tempo (Te) | 2 | 15,27 | 1,01 | 0,4975 | ArxTe |
| ArxTe | 2 | 15,12 | 13,96 | 0,0001 | RES |
| RES | 30 | 1,08 | | | |
| TOT | 35 | | | | |

Cochran's test = 0,3983 (not significant)

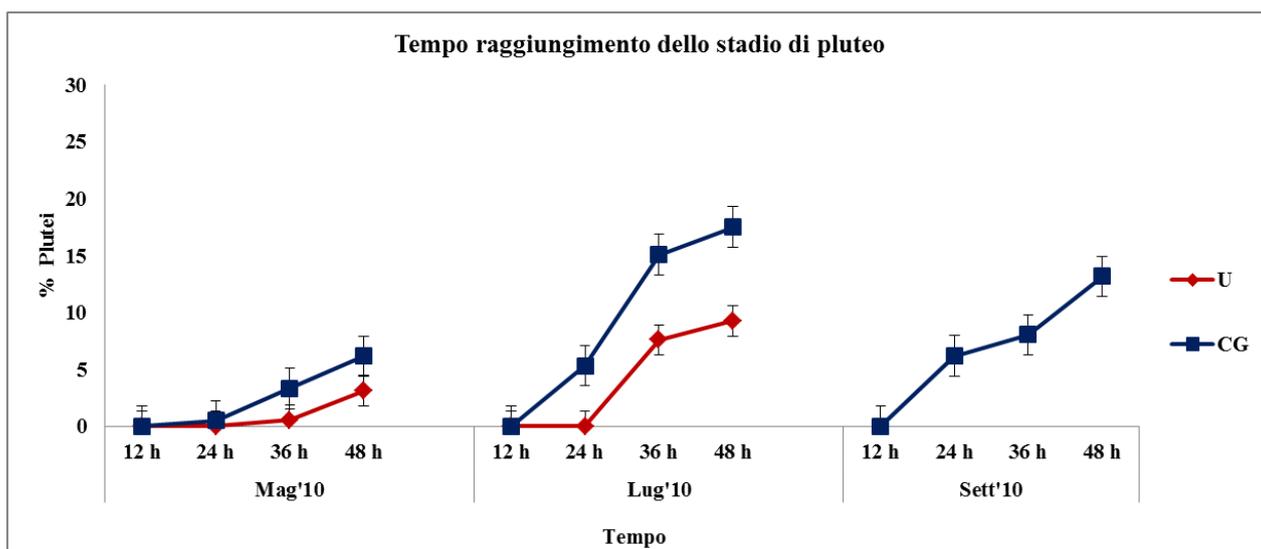


Figura 6.5 Tempo di comparsa dello stadio di pluteo di *A. lixula* durante la stagione riproduttiva nelle due aree di studio, Capo Gallo (CG) e Ustica (U).

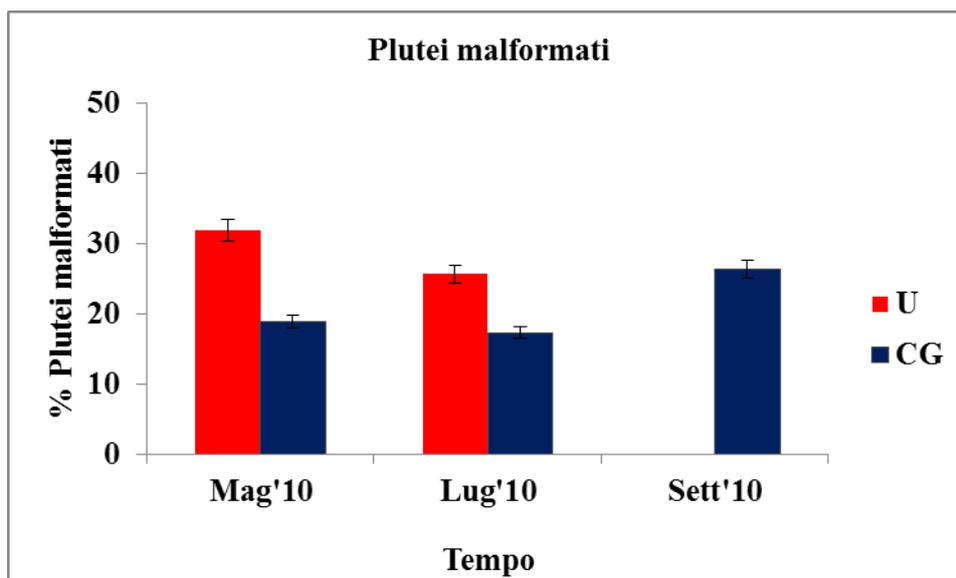


Figura 6.7 Percentuale di plutei malformati rinvenuti nelle due aree durante la stagione riproduttiva.

6.4 Discussione

Il pattern di sviluppo embrionale e larvale di *A. lixula* si è presentato coerente con quello di specie affini (Falugi & Angelini, 2003). Le prime divisioni embrionali sono state infatti, osservate entro le 4h dalla fecondazione e già alle 12h sono stati rinvenuti embrioni in fase di gastrulazione. Le fasi di sviluppo larvale fino allo stadio di pluteo a 4 braccia si sono svolte correttamente dalle 12h in poi per raggiungere lo stadio di pluteo dopo le 36h. Un *trend* assolutamente paragonabile a quello descritto per altri echinidi regolari.

Durante la stagione riproduttiva, da Maggio a Settembre 2010, le due aree hanno mostrato un successo di sviluppo elevato e corretto nelle sue fasi. Tuttavia sono state messe in risalto una serie di differenze quali-quantitative fra le due aree. Ad esempio, il raggiungimento dello stadio di pluteo dei campioni di Ustica è stato osservato con un ritardo di circa 12 ore (36h successive alla fecondazione) rispetto a quelli di Capo Gallo dove lo stadio a pluteo è stato osservato dopo solo 24h. Probabilmente, in accordo a quanto ipotizzato da Bertram & Strathmann, (1998) e Byrne *et al.*, (2009), questo

potrebbe essere spiegato da un possibile stress che i riproduttori provenienti da Ustica subivano durante il trasporto. Altresì, il ritardo nel raggiungimento dello stadio a pluteo, potrebbe essere ricercato ancora una volta nell'energia iniziale dell'embrione, ovvero quella allocata dalla madre al momento della gametogenesi (McEdward & Morgan, 2001). Falugi & Angelini (2003), sottolineano come i tempi di comparsa per ogni stadio di sviluppo siano fortemente influenzati dalle condizioni ambientali in cui questo si realizza e quindi come la disponibilità trofica sia determinante nel successo larvale di questi organismi.

La differenza, in qualità e quantità, di larve ottenute nelle due aree potrebbe quindi essere attribuita ad una differente disponibilità trofica a disposizione dei riproduttori, che va ad inficiare l'energia allocata nei gameti e di conseguenza l'efficienza dello sviluppo.

Anche la variabilità temporale riscontrata fra le due aree durante la stagione riproduttiva, potrebbe essere ricondotta ad una differente disponibilità delle varie risorse trofiche a carattere stagionale.

In conclusione, in entrambe le aree, *A. lixula* presenta un successo di sviluppo embrionale e larvale paragonabile. Sembra essere in grado di portare a termine lo sviluppo, con la stessa efficienza, durante tutti gli eventi di *spawning* considerati, a differenza di quanto ipotizzato da Lo Bianco (1909).

7. Risposte riproduttive di *A. lixula* alle variabili ambientali, aumento della temperatura e acidificazione dell'acqua

7.1 Introduzione

Il ciclo riproduttivo di una specie, ed i meccanismi di fecondazione e di sviluppo embrionale ad esso associati, sono influenzati da una serie di fattori biotici e abiotici ambientali come temperatura, fotoperiodo, idrodinamismo, disponibilità di risorse trofiche, presenza di sostanze tossiche e molti altri ancora, che controllano alcune fasi fondamentali della riproduzione stessa (Grange, 2005; Emlet, 2003; Lamare *et al.*, 2002; Kelly, 2001; Levitan, 1991; Byrne, 1990).

Negli ultimi anni, grande interesse è stato rivolto ai possibili effetti che i cambiamenti climatici possono avere sull'ambiente marino, trovandosi questo sottoposto ad un incremento simultaneo in temperatura e CO₂ (Fabry *et al.*, 2008; Pörtner, 2008).

Gli organismi possono essere condizionati dall'acidificazione oceanica in due modi: attraverso la riduzione del pH dell'acqua o attraverso l'incremento di CO₂ nel sangue definito come *ipercapnia*. Entrambe le risposte esercitano effetti negativi sul metabolismo, sulla biochimica e sulla formazione dello scheletro delle specie marine calcificanti (Byrne *et al.*, 2010; Brennand *et al.*, 2010; Kurihara, 2008; Pörtner, 2008; Widdicombe & Spicer, 2008; Wood *et al.*, 2008; Kurihara & Shirayama, 2004).

La tolleranza ai cambiamenti climatici e ad altri fattori di stress antropogenici, varia notevolmente tra le specie e tra le regioni rendendo difficile poter fare conclusioni su come le comunità marine risponderanno in futuro (Dupont & Thorndyke, 2009; Kurihara, 2008; Pörtner, 2008).

Recenti studi condotti su gameti ed embrioni di invertebrati marini, hanno messo in evidenza come all'acidificazione segue una diminuzione netta del successo di fecondazione, un ritardo nello sviluppo e un progressivo aumento di malformazioni

embrionali, fino ad arrivare alla perdita di massa muscolare o al “nanismo” larvale. Tutte condizioni che portano ad una riduzione nella competizione e di conseguenza ad un’elevata mortalità, compromettendo l’esistenza stessa delle popolazioni adulte e la biodiversità delle comunità bentoniche (Byrne *et al.*, 2010; Brennan *et al.*, 2010; Findlay *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2009; Havenhand *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2008; Shirayama & Thornton, 2005; Kurihara & Shirayama, 2004).

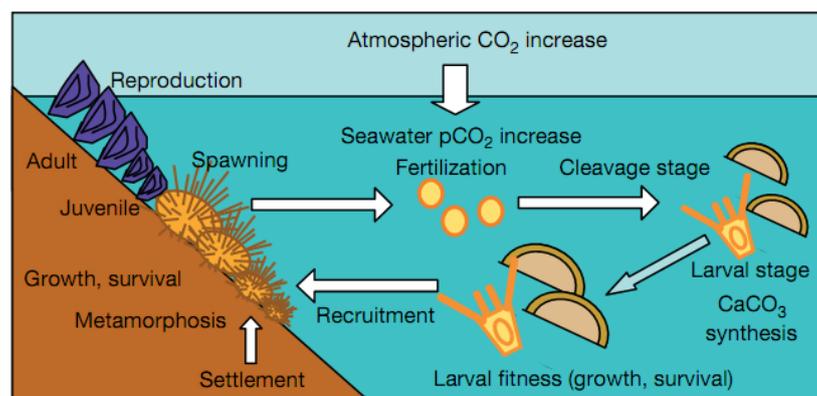


Figura 7.1 Stadi vitali di specie calcificanti bentoniche e possibili influenze dell’acidificazione oceanica (modificata da Kurihara, 2008).

Gli effetti di un incremento dell’acidificazione degli oceani possono essere quindi seguiti e anticipati nello studio dei differenti stadi vitali degli organismi, partendo dai gameti passando per gli stadi embrionali e larvali e arrivando all’insediamento delle nuove generazioni (Kurihara, 2008) (Fig.7.1). La risposta da parte di ogni singolo stadio vitale all’acidificazione dell’ambiente potrebbe avere effetti sulla distribuzione e abbondanza delle specie in un prossimo futuro. In alcuni casi, il possibile effetto negativo sulla fecondazione e contemporaneamente sulla calcificazione in organismi bentonici, potrebbe predire un abbassamento della fitness e un incremento della mortalità delle nuove generazioni, il che farebbe pensare ad una possibile estinzione di alcune specie nel caso in cui queste non fossero in grado di adattarsi rapidamente da un punto di vista evolutivo alle nuove condizioni ambientali. Queste considerazioni portano molti

autori a prevedere un possibile cambiamento nelle comunità bentoniche con la scomparsa di specie dominanti autoctone e comparsa di nuove specie dominanti alloctone (Kurihara, 2008; Fabry *et al.*, 2008; O'Donnell *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 2010).

Ad esempio, risultati controversi si hanno tra le diverse specie di echinidi nelle risposte dei vari stadi vitali e processi riproduttivi alle variazioni climatiche. Questa osservazione non fa che alimentare l'ipotesi che la differente risposta ai cambiamenti climatici all'interno dei singoli *taxa* potrebbe portare ad una rapida evoluzione, e quindi cambiamento, della struttura delle comunità bentoniche essendo gli echinodermi specie chiave negli ecosistemi costieri in gran parte degli oceani e mari. Secondo Byrne *et al.* (2009) non sarebbe il pH ma la temperatura ad influenzare la fecondazione e la sopravvivenza degli embrioni del riccio *Heliocidaris erythrogramma* (Valenciennes, 1846). Brennan *et al.*, (2010) sostengono sia l'esposizione simultanea ad elevate temperature e bassi pH a determinare il "nanismo" larvale del riccio *Tripneustes gratilla* (Linneo, 1758). Kurihara & Shirayama (2004) hanno registrato, in seguito ad aumento di CO₂, fino a raggiungere un pH di 6.6 unità, una netta diminuzione delle dimensioni nelle larve di *Echinometra mathaei* (De Blainville, 1825) e di *Hemicentrotus pulcherrimus* (Agassiz, 1863). Numerosi autori (Clark *et al.*, 2009; Carr *et al.*, 2006; Kurihara & Shirayama, 2004) sottolineano come effetti negativi sui tassi di sviluppo e crescita si avrebbero, in differenti specie di echinodermi, e di molluschi, solo a pH <7.00, e non per i valori di pH previsti dagli scenari considerati nell'"Intergovernmental Panel on Climate Change" (IPCC) 2007.

Gli scenari dell' IPCC sono stati costruiti secondo l'ipotesi che nei prossimi 100 anni l'arricchimento in CO₂ nell'ambiente rimarrà costante, presupposto ad oggi al centro di dibattiti internazionali. Gli scenari IPCC mostrano nei prossimi 100 anni un aumento

della temperatura dai 4 ai 6°C e un decremento dei valori di pH pari a 0,3-0,4 unità rispetto a quello odierno.

Alla luce delle previsioni e dei primi studi sugli effetti di queste variabili sulle larve, potrebbe essere già l'incremento di +4°C della temperatura (IPCC, 2007) a controllare il ritmo dello sviluppo negli invertebrati marini, portando ad un bilancio tra facilitazione (crescita più rapida e incremento nelle dimensioni larvali) e rallentamento e completo fallimento dell'embriogenesi ai limiti termici più alti (Brennand *et al.*, 2010).

Diversi autori hanno ipotizzato, come gli embrioni potrebbero essere maggiormente vulnerabili al riscaldamento e quindi essere influenzati maggiormente dalla variazione di temperatura e non da un'acidificazione. Mentre solo le larve di specie calcificanti marine mostrerebbero effetti deleteri dovuti all'aumento di CO₂ e quindi ad un'acidificazione drastica dell'ambiente nel quale avviene lo sviluppo e l'accrescimento del nuovo organismo (Brennand *et al.*, 2010; Byrne, 2010; Byrne *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2009; Kurihara, 2008; Kurihara & Shirayama, 2004) (Fig.7.2).

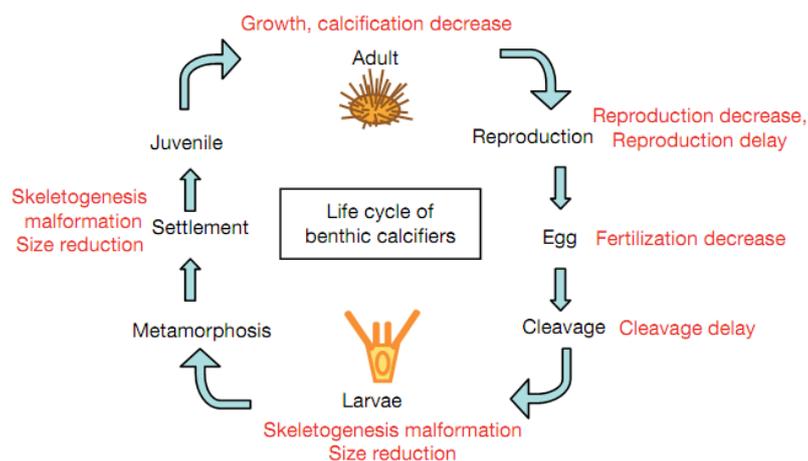


Figura 7.2 Impatti della CO₂ a differenti stadi vitali di specie calcificanti bentoniche secondo le concentrazioni proposte per gli scenari climatici futuri (380~2000 µatm P_{CO2}/pH 8.2~7.3) (adattata da Kurihara, 2008).

In particolare quindi si aspettano impatti negativi sugli organismi calcificanti (echinodermi, molluschi, policheti, briozoi, foraminiferi, alghe) che potrebbero quindi

avere implicazioni di vasta portata sulla biodiversità e la salute globale degli oceani (Brennand *et al.*, 2010; Uthicke *et al.*, 2009; Kurihara, 2008; Pörtner, 2008).

La prevista riduzione della saturazione di CaCO₃ rappresenta una sfida importante per gli organismi calcificanti nella produzione dei loro scheletri. Larve con scheletri fragili potrebbero essere l'anello debole della popolazione, compromettendo il successo di reclutamento e quindi la persistenza delle popolazioni adulte della stessa specie (Uthicke *et al.*, 2009).

Nonostante la ben documentata influenza della temperatura sullo sviluppo e le soglie termiche mostrate dagli embrioni, le ricerche sugli effetti dei cambiamenti climatici sugli stadi vitali degli organismi marini, si sono maggiormente concentrate sull'impatto dell'acidificazione e dell'ipercapnia come unica fonte di stress (Clark *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2008; Carr *et al.*, 2006; Kurihara & Shirayama., 2004), non indagando invece, sugli effetti interattivi dovuti all'incremento della temperatura e all'acidificazione sullo sviluppo larvale.

Parker *et al.* (2010) affrontando uno studio sugli effetti di acidificazione (da pH 8.1 a 7.8) e aumento della temperatura (da 18 a 30°C) su due molluschi bivalvi, *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) specie nativa delle coste australiane e *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) specie del Pacifico, trovano che entrambe le specie rispondono allo stress con una netta riduzione della fecondazione, dello sviluppo e con un progressivo incremento delle malformazioni associate allo stadio larvale con conseguente incremento della mortalità. Ma sottolineano come l'impatto più forte lo subisce la specie nativa *S. glomerata*, questo potrebbe portare, a detta degli autori, ad una progressiva scomparsa della specie nativa a favore dell'insediamento della specie pacifica *C. gigas* causando a lungo termine uno *shift* nella struttura della comunità bentonica associata alle coste australiane.

Questi dati, ci indicano come la variazione di questi due fattori abiotici possano influenzare in misura differente lo sviluppo larvale delle varie specie marine portando in alcuni casi all'aumento di competizione interspecifica e ad un possibile *shift* delle comunità così come le conosciamo oggi.

Pertanto, le informazioni sulle fasi di riproduttive e di sviluppo di una specie saranno essenziali per comprendere la resistenza e la resilienza delle singole specie in risposta alle variazioni ambientali, naturali e/o di natura antropica (Grange, 2005).

Obiettivo del presente studio è quello di interpretare gli effetti, negativi e/o positivi, dei cambiamenti climatici, aumento progressivo della temperatura e acidificazione dell'acqua, su una specie *A. lixula* considerata fortemente termofila e in espansione in Mediterraneo.

Obiettivi principali di questa fase della ricerca sono stati:

1- Valutare i possibili effetti della variazione di temperatura e pH sul successo riproduttivo (successo di fecondazione, successo di sviluppo embrionale e larvale) di *A. lixula*.

2- Valutare i possibili effetti della variazione di temperatura e pH sulla morfologia larvale di *A. lixula*.

7.2 Materiali e metodi

7.2.1 Allestimento delle colture sperimentali

Per gli esperimenti manipolativi è stata allestita una camera termostata dove mantenere le colture. Per il mantenimento della temperatura all'interno di ciascun becher (ad eccezione degli esperimenti con temperatura dei 20 e 24°C, per i quali è bastato settare la camera termostata), è stato inserito un termoriscaldatore automatico da 25 Watt con range di temperatura dai 18°C ai 32°C.

Per quanto riguarda l'impianto base di distribuzione della CO₂, è stato realizzato un sistema in serie utilizzando: una bombola ricaricabile da 1.5l di CO₂ gassosa, dotata di manometro e di valvola di non-ritorno incorporata a dei rubinetti con valvole in serie a 2 vie, di cui ogni via regolabile separatamente infine un diffusore di CO₂, con disco in ceramica di diametro 26 mm, veniva inserito in ciascuna coltura. Preparato l'ambiente per gli esperimenti manipolativi, si proseguiva con la manipolazione in temperatura e pH dell'acqua per le colture. I becher per tutti i set sperimentali, venivano riempiti con 900 ml di FSW e dopo aver settato il termoriscaldatore alla temperatura prescelta, si attendeva che questa venisse raggiunta, monitorandola con l'ausilio di un termometro digitale.

Le temperature scelte sono state quelle basate sull'IPPC (2007), in particolare sulle previsioni date dallo scenario per il Mediterraneo, di +4/+6°C di aumento nei prossimi 100 anni.

Si procedeva quindi con la misurazione del pH in ciascun becher, utilizzando il pHmetro *Crison GLP21* e, grazie all'immissione di bolle di CO₂ gassosa il pH veniva quindi diminuito di ~0.3 unità. Il pH misurato durante l'esperimento controllo dei 20°C, in accordo a quanto notato da Byrne *et al.*,(2009), non cambiava tra le 5 e le 20h.

Questo ci ha permesso di immettere le bolle di CO₂ soltanto all'inizio dell'esperimento senza bisogno di mantenere un flusso continuo nelle 48h evitando che si potesse avere narcosi sulle uova ed embrioni, compromettendo la riuscita degli stessi esperimenti.

In accordo con Strathmann (1992), i livelli di ossigeno erano mantenuti ottimali grazie al movimento in continuo dell'acqua dato da pale rotanti collegate a motorini indipendenti per ciascuna coltura.

Inoltre, in accordo a Kurihara & Shirayama (2004), veniva realizzato per ogni temperatura sperimentale un ulteriore set di controllo con FSW tamponata con HCl a pH neutro 8.0, in modo da avere un controllo interno all'esperimento.

Dopo aver preparato l'ambiente di coltura, venivano immesse in ciascun becher la soluzione stock di uova, ad una concentrazione di 5×10^4 uova per litro ovvero (~ 50 uova per ml^{-1}).

Tabella 7.1 Temperatura (T) e pH considerati come trattamenti sperimentali.

| T | 20°C | | | 24°C | | | 26°C | | | 27°C | | |
|----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|
| pH | 8.1 | 8.0 | 7.8 | 8.1 | 8.0 | 7.8 | 8.1 | 8.0 | 7.8 | 8.1 | 8.0 | 7.8 |

In accordo con Byrne *et al.*, (2009), entrambi i gameti prima della fecondazione venivano pre-incubati nell'acqua "sperimentale", in modo da consentirne l'acclimatazione.

Per essere quindi sicuri che le condizioni fossero appropriate e le uova integre, si attendevano ~ 10 -15 minuti prima di aggiungere lo sperma.

Gli embrioni sono stati quindi allevati in FSW sperimentale a quattro livelli di temperatura (controllo=20°C, 24°C, 26°C e 27°C) e ai tre livelli di pH (controllo non manipolato naturale (N) ≈ 8.1 , neutro=8.0, e acido -0.3 unità rispetto al controllo con $\text{CO}_2 \approx 7.8$) (Tab. 7.1).

Temperatura e pH, in tutti i livelli, venivano monitorati ad ogni *end-point* (2h-4h-12h-24h-36h-48h) (Tab. 7.2) e ogni 6h. Ad ogni *end-point* veniva prelevato, da ogni coltura 1ml di campione e fissato in formaldeide al 10% per le analisi biologiche.

Tabella 7.2 Medie di temperature e pH nei trattamenti alla fine degli esperimenti (48h). Il valore in parentesi è l'errore standard, con $n=30$.

| Temperatura (°C) | pH (Naturale) 8.1 | pH (Neutro) 8.0 | pH (CO ₂) 7.80 |
|------------------|-------------------|-----------------|----------------------------|
| 20 | 8.12 (0.01) | 8.16 (0.01) | 7.89 (0.01) |
| 24 | 8.15 (0.01) | 8.00(0.03) | 7.86 (0.02) |
| 26 | 8.16 (0.01) | 8.11 (0.01) | 7.97 (0.02) |
| 27 | 7.92 (0.03) | 7.85 (0.02) | 7.65 (0.04) |

7.2.2 Disegno sperimentale

Valutazione del successo di fecondazione e di sviluppo di *A. lixula* in differenti condizioni di temperatura e pH

Numerosi studi hanno fornito dati sull'influenza della temperatura o del pH, sulla fecondazione e sullo sviluppo degli echinodermi considerati specie indicatrici (Kurihara & Shirayama, 2004; Pörtner *et al.*, 2005; Carr *et al.*, 2006; Dupont *et al.*, 2008; Havenhand *et al.*, 2008), ma pochi sono i dati pubblicati sulla possibile interazione di questi due fattori. Questi dati, nell'ottica delle previsioni future sui cambiamenti climatici globali sono di fondamentale importanza per la comprensione delle possibili risposte delle popolazioni marine.

Per verificare le possibili influenze di queste due variabili ambientali sull'echinide *A. lixula*, è stato realizzato un esperimento manipolativo, in cui sono stati indagati i possibili effetti interattivi tra pH e temperatura su: (a) successo di fecondazione, (b) successo di divisione fino allo stadio di gastrula, (c) successo embrionale sino allo stadio di pluteo (Fig. 7.3).

In particolare, è stato ipotizzato che: (1) l'aumento della temperatura favorisce lo sviluppo embrionale e che (2) la riduzione del pH diminuisce il successo di fecondazione e di sviluppo.

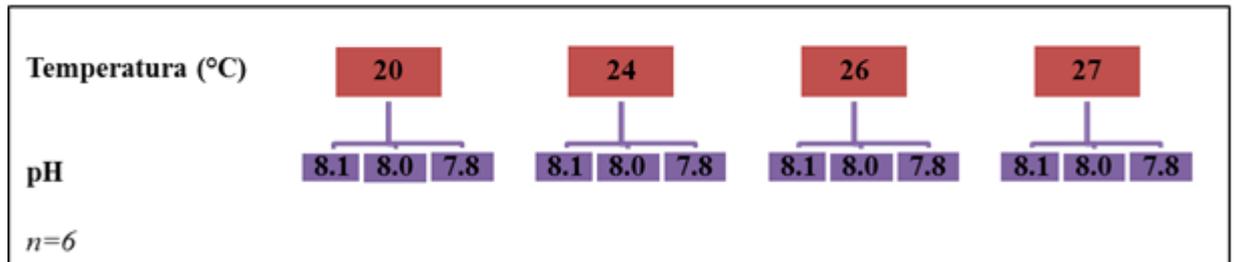


Figura 7.3 Disegno sperimentale utilizzato per la valutazione degli effetti di temperatura e pH sul successo di fecondazione, divisione e sviluppo larvale di *A. lixula*.

Analisi morfometrica delle larve di *A. lixula* poste in differenti condizioni di temperatura e pH

Secondo Brennan *et al.*, (2010) l'esposizione simultanea ad elevate temperature e bassi pH determina "nanismo" larvale nel riccio *Tripneustes gratilla* (Linneo, 1758). Numerosi autori (Clark *et al.*, 2009; Carr *et al.*, 2006; Kurihara & Shirayama, 2004) sottolineano come questi effetti si avrebbero, in differenti specie di echinodermi e di molluschi, solo a pH al di sotto delle 7 unità, e non ai pH previsti dagli scenari considerati nell'IPCC (2007).

Quindi, sono stati valutati i possibili effetti di tali fattori (Fig. 7.5) sulla morfologia larvale, utilizzando come variabili: (a) la media della lunghezza totale delle braccia (*overall length*, OL), (b) la media della lunghezza delle braccia post-orali (*postoral length*, PL) e (c) la lunghezza del corpo delle larve a stadio di pluteo (*body length*, BL).

È stata posta maggiore attenzione alla fase larvale, poiché questa produce uno scheletro fragile di calcite e in quanto rappresenta un periodo di vita planctonica dove la chimica dell'acqua e la temperatura giocano un maggiore impatto sullo sviluppo. Gli echino-plutei, infatti, producono aste in calcite che supportano il loro corpo e svolgono la

funzione di nuoto e ricerca del cibo. La lunghezza delle braccia e quindi la crescita delle aste in calcite, ha un'influenza diretta sull'efficienza di cattura del cibo e sulla vulnerabilità alla predazione (Emlet, 2003).

È stato ipotizzato che l'interazione tra i due fattori, temperatura e pH, potesse influenzare negativamente la morfologia delle larve di *A. lixula*.

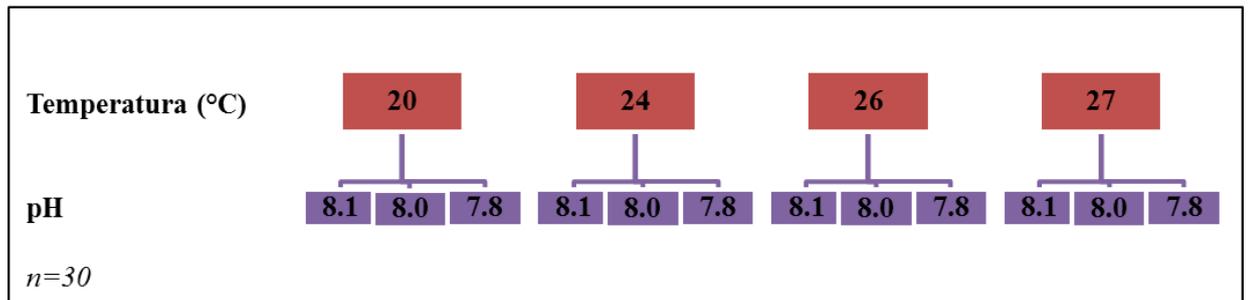


Figura 7.4 Disegno sperimentale utilizzato per la valutazione degli effetti di temperatura e pH sulle tre misure morfometriche larvali, OL, BL e PL (Fig.5.5) di *A. lixula*.

In accordo a Brennan *et al.*, (2010) e Kurihara & Shirayama, (2004), per stimare la crescita larvale in relazione ai fattori temperatura e pH, abbiamo valutato la morfologia della larva a stadio di pluteo.

La crescita larvale è stata valutata per le temperature di 20°C, 24°C e 26°C.

Le colture sperimentali a 27°C sono state escluse da tale analisi in seguito all'elevata mortalità registrata.

Dal campione delle 48h (stadio a pluteo), per ogni combinazione di trattamento sperimentale, sono stati scelti in modo casuale i plutei, posizionati di piatto sul piano di messa a fuoco e fotografati con l'ausilio di una macchina fotografica digitale (CAMEDIA C30330 Zoom, 3,3 megapixel) montata su un microscopio (Olympus BX50) ad ingrandimento 10X. Le immagini così scattate sono state successivamente acquisite sul computer (CAMEDIA MASTER 2.0) e analizzate.

Per ciascuna coltura, 30 plutei di *A. lixula*, sono stati misurati, utilizzando il *software* di analisi di immagine *ImageJ* (NIH, USA), per un totale di 270 larve (30 larve x 3 Temperature x 3 pH).

Per ogni larva sono state misurate la lunghezza totale delle 2 braccia (OL= *overall length*), la lunghezza delle braccia post-orali (PL= *postoral length*), e la lunghezza del corpo (BL= *body length*), considerandola come *midline*, ovvero la misura della lunghezza in verticale del corpo del pluteo, che non comprende le braccia antero-laterali (Fig.5.5).

Per le successive analisi statistiche sono state utilizzate per OL e PL le misure medie ottenute dalla misurazione per ambo i lati di queste.

Un altro indice per valutare il possibile effetto del pH sullo sviluppo della larva proposto da Brennand *et al.* (2010) è l'asimmetria larvale calcolata come la differenza fra le braccia postorali della larva.

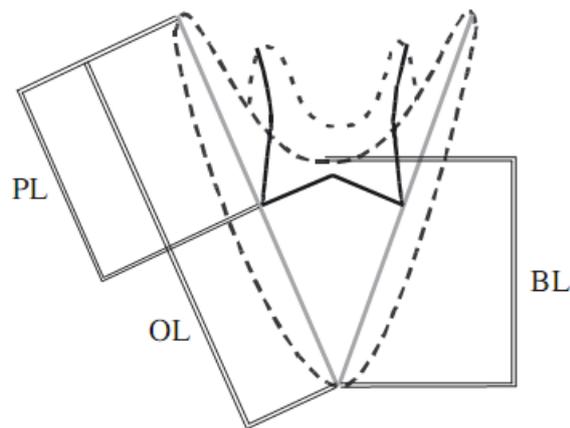


Figura 7.5 Le tre misure morfometriche dello stadio di pluteo a 4 braccia: lunghezza totale (OL), lunghezza delle braccia post-orali (PL) e lunghezza del corpo (BL). (Kurihara & Shirayama, 2004).

7.3 Risultati

7.3.1 Valutazione del successo di fecondazione, sviluppo embrionale e larvale di *A. lixula* in differenti condizioni di temperatura e pH

Attraverso gli esperimenti manipolativi è stato possibile valutare: (a) il successo di fecondazione, espresso come percentuale di uova fecondate; (b) il successo di divisione embrionale, come percentuale di embrioni in divisione fino allo stadio di gastrula; (c) il successo larvale, come percentuale di plutei ottenuti nelle 48h di mantenimento.

Dai risultati ottenuti, il successo di fecondazione e di divisione hanno presentato una differenza statisticamente significativa unicamente per il fattore temperatura (Tab.7.3).

La percentuale di fecondazione si è mantenuta al di sotto del 50% in tutti i trattamenti con un leggero decremento soltanto alle temperature più alte (Fig.7.6).

La fecondazione si è mantenuta infatti elevata anche alla temperatura di 26°C (%media±SE : 31.44±6.19, $n=6$) se paragonata alla temperatura di controllo dei 20°C (%media±SE: 39.83±3.03, $n=6$), mentre le percentuali precipitavano alla temperatura dei 27°C (%media±SE: 1.22±0.54, $n=6$).

Tabella 7.3 ANOVA sul successo di fecondazione e divisione embrionale di *A. lixula* a differenti condizioni di temperatura e pH

| Variable | Source | SS | DF | MS | F | p | F versus |
|----------|--------|----------|----|---------|-------|--------------|----------|
| %Fec | Temp | 16023.02 | 3 | 5341.00 | 15,3 | 0,001 | RES |
| | pH | 90.75 | 2 | 45.37 | 0,13 | 0,8783 | RES |
| | TexpH | 367.13 | 6 | 61.18 | 0,18 | 0,9825 | RES |
| | RES | 20942.67 | 60 | 349.04 | | | |
| | TOT | 37423.57 | 71 | | | | |
| %Div | Temp | 14379.94 | 3 | 4793.31 | 60,47 | 0,001 | RES |
| | pH | 243.61 | 2 | 121.80 | 1,54 | 0,2235 | RES |
| | TexpH | 77.64 | 6 | 12.94 | 0,16 | 0,9855 | RES |
| | RES | 4756.33 | 60 | 79.27 | | | |
| | TOT | 19457.53 | 71 | | | | |

Cochran's test: Fec=0,2422; Div=0,2919 (not significant)

Il test SNK *a postertiori*, hanno messo in evidenza come la fecondazione e la percentuale di embrioni erano significativamente più basse alle temperature più elevate (20>24>26>27°C).

Per quanto riguarda invece il successo larvale, dai risultati dell'ANOVA è risultata una differenza significativa sia per il fattore temperatura che per il fattore pH (Temperatura $F_{3,60}=43.44$, $p<0.001$, pH $F_{2,60}=5.17$, $p<0.0085$), mentre nessuna interazione tra i fattori è stata evidenziata ($F_{6,60}=1.47$, $p=0.20$).

L'analisi *a posteriori* rivela che la percentuale di plutei è maggiore alla temperatura dei 24°C rispetto a tutte le altre temperature (24>26=20>27°C) (Fig.7.7).

Nel caso del pH nessuna differenza è stata riscontrata nei trattamenti controllo e neutro, mentre risulta tra quest'ultimi e il trattamento con CO₂ (pH 8.1=pH 8.0 > pH 7.8).

Tabella 7.4 ANOVA sul successo larvale di *A.lixula* a differenti condizioni di temperatura e pH

| Variabile | Source | SS | DF | MS | F | p | F versus |
|-----------|---------|----------|----|-----------|-------|--------|----------|
| %Plutei | Te | 13395,43 | 3 | 4465,1438 | 43,44 | 0 | RES |
| | ph | 1061,882 | 2 | 530,9412 | 5,17 | 0,0085 | RES |
| | Texph | 907,764 | 6 | 151,294 | 1,47 | 0,2033 | RES |
| | RES | 6167,624 | 60 | 102,7937 | | | |
| TOT | 21532,7 | 71 | | | | | |

Cochran's test= 0,2328 (not significant)

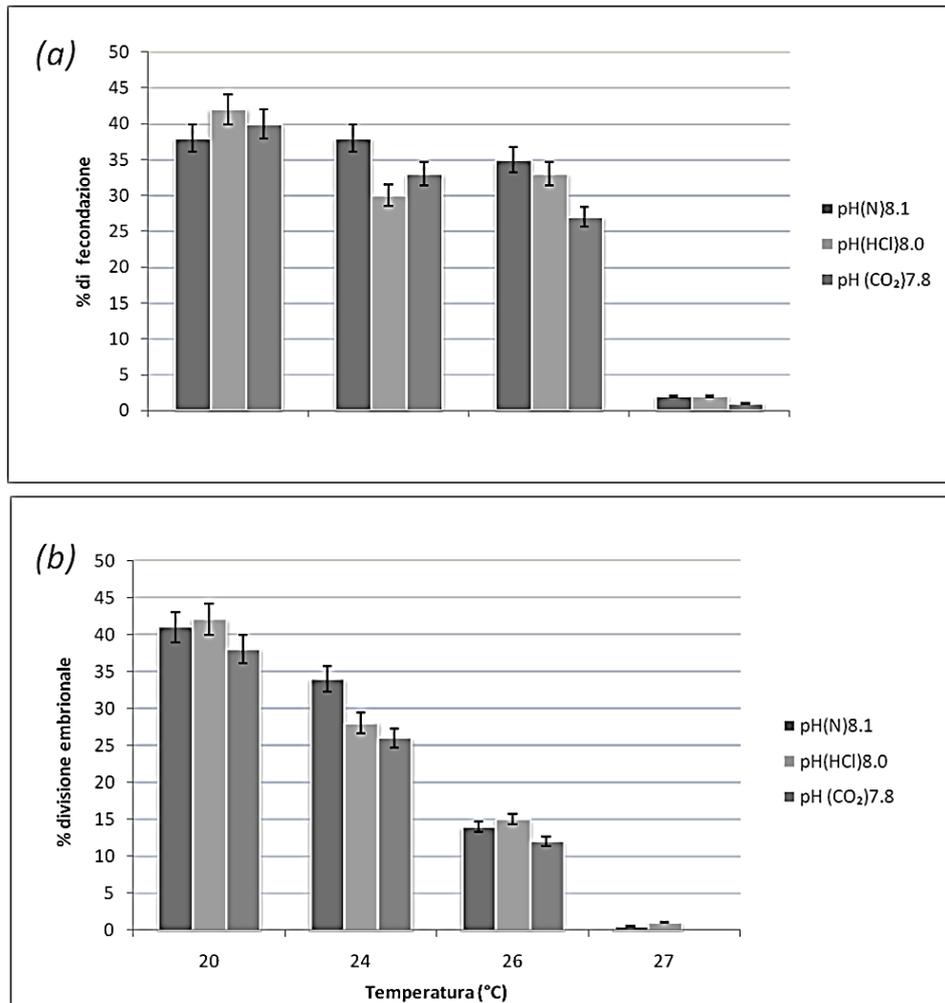


Figura 7.6 Percentuale (A) di fecondazione e (B) di divisione embrionale di *A. lixula* a differenti trattamenti sperimentali di temperatura e pH. Il trattamento 20°C pH 8.1 rappresenta il controllo.

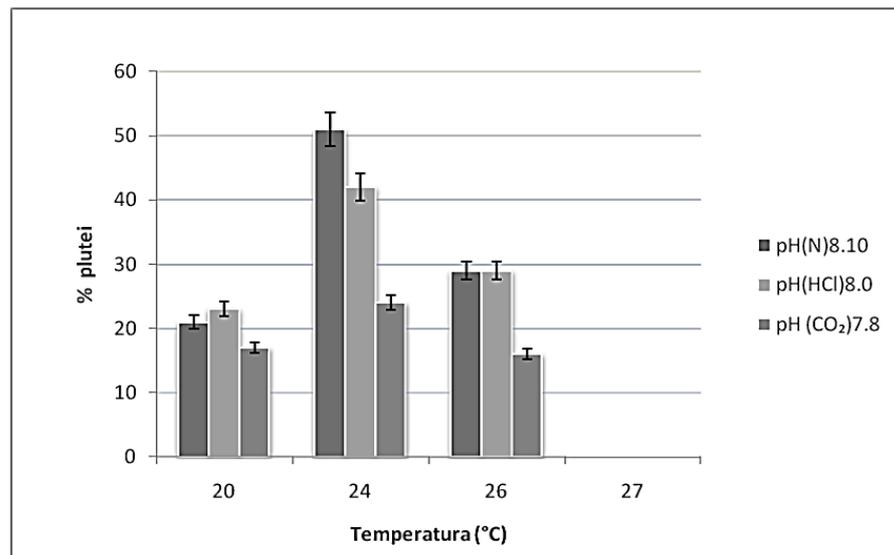


Figura 7.7 Percentuale di plutei di *A. lixula* a differenti trattamenti sperimentali di temperatura e pH. Il trattamento 20°C pH 8.1 rappresenta il controllo.

7.3.2 Effetti della variazione di temperatura e pH sulla morfologia delle larve di *A. lixula*

Dalle analisi sulle misure morfometriche larvali è risultato che in generale tutte le misure sono incrementate significativamente con l'aumento della temperatura (temperatura, $p < 0.0001$) (Tab. 7.4).

La lunghezza totale delle braccia OL era maggiore per i trattamenti $+4^{\circ}\text{C}$ (24°C) rispetto ai trattamenti $+6^{\circ}\text{C}$ (26°C) e a quelli di controllo (20°C), $229.09 \mu\text{m}$ ($\pm\text{SE}=4.22$, $n=90$), $206.47 \mu\text{m}$ ($\pm\text{SE}=3.97$, $n=90$) e $153.99 \mu\text{m}$ ($\pm\text{SE}=2.62$, $n=90$) rispettivamente.

Per quanto riguarda le lunghezze medie delle braccia post-orali PL (media \pm SE: (26°C) $129.02 \pm 2.23 \mu\text{m}$; (24°C) 117.74 ± 2.00 ; (20°C) 102.12 ± 2.08 , $n=90$) e del corpo BL (media \pm SE: (26°C) 129.23 ± 2.23 ; (24°C) 117.97 ± 2.00 ; (20°C) 102.27 ± 2.08 , $n=90$), risultavano invece maggiori alla temperatura di $+6^{\circ}\text{C}$ rispetto ai $+4^{\circ}\text{C}$ e al controllo.

Dall'ANOVA effettuata singolarmente per ciascuna misura, nessuna differenza è stata riscontrata per il fattore pH, mentre si è avuta una significatività per l'interazione $T \times \text{pH}$ (Tab. 7.4).

I test SNK *a posteriori* hanno evidenziato per l'interazione tra temperatura e pH, sulle misure PL e BL, che nel trattamento a temperatura di 26°C e pH 7.8 vi era un decremento rispetto al pH naturale (8.1) di controllo (Tab. 7.5).

In generale per le tre misure morfometriche delle larve, si è osservato un incremento significativo rispetto all'aumento della temperatura, ma nessuna significatività a carico della variazione del pH.

Tabella 7.5 ANOVA sulla morfometria larvale: lunghezza totale delle braccia (OL), lunghezza delle braccia post-orali (PL), e lunghezza del corpo (BL) delle larve di *Arbacia lixula* allevate in trattamenti di temperatura (temp) e pH (come fattori fissi) e test *post hoc* di Student-Newman-Keuls (SNK).

| Parametro | Source | df | MS | F | p | SNK |
|-----------|-----------|-----|----------|--------|---------------|------------|
| OL | Temp | 2 | 133607.4 | 115.39 | 0.0001 | 24>26>20°C |
| | pH | 2 | 242.0568 | 0.21 | 0.8115 | |
| | Temp x pH | 4 | 5413.993 | 4.68 | 0.0012 | |
| | Residui | 261 | | | | |
| | Totale | 269 | | | | |
| PL | Temp | 2 | 16424.21 | 42.41 | 0.0001 | 26>24>20°C |
| | pH | 2 | 970.492 | 2.51 | 0.0835 | |
| | Temp x pH | 4 | 946.7111 | 2.44 | 0.047 | |
| | Residui | 261 | | | | |
| | Totale | 269 | | | | |
| BL | Temp | 2 | 16493.78 | 42.5 | 0.0001 | 26>24>20°C |
| | pH | 2 | 970.06 | 2.5 | 0.0841 | |
| | Temp x pH | 4 | 951.1391 | 2.45 | 0.0465 | |
| | Residui | 261 | | | | |
| | Totale | 269 | | | | |

Cochran's test: OL=0,1638; PL=0,1753; BL=0,1754 (not significant)

L'effetto della diminuzione del pH, si presenta invece, solo come interazione alla temperatura più alta (26°C), dove si osserva una diminuzione delle dimensioni dell'intero corpo (BL), nonché un accorciamento della lunghezza delle braccia post-orali (PO) della larva (Fig.7.8 e 7.9).

Infine, la valutazione dell'indice di asimmetria larvale nei trattamenti di temperatura e pH, non mette in evidenza alcuna influenza significativa da parte di ciascun fattore, come dimostrano i risultati dell'ANOVA (Temperatura e pH fissi) (Tab.7.6).

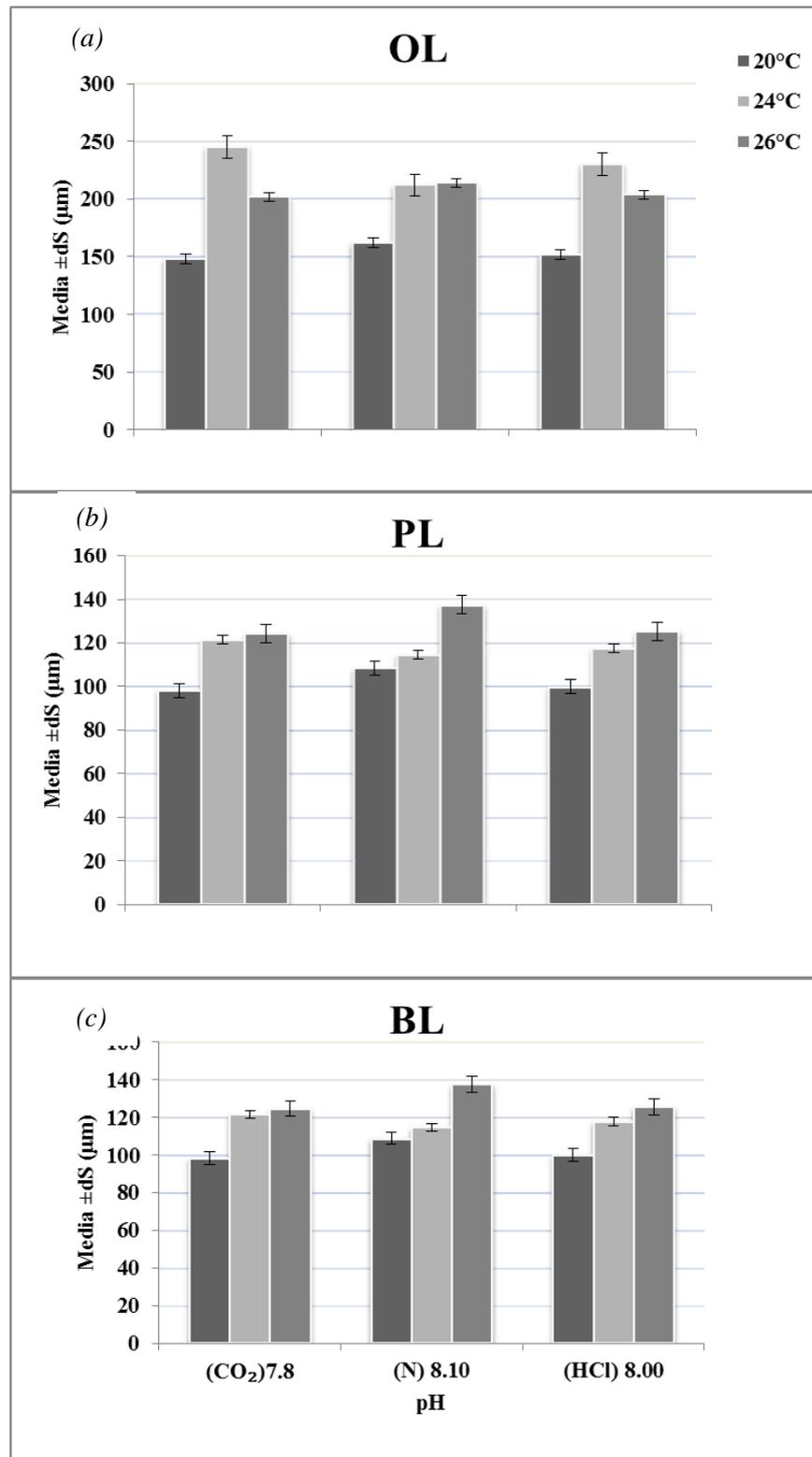


Figura 7.8 Misure morfometriche larvali di *A. lixula* nei diversi trattamenti sperimentali di temperatura e pH: (a) Lunghezza totale; (b) Lunghezza braccia postorali; (c) Lunghezza del corpo.

Tabella 7.6 ANOVA per l'Asimmetria delle larve di *A. lixula* in differenti condizioni di temperatura e pH.

| Variabile | Source | DF | MS | F | <i>p</i> |
|-----------|--------|-----|--------|------|----------|
| Asimm. | Te | 2 | 6,7413 | 3,59 | 0,0288 |
| | ph | 2 | 1,5778 | 0,84 | 0,4323 |
| | TeXph | 4 | 2,3151 | 1,23 | 0,2967 |
| | RES | 261 | 1,8755 | | |
| TOT | | 269 | | | |

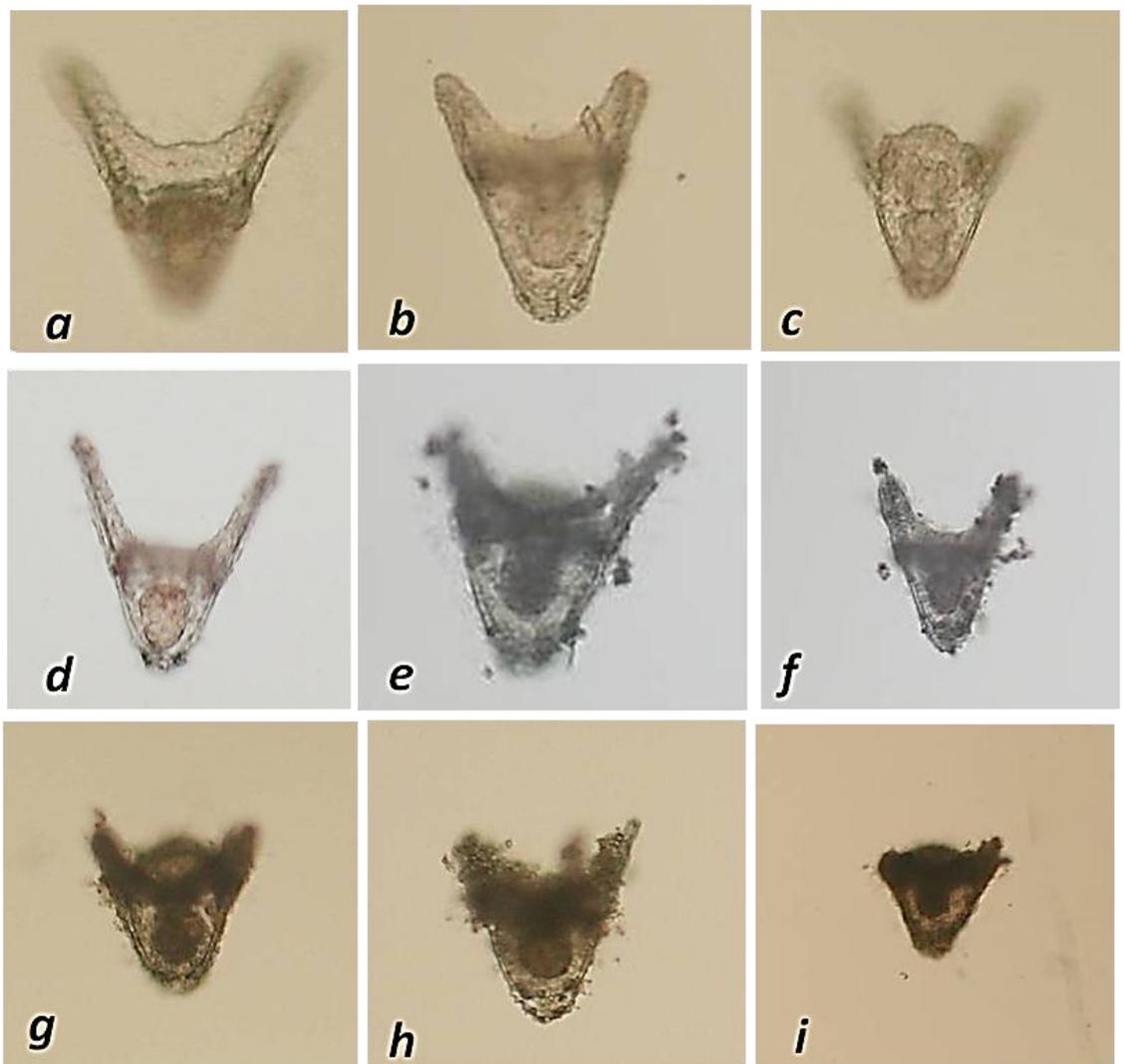


Figura 7.9 Plutei di *A. lixula* allevati per 48h a differenti temperature e pH. (a-b-c): plutei alla temperatura dei 20°C a pH 8.1, pH 7.8 e pH 8.0 rispettivamente; (d-e-f) 24°C nei 3 trattamenti di pH; (g-h-i) 26°C nei 3 trattamenti di pH.

7.4 Discussione

7.4.1 Risposta del successo di fecondazione, sviluppo embrionale e larvale di *A. lixula* a differenti condizioni di temperatura e pH

La temperatura, fattore ambientale più importante nel controllare le popolazioni marine, è stata oggetto di numerosi studi fisiologici, fenologici e di distribuzione di molte specie marine (Olive, 1995; Bhaud, 1995; Przeslawski *et al.*, 2008; Byrne *et al.* 2009). La tolleranza termica è assolutamente una caratteristica peculiare di ciascuna specie e spesso specie affini rispondono in modo differente alle variazioni termiche. Tassi di sviluppo e crescita sono fortemente e positivamente legati alla temperatura (Retzel *et al.*, 2004). In generale questi due parametri incrementano all'aumentare della temperatura, e l'incremento dipenderà anche dalla portata e durata della sollecitazione termica che verrà controllata dai meccanismi fisiologici che ne determineranno il range di sopportabilità nei vari stadi vitali (Przeslawski *et al.*, 2008). Per la maggior parte degli organismi marini la temperatura dell'acqua, ovvero del loro ambiente vitale, è in grado di regolare la maggior parte degli eventi cruciali della life history ed in particolare i momenti riproduttivi e le fasi di sviluppo e crescita larvale (Johnson & Babcock, 2004).

Recentemente, oltre alla temperatura, ci si è interessati alla possibile influenza dell'acidificazione dell'acqua, che in qualche modo potrebbe influenzare direttamente i pattern di distribuzione e di sopravvivenza di differenti specie sia animali che vegetali (Fabry *et al.*, 2008; Thomas, 2006). L'incremento del diossido di carbonio nell'acqua potrebbe ridurre i tassi metabolici di molti organismi soprattutto il tasso di respirazione influenzando potenzialmente le attività di nutrimento, crescita e riproduzione (Portner *et al.*, 2005). Inoltre la riduzione del tasso di calcificazione porterebbe ad una diminuzione dei tassi di sviluppo delle larve, all'incremento di malformazioni larvali e quindi ad un incremento del tasso di mortalità delle nuove generazioni.

I risultati ottenuti in questo lavoro, mostrano come la fecondazione e la prima divisione embrionale di *A. lixula*, siano maggiormente influenzate dalla temperatura, indipendentemente dal pH considerato, anche se il successo di fecondazione si mantiene pressoché costante in tutti i livelli sperimentali.

Come riportato in diversi studi su una varietà di ricci marini tropicali e temperati, riguardo la termotolleranza come unico fattore di stress (Fujisawa, 1995; Olive, 1995), probabilmente anche per *A. lixula* la fecondazione e le prime divisioni embrionali possono considerarsi variabili resistenti all'incremento della temperatura e non influenzate dall'acidificazione fino a valori di pH 7.8.

Una prima possibile spiegazione potrebbe essere ricercata nell'attività spermatica.

Lo sperma all'interno delle gonadi viene mantenuto in un ambiente acido (~pH 6.0) dove vengono inibite tutte le sue funzioni di motilità. La fecondazione avviene in un ambiente meno acido (pH 8.0) che sblocca le funzioni motorie dello sperma. Per inibire l'attività motoria dello sperma sarebbe necessario una diminuzione del pH dell'ambiente di fecondazione al di sotto del valore di 7.4 come riportato da Trimmer & Vaquier (2002). Questo sicuramente rafforza la resistenza della fase di fecondazione rispetto all'acidificazione prevista dal IPCC per i prossimi 100 anni.

In accordo con Byrne *et al.*, (2009) una seconda spiegazione, potrebbe essere data dall'acclimatazione materna, dovuta alla elevata *plasticità fenotipica* di questi organismi. Gli adulti, in particolare le madri, sarebbero in grado di trasmettere la propria memoria termica ai gameti prodotti e quindi ad influenzare la tolleranza termica nella fecondazione e nelle prime fasi di sviluppo.

Gli effetti dell'acidificazione, ottenuti in questo studio, per *A. lixula*, sulla fecondazione e sviluppo embrionale, sono paragonabili a quelli ottenuti su altre 9 specie di echinidi non mediterranei (Tab.7.6: riadattata da Byrne *et al.*, 2009). Per la maggior

parte delle specie prese in esame, la fecondazione e le prime fasi di sviluppo sono influenzate negativamente solo da valori di pH <7.4, molto al di sotto rispetto alle previsioni future.

I risultati ottenuti sul successo dello sviluppo embrionale e larvale, hanno permesso di delineare per *A. lixula*, un *range* termico ottimale di sopravvivenza, compreso tra i 20°C e i 26°C, dove: alla temperatura di 24°C si raggiunge l'*optimum*, mentre alla temperatura di 27°C si ha il 100% di mortalità larvale. Tanto gli embrioni tanto le larve non hanno mostrato, da un punto di vista quantitativo, alcun effetto negativo o positivo correlabile alla variazione del pH. Come riportato per altri echinidi il successo dello sviluppo embrionale e delle prime fasi larvali sembra essere controllato dalla temperatura piuttosto che dal pH, soprattutto se questo si mantiene tra 8.0 e 7.6 (Clark *et al.*, 2009; Brennand *et al.*, 2010).

7.4.2 Effetti di temperatura e pH sulla morfologia larvale di *A. lixula*

Secondo Brennand *et al.*, (2010), gli embrioni durante i primi stadi potrebbero essere più vulnerabili all'incremento della temperatura indipendentemente dal pH, mentre le larve che riescono a sopravvivere, potrebbero essere maggiormente influenzate dall'acidificazione, iniziando in questa fase l'accrescimento delle porzioni scheletriche.

Sebbene, i primi risultati indicano che la fecondazione e i primi stadi di sviluppo di *A. lixula* siano resistenti alla temperatura e alla diminuzione del pH, quest'ultimo potrebbe avere un effetto negativo sulla sopravvivenza larvale.

Alcune larve calcificanti planctoniche mostrano effetti deleteri in risposta all'incremento della CO₂, mentre altre, anche se di specie affini, sembrano essere più resistenti (Brennand *et al.*, 2010; Byrne *et al.*, 2010).

La tipica forma triangolare e le lunghe braccia dei plutei sono importanti per il nuoto e per l'alimentazione delle larve degli echinidi (Emlet *et al.*, 2003). Inoltre queste mostrano nella lunghezza delle braccia, una plasticità fenotipica in relazione alle condizioni ambientali (Strathmann *et al.*, 1992). Emlet (2003) sottolinea come la dimensione del corpo (BL) cresca allometricamente con le braccia post-orali (PL) in relazione alle condizioni trofiche e di stress ambientale. Una morfologia anormale e un accorciamento nella lunghezza totale della larva (OL), delle braccia post-orali (PL) e del corpo (BL) potrebbe quindi ridurre la capacità di nuoto e predazione nonché la sopravvivenza stessa della specie.

Le larve di *A. lixula* hanno dato risposte sia negative che positive alle variazioni di temperatura e pH.

La risposta delle larve all'incremento della temperatura, riflette il tipico *pattern* visto per altri echinidi e invertebrati marini (Brennand *et al.*, 2010), con un bilancio tra facilitazione a certi livelli di temperatura (24 e 26°C) e completo fallimento dopo i 27°C.

La temperatura infatti, controlla il “ritmo” dello sviluppo negli invertebrati (Brennand *et al.*, 2010) e dai nostri risultati emerge come a +4°C si abbia uno sviluppo più rapido e un incremento nelle dimensioni larvali totali. La crescita larvale totale (OL), in *A. lixula* risulta positivamente correlata all'incremento della temperatura, indipendentemente dal pH (Brennand *et al.*, 2010) tranne alla temperatura soglia dei 26°C dove si registra un'interazione tra i due fattori.

Per quanto concerne invece, le altre variabili morfologiche considerate, PL e BL, queste mostrano un incremento positivo con la temperatura fino ai 26°C. Raggiunta la temperatura dei 26°C si registra un decremento significativo in relazione alla riduzione del pH da 8.0 a 7.8.

Infine non è stata osservata alcuna influenza né della temperatura né del pH sull'asimmetria larvale, come proposto da Brennand *et al.* (2010) per l'echinide *Tripneustes gratilla* (Linneo, 1758). In accordo con altri autori, le larve di *A. lixula* invece presentano una buona simmetria, anche nel controllo (20°C/8.1pH), come quella riscontrata nelle altre specie appartenenti al genere *Arbacia* (Harvey, 1949; Emler, 2009).

Tabella 7.7 Tolleranza pH nella fecondazione, primo sviluppo e delle larve a stadio di pluteo, in differenti specie di echinidi regolari (da Byrne *et al.*, 2009).

| Specie | Range pH fec. | pH fec. <60-70% | Range pH svil. norm. | pH svil. norm. <60- 70% | Referenza |
|--------------------------------------|------------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | 7.3-8.2 | 7.0 | 7.5-8.3 | 7.3 | Bay <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> | 7.4-8.0 | 7.0 | 7.6-8.0 | 7.4 | Kurihara & Shirayama, 2004 |
| <i>Arbacia punctulata</i> | 6.9-8.6 | 7.0 | 7.4-8.6 | 7.4 | Carr <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Echinometra mathaei</i> | 7.6-8.1 | 7.4 | n.d. | n.d. | Kurihara & Shirayama, 2004 |
| <i>Heliocidaris erythrogramma</i> | 7.6-8.3 | n.d. | 7.8-8.3 | n.d. | Byrne <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Tripneustes gratilla</i> | n.d. | n.d. | 7.8-8.15 | 7.6 | Brennand <i>et al.</i> , 2010 |
| | 6.0-8.2 | n.d. | 6.5-8.2 | 6.5 | Clark <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Pseudechinus huttoni</i> | 6.0-8.1 | n.d. | 6.5-8.2 | 6.5 | |
| <i>Evechinus chloroticus</i> | 6.0-8.1 | n.d. | 6.0-8.1 | 6.0 | |
| <i>Sterechinus neumayeri</i> | 6.0-8.0 | n.d. | 6.0-8.0 | 6.0 | |

n.d.: nessun dato disponibile.

8. Conclusioni

“Since the reproductive and recruitment processes and stages are basic to the persistence of a species and are more responsive than the adults to both natural environmental variations and man-made stresses, concentration upon these stages should not only add greatly to our understanding of natural regulation but should also provide the most sensitive baseline for applied purposes” (Lewis, 1976)

Lo studio del ciclo vitale di una specie e del suo successo riproduttivo, quindi della capacità di persistere nell’ambiente, è un tassello importante per la comprensione delle dinamiche meccanismi e i processi ambientali a diverse scale spaziali.

È, infatti, sicuramente la strategia riproduttiva di una specie ad indicare quali sono e potranno essere le capacità di espansione di una specie nel tempo e nello spazio.

Per quanto riguarda il *taxon* degli echinodermi questi sono da sempre modello di studio sia in campo biologico che ecologico grazie alla elevata plasticità fenotipica e genotipica e al complesso ciclo vitale, che lo contraddistingue biologicamente ed ecologicamente.

Nonostante l’echinide *Arbacia lixula* sia una delle specie più comuni nell’infralitorale superiore mediterraneo, ad oggi la sua biologia riproduttiva risulta ancora poco studiata. Negli ultimi decenni, si è registrato un forte incremento delle densità e delle biomasse di questa specie, presumibilmente attribuibile al suo carattere spiccatamente termofilo e al progressivo aumento di temperature delle acque superficiali del Mediterraneo. Secondo alcuni studi condotti in aree marine protette, l’aumento del pascolo di *P. lividus* e *A. lixula* determinerebbe, nelle comunità algali rocciose mediterranee, il passaggio da sistemi altamente complessi e ricchi di biodiversità come quelli delle macroalghe erette a

sistemi semplificati e a bassa biodiversità, dominati da alghe coralline incrostanti e ricci denominati “sea urchin barrens”. Inoltre l’abbondanza di *A. lixula*, sembrerebbe essere positivamente correlata all’estensione del barren. In questo contesto, risulta estremamente importante studiare la biologia riproduttiva di *A. lixula* una specie habitat determiner, il cui pascolo sembra avere un forte impatto sulla comunità algale dell’infralitorale roccioso mediterraneo.

In Mediterraneo la presenza di specie termofile e della loro progressiva espansione potrebbe essere all’origine di cambiamenti drastici nella struttura e funzionalità dell’intero ecosistema. L’espansione di specie termofile può essere suddivisa in due processi: meridionalizzazione e tropicalizzazione (Riese *et al.*, 1995; Francour *et al.*, 1994). Il primo processo vede specie termofile indigene facilitate, grazie alle loro caratteristiche termofile, nell’espansione in settori più a nord del bacino, occupando quindi nuovi spazi. Il secondo vede invece specie alloctone, di provenienza per lo più tropicale, insediarsi e riprodursi attivamente nel bacino. I due processi indifferentemente potrebbero portare ad una riorganizzazione degli spazi, quindi delle nicchie delle specie autoctone, provocando possibili competizioni interspecifiche (Boero *et al.*, 2008).

In quest’ottica, la tesi di dottorato ha voluto approfondire la biologia ed ecologia riproduttiva di una specie che potenzialmente, grazie all’attuale cambiamento climatico, potrebbe espandersi ed esplodere demograficamente in Mediterraneo. Questo comporterebbe un impoverimento della comunità algale dell’infralitorale che da alghe fotofile passerebbe ad alghe coralline incrostanti (Guidetti *et al.*, 2004; Bonaviri *et al.*, 2005; Bulleri *et al.*, 2002; Privitera *et al.*, 2005; Privitera *et al.*, 2008).

Lo studio accurato del successo riproduttivo potrebbe essere la chiave per comprendere le dinamiche e le potenzialità della specie.

In primo luogo è stato descritto e analizzato per la prima volta il ciclo riproduttivo di *A. lixula* attraverso. Questo ha permesso di stabilire che questa specie, rispetto alle affini presenti in Mediterraneo, è in grado di produrre gameti efficienti durante gran parte dell'anno. Presenta una stagione riproduttiva molto lunga (da Gennaio a Settembre) e complessa nelle sue fasi. Questo è stato confermato dall'analisi su due popolazioni distanti fra loro centinaia di Km (Capo Gallo lungo la costa del palermitano; Ustica, isola del Tirreno centrale), paragonabili.

Le due popolazioni hanno presentato lo stesso pattern stagionale di riproduzione e quindi possano essere considerate sincrone. Si sono registrati diversi momenti di spawning durante la stagione riproduttiva con un picco più importante tra Marzo e Giugno. Ma individui maturi e in fase di emissione sono stati riscontrati durante il resto dell'anno, suggerendo che la specie sia in grado di riprodursi in più momenti in diverse stagioni (Lo Bianco, 1909; Fenaux, 1968; Tavares *et al.* 2004).

L'unica differenza osservata tra le due popolazioni è stata a livello quantitativo. Durante tutta la stagione riproduttiva, rispetto alla popolazione di Ustica, la popolazione di Capo Gallo ha mostrato un IGS più alto. Questa differenza potrebbe essere attribuita a differenti apporti nutritivi a ciascuna popolazione (George *et al.*, 1990), in questo lavoro non ancora prese in esame.

A questo punto il lavoro è proseguito nel tentativo di capire se a questa lunga stagione riproduttiva seguisse o meno un altrettanto successo riproduttivo, ossia se gli eventi di *spawning* erano seguiti da un successo riproduttivo (successo di fecondazione, sviluppo embrionale e larvale).

Lo Bianco (1909) sosteneva che i ripetuti momenti riproduttivi osservati in *A. lixula* erano il risultato di uno stress fisiologico che si traduceva in una sovrapproduzione gametica con un conseguente decremento del successo riproduttivo nel corso della

stagione riproduttiva. Un'ipotesi alternativa, sull'adozione di questa strategia riproduttiva, potrebbe essere data dal fatto che la specie migliori per compensare un basso successo riproduttivo, causato da fattori esogeni e/o endogeni, la *fitness* aumentando i possibili momenti riproduttivi.

I risultati della tesi indicano che, in entrambe le aree, il successo di fecondazione si mantiene relativamente basso durante la stagione riproduttiva (<50%), ma che questo è sempre corrisposto da un ottimale sviluppo embrionale e larvale. *A. lixula* sembra essere in grado di riprodursi con la stessa efficienza durante tutti gli eventi di *spawning* considerati, a differenza di quanto ipotizzato da Lo Bianco (1909), mantenendo rispetto agli altri echinidi una capacità di fecondazione sempre molto bassa. Quindi, si rafforza l'ipotesi che la specie nell'ottimizzare la propria *fitness* e produrre una prole efficiente cerchi di sfruttare l'intera stagione riproduttiva.

Inoltre come già osservato in altri echinidi, il successo di fecondazione sembra essere dipendente dalla concentrazione, o meglio diluizione, dello sperma presente al momento della fecondazione ma anche dall'età, ovvero longevità, dei rispettivi gameti. Le peculiari caratteristiche di ciascun gamete mettono in gioco una serie di ipotesi anche sulla relazione fra la densità dei riproduttori e le condizioni chimico fisiche dell'ambiente al momento della riproduzione (Timourian, 1972; Levitan, 1991, 1993, 2000, 2008; Benzie & Dixon, 1994; Thomas, 1994; Meidel & Yund, 2001; Williams & Bentley, 2002; Lauzon-Guay & Scheibling, 2007). Una possibile interpretazione dei risultati fin qui ottenuti per *A. lixula*, è che l' elevata quantità di sperma, nelle soluzioni più concentrate, determini nelle uova l'attivazione prematura dei meccanismi di blocco per la polispermia, impedendo che queste vengano fecondate. Viceversa in presenza di sperma molto diluito le uova non attivano, o rallentano, i sistemi anti-polispermia, mantenendo in questo modo un successo di fecondazione più elevato (Meidel & Yund,

2001). Per quanto riguarda la longevità dei rispettivi gameti si è delineato un trend simile e paragonabile alla maggior parte degli echinidi regolari. Lo sperma va incontro a un decremento delle sua attività in un tempo molto ridotto (<1h) se fortemente diluito, mentre mantiene intatte le sue capacità motorie più a lungo se poco diluito. Questo è spiegabile con l'aumento del tasso di respirazione ad elevate diluizioni e la riduzione del pH al momento della fecondazione. Lo sperma nelle gonadi è mantenuto ad un pH di circa 6.0, l'aumento del pH a 8.0 in acqua ne provoca l'attivazione (Trimmers & Vaquier, 2002). Per quanto riguarda le uova queste appaiono estremamente resistenti al tempo che decorre tra l'emissione e la fecondazione. Fino alle 36h successive alla possibile emissione, le uova hanno risposto positivamente alla fecondazione e questo aumenta sicuramente la probabilità di mantenere un successo riproduttivo elevato all'interno di una popolazione in caso di basse densità di riproduttori o di asincronia fra i due sessi nei momenti di *spawning*.

Anche nel caso del successo di sviluppo embrionale e larvale *A. lixula* ha risposto positivamente durante tutta la stagione riproduttiva, producendo embrioni efficienti ed echinoplutei ben formati e vitali fino a fine estate in entrambe le aree. La fase cruciale del raggiungimento dello stadio di gastrula, è stata registrata positivamente nelle due aree confermando il buono stato dei gameti ad entrambe le popolazioni. Una differenza fra le aree va comunque indicata a carico del valore numerico degli embrioni ottenuti e dei tempi del loro sviluppo. Tra le due aree, l'area di Capo Gallo mostra un numero più elevato di embrioni e larve efficienti durante tutta la stagione riproduttiva, rispetto ad Ustica. Inoltre, nonostante il trend dei tempi di sviluppo embrionale (fino alle 24h) possono considerarsi assolutamente paragonabili, risultano invece leggermente sfasati i tempi di comparsa della forma di pluteo. A Capo Gallo quest'ultima sembra essere raggiunta più velocemente rispetto ad Ustica. È probabile anche in questo caso attribuire

la differenza ad una diversa disponibilità energetica, da ricercare ancora nei gameti prodotti dalle due popolazioni, visto che allo stadio di primo pluteo (4 braccia) la larva non è ancora in grado di autosostentamento e quindi ancora legata alle energie allocate dai genitori.

In generale è quindi possibile sostenere che *A. lixula* presenti una strategia riproduttiva altamente complessa nelle sue fasi e modalità di attuazione, ma a questa corrisponde un successo riproduttivo notevole. La specie mostra la capacità di riprodursi efficacemente durante la maggior parte di un anno abbracciando più stagioni (Inverno-Primavera-Estate), anche se con un tasso medio basso (<50%) rispetto ad altre specie, Questo viene confermato non solo dalla continua presenza di gameti maturi, ma dal successo di fecondazione, embrionale e larvale continuo durante l'intera stagione riproduttiva. Altro dato importante ottenuto è quello sulla capacità di questa specie di incamerare energia nelle gonadi durante tutto l'anno e quindi permettere una gametogenesi pressoché continua. Questo è stato evidenziato dall'andamento dello strato nutritivo (NP) che ci mostra, sì un decremento durante i momenti principali di *spawning* (Marzo-Agosto), ma si mantiene molto elevato durante tutto l'anno e dalle analisi istologiche emerge la sua costante presenza, in associazione alla produzione dei gameti, rispetto a quello rilevato in specie affini.

Una volta identificato il ciclo riproduttivo della specie e la sua capacità riproduttiva, l'attenzione è stata rivolta ai possibili impatti di alcune variabili ambientali sul successo riproduttivo di questa specie.

Negli ultimi decenni, la comunità scientifica ha rivolto la sua attenzione al processo dei cambiamenti climatici e dei possibili effetti, biologici ed ecologici, che questi potrebbero avere sulle specie soprattutto marine. In particolare, l'attenzione si è focalizzata su due fattori ambientali, temperatura e pH (IPCC, 2007).

L'influenza della temperatura sui processi biologici e fisiologici è ampiamente documentata in numerose specie marine (Orton, 1920; Olive, 1995; Bhaud, 1995). Questa è in grado di agire direttamente sui meccanismi biologici, e soprattutto fisiologici, di un organismo tanto adulto quanto giovanile. Spesso è proprio la temperatura a guidare alcuni dei momenti cruciali dello sviluppo embrionale di un organismo.

Altrettanto importante, nella vita di un organismo marino, è il pH in cui avvengono le principali fasi di crescita. Questo valore è alla base e regola la maggior parte dei meccanismi fisiologici degli organismi. La variazione di una tale componente potrebbe portare a cambiamenti determinanti nel ciclo vitale di un organismo agendo, ad esempio, direttamente sull'attivazione o inibizione della fecondazione in organismi a fecondazione esterna, o sul corretto sviluppo degli embrioni (Fabry *et al.*, 2008; Portner, 2008). All'acidificazione dell'acqua segue anche una diminuzione della presenza di ioni carbonato utili a garantire la quantità necessaria alla formazione delle porzioni calcitiche e aragonitiche proprie degli organismi calcificanti. Le due componenti ambientali citate separatamente, in realtà sono una la conseguenza dell'altra, e quindi in ambiente marino agiscono contemporaneamente anche se in misura differente (Dupont & Thorndyke, 2009).

Gli echinodermi, i *free-spawners* più studiati insieme ai coralli, sono soggetti durante tutte le fasi della riproduzione a sollecitazioni termiche, dal momento dell'emissione dei gameti in acqua al completo sviluppo del nuovo individuo. Essendo questi di facile reperibilità, ecologicamente importanti e con uno sviluppo embriologico facilmente riproducibile in condizioni di laboratorio, risultano essere un ottimo indicatore di quello che potrebbe accadere all'organismo al variare della temperatura, durante le singole fasi vitali. Questi organismi non solo sono *free-spawners* ma anche uno dei gruppi di organismi bentonici calcificanti più importati. Tra le fasi più importanti del ciclo vitale di

un echinide è sicuramente determinante lo sviluppo larvale durante il quale il nuovo individuo produce il suo scheletro. Anche in questo caso quindi, è uno dei taxa più studiati in merito all'acidificazione poiché le risposte alla variazione di questa componente ambientale è di facile e veloce acquisizione.

Seguire *A. lixula* dal momento della fecondazione alla fase di echinopluteo in condizioni differenti di temperatura e pH è stato quindi l'ultimo obiettivo della tesi. Da una specie definita termofila ci aspettavamo una correlazione positiva tra successo riproduttivo e aumento della temperatura, nonché una certa adattabilità delle larve. Per quanto riguarda il pH, ci aspettavamo che il successo di fecondazione fosse correlato negativamente alla sua diminuzione, mentre per le larve ci attendevamo una riduzione nella taglia ma non nell'efficienza, come ottenuto in altri echinidi.

Dai dati ottenuti emerge che il fattore che influenza significativamente, sia lo sviluppo dei primi stadi embrionali che la morfologia dello stadio di pluteo di *A. lixula*, è la temperatura piuttosto che il pH (Byrne *et al.* 2009).

Dalle analisi non risulta che la riduzione di 0.3 unità di pH, rispetto a quello registrato in natura, possa avere degli effetti negativi o positivi sulla fecondazione, sul corretto sviluppo degli embrioni, sulla morfologia e sulle dimensioni delle larve (Byrne *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2009; Ericson *et al.*, 2010). In particolare, il successo di fecondazione e di primo sviluppo (fino allo stadio di gastrula) in *A. lixula* non risultano influenzate negativamente né dalla temperatura né dal pH o dalla loro interazione.

Come descritto anche per altri echinidi, tropicali o polari, queste fasi possono essere definite altamente resistenti all'aumento di temperatura e riduzione del pH (Byrne *et al.*, 2009, 2010a, 2010b; Ericson *et al.*, 2010). Solo recentemente è stato registrato un impatto dell'acidificazione sul successo di fecondazione. La riduzione del pH agirebbe direttamente sull'efficienza dello sperma quando quest'ultimo si trova a diluizioni molto

elevate e pH ambientale basso (Reuter *et al.*, 2011). Mentre a causa dell'aumento della temperatura è inficiata la longevità, e quindi l'efficienza, di entrambi i gameti che perdono vitalità progressivamente passando dai 20 ai 30°C (Rahman *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda il successo larvale di *A. lixula* questo è positivamente correlato con l'aumento della temperatura fino alla soglia dei 26°C, oltre i quali si registrano percentuali di malformazione e mortalità molto elevati. Stabilendo un *range* ottimale di sopravvivenza larvale compreso fra i 20 e i 26°C. Mentre nessun effetto è stato riscontrato nei trattamenti con riduzione dei valori di pH (7.8). Nella lunghezza totale della larva è stata rivelata una significatività nell'interazione fra i due fattori, che potrebbe essere spiegata con un'azione "tamponante" della temperatura sugli effetti negativi dovuti all'acidificazione, rispondendo con un accorciamento delle braccia, in accordo con Brennan *et al.* (2010). L'influenza del pH sullo sviluppo larvale è stata riscontrata, con un aumento della mortalità larvale e un aumento del tasso di malformazioni, in embrioni sottoposti ad una riduzione del pH al di sotto del 7.8 (Kurihara & Shirayama, 2004; Clark *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2010; Brennan *et al.*, 2010). Le larve potrebbero comunque, mostrare un decremento nella crescita somatica e possibilmente nella calcificazione, nelle fasi successive a quella di pluteo a 4 braccia, compromettendone la loro sopravvivenza. Secondo Strathman *et al.*, (1992) ed Emlet (2003) sono le dimensioni larvali e la loro qualità a determinare il successo di reclutamento di una specie.

I risultati ottenuti in questo studio indicherebbero che, *A. lixula* nonostante sia considerata termofila (Kempf, 1962; Francour *et al.*, 1994; Gianguzza *et al.*, 2011), andrebbe incontro ad un decremento numerico delle future popolazioni. Se infatti la temperatura media dell'acqua raggiungesse i 26°C questa agirebbe direttamente sul successo larvale.

Nonostante la probabile acclimatazione termica materna, o in generale delle popolazioni già esistenti, questa non riuscirebbe a garantire lo sviluppo embrionale all'interno del *range* di temperature previste dagli scenari futuri (IPCC, 2007).

A. lixula si presenta altamente versatile nelle fasi riproduttive. Questa strategia riproduttiva potrebbe facilitare la sopravvivenza di questa specie in risposta all'aumento di temperatura previsto dai cambiamenti climatici.

In effetti, *A. lixula* sembra essere in grado di modulare i propri ritmi biologici e quindi riproduttivi in funzione delle variazioni termiche.

Grazie all'elevato numero di momenti riproduttivi, registrati in vari momenti dell'anno con medie termiche differenti, che vanno dai 14-15°C primaverili ai 26-27°C estivi.

Si potrebbe ipotizzare un adattamento della specie realizzato attraverso un progressivo slittamento della stagione riproduttiva nei mesi termicamente più favorevoli, ovviando ad un ulteriore abbassamento del successo riproduttivo nei periodi più caldi.

Inoltre la capacità di *A. lixula* di accumulare sostanze nutritive durante gran parte dell'anno, aumenta notevolmente il suo carattere plastico, nonché la possibilità di mantenere elevata l'allocazione energetica per la riproduzione in qualsiasi momento dell'anno.

Infine è da mettere in evidenza come la strategia riproduttiva dei due echinidi regolari più comuni in Mediterraneo, *A. lixula* e *P. lividus*, sia assolutamente differente nelle modalità e fasi principali.

Mentre *P. lividus* presenta generalmente una stagione riproduttiva breve e concentrata nei mesi primaverili (Marzo-Maggio) coprendo un range di temperature molto ridotto (18-22°C), *A. lixula* ha una stagione riproduttiva molto ampia (Gennaio-Settembre) e che abbraccia un range termico molto ampio (15-27°C).

L'adozione di due strategie riproduttive così differenti in due specie co-occurring, è stato già notato in altri ambienti (Lessios, 1984; Tavares *et al.*, 2004). La non sovrapposizione degli eventi riproduttivi di due specie, che condividono lo spazio e probabilmente le risorse, può avere chiaramente dei risvolti ecologici importanti.

9. Bibliografia

- **Alcock K.J., 1992.** The duration of strong mate-guarding by males of the libellulid dragonfly *Paltotheris lineatipes*: proximate causation. *J. Ins. Behav.* **5**:507-515.
- **Babcoock R.C., Mundy C.N., Whitehead D., 1994.** Sperm diffusion models and in situ confirmation of long-distance fertilization in the free-spawning asteroid *Acanthaster planci*. *Biol.Bull.* **186**:17-28.
- **Bateman A.J., 1948.** Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*,**2**:349-368.
- **Baker R.R. and Parker G.A., (1973).** The origin and evolution of sexual reproduction up to the evolution of the male-female phenomenon. *Acta Biotheor.*, **22**:1-77.
- **Bayed A., Quiniou F., Benrha A., Guillou M., 2005.** The *Paracentrotus lividus* populations from the northern Moroccan Atlantic coast: growth, reproduction and health condition. *J.Mar.Biol.Ass.UK.* **85**:999-1007.
- **Bauer R.T., 1989.** Continuous reproduction and episodic recruitment in nine shrimps species inhabiting a tropical seagrass meadow. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **127**:175-187.
- **Begon M., 1985.** A general theory of life-history variation. In: Sibly RM, Smith RH (eds) Behavioural ecology. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*: 91-97.
- **Bentley M.G., Olive P.J.W., Last K. 2001.** Sexual satellitism, moonlight and nuptial dances of worms: the influence of the moon on the reproduction of marine animals. *Earth, Moon and Planets* **85-86**: 67-84 in *Kluwer Academic Publisher, Neantherlands*.
- **Benzie J.A.H. & Dixon P. 1994.** The effects of sperm concentration, sperm: egg ratio, and gamete age on fertilization success in Crown-of-Thorns starfish (*Acanthaster planci*) in the laboratory. *Biol.Bull.* **186**:139-152.
- **Bertram D.F., Strathmann R.R, 1998.** Effects of maternal and larval nutrition on growth and form of planktotrophic larvae. *Ecology*, **79(1)** : 315-327.
- **Bhaud M., Cha J.H., Duchene J.C., Nozais C., 1995.** Influence of temperature on the marine fauna: what can be expected from a climate change. *J.Therm.Biol.* Vol.20, 1/2:91-104.
- **Bode M., Marshall D.J. 2007.** The quick and the dead? Sperm competition and sexual conflict in sea. *Evolution* **61-11**: 2693-2700.
- **Boero F., Feral J.P., Azzurro E., Cardin V., Riedel B., Despalatovic M., Munda I., Moschella P., Zaouali J., Fonda Umani S., Theocaris A., Wiltshire K., Briand F.,**

2008. Climate warming and related changes in Mediterranean marine biota. *CIESM Workshop Monograph* **35**: 5-21.
- **Bonaviri C., Agnetta D., Gianguzza P., Vega Fernandez T., Riggio S. 2005.** Effetto della complessità strutturale del substrato sulla distribuzione di *Paracentrotus lividus* e *Arbacia lixula* nel barrendell' A.M.P. "Isola di Ustica". Agli Atti del "XV Congresso della Società Italiana di Ecologia- Torino 2005".
 - **Booolootian R.A., 1966.** Reproductive physiology. In *Physiology of Echinodermata*, R.A. Booolootian, ed. Wiley (Interscience), New York and London, Pp. 561-614.
 - **Boudouresque, C.F., Verlaque, M., 2001.** Ecology of *Paracentrotus lividus*. In: Lawrence, J.M. (Ed.), Edible Sea Urchins. *Elsevier, Amsterdam*, pp. 177–216.
 - **Brennand S.H., Soars N., Dworjanyn S.A., Davis A.R., Byrne M., 2010.** Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *PlosOne* **5(6)**: e11372.
 - **Brewin P.E., Lamare M.D., Keogh J.A., Mladenov P.V., 2000.** Reproductive variability over a four-year period in the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinoidea: Echinodermata) from differing habitats in New Zeland. *Mar.Biol.* **137**: 543-557.
 - **Bulleri F., Benedetti-Cecchi L., Cinelli F., 1999.** Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **241**: 81–95.
 - **Bulleri F., Bertocci I., Michela F., 2002.** Interplay of encrusting coralline algae and sea urchins in maintaining alternative habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **243**: 101-109.
 - **Byrne M., 1990.** Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered habitat on the west coast of Ireland. *Mar.Biol.* **104**: 275-289.
 - **Byrne M., Ho M., Selvakumaraswamy P., Nguyen H.D., Dworjanyn S.A., Davis A.R. 2009.** Temperature, but no pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proc.R.Soc. B* **276**:1883-1888.
 - **Byrne M., 2010.** Impact of climate change stressors on marine invertebrate life histories with a focus on the Mollusca and Echinodermata. In: Yu J, Henderson-Sellers A, eds. *Climate alert: Climate change monitoring and strategy*. Sydney: University of Sydney Press. Pp. 142–185.

- **Byrne M., Soars N., Selvakumaraswamy P., Dworjanyn S.A., Davis A.R., 2010.** Sea urchin fertilisation in a warm, acidified and high pCO₂ ocean across a range of sperm densities. *Mar Env Res* **69**: 234–239.
- **Cakal A.O., Parlak H. 2007.** Embryotoxic effects of nonylphenol and octylphenol in sea urchin *Arbacia lixula*. *Ecotoxicology* **16**: 439-444.
- **Carr R.S., Biedenbach J.M., Nipper M., 2006.** Influence of Potentially Confounding Factors on Sea Urchin Porewater Toxicity Tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **51**: 573–579.
- **Charnov E.L., 2005.** Reproductive effort is inversely proportional to average adult life span. *Evol. Ecol. Res.* **7**: 1221-1222.
- **Chapman T., Arnqvist G., Banghan J., Rowe L., 2003a.** Sexual conflict. *Trends Ecol. Evol.* **18**:41-46.
- **Chellappa S., Camera M.R., Chellappa N.T., Beveridge M.C.M., Huntingford F.A., 2003.** Reproductive ecology of a neotropical cichlid fish, *Cichlamonoculus* (Osteichthyes: Cichlidae). *Braz. J. Biol.* **63(1)**:17-26.
- **Chia F.S., Bikell L.N., 1983.** Echinodemata. Pp. 545-619 in Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. II: Spermatogenesis and Sperm Function, K. G. and R. G. Adiyodi, eds. Wiley and Sons, Ltd.
- **Clark D., Lamare M., Barker M., 2009.** Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: a comparison among a tropical, temperate, and a polar species. *Mar Biol* **156**:1125–1137.
- **Cognetti G., Sarà M., Magazzù G., 2002.** Biologia marina. *Eds. Calderini.*
- **Connell J.H., 1985.** The consequences of variation in initial settlement vs. post-settlement mortality in rocky intertidal communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **93**: 11-45.
- **Conway C.M, Igelsrud D., Conway AF., 1984.** Tested studies for laboratory - *Kendall/Hunt Pub.Co. Chapter 4*: 53-89.
- **Crapp, G. B., Willis, M. E. 1975.** Age determination in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck), with notes on the reproductive cycle. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **20**:157-178
- **Crean A.J., Marshall D.J. 2008.** Gamete plasticity in a broadcast spawning marine invertebrate. *PNAS* **105(36)**: 13508-13513.

- **Darwin C., 1859.** On the origin of species by means of natural selection, on the preservation of favored races in the struggle of life. *London: J. Murray.*
- **Darwin C., 1971.** The descent of man, and selection in relation to sex. *London: J. Murray.*
- **Dawkins R., 1989.** "Battle of the Sexes", in *The Selfish Gene* pp. 140–165. Oxford: Oxford University Press.
- **Denny M.W., Shibata, M.F., 1989.** Consequences of surf-zone turbulence for settlement and external fertilization. *American Naturalist* **134**: 859–889.
- **Dorit R., Walker W., Barnes R., 1991.** *Zoology. Sanders College Publishing, USA.*
- **Dupont S., Thorndyke M.C., 2009.** Impact of CO₂-driven ocean acidification on invertebrates early life-history – what do we know, what we need to know and what we can do. *Biogeosciences Discussion* **6**: 3109–3131.
- **Ebert T.A., 1968.** Growth rates of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* related to food availability and spine abrasion. *Ecology* **49**: 1075-1091.
- **Ebert T.A., 1996.** Adaptive aspects of phenotypic plasticity in echinoderms. *Oceanol. Acta* **19**:347-355.
- **Emlet R.B., McEdward L.R., Strathmann R.R. 1987.** Echinoderm larval ecology viewed from the egg. Pages 55-136 in M. Jaongoux and J. M. Lawrence, eds. *Echinoderm studies. Vol.2 Balkema, Rotterdam.*
- **Emlet R.B., 2003.** Sea urchin larval ecology: food rations, development, and size at metamorphosis. *The Sea Urchin: From Basic Biology to Aquaculture*, Yokota, Matranga & Smolenicka (eds): 105-110.
- **Emlet R.B., 2009.** The bilaterally asymmetrical larval form of *Stomopneustes variolaris* (Lamerck). *Biol.Bull.* **216**: 163-174.
- **Evans J.P., Marshall D.J. 2005.** Male-by-female interactions influence fertilization success and mediate the benefits of polyandry in the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. *Evolution* **59(1)**: 196-112.
- **Ericson J.A., Lamare M.D., Morley S.A., Barker M. F., 2010.** The response of two ecologically important Antarctic invertebrates (*Sterechinus neumayeri* and *Parborlasia corrugatus*) to reduced sea water pH: effects on fertilisation and embryonic development. *Mar. Biol.* **157**: 2689-2702.

- **Fabry, V.J., Seibel, B.A., Feely, R.A., Orr, J.C., 2008.** Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science* **65**: 414–432.
- **Falugi C., Angelini C., 2003.** Sea urchin development from the egg to metamorphosis: an integrated model for cell-to-cell and environment interaction. *The Sea Urchin: From Basic Biology to Aquaculture*, Yokota, Matranga & Smolenicka (eds): 73-93.
- **Fenaux L. 1968.** Maturation des gonads et cycle saisonnier des larves chez *A. lixula*, *P. lividus* et *P. microtuberculatus* (echinides) à Villefranche-Sur-Mer. *Vie Milieu* **13**: 1-52.
- **Fenaux L., Strathmann M.F., Strathmann R.R., 1994.** Five tests of food-limited growth of larvae in coastal waters by comparisons of rates of development and form of echinoplutei. *Limnol.Oceanogr.* **39(1)**: 84-98.
- **Feriche M., Pleguazuelos J.M., Santos X., 2008.** Reproductive ecology of Montpellier snake, *Molpolon monspessulans* (Colubridae), and comparison with other sympatric colubrids in the Iberia Peninsula. *Copeia* **2**:279-285.
- **Fernandez C., Boudouresque CF. 1997.** Phenotypic plasticity of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata : Echinoidea) in a lagoonal environment. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **152** : 145-154.
- **Fisher R.A., 1930.** The genetical theory of natural selection. *Oxford: Clarendon press.*
- **Findlay H.S., Kendall M.A., Spicer J.I., Widdicombe S., 2010.** Post-larval development of two intertidal barnacles at elevated CO2 and temperature
- **Fox M.H., 1924.** Lunar periodicity in reproduction. *Proc. R. Soc. Lond. B* **95**:523-550.
- **Francour P., Boudouresque C.F., Harmelin J.G., Harmelin-Vivien M.L., Quignard J.P., 1994.** Are the Mediterranean waters becoming warmer? Information from biological Indicators. *Mar Pollut Bull* **28**: 523-526.
- **Fuji A., 1960.** Studies on the biology of the sea urchin. Reproductive cycle of two sea urchins, *Strongylocentrotus nudus* and *S. intermedius*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **11**: 49-57.
- **Fujisawa, H., 1995.** Variation in embryonic temperature sensitivity among groups of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, which differ in their habitats. *Zool. Sci.* **12**,583–589.
- **Garcia-Lopez A., Anguis V., Couto E., Canario A.V.M., Canavate J.P., Sarasquete C., Martinez-Rodriguez G., 2006.** Non-invasive assessment of

- reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese *Solea senegalensis* (Kaup). *Aquaculture* **254**:583-593.
- **Gattuso J.P., Frankignoulle M., Bourge I., Romaine S., Buddemeier R.W. 1998.** Effect of calcium carbonate saturation of seawater in coral calcification. *Global Planet change* **18**: 37-46.
 - **Gaudette J., 2004.** Disponibilité du sperme au cours de la saison de la ponte de l'oursin vert, *Strongylocentrotus droebachiensis*, dans des populations de différentes tailles. *M.Sc. Faculté des Sciences et de Genie Université Laval Québec*.
 - **Ghiselin M.T., 1974.** The economy of nature and the evolution of sex. *Berkeley: University of California Press*.
 - **Gianguzza P., Chiantore M., Bonaviri C., Cattaneo-Vietti R., Vielmini I., Riggio S. 2006.** The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica Island MPA (Western Mediterranean, Italy). *Fish.Res.***81**: 37-44.
 - **Gianguzza P., Agnetta D., Bonaviri C., Di Trapani F., Visconti G., Gianguzza F., Riggio S., 2011.** The rise of thermophilic sea urchins and the expansion of barren grounds in the Mediterranean Sea. *Chem. Ecol.* Vol. **27**, **2**: 129-134.
 - **Giese A.C., 1959.** Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* **21**: 547-576.
 - **Giese A.C., Pearse J.S. 1974.** Introduction: general principles. In: A.C. Giese and J.S. Pearse (eds.) *Reproduction of marine invertebrates*, Acoelomate and Pseudocoelomate metazoan. *Academic Press, New York* vol.1 Pp. 1-49.
 - **George S.B., Cellario C., Fenaux L., 1990.** Population differences in egg quality of *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea): proximate composition of eggs and larval development. *J.Exp.Mar.Biol. Ed, Vol.* **141**:107-118.
 - **Gonor J., 1973.** Reproductive cycles in Oregon populations of the echinoid, *Strongylocentrotus purpuratus*: 1. Annual gonad growth and ovarian gametogenic cycles. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **12**: 45-64.
 - **Grange L.J., 2005.** Reproductive success in Antarctic Marine Invertebrates. PhD thesis, University of Southampton.
 - **Guettaf M., San Martin G.A., Francour P., 2000.** Interpopulation variability of the reproductive cycle of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in the southwestern Mediterranean. *J.Mar.Biol.Ass.U.K.* **80**:899-907.

- **Guidetti M., Chiantore M., Zichichi F., Elia L., Mangialajo L., Mori M., Cattaneo-Vietti R. 2003.** Variability in density and reproductive condition in the sea urchin *Paracentrotus lividus* Lamarck. In: Casagrandi, R. & Meli, P. (eds.) *Ecologia. Atti del 13° Congresso Nazionale della S.It.E., Como. Aracne, Roma.*
- **Guidetti P., Terlizzi A., Boero F., 2004.** Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy Mediterranean Sea). *Fish. Res.* **66**: 287–297.
- **Guidetti P., Mori M., 2005.** Morpho-functional defences of Mediterranean sea urchins, *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*, against fish predators. *Mar. Biol.* **147**: 797–802.
- **Harrold C., Reed D.C., 1985.** Food availability, sea urchin grazing and kelp forest community structure. *Ecology, Volume 66*: 1160-1169.
- **Harvey E.B., 1949.** The growth and metamorphosis of the *Arbacia punctulata* pluteus, and late development of the white halves of centrifuged eggs. *Biol. Bull.* **97**: 287-299.
- **Harvey E.B., 1956.** The American *Arbacia* and Other Sea Urchins. *Princeton Univ. Press, Princeton, N. J.* 298 pp.
- **Havenhend J.N. Buttler F.R., Thorndyke M.C., Williamson J.E., 2008.** Near-future levels of ocean acidification reduce fertilization success in a sea urchin. *Current Biology* **18**(15).
- **Hellstrom M., Kavanagh K.D., Benzie J.H., 2010.** Multiple spawning and sexual reproduction in the octocoral *Sarcophyton elegans* (Cnidaria: Alcyonacea) on Lizard Island, Great Barrier Reef. *Mar. Biol.* **157**:383-392.
- **Hereu M., Cabala M., Linares C., Sala E., 2004.** Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Mar. Biol.* **144**: 1011–1018.
- **Hernandez J.C., Clemente S., Girard D., Perez-Ruzafa A., Brito A., 2010.** Effect of temperature on settlement and postsettlement survival in a barrens-forming sea urchin. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **413**: 69-80.
- **Himmelman J.H. 1981.** Synchronization of spawning of marine invertebrates by phytoplankton. Pp.1-19, in *Advances in invertebrates reproduction*, Vol.11, W.J. Clark Jr. and T.S. Adams, eds. Elsevier/North Holland, new York.

- **Hodgson A. N., W. J.F. Le Quesne, Hawkins S.J., Bishop J.D.D., 2007.** Factors affecting fertilization success in two species of patellid limpet (Mollusca: Gastropoda) and development of fertilization kinetics models. *Mar. Biol.* **150**: 415-426.
- **Hughes A.D., Kelly M.S., Barnes D.K.A., Catarino A.I., Black K.D., 2006.** The dual functions of sea urchin gonads are reflected in the temporal variations of their biochemistry. *Mar.Biol.* **148**: 789-798.
- **Jenckins S.R., Marshall D., Frascchetti S., 2009.** Settlement and recruitment. In *Whal M. (eds.) Ecological studies: Marine Hard Bottom Communities*, **206**: 177-190.
- **Johnson LG, Babcock RC, 1994** Temperature and the larval ecology of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*. *Biol. Bull.*, **168**, 419–431.
- **Illiffe, T.M., Pearse J.S., 1982.** Annual and lunar reproductive rhythms of the sea urchin *Diadema antillarum* (Philippi) at Bermuda. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, **5**:139-148.
- **IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) 2007** *The fourth assessment report of the IPCC*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- **Keller B.D., 1983.** Coexistence of sea urchins in seagrass meadows: an experimental analysis of competition and predation. *Ecology* **64**:1581-1598.
- **Kelly M.S., 2001.** Environmental parameters controlling gametogenesis in the echinoid *Psammechinus miliaris*. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **266**: 67-80.
- **Kempf M., 1962.** Recherches d'écologie compare sur *Paracentrotus lividus* (Lmk.) et *Arbacia lixula* (L.) (I). *Rec. Trav. St. Mar. End.* **25**: 47–116.
- **Kenner M.C., Lares M.T., 1991.** Size at first reproduction of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* in a entral California kelp forest. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **76**:303-306
- **Kojis B.L. and Quinn N.J., 1982.** Reproductive ecology of two faviid corals (Caelenterata: Scleractinae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **8**: 251-255.
- **Kurihara H., Shirayama Y., 2004.** Effects of increased atmospheric CO₂ on sea urchin early development. *Mar.Ecol. Prog. Ser.* **274**: 161–169.
- **Kurihara H., 2008.** Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early development stages of invertebrates. *Mar Ecol Prog Ser* **373**: 275–284.
- **Lamare M.D., Brewin P., Barker M.F., Wing S. R., 2002.** Reproduction of the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata: Echinoidea) in a New Zealand fiord. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, Vol. **36**: 719–732.

- **Lauzon-Guay JS., Scheibling R.E., 2007.** Importance of spatial population characteristics on the fertilization rates of sea urchins. *Biol.Bull.* **212**: 195-205.
- **Lawrence J.M., Herrera J., 2000.** Stress and deviant reproduction in echinoderms. *Zoological Studies* **39(3)**: 151-171.
- **Lawrence M.J., 2007.** Edible sea urchins: biology and ecology. Second edition. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* Vol.**37**.
- **Lees D.C., 1970.** The relationship between movement and available food in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* and *Strongylocentrotus purpuratus*. M Sc thesis. San Diego State University.
- **Lessios H.A. 1984.** Annual reproductive periodicity in eight echinoid species on the Carabbean coast of Panama. *Proceeding of the fifth echinoderm conference, Galway 24-29 September 1984*, p.303-311.
- **Lessios H.A., Lockhart S., Collin R., Sotil G., Sanchez-Jerez P., Zigler K.S., Perez A.F., Garrido M.J., Geyer L.B., Bernardi G., Vacquier V.D., Harun R. and Kessing B.D., 2011.** Phylogeography and bindin evolution in *Arbacia*, a sea urchin genus with an unusual distribution. *Molecular Ecology* **21(1)**:130-144.
- **Leighton D.L., 1967.** Ecological investigations of sea urchin populations along the Palos Verdes Peninsula. In. North WJ (eds) Annual Report, Kelp Habitat Improvement Project 1966 bis 1967. California Istitute of Technology, Pasadena p 41-54.
- **Levitan D.R., 1991.** Influence of body size and population density on fertilization success and reproductive output in a free-spawning invertebrate. *Biol.Bull.* **181**: 261-268.
- **Levitan DR, Sewell M.A., Chia FS., 1991.** Kinetics of fertilization in sea urchin *Strngylocentrotus franciscanus*: interaction of gamete dilution, age, and contact time. *Biol.Bull.* **181**:371-378.
- **Levitan DR., Sewell M.A., Chia FS., 1992.** How distribution and abundance influence fertilization success in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Ecology* **73(1)**: 248-254.
- **Levitan DR., 1993.** The importance of sperm limitation to the evolution of egg size in marine invertebrates. *Am. Nat.* 141, **4**:517-536.
- **Levitan D.R. & Young C.M. 1995.** Reproductive success in large populations: empirical measures and theoretical predictions of fertilization in the sea biscuit *Clypeaster rosaceus*. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **190**: 221-241.

- **Levitan D.R., Petersen C., 1995.** Sperm limitation in the sea. *Science TREE Vol.10-6*:228-231.
- **Levitan DR., 1996.** Predicting optimal and unique egg sizes in free-spawning marine invertebrates. *Am. Nat.* 148, **1**: 174-188.
- **Levitan D.R., 2000.** Optimal egg size in marine invertebrates: theory and phylogenetic analysis of the critical relationship between egg size and development time echinoids. *Am.Nat*, vol.**156** no.12.
- **Levitan D.R., 2000.** Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Proc.R.Soc.Lond.* **267**:531-534.
- **Levitan D.R., 2002.** The relationship between conspecific fertilization success and reproductive isolation among three congeneric sea urchins. *Evolution* **56(8)**: 1599-1609.
- **Levitan DR., 2005.** The distribution Of male and female reproductive success in a broadcast spawning marine invertebrate. *Integr.Comp.Biol.* **45**:848-855.
- **Levitan DR., 2006.** The relationship between egg size and fertilization success in broadcast-spawning marine invertebrates. *Integr.Comp.Biol.* **46(3)**: 298-311.
- **Levitan DR., 2008.** Gamete traits influence the variance in reproductive success, the intensity of sexual selection, and the outcome of sexual conflict among congeneric sea urchin. *Evolution* **62(6)**: 1305-1316.
- **Lillie F.R., 1915.** Studies of fertilization. VII. Analysis of variations in the fertilizing power of sperm suspensions of *Arbacia*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.Woods Hole* **28**, 229-251.
- **Ling S.D., Johnson C.R., Frusher S., King C.K., 2008.** Reproductive potetial of marine ecosystem engineer at the edge of a newly expanded range. *Glob.Chan.Biol.* **14**: 1-9.
- **Lo Bianco S., 1909.** Notizie biologiche riguardanti specialmente il period di maturità sessuale degli animali del golfo di Napoli. *Mitth.Zool.Stat. Neapel*, **19,4**.
- **Lopez-Almansa J.C., 2004.** Review: Reproductive ecology of riparian elms. *Invest. Agrar. Sist. Recup. For.* **13(1)**: 17-27.
- **Lozano J., Galera J., López S., Turon X., Palacín C., Morera G., 1995.** Biological cycles and recruitment of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar Ecol Prog Ser*, Vol **122**: 179-191.

- **Lumare F., 1979.** Reproduction of *Penaeus kerathurus* using eyestalk ablation. *Aquaculture* **18(3)**: 203-214.
- **Manier M.K. & Palumbi S.R. 2008.** Intraspecific divergence in sperm morphology of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*: implications for selection in broadcast spawners. *BMC Evol.Biol.* 2008, **8**:283.
- **Markow T.A. and O'Grady P., 2008.** Reproductive ecology of *Drosophyla*. *Funct. Ecol.* **22**:747-759.
- **Marshall D.J., Styan C.A., Kenough M.J., 2000.** Intraspecific co-variation between egg and body size affects fertilization kinetics of free-spawning invertebrates. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **195**: 305-309.
- **Marshall D.J., 2002.** In situ measures of spawning synchrony and fertilization success in an intertidal, free-spawning invertebrate. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **236**.113-119.
- **Marshall D.J., Styan C.A., Kenough M.J., 2002.** Sperm environment affects offspring quality in broadcast spawning marine invertebrates. *Ecol.Lett.***5**:173-176.
- **Marshall D.J., Steinberg P.D., Evans J.P., 2004.** The early sperm gets the good egg: mating order effects in free spawners. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **271**: 1585-1589.
- **Marshall D.J., 2005.** Geographical variation in offspring size effects across generation. *Oikos* **108**: 602-608.
- **Marshall D.J., Bolton T.F. 2007.** Sperm release strategies in marine broadcast spawners: the costs of releasing sperm quickly. *J.Exp.Biol.* **210**:3720-3727.
- **Marshall D.J., Keough M.J., 2008.** The relationship between offspring size and performance in the sea. *Am.Nat.* **171**:214-224.
- **Marshall D.J., Bonduriansky R., Bussière L.F., 2008.** Offspring size variation within broods as a bet-hedging strategy in unpredictable environments. *Ecology* **89(9)**: 2506-2517.
- **Maxwell M.R., Macy W.K, Odate S., Honlon R.T., 1998.** Evidence for multiple spawning by squids (*Loligo pealen*) in captivity. *Biol. Bull.* **195**:225-226.
- **McEdward L.R. & Morgan K.H. 2001.** Interspecific relationships between egg size and the level investment per offspring in echinoderms. *Biol.Bull.* **200**:33-50.
- **Meidel S.K. and Scheibling R.E., 1998a.** Annual reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, in differing habitats in Nova Scotia, Canada. *Mar.Biol.* **131**: 461-478.

- **Meidel S.K. and Scheibling R.E. 1998b.** Variation in egg spawning among subpopulations of sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*: theoretical approach. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **213**: 97-110.
- **Meidel S.K., Scheibling R.E., 1999.** Effects of food type and ration on reproductive maturation end growth on the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar. Biol.* **134**: 155-166.
- **Meidel S.K. & Yund P.O. 2001.** Egg longevity and time-integrated fertilization in a temperate sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Biol.Bull.* **201**:84-94.
- **Mori S., 1987.** Divergence in reproductive ecology of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Japanese J. Ichth.* **34(2)**:165-175.
- **Moulin L., Catarino A.I., Claessens T., Dubois P., 2011.** Effects of sea water acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Mar. Poll. Bull.* **62**: 48-54.
- **Muthiga N.A. and McClannan T.R., 2007.** Ecology of *Diadema*. In J.M. Lawrence (ed.) Edible sea urchins: biology and ecology. *Elsevier*, Amsterdam, the Netherlands.
- **O'Donnell M.J., Hammond L.T.M., Hofmann G.E., 2009.** Predicted impact of ocean acidification on a marine invertebrate: elevated CO₂ alters response to thermal stress in sea urchin larvae. *Mar. Biol.* **156**: 439-446.
- **O'Donnell M.J., Todgham A.E., Sewell M.A., Hammond L.T.M., Ruggiero K., Fangué N.A., Zippay M.L., Hofmann G.E., 2010.** Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchin. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **398**: 157-171.
- **Olive P.J.W., 1995.** Annual Breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony. *J.Therm.Biol.* Vol. **20** No.1/2: pp.79-90.
- **Olive P.J.W., Lewis C., Beardall V., 2000.** Fitness components of seasonal reproduction: an analysis using *Nereis virens* as a life history model. *Oceanologica Acta* Vol. **23** n°4.
- **Orr J.C., Fabry V.J., Aumont O., Bopp L., Doney S.D., Feely R.A., Gnanadesikan A., Gruber N., Ishida A., Joos F., Key R.M., Lindsay K., Reimer E.M., Matear R., Monfray P., Mouchet A., Najjar R.G., Plattner G.K., Rodgers K.B., Sabine C.L., Sarmiento J.L., Schlitzer R., Slater R.D., Totterdell I.J., Weirig M.F., Yamanaka**

- Y. & Yoo A. 2005.** Antropogenic ocean acidification over twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* **437**: 681-686.
- **Orton J.H., 1920.** Sea temperature, breeding and distribution of marine animals. *J.Mar.Biol.Ass.UK* **12**: 339-366.
 - **Oyarzun S.T., Marin S.L., Valladares C., Iriarte J.L., 1999.** Reproductive cycle of *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) in two areas of the Magellan region (53°S, 70-72°W), Chile. *Sci. Mar.* **62** (Supl.1): 439-449.
 - **Paine R.T., Vadas R.L., 1969.** The effects of grazing by sea urchins *Strongylocentrotus* spp. On benthic algal population. *Limnol Oceanograf* **14**:710-719.
 - **Palacios E., Ibarra A.M., Racotta I.S., 1999.** Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Paenus vannamei* broodstock. *Aquaculture* **185**: 353-371.
 - **Parker G.A., 1978.** Selection on non-random fusion of gametes during the evolution of anisogamy. *J. theor. Biol.* **73**: 1-28.
 - **Parker L.M., Ross P.M., O'Connor W.A., 2010.** Comparing the effect of elevated $p\text{CO}_2$ and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters. *Mar.Biol.* **157**: 2435-2452.
 - **Pearse J.S., 1981.** Synchronization of gametogenesis in the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S.franciscanus*. In: Clark, W. H. Jr., Adams, T. S. (eds.) Advances in invertebrate reproduction. *Elsevier North Holland, Amsterdam*, p. 53-68.
 - **Pennington T.J., 1985.** The ecology of fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation, and synchronous spawning. *Biol.Bull.* **169**:417-430.
 - **Pennington J.T., Strathmann R.R., 1990.** Consequences of the calcite skeletons of planktonic echinoderm larvae for orientation, swimming, and shape. *Biol.Bull.* **179**: 121-133.
 - **Pianka E.R., 1970.** On r- and k-selection. *Amer. Nat.* **104**: 592-597.
 - **Pianka E.R., 1976.** Natural selection of optimal reproductive tactics. *Amer. Zool.* **16**: 775-784.
 - **Pinnegar J.K., Polunin N.V.C., Francour P., Badalamenti F., Chemello R., Harmelin-Vivien M.-L., Hereu B., Milazzo M., Zabala M., D'Anna G. and Pipitone C., 2000.** Trophic cascades in benthic marine ecosystems: lessons for

fisheries and protected-area management. *Environmental Conservation* **27** (2): 179–200.

- **Podolsky R.D., 2002.** Fertilization ecology of egg coats: physical versus chemical contributions to fertilization success of free-spawned eggs. *J.Exp.Biol.* **205**:1657-1668.
- **Portner, H.O., Langenbuch, M., Michaelidis B., 2005** Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change, *Journal of Geophysical Research* **110**.
- **Portner, H.O., Langenbuch, M., Reipschleger A., 2004.** Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *Journal of Oceanography* **60**: 705-718.
- **Pörtner, H.O., 2008.** Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Marine Ecology Progress Series* **373**: 203–217.
- **Przeslawski R., Ahyong S., Byrne M., Worheides G., Hutchings P., 2008.** Beyond corals and fish: the effects of climate change on noncoral benthic invertebrates of tropical reefs. *Glob. Chan. Biol.* **14**: 2773-2795.
- **Privitera D., Chiantore M., Mangialajo L., Glavic N., Kozul W., Cattaneo-Vietti R., Albertelli G., 2005.** Spatial scale of variability of sea urchins and algal communities in the Dubrovnik Area. *XV Congresso della Società Italiana di Ecologia, Torino 2005*.
- **Privitera D., Chiantore M., Mangialajo L., Glavic N., Kozul W., Cattaneo-Vietti R. 2008.** Inter- and intra-specific competition between *paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* in resource-limited barren areas. *J.Sea Resear.* **60**: 184-192.
- **Quiniou F., Guillou M., Judas A., 1999.** Arrest and delay in embryonic development in sea urchin populations of the Bay of Brest (Brittany, France): link with environmental factors. *Mar. Poll. Bull.* Vol.38, **5**: 401-406.
- **Rahman M.A., Uehara T., Rahman S.M., 2002.** Effects of egg size on fertilization, fecundity and offspring performance: a comparative study between two sibling species of tropical sea urchins (genus *Echinometra*). *P.J.Biol.Sci.* **5(1)**: 114-121.
- **Rahman Md.S., Tsuchiya M., Uehara T., 2009.** effects of temperature on gamete longevity and fertilization success in two sea urchins species, *Echinometra mathei* and *Tripnesteus gratilla*. *Zool.Sci.* **26(1)**: 1-8.

- **Regis, M.B., 1979.** Analyse des fluctuations des indices physiologiques chez deux échinoides (*Paracentrotus lividus* (Lmck) et *Arbacia Lixula* L.) du Golfe de Marseille. *T6thys* **9**:167-181
- **Reitzel AM, Miner BG, McEdward LR., 2004** Relationships between spawning date and larval development time for benthic marine invertebrates: a modelling approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **280**, 13–23.
- **Reitzel A.M., Heyland A., 2007.** Reduction in morphological plasticity in echinoid larvae: relationship of plasticity with maternal investment and food availability. *Evol.Ecol.Res.* **9**: 109-121.
- **Reuter K., Lotterhos K.E., Crim R. N., Thompson C.A., Harley C.D.G., 2011.** Elevated $p\text{CO}_2$ increases sperm limitation and risk of polyspermy in the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*. *Glob. Chan. Biol.* **17**: 163-171.
- **Richmond R.H., Hunter C.L., 1990.** Reproduction and recruitment of corals: comparisons among the Caribbean, the tropical Pacific and the Red Sea. *Mar Ecol Prog Ser* **60**:185–203
- **Riebesell U., Zondervan I., Rost B., Tortell P.D., Richard E.Z., Morel F.M.M. 2000.** Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO_2 . *Nature* **407**: 364-367.
- **Riffell J.A., Zimmer R.K., 2007.** Sex and flow: the consequences of fluid shear for sperm-egg interactions. *J.Exp.Biol.* **210**:3644-3660.
- **Riggio S., Milazzo M., 2004.** Ricchezza specifica e biodiversità marina nell'isola di Ustica. *Naturalista sicil.*, S IV, XXVIII (1), 559-586.
- **Russell M.P., 1998.** Resource allocation plasticity in sea urchins: rapid, diet induced, phenotypic changes in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* (Muller). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **220**: 1-14.
- **Sanchez-Espana A.I., Martinez-pita I., Garcia F.J., 2004.** Gonadal growth and reproduction in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) from southern Spain. *Hydrobiologia* **519**: 61-72.
- **Sala E., 1996.** The role of fishes in the organization of a Mediterranean sublittoral community. These doct, Univ Aix-Marseille II.
- **Sala E., Ribes M., Hereu B., Zabala M., Alvà V., Coma R., Garrabou J., 1998.** Temporal variability in abundance of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and

Arbacia lixula in the northwestern Mediterranean: comparison between a marine reserve and an unprotected area. *Mar Ecol Prog Ser*, Vol. **168**: 135-145.

- **Sewell M.A., Young C.M., 1999.** Temperature limits to fertilization and early development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **236**:291-305.
- **Shirayama Y, Thornton H., 2005.** Effect of increased atmospheric CO₂ concentration on shallow water marine benthos. *J Geophys Res* **110**:108–115.
- **Shpigel M., McBride S.C., Marciano S., Lupatsch I., 2004.** The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of european sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* **232**:343-355.
- **Smith C., Reichand M., Juragda P., Przybylski M., 2004.** The reproductive ecology of the European bitterling (*Rhodeus sericeus*). *J. Zool. Lond.* **262**: 107-124.
- **Sodergren E., Weinstock G.M., Davidson E.H., Cameron R.A., Gibbs R.A., Angerer R.C., Arnone M.I., Burgess D.R., Burke R.D. et al., 2006.** The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **314**: 941-952.
- **Spirlet C., Grosjean P., Jangoux M., 2000.** Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Pparacentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). *Aquaculture* **185**:85-99.
- **Stearns, S., 1992.** The evolution of life histories. Oxford, England: Oxford University Press.
- **Strathmann R.R, Fenaux L., Strathmann M.F., 1992.** Heterochronic developmental plasticity in larval sea urchins and its implications for evolution of nonfeeding larvae. *Evolution* **46**: 972-986.
- **Strathmann R.R., Grunbaum D., 2006.** Good eaters, poor swimmers: compromises in larval form. *Integr.Comp.Biol.* **46(3)**:312-322.
- **Styan C.A., 1998.** Polyspermy, egg size, and the fertilization kinetics of free-spawning marine invertebrates. *American naturalist* **152**: 290-297.
- **Tavares Y.A.G., Kawall H.G. and Borzone C.A., 2004.** Biochemical changes the gonad in relation to the reproductive cycle of *Echinometra lucunter* and *Arbacia lixula* in southern Brazil. In: LAWRENCE JM AND GUZMAN O (Eds), *Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture: proceedings of the International Conference on Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture, Puerto Varas, March 2003. DEStech Publications Inc., Lancaster, Pennsylvania*, p. 147–155.

- **Tomas F., Romero J., Turon X., 2005.** Experimental evidence that intra-specific competition in seagrass meadows reduces reproductive potential in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck). *Sci. Mar.* **69**: 475-484.
- **Thomas F.I.M., 1994.** Physical properties of gametes in three sea urchins species. *J.Exp.Biol.* **194**:263-284.
- **Thomas C.D., Franco A.M.A., Hill J.K., 2006.** Range retractions and extinction in the face of climate warming. *Trends Ecol. Evol.* Vol.21 **8**: 415-416.
- **Thompson R.J., 1982.** The relationship between food ration and reproductive effort in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Oecologia* **56**: 50-57.
- **Thornton H., Shirayama Y., 2001.** III-1 Effect on benthic organisms. In: CO₂ ocean sequestration and its biological impacts. *Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish.* **67(4)**: 756-757.
- **Thorson G., 1950.** Reproductive and larval of ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Revs.* **25**: 1-45
- **Timourian H., Hubert C.E., Stuart R.N., 1972.** Fertilization in the sea urchin as a function of sperm-to-egg ratio. *J.Reprod.Fert.* **29**:381-385.
- **Trimmer J.S., Vacquier V.D., 1986.** Activation of sea urchin gametes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **2**: 1-26.
- **Uthicke S., Schaffelke B., Byrne M., 2009.** A boom-bust phylum? Ecological and evolutionary consequences of density variations in echinoderms. *Ecol Mon* **79**: 3–24.
- **Vailington D., Rosolofonirina R., Jangoux M., 2005.** Reproductive cycle of edible echinoderms from the Southwestern Indian Ocean. *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* **4(1)**: 47-60.
- **Vogel H., Czihak G., Chang P., Wolf W., 1982.** Fertilization kinetics of the sea urchin eggs. *Math.Biosci.***58**: 189-216.
- **Wahle R.A., Gilbert A.E., 2002.** Detecting and quantifying male sea urchin spawning with time-integrated fertilization assays. *Mar.Biol.* **140**:375-382.
- **Walker M.M., 1981.** Influence of season on growth of the sea urchin *Evechinus chloroticus*. *NZ Journal Mar. Fre. Res.* **15**:201:205.
- **Walker W.C., Harrington, Lesser P.M, Fagerberg R.W., 2005.** Nutritive phagocyte incubation chambers provide a structural and nutritive microenvironment for germ cells of *Stongylocentrotus droebachiensis*, the green sea urchin. *Biol.Bull.* **209**: 31-48.

- **Widdicombe S., Spicer J.I., 2008.** Predicting the impact of ocean acidification in benthic biodiversity: what can animal physiology tell us? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **366**: 187–197.
- **Williamson J.E., Steinberg P.D., 2002.** Reproductive cycle of the sea urchin *Holopneustes purpureescens* (Temnopleuridae: Echinodermata). *Mar.Biol.***140**: 519-532.
- **Williams G.C., 1966.** Natural Selection, the Costs of Reproduction, and a Refinement of Lack's Principle. *American Naturalist, Volume 100*: 687-690.
- **Williams G.C., 1975.** Sex and evolution. Princeton University Press, Princeton, N.J., pp.210.
- **Williams M.E., Bentley M.G., 2002.** Fertilization success in marine invertebrates: the influence of gamete age. *Biol.Bull.* **202**:34-42.
- **Wood H.L., Spicer J.I., Widdicombe S., 2008.** Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proc.R.Soc.B.* **275**: 1767–1773.
- **Vance R., 1973.** On reproductive strategies in marine benthic invertebrates. *American Naturalist*, **107**: 339-352.
- **Young C.M., Tyler P.A., Fenaux L., 1997.** Potential for deep sea invasion by Mediterranean shallow water echinoids: pressure and temperature as stage-specific dispersal barriers. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* **154**: 197-209.
- **Yund P.O., Meidel S.K., 2003.** Sea urchin spawning in benthic boundary layers: are eggs fertilized before advecting away from females? *Limnol.Oceanogr.* **48(2)**:795-801.
- **Yund P.O., 2000.** How severe is sperm limitation in natural populations of marine free-spawners? *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 10-13.

10. Ringraziamenti

I miei più sinceri ringraziamenti vanno a tutto lo staff del laboratorio di Ecologia Marina. Cominciando dalla Dott.sa Paola Gianguzza che mi ha sostenuta e incoraggiata durante i tre anni di dottorato, al Prof. Silvano Riggio per la passione e la curiosità per la scienza trasmessa durante questi anni. Un particolare ringraziamento a tutti i colleghi ed amici del laboratorio, con i quali abbiamo condiviso anni di lavoro, avventure e disavventure sul campo, i dott.: Davide Agnetta, Chiara Bonaviri, Emanuela Butera, Francesco Di Trapani, Nicola Galasso, Davide Perricone e Claudia Scianna.

Un profondo ringraziamento alla Prof.ssa MariaTeresa Musmeci per avermi insegnato e avviato allo studio dell'istologia, fondamentale nello svolgimento di questa tesi, e per avermi insegnato a lavorare con sicurezza e determinazione. Ringrazio anche il Prof. Fabrizio Gianguzza che ha messo a disposizione in questi anni il suo laboratorio e il suo staff per lo svolgimento di gran parte del lavoro, che con fiducia e positività mi ha sostenuta e ha creduto in me.

Un ringraziamento va alla Capitaneria di Porto di Palermo e alla Delegazione di Spiaggia di Ustica. Questa tesi fa parte del progetto di ricerca "Monitoraggio delle popolazioni di *Paracentrotus lividus* e *Arbacia lixula* ai fini della tutela della diversità biologica dell'AMP 'Isola di Ustica'" finanziato dal M.A.T.T.M. (Ministero dell'Ambiente e della Difesa del Territorio e del Mare).

Desidero ringraziare tutta la mia famiglia per avermi supportata e sopportata in questi anni e avere creduto in questo sforzo ed investimento, sperando in un futuro pieno di felicità.

Ringrazio tutti i miei amici, vicini e lontani (difficilmente elencabili!), e Marco per avermi sopportato in tutti questi anni con le lezioni sui ricci e sull'ambiente, per avermi fatto compagnia, incoraggiata, distratta e avermi fatto divertire sempre.