



Variabilità nel numero di paragnati in popolazioni di *Hediste diversicolor* (Polychaeta, Nereididae) del Mediterraneo occidentale

Ferruccio Maltagliati^{a*}, Lucia Massaro^a, Piero Cossu^b, Alberto Castelli^a

^a Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, Università di Pisa, Via A. Volta 6, Pisa, 56126, Italy

^b Dipartimento di Zoologia e Antropologia Biologica, Università di Sassari, Via F. Muroli 25, Sassari, 07100, Italy

Riassunto

Con il presente lavoro è stata analizzata la variabilità nel numero di paragnati (dentelli chitinosi) presenti sul faringe del polichete di ambienti salmastri *Hediste diversicolor*. Il faringe è classicamente suddiviso in 7 zone distribuite in una cintura mascellare (I-IV) e una orale (V-VII+VIII). L'assenza di paragnati nella zona V è uno dei caratteri diagnostici di *H. diversicolor*. Sono stati raccolti 30 individui in ciascuna delle seguenti località: 1) Fiume Morto e 2) Coltano (Toscana nord occidentale), 3) Migliacciaru (Corsica orientale), 4) Baia di Figari (Corsica sud occidentale) e 5) Stagno di Calich (Sardegna nord occidentale). Il conteggio dei paragnati è stato effettuato allo stereomicroscopio su individui fissati in etanolo al 70%. Per tutte le zone del faringe è stata rilevata una notevole variabilità tra le popolazioni che è risultata significativa mediante ANOVA (tutti i valori di $P < 0.001$). Le due popolazioni corse sono caratterizzate da un numero di paragnati superiore rispetto alle altre e la popolazione di Migliacciaru è risultata più asimmetrica rispetto alle altre. L'ANOVA delle misure di asimmetria ($|II_{sx}-II_{dx}|$, $|IV_{sx}-IV_{dx}|$ e $|VI_{sx}-VI_{dx}|$) ha dato differenziazione significativa tra le popolazioni solo per le zone II e IV. Data la funzione che i paragnati svolgono nell'alimentazione di *H. diversicolor*, le differenze osservate tra le popolazioni suggeriscono che esse sono localmente adattate a condizioni trofiche peculiari. © 2004 SItE. All rights reserved

Parole chiave: *Hediste diversicolor*, paragnati, variabilità morfologica, differenziazione tra popolazioni, asimmetria, ambienti salmastri

1. Introduzione

Le specie di ambienti salmastri tendono a frammentarsi in popolazioni localmente adattate che si differenziano sia dal punto di vista morfologico che da quello genetico a causa dell'evoluzione indipendente dovuta all'isolamento (Muus, 1967; Cognetti, 1994; Cognetti & Maltagliati, 2000; Bilton et al., 2002). Inoltre, la differenziazione tra le popolazioni è rinforzata dagli adattamenti del ciclo vitale della maggior parte delle specie tipiche di

questi ambienti. In linea generale, infatti, le specie di ambienti salmastri sono caratterizzate da un basso potenziale per la dispersione, dato lo stile di vita sedentario degli adulti ed essendo prive di stadi larvali pelagici. In certi casi è stata anche rilevata sottostrutturazione delle popolazioni all'interno dei singoli biotopi dovuta alla presenza *i*) di substrato disponibile per l'insediamento (Camilli et al., 2001), *ii*) di "tipi genetici" rilevabili in simpatria o parapatia (Röhner et al., 1997), o *iii*) a forti gradienti di inquinamento (Virgilio et al., 2003).

Il polichete nereide *Hediste diversicolor* (O. F. Müller, 1776) è una specie comune dell'infauna dei

* Autore per la corrispondenza. Tel.: +39-050-2219006; fax: +39-050-49694; e-mail: maltagli@discat.unipi.it.

biotopi salmastri presenti lungo le coste atlantiche del Nord America e dell'Europa, del Mare del Nord, del Mar Baltico, del Mediterraneo e del Mar Nero (Chambers & Garwood, 1992). Data la sua ampia distribuzione e la sua relativa abbondanza, *H. diversicolor* è stata utilizzata da vari Autori come modello sperimentale per svariati tipi di studi, che vanno dall'analisi della resistenza fisiologica allo stress ambientale fino all'adattamento genetico. In particolare è stata messa in evidenza differenziazione tra le popolazioni su base morfologica (Muus, 1967; Garcia-Arberas & Rallo, 2001; Khlebovich & Komendantov, 2002), fisiologica (Smith, 1964; Hateley et al., 1989; Grant et al., 1989; Nithart, 2000), demografica (Garcia-Arberas & Rallo, 2002 e bibliografia contenuta) e genetica (Hateley et al., 1992; Abbiati & Maltagliati, 1996; Röhner et al., 1997; Scaps et al., 2001; Virgilio et al., 2003; Virgilio & Abbiati, 2004). Gli elevati livelli di differenziazione rilevati tra le popolazioni sono stati spiegati in base dell'isolamento cui sono soggette le popolazioni e/o i diversi regimi selettivi cui sono sottoposte.

Con il presente studio si intende verificare le ipotesi di *i*) differenziazione morfologica delle popolazioni e *ii*) sottostrutturazione morfologica all'interno delle singole popolazioni di *H. diversicolor* mediante l'uso del numero e della distribuzione dei paragnati presenti sulle zone del faringe.

I paragnati sono dentelli chitinosi distribuiti in gruppi discreti sulle due cinture che contraddistinguono il faringe (Muus, 1967): le zone da I a IV formano la cintura mascellare, mentre quelle da V a VII-VIII formano la cintura orale (Fig. 1). La funzione dei paragnati è strettamente legata al comportamento alimentare (Barnes & Head, 1977; Hateley et al., 1992). Una componente ereditabile della variazione del numero dei paragnati sul faringe è stata dimostrata da Hateley et al. (1992) per almeno quattro delle sei zone, pertanto i paragnati possono essere considerati marcatori morfologici adatti al nostro studio. È stato provato che il numero dei paragnati presenti sul faringe è un carattere efficace per verificare il differenziamento tra le popolazioni di specie di nereididi (Muus, 1967; Barnes & Head, 1977; Barnes, 1978; Gillet, 1990; Khlebovich et al., 1982; Hateley et al., 1992) ed anche per distinguere

complessi di specie, specialmente quando usato insieme a marcatori genetici (e.g. Scaps et al., 2000; Maltagliati et al., 2001). In passato sono stati effettuati tentativi di individuare una relazione tra la distribuzione ed il numero di paragnati con la granulometria del sedimento, la salinità e la latitudine (Barnes, 1978; Gillet, 1990), ma tali studi non hanno fornito risultati significativi.

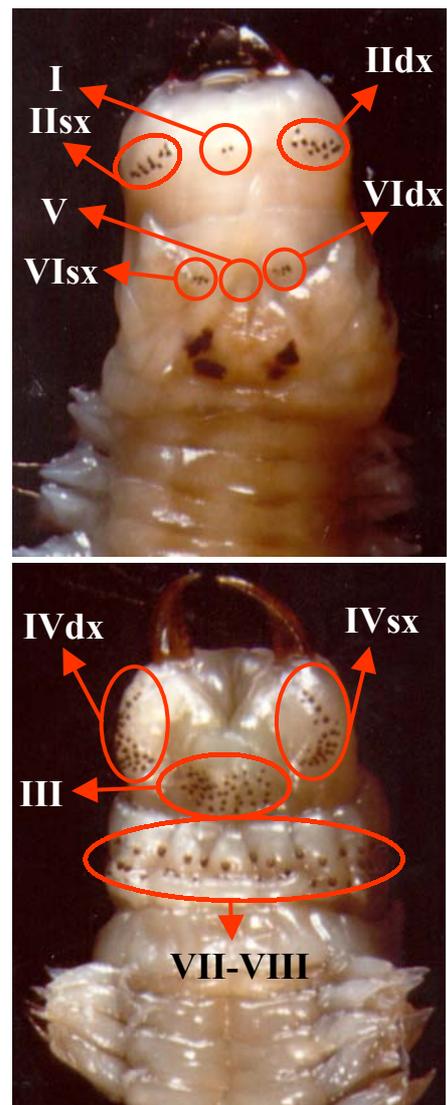


Fig. 1. Visione dorsale e ventrale della parte anteriore di un individuo fissato in etanolo al 70% con il faringe estroflesso. I numeri romani si riferiscono alle zone del faringe. Da rilevare che l'assenza di paragnati nella zona V è un carattere diagnostico della specie.

2. Materiali e metodi

I campioni di *H. diversicolor* utilizzati nel presente lavoro sono stati raccolti da cinque biotopi salmastri mediterranei nell'estate del 2002: 1) Fiume Morto (FMO, Toscana nord-occidentale: 43°44'N, 10°16'E), 2) Coltano (COL, Toscana nord-occidentale: 43°40'N, 10°22'E), 3) Migliacciaru (MIG, Corsica orientale: 42°0'N, 9°22'E), 4) Figari Bay (FIG, Corsica sud-occidentale: 41°29'N, 9°04'E), e 5) stagno di Calich (CAL, Sardegna nord-occidentale: 40°35'N, 8°17'E) (Fig 2).



Fig. 2. Siti di campionamento.

Per ciascuna località sono stati prelevati trenta esemplari rimuovendo blocchi di fango con una zappa in zone salmastre con basso fondale (<30 cm) e separando manualmente gli individui dal sedimento. Successivamente i campioni sono stati posti in contenitori termoisolati con acqua del sito di campionamento areata. In laboratorio gli individui sono stati sciacquati in acqua distillata, asciugati su carta assorbente e fissati in etanolo al 70% con il faringe everso. L'eversione del faringe è

stata provocata mediante pressione tra pollice ed indice a livello del III-V setigero. I paragnati sulle zone del faringe sono stati contati mediante stereoscopio.

I dati sono stati analizzati mediante il programma STATISTICA 5.1 (StatSoft Inc., 1997). Per stimare l'asimmetria nella distribuzione dei paragnati delle zone pari, abbiamo definito il seguente coefficiente:

$$A = |II dx - II sx| + |IV dx - IV sx| + |VI dx - VI sx|.$$

Per valutare la differenziazione tra le popolazioni è stata applicata l'analisi della varianza sia alle zone del faringe sia alle misure di asimmetria.

Sulla base di una matrice individuale delle distanze euclidee standardizzate, sono state applicate l'analisi delle componenti principali (PCA) ed il multidimensional scaling non metrico (nMDS).

3. Risultati e discussione

3.1. Modelli di distribuzione dei paragnati

Le medie, le deviazioni standard e gli intervalli del numero di paragnati in ciascuna zona del faringe per tutte le popolazioni sono riportati in Tab. 1. In generale gli istogrammi della distribuzione del numero dei paragnati per tutte le zone del faringe sono unimodali e approssimativamente simmetrici (dati non riportati).

Le correlazioni tra zone sono tutte positive tranne due (Tab. 2). La maggior parte di esse sono statisticamente significative con l'eccezione di quattro casi, tutti comprendenti la zona VII-VIII. L'analisi delle componenti principali (Tab. 3) conferma le conclusioni sulle interrelazioni presenti tra zone rilevate da Barnes & Head (1977) e da Hateley et al. (1992). I paragnati nelle zone della cintura mascellare (zone I-IV) sono strettamente associati tra loro (elevati "loadings" sull'asse 1). Nella cintura orale le zone VI_{sx} and VI_{dx} non sono strettamente correlate con il gruppo VII-VIII, né esiste alcuna correlazione tra la cintura mascellare e quella orale. Ciò è indicato dagli elevati "loadings"

per le zone VI e VII-VIII rispettivamente sugli assi 3 e 2.

Tabella 1. Numero medio di paragnati (\pm deviazione standard) ed intervallo per ciascuna zona del faringe nelle cinque popolazioni di *H. diversicolor* analizzate.

popolazione	zona									totale
	I	II _{dx}	II _{sx}	III	IV _{dx}	IV _{sx}	VI _{dx}	VI _{sx}	VII-VIII	
Fiume Morto	2.067	11.633	10.900	28.033	18.467	18.867	5.567	5.667	30.900	132.100
\pm dev. std	± 1.048	± 2.553	± 3.155	± 5.203	± 3.875	± 3.739	± 1.278	± 1.768	± 4.678	± 15.166
(intervallo)	(0-5)	(7-17)	(7-17)*	(19-44)	(11-29)	(11-31)	(3-8)	(2-10)	(19-40)	
Coltano	2.167	13.067	11.867	35.167	20.000	19.567	6.333	6.233	31.733	146.133
\pm dev. std	± 1.177	± 3.657	± 2.556	± 5.266	± 3.373	± 2.967	± 1.373	± 1.775	± 5.959	± 13.866
(intervallo)	(0-5)	(8-28)	(7-20)	(25-45)	(15-30)	(15-30)	(4-10)	(3-10)	(17-45)	
Migliacciaru	5.633	17.100	17.867	45.267	21.933	22.600	6.400	6.333	30.033	173.167
\pm dev. std	± 1.938	± 5.228	± 4.495	± 9.017	± 6.943	± 8.613	± 1.589	± 1.845	± 8.640	± 28.663
(intervallo)	(2-9)	(7-28)*	(11-29)*	(25-63)	(6-35)	(4-36)	(3-10)	(3-10)	(17-45)*	
Figari	6.900	26.767	26.200	48.600	31.600	30.867	7.967	8.167	29.967	217.033
\pm dev. std	± 1.729	± 5.211	± 3.764	± 6.414	± 5.691	± 5.501	± 2.092	± 1.464	± 3.864	± 23.395
(intervallo)	(5-12)	(17-39)	(19-34)	(39-59)	(22-46)	(22-44)	(5-13)	(5-11)	(20-40)	
Calich	2.300	16.300	17.133	25.800	19.621	19.967	4.967	4.767	24.567	134.767
\pm dev. std	± 1.055	± 5.396	± 4.083	± 4.627	± 4.419	± 3.605	± 1.326	± 1.040	± 5.703	± 16.652
(intervallo)	(0-4)	(4-28)*	(7-25)	(18-43)	(11-29)	(16-30)	(2-9)	(2-7)	(12-35)	

* almeno un individuo non aveva paragnati in questa zona, ma non è stato considerato come minimo.

Tabella 2. Correlazioni di Spearman tra le varie zone del faringe.

	I	II _{dx}	II _{sx}	III	IV _{dx}	IV _{sx}	VI _{dx}	VI _{sx}
II _{dx}	0.646***							
II _{sx}	0.675***	0.759***						
III	0.686***	0.521***	0.521***					
IV _{dx}	0.526***	0.646***	0.468***	0.501***				
IV _{sx}	0.618***	0.549***	0.683***	0.583***	0.667***			
VI _{dx}	0.378***	0.357***	0.380***	0.547***	0.300***	0.302***		
VI _{sx}	0.382***	0.351***	0.387***	0.539***	0.446***	0.389***	0.659***	
VII-VIII	0.070 ^{ns}	-0.100 ^{ns}	-0.037 ^{ns}	0.362***	0.172*	0.122 ^{ns}	0.271***	0.281***

* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; ^{ns} non significativo.

L'analisi delle asimmetrie ha dato un coefficiente medio di asimmetria marcatamente più elevato nella popolazione di Migliacciaru (Tab. 4).

3.2. Differenze tra le popolazioni

I risultati del presente lavoro hanno mostrato che il numero di paragnati presenti sul faringe differenzia le popolazioni. L'analisi della varianza ha messo in evidenza che le differenze tra le popolazioni sono significative per tutte le zone del faringe e per il numero totale di paragnati ($P < 0.001$). L'analisi della varianza applicata alle

misure di asimmetria ha rilevato significatività per le zone II e IV ($P < 0.001$), ma non per la zona VI ($P = 0.270$).

L'ordinamento degli individui di *H. diversicolor* nello spazio bidimensionale effettuato mediante nMDS non ha separato chiaramente le popolazioni (Fig. 3). È da rilevare comunque che, nonostante le evidenti sovrapposizioni, sul grafico sono evidenziabili nubi di punti corrispondenti ad individui co-popolazionali. Non sono pertanto rilevabili relazioni apprezzabili tra la differenziazione morfologica e la distribuzione geografica.

Tabella 3. Componenti principali estratte dalla matrice di correlazione. I valori maggiori di 0.7 sono riportati in grassetto.

	Eigenvalore	Numero del fattore		
		1	2	3
		4.854	1.273	0.859
	Zona del faringe		Coefficiente del fattore	
Cintura mascellare	I	0.793	0.051	0.315
	IIdx	0.776	-0.199	0.338
	IIsx	0.809	-0.205	0.300
	III	0.669	0.306	0.427
	IVdx	0.775	0.217	0.182
	IVsx	0.866	0.087	0.055
Cintura orale	VIdx	0.218	0.012	0.910
	VIsx	0.304	0.225	0.786
	VII-VIII	0.014	0.945	0.136

3.3. Sottostrutturazione delle popolazioni

I risultati del presente lavoro permettono di rigettare l'ipotesi di sottostrutturazione su base morfologica delle popolazioni di *H. diversicolor* analizzate. Viene confermata pertanto l'ipotesi che *H. diversicolor* è in grado di disperdersi all'interno dei singoli biotopi (Davey & Gorge, 1984; Dankers & Binsbergen, 1984; Hateley et al., 1992) rendendo omogenee le popolazioni. I nostri risultati contrastano con la sottostrutturazione rilevata da Virgilio et al. (2003) nella popolazione della laguna Pialassa (Ravenna) mediante marcatori alloenzimatici. Questi Autori hanno ipotizzato che un forte gradiente di inquinamento presente nella zona produrrebbe sottostrutturazione mediante selezione.

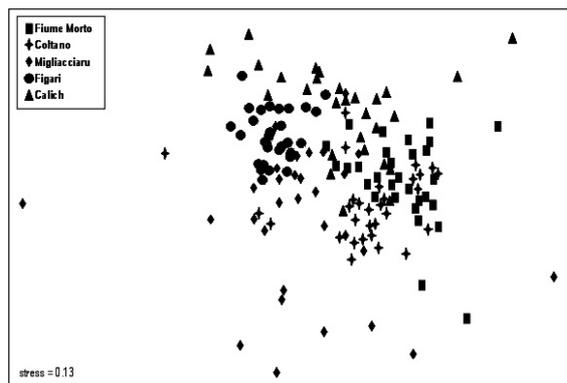


Fig. 3. Ordinato bidimensionale degli individui di *H. diversicolor* effettuato tramite multidimensional scaling basato sulla matrice delle distanze euclidee standardizzate.

Tabella 4. Valori medi del coefficiente di asimmetria, *A* (\pm deviazione standard), nelle popolazioni analizzate.

popolazione	<i>A</i>
Fiume Morto	5.567 \pm 2.873
Coltano	5.933 \pm 6.142
Migliacciaru	14.367 \pm 12.751
Figari	7.367 \pm 4.081
Calich	5.800 \pm 4.759

I biotopi considerati nel presente lavoro non appaiono soggetti a particolari tipi di inquinamento, fatta eccezione per il Fiume Morto che è pesantemente soggetto ad inquinamento, prevalentemente di tipo organico da scarichi urbani. Comunque, nonostante ciò, in questo biotopo non sono presenti evidenti gradienti, che possano generare sottostrutturazione della popolazione di *H. diversicolor* presente.

I nostri risultati non evidenziano neppure nelle popolazioni di *H. diversicolor* da noi analizzate la presenza di "tipi genetici" presenti in simpatria o parapatria che possono produrre tipi ibridi, come rilevato da Röhner et al. (1997) in popolazioni del Mare del Nord e del Mar Baltico, mediante analisi genetiche.

Va comunque sottolineato che l'ipotesi di presenza di sottostrutturazione nelle popolazioni di *H. diversicolor* analizzate nel presente lavoro deve essere verificata utilizzando altri tipi di marcatori (genetici), in quanto il numero e la distribuzione dei paragnati potrebbero costituire marcatori non

sufficientemente sensibili per l'individuazione di suddivisioni molto fini. Il presente lavoro conferma l'efficacia dei paragnati per valutare il grado di differenziamento presente tra le popolazioni di *H. diversicolor*.

4. Bibliografia

- Abbiati, M. & Maltagliati, F. (1996) Allozyme evidence of genetic differentiation between populations of *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) from the Western Mediterranean *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **76**, 637-647.
- Barnes, R.S.K. (1978) Variation in paragnath number of *Nereis diversicolor* in relation to sediment type and salinity regime. *Estuarine and Coastal Marine Science*, **6**, 275-283.
- Barnes, R.S.K. & Head, S.M. (1977) Variation in paragnath number in some British populations of the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*. *Estuarine and Coastal Marine Science*, **5**, 771-781.
- Bilton, D.T., Paula, J. & Bishop, J.D.D. (2002) Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **55**, 937-952.
- Camilli, L., Castelli, A., Lardicci, C. & Maltagliati, F. (2001) Evidence for high levels of genetic divergence between populations of the bivalve *Mytilaster minimus* from a brackish environment and two adjacent marine sites. *Journal of Molluscan Studies*, **67**, 506-510.
- Chambers, S.J. & Garwood, P.R. (1992) *Polychaetes from Scottish waters. A guide to identification. Part 3. Family Nereidae*. National Museum of Scotland: Edinburgh.
- Cognetti, G. (1994) Colonization of brackish waters. *Marine Pollution Bulletin*, **28**, 583-586.
- Cognetti, G. & Maltagliati, F. (2000) Biodiversity and adaptive mechanisms in brackish water fauna. *Marine Pollution Bulletin*, **40**, 7-14.
- Dankers, N. & Binsbergen, M.A. (1984) The polychaete *Nereis diversicolor* is also migrating. *De Levende Natuur*, **84**, 14-15.
- Davey, J.T. & George, C.L. (1986) Species interactions in soft sediments: factors in the distribution of *Nereis (Hediste) diversicolor* in the Tamar estuary. *Ophelia*, **26**, 151-164.
- Garcia-Arberas, L. & Rallo, A. (2001) Variations in paragnath number of *Hediste diversicolor* from the Basque coast, in relation to habitat conditions *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **80**, 733-734.
- Garcia-Arberas, L. & Rallo, A. (2002) Life cycle, demography and secondary production of the polychaete *Hediste diversicolor* in a non-polluted estuary in the Bay of Biscay. *P.S.Z.N.I. Marine Ecology*, **23**, 237-251.
- Gillet, P. (1990) Variation intraspécifique des paragnaths chez *Nereis diversicolor* (Annélides, Polychètes) de l'Atlantique nord-est. *Vie et Milieu*, **40**, 297-303.
- Grant, A., Hateley, J.G. & Jones, N.V. (1989) Mapping the ecological impact of heavy metals on the estuarine polychaete *Nereis diversicolor* using inherited metal tolerance. *Marine Pollution Bulletin*, **20**, 235-236.
- Hateley, J.G., Grant, A. & Jones, N.V. (1989) Heavy metal tolerance in estuarine populations of *Nereis diversicolor*. *Reproduction, genetics and distribution of marine organisms* (eds J.S. Ryland & P.A. Tyler), pp. 379-384. Olsen & Olsen, Fredensborg.
- Hateley, J.G., Grant, A., Taylor, S.M. & Jones, N.V. (1992) Morphological and other evidence on the degree of genetic differentiation between population of *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **72**, 365-381.
- Khlebovich, V.V. & Komendantov, A.Y. (2002) Temporary variation of paragnath arrangement in *Hediste diversicolor* and *H. japonica* (Polychaeta, Nereididae). *Zoologicheskij Zhurnal*, **81**, 503-505.
- Khlebovich, V.V., Komendantov, A.Y. & Yakovishina, L.A. (1982) On variation of paragnath number in *Nereis diversicolor*, *N. japonica* and *N. limnicola* (Polychaeta, Nereidae). *Zoologicheskij Zhurnal*, **62**, 1110-1113.
- Maltagliati, F., Camilli, L., Lardicci, C. & Castelli, A. (2001) Evidence for morphological and genetic divergence in *Perinereis cultrifera* (Polychaeta, Nereididae) from two habitat types at Elba Island (Italy) *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **81**, 411-414.
- Muus, B.J. (1967) Some problems facing the ecologist concerning races and subspecies of brackish water animals. *Estuaries* (ed. G.H. Lauff), pp. 558-563. American Association for the Advancement of Science, Washington.
- Nithart, M. (2000) Comparison of stable carbon and nitrogen isotope signatures of the polychaete *Nereis diversicolor* from different estuarine sites. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **80**, 763-765.
- Röhner, M., Bastrop, R. & Jürss, K. (1997) Genetic differentiation in *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) for the North Sea and the Baltic Sea. *Marine Biology*, **130**, 171-180.
- Scaps, P., Rouabah, A. & Lepretre, A. (2000) Morphological and biochemical evidence that *Perinereis cultrifera* (Polychaeta: Nereididae) is a complex of species *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **80**, 735-736.
- Scaps, P., Demuyne, S., Lepretre, A. & Grumiaux, F. (2001) Electrophoretic heterogeneity in *Hediste diversicolor* (Annelida: Polychaeta) within and between estuaries in Northern France. *Vie et Milieu*, **51**, 99-111.
- Smith, R.I. (1964) On the early development of *Nereis diversicolor* in different salinities. *Journal of Morphology*, **114**, 437-464.
- StatSoft, Inc. (1997) *STATISTICA for Windows* [Computer program manual]. Tulsa, OK. Web site <http://www.statsoft.com>.
- Virgilio, M. & Abbiati, M. (2004) Habitat discontinuity and genetic structure in populations of the estuarine species *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **61**, 361-367.
- Virgilio, M., Barboncini, N., Trombini, C. & Abbiati, M. (2003) Relationships between sediments and tissue contamination and allozymic patterns in *Hediste diversicolor* (Polychaeta Nereididae) in the Pialassa lagoons (north Adriatic Sea). *Oceanologica Acta*, **26**, 85-92.