

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

Analisi morfologica e genetica di *Syllis gracilis* (Polychaeta, Syllidae) in ambienti marini e salmastri.

Relatori:

Prof. A. CASTELLI

Dott. F. MALTAGLIATI

Candidato:

J. LANGENECK

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

Quid hic? Intueri naturam.

Quo munere? Curiosum esse.

Riassunto

Recenti ricerche hanno messo in evidenza in numerosi gruppi di invertebrati marini la presenza, all'interno di quelle classicamente definite su base morfologica come singole specie, di diverse specie criptiche. Tale diversificazione è talvolta legata ad ambienti le cui caratteristiche fisiche determinano forti spinte selettive sugli organismi che li popolano, quali ad esempio gli ambienti salmastri, in altri casi è semplicemente determinata dalla distanza geografica o dalla presenza di barriere alla dispersione. *Syllis gracilis* Grube, 1840, è un polichete che vive nelle concrezioni biogene dei fondi duri superficiali in ambienti costieri marini e salmastri di tutto il Mar Mediterraneo. Allo scopo di approfondire le conoscenze su questa specie a larga ripartizione ecologica e geografica, nel corso di due anni sono stati effettuati numerosi campionamenti in diverse località lungo le coste italiane; la specie in questione, infatti, non è di semplice reperimento, in quanto presenta una distribuzione non uniforme molto probabilmente legata a piccole variazioni di parametri ambientali, ed è stato possibile raccoglierla solo in 13 località situate nel Mar Ligure, nel Mar Tirreno, nel Mar di Sardegna e nel Mar Adriatico. Quattro delle 13 popolazioni raccolte provengono da ambienti di transizione (ambienti salmastri e porti), le altre nove da ambienti marini costieri. In otto località (due salmastre e sei marine) è stato possibile raccogliere un numero rappresentativo di esemplari ($N > 10$). Si prevede di caratterizzare gli individui di *Syllis gracilis* campionati sia morfologicamente, attraverso caratteri semi-quantitativi di univoco rilevamento anche sugli esemplari fissati, sia geneticamente, utilizzando marcatori mitocondriali. Attraverso l'approccio morfologico e genetico si intende testare l'ipotesi di una separazione a livello specifico tra diverse popolazioni e in particolare tra quelle di ambiente marino e di ambiente salmastro, già emersa in precedenti studi.

SOMMARIO

1. Introduzione	4
1.1 Gli ambienti salmastri come <i>hot spot</i> per i processi microevolutivi e la presenza di <i>sibling species</i>	4
1.2 Caratteristiche della specie studiata	6
2. Materiali e metodi	11
2.1 Schema di campionamento e popolazioni campionate	11
2.2 Protocollo di caratterizzazione genetica	16
2.3 Protocollo di caratterizzazione morfologica.....	18
3 Risultati	23
3.1 Struttura genetica delle popolazioni esaminate	23
3.2 Risultato dello studio morfologico.....	26
4 Discussione	34
4.1 Analisi molecolare	34
4.2 Analisi morfologica.....	38
4.3 Osservazioni nomenclaturali sul genere <i>Syllis</i> e su <i>Syllis gracilis</i> in particolare	40
5 Conclusioni	44
6 Bibliografia	47
7 Appendice	56
Ringraziamenti	61

1. Introduzione

1.1 Gli ambienti salmastri come *hot spot* per i processi microevolutivi e la presenza di *sibling species*

Gli ambienti salmastri rappresentano aree di transizione tra l'ambiente dulciacquicolo e quello marino, e presentano peculiari caratteristiche fisiche, che influiscono sugli organismi che li popolano. In queste aree si riscontra una notevole variazione della salinità, che, a causa dell'evaporazione nei mesi estivi, dell'influsso di precipitazioni e dell'eventuale presenza di immissari, assume un intervallo di valori molto più ampio rispetto a quanto si osserva nell'ambiente marino o in quello dulciacquicolo. Si osserva un'ampia variazione anche a livello della temperatura, del pH e della concentrazione di ossigeno disciolto, che influiscono sulla biologia di questi ambienti; infine, anche l'eventuale immissione di inquinanti organici o inorganici ha un effetto molto maggiore rispetto a quanto si osserva in ambienti marini, a causa della limitatezza dell'area, della profondità generalmente bassa e dello scarso ricambio d'acqua. Gli ambienti salmastri, quindi, si configurano in linea generale come ambienti stressati, esposti a rischi di eutrofizzazione, ipossia ed inquinamento; per questo, essi hanno una notevole influenza sui processi microevolutivi, che in queste aree assumono entità e velocità tendenzialmente maggiori rispetto a quanto si osserva in ambienti propriamente marini (Cognetti, 1982; 1994; Cognetti & Maltagliati, 2000; Cognetti et al., 2008).

Nonostante le forze selettive in questi ambienti siano forti, un'impostazione classica li considera troppo instabili per permettere veri e propri processi di speciazione, per cui la pressione ambientale si esplicherebbe in un differenziamento, più o meno marcato e tendenzialmente più morfologico che genetico (plasticità fenotipica), della popolazione nell'ambiente salmastro rispetto a quella marina (Cognetti, 1982). Negli ultimi anni, tuttavia, questo paradigma è stato parzialmente rovesciato, in quanto in molti casi si è giunti a stabilire l'esistenza, all'interno di quelle considerate classicamente come singole specie, di entità riproduttivamente isolate e chiaramente associate ad ambienti salmastri, sia per quanto riguarda gli invertebrati (Maltagliati et al., 2000; 2001; Iannotta et al., 2009), sia per quanto riguarda i vertebrati, che in teoria, avendo generazioni più lunghe, dovrebbero essere meno propensi a questo tipo di speciazione (Trabelsi et al., 2002a; 2002b). Questi organismi, che si configurano come vere e proprie specie distinte, sono tuttavia spesso difficili o impossibili da distinguere senza ricorrere a strumenti molecolari, per un'effettiva congruenza di caratteristiche morfologiche o per la sovrapposizione di caratteri tra specie differenti, che rende di fatto inaffidabili i caratteri morfologici al fine della determinazione (Iannotta et al., 2009; Couceiro et al., 2011).

L'esistenza di *sibling species*, ossia specie strettamente imparentate, riproduttivamente isolate ma impossibili da distinguere su base morfologica (Dobzhansky, 1972; Steyskal, 1972), è stata rilevata

in primo luogo nei protisti (Sonneborn, 1939), ma è diventata presto un'evidenza anche per quanto riguarda i metazoi (Mayr, 1942), nell'ambito dei quali sono stati rilevati numerosi casi, legati a fenomeni di speciazione geografica, di speciazione ecologica oppure semplicemente all'assenza di elementi morfologici affidabili. In questo caso quella che su base morfologica era considerata una specie si rivela essere, invece, un complesso di specie, più o meno isolate a livello riproduttivo, e più o meno distinte a livello di caratteri morfologici. Talora un complesso di specie può essere individuato semplicemente prendendo in considerazione caratteri o combinazioni di caratteri morfologici non considerati nelle precedenti descrizioni (Faulwetter et al., 2011; Nygren & Pleijel, 2011), tuttavia sovente è impossibile trovare elementi morfologici che garantiscano una sicura distinzione tra specie differenti, anche se queste sono riproduttivamente separate e possono presentare fenotipi univocamente attribuibili ad una o all'altra specie, in quanto si riscontra un certo grado di sovrapposizione morfologica (Petraccioli et al., 2010; Sanna et al., 2011; Couceiro et al., 2011). Questo è tanto più vero in ambiente salmastro, dove la forte pressione selettiva tenderà a spingere verso pochi fenotipi resistenti, a prescindere da quanto siano geneticamente vicine le popolazioni considerate.

I policheti rappresentano un gruppo molto interessante dal punto di vista di questo tipo di studi, in quanto comprendono molte specie tradizionalmente definite su base morfologica, la cui distribuzione, gli habitat che frequentano, le profondità cui si ritrovano spesso fanno sospettare la presenza di complessi di specie. Mentre studi genetici, più o meno approfonditi, sono stati condotti per quanto riguarda le famiglie Capitellidae (Grassle & Grassle, 1976), Opheliidae (Britton-Davidian & Amoureux, 1982; Maltagliati et al., 2004; 2005), Arenicolidae (Cadman & Nelson-Smith, 1990), Spionidae (Manchenko & Radashevsky, 1993; 1994; 1998; 2002; Röhner et al., 1996), Nereididae (Röhner et al., 1997; Sato & Masuda, 1997; Maltagliati et al., 2001; Virgilio et al., 2004; Cossu et al., 2012; Glasby et al., 2013), Parergodrilidae (Schmidt & Westheide, 2000), Orbiniidae (Kruse et al., 2003), Phyllodocidae (Nygren et al., 2009; Nygren & Pleijel, 2011) e Amphinomidae (Barroso et al., 2010), la famiglia Syllidae è ancora abbastanza poco conosciuta da questo punto di vista, e la massima parte degli studi si concentra su caratteri morfologici, la cui validità tuttavia non è usualmente comprovata su base genetica (Martin et al., 2003; Lattig et al., 2007; Faulwetter et al., 2011). Ad oggi, la caratterizzazione della struttura di popolazione e l'individuazione di eventuali *sibling species* sono state effettuate su base molecolare solo per quanto riguarda *Petitia amphophthalma* (von Soosten et al., 1998), che ha rivelato una buona connettività tra popolazioni lontane, che si configurano quindi come chiaramente conspecifiche, e *Syllis gracilis* (Maltagliati et al., 2000), l'oggetto di questa tesi.

1.2 Caratteristiche della specie studiata

Syllis gracilis Grube, 1840 (fig. 1) è un polichete considerato molto comune (anche se non abbondante) tanto in ambienti marini quanto in ambienti salmastri, dove frequenta fondi duri a partire dalla zona di marea fino a oltre 300 m di profondità (San Martín, 2003). Si tratta di una *Syllis* di dimensioni medie, superando, seppur raramente, i 30 mm di lunghezza totale, per 0,5 mm di larghezza e oltre 140 chetigeri. La specie si riconosce con facilità in quanto dopo il proventricolo il numero di chete di cui è provvisto il parapodio si riduce drasticamente, e le poche che rimangono, oltre a risultare notevolmente più spesse, risultano modificate per fusione dell'articolo con il pezzo basale ed assumono una struttura a Y (fig. 2b). Le chete composte presenti ai primi chetigeri sono provviste di articoli vistosamente bidentati, in evidente gradazione dorso-ventrale (2a); verso il pigidio si assiste alla scomparsa delle chete a Y, che vengono di nuovo sostituite da chete composte simili a quelle della parte anteriore. Altri caratteri tipici di questa specie sono i cirri dorsali decisamente brevi, provvisti di 8-10 articoli, e la presenza di due bande scure trasversali su ogni chetigero anteriore, via via più sbiadite andando verso la parte posteriore del corpo. L'unico carattere realmente diagnostico è la presenza delle chete a Y, per quanto probabilmente anch'esso sia stato sopravvalutato (vedi cap. 4.3). Talora i giovanili sono sprovvisti di chete ad Y, o ne presentano solo accenni, per cui possono essere confusi con facilità con *Syllis armillaris* (Müller, 1771) o *Syllis hyalina* Grube, 1863, piuttosto simili per quanto riguarda la struttura di acicule, chete composte e cirri dorsali. Per quanto la maggior parte delle *Syllis gracilis* sia provvista di strie trasversali decisamente marcate che non sbiadiscono in alcol, la colorazione risulta un elemento di scarsa affidabilità, sia perché la sfumatura di fondo, che determina in parte l'accentuazione delle strie, dipende fortemente dall'alimentazione dell'animale, e conseguentemente dall'habitat in cui vive, sia perché è abbastanza comune trovare individui che sono sprovvisti di fasce trasversali, ma sono indubbiamente attribuibili a questa specie (Fig. 1b). Inoltre, il pattern con due strie trasversali su ogni chetigero è condiviso da altre specie del genere *Syllis*, anche non strettamente imparentate con *S. gracilis*.



Figura 1 – a: *Syllis gracilis* nella forma tipica, provvista di due bande trasversali scure su ogni chetigero (Sassoscritto);
b: *Syllis gracilis* nella forma priva di bande trasversali scure (porto di Livorno).



Figura 2: a – chete composte di *Syllis gracilis* (chetigero 12-13); **b –** chete a Y e di transizione di *Syllis gracilis* (chetigero 17-18). Si intravede in secondo piano il cirro dorsale; ambedue le fotografie sono riferite all'esemplare ritratto in Fig. 1b.

Syllis gracilis è una specie legata a concrezioni biogene e a comunità caratterizzate da organismi biocostruttori; in ambiente marino si trova comunemente in concrezioni algali (San Martín, 2003), spugne (Voultsiadou-Koukoura et al., 1987), reef a vermetidi (Ben Eliahu, 1977) o a *Sabellaria* (Cole & Chapman, 2007) e concrezioni coralligene basate su rodofite e metazoi ermatipici (Casellato & Stefanon, 2008), mentre in ambienti salmastri è un caratteristico abitatore degli agglomerati di serpulidi, costruiti da *Hydroides* sp. e *Ficopomatus enigmaticus* (Nonnis Marzano et al., 2007). In ambiente salmastro può essere sporadicamente trovata su fondo mobile, tuttavia non con le densità che raggiunge su fondo duro; risulta parimenti una specie sporadica nelle comunità dominate da *Mytilus* sp., dove sono più frequenti altre specie di *Syllis* (osservazioni personali). La

specie è moderatamente tollerante nei confronti dell'inquinamento organico ed inorganico, e si trova comunemente nelle comunità di fondo duro delle aree portuali (Bedini et al., 2003 e presente studio).

Per quanto riguarda la biogeografia, *Syllis gracilis* è comunemente considerata una specie cosmopolita, presente in mari temperati e tropicali (San Martín, 2003) ma segnalata anche in acque decisamente più fredde (Stewart et al., 1985; Hansson, 1987). Per quanto riguarda il bacino atlanto-mediterraneo risulta segnalata per l'intero Mediterraneo (Musco & Giangrande, 2005a), per il Mar Nero (Şahin & Çinar, 2012), per l'Atlantico orientale, sia settentrionale (Hansson, 1987; Muller, 2004; Cacabelos et al., 2010) che meridionale (Day, 1967) e per l'Atlantico occidentale, settentrionale (Wenner et al., 1984; Stewart et al., 1985), centrale (Fauchald et al., 2009; Liñero-Arana & Díaz Díaz, 2011) e meridionale (Elías et al., 2006). La specie è tuttavia nota anche per l'Oceano Pacifico, settentrionale (Imajima, 2003), centrale (Fauchald, 1977; Capa et al., 2001; Hernández-Alcantara et al., 2003) e meridionale (Ehlers, 1901; Hutchings & Murray, 1984), nonché per l'Oceano Indiano, orientale (Tan & Chou, 1993) ed occidentale (Al-Farraj et al., 2012), compreso il Mar Rosso (Gravier, 1900), e per l'Antartide (Hartman, 1964). Per quanto siano note, tra i policheti, specie che presentano al contempo un'ampia distribuzione e una buona connettività tra popolazioni distanti (Schmidt & Westheide, 2000), l'ampia distribuzione di questa specie porta a sospettare che si tratti, in realtà, di un complesso di specie. Peraltro, la forma dell'Oceano Pacifico è stata descritta con altri nomi (Grube, 1868; Gravier, 1900; Ehlers, 1901) e risulta probabilmente distinguibile a livello morfologico, anche tenendo conto che una recente ricostruzione filogenetica ha messo in evidenza la polifilia di *Syllis gracilis* come odiernamente inteso, in quanto le popolazioni dell'Oceano Pacifico sono più strettamente imparentate con *Syllis ypsiloides* Aguado et al., 2008 che non con le *Syllis gracilis* atlantiche esaminate (Aguado et al., 2012).

A livello delle popolazioni atlanto-mediterranee di *Syllis gracilis*, tuttavia, un'indagine condotta attraverso marcatori alloenzimatici ha condotto a ritenere che le popolazioni di ambiente salmastro e le popolazioni di ambiente marino risultino differenziate a livello specifico (Maltagliati et al., 2000). In questo studio sono state prese in considerazione tre popolazioni salmastre, provenienti dal Mar di Sardegna (Stagno di Casaraccio, Stagno di Calich) e dal Mar Tirreno settentrionale (Laguna di Orbetello) e due popolazioni marine, provenienti dal Mar Tirreno occidentale (La Maddalena). Si è riscontrato una maggiore vicinanza genetica tra le popolazioni salmastre, anche se queste provengono da aree geograficamente ben distinte, ed una distanza genetica tra le popolazioni salmastre e le popolazioni marine che ricade nell'intervallo di valori tipico per specie congeneriche, ben maggiore di quanto solitamente riscontrato in popolazioni conspecifiche. Questi dati hanno portato Maltagliati et al. (2000) a ritenere che nella regione mediterranea *Syllis gracilis* sia in realtà

un complesso di almeno due specie, probabilmente derivate da un antenato comune – a differenza di quanto si riscontra per la *Syllis gracilis* del Pacifico – ma ad oggi riproduttivamente isolate, la cui differenziazione è probabilmente stata mediata dalla pressione selettiva dell'ambiente salmastro. In realtà Maltagliati et al. (2000) hanno messo in evidenza un altro elemento che ad oggi, per assenza di dati, non ha una spiegazione soddisfacente, ossia la notevole distanza genetica tra le due popolazioni marine, che pure provengono da due siti a distanza di pochi chilometri. Di fatto ci si aspetterebbe che popolazioni marine abbiano una maggiore connettività rispetto a quelle di ambienti salmastri, e che, di conseguenza, mostrino una maggiore omogeneità.

La presente tesi si propone di approfondire questo argomento, attraverso lo studio di un numero maggiore, rispetto a quello di Maltagliati et al. (2000), di popolazioni di *Syllis gracilis* e ad una scala spaziale più ampia, e utilizzando un marcatore genetico più sensibile rispetto agli allozimi, ossia un gene mitocondriale. Ogni mitocondrio, derivando da un batterio aerobio che ha contratto un'antica endosimbiosi con pre-eucariote nucleato, contiene una molecola circolare di DNA mitocondriale (mtDNA). Il mtDNA contiene i geni che codificano per l'rRNA ribosomale che struttura i ribosomi del mitocondrio, i geni che codificano per i RNA transfert ed i geni che codificano per alcuni enzimi della catena respiratoria. Il mtDNA è provvisto di una regione di controllo (D-Loop) ma è privo di introni e spaziatori tra i geni, per cui risulta quasi completamente adattativo, con, teoricamente, il solo D-Loop impiegabile come marcatore neutrale, elemento di cui è necessario tenere conto quando si utilizzano i geni mitocondriali per ricostruzioni filogenetiche o genetica di popolazione. Poiché nei gameti maschili i mitocondri sono concentrati alla base del flagello, dove hanno un ruolo fondamentale nella propulsione, e usualmente vengono comunque distrutti a livello della fecondazione, il mtDNA in linea generale viene ereditato esclusivamente dalla madre, il che permette di ricostruire con una certa sicurezza le linee di ascendenza, a differenza di quanto si riscontra nel DNA nucleare, presente in doppia copia e ad eredità biparentale. Questo è tendenzialmente valido per tutti gli animali, le piante e i funghi, anche se sporadicamente in tutti gli organismi si può riscontrare eredità mitocondriale biparentale (Schwartz & Vissing, 2002), ed in alcuni organismi, principalmente alcuni bivalvi, questo processo è frequente (Hoeh et al., 1991). Queste caratteristiche rendono il mtDNA ideale per studi di vario tipo, dalla genetica di popolazione, alle ricostruzioni filogenetiche, alla genetica forense; per quanto riguarda lo studio della genetica di popolazione, sono molto usati i geni che codificano per il rRNA 16S, per il citocromo b e per la subunità I della citocromo ossidasi (COI).

In questo studio si intende utilizzare il gene per il 16S rRNA per caratterizzare le popolazioni di *Syllis gracilis*. Parallelamente alla caratterizzazione genetica, si intende tentare una caratterizzazione morfologica facendo uso di alcuni caratteri che possono essere rilevati anche

sull'animale fissato, in modo da capire se le popolazioni marine e salmastre siano distinguibili anche a livello del fenotipo. In questa maniera intendiamo verificare le conclusioni raggiunte nell'articolo di Maltagliati et al. (2000) e valutare la connettività tra le popolazioni marine su una scala maggiore, per contribuire alla conoscenza della storia evolutiva di *Syllis gracilis* nel bacino del Mediterraneo.

2. Materiali e metodi

2.1 Schema di campionamento e popolazioni campionate

La ricerca di campioni rappresentativi di popolazioni di *Syllis gracilis* da differenti aree geografiche è stata decisamente impegnativa. In buona parte dei siti campionati la specie non è stata trovata, o sono stati trovati singoli o pochi individui, che sono stati inseriti comunque nell'analisi. Poiché *Syllis gracilis* è un specie tendenzialmente endolitica e tipicamente legata a concrezioni di vario tipo, si è campionato attraverso un attrezzo per i grattaggi mesolitorali (Fig. 3) o, dove l'eccessiva irregolarità del substrato rende tale strumento inefficace, con martello e scalpello. I campioni sono stati esaminati in laboratorio, estraendo i policheti presenti dalle concrezioni raccolte. Nei campioni marini sono state campionate 103 specie di policheti, tra cui 40 specie di Syllidae, riconducibili ad una fauna tipica del litorale roccioso (Abbiati et al., 1987; 1991), mentre in ambiente salmastro sono state campionate 24 specie di policheti, tra cui 8 Syllidae, quasi tutte tipiche di ambienti salmastri (Cosentino, 2011). Le *Syllis gracilis* trovate sono state fissate in etanolo al 96%. Il campionamento è stato condotto cercando di coprire la massima parte possibile delle coste dei mari italiani (Fig. 4), sia per quanto riguarda le popolazioni marine, sia per quanto



Figura 3: Lo strumento impiegato per la raccolta di buona parte dei campioni di grattaggio mesolitorale. Il righello accanto misura 15 cm.

riguarda le popolazioni salmastre. I principali dati relativi alle popolazioni rinvenute sono trascritte in tabella 1. Nell'analisi morfologica è stata inserita anche una piccola popolazione fissata su vetrino, campionata all'inizio degli anni '80 sulle scogliera artificiali antistanti Fiumicino.

Per quanto riguarda il Mar Ligure, la specie è stata cercata in ambiente salmastro a Viareggio (Canale della Burlamacca) e Montignoso (Foce del Torrente Pannosa), senza successo. In ambiente marino sono stati effettuati campionamenti sul mesolitorale di Riomaggiore (Cinque Terre), Isola di Palmaria (Golfo di La Spezia), Viareggio, Marina di Pisa, due siti nella città di Livorno (porto e accademia navale), due siti lungo il litorale livornese (Castello del Boccale e Sassoscritto), Castiglioncello e Isola di Capraia, nonché tra Levanto e Monterosso (SP) ad una profondità di circa 9 m. La specie è stata trovata con campioni con numerosità utile a Palmaria, nei due siti di Calafuria e a Capraia e, con un solo esemplare, anche nel porto di Livorno. Inoltre, in collezione sono presenti esemplari provenienti dalla foce del Fiume Magra.

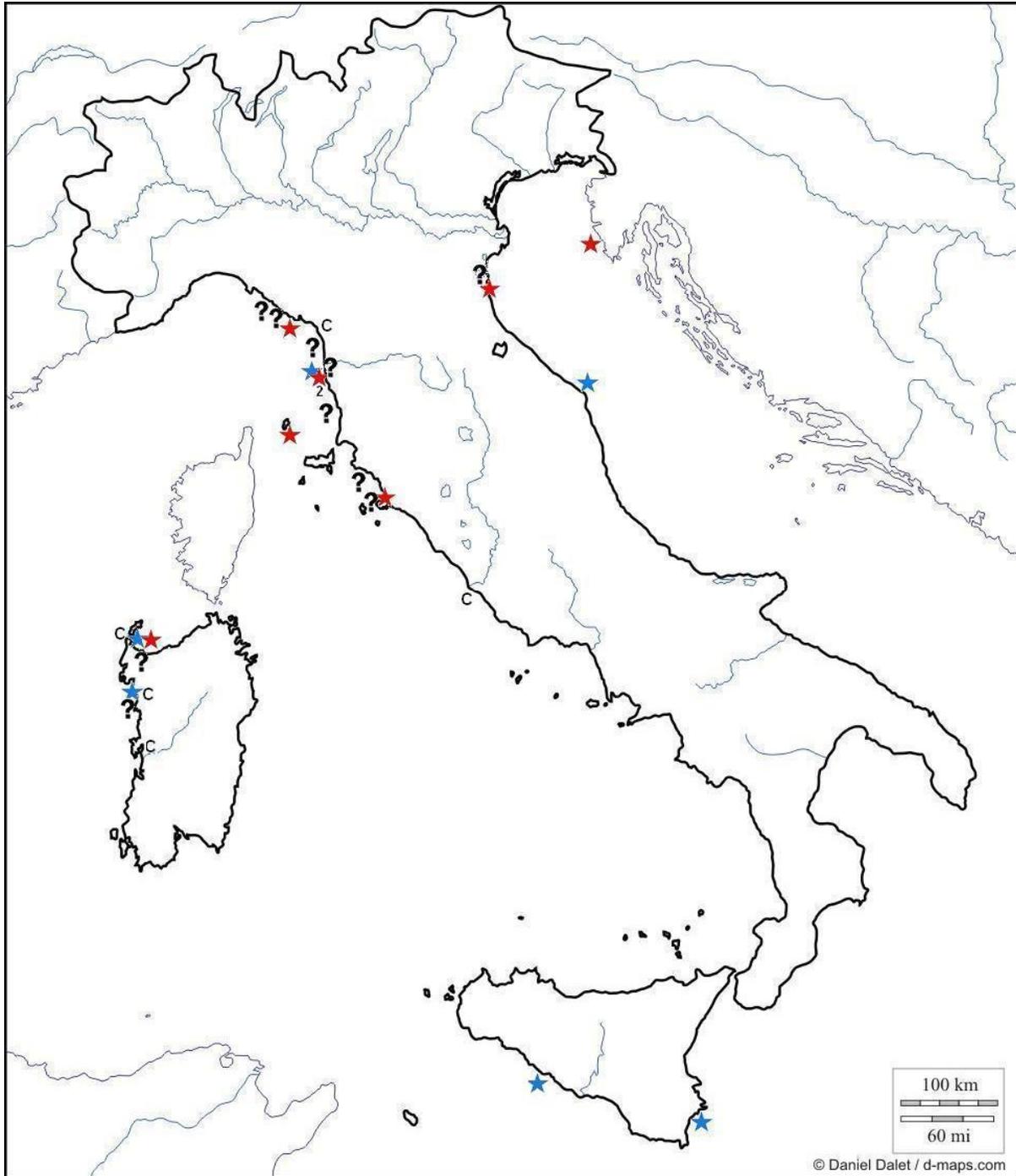


Figura 4: Località considerate nella ricerca di *Syllis gracilis* nei mari italiani.

- Legenda:
- stella rossa: popolazione campionata con almeno 10 esemplari
 - stella azzurra: popolazione campionata con meno di 10 esemplari
 - punto interrogativo: località in cui la specie è stata cercata ma non trovata
 - C: località per cui sono presenti esemplari nella collezione del Dipartimento di Biologia di Pisa.

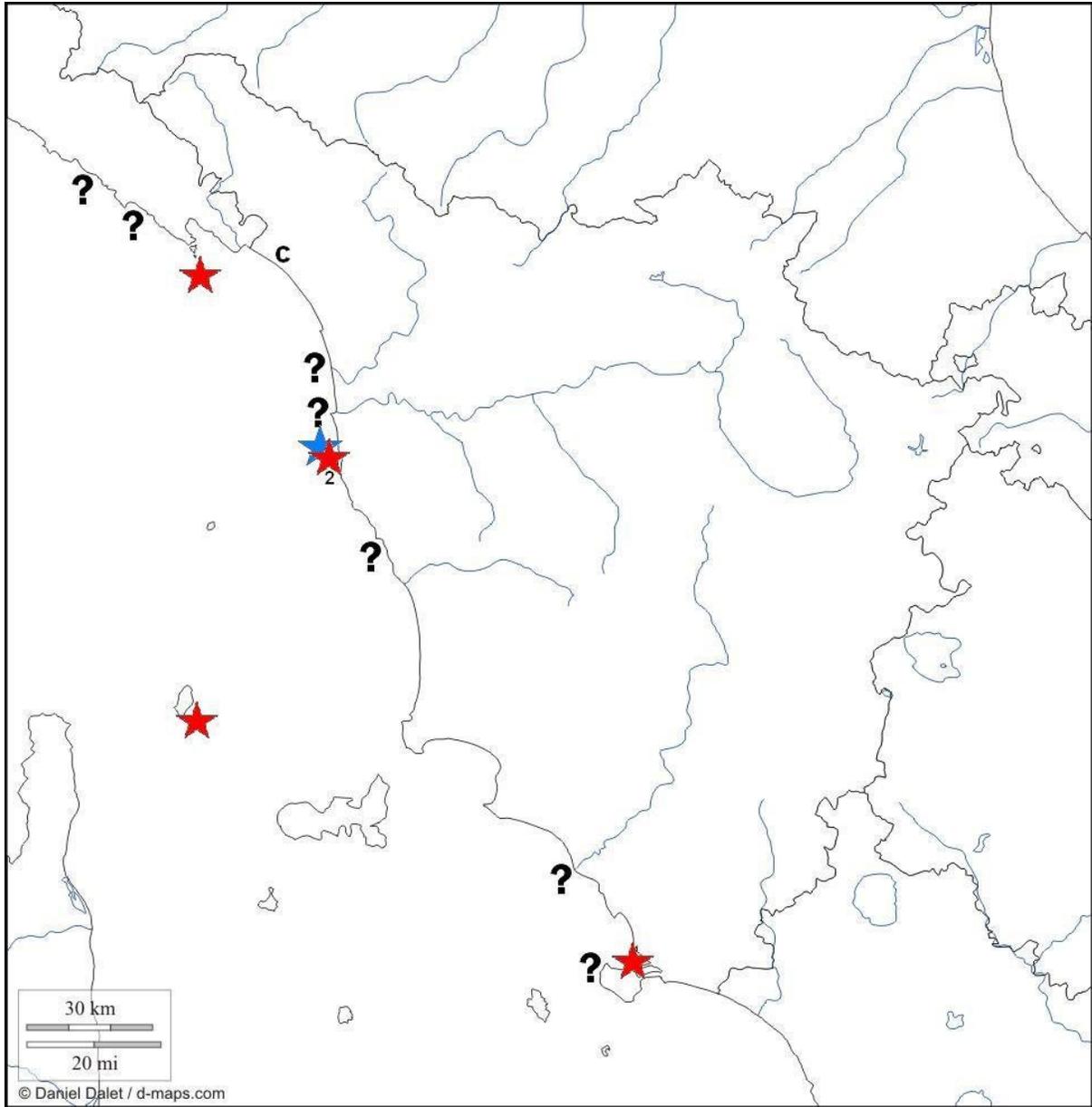


Figura 5: Località considerate nella ricerca di *Syllis gracilis* nel Mar Ligure e Tirreno settentrionale. Legenda analoga a Fig. 3.

Tabella 1: Le popolazioni di *Syllis gracilis* oggetto del presente studio.

Popolazione	Coordinate geografiche	Bacino	Ambiente	N. individui	Substrato
Palmaria	44°2'42.00"N; 9°51'34.69"E	Mar Ligure	Marino	15	Corallinaceae articolate
Livorno Porto	43°32'45.79"N; 10°17'57.18"E	Mar Ligure	Marino	1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
Boccale	43°28'30.22"N; 10°19'49.38"E	Mar Ligure	Marino	11	Corallinaceae articolate
Sassoscritto	43°27'53.52"N; 10°20'30.72"E	Mar Ligure	Marino	32	Corallinaceae articolate
Capraia	43°1'46.38"N; 9°50'37.08"E	Mar Ligure	Marino	9	Corallinaceae articolate
Giannutri	42°15'22.17"N; 11° 5'44.62"E	Mar Tirreno	Marino	1	Corallinaceae articolate
Orbetello	42°26'11.94"N; 11°12'22.82"E	Mar Tirreno	Salmastro	35 (+ 20)	<i>Ficopomatus enigmaticus</i>
Fiumicino (vetrini)	41°74'36.51"N; 12°22'77.83"E	Mar Tirreno	Marino	15	Ignoto (scogliere artificiali)
Porto Torres	40°50'30.36"N; 8°24'13.15"E	Mar di Sardegna	Marino	20	Corallinaceae articolate
Stintino	40°56'7.84"N; 8°13'47.86"E	Mar di Sardegna	Marino	4	Corallinaceae articolate
Stagno del Calich	40°35'44.01"N; 8°17'14.80"E	Mar di Sardegna	Salmastro	1	<i>Ficopomatus enigmaticus</i>
Eraclea Minoa	37°23'18.74"N; 13°16'32.88"E	Canale di Sicilia	Marino	7	Corallinaceae articolate
AMP Plemmirio	37° 0'12.22"N; 15°19'3.41"E	Mar Ionio	Marino	1	Corallinaceae articolate
Ancona	43°37'15.66"N; 13°30'24.44"E	Mar Adriatico	Salmastro?	2	<i>Hydroides dianthus</i>
Pialassa della Baiona	44°29'15.40"N; 12°15'44.34"E	Mar Adriatico	Salmastro	35	<i>Hymeniacidon sanguineum</i>
Rovigno	45° 4'14.53"N; 13°38'8.89"E	Mar Adriatico	Marino	35	Corallinaceae articolate

Nel Mar Tirreno si sono indagati, per le popolazioni salmastre, Castiglione della Pescaia (Diaccia Botrona) e Orbetello (Laguna di Ponente), trovando un'abbondante popolazione solo nella Laguna di Orbetello; in ambiente marino sono stati indagati i litorali di Castiglione della Pescaia, Porto Santo Stefano e Giannutri, e la specie è stata ritrovata con un solo esemplare a Giannutri (Fig. 5).

Per quanto riguarda il Mar di Sardegna, la specie è stata cercata in ambiente salmastro negli stagni costieri di Casaraccio (Golfo dell'Asinara, Sardegna) e di Calich (Alghero, Sardegna), dove era già stata trovata con popolazioni abbondanti (esemplari in collezione e Maltagliati et al., 2000), tuttavia nello Stagno di Casaraccio la specie non è stata trovata (vicariata da altre specie di *Syllis*), mentre nel Calich ricerche condotte per due anni consecutivi hanno finora portato a campionare un solo esemplare. In ambiente marino la specie è stata ricercata in Sardegna lungo i litorali di Alghero e Stintino e nel porto di Porto Torres; è stata campionata una popolazione abbastanza consistente da Porto Torres, ed alcuni individui a Stintino.

Dal sud Italia sono stati ottenuti campioni con relativamente pochi individui; è stato campionato un solo individuo dall'Area Marina Protetta del Plemmirio (Siracusa, Mar Ionio), e sette individui dal

sito di Eraclea Minoa, sul Canale di Sicilia. Infine, nel Mar Adriatico sono stati condotti campionamenti in ambiente salmastro alla Pialassa della Baiona e nelle Valli di Comacchio, ottenendo una popolazione dalla Pialassa della Baiona, e in ambiente marino a Rovigno (Croazia). Due esemplari sono stati raccolti in un campione proveniente dal porto di Ancona, fissato in etanolo assoluto e conservato in congelatore da uno studio precedente, non relativo a questa specie. Sebbene il porto di Ancona non rappresenti un ambiente propriamente lagunare, probabilmente questi esemplari devono essere considerati di ambiente salmastro, in quanto il campione si è rivelato ricco di specie tipicamente lagunari, quali *Hediste diversicolor*, *Carcinus aestuarii* e *Hydroides dianthus*, insieme a specie tipicamente eurialine, quali *Mytilus galloprovincialis* e *Caulleriella bioculata*. I porti, peraltro, essendo ambienti confinati, soggetti ad un forte stress ambientale e sovente ad un notevole influsso di acqua dolce, presentano caratteristiche in buona parte congruenti con quelle degli ambienti salmastri, per cui non è detto che le popolazioni provenienti da aree portuali possano essere considerate alla stregua delle altre popolazioni marine.

Per quanto riguarda l'habitat in cui sono state rilevate, tutte le popolazioni sono state raccolte nel mesolitorale, fatta eccezione per la popolazione di Rovigno, campionata a 3 m di profondità, e l'esemplare dell'AMP del Plemmirio (SR), raccolto a 4 m di profondità. Le popolazioni marine provengono tipicamente da comunità in cui gli organismi strutturanti sono Corallinaceae articolate, mentre le popolazioni salmastre si trovano in reef di *Ficopomatus enigmaticus* (Orbetello) o in concrezioni strutturate dalla spugna *Hymeniacidon sanguineum* e dal polichete *Hydroides dianthus* (Pialassa della Baiona). Nei porti la specie si trova, piuttosto sporadica, in concrezioni di *Hydroides dianthus* e *Mytilus galloprovincialis*.

Per quanto i campioni ottenuti permettano sicuramente di valutare la variabilità della specie su una scala spaziale piuttosto ampia, coprendo il Mar Ligure, il Mar Tirreno, il Mar di Sardegna, il Canale di Sicilia e il Mar Adriatico settentrionale, il campionamento ottenuto non può essere considerato del tutto soddisfacente. Questo non è sicuramente dovuto alla limitatezza dello sforzo di campionamento, quanto piuttosto all'oggettiva difficoltà di trovare la specie: su 36 uscite di campionamento effettuate, solo 17 hanno avuto successo, spesso peraltro permettendo di campionare solo pochi esemplari. Questo, in relazione anche alla limitata disponibilità di tempo e di risorse economiche, ha condotto a limitare gli sforzi di campionamento a tre principali aree geografiche, che sono state coperte in maniera ottimale, mentre buona parte dei mari italiani non risulta rappresentato.

2.2 Protocollo di caratterizzazione genetica

Nel presente lavoro sono stati sequenziati in totale 51 esemplari provenienti da 13 popolazioni (a fronte dei 244 appartenenti a 15 popolazioni caratterizzati morfologicamente – vedi Appendice) (Tab.2).

Tabella 2: Prospetto delle popolazioni campionate (Tab.1), con aggiunta del codice e del numero di esemplari sequenziati per ciascuna. I codici delle popolazioni, utilizzati per le sigle degli esemplari, verranno utilizzati da ora in poi nel testo.

Codice	Località	Bacino	Ambiente	N	Sequenziati
PAL	Palmaria	Mar Ligure	Marino	15	8
LIV	Livorno Porto	Mar Ligure	Marino	1	1
BOC	Boccale	Mar Ligure	Marino	11	2
SSC	Sassoscritto	Mar Ligure	Marino	34	8
CAP	Capraia	Mar Ligure	Marino	9	5
GIA	Giannutri	Mar Tirreno	Marino	1	/
ORB	Orbetello	Mar Tirreno	Salmastro	35	5
PTO	Porto Torres	Mar di Sardegna	Marino	20	6
STI	Stintino	Mar di Sardegna	Marino	4	1
CAL	Stagno del Calich	Mar di Sardegna	Salmastro	1	1
EMI	Eraclea Minoa	Canale di Sicilia	Marino	7	3
PLE	AMP Plemmirio	Mar Ionio	Marino	1	/
ANC	Ancona	Mar Adriatico	Salmastro?	2	1
PBA	Pialassa della Baiona	Mar Adriatico	Salmastro	35	4
ROV	Rovigno	Mar Adriatico	Marino	35	6

Estrazione del DNA: il DNA è stato isolato da 1-2 parapodi staccati agli esemplari utilizzando il kit Qiagen DNeasy per l'estrazione da tessuti (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). La concentrazione del DNA è stata stimata attraverso misure fluorimetriche (rilevando un valore medio di 5 ng/μl per campione).

Amplificazione attraverso PCR: è stata amplificata una porzione interna del gene mitocondriale per il 16S rRNA (472 bp), utilizzando i *primer* descritti in Simon et al. (1994). Le reazioni sono state effettuate in un volume di 25 μl. Tale volume di miscela di reazione contiene 0,2 μM di ciascun *primer*, 1,25 U di Sigma Taq DNA Polimerasi, 1x *buffer* di reazione e 200 μM di miscela di dNTP. La concentrazione di MgCl₂ è stata stabilita a 3 mM. Ad ogni reazione sono stati aggiunti 12,5 μg di BSA e circa 60 ng di DNA genomico totale.

L'amplificazione del DNA attraverso la PCR è stata ottenuta attraverso il seguente protocollo: una fase iniziale di denaturazione di 2 min a 94 °C, 35 cicli da 1 min di denaturazione a 94 °C, 1 min di *annealing* a 48 °C e 1 min 30 s di estensione a 72 °C ciascuno. I 35 cicli sono stati seguiti da una fase di allungamento finale per 5 min a 72 °C. Al termine del protocollo gli amplificati sono stati conservati a 4 °C fino alla fase successiva. Per tutte le reazioni di PCR sono stati inclusi controlli negativi. Per verificare il successo dell'amplificazione, gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi su un gel di agarosio al 2%, a 4 V/cm per 20 min, utilizzando un tampone 1xSBA (1 g di sodio tetraborato decaidrato su 1 l d'acqua) contenente bromuro di etidio (10 mg/ml) per la colorazione dei frammenti di DNA. I gel sono stati quindi visualizzati tramite transilluminatore a UV. I prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit ExoSAP-IT (USB Corporation) e sequenziati utilizzando un servizio esterno di sequenziamento (Macrogen Europe, Paesi Bassi). Ogni amplificato è stato sequenziato sia in direzione *forward*, sia in direzione *reverse*, e l'elettroforesi di sequenziamento è stata ripetuta due volte per verificare l'affidabilità dei risultati. Negli elettroferogrammi non sono stati osservati doppi picchi, che potrebbero essere interpretati come prova della presenza di pseudogeni mitocondriali nel nucleo (*Numts*) o eteroplasmia. I prodotti di PCR non hanno mostrato alcun fenomeno aspecifico, escludendo la presenza di diverse sequenze nucleari simili al mtDNA.

Analisi dei dati: Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma Clustal W (Thompson et al., 1994) implementato nel software BioEdit 7.0.5.2 (Hall, 1999). Un'analisi preliminare è consistita nell'allineamento delle sequenze ottenute con quelle presenti in GenBank, in modo da confermare l'attribuzione degli individui sequenziali alla specie in questione, attraverso il software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponibile presso l'indirizzo <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Le relazioni fra i diversi aplotipi individuati sono state ricostruite attraverso un network, ottenuto attraverso il programma NETWORK 4.6.1.1., che utilizza l'algoritmo *median-joining* (Bandelt et al., 1999). Nel network ogni cerchio rappresenta un aplotipo, e il suo diametro è proporzionale alla frequenza dell'aplotipo stesso nel *dataset*; le linee di connessione tra aplotipi sono inoltre proporzionali alla distanza genetica tra di essi.

Al fine di procedere alla costruzione di un albero filogenetico si sono incluse nell'analisi tutte le sequenze di 16S rRNA attribuite a *Syllis gracilis* su GenBank. Inoltre, sono state allineate le sequenze di 16S rRNA relative alle principali specie atlanto-mediterranee del gruppo di *Syllis armillaris*. Di seguito sono elencate le specie incluse nell'analisi con il codice con cui sono depositate in GenBank:

EF123811.1 = *Syllis gracilis* (Galizia, Oceano Atlantico)
JF903733.1 = *Syllis gracilis* (Australia, Oceano Pacifico)
JF903727.1 = *Syllis armillaris* (Maiorca, Mar Mediterraneo)
JF903741.1 = *Syllis pulvinata* (Girona, Mar Mediterraneo)
EF123818.1 = *Syllis hyalina* (Girona, Mar Mediterraneo)
JF903735.1 = *Syllis hyalina* (Australia, Oceano Pacifico)
JF903726.1 = *Syllis alternata* (Girona, Mar Mediterraneo)

Il modello di sostituzione nucleotidica con maggior supporto statistico è stato individuato attraverso il programma jModelTest (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012). Sulla base del modello identificato si è costruito un albero filogenetico attraverso il software MrBayes v. 3.2.1., basato sull'inferenza bayesiana (Ronquist et al., 2011). Come outgroup si è scelto di utilizzare *Syllis alternata*, che secondo Aguado et al. (2012) ricade in un clade *sister* del gruppo di *Syllis armillaris*, temendo che l'utilizzo di una specie che ricada nel grande clade delle *Typosyllis* (*sensu* Aguado et al., 2012), molto distante, avrebbe potuto rendere poco leggibile l'albero.

2.3 Protocollo di caratterizzazione morfologica

Nella caratterizzazione morfologica degli individui di *Syllis gracilis* si è tenuto conto dei caratteri apprezzabili anche nell'animale fissato, il che ha condotto ad escludere 1) la colorazione, che nelle *Syllis* vive può essere fortemente diagnostica ma tende sovente a sbiadire in etanolo, e 2) misure quantitative relative alla lunghezza corporea, in quanto questi organismi si contraggono notevolmente durante la fissazione, portando sia ad una scarsa attendibilità delle misure quantitative, sia all'oggettiva difficoltà di effettuare tali misurazioni.

Lo studio si è concentrato quindi su cinque parametri semiquantitativi di rilevamento abbastanza semplice anche su esemplari fissati, ovvero 1) il numero di chetigeri occupati dal faringe, 2) il numero di chetigeri occupati dal proventricolo, 3) il chetigero d'inizio delle chete a Y, 4 e 5) rispettivamente il numero di articoli presenti al cirro dorsale ai chetigeri 10 e 20. L'utilizzo di quest'ultimo parametro morfologico è agevolato dal fatto che, a differenza di molte specie congeneriche, *Syllis gracilis* non presenta alternanza fra cirri corti e lunghi, ed i cirri tendono ad accorciarsi andando verso il pigidio, raggiungendo tuttavia una lunghezza stabile e costante prima del ventesimo chetigero. Questi caratteri sono stati scelti anche in quanto sono usualmente considerati di alto valore diagnostico (San Martín & Aguado, 2012). Non si è tentata una caratterizzazione morfologica di maggiore minuzia, in quanto l'obiettivo principale della caratterizzazione morfologica consiste nell'individuazione di eventuali parametri che permettano una semplice distinzione operativa tra differenti popolazioni di *Syllis gracilis*.

Non è stato possibile valutare tutti i caratteri considerati su tutti gli esemplari; per le popolazioni di Rovigno ed Orbetello non è stato considerato il numero di articoli presenti ai cirri dorsali dei chetigeri 10 e 20 (anche se, almeno per quanto riguarda la popolazione di Orbetello si è ovviato a ciò prendendo i parametri suddetti su 20 individui aggiuntivi, che, però, non sono stati genotipizzati) e in molti casi lo stato di conservazione degli animali non ha permesso di ottenere alcuni dati. I cirri, infatti, tendono a danneggiarsi con una certa facilità; in esemplari rotti a breve distanza dal prostomio può non essere possibile individuare il chetigero d'inizio delle chete a Y. Talora, infine, la parete corporea è lacerata ed il faringe e il proventricolo escono, oppure il faringe è parzialmente estroflesso, il che non permette di valutarne la lunghezza. Questi caratteri morfologici, quindi, devono essere considerati con una certa cautela.

In particolare, per quanto riguarda le lunghezze di faringe e proventricolo, poiché queste risultano fortemente dipendenti dalle dimensioni dell'animale, ossia si sviluppano in maniera non bilanciata con il resto del corpo, si è deciso di calcolare il rapporto tra le due misure, ritenendo potesse risultare maggiormente informativo, pur lavorando anche con i valori grezzi. Lo stesso si è fatto per quanto riguarda la lunghezza dei cirri dorsali, per cui si è ipotizzata la possibilità di riscontrare differenze nel rapporto tra i cirri del 10° e i cirri del 20° chetigero; in questo caso, tuttavia, è verosimile che il carattere di maggiore rilevanza sia la lunghezza del cirro in numero di articoli.

L'analisi statistica è stata condotta secondo due approcci complementari. Il primo, basato sulla statistica univariata, si è avvalso del *t*-test per il confronto tra coppie di medie, corrispondenti a coppie di popolazioni. Questo test, basato sulla statistica *t* di Student, permette di confrontare una media campionaria con una media generale o, come nel nostro caso, due medie campionarie, calcolando un parametro, detto appunto *t*

$$t = \frac{\bar{x}_t - \bar{x}_c}{\sqrt{\frac{S_t^2}{n_t} + \frac{S_c^2}{n_c}}}$$

corrispondente alla differenza tra le medie campionarie standardizzata per la radice quadrata della somma delle varianze stimate divise per il numero di osservazioni all'interno del campione; il valore di *t* ottenuto viene confrontato con un valore *t_{critico}* dipendente dai gradi di libertà della distribuzione, a loro volta legati al numero di osservazioni effettuate. Se il valore ottenuto risulta superiore al valore di *t_{critico}*, si rigetta l'ipotesi nulla secondo cui le due medie campionarie non differiscono, altrimenti la si accetta. Un valore di *t* inferiore al *t_{critico}* può dipendere da una differenza tra le medie effettivamente bassa, oppure da una varianza molto alta nelle due distribuzioni considerate, che confonde i risultati e non permette di individuare un pattern definito nella variazione del parametro considerato; un valore di *t* superiore al *t_{critico}* nel confronto fra due

medie, invece, permette di asserire che la variabilità all'interno dei due campioni è ripartita in maniera tale da permettere una netta distinzione tra i due. In questo studio si è utilizzato un semplice programma di calcolo per effettuare il *t*-test (Microsoft Excel 2003). Una volta effettuato il *F*-test per verificare l'omoscedasticità dei campioni, vista la presenza di coppie di campioni per cui tale proprietà non è verificata si è imposta al calcolatore la condizione dell'eteroscedasticità e si è considerato il *t*-test riferito ad una distribuzione a due code, in quanto non è possibile ipotizzare a priori se una delle due medie campionarie debba risultare maggiore dell'altra. Il *t*-test è stato applicato anche al confronto morfologico fra gruppi di esemplari corrispondenti a cluster genici rilevati dalla caratterizzazione molecolare, in modo da rilevare eventuali differenze tra i valori medi dei parametri considerati.

In secondo luogo si è proceduto, attraverso il software PRIMER-E v. 5, ad un'analisi multivariata della variabilità morfologica, considerando come campioni i singoli individui, e come variabili alcuni dei parametri morfologici considerati; la scelta è stata limitata ai tre parametri che in base ai risultati del *t*-test apparivano maggiormente informativi. Per quanto l'analisi multivariata sia classicamente impiegata per studi ecologici, questa tecnica trova anche una notevole applicazione nell'analisi di caratteri morfologici (Blackith & Reyment, 1971). L'analisi multivariata condotta si basa sul calcolo di una matrice di distanze fra i vari esemplari caratterizzati, ottenuta, previa una trasformazione di radice quadrata dei dati per fare in modo che le variabili considerate abbiano lo stesso ordine di grandezza e non si abbia un effetto maggiore sulla similarità da parte di una variabile rispetto alle altre, attraverso la distanza di Manhattan (Dekhtyar, 2009):

$$d_m(\bar{x}, \bar{y}) = \sum_{k=1}^N |x_k - y_k|$$

Utilizzando tale matrice si è proceduto ad un ordinamento dei campioni secondo il metodo del *non metric Multi Dimensional Scaling* (MDS: Clarke, 1993); questo metodo costruisce una mappa dei campioni – cioè, nel nostro caso, degli esemplari caratterizzati – in due o tre dimensioni non utilizzando direttamente la matrice di similarità, ma ordinando i campioni per similarità ed assegnando ad essi dei ranghi, che verranno utilizzati come distanze. In linea generale nel considerare una rappresentazione grafica di questo tipo è opportuno fare riferimento ad un coefficiente di stress (*s*), che indica quanto la rappresentazione grafica risulti attendibile rispetto alla matrice di similarità originaria. Per l'indice di stress generalmente viene indicato un valore limite di $s = 0,2$, al di sopra del quale la rappresentazione grafica viene considerata poco accurata; nel nostro caso, avendo solo tre variabili, possiamo essere comunque ragionevolmente sicuri dell'accuratezza della distribuzione dei campioni in due dimensioni.

Il MDS permette di identificare graficamente un pattern di variazione nei campioni considerati, tuttavia non risulta informativo riguardo la significatività delle differenze tra di essi; per questo motivo è stato utilizzato un test statistico per campioni multivariati, l'ANOSIM (*ANalysis Of SIMilarities*: Clarke, 1993). Questo test, analogamente al MDS, si basa sulla matrice dei ranghi e non è parametrico, e si sviluppa in tre fasi; la prima fase consiste nel calcolo di un coefficiente R , corrispondente alla differenza fra la distanza media tra ogni coppia di campioni all'interno di un livello del fattore considerato e la distanza media fra coppie di campioni riferiti a livelli differenti del fattore:

$$R = \frac{(\bar{r}_B - \bar{r}_W)}{\frac{1}{2}M}$$

Ove \bar{r}_B corrisponde alla distanza media tra i gruppi, mentre \bar{r}_W è la distanza media entro i gruppi ($B = \textit{between}$, $W = \textit{within}$). Il termine M dipende da n , ossia dal numero di campioni considerati, secondo la seguente relazione:

$$M = \frac{n(n-1)}{2}$$

R può assumere valori compresi fra -1 e +1. Nel caso in cui R tenda a +1, la distanza tra gruppi è maggiore della distanza entro i gruppi, per cui i gruppi (corrispondenti ai livelli del fattore) risultano tendenzialmente supportati, mentre un valore di R tendente a 0 indica che la distanza entro i gruppi è pressoché uguale alla distanza tra i gruppi, e quindi non si osserva una chiara strutturazione in gruppi. Valori di R negativi si osservano molto raramente, giacché è improbabile osservare una maggiore diversità all'interno di un livello di un fattore che non tra livelli differenti, tuttavia si possono presentare in caso di errori di campionamento, in particolare se si considerano appartenenti al medesimo livello campioni che in realtà appartengono a livelli diversi.

A seguito del calcolo di R , si pone come ipotesi nulla che non esistano differenze fra i livelli; in caso questa sia verificata, i gruppi corrispondenti, nel nostro caso, a differenti località di campionamento, risultano arbitrari, ed è possibile riorganizzare i campioni in gruppi diversi senza che si osservino grandi variazioni nel valore di R . Il programma PRIMER effettua una serie di permutazioni, ricalcolando per ognuna R ; generalmente sono sufficienti 999 permutazioni per poter decidere se i gruppi originari sono confermati a livello statistico, oppure risultano arbitrari (Clarke, 1993; Clarke & Warwick, 2001). Il programma a questo punto costruisce la curva di distribuzione degli R ottenuti per permutazione, e identifica sulla curva la posizione del coefficiente R calcolato con i gruppi originari; in caso la probabilità di osservare il valore corrispondente risulti inferiore al

5%, si rigetta l'ipotesi nulla e si conclude che le differenze tra gruppi sono verificate, altrimenti si conclude che i gruppi sono arbitrari.

Oltre al test globale, che verifica quanto siano supportati i gruppi in generale, il programma PRIMER calcola le differenze tra coppie di gruppi, e ne valuta la significatività. Analogamente al suo corrispondente nella statistica univariata ANOVA, ANOSIM può essere condotto su un solo fattore, su più fattori incrociati o su più fattori gerarchizzati. Nel nostro caso abbiamo due fattori di cui intendiamo testare l'effetto sulla morfologia delle *Syllis gracilis*, ossia l'ambiente (marino o salmastro) e la popolazione campionata; poiché ogni popolazione appartiene ad uno e un solo livello del fattore ambiente, è cioè o marina o salmastra, il fattore popolazione è gerarchizzato nel fattore ambiente, per cui imponiamo al programma di effettuare ANOSIM per fattori gerarchizzati (*nested*).

Si identificano quattro aplogruppi (HG); l'HG1 comprende gli aplotipi Hap_11, Hap_10, Hap_12 e Hap_14 (quest'ultimo separato dal resto del gruppo da 8 mutazioni); l'HG2 comprende gli aplotipi Hap_6, Hap_7, Hap_8 e Hap_9, distanti l'uno dall'altro una o due mutazioni; l'HG3 comprende gli aplotipi Hap_15 e Hap_16, separati da due mutazioni e corrispondenti ognuno ad un solo individuo; l'HG4 comprende il solo Hap_5, corrispondente ad un esemplare proveniente da Capraia (CAP06) (Fig.6). HG2 e HG3 sono separati da HG1 da 25-27 mutazioni (HG1-HG3: 25-27 mutazioni a seconda se contiamo a partire da Hap_14 o dal resto dell'aplogruppo; HG1-HG2: 26 mutazioni). Hap_5 è invece separato dall'aplogruppo più vicino, HG2, da 63 mutazioni, risultando nettamente distinto (Fig.6).

Il BLAST, effettuato attraverso lo strumento disponibile online su GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), mostra che, mentre tutte le altre sequenze risultano più o meno simili alla sequenza depositata per *Syllis gracilis* atlantica, Hap_5 ha come specie più vicina *Syllis armillaris* o *Syllis pulvinata*, se pure con un'identità di sequenza pari al 97%, che fa ipotizzare si tratti di una specie distinta dalle due (ma vedi più avanti e al cap. 4.1). L'identità di sequenza fra HG1 e la sequenza di *Syllis gracilis* depositata in GenBank è prossima al 100%, mentre per quanto riguarda HG2 e HG3, mostrano identità di sequenza del 93-94%.

Per quanto riguarda la distribuzione geografica degli aplogruppi e la loro ripartizione nelle popolazioni, si riscontra una sostanziale varietà di situazioni. Le popolazioni CAP, ANC e STI risultano incluse nell'HG2 (per quanto il fatto che per le ultime due sia stato sequenziato un solo individuo non permetta di trarre conclusioni su di una base solida), mentre le popolazioni ORB, ROV, PBA, BOC, LIV e CAL sono comprese nell'HG1; le popolazioni PAL e PTO consistono di individui che ricadono sia nell'HG1, sia nell'HG2 (3:5 per PAL, 4:2 per PTO), mentre SSC e EMI comprendono individui che ricadono nell'HG1 e individui che ricadono nell'HG3 (1:7 per SSC, 1:2 per EMI).

Per quanto riguarda l'analisi filogenetica, il modello di sostituzione nucleotidica a massimo supporto statistico è risultato essere TIM2+G. La massima parte delle sequenze ottenute nel corso di questo studio ricade in un grande cluster a basso supporto statistico, che comprende tre aplogruppi fortemente supportati dall'analisi ($PP > 0.95$) e costituiti da aplotipi con distanza genetica molto bassa (Fig. 7), come già evidenziato a livello del network (cf. Fig. 6).

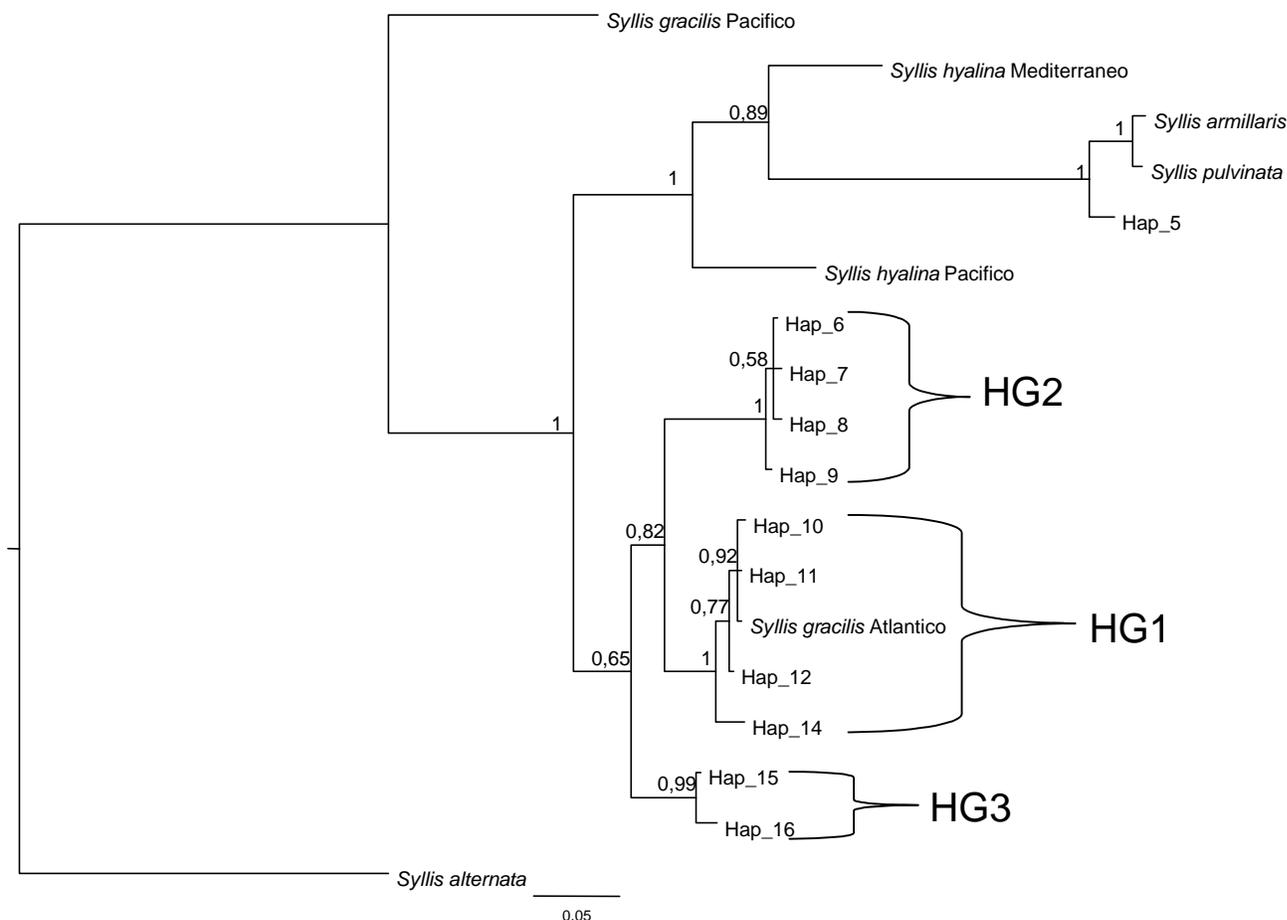


Figura 7: Albero filogenetico degli aplotipi ottenuto a partire dalle sequenze del 16S rRNA di *Syllis gracilis*. Sui nodi dell'albero sono riportati i valori delle probabilità a posteriori (PP) dell'analisi Bayesiana.

La sequenza di *Syllis gracilis* atlantica ottenuta da GenBank ricade nell'HG1, molto vicina a Hap_11 e Hap_10; *Syllis gracilis* pacifica, invece, come suggerito da studi precedenti, non ricade nel gruppo di *Syllis gracilis* s.s. e risulta decisamente distante.

Hap_5 ricade, come previsto, in un altro clade con forte supporto statistico che comprende *Syllis armillaris*, *Syllis pulvinata* ed ambedue le sequenze riferite a *Syllis hyalina*. *Syllis armillaris* e *Syllis pulvinata* hanno distanza genetica molto bassa, comparabile a quella che si riscontra fra due aplotipi di *Syllis gracilis* all'interno di un medesimo aplogruppo, mentre Hap_5 risulta differire da ambedue in misura maggiore, anche se sempre con distanza genetica inferiore rispetto a quella che si rileva tra due degli aplogruppi di *Syllis gracilis* identificati da questo studio. Le due *Syllis hyalina* hanno elevata distanza genetica sia l'una rispetto all'altra, sia rispetto al *complex* di *Syllis armillaris*, che risulta molto distante e ben caratterizzato, con elevato supporto statistico.

3.2 Risultato dello studio morfologico

Sono stati caratterizzati a livello morfologico 244 individui di *Syllis gracilis* appartenenti a 16 popolazioni; il numero di individui caratterizzati morfologicamente per popolazione va da 1 (LIV, GIA, CAL, PLE) a 54 (ORB). I dati relativi sono riportati in Appendice. Sono state in primo luogo calcolate media e deviazione standard, riportate in Tab. 3 (dall'analisi sono state escluse le popolazioni rappresentate da 1-4 esemplari):

Tabella 3: Media \pm deviazione standard calcolate per i parametri e rapporti utilizzati per l'analisi morfologica degli esemplari. Legenda: F= lunghezza del faringe in chetigeri; P= lunghezza del pro ventricolo in chetigeri; C10= lunghezza in articoli del cirro dorsale al 10° chetigero; C20= lunghezza in articoli del cirro dorsale al 20° chetigero; Y= chetigero d'inizio delle chete a Y; F/P= rapporto fra la lunghezza del faringe e la lunghezza del proventricolo; 10/20= rapporto fra la lunghezza del cirro al cg. 10 e la lunghezza del cirro al cg. 20. Per le abbreviazioni relative alle località di campionamento, vedi Tab.2

	F	P	C10	C20	Y	F/P	10/20
PAL	7,33 \pm 1,86	5,25 \pm 1,44	7,60 \pm 1,21	7,11 \pm 1,16	16,60 \pm 2,06	1,43 \pm 0,18	1,07 \pm 0,13
BOC	7,78 \pm 1,38	6,56 \pm 1,41	8,70 \pm 1,64	7,60 \pm 0,97	19,63 \pm 2,88	1,19 \pm 0,19	1,15 \pm 0,10
SSC	8,32 \pm 1,56	7,28 \pm 1,57	8,72 \pm 1,83	7,42 \pm 1,55	19,13 \pm 2,02	1,17 \pm 0,22	1,17 \pm 0,19
CAP	8,00 \pm 1,60	5,40 \pm 2,05	9,57 \pm 1,12	7,57 \pm 1,12	19,50 \pm 1,39	1,51 \pm 0,20	1,26 \pm 0,13
ORB	9,50 \pm 1,53	9,76 \pm 1,75	12,70 \pm 2,05	10,90 \pm 1,80	20,69 \pm 2,69	0,99 \pm 0,18	1,17 \pm 0,11
FIV	8,20 \pm 1,61	4,47 \pm 0,83			16,73 \pm 2,81	1,86 \pm 0,36	
PTO	8,18 \pm 1,38	5,53 \pm 1,25	9,00 \pm 3,40	7,95 \pm 2,41	20,56 \pm 3,14	1,52 \pm 0,35	1,13 \pm 0,21
PBA	9,13 \pm 1,09	7,18 \pm 1,56	13,44 \pm 1,66	11,09 \pm 1,43	21,85 \pm 2,40	1,30 \pm 0,28	1,22 \pm 0,14
EMI	10,14 \pm 1,13	8,00 \pm 1,50	11,86 \pm 1,29	10,00 \pm 1,00	25,67 \pm 1,11	1,28 \pm 0,17	1,19 \pm 0,07
ROV	10,34 \pm 1,33	4,86 \pm 0,77			18,06 \pm 1,97	2,16 \pm 0,32	

È stato quindi effettuato il *F*-test per verificare l'omoscedasticità in modo da impostare correttamente il *t*-test sulle medie. Il risultato (non riportato) non permette di considerare omoscedastici i campioni, conseguentemente si ricorre al *t*-test per l'eteroscedasticità. I risultati del *t*-test condotto sulle cinque variabili e sui due rapporti calcolati sono riportati in Tab.4.

Per quanto riguarda la lunghezza assoluta di faringe e proventricolo, non è possibile individuare un pattern specifico nelle differenze tra le medie; di fatto, non si individuano cluster specifici, ma le differenze significative fra popolazioni sono distribuite in maniera piuttosto casuale. Questo è particolarmente vero per quanto riguarda il faringe, mentre riguardo il proventricolo solo la popolazione di Orbetello risulta differire significativamente da tutte le altre. Questi risultati confermano l'ipotesi che la lunghezza assoluta di faringe e proventricolo non risulti particolarmente significativa, sia soggetta ad un'ampia variabilità casuale e dipenda molto verosimilmente dalle dimensioni dell'animale, che tuttavia non possono essere valutate con sicurezza in organismi fissati; standardizzare tali misure su parametri quantitativi relativi alle dimensioni dell'animale risulta quindi poco pratico, e in definitiva viziato da notevoli fonti di errore. Per questi motivi si decide di escludere questi due parametri dall'analisi multivariata.

Tabella 4: Risultato del *t*-test effettuato per ciascuna coppia di popolazioni in relazione a ciascun parametro morfologico (continua alla pag. successiva). Sono riportate direttamente le probabilità, mentre è omissa il valore di *t*. I valori significativi sono riportati in grassetto; i valori di probabilità approssimati a 0 corrispondono a valori reali inferiori allo 0,001%. Per le abbreviazioni relative alle località di campionamento, vedi Tab.2

Faringe

	PAL	BOC	SSC	CAP	ORB	FIV	PTO	EMI	PBA	ROV
PAL										
BOC		56,5								
SSC		4	49,2							
CAP		19,7	78,3	44,3						
ORB		0,008	4,6	0,06	0,4					
FIV		13,5	62	80,3	70,7	1,1				
PTO		11,1	62,7	73,5	71,2	0,3	96,6			
EMI		0,004	1,3	0,08	0,1	13,5	0,2	0,08		
PBA		0,05	10,4	1,4	1,8	19,1	5,8	2,4	2,6	
ROV		0	0,72	0	0,02	0,7	0,02	0	63,2	0,02

Proventricolo

	PAL	BOC	SSC	CAP	ORB	FIV	PTO	EMI	PBA	ROV
PAL										
BOC		6,2								
SSC		0,02	24,9							
CAP		81,7	14,5	1,5						
ORB		0	0,02	0	0,03					
FIV		8,4	0,4	0	14,7	0				
PTO		53,7	10,5	0,003	82,7	0	0,3			
EMI		0,002	3,2	7,6	0,4	0,01	0	0		
PBA		0,03	29,9	78,5	2	0	0	0,001	3,1	
ROV		33,6	1,2	0	35,4	0	13,4	2,3	0	0

Circo 10

	PAL	BOC	SSC	CAP	ORB	PTO	EMI	PBA
PAL								
BOC		3,3						
SSC		3,2	96,2					
CAP		1,8	24,1	26,1				
ORB		0	0	0	0,12			
PTO		4,6	65,6	68,9	50,5	0,001		
EMI		0	0,001	0	0,9	15,4	0,02	
PBA		0	0	0	0,03	19,9	0	0,3

Circo 20

	PAL	BOC	SSC	CAP	ORB	PTO	EMI	PBA
PAL								
BOC		37,6						
SSC		52,6	69,9					
CAP		40,5	95,7	74,6				
ORB		0	0	0	0			
PTO		10,7	47,5	20,1	44,2	0		
EMI		0,003	0,007	0	0,02	6,1	0,001	
PBA		0	0	0	0	69,6	0	0,3

Tabella 4 (continua)

Inizio chete a Y

	PAL	BOC	SSC	CAP	ORB	FIV	PTO	EMI	PBA	ROV
PAL										
BOC	0,26									
SSC	0,01	51,2								
CAP	7,5	93,3	78,6							
ORB	0	19,6	0,1	41						
FIV	87,6	0,9	0,6	9,5	0,007					
PTO	0,001	32,7	4,8	48,3	86	0,04				
EMI	0	0,003	0,002	0,32	0,006	0	0,002			
PBA	0	1,8	0,001	13,4	6,2	0	11,3	0,03		
ROV	1,3	6,3	1,6	32,1	0	11,3	0,2	0	0	

Rapporto F/P

	PAL	BOC	SSC	CAP	ORB	FIV	PTO	EMI	PBA	ROV
PAL										
BOC	0,85									
SSC	0,08	82,4								
CAP	44,3	1,7	1,3							
ORB	0	1,4	0,03	0,3						
FIV	0,05	0	0	1,6	0					
PTO	37,5	0,5	0,1	95,7	0,001	1				
EMI	10,7	36,6	22,6	6,9	0,8	0,007	4			
PBA	8,1	17,1	4,5	7,6	0	0,002	3,5	77,9		
ROV	0	0	0	0,03	0	1	0	0	0	

Rapporto 10/20

	PAL	BOC	SSC	CAP	ORB	PTO	EMI	PBA
PAL								
BOC	19,2							
SSC	13,1	75,5						
CAP	1,9	9,6	14,6					
ORB	10,9	70,9	99,4	12,5				
PTO	38,8	70,6	53,3	7,4	48			
EMI	7	45,4	69,2	20,8	69,5	32,7		
PBA	2,6	13,7	25,7	43,7	19,5	12,1	40,1	

Di maggior interesse appaiono gli altri parametri considerati. Per quanto riguarda il cirro dorsale al chetigero 10, si individua un cluster formato da BOC, SSC, CAP e PTO, che non differiscono significativamente tra di loro, e per contro sono differenti da tutte le altre. ORB risulta non differire da PBA ed EMI, che tuttavia differiscono significativamente. PAL, infine, risulta isolata da tutte le altre popolazioni. Questo pattern è confermato anche dal t-test condotto sul cirro dorsale al chetigero 20, in cui l'unica differenza consiste nel fatto che PAL si trova nel medesimo gruppo di BOC, SSC, CAP e PTO, da cui non differisce significativamente.

Il chetigero di inizio delle chete a Y non sembra avere un pattern particolarmente specifico; EMI differisce significativamente da tutte le altre popolazioni in quanto le chete a Y iniziano particolarmente distante dal prostomio (in media tra il 25 e il 27 chetigero). Le popolazioni PAL e FIV, invece, cadono nella parte opposta dell'intervallo dei valori rilevati per questo parametro, essendo provviste di chete a Y a partire dai chetigero 15-17, ma non risultano tuttavia differenti da

CAP, a sua volta non differente da altre popolazioni. Per questo motivo non è possibile individuare un cluster specifico di popolazioni per cui questo parametro abbia un valore stabile. Questo parametro risulta abbastanza ben caratterizzato nelle singole popolazioni, ma non sembra avere un nesso né con la distribuzione geografica, né con l'ambiente in cui è stata campionata la popolazione.

Il rapporto fra lunghezza del faringe e lunghezza del proventricolo risulta abbastanza informativo per quanto riguarda le popolazioni. ORB risulta differire significativamente da tutte le altre popolazioni in quanto tale rapporto è particolarmente basso (circa 1), e lo stesso si può dire per ROV, ma per il motivo opposto (il rapporto è superiore a 2). Anche FIV, con un rapporto medio intorno a 1,9, risulta significativamente differente da tutte le altre popolazioni. Considerando le restanti popolazioni, non è possibile individuare un pattern specifico che permetta di isolare un cluster ben caratterizzato, analogamente a quanto si riscontra per il carattere delle chete a Y. Risulta comunque evidente che questo rapporto può essere fortemente caratterizzato a livello delle popolazioni.

Il rapporto fra lunghezza del cirro dorsale al 10° chetigero e lunghezza del cirro al 20° chetigero risulta differire significativamente soltanto nel confronto PAL-CAP e PAL-PBA; per tutte le restanti popolazioni non si riscontra alcuna differenza significativa. Questo elemento, insieme all'osservazione che il risultato del t-test è sostanzialmente congruente per quanto riguarda la lunghezza del cirro 10 e del cirro 20, porta ad escludere dall'analisi multivariata 1) il rapporto 10/20, in quanto non informativo riguardo eventuali differenze fra popolazioni, e 2) la lunghezza del cirro 10, in quanto utilizzare ambedue le misure dei cirri come variabili conferirebbe a questo carattere un peso doppio rispetto agli altri; il cirro dorsale del chetigero 20 risulta tra i due il parametro più informativo, in quanto caratterizzato da una minore variabilità, ma anche perché al chetigero 20 il cirro raggiunge una lunghezza stabile, come già osservato precedentemente (vedi cap. 2.3).

In conseguenza delle considerazioni effettuate, l'analisi multivariata è stata condotta utilizzando come variabili la lunghezza del cirro dorsale al 20° chetigero, il chetigero d'inizio delle chete a Y e il rapporto fra lunghezza del faringe e lunghezza del proventricolo. L'impossibilità di rilevare uno o più dei parametri su numerosi esemplari ha ridotto a 130 gli esemplari considerati, dai quali sono stati eliminati altri 7 individui corrispondenti a popolazioni campionate in misura troppo limitata da poter avere stime di variabilità attendibili. Su questo campione è stato in primo luogo effettuato l'ordinamento in uno spazio bidimensionale mediante MDS (Fig. 8 e 9)

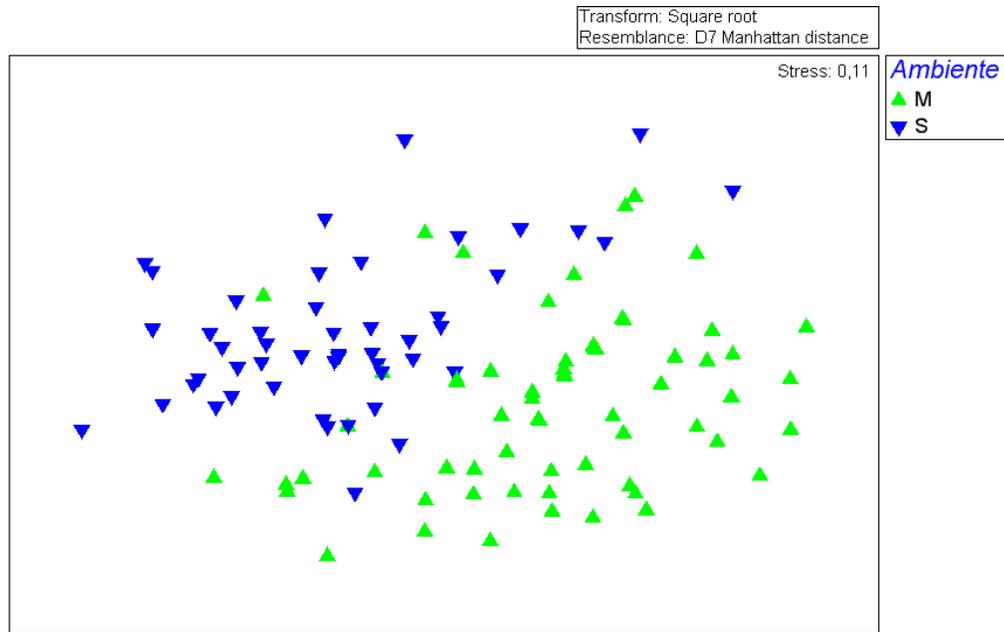


Figura 8: MDS relativo a *Syllis gracilis* da varie popolazioni – sono messi in evidenza i livelli del fattore “ambiente” (M= marino; S= salmastro)

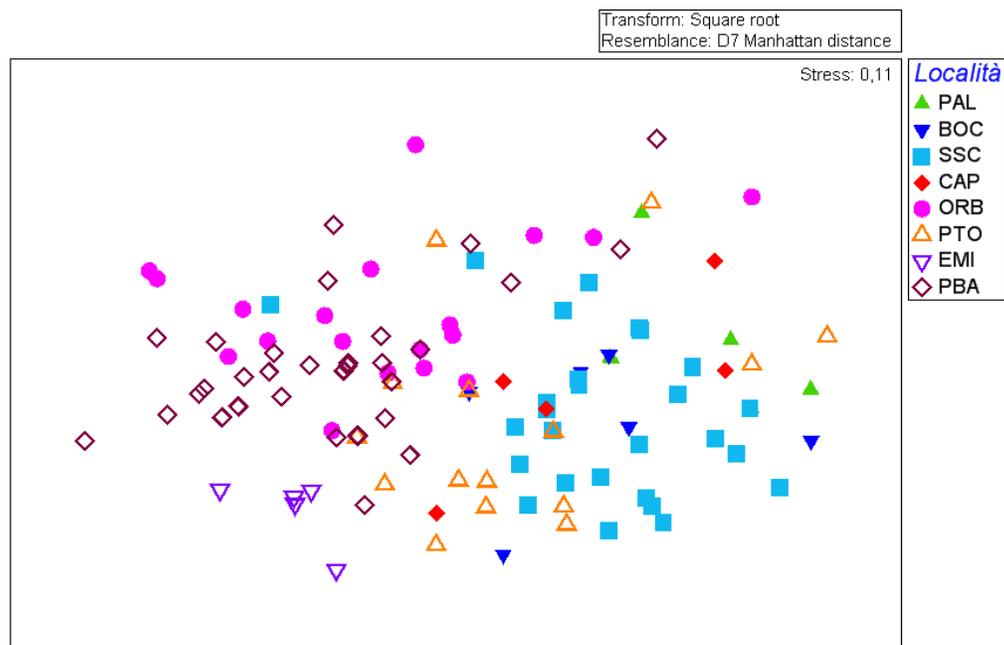


Figura 9: MDS relativo a *Syllis gracilis* da varie popolazioni – sono messi in evidenza i livelli del fattore “popolazione”

Per quanto riguarda l’ambiente, nel grafico MDS si possono individuare due aree, una in cui vanno a disporsi prevalentemente le *Syllis gracilis* di ambiente salmastro, una in cui vanno a disporsi principalmente le *Syllis gracilis* di ambiente marino. I due gruppi, tuttavia, non risultano nettamente delineati, essendo presente un’ampia zona di sovrapposizione; inoltre numerosi esemplari

provenienti da un ambiente salmastro ricadono nell'area prevalentemente occupata da organismi di ambiente marino, e viceversa (Fig. 8). A livello delle singole popolazioni il MDS mette in evidenza una situazione complessivamente poco leggibile. La maggior parte delle popolazioni marine (PAL, BOC, SSC, CAP) risultano mescolate. Le due popolazioni salmastre PBA e ORB risultano largamente sovrapposte, ma anche in esse si individuano singoli esemplari fortemente distinti a livello morfologico; vicino ad essi ricade un gruppo costituito dalla maggior parte degli esemplari di PTO, ma anche in questo caso diversi altri esemplari sono mescolati alle popolazioni marine. Infine, un singolo esemplare di SSC risulta molto vicino agli esemplari di PBA e ORB, e gli esemplari di EMI costituiscono l'unico gruppo ben caratterizzato e separato dagli altri (Fig. 9). Il coefficiente di stress $s = 0,11$ permette di considerare sufficientemente accurata tale rappresentazione grafica. Poiché l'ordinamento grafico risulta meramente indicativo, si ricorre ad un test statistico, l'ANOSIM, come descritto nel par. 2.3, di cui vengono riportati i risultati:

*TESTS FOR DIFFERENCES BETWEEN Popolazione GROUPS
(across all Ambiente groups)*

Global Test

Sample statistic (Global R): 0,248
Significance level of sample statistic: 0,1%
Number of permutations: 999 (Random sample from a large number)
Number of permuted statistics greater than or equal to Global R: 0

*TESTS FOR DIFFERENCES BETWEEN Ambiente GROUPS
(using Popolazione groups as samples)*

Global Test

Sample statistic (Global R): 0,219
Significance level of sample statistic: 14,3%
Number of permutations: 28 (All possible permutations)
Number of permuted statistics greater than or equal to Global R: 4

Il test risulta dunque significativo per quanto riguarda le differenze tra le popolazioni, non significativo per quanto riguarda l'ambiente. Si è altresì condotto il test per coppie di popolazioni, con i risultati in Tab. 5.

Tabella 5: ANOSIM per coppie di popolazioni. Nella prima colonna è riportata la coppia di gruppi fra i quali viene condotto il confronto; nella seconda il valore della statistica R; nella terza il livello di significatività del valore rilevato (in grassetto i valori significativi); nella quarta il numero di possibili permutazioni e nella quinta il numero di permutazioni effettuate (pari al numero delle possibili se quest'ultimo è inferiore a 999); nella sesta colonna è riportato il numero di valori campionari di R osservati che risultino maggiori o uguali rispetto al valore riportato in colonna 2

Groups	R Statistic	Significance Level %	Possible Permutations	Actual Permutations	Number \geq Observed
PAL, BOC	0,187	5,3	6435	999	52
PAL, SSC	0,144	10,3	48903492	999	102
PAL, CAP	0,114	16,5	1287	999	164
PAL, ORB	0,655	0,1	3108105	999	0
PAL, PTO	0,332	0,4	735471	999	3
PAL, EMI	1	0,1	1287	999	0
PAL, PBA	0,764	0,1	76904685	999	0
BOC, SSC	-0,043	58,4	10295472	999	583
BOC, CAP	0,01	41	792	792	325
BOC, ORB	0,412	0,2	888030	999	1
BOC, PTO	0,105	15,6	245157	999	155
BOC, EMI	0,864	0,1	792	792	1
BOC, PBA	0,615	0,1	15380937	999	0
SSC, CAP	0,218	7,3	324632	999	72
SSC, ORB	0,568	0,1	Too Many	999	0
SSC, PTO	0,331	0,1	Too Many	999	0
SSC, EMI	0,91	0,1	324632	999	0
SSC, PBA	0,705	0,1	Too Many	999	0
CAP, ORB	0,501	0,4	53130	999	3
CAP, PTO	-0,023	51,2	20349	999	511
CAP, EMI	0,788	0,8	126	126	1
CAP, PBA	0,562	0,2	435897	999	1
ORB, PTO	0,434	0,1	Too Many	999	0
ORB, EMI	0,423	0,3	53130	999	2
ORB, PBA	0,143	0,6	Too Many	999	5
PTO, EMI	0,422	0,8	20349	999	7
PTO, PBA	0,419	0,1	Too Many	999	0
EMI, PBA	0,233	5,8	435897	999	57

Nonostante globalmente si possano individuare differenze morfologiche tra le popolazioni basandosi sulla combinazione dei tre parametri impiegati come variabile, in molti casi non si riscontra una differenza significativa fra coppie di popolazioni. Le quattro popolazioni di PAL, SSC, BOC e CAP non risultano distinte tra di loro dal punto di vista morfologico. CAP e BOC risultano altresì non distinte da PTO, mentre le altre due risultano significativamente differenti. Le due popolazioni di PBA ed EMI risultano non distinte dal punto di vista morfologico, e per contro distinte dalle altre popolazioni, infine ORB è significativamente differente da tutte le altre popolazioni.

Si è infine effettuato il t-test sugli aplogruppi identificati dalla caratterizzazione genetica (vedi cap. 3.1); a causa del basso numero di individui riconducibili agli aplogruppi 3 e 4, sono stati considerati solo gli aplogruppi 1 e 2 (Tab.6 e Tab. 7):

Tabella 6: Media \pm deviazione standard calcolate per i parametri e rapporti utilizzati per l'analisi morfologica degli esemplari nei *subset* corrispondenti ai due aplogruppi HG1 e HG2; legenda come in Tab.3.

	F	P	C10	C20	Y	F/P	10/20
HG1	8,15 \pm 2,03	6,35 \pm 2,07	9,18 \pm 2,58	8,00 \pm 1,92	19,06 \pm 3,24	1,38 \pm 0,44	1,16 \pm 0,18
HG2	7,82 \pm 1,25	5,55 \pm 1,29	8,58 \pm 1,68	7,38 \pm 1,39	18,00 \pm 2,24	1,45 \pm 0,26	1,15 \pm 0,15

Tabella 7: Risultati del *t*-test condotto sui gruppi corrispondenti ai due aplogruppi HG1 e HG2 per i vari caratteri morfologici. Come in Tab. 4 è riportata direttamente la probabilità del valore di *t* riscontrato.

Faringe	52,4
Proventricolo	13,7
Cirro 10	41,9
Cirro 20	28,8
Inizio chete a Y	24,1
Rapporto F/V	51,6
Rapporto 10/20	81,3

Nessuno dei test condotti per i vari parametri sugli esemplari corrispondenti ai due aplogruppi conduce a rilevare una differenza significativa ed anzi, tutte le probabilità calcolate risultano ben lontane dalla significatività (Tab. 7). Se ne conclude che gli esemplari corrispondenti ai due aplogruppi risultano indistinguibili dal punto di vista morfologico.

4 Discussione

4.1 Analisi molecolare

Nelle *Syllis gracilis* sequenziate sono stati individuati tre aplogruppi, separati da 26-28 mutazioni, riconducibili al *complex* di *Syllis gracilis*; inoltre è presente un quarto aplogruppo molto distante, rappresentato da una sola sequenza, che risulta simile a *Syllis armillaris*. L'aplogruppo (HG) 3 risulta decisamente raro, perlomeno nelle popolazioni campionate, comprendendo solo due esemplari, uno proveniente da SSC, l'altro da EMI, gli HG1 e HG2 includono un grande numero di esemplari, provenienti da più popolazioni. Nel campionamento si individuano sia popolazioni con sequenze riconducibili ad un solo aplogruppo, sia popolazioni con sequenze riconducibili a più aplogruppi. Sia nell'HG1 che nell'HG2 si individua un aplotipo condiviso da un grande numero di individui (31 su 35 – 88,6% - per HG1, 9 su 13 – 69,2% - per HG2) ed alcuni aplotipi rari, portati da 1-2 individui e separati da una sola mutazione dall'aplotipo più frequente (fatta eccezione per Hap_14, la cui relazione con HG1 non è tuttavia così chiara). Questa struttura lascia ritenere che Hap_11 e Hap_6 (rispettivamente gli aplotipi più frequenti nell'HG1 e nell'HG2) siano gli aplotipi ancestrali, mentre gli aplotipi rari siano derivati solo in tempi relativamente recenti (Avisé, 2000).

Tutti e tre gli aplogruppi hanno ampia distribuzione, anche se l'HG1 risulta più diffuso, in quanto è stato ritrovato dall'Adriatico settentrionale (ROV, PBA) al Canale di Sicilia (EMI) fino al Tirreno settentrionale (ORB, PTO) ed al Mar Ligure (PAL, LIV, SSC, BOC). Inoltre, considerando anche la sequenza depositata in GenBank, è possibile ampliare la sua diffusione fino a comprendere l'Oceano Atlantico orientale. L'HG2 è stato trovato principalmente nel Mar Ligure (PAL, CAP) e nel Mar di Sardegna (PTO, STI), con un solo esemplare proveniente dall'Adriatico (ANC). L'HG3 ha distribuzione abbastanza ampia, essendo stato trovato sia nel Canale di Sicilia (EMI) sia nel Mar Ligure (SSC); tuttavia il fatto che sia stato riscontrato solo in due esemplari non permette di trarre ipotesi che abbiano un minimo supporto sulla sua distribuzione reale.

L'albero filogenetico Bayesiano conferma i tre aplogruppi, che sono fortemente supportati dal punto di vista statistico; non è invece ben chiara la relazione tra di essi, sebbene si suggerisca che l'HG3 sia stata la prima linea filetica a separarsi. Vista l'ampia diffusione e la notevole frequenza nelle popolazioni campionate dell'HG1, si ipotizza che sia questo, e in particolare Hap_11, l'aplotipo ancestrale, e che gli aplotipi dell'HG2 e dell'HG3 ne siano derivati successivamente. La notevole distanza tra i tre aplogruppi e l'identità genetica relativamente bassa (93-94% di identità di sequenza per le coppie HG1-HG2 e HG1-HG3, 92% per HG2 e HG3) portano a ritenere che le tre linee filetiche si configurino alla stregua di vere e proprie specie, perlomeno secondo la definizione filogenetica di Cracraft (1989), secondo cui "una specie è un gruppo irriducibile (basale) di organismi, distinto da ogni altro gruppo affine, all'interno del quale si individua una struttura

parentale di ascendenza e discendenza”. Questo risultato è parzialmente consistente con quanto rilevato da Maltagliati et al. (2000), che mettono in evidenza attraverso marcatori alloenzimatici l’esistenza di tre principali linee filetiche, una delle quali corrisponde alle popolazioni salmastre, le altre due ad altrettante popolazioni marine pressoché simpatiche. Anche nel presente lavoro si riscontra la simpatria di differenti linee filetiche, il che porta a chiedersi come mai tali supposte specie non siano mutuamente esclusive, avendo apparentemente le medesime necessità ecologiche. Una possibile spiegazione è che la distribuzione delle varie *sibling species* mediterranee riconducibili al *complex* di *Syllis gracilis* sia influenzata da fattori che operano a livello di microhabitat, su scala estremamente piccola, nell’ordine dei pochi centimetri, quali le caratteristiche della copertura algale, cui potrebbero essere specificamente legati questi organismi. Tuttavia a sostegno di questa ipotesi non si hanno né dati, né indizi basati sulle caratteristiche ecologiche della specie, che apparentemente risulta piuttosto generalista. Tutte le popolazioni in cui si riscontrano individui riconducibili a più aplogruppi (PAL, SSC, PTO, EMI) sono marine e, viste le esigenze ecologiche di *Syllis gracilis*, legate ad un ambiente fortemente diversificato. Per contro, tanto le popolazioni di ambienti salmastri (ORB, PBA) quanto la popolazione marina dell’alto Adriatico (ROV) presentano solo l’aplotipo ancestrale Hap_11 (con l’eccezione di un esemplare di PBA corrispondente a Hap_14, anch’esso a distribuzione abbastanza ampia, tenendo conto che è stato ritrovato anche nella popolazione di BOC). La relativa uniformità genetica delle popolazioni salmastre è ben spiegata dal fatto che questi ambienti sono soggetti ad un forte stress ambientale, con la possibilità frequenti eventi di estinzione e ricolonizzazione locali (Cognetti, 1994; Cognetti & Maltagliati, 2000). Per quanto riguarda il Mar Adriatico, si tratta di un’area ricolonizzata in tempi più recenti rispetto al resto del Mar Mediterraneo, in quanto, in seguito all’abbassamento del livello del mare durante l’ultima era glaciale, i fondali poco profondi dell’Adriatico Settentrionale sono rimasti per gran parte e per lungo tempo emersi (Clark et al., 2009; Maselli, 2011).

A differenza con quanto rilevato da Maltagliati et al. (2000), attraverso il 16S rRNA non si identifica una linea che comprenda solo le popolazioni salmastre. Questo è dovuto, probabilmente, al disegno di campionamento più esteso e all’inclusione di un maggior numero di popolazioni nel presente lavoro. Tuttavia le popolazioni salmastre ricadono tutte nell’HG1 a prescindere dalla loro localizzazione geografica. L’ipotesi che tutte le popolazioni salmastre ricadano nel medesimo clade è dunque confermata. I cladi corrispondenti all’HG2 e all’HG3 sono invece strettamente marini. In realtà ambedue le asserzioni risultano vere soltanto escludendo l’individuo di Ancona ANC01, che ricade nell’HG2, la cui attribuzione ad una popolazione salmastra è tuttavia dubbia ed effettuata solo sulla base di prove indiziarie. Ancona rappresenta un risultato di difficile interpretazione anche dal punto di vista della distribuzione geografica, in quanto amplia notevolmente la distribuzione

dell'HG2, che altrimenti risulterebbe limitato al Mar di Sardegna e al Mar Ligure. In assenza di altri individui per questa popolazione, questo dato non permette di trarre ulteriori inferenze.

L'aplotipo Hap_5, corrispondente all'esemplare CAP06 proveniente dall'Isola di Capraia, risulta molto distante dal *complex* di *Syllis gracilis*, mentre si colloca piuttosto vicino alle sequenze di *Syllis armillaris* e *Syllis pulvinata* disponibili in GenBank, con cui ha un'identità di sequenza del 97%. Per quanto riguarda queste due sequenze, si ritiene che molto probabilmente appartengano alla medesima specie. Ciò può corrispondere ad un errore di determinazione dell'esemplare identificato come *Syllis pulvinata*, oppure ad una marcata plasticità fenotipica in *Syllis armillaris*, di cui *Syllis pulvinata* risulterebbe semplicemente un morfotipo. La distanza genetica tra Hap_5 e *Syllis armillaris* è più alta rispetto a quella che si riscontra tra aplotipi di *Syllis gracilis* appartenenti al medesimo aplogruppo, ma risulta comunque più bassa rispetto a quella presente tra aplogruppi differenti. Questo risultato potrebbe semplicemente essere dovuto 1) alla distanza geografica che separa le località di campionamento relative alle sequenze depositate in GenBank (coste mediterranee spagnole) e l'Isola di Capraia da cui proviene l'esemplare in questione, oppure, 2) tenendo conto che si tratta di singoli esemplari, all'errore di campionamento, nel qual caso Hap_5 sarebbe semplicemente una *Syllis armillaris*. Tuttavia ciò potrebbe anche corrispondere ad un'effettiva differenza a livello specifico tra le due entità. Non avendo a disposizione un campione sufficientemente numeroso di *Syllis armillaris* per valutarne la variabilità, non è possibile argomentare a favore dell'una o dell'altra ipotesi. È da rilevare, comunque, che l'individuo dell'isola di Capraia CAP06, pur essendo in cattive condizioni di conservazione e non essendo conseguentemente possibile confrontarlo con gli altri esemplari per i caratteri considerati nell'analisi morfologica, è una *Syllis* provvista di chete a Y, che generalmente sono assenti in *Syllis armillaris*, ma presenti nell'affine *Syllis mayeri*, descritta per l'area caraibica, ma potenzialmente presente anche nel Mediterraneo (Ben-Eliahu, 1977; Musco & Giangrande, 2005b). Anche in questo caso si possono dare due interpretazioni di questo dato. La prima interpretazione prende la mosca dall'ipotesi, ampiamente condivisa, che quanto viene chiamato *Syllis armillaris* rappresenti, in realtà, un complesso di specie, in maniera non differente da *Syllis gracilis* (Musco & Giangrande, 2005b). In quest'ottica, si può ipotizzare che l'individuo CAP06 appartenga ad una specie riconducibile a tale *complex*, magari di separazione recente, ma non corrispondente a questa specie in senso stretto, e forse corrispondente proprio a *Syllis mayeri*, per la quale, purtroppo, non sono disponibili dati molecolari. Se questo fosse verificato, confermerebbe l'ipotesi che le tre linee filetiche di *Syllis gracilis* corrispondano effettivamente a tre specie criptiche, dato che risultano molto più distanti tra di loro. Un'alternativa, che tuttavia non può essere esclusa, è quella che mette in gioco la plasticità fenotipica, che potrebbe determinare la comparsa di fenotipi ben caratterizzati

e nettamente distinti in individui con genotipi simili, in risposta a differenti pressioni ambientali (Whitman & Agrawal, 2009). Questo fenomeno, ben noto per alcuni phyla, tra cui quello degli artropodi (Whitman & Agrawal, 2009), nei policheti è relativamente poco studiato ma conosciuto (Meyer et al., 2008). Per quanto riguarda i risultati del presente lavoro, si può ipotizzare l'esistenza di popolazioni di *Syllis armillaris* adattate ad un habitat endolitico per comparsa delle chete a Y; strutture affini (anche se non necessariamente omologhe) sono presenti in specie di Syllidae non strettamente imparentate, ma che condividono una vita o endolitica (*Syllis gracilis*, *S. amica*) o endosimbiotica all'interno di spugne (*S. mayeri*, *Haplosyllis* spp); talora, come nel caso di *Haplosyllis*, l'endosimbiosi in spugne è facoltativa e la specie si trova anche con *habitus* endolitico non differente da *S. gracilis* (Abbiati et al., 1987; 1991; San Martín, 2003). La presenza di chete a Y in popolazioni endolitiche di *S. armillaris*, tuttavia, non comporta necessariamente un differenziamento a livello specifico. Di fatto, la stessa *Syllis mayeri* potrebbe rappresentare semplicemente un morfotipo di *Syllis armillaris*, ben caratterizzato a livello morfologico, ma non supportato da un'eventuale analisi molecolare. Questa ipotesi è supportata dall'assenza di corrispondenza fra i gruppi identificati dall'analisi morfologica e quelli individuati dall'analisi molecolare in *Syllis gracilis* nel presente studio. Non è inverosimile inoltre che la plasticità fenotipica abbia un ruolo predominante nel determinare le caratteristiche morfologiche di questi organismi, piuttosto che i rapporti di parentela fra di essi, e conseguentemente le filogenesi costruite sulla base della morfologia, perlomeno a livello dei rapporti "intragenerici", risultino poco realistiche (Scotland et al., 2003; ma vedi anche Wiens, 2004).

Di fatto, l'albero filogenetico costruito sulla base del 16S rRNA mette in evidenza una netta differenza nelle relazioni tra le specie considerate rispetto alla ricostruzione di Aguado et al. (2012) (Fig. 10), che si avvale, oltre che di questo gene, del 18S rRNA e della subunità I della citocromo ossidasi (COI). Le differenze più eclatanti consistono nella differente posizione di *Syllis hyalina* del Pacifico, che di fatto si configura a sua volta come una specie differente rispetto a *Syllis hyalina* s.s., atlanto-mediterranea, e di *Syllis gracilis* del Pacifico. Nella nostra ricostruzione *Syllis hyalina* del Pacifico risulta *sister* di un clade, presente anche in Aguado et al. (2012), che comprende *Syllis hyalina*, *S. armillaris* e *S. pulvinata*, con alto supporto statistico e non basale alle altre specie considerate. *Syllis gracilis* del Pacifico, invece di ramificare insieme al clade precedentemente descritto, a *S. gracilis* s.s. e a *S. armillaris* atlantica, risulta *sister* del resto delle specie appartenenti al gruppo di *Syllis armillaris* considerate in questo studio. In acque atlanto-mediterranee si individuano dunque due principali gruppi, ossia il gruppo *hyalina-armillaris* e il gruppo *gracilis*, la cui separazione, tenendo conto della presenza di una specie a distribuzione geografica pacifica nel primo gruppo, è probabilmente molto antica. Chiaramente questa ipotesi riguardo l'evoluzione di

questo gruppo deve essere confermata sia da uno studio a più ampia scala spaziale sulle specie considerate, sia dall'inclusione di altre specie in esso, tenendo conto del fatto che è plausibile trovare in questo genere sia specie che, a fronte di caratteristiche morfologiche fortemente divergenti, risultano congruenti dal punto di vista genetico, sia *complex* di specie criptiche, morfologicamente indistinguibili e tradizionalmente considerate alla stregua di un'unica specie.

4.2 Analisi morfologica

Per quanto riguarda la caratterizzazione morfologica, tanto le analisi univariate quanto le analisi multivariate mettono in evidenza una notevole variabilità tra le popolazioni, che secondo i test statistici effettuati risultano ad un livello generale significativamente caratterizzate dal punto di vista morfologico. Per contro, i medesimi test condotti a livello dell'ambiente non mostrano alcuna significatività, e l'apparente separazione che si osserva nel MDS (Fig. 8) risulta di fatto un artefatto della differenziazione morfologica fra popolazioni.

Più interessante è il risultato dei test a coppie; il risultato dei test a coppie effettuati sulla base delle singole variabili morfologiche e sulla base della combinazione fra variabili risulta in buona parte congruente, mettendo in evidenza a livello generale due principali gruppi di popolazioni, fra le quali per la maggior parte dei test non si ha alcuna differenza significativa. Uno dei due gruppi comprende le popolazioni di PAL, BOC, SSC, CAP, FIV e PTO, mentre il secondo comprende ORB, EMI e PBA (nonostante per alcuni test vi siano differenze significative anche all'interno, ad esempio ORB e ROV si distaccano costantemente per il rapporto tra faringe e proventricolo, PAL e EMI per il punto d'inizio delle chete a Y). Le lunghezze di faringe e proventricolo risultano fortemente caratterizzate a livello di popolazione. Questo può essere legato al fatto che le singole popolazioni sono state campionate in periodi differenti l'una dall'altra e in finestre temporali piuttosto ristrette, comprendendo organismi relativamente uniformi per età e dimensioni. Questo carattere non sembra, quindi, informativo per quanto riguarda l'affinità fra popolazioni.

A livello dell'ANOSIM un gruppo risulta costituito da BOC, SSC, CAP, PAL (con un confronto significativo) e PTO (con due confronti significativi), l'altro è costituito da PBA ed EMI, ed ORB risulta significativamente differente da tutte le popolazioni. Il parametro morfologico che caratterizza maggiormente questi gruppi è rappresentato dalla lunghezza del cirro dorsale al chetigero 20 in numero di articoli; dai risultati del *t*-test corrispondente si può ipotizzare che esistano due morfotipi di *Syllis gracilis*, uno a cirri corti, corrispondente alle popolazioni PAL, BOC, SSC, CAP e PTO e uno a cirri lunghi, corrispondente alle popolazioni ORB, EMI e PBA. Nel caso del cirro 10 PAL risulta significativamente diversa da tutte le popolazioni in quanto il cirro in media è particolarmente corto, mentre EMI risulta differire in ambedue i casi da PBA,

probabilmente anche a causa dei pochi esemplari campionati. Considerando il cirro 20, più affidabile come parametro in quanto affetto da una minore variabilità all'interno delle popolazioni (Tab. 3), emerge che il morfotipo a cirri corti ha cirro dorsale del 20° chetigero formato in media da 7-8 articoli, mentre il morfotipo a cirri lunghi ha cirro dorsale del 20° chetigero formato in media da 10-11 articoli. Ambedue i morfotipi hanno ampia distribuzione, per quanto solo il morfotipo a cirri lunghi si trovi nelle aree dell'Adriatico e del Canale di Sicilia, e in ambiente salmastro dalle analisi condotte sembrerebbe essere presente soltanto il morfotipo a cirri lunghi. Tuttavia queste conclusioni devono essere prese con beneficio d'inventario, in quanto nell'analisi non sono incluse le popolazioni rappresentate da un basso numero di individui, tra i quali sono presenti sia esemplari a cirri corti campionati nel Mar Adriatico (ANC), sia esemplari a cirri corti provenienti da ambienti salmastri (ANC, CAL).

La lunghezza del cirro 20 rappresenta l'unico parametro che mostri una variazione abbastanza netta e costante su diverse popolazioni; le restanti variabili considerate risultano invece tendenzialmente ben caratterizzate a livello della singola popolazione, ma senza un *pattern* di variazione identificabile in qualche misura, e lo stesso si riscontra nell'analisi multivariata. La distribuzione geografica non sembra avere corrispondenza con la variazione dei suddetti parametri, che invece verosimilmente dipendono dalle caratteristiche specifiche dell'ambiente in cui gli organismi vivono, cui la popolazione locale risulta morfologicamente strettamente adattata. Questa ipotesi è supportata dal risultato non significativo del *t*-test condotto su tutte le variabili per gli organismi corrispondenti ai due aplogruppi principali, che mette in evidenza come, sulla base dei parametri morfologici considerati, non sia possibile distinguere fra organismi appartenenti ai due gruppi. Al contrario, organismi della medesima popolazione appartenenti ad aplogruppi diversi possono risultare morfologicamente molto simili e strutturare un gruppo coerente e significativamente distinto dagli altri: si veda, ad esempio, il caso di PAL, significativamente differente da tutte le popolazioni tranne FIV per il chetigero d'inizio delle chete a Y.

Il *complex* di *Syllis gracilis* mostra quindi una notevole plasticità fenotipica, e la variazione dei caratteri morfologici sembra essere controllata molto più dalle caratteristiche ambientali a scala ridotta che da elementi ereditari e dall'influenza dell'ambiente ad ampia scala. Anche in questo caso saranno opportuni ulteriori studi per comprendere in quale misura e attraverso quali fattori l'ambiente influenzi la morfologia di questi organismi. Comprendere quale sia l'effetto dell'ambiente sulle caratteristiche morfologiche del *complex* di *Syllis gracilis* può avere notevole rilevanza anche per quanto riguarda lo studio dei Syllidae sulla base dei caratteri morfologici, cui fino ad oggi è stata data una notevole importanza, probabilmente sopravvalutata.

4.3 Osservazioni nomenclaturali sul genere *Syllis* e su *Syllis gracilis* in particolare

Il genere *Syllis*, odiernamente uno dei più ricchi di specie all'interno dei policheti (Musco & Giangrande, 2005a; Castelli et al., 2008), ha avuto nel corso del tempo una certa varietà di interpretazioni. La specie tipo, cui è riferito il genere, è rappresentata da *Syllis monilaris* Savigny in Lamarck, 1818. Questo, tuttavia, deve essere considerato alla stregua di un *nomen dubium*, in quanto dalla stringata descrizione non è possibile capire di quale specie si tratti:

“Faringe di media lunghezza, divisa in due parti, con orifizio privo di tentacoli, ma provvisto di un piccolo corno (*dente*) solido, avanzato. Mascelle assenti. Tre antenne a molti articoli, moniliformi: le intermedie assenti. Due paia di cirri tentacolari moniliformi. Gli altri cirri sono superiormente moniliformi, lunghi, inferiormente inarticolati, conici.

OSSERVAZIONI

Ciò che è degno di nota nelle *Syllis* è la presenza di numerose strutture moniliformi, in quanto le tre antenne, i cirri tentacolari e, tra gli altri cirri del corpo, il superiore di ogni coppia hanno tutti forma simile. Il corpo di questi nereidi è composto da segmenti molto numerosi, a parapodi semplici, provvisti di un solo ciuffo di sete, ed una sola acicula. Gli occhi sono evidenti, mentre le branchie non lo sono.

Syllis monilaris

Si trova in Mar Rosso. Corpo molto lungo, poco depresso, insensibilmente ristretto verso la coda, che termina in due cirri sottili e moniliformi. Da 11 a 341 segmenti corti.”

Dalla descrizione di Lamarck emergono chiaramente le principali caratteristiche della famiglia Syllidae e della sottofamiglia Syllinae; è altresì possibile, all'interno di quest'ultima, escludere i generi *Trypanosyllis* Claparède, 1864, *Opisthosyllis* Langerhans, 1879, *Paraopisthosyllis* Hartmann-Schröder, 1991, *Perkinsyllis* San Martín et al., 2009, *Xenosyllis* Marion & Bobretzky, 1875, *Plakosyllis* Hartmann-Schröder, 1956 ed *Eurysyllis* Ehlers, 1864. Tuttavia non vengono descritte le chete, che hanno una notevole rilevanza per la determinazione a livello specifico di questi organismi.

Nonostante Savigny (1822) ed Audouin & Milne Edwards (1833) abbiano descritto altre specie appartenenti al genere *Syllis*, il primo a prendere in considerazione le chete come carattere diagnostico è Grube (1840). La sua interpretazione di *Syllis monilaris* condurrà successivamente alla divisione del genere *Syllis* in tre-quattro generi, che rimarranno in uso fino alla fine del '900. Secondo Grube (1840) *Syllis monilaris* – che descrive basandosi su esemplari del Golfo di Napoli, che verosimilmente sono altro dalla *Syllis monilaris* descritta da Savigny per il Mar Rosso – è provvista di chete descritte come segue:

“Nelle sete gialle non osservo alcuna articolazione: alcune sembrano aghi robusti, lievemente incurvati, e sporgono appena al di fuori dell'epidermide, mentre altre, ancora più spesse, terminano in due punte uncinata, di cui la superiore, meno incurvata, termina in due dentelli, e non sono dritte, ma sinuose nella parte centrale.”

Appare chiaro come la descrizione di queste chete renda l'interpretazione di Grube (1840), sostanzialmente congruente con *Haplosyllis spongicola* (Grube, 1855), il che non spiega come mai

Grube (1855) abbia sentito la necessità di descrivere la medesima specie con un nome diverso quindici anni dopo. Per quanto Savigny (1822), e successivamente Audouin & Milne Edwards (1833), attribuiscano al genere *Syllis* alcune specie precedentemente descritte – nessuna delle quali è odiernamente posta in questo genere – dopo *Syllis monilaris sensu* Grube, la prima specie descritta in maniera da essere chiaramente riconoscibile è *Syllis vittata*, descritta alla pagina successiva (Grube, 1840).

Successivamente il genere viene smembrato, principalmente per semplificare la sistematica. Langerhans (1879) utilizza il genere *Syllis* per definire soltanto le specie provviste solo di chete semplici, mentre crea *Typosyllis* per definire le specie provviste di chete composte in ogni parapodio; per quanto questa distinzione sia evidentemente artificiosa, questo genere, con *Syllis krohni* Ehlers, 1864 come specie tipo, rimane in uso a lungo. Successivamente Czerniavsky (1881) opera un'ulteriore distinzione, attribuendo le specie con chete composte pseudospinigere al genere *Langerhansia*, da alcuni considerato sinonimo di *Ehlersia* Quatrefages, 1866.

Probabilmente per ovviare all'impossibilità di identificare la specie tipo del genere *Syllis*, Licher (1999) trasferisce tutte le specie al genere *Typosyllis*, di cui invece la specie tipo è ben caratterizzata. Il genere *Langerhansia* rappresenta secondo Licher (1999) un gruppo monofiletico, che tuttavia viene considerato parte di *Typosyllis*, che altrimenti risulterebbe parafiletico. Questa situazione viene mantenuta anche attualmente, pur rigettando la proposta di Licher (1999) di utilizzare *Typosyllis*, e mantenendo in uso *Syllis*. Aguado et al. (2012), in uno studio filogenetico condotto su numerose specie appartenenti alla famiglia con dati molecolari e morfologici, rilevano come il genere *Syllis* sia in realtà non parafiletico, ma polifiletico, in quanto le specie del genere *Syllis* risultano mescolate con specie dei generi *Opisthosyllis* Langerhans, 1879 e *Megasyllis* San Martín et al., 2008 (polifiletici) e con i gruppi monofiletici corrispondenti ai generi *Haplosyllis* Langerhans, 1879, *Paraopisthosyllis* Hartmann-Schröder, 1991 e *Branchiosyllis* Ehlers, 1887. Mentre, pur ignorando che cosa sia la specie tipo del genere, al tempo della revisione di Licher (1999) la situazione risultava piuttosto stabile, e l'unico dubbio era relativo all'opportunità di usare *Typosyllis* in luogo di *Syllis*, con questo lavoro di maggior respiro la sistematica del genere *Syllis* si complica, e risulta effettivamente più pressante decidere se sia opportuno usare *Syllis* e per quale sottogruppo. Sicuramente è disponibile il genere *Typosyllis*, che può essere attribuito ad un grande clade che comprende tutte le *Megasyllis*, le *Opisthosyllis* e le *Paraopisthosyllis*, insieme ad un gran numero di classiche *Syllis* e *Typosyllis*, tra cui *Typosyllis krohni* (specie tipo). Un secondo clade, che comprende tutte le *Syllis* con chete pseudo-spinigere ma non solo, risulta *sister* di un clade che comprende i due sottocladi corrispondenti ai generi *Haplosyllis* e *Branchiosyllis*. Per questo gruppo potrebbe essere impiegato il genere *Langerhansia*. Infine, un terzo clade, *sister* del clade che

comprende *Langerhansia*, *Haplosyllis* e *Branchiosyllis*, comprende *Syllis gracilis* e le specie simili, e risulta piuttosto ben caratterizzato (Fig. 10). Tuttavia non sembra sia disponibile un nome utilizzabile per questo gruppo, a meno di non stabilizzare a quest'uopo l'uso di *Syllis*, il che necessiterebbe una richiesta alla Commissione Internazionale della Nomenclatura Zoologica (ICZN: <http://iczn.org/content/guidelines-case-preparation>). Questi tre cladi corrispondono sostanzialmente ai tre gruppi individuati da Licher (1999) nella sua revisione del genere *Typosyllis*: il primo corrisponde al gruppo di *Syllis prolifera*, il secondo al gruppo di *Syllis rosea*, il terzo al gruppo di *Syllis armillaris*.

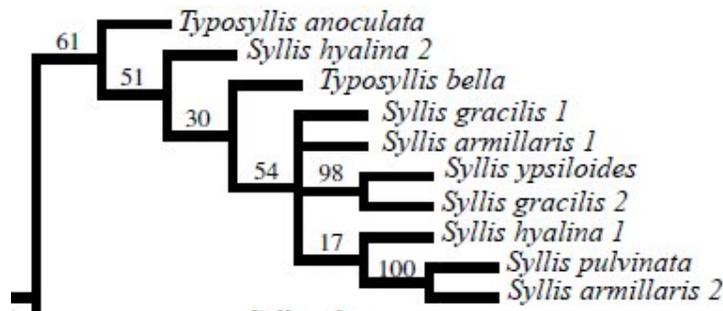


Figura 10: Il gruppo di *Syllis armillaris* (comprendente *S. gracilis*) come emerge dalla filogenesi di Aguado et al. (2012)

Il gruppo di *Syllis armillaris* comprende numerose specie decisamente simili tra di loro, tanto che talora la distinzione su base morfologica risulta piuttosto difficile e poco sicura. In realtà Aguado et al. (2012) mettono in evidenza come, delle 7 specie attribuite nello studio filogenetico al gruppo, 3, ossia *S. armillaris*, *S. hyalina* e *S. gracilis*, si rivelino essere in realtà gruppi di specie, in nessun caso direttamente imparentate, ma piuttosto convergenti per i caratteri morfologici considerati. Questo mette in evidenza come alcuni caratteri tradizionalmente considerati informativi nei confronti della filogenesi, quali la struttura delle chete e la forma delle acicule (San Martín & Aguado, 2005), siano stati probabilmente sopravvalutati. In particolare, la caratteristica tipica di *Syllis gracilis*, rappresentata dalle chete a Y, sembra essersi evoluta più volte nell'ambito del clade, che mostra una certa tendenza a presentare questo tipo di struttura. Esse si riscontrano nelle *Syllis gracilis* atlantiche, nelle *Syllis gracilis* del Pacifico, non imparentate con quelle atlantiche, ma piuttosto con *S. ypsiloides*, sempre dell'Oceano Pacifico e provvista di tali chete. Le chete a Y non si riscontrano in nessuna delle due forme, non imparentate, di *S. armillaris*, ma si riscontrano in una specie molto simile a *S. armillaris*, *S. mayeri* (Musco & Giangrande, 2005b – non inclusa nella filogenesi), probabilmente corrispondente agli individui anomali citati da Ben-Eliahu (1977).

L'eccessiva importanza assegnata in passato a questo carattere ha condotto a definire sinonimi di *Syllis gracilis* numerosi taxa (Fauvel, 1914; 1923) che probabilmente andrebbero rivisti. Alla specie del Pacifico, distinta anche a livello morfologico, possono essere riferiti i nomi *Syllis vancaurica*

Grube, 1868, *Syllis longissima* Gravier, 1900 e *Syllis palifica* Ehlers, 1901. Per quanto riguarda le forme mediterranee, che sembrano comunque essere distinte a livello di specie (Maltagliati et al., 2000), potrebbero essere disponibili numerosi nomi di Czerniavsky (1881) (*Syllis navicellidens*, *S. nigrovittata* e *S. quadridentata*) e *Syllis mixtosetosa* Bobretzky, 1870, tutti riferiti a forme del Mar Nero, verosimilmente legate alle popolazioni di acqua salmastra. Tuttavia le caratteristiche morfologiche su cui sono istituite queste specie non risultano distintive, basandosi sostanzialmente su differenze nella colorazione in vivo, che a sua volta può essere fortemente alterata dalla dieta. Per quanto riguarda le specie appartenenti al *complex* atlanto-mediterraneo di *Syllis gracilis* (che in questo studio sembrano essere almeno tre), non risultano morfologicamente distinguibili (vedi cap. 4.2), ed in ogni caso non possono essere messe in relazione con alcuno dei nomi scientifici ottocenteschi.

5 Conclusioni

Secondo il presente studio, tra gli individui campionati come *Syllis gracilis* si individuano tre aplogruppi relativamente distanti, corrispondenti probabilmente a tre specie biologiche riproduttivamente isolate. Lo studio ha portato ad identificare altresì un'altra entità provvista di chete a Y, morfologicamente simile a *S. gracilis*, ma geneticamente più vicina a *Syllis armillaris*, che può essere tentativamente accostata a *Syllis mayeri*, specie di recente istituzione (Musco & Giangrande, 2005b). Le tre supposte specie criptiche non sembrano essere differenziate a livello di habitat di elezione o distribuzione geografica. L'aplogruppo più rappresentato e a più ampia distribuzione comprende tutti gli esemplari di ambiente salmastro, ma anche buona parte degli organismi di ambiente strettamente marino; gli altri due aplogruppi, che si ipotizzano derivati da questo in epoca più o meno remota, sono invece strettamente marini. L'ipotesi di Maltagliati et al. (2000) che vi siano linee filetiche strettamente marine e salmastre risulta quindi rigettata, ma è possibile individuare una linea filetica eurialina (corrispondente all'HG1) e due linee filetiche stenoaline (HG2 e HG3). Il numero delle linee filetiche individuate risulta in accordo con i risultati di Maltagliati et al. (2000). È opportuno sottolineare, tuttavia, che l'esistenza di una linea di ambiente salmastro identificata attraverso marcatori alloenzimatici potrebbe non corrispondere ad un'effettiva differenziazione genetica, ma essere mediato da fenomeni di altro tipo. Due ipotesi non mutuamente esclusive sono la possibilità che *Syllis gracilis* eurialine esprimano differenti isoforme enzimatiche in ambiente salmastro, e la possibilità che a livello di alcuni degli enzimi considerati si abbia una forte convergenza evolutiva.

Le tre specie criptiche individuate dal presente studio risultano indistinguibili a livello morfologico, perlomeno per quanto riguarda i parametri considerati. Si osserva, invece, sia considerando l'insieme dei caratteri, sia per i caratteri singoli, un marcato differenziamento morfologico tra popolazioni, in alcuni casi anche a prescindere dal genotipo: la popolazione di Palmaria risulta decisamente omogenea a livello morfologico, nonostante sia composta da esemplari riconducibili sia all'HG1, sia all'HG2. Per quanto riguarda i caratteri considerati nell'analisi morfologica, la lunghezza di faringe e proventricolo e il rapporto fra le due lunghezze risultano fortemente caratterizzati a livello delle popolazioni, ma non sembrano dare alcuna informazione relativa all'affinità tra popolazioni differenti. Il chetigero di inizio delle chete a Y risulta fortemente caratterizzante per quanto riguarda alcune popolazioni, mentre per altre risulta un carattere piuttosto omogeneo. Infine, per quanto riguarda la lunghezza in numero di articoli dei cirri dorsali, è possibile identificare con una certa precisione due morfotipi, uno a cirri corti, formati da 7-8 articoli, ed uno a cirri lunghi, formati da 10-11 articoli. Questi morfotipi non corrispondono a cluster genici, e per quanto ambedue le popolazioni di ambiente salmastro considerate nell'analisi

ricadano nel morfotipo a cirri lunghi, in tale ambiente sono anche stati individuati esemplari a cirri corti. Non è quindi chiaro quale sia il fenomeno che determina l'uno o l'altro fenotipo.

Mentre parte delle domande aperte dallo studio di Maltagliati et al. (2000) hanno trovato una risposta, almeno parziale, attraverso questo studio, gran parte delle problematiche relative alla storia evolutiva di *Syllis gracilis* nel Mar Mediterraneo presentano ancora ampie possibilità di indagine. Un'inferenza più solida sulla distribuzione e sull'origine degli aplogruppi individuati può provenire dalla genotipizzazione della restante parte del campione raccolto nel corso dello studio e da un ulteriore ampliamento dell'area di studio. Un'eventuale prosecuzione del progetto (Fig. 11) potrebbe prevedere l'introduzione di una popolazione marina ed una salmastra dalle seguenti aree: Sardegna orientale, Golfo di Napoli, Sicilia orientale, Golfo di Taranto e Gargano; in aggiunta potrebbe essere utile l'analisi di una popolazione marina dalla Sicilia settentrionale. Particolarmente importante risulterebbe ottenere esemplari marini dal Golfo di Napoli, che risulta *locus typicus* per la specie (Grube, 1840).

L'effettiva impossibilità di distinguere le tre specie criptiche individuate attraverso l'analisi morfologica può essere ulteriormente approfondita, considerando caratteri che possono essere riscontrati soltanto attraverso un'analisi in vivo dell'organismo, quale il colore, che sembra possa essere fortemente informativo per quanto riguarda specie criptiche di policheti (Nygren & Pleijel, 2011). Una tecnica recente, ma che promette interessanti sviluppi, consiste nell'analisi oggettiva di colore e pattern cromatici attraverso fotografie digitali scattate in condizioni standardizzate; inizialmente sviluppata in ambito ornitologico, con minime modifiche sembra poter essere fruttuosamente applicata anche ad altri *taxa* (McKay, 2013).

Un ulteriore campo di ricerca è relativo ai meccanismi fisiologici e biochimici che permettono a *Syllis gracilis* la vita in ambiente salmastro. Una volta individuata una linea filetica eurialina e due apparentemente stenoaline può essere interessante stabilire esemplari appartenenti a diverse popolazioni e diversi aplogruppi e valutarne la tolleranza a differenti gradi di salinità, in modo da capire se vi siano differenze nell'adattabilità ad ambienti di transizione ed eventualmente da quali processi sia mediato l'adattamento.

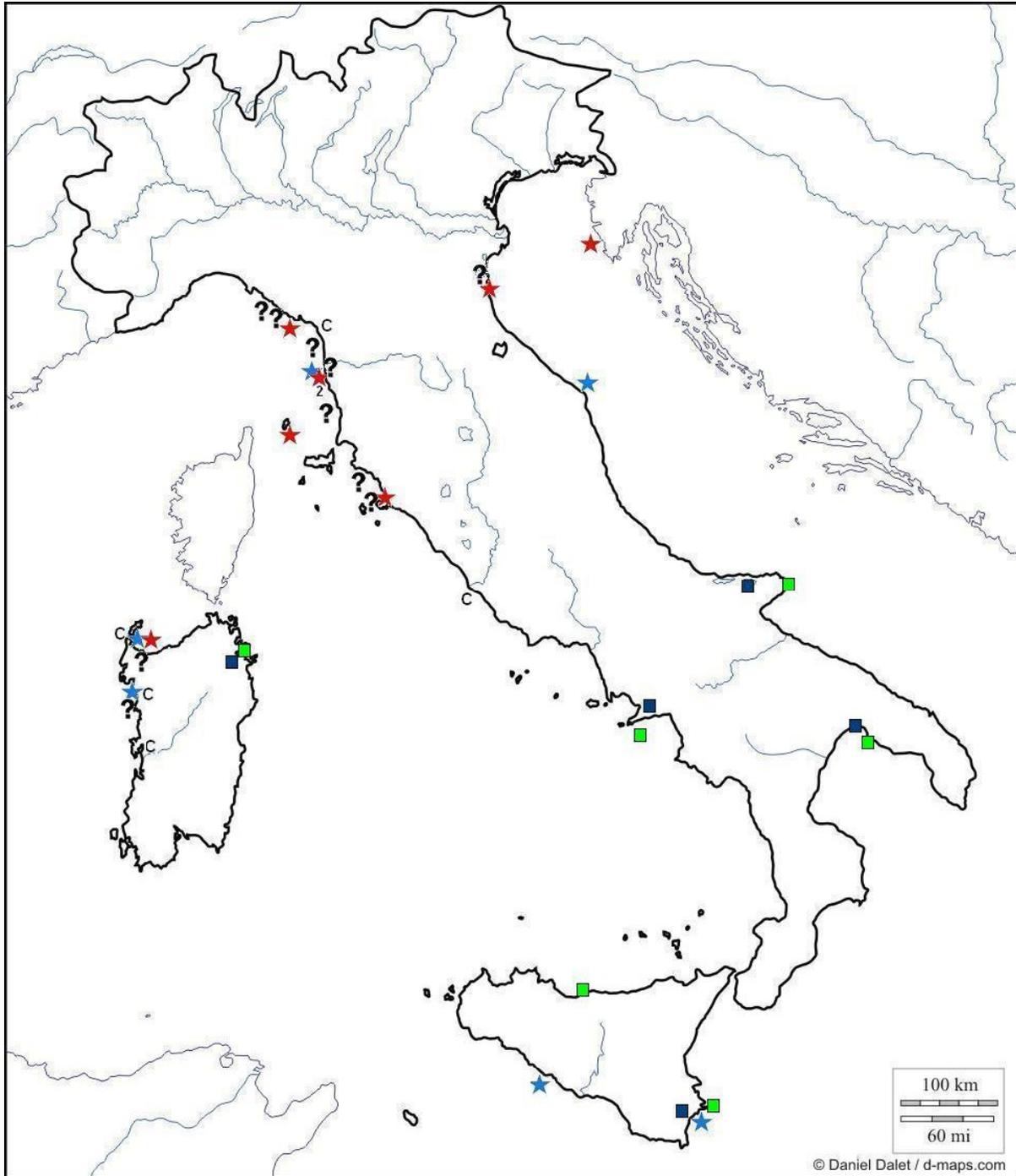


Figura 11: Ipotesi di ampliamento del presente studio attraverso un campionamento più esteso che permetta di coprire tutti i mari italiani; ai siti considerati in Fig. 3 sono stati aggiunti punti corrispondenti ad aree da cui sarebbe opportuno avere un campione rappresentativo di questa specie, da ambiente marino (quadrato verde) o salmastro (quadrato blu). La posizione dei quadratini è puramente indicativa. Per i restanti simboli, vedi Fig. 3.

6 Bibliografia

- Abbiati M., Bianchi C.N. & Castelli A., 1987: Polychaete Vertical Zonation along a Littoral Cliff in the Western Mediterranean. *Marine Ecology*, 8: 33-48.
- Abbiati M., Bianchi C.N., Castelli A., Giangrande A. & Lardicci C., 1991: Distribution of Polychaetes on Hard Substrates of the Midlittoral-Infralittoral Transition Zone, Western Mediterranean. *Ophelia*, Suppl. 5: 421-432.
- Aguado M.T., San Martín G. & Siddall M.E., 2012: Systematics and evolution of syllids (Annelida: Syllidae). *Cladistics* 28: 234-250.
- Al-Farraj S., El-Gendy A., Al Kahtani S. & El-Hedeny M., 2012: The Impact of Sewage Pollution on Polychaetes of Al Khumrah, South of Jeddah, Saudi Arabia. *Research Journal of Environmental Sciences*, 6: 77-87.
- Audouin J.V. & Milne Edwards H., 1833: Classification des Annélides et description de celles qui habitent les côtes de la France. *Annales des sciences naturelles, Paris, sér. 1*, 29: 388-412.
- Avice J.C., 2000: Phylogeography: The History and Formation of Species. *Harvard University Press*: 447 pp.
- Bandelt H.-J., Forster P. & Röhl A., 1999: Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Barroso R., Klautau M., Solé-Cava A.M. & Paiva P.C., 2010: *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae), the “cosmopolitan” fireworm, consists of at least three cryptic species. *Marine Biology*, 157: 69-80.
- Bedini R., Canali M.G. & Cappagli M., 2003: Analysis of Macrobenthic Community Structure in Relation To Different Environmental Conditions In Three Harbours In The North Tyrrhenian Sea (Italy). Preliminary Study. *Mediterranean Marine Science*, 4: 83-97.
- Ben-Eliahu M.N., 1977: Polychaete cryptofauna from rims of similar intertidal vermetid reefs on the Mediterranean coast of Israel and in the Gulf of Elat: Syllinae and Eusyllinae (Polychaeta Errantia: Syllidae). *Israel Journal of Zoology*, 26: 1-58.
- Blackith R.E. & Reyment R.A., 1971: Multivariate Morphometrics. *Academic Press*, 412 pp.
- Britton-Davidian J. & Amoureux L., 1982: Biochemical systematics of two sibling species of polychaete annelids: *Ophelia bicornis* and *O. radiata*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 10: 351-354.
- Cacabelos E., Moreira J. & Troncoso J.S., 2010: Distribution and Ecological Analysis of the Syllidae (Annelida, Polychaeta) from the Ensenada de San Simón (Galicia, NW Spain). *Thalassas*, 26: 93-102.

- Cadman P.S. & Nelson-Smith A., 1990: Genetic evidence for two species of lugworm (*Arenicola*) in South Wales. *Marine Ecology Progress Series*, 64: 107-112.
- Capa M., San Martín G. & López E., 2001: Syllinae (Syllidae: Polychaeta) del Parque Nacional de Coiba, Panamá. *Revista de Biología Tropical*, 49: 103-115.
- Casellato S. & Stefanon A., 2008: Coralligenous habitat in the northern Adriatic Sea: an overview. *Marine Ecology*, 29: 321-341.
- Clark P.U, Dyke A.S., Shakun J.D., Carlson A.E., Clark J., Wohlfarth B., Mitrovica J.X., Hostetler S.W. & McCabe A.M., 2009: The last Glacial Maximum. *Science*, 324: 720-724.
- Clarke K.R., 1993: Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18: 117-143.
- Clarke K.R. & Warwick R.M., 2001: Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd. edition. *PRIMER-E, Plymouth*.
- Cognetti G., 1982: Adaptive strategy of brackish water fauna in pure and polluted waters. *Marine Pollution Bulletin*, 13: 247-250.
- 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.
- Cognetti G., Sarà M. & Magazzù G., 2008: Biologia Marina. *Edagricole*.
- Cole V.J. & Chapman M.G., 2007: Patterns of distribution of annelids: taxonomic and spatial inconsistencies between two biogeographic provinces and across multiple spatial scales. *Marine Ecology Progress Series*, 346: 235-241.
- Cosentino A., 2011: Microhabitat selection in a local syllid assemblage with the first record of *Syllis hyllebergi* (Syllinae) in the central Mediterranean. *Italian Journal of Zoology*, 78 – suppl. 1: 267-279.
- Cossu P., Maltagliati F., Lai T., Casu M., Curini-Galletti M. & Castelli A., 2012: Genetic structure of *Hediste diversicolor* (Polychaeta, Nereididae) from the northwestern Mediterranean as revealed by DNA inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Marine Ecology Progress Series*, 452: 171-178.
- Couceiro L., López L., Sotka E.E., Ruiz J.M. & Barreiro R., 2011: Molecular data delineate cryptic *Nassarius* species and characterize spatial genetic structure of *N. nitidus*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 92: 1175-1182
- Cracraft J., 1989: Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. in Speciation and its consequences (D. Otte and J. Endler, eds.). *Sinauer Assoc., Sunderland, Ma*: 28-59.

- Czerniavsky V., 1881: Material ad zoographiam Ponticam comparatam. Fasc. III Vermes. *Bulletin de la Société Impériale des naturalistes de Moscou*, 56: 211-363.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. & Posada D., 2012: jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- Day J.H., 1967: Polychaeta of Southern Africa. Part 1. Errantia. *British Museum (Natural History), London*. 458 & xxix pp.
- Dekhtyar A., 2009: Distance/Similarity Measures. *CSC 466: Knowledge Discovery from Data*. 5 pp.
- Dobzhansky T., 1972: Species of *Drosophila*. *Science*, 177: 664-669.
- Ehlers E., 1901: Die Polychaeten des magellanischen und chilenischen Strandes. Ein faunistischer Versuch. *Festschrift. zur Feier. des Hundertfuenfzigjaehrigen Bestehens. des Koeniglichen Gesellschaft der Wissenschaften. zu Goettingen. Math.-Phy. Abhandlungen 1901: 1-232*.
- Elías R., Rivero M.S., Palacios J.R. & Vallarino E.A., 2006: Sewage-induced disturbs on polychaetes inhabiting intertidal mussel beds of *Brachidontes rodriguezii* off Mar del Plata (SW Atlantic, Argentina). *Scientia Marina*, 70: 187-196.
- Fauchald K., 1977: Polychaetes from Intertidal Areas in Panama, with a Review of Previous Shallow-Water Records. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 221: 81 pp.
- Fauchald K., Granados-Barba A. & Solís-Weiss V., 2009: Polychaeta (Annelida) of the Gulf of Mexico, Pp. 751–788 in *Felder, D.L. and D.K. Camp (eds.), Gulf of Mexico—Origins, Waters, and Biota. Biodiversity. Texas A&M Press, College Station, Texas*.
- Faulwetter S., Chatzigeorgiou G., Galil B.S., Nicolaidou A. & Arvanitidis C., 2011: *Sphaerosyllis levantina* sp. n. (Annelida) from the eastern Mediterranean, with notes on character variation in *Sphaerosyllis hystrix* Claparède, 1863. *Zookeys*, 2011: 327-345.
- Fauvel P., 1914. Annélides polychètes non-pélagiques provenant des campagnes de l'Hirondelle et de la Princesse-Alice (1885-1910). *Résultats des campagnes scientifiques accomplis par le Prince Albert I*, 46: 1-432
- Fauvel P., 1923: Polychètes errantes. *Faune de France 5: 1-488. Librairie de la Faculte des Sciences. Paris*.
- Glasby C.J., Wei N.-W.V. & Gibb K.S., 2013: Cryptic species of Nereididae (Annelida: Polychaeta) on Australian coral reefs. *Invertebrate Systematics*, 27: 245-264.
- Grassle J. & Grassle J.F., 1976: Sibling species in the marine pollution indicator *Capitella* (polychaeta). *Science*, 7: 567-569.
- Gravier C., 1900: Contribution à l'étude des Annélides Polychètes de la Mer Rouge. Première partie. *Nouvelles Archives du Museum d'Histoire Naturelle Paris, Ser. 4, 2(2): 137-282*.

- Grube A.E., 1840: Actinien, Echinodermen und Würmer des Adriatischen- und Mittelmeers, nach eigenen Sammlungen beschrieben. 1-92. *J.H. Bon. Königsberg.*
- Grube A.E., 1855: Beschreibungen neuer oder wenig bekannter Anneliden. *Archiv für Naturgeschichte, Berlin, 21(1): 81-136, pls 3-5.*
- Grube, A.E. 1868. Reise der Oesterreichischen Fregatte Novara um die Erde in den Jahren 1857, 1858 and 1859. *Novara-Expedition, 2: 1-48.*
- Guindon S. & Gascuel O., 2003: A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology 52: 696-704.*
- Hall T.A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.*
- Hansson H.G. (Comp.), 1987: NEAT (North East Atlantic Taxa): South Scandinavian marine Annelida Check-List. *Internet pdf Ed., Aug. 1998. [http://www.tmbi.g]*
- Hartman O., 1964. Polychaeta Errantia of Antarctica. *Antarctic Research Series, 3: 131 pp.*
- Hernández-Alcantara P., Frontana-Urbe S.C. & Solís-Weiss V., 2003: Commented Checklist of the Polychaetes (Annelida: Polychaeta) from Areas Adjacent to Island of the Mexican Pacific and Gulf of California. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences, 102: 1-16.*
- Hoeh W.R., Blakley K.H. & Brown W.M., 1991: Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science, 251: 1488-1490.*
- Hutchings P. A. & Murray A., 1984: Taxonomy of polychaetes from the Hawkesbury River and the southern estuaries of New South Wales, Australia. *Records of the Australian Museum, Supplement 3: 1-118.*
- Iannotta M.A., Toscano F. & Patti F.P., 2009: *Nassarius corniculus* (Olivi, 1792) (Caenogastropoda: Nassariidae): a model of environmental complexity of Italian brackish and marine habitats. *Marine Ecology 30: 106-115.*
- Imajima M., 2003: Polychaetous Annelids from Sagami Bay and Sagami Sea collected by the Emperor Showa of Japan and deposited at the Showa Memorial Institute, National Science Museum, Tokyo (II), Orders included within the Phyllodocida, Amphinomida, Spintherida and Enicida. *National Science Museum Monographs, 23: 1-221.*
- Kruse I., Reusch T.B.H. & Schneider M.V., 2003: Sibling species or poecilogony in the polychaete *Scoloplos armiger*? *Marine Biology, 142: 937-947.*
- Lamarck J. B. de, 1818: Histoire naturelle des Animaux sans Vertèbres, présentant les caractères généraux et particuliers de ces animaux, leur distribution, leurs classes, leurs familles, leurs genres, et la citation des principales espèces qui s'y rapportent; précédés d'une Introduction offrant la détermination des caractères essentiels de l'Animal, sa distinction du végétal et

- des autres corps naturels, enfin, l'Exposition des Principes fondamentaux de la Zoologie. Paris, Deterville, 612 pp.
- Langerhans P., 1879: Die Wurmfauna von Madeira. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 32(4): 513-592.
- Lattig P., San Martín G. & Martín D., 2007: Taxonomic and morphometric analyses of the *Haplosyllis spongicola* complex (Polychaeta: Syllidae: Syllinae) from Spanish seas, with re-description of the type species and descriptions of two new species. *Scientia Marina*, 71: 551-570.
- Licher F., 1999: Revision der Gattung *Typosyllis* Langerhans, 1879 (Polychaeta: Syllidae). Morphologie, Taxonomie und Phylogenie. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft* 551:1-336.
- Liñero-Arana I. & Díaz Díaz O., 2011: Syllidae (Annelida, Polychaeta) from the Caribbean coast of Venezuela. *Zookeys* 2011: 1-28.
- 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. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 81: 411-414.
- Maltagliati F., Casu M. & Castelli A., 2004: Morphological and genetic evidence supports the existence of two species in the genus *Ophelia* (Annelida, Polychaeta) from the Western Mediterranean. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83: 101-113.
- Maltagliati F., Casu M., Lai T., Iraci Sareri D., Casu D., Curini-Galletti M., Cantone G. & Castelli A., 2005: Taxonomic distinction of *Ophelia barquii* and *O. bicornis* (Annelida, Polychaeta) in the Mediterranean as revealed by ISSR markers and the number of nephridiopores. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85: 835-841.
- Maltagliati F., Peru A.P., Casu M., Rossi F., Lardicci C., Curini-Galletti M. & Castelli A., 2000: Is *Syllis gracilis* (Polychaeta: Syllidae) a species complex? An allozyme perspective. *Marine Biology*, 136: 871-897.
- Manchenko G.P. & Radashevsky V.I., 1993: Genetic differences between two sibling species of the *Polydora ciliata* complex (Polychaeta: Spionidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 21: 543-548.
- Manchenko G.P. & Radashevsky V.I., 1994: Genetic differences between two allopatric sibling species of the genus *Polydora* (Polychaeta: Spionidae) from the West Pacific. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22: 767-773.

- Manchenko G.P. & Radashevsky V.I., 1998: Genetic evidence for two sibling species within *Polydora* cf. *ciliata* (Polychaeta: Spionidae) from the Sea of Japan. *Marine Biology*, 131: 489-495.
- Manchenko G.P. & Radashevsky V.I., 2002: Genetic differences between two sibling sympatric *Dipolydora* species (Polychaeta: Spionidae) from the Sea of Japan, and a new species description. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 82: 193-199.
- Martin D., Britayev T.A., San Martín G. & Gil J., 2003: Inter-population variability and character description in the sponge-associated *Haplosyllis spongicola* complex (Polycheta: Syllidae). *Hydrobiologia*, 496: 145-162.
- Maselli V., 2011: The stratigraphic Record of the Quaternary Sea Level Fluctuations and the Impact of the Post-Glacial Sea Level Rise (Termination I) in the Adriatic Basin (Mediterranean Sea). *Tesi di Dottorato, Università di Bologna*.
- Mayr E., 1942: Systematics and the origin of species. *Columbia Univ. Press*.
- McKay B.D., 2013: The use of digital photography in sistematics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 110: 1-13.
- Meyer A., Bleidorn C., Rouse G.W. & Hausen H., 2008: Morphological and molecular data suggest a cosmopolitan distribution of the polychaete *Proscoloplos cygnochaetus* Day, 1954 (Annelida, Orbiniidae). *Marine Biology*, 153: 879-889.
- Muller Y., 2004: Faune et flore du littoral du Nord, du Pas-de-Calais et de la Belgique: inventaire. *Commission Régionale de Biologie Région Nord Pas-de-Calais: France*. 307 pp.
- Musco L. & Giangrande A., 2005a: Mediterranean Syllidae (Annelida: Polychaeta) revisited: biogeography, diversity and species fidelity to environmental features. *Marine Ecology Progress Series*, 304: 143-153.
- Musco L. & Giangrande A., 2005b: A new sponge-associated species, *Syllis mayeri* n.sp. (Polychaeta: Syllidae), with a discussion on the status of *Syllis armillaris*. *Scientia Marina* 69: 467-474.
- Nonnis Marzano C., Baldaconi R., Fianchini A., Gravina F. & Corriero G., 2007: Settlement seasonality and temporal changes in hard substrate macrozoobenthic communities of Lesina Lagoon (Apulia, Southern Adriatic Sea). *Chemistry and Ecology*, 23: 479-491.
- Nygren A., Eklöf J. & Pleijel F., 2009: Arctic-boreal sibling species of *Paranaitis* (Polychaeta, Phyllodocidae). *Marine Biological Research*, 5: 315-327.
- Nygren A. & Pleijel F., 2011: From one to ten in a single stroke – resolving the European *Eumida sanguinea* (Phyllodocidae, Annelida) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58: 132-141.

- Röhner M., Bastrop R. & Jürss K., 1996: Genetic differences between two allopatric populations (or sibling species) of the polychaete genus *Marenzelleria* in Europe. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 114: 185-192.
- 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.
- Ronquist F., Huelsenbeck J. & Teslenko M., 2011: Draft MrBayes version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries. *Online publ.*
- Şahin G.K. & Çinar M.E., 2012: A check-list of polychaete species (Annelida: Polychaeta) from the Black Sea. *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, 18: 10-48.
- San Martín G., 2003: Annelida, Polychaeta II: Syllidae. In: Ramos MA et al. (eds) Fauna Iberica, Vol 21 Museo Nacional de Ciencias Naturales. *CSIC, Madrid: 1-554.*
- San Martín G. & Aguado M.T., 2012: Contribution of Scanning Electron Microscope to the Study of Morphology, Biology, Reproduction, and Phylogeny of the Family Syllidae (Polychaeta). *in Kazmiruk V. (ed.): Scanning Electron Microscope, InTech: 129-146.*
- Sanna D., Dedola G.L., Lai T., Curini-Galletti M. & Casu M., 2011: PCR-RFLP: A practical method for the identification of specimens of *Patella ulyssiponensis s.l.* (Gastropoda: Patellidae). *Italian Journal of Zoology*, 79: 50-59.
- Sato M. & Masuda Y., 1997: Genetic differentiation in two sibling species of the brackish-water polychaete *Hediste japonica* complex (Nereididae). *Marine Biology*, 130: 163-170.
- Savigny J.C., 1822. Système des annelides, principalement de celles des côtes de l'Égypte et de la Syrie, offrant les caractères tant distinctifs que naturels des Ordres, Familles et Genres, avec la Description des Espèces. *Description.de l'Égypte. Histoire Naturelle, Paris 1(3): 1-128.*
- Schmidt H. & Westheide W., 2000: Are the meiofaunal polychaetes *Hesionides arenaria* and *Stygocapitella subterranea* true cosmopolitan species? – results of RAPD-PCR investigations. *Zoologica Scripta*, 29: 17-27.
- Schwartz M. & Vissing J., 2002: Brief Report: Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *The New England Journal of Medicine*, 347: 576-580.
- Scotland R.W., Olmstead R.G. & Bennett J.R., 2003: Phylogeny Reconstruction: The Role of Morphology. *Systematic Biology*, 52: 539-549.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. & Flook P.K., 1994: Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.

- Sonneborn T.M., 1939: *Paramecium Aurelia*: Mating Types and Groups; Lethal Interactions; Determination and Inheritance. *The American Naturalist* 73: 390-413.
- Soosten C.v, Schmidt H. & Westheide W., 1998: Genetic variability and relationships among geographically widely separated populations of *Petitia amphophthalma* (Polychaeta: Syllidae). Results from RAPD-PCR investigations. *Marine Biology*, 131: 659-669.
- Stewart P.L., Pocklington P. & Cunjak R.A., 1985: Distribution, Abundance and Diversity of Benthic Macroinvertebrates on the Canadian Continental Shelf and Slope of Southern Davis Strait and Ungava Bay. *Arctic*, 38: 281-291.
- Steyskal G.C., 1972: The Meaning of the Term “Sibling Species”. *Systematic Zoology*, 21: 446.
- Tan L.T. & Chou L.M., 1993: Checklist of Polychaete Species from Singapore Waters (Annelida). *Raffles Bulletin of Zoology*, 41: 279-295.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J., 1994: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Trabelsi M., Faure E., Quignard J.-P., Boussaïd M., Focant B. & Mâamouri F., 2002a: *Atherina punctata* and *Atherina lagunae* (Pisces, Atherinidae), new species found in the Mediterranean sea. 1. Biometric investigations of three Atherinid species. *Comptes Rendues Biologie*, 325: 967-975.
- Trabelsi M., Gilles A., Fleury C., Mâamouri F., Quignard J.-P. & Faure E., 2002b: *Atherina punctata* and *Atherina lagunae* (Pisces, Atherinidae), new species found in the Mediterranean sea. 2. Molecular investigations of three Atherinid species. *Comptes Rendues Biologie*, 325: 1119-1128.
- 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.
- Voultsiadou-Koukoura H.E., Koukoura A. & Eleftheriou A., 1987: Macrofauna Associated with the Sponge *Verongia aerophoba* in the North Aegean Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 24: 265-278.
- Wenner E.L., Hinde P., Knott D.M. & Van Dolah R.F., 1984: A Temporal and Spatial Study of Invertebrate Communities Associated With Hard-Bottom Habitats in the South Atlantic Bight. *NOAA Technical Report NMFS 18*.
- Whitman D.W. & Agrawal A.A., 2009: What Is Phenotypic Plasticity and Why Is It Important? in *Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences* (Eds. D.W. Whitman, T.N. Ananthakrishnan), *Science Publishers: 1-63*.

Wiens J.J., 2004: The Role of Morphological Data in Phylogeny Reconstruction. *Systematic Biology*, 53: 653-661.

7 Appendice

Dati morfologici relativi agli esemplari di *Syllis gracilis* considerati nell'analisi. Gli esemplari in rosso sono stati anche genotipizzati ed inclusi nell'analisi genetica. I codici delle popolazioni corrispondono a Tab.2, fatta eccezione per FIV, che indica gli esemplari fissati su vetrino provenienti da Fiumicino, inclusi nell'analisi morfologica, e ORA, che indica gli esemplari di Orbetello caratterizzati morfologicamente ma non considerati per la genotipizzazione.

Esemplare	Faringe (cg.)	Proventricolo (cg.)	N. Art. Cirro 10	N. Art. Cirro 20	Inizio chete a Y (cg.)	Rapporto F/P	Rapporto 10/20
PAL01	9	6	9	-	16	1,50	
PAL02	7	5	9	9	15	1,40	1,00
PAL03	7	6	8	-	15	1,17	
PAL-R	-	-	-	-	-		
PAL04	9	7	8	8	18	1,29	1,00
PAL05	5	3	-	6	16	1,67	
PAL06	8	6	8	8	18	1,33	1,00
PAL07	8	6	8	6	17	1,33	1,33
PAL08	5	3	6	6	16	1,67	1,00
PAL09	7	4	6	-	-	1,75	
PAL10	8	6	7	6	-	1,33	1,17
PAL11	8	6	-	8	19	1,33	
PAL12	-	-	-	-	-		
PAL13	7	5	7	7	16	1,40	1,00
PAL14	-	-	-	-	-		
LIV01	5	3	7	9	17	1,67	0,78
BOC01	7	6	10	8	18	1,17	1,25
BOC02	8	6	9	7	19	1,33	1,29
BOC03	8	8	9	8	19	1,00	1,13
BOC04	7	6	9	9	21	1,17	1,00
BOC05	5	5	9	7	NO (accenni)	1,00	1,29
BOC06	11	7	8	7	23	1,57	1,14
BOC07	8	8	9	8	19	1,00	1,13
BOC08	5	4	6	5	17	1,25	1,20
BOC-R	-	-	-	-	-		
BOC09	11	9	9	9	NO (gracilis?)	1,22	1,00
BOC10	-	-	9	8	21		1,13
SSC01	8	7	9	8	17	1,14	1,13
SSC02	8	7	9	7	17	1,14	1,29
SSC03	8	7	10	8	19	1,14	1,25
SSC04	9	7	10	8	17	1,29	1,25
SSC05	9	7	-	-	19	1,29	
SSC06	9	7	9	8	20	1,29	1,13
SSC07	9	8	10	9	17	1,13	1,11
SSC08	9	7	10	8	19	1,29	1,25
SSC09	8	7	8	8	17	1,14	1,00
SSC10	10	7	9	9	18	1,43	1,00
SSC-R	-	-	-	-	-		
SSC11	7	6	6	6	17	1,17	1,00
SSC12	7	6	8	6	18	1,17	1,33
SSC13	7	6	7	7	17	1,17	1,00
SSC14	7	7	7	6	20	1,00	1,17
SSC15	5	5	8	5	18	1,00	1,60
SSC16	6	7	8	6	20	0,86	1,33

SSC17	8	5	8	7	20	1,60	1,14
SSC18	8	7	8	7	22	1,14	1,14
SSC19	-	8	-	-	-		
SSC20	8	8	6	8	21	1,00	0,75
SSC21	8	8	-	6	20	1,00	
SSC22	8	5	9	7	19	1,60	1,29
SSC23	8	7	7	6	21	1,14	1,17
SSC24	11	9	14	13	22	1,22	1,08
SSC25	10	6	8	8	21	1,67	1,00
SSC26	8	9	9	7	18	0,89	1,29
SSC27	11	7	13	8	20	1,57	1,63
SSC28	10	9	9	8	20	1,11	1,13
SSC29	-	-	8	7	20		1,14
SSC30	7	8	-	6	18	0,88	
SSC31	8	8	6	7	21	1,00	0,86
SSC32	8	7	7	6	20	1,14	1,17
SSC33	11	14	13	10	19	0,79	1,30
CAP01	8	5	12	9	20	1,60	1,33
CAP02	8	6	10	8	24	1,33	1,25
CAP03	8	5	10	8	15	1,60	1,25
CAP04	9	7	10	8	20	1,29	1,25
CAP05	-	-	8	6	21		1,33
CAP06	-	-	-	-	-		
CAP07	-	-	10	7	-		1,43
CAP08	7	4	7	7	17	1,75	1,00
CAP-R	-	-	-	-	-		
GIA01	7	4	-	-	24	1,75	
ORB01	10	11	-	-	19	0,91	
ORB02	8	11	-	-	20	0,73	
ORB03	10	11	-	-	23	0,91	
ORB04	12	11	-	-	24	1,09	
ORB05	12	11	-	-	22	1,09	
ORB07	9	9	-	-	24	1,00	
ORB08	11	9	-	-	21	1,22	
ORB09	10	9	-	-	24	1,11	
ORB10	10	11	-	-	23	0,91	
ORB11	6	6	-	-	16	1,00	
ORB12	7	7	-	-	15	1,00	
ORB13	9	8	-	-	18	1,13	
ORB14	9	10	-	-	23	0,90	
ORB15	8	7	-	-	14	1,14	
ORB16	10	7	-	-	19	1,43	
ORB17	10	9	-	-	24	1,11	
ORB18	8	8	-	-	19	1,00	
ORB19	10	7	-	-	20	1,43	
ORB20	12	8	-	-	21	1,50	
ORB21	9	9	-	-	22	1,00	
ORB22	9	9	-	-	22	1,00	
ORB23	12	11	-	-	22	1,09	
ORB24	12	13	-	-	23	0,92	
ORB25	10	11	-	-	22	0,91	
ORB26	10	12	-	-	21	0,83	
ORB27	10	11	-	-	22	0,91	

ORB28	6	10	-	-	16	0,60	
ORB29	9	11	-	-	20	0,82	
ORB30	12	10	-	-	22	1,20	
ORB31	10	13	-	-	21	0,77	
ORB32	11	11	-	-	19	1,00	
ORB33	9	11	-	-	22	0,82	
ORB34	8	11	-	-	20	0,73	
ORB35	10	13	-	-	23	0,77	
ORA01	7	10	14	12	18	0,70	1,17
ORA02	11	12	16	15	23	0,92	1,07
ORA03	10	11	15	12	24	0,91	1,25
ORA04	8	8	12	10	21	1,00	1,20
ORA05	8	10	12	11	22	0,80	1,09
ORA06	10	13	14	12	23	0,77	1,17
ORA07	10	10	14	12	23	1,00	1,17
ORA08	11	10	12	10	24	1,10	1,20
ORA09	10	10	12	10	22	1,00	1,20
ORA10	10	10	13	11	22	1,00	1,18
ORA11	7	7	10	10	17	1,00	1,00
ORA12	10	9	14	10	20	1,11	1,40
ORA13	8	8	13	10	17	1,00	1,30
ORA14	8	8	13	10	20	1,00	1,30
ORA15	11	11	17	15	23	1,00	1,13
ORA16	8	10	9	9	17	0,80	1,00
ORA17	10	10	10	9	21	1,00	1,11
ORA18	8	7	10	8	13	1,14	1,25
ORA19	11	9	12	10	21	1,22	1,20
ORA20	9	8	12	12	20	1,13	1,00
FIV163	12	5	-	-	21	2,40	
FIV164	10	5	-	-	19	2,00	
FIV133	7	3	-	-	14	2,33	
FIV158	6	4	-	-	13	1,50	
FIV156	6	4	-	-	12	1,50	
FIV169	9	4	-	-	18	2,25	
FIV167	8	5	-	-	17	1,60	
FIV85	9	6	-	-	17	1,50	
FIV108	9	4	-	-	21	2,25	
FIV113	8	4	-	-	16	2,00	
FIV166	9	5	-	-	20	1,80	
FIV127	8	4	-	-	16	2,00	
FIV75	6	4	-	-	14	1,50	
FIV11	8	4	-	-	15	2,00	
FIV107	8	6	-	-	18	1,33	
PTO01	9	5	8	8	22	1,80	1,00
PTO02	7	4	7	7	21	1,75	1,00
PTO03	8	5	8	8	20	1,60	1,00
PTO04	8	7	10	10	22	1,14	1,00
PTO05	-	-	8	8	20		1,00
PTO06	10	6	8	8	24	1,67	1,00
PTO07	11	5	10	10	20	2,20	1,00
PTO08	10	7	10	9	24	1,43	1,11
PTO09	8	7	9	9	21	1,14	1,00
PTO10	8	5	14	9	15	1,60	1,56

PTO11	8	5	17	10	23	1,60	1,70
PTO12	-	-	7	6	19		1,17
PTO13	8	5	7	7	21	1,60	1,00
PTO14	6	6	8	6	15	1,00	1,33
PTO15	5	6	8	-	-	0,83	
PTO16	9	7	10	8	23	1,29	1,25
PTO17	8	5	8	7	21	1,60	1,14
PTO18	8	5	10	8	22	1,60	1,25
PTO19	8	4	7	7	17	2,00	1,00
PTO20	-	-	6	6	NO		1,00
STI01	12	10	10	10	20	1,20	1,00
STI02	8	7	8	8	19	1,14	1,00
STI03	10	9	9	9	-	1,11	1,00
STI04	10	7	10	10	18	1,43	1,00
CAL01	4	6	8	7	17	0,67	1,14
EMI01	11	9	11	9	27	1,22	1,22
EMI02	9	8	13	11	27	1,13	1,18
EMI03	11	7	13	10	25	1,57	1,30
EMI04	9	8	11	10	-	1,13	1,10
EMI05	10	-	12	10	23		1,20
EMI06	11	8	11	10	26	1,38	1,10
EMI07	10	8	12	10	26	1,25	1,20
PLE01	10	12	12	9	23	0,83	1,33
ANC01	7	7	8	7	21	1,00	1,14
ANC02	-	-	-	-	-		
PBA01	10	5	16	14	25	2,00	1,14
PBA02	8	6	12	10	18	1,33	1,20
PBA03	8	9	14	10	22	0,89	1,40
PBA04	-	6	12	11	20		1,09
PBA05	-	-	-	-	-		
PBA06	9	5	15	13	24	1,80	1,15
PBA07	6	7	9	9	14	0,86	1,00
PBA08	10	6	12	10	22	1,67	1,20
PBA09	-	-	10	8	14		1,25
PBA10	9	8	12	9	25	1,13	1,33
PBA11	10	9	13	12	24	1,11	1,08
PBA12	10	8	15	12	25	1,25	1,25
PBA13	10	7	13	11	22	1,43	1,18
PBA14	8	6	16	13	24	1,33	1,23
PBA15	10	7	-	9	16	1,43	
PBA16	10	9	15	10	22	1,11	1,50
PBA17	9	7	14	10	24	1,29	1,40
PBA18	8	10	13	12	24	0,80	1,08
PBA19	10	7	14	12	23	1,43	1,17
PBA20	10	6	14	12	21	1,67	1,17
PBA21	10	8	18	11	22	1,25	1,64
PBA22	9	6	-	13	20	1,50	
PBA23	10	7	13	11	22	1,43	1,18
PBA24	10	9	12	12	23	1,11	1,00
PBA25	11	7	12	10	23	1,57	1,20
PBA26	8	8	12	10	21	1,00	1,20
PBA27	9	9	17	14	24	1,00	1,21
PBA28	10	7	13	9	23	1,43	1,44

PBA29	9	9	13	11	23	1,00	1,18
PBA30	7	7	14	11	24	1,00	1,27
PBA31	10	7	13	13	24	1,43	1,00
PBA32	8	6	14	11	22	1,33	1,27
PBA33	9	7	12	11	18	1,29	1,09
PBA34	9	6	14	12	24	1,50	1,17
PBA35	8	6	14	11	21	1,33	1,27
ROV01	10	6	-	-	20	1,67	
ROV02	6	4	-	-	14	1,50	
ROV03	10	4	-	-	17	2,50	
ROV04	10	5	-	-	19	2,00	
ROV05	12	6	-	-	18	2,00	
ROV06	12	5	-	-	22	2,40	
ROV07	10	5	-	-	17	2,00	
ROV08	12	5	-	-	22	2,40	
ROV09	9	5	-	-	17	1,80	
ROV10	10	5	-	-	17	2,00	
ROV11	11	4	-	-	18	2,75	
ROV12	10	5	-	-	18	2,00	
ROV13	10	5	-	-	19	2,00	
ROV14	12	5	-	-	18	2,40	
ROV15	9	4	-	-	18	2,25	
ROV16	10	4	-	-	16	2,50	
ROV17	12	5	-	-	21	2,40	
ROV18	12	7	-	-	20	1,71	
ROV19	10	6	-	-	16	1,67	
ROV20	9	5	-	-	16	1,80	
ROV21	10	4	-	-	19	2,50	
ROV22	9	5	-	-	18	1,80	
ROV23	12	5	-	-	20	2,40	
ROV24	10	4	-	-	18	2,50	
ROV25	10	4	-	-	18	2,50	
ROV26	10	4	-	-	16	2,50	
ROV27	9	4	-	-	18	2,25	
ROV28	11	5	-	-	16	2,20	
ROV29	10	4	-	-	16	2,50	
ROV30	9	5	-	-	17	1,80	
ROV31	10	4	-	-	19	2,50	
ROV32	12	6	-	-	23	2,00	
ROV33	12	6	-	-	18	2,00	
ROV34	12	5	-	-	17	2,40	
ROV35	10	5	-	-	16	2,00	

Ringraziamenti

Questo lavoro non sarebbe stato possibile senza il contributo di molti, a partire dalla raccolta dei campioni di *Syllis gracilis*. A questo riguardo desidero ringraziare il gruppo di ricerca del Dipartimento di Zoologia e Genetica Evoluzionistica dell'Università di Sassari, nelle persone dei dott. Marco Casu, Daria Sanna, Piero Cossu, Fabio Scarpa, Gian Luca Dedola e del prof. Marco Curini-Galletti per l'ospitalità che mi hanno offerto nei due anni passati, l'aiuto pratico nel campionamento e le fruttuose discussioni intorno all'argomento della mia tesi, e soprattutto per la genotipizzazione degli organismi.

Ringrazio inoltre la dott.ssa Barbara Mikać del Centre for marine Research, Laboratory for Ecology and Systematics of Benthos, Ruđer Bošković Institute di Rovinj (Croazia) per i campioni da Rovinj e dalla Sicilia, di importanza fondamentale per questo lavoro;

il dott. Massimo Ponti e il prof. Marco Abbiati dell'Università di Bologna (sede distaccata di Ravenna) per le importanti indicazioni che mi sono state utilissime nel campionare la popolazione della Pialassa della Baiona;

i dott. Fabio Bulleri, Martina Dal Bello, Luca Rindi e il prof. Lisandro Benedetti-Cecchi (Università di Pisa) che hanno fornito campioni di grattaggio mesolitorale da Calafuria, Capraia, Giannutri; il dott. Matteo Nannini per il campione dall'isola Palmaria.

Un importante contributo nell'elaborazione e nella discussione dei dati è venuto quindi dal dott. Michele Barbieri, che ha anche contribuito nella raccolta di campioni, dalla dott.ssa Silvia Frosini e dal prof. Claudio Lardicci.

Infine desidero ringraziare coloro che in questi mesi di campionamento, analisi e stesura della tesi mi hanno supportato, nonché sopportato quando li tediavo con le mirabolanti avventure evolutive di policheti di cui verosimilmente gli poteva importare piuttosto poco; in primo luogo i miei genitori e mia sorella Sophie, il mio primo mentore naturalistico Enrico Pappalettere, e poi Chiara, Francesca, Gemma, Giulio, Irene, Luca, Martina, Sara, Silvia, Tommaso. Senza di voi tutto questo non sarebbe stato possibile, e in fondo non avrebbe neanche avuto significato.