

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
ETOLOGIA ED ECOLOGIA ANIMALE  
(XXIII CICLO)**

**Analisi morfometriche e valutazione  
del livello di asimmetria fluttuante  
in popolazioni di *Talitrus saltator***

**Tesi di**

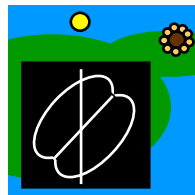
**Ottavio Giorgio Maria Ottaviano**



**Coordinatore  
Tutor**

**Prof. Alberto Ugolini  
Prof. Felicita Scapini**

**2010**





**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA “L. Pardi”**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
ETOLOGIA ED ECOLOGIA ANIMALE  
(XXIII CICLO, BIO 05, BIO 07)**

**Analisi morfometriche e valutazione  
del livello di asimmetria fluttuante  
in popolazioni di *Talitrus saltator***

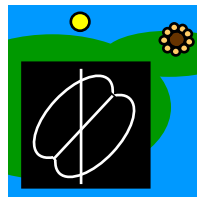
**Tesi di**

**Ottavio Giorgio Maria Ottaviano**

**Coordinatore Prof. Alberto Ugolini**

**Tutor Prof. Felicita Scapini**

**2010**





*A Iolanda e Sveva*



## INDICE

RIASSUNTO	pag. 3
<b>1. INTRODUZIONE</b>	7
<b>1.1. Prologo</b>	7
<b>1.2. L'Asimmetria Fluttuante</b>	7
<b>1.3. Breve inquadramento sistematico, morfologico ed ecologico della specie utilizzata</b>	10
<b>1.4. <i>Talitrus saltator</i> come modello di studio dell'asimmetria fluttuante e come bioindicatore</b>	13
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	16
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	17
<b>3.1. Descrizione dei siti di studio</b>	17
<b>3.2. Campionamento</b>	21
<b>3.3. Analisi morfometriche e genetiche</b>	23
<b>3.4. Analisi statistica</b>	31
<b>4. RISULTATI</b>	34
<b>4.1. Densità nell'area di cattura e <i>sex ratio</i></b>	34
<b>4.2. Analisi genetiche</b>	35
<b>4.3. Individui NA e <i>outlier</i></b>	36
<b>4.4. Capsula cefalica</b>	38
<b>4.5. Flagello delle antenne seconde</b>	42
<b>4.6. <i>Meri</i> dei pereiopodi</b>	52
<b>4.7. Asimmetria fluttuante dei <i>meri</i> dei pereiopodi</b>	78
<b>5. DISCUSSIONE</b>	81
<b>6. CONCLUSIONI</b>	92
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	94
<b>8. PUBBLICAZIONI</b>	99
<b>8.1. Can fluctuating asymmetry in <i>Talitrus saltator</i> (Montagu, 1808) (Crustacea, Amphipoda) populations be used as a bioindicator of stress on sandy beach ecosystems? (<i>Oceanologia</i>, 2010).</b>	99
<b>8.2. The possible use of sandhoppers as bioindicators of environmental stress on sandy beaches (<i>Zoologica Baetica</i>, in press)</b>	121





## RIASSUNTO

Lo scopo fondamentale della tesi è stato quello di verificare, sulla specie *Talitrus saltator* (Crostacei, Anfipodi), l'ipotesi delle asimmetrie fluttuanti, formulata da Møller & Swaddle (1997), con l'intento, in caso di verifica positiva dell'ipotesi, di proporre questa caratteristica della popolazione come bioindicatore dello stress a carico degli ecosistemi delle spiagge sabbiose.

Per raggiungere tale obiettivo sono state realizzate una serie di analisi morfometriche su quattro popolazioni di *Talitrus saltator*, tre del Mediterraneo e una dell'Atlantico. Le analisi morfometriche hanno riguardato la capsula cefalica (indicatore delle dimensioni complessive del corpo dei talitri), il numero degli articoli del flagello delle antenne seconde (carattere bilaterale meristico) e la lunghezza dei *meri* dei pereopodi P3, P6 e P7 (caratteri bilaterali metrici). Essendo l'asimmetria fluttuante un fenomeno di popolazione, il nucleo centrale della ricerca è stato il confronto del livello di asimmetria fluttuante delle popolazioni in esame. In particolare, l'obiettivo era correlare il livello di asimmetria fluttuante con gli impatti delle attività legate al turismo, con l'inquinamento di acqua e sedimenti da idrocarburi o pesticidi, con le condizioni climatiche e le escursioni di marea e, anche, con la taglia degli individui.

Sono state analizzate due popolazioni siciliane, Maganuco e Bruca, campionate alla fine dell'estate, che vivono su spiagge soggette a un crescente impiego ai fini turistici ed esposte a inquinamento cronico da idrocarburi dipendente dalle attività di trivellazione in mare per la ricerca e l'estrazione del petrolio, all'intenso traffico di petroliere e al lavaggio (illegale) delle loro cisterne. La spiaggia di Bruca è, inoltre, soggetta a inquinamento da pesticidi, utilizzati nelle vicine serre e scaricati in mare tramite le acque di drenaggio. La popolazione atlantica, Damgan, campionata alla fine dell'estate, proveniva da una spiaggia della Bretagna, ed è stata scelta poiché soggetta a forti escursioni di marea e a condizioni climatiche diverse dal Mediterraneo; un ulteriore motivo era valutare un'eventuale influenza della taglia degli individui sui livelli di asimmetria fluttuante visto che, spostandosi verso latitudini maggiori, aumentano le dimensioni degli individui delle popolazioni della stessa specie. La popolazione di controllo è stata scelta a Collelungo, poiché non impattata o, comunque, meno impattata delle altre spiagge, essendo inserita all'interno di una riserva naturale, il Parco Regionale della Maremma, sito nella Toscana meridionale. Su questa popolazione, per controllare eventuali effetti stagionali sul livello di asimmetria fluttuante, sono stati effettuati due campionamenti in stagioni diverse (Collelungo October e Collelungo April). Per questa spiaggia era nota la dinamica annuale della popolazione.

La popolazione più settentrionale, Damgan, nonostante le maggiori dimensioni della capsula cefalica, ha mostrato un numero di articoli del flagello delle antenne seconde significativamente minore rispetto alle altre popolazioni, il che indicherebbe che questi individui, seppure adulti, siano ancora soggetti a

crescere. La loro crescita sembra allometrica visto che solo i *meri* dei pereiopodi P3 sono significativamente più lunghi di quelli delle altre popolazioni; inoltre, in questi stessi *meri*, i talitri di Damgan manifestano un'asimmetria direzionale destra e si può ipotizzare che, in questa fase di crescita, non ci sia ancora la perfetta simmetria bilaterale.

E' stato confermato il dimorfismo sessuale del flagello delle antenne seconde con i maschi che hanno un numero di articoli significativamente maggiore delle femmine. I risultati hanno mostrato anche che il dimorfismo sessuale di questo carattere si presenta in maniera più marcata nella popolazione più vecchia, Collelungo April. Nei talitri più vecchi, inoltre, il dimorfismo sessuale tende a manifestarsi anche in altri caratteri, con la prevalenza dei maschi per la lunghezza dei *meri* dei pereiopodi P7 e P3 e prevalenza delle femmine mature nella lunghezza della capsula cefalica.

La popolazione di Collelungo October ha manifestato asimmetria direzionale destra a carico del flagello delle antenne seconde. Contrariamente alle attese, questa popolazione ha mostrato un livello di asimmetria fluttuante dei *meri* dei pereiopodi significativamente maggiore rispetto a tutte le altre popolazioni, comprese le siciliane, soggette a maggiori impatti chimici. Pertanto è emerso che l'asimmetria fluttuante della lunghezza dei *meri* dei pereiopodi di *Talitrus saltator* non può essere usata come bioindicatore degli stress chimici a carico degli ecosistemi delle spiagge sabbiose, dato che essa non aumenta in quelle popolazioni che sono cronicamente o acutamente esposte a inquinamento da idrocarburi o a inquinamento cronico da pesticidi. Anche diverse condizioni climatiche o maggiori escursioni tidali non innalzano il livello di asimmetria fluttuante.

E' stata dimostrata una differenza stagionale nel livello di asimmetria fluttuante di Collelungo. Infatti, la popolazione di Collelungo April, più vecchia rispetto a quella di Collelungo October, ha un minore livello di asimmetria fluttuante. Questo è spiegabile con tre ipotesi non escludentisi: 1) Gli asimmetrici sono stati selezionati contro; 2) Nel corso delle mute successive, gli asimmetrici hanno compensato le asimmetrie; 3) Sebbene all'interno di una riserva naturale, la spiaggia di Collelungo ha una relativa presenza di visitatori che vi giungono attraverso il Parco Regionale della Maremma determinando impatto meccanico. I dati degli ingressi alla spiaggia indicano un picco rilevante di visitatori nei mesi di aprile e maggio che è proprio il periodo di sviluppo dei talitri. Gli individui di Collelungo October, nati nella primavera precedente, si sono sviluppati in un periodo di grande impatto meccanico, mentre i talitri di Collelungo April, nati verso settembre-novembre dell'anno precedente, sono stati sottoposti a minori impatti meccanici durante il periodo del loro sviluppo. Invece, nelle altre spiagge campionate, nel periodo di sviluppo dei talitri, cioè nei mesi di aprile e maggio, c'è un afflusso notevolmente più limitato di visitatori, mentre c'è una presenza relativamente alta di turisti in agosto, periodo nel quale i talitri, già sviluppati, si riducono in densità.

Pertanto, l'asimmetria fluttuante della lunghezza dei *meri* dei pereopodi P3, P6 e P7 di *Talitrus saltator* potrebbe aumentare a causa degli stress meccanici dovuti alle attività legate all'utilizzo turistico degli ecosistemi delle spiagge sabbiose durante il periodo di sviluppo individuale.

La maggiore *sensibilità* agli stress meccanici si riscontra a carico dei *meri* dei pereopodi P3, cui seguono quelli dei P6, mentre la maggiore *resistenza* all'innalzamento del livello di asimmetria fluttuante si riscontra nei *meri* dei pereopodi P7. Questo fenomeno potrebbe essere legato a una maggiore canalizzazione dello sviluppo della simmetria bilaterale di quest'appendice a causa del suo ruolo funzionale nell'equilibrio statico e dinamico dell'animale. Essendo la specie relativamente resistente nei confronti degli impatti, le differenze tra le popolazioni nel livello di asimmetria fluttuante dei *meri* dei pereopodi P3 e P6 sono quelle da utilizzare per prime come allarme precoce di stress meccanici. Questi segmenti hanno, inoltre, il vantaggio di essere più corti e quindi meno soggetti a errori di misurazione.

L'uso di *Talitrus saltator* come bioindicatore ha il vantaggio di consentire confronti su una vasta area geografica - la distribuzione della specie - e durante tutto l'anno in quanto questa è la durata media del ciclo di vita. A differenza di altri parametri di popolazione o di comunità volti a valutare lo stato di benessere di un ecosistema, l'asimmetria fluttuante della lunghezza dei *meri* dei pereopodi di *Talitrus saltator* sembra presentare il vantaggio di non dipendere dallo sforzo di campionamento né dall'abbondanza delle popolazioni in un particolare momento dell'anno. Tuttavia, giacché l'asimmetria fluttuante presenta variazioni stagionali, l'applicazione di questo bioindicatore ha come presupposto la conoscenza della dinamica della popolazione sulla quale esso viene misurato, oltre che del periodo in cui agiscono gli stress meccanici.

In conclusione, tenendo opportunamente conto del periodo di sviluppo dei talitri, della dinamica delle popolazioni in esame e del periodo in cui agiscono i fattori stressanti, particolarmente la stagionalità delle attività legate al turismo, i livelli di asimmetria fluttuante dei *meri* dei pereopodi P6 e soprattutto P3 possono essere considerati un efficace e precoce bioindicatore degli stress meccanici a carico degli ecosistemi delle spiagge sabbiose.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Prologo

Uno dei criteri fondamentali nella classificazione del regno Animale è il tipo di simmetria. All'interno del sottoregno Eumetazoi (complessità anatomica a livello di organi o di apparati e sistemi), quegli animali dotati di simmetria bilaterale, cioè il cui corpo può essere diviso mediante un piano sagittale in due parti specularmente (quasi) identiche, costituiscono il grado Bilateri che comprende la maggior parte dei phyla. Ai Bilateri si contrappongono gli appartenenti al grado Radiati poiché dotati di simmetria raggiata. E' un criterio di classificazione filogeneticamente e ontogeneticamente "antico" visto che rimanda ad uno dei primi bivi seguiti dall'evoluzione del regno Animale e dallo sviluppo degli organismi. Pertanto, indagare sulle possibili alterazioni della simmetria bilaterale, col suo sottostante mondo di geni homeobox, basilari nello sviluppo del piano architettonico degli embrioni animali, di induttori morfogenetici e di comunicazioni tra parte destra e sinistra del corpo (Holland & Hogan, 1988; Boncinelli *et al.*, 1994; Hughes & Kaufman, 2002; Emlen & Allen, 2004; Nam & Nei, 2005; Crickmore & Mann, 2006), è affascinante poiché è un modo per accendere una piccola fiamma su un territorio della biologia ancora molto oscuro.

In questa tesi saranno esaminate le alterazioni quantitative della simmetria bilaterale, tra cui si annovera, anche per ragioni di tipo ecologico, l'asimmetria fluttuante.

## 1.2. L'Asimmetria Fluttuante

L'Asimmetria Fluttuante è un fenomeno di popolazione definita come lieve deviazione casuale di un carattere morfologico dalla perfetta simmetria bilaterale (Møller & Swaddle, 1997). L'asimmetria corporea viene misurata attraverso le differenze tra gli elementi destri e sinistri di caratteri bilaterali degli individui di un campione della popolazione. Tipicamente, l'asimmetria è il frutto di un differente sviluppo dei due lati del corpo di un individuo.

Esiste un interesse recente, e non solo, per l'asimmetria fluttuante. Ci sono varie ragioni. La più importante è che l'asimmetria fluttuante è in relazione con quello che forse è il maggiore ed insoluto problema generale della biologia ossia l'ordinata espressione dei genotipi in complessi fenotipi tridimensionali, in altri termini il problema della forma in biologia. Il suo *appeal* dipende dalla nostra conoscenza a priori dell'ideale, ossia la perfetta simmetria bilaterale.

Dal punto di vista statistico, l'asimmetria fluttuante è definita attraverso due criteri. I valori delle differenze tra parte destra (R) e sinistra (L) del corpo sono 1) distribuiti normalmente e 2) hanno una media che non si discosta significativamente da zero dato che, in condizioni ideali, un certo numero di individui ha un carattere più sviluppato su un lato del corpo, poniamo a destra, e uno stesso numero di individui ha lo stesso carattere più sviluppato a sinistra:

ecco perché fluttuanti (Fig. 1a). La varianza delle distribuzioni individua il livello di asimmetria di ogni carattere che, comunque, può essere definito anche attraverso il valore assoluto dell'asimmetria individuale di ogni carattere.

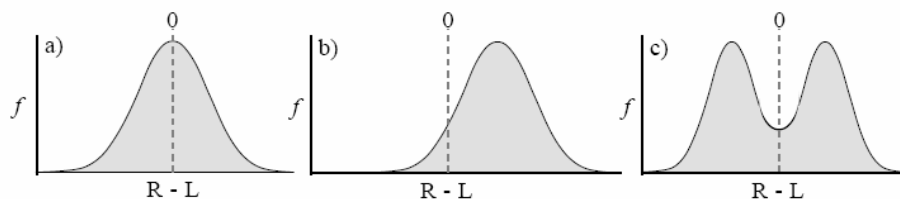


Fig. 1. Tre usuali distribuzioni di  $R - L$ , valori delle differenze tra lato destro (R) e sinistro (L) del corpo nei Bilateri a) Asimmetria Fluttuante; b) Asimmetria Direzionale; c) Antisimmetria (da Palmer, 1994, modificata).

L'analisi delle proprietà statistiche consente di differenziare l'asimmetria fluttuante da altri tipi di asimmetria come l'asimmetria direzionale e l'antisimmetria.

L'Asimmetria Direzionale si manifesta quando c'è la tendenza di un carattere a svilupparsi di più su un lato del corpo piuttosto che sull'altro lato. In questi casi è possibile predire quale lato del carattere sarà più grande prima che tale carattere si sviluppi. Nell'asimmetria direzionale i valori delle differenze tra lato destro e sinistro del corpo si distribuiscono normalmente ma con una media significativamente diversa da zero (Fig. 1b, asimmetria direzionale destra). Esempi di asimmetria direzionale si hanno nel becco del pioviero dal becco storto, sempre deviato a destra (Neville, 1976), nella posizione degli occhi delle sogliole, nella direzione di avvolgimento della conchiglia delle chioccioline (in quasi tutte le specie destrorsa) e nel numero di lobi dei polmoni nell'uomo. Nell'asimmetria direzionale le deviazioni delle traiettorie dello sviluppo dalla perfetta simmetria sono orientate verso una particolare direzione e sono codificate geneticamente negli individui di una determinata popolazione. Quando per un dato carattere si manifesta perciò l'asimmetria direzionale, non è più possibile scindere gli effetti dello stress ambientale dal fattore genetico. L'Antisimmetria si verifica quando un lato di un carattere è più grande dell'altro, ma non c'è preferenza per quale lato sarà più grande: quindi non è possibile prevedere quale lato sarà più grande. Statisticamente, nell'antisimmetria le differenze tra i due elementi di caratteri bilaterali si distribuiscono in modo platicurtico, cioè con picco allargato con una media non significativamente diversa dallo zero, oppure attraverso una distribuzione bimodale che riflette la presenza, all'interno dello stesso campione, di due gruppi di individui che tendono a svilupparsi in senso opposto (Fig. 1c). Un tipico esempio di antisimmetria è dato dalle chele di segnalazione dei granchi

violinisti maschi che appartengono al genere *Uca*. In *Uca musica*, le femmine hanno piccole chele simmetriche mentre i giovani maschi iniziano la vita con due grandi chele ugualmente sviluppate e l'asimmetria nello sviluppo è determinata da quale delle due chele sarà danneggiata o persa per prima. La chela danneggiata o persa ricresce piccola, come quella delle femmine. Ciò accade in modo casuale nel 50% dei casi a destra e nel 50% a sinistra: ne scaturisce pertanto una tipica distribuzione bimodale. Sono rarissimi i casi di maschi che, non avendo subito danni, hanno, da adulti, due chele di grandi dimensioni, così come sono rari i casi di maschi con due chele di tipo femminile avendole perse entrambe contemporaneamente (Neville, 1976). Un altro esempio di antisimmetria si ritrova nel becco incrociato dell'uccello crociere, *Loxia curvirostra*; nel 58% dei casi la mandibola incrocia a sinistra e nel 42% incrocia a destra dando origine ad una distribuzione bimodale (Neville, 1976). Presumibilmente l'antisimmetria è il risultato di una predisposizione genetica degli individui verso l'asimmetria. Come nell'asimmetria direzionale, anche nell'antisimmetria, l'effetto dello stress ambientale non può essere considerato a prescindere dal fattore genetico (Palmer & Strobeck, 1986; Møller & Swaddle, 1997).

Møller & Swaddle (1997) sostengono che nel corso dello sviluppo si creano delle asimmetrie nella struttura bilaterale dell'organismo ogniqualvolta agiscono degli stress di natura genetica o ambientale. Ciò è stato visto spesso negli uccelli, ad esempio nella coda delle rondini che per volare deve essere simmetrica; tuttavia, nelle popolazioni più stressate i due rami della coda non sono simmetrici. Per quanto riguarda gli stress di origine genetica, ricordiamo mutazioni, elevati livelli di omozigosi, ibridazione che divide geni complessi coadattati, inincrocio, intensi periodi di selezione direzionale: tutti questi fenomeni guastano il bilancio di un genoma riducendo la capacità di un organismo di tamponare la produzione di errori casuali durante lo sviluppo. A conferma di quanto prima affermato circa gli stress di origine genetica, c'è l'osservazione, che ha ancora più rinfocolato l'interesse per l'asimmetria fluttuante, di un'associazione statisticamente significativa tra asimmetria fluttuante e eterozigosi: più eterozigoti sono gli individui o la popolazione, più bassa è l'asimmetria fluttuante. In altri termini, per ragioni ancora non chiare, un incremento dell'eterozigosi sembra garantire un incremento del potere tampone contro perturbazioni indotte dall'ambiente nel corso dello sviluppo. Altre ricerche hanno riferito un incremento dell'asimmetria fluttuante in ibridi tra specie rispetto al livello di asimmetria fluttuante nelle specie parentali: se ne può dedurre che qualsiasi sia il ruolo canalizzante giocato dall'eterozigosi all'interno delle specie, tale canalizzazione sembra venga disturbata dal mescolamento di complessi di geni coadattati negli ibridi interspecifici (Palmer & Strobeck, 1986). I risultati di queste ricerche sono solo apparentemente in contraddizione visto che tra gli stress genetici si annovera anche l'ibridazione che divide geni complessi coadattati. In questa prospettiva, suona molto veritiera la considerazione di Mayr (1942) sulla specie, come sistema per

proteggere l'equilibrio di complessi di geni conquistato attraverso il vaglio della selezione naturale. Tra gli stress ambientali annoveriamo: temperature avverse, inquinamento chimico, carenze nelle risorse alimentari che possono destabilizzare ulteriormente l'organismo durante la fase delicata del suo sviluppo.

In conclusione, com'è stato evidenziato in un turbine di ricerche dagli anni '50 in poi, l'asimmetria fluttuante ci fornisce un'attraente misura di quello che, con Lewontin (1998), definiamo rumore dello sviluppo. In questa prospettiva, le popolazioni che mostrano differenti livelli di asimmetria fluttuante sono probabilmente soggette a differenti gradi di stress.

I caratteri bilaterali che possono essere esaminati si distinguono in meristici e metrici. I caratteri meristici sono quelli che si presentano in quantità discrete cioè che si possono contare come i raggi delle pinne pari dei pesci; l'asimmetria nei caratteri meristici tende solitamente a manifestarsi solo quando lo stress raggiunge livelli molto elevati. Metrici sono i caratteri continui come, ad esempio, le misure di distanze tra punti del corpo, e rappresentano degli indicatori più sensibili della stabilità dello sviluppo di un organismo (Møller & Swaddle, 1997).

### **1.3. Breve inquadramento sistematico, morfologico ed ecologico della specie utilizzata**

La specie utilizzata in questa ricerca, *Talitrus saltator* (Montagu, 1808), appartiene al phylum degli Artropodi, subphylum Crostacei, classe Malacostraci, superordine Peracaridi, ordine Anfipodi, sottordine Gammaridi, famiglia Talitridi (Ruppert & Barnes, 1997).

I Peracaridi sono Malacostraci caratterizzati dalla presenza, nella femmina, di una sacca ventrale incubatrice, detta marsupio, formata da sottili lamine triangolari dette oostegiti il cui sviluppo è sotto controllo ormonale e si completa soltanto nell'età riproduttiva. Lo sviluppo è diretto e, quando escono dal marsupio, i giovani sono, all'aspetto, simili agli adulti.

Gli Anfipodi sono Peracaridi con il corpo compresso lateralmente, lungo perlopiù dai 5 ai 15 mm, privo di carapace e suddiviso in capo, mesosoma, metasoma, urosoma e telson (Karaman, 1993). Sul capo si trovano le antenne prime e seconde, di solito ben sviluppate. Il mesosoma è formato da 8 segmenti, ma il primo (e raramente anche il secondo), col suo paio di appendici dette massillipedi, è fuso col capo. Quindi, il mesosoma appare formato da 7 segmenti, ciascuno dei quali è fornito di un paio di appendici, i pereiopodi. Le prime due paia di pereiopodi sono chiamate anche gnatopodi, sono spesso subchelate e hanno funzione prensile. I successivi pereiopodi hanno prevalentemente funzione locomotoria. Ciascun pereiopode è costituito da 7 segmenti che, in senso prossimo-distale, sono: coxa o coxopodite, basipodite, ischiopodite, *merus* o meropodite, *carpus* o carpopodite, propodite, dattilo o dattilopodite. I pereiopodi 3 e 4 (P3 e P4) sono più o meno simili fra loro mentre i pereiopodi 5, 6, e 7 (P5, P6 e P7) sono progressivamente più lunghi



anche se in qualche specie (ma non in *Talitrus saltator*) la lunghezza maggiore è nel P6. I dattili di questi pereopodi sono orientati verso la parte anteriore del corpo dell'animale cioè in direzione contraria rispetto ai pereopodi 3 e 4 e agli gnatopodi 1 e 2. Le branchie, che hanno l'aspetto di lamelle o vescicole, si trovano sulla faccia interna delle coxe dei pereopodi, ma mancano su quelle degli gnatopodi 1 e, spesso, su quelle dei pereopodi P7.

Il metasoma è formato da 3 segmenti, ciascuno dei quali è dotato di un paio di appendici filiformi, i pleopodi, che sono usati per il nuoto e per creare la corrente respiratoria. L'urosoma è costituito da 3 segmenti, ciascuno dei quali porta un paio di appendici, gli uropodi. Ogni uropode è formato da un peduncolo e da due rami, uno esterno e uno interno, più o meno forniti di spine, anche se uno o entrambi i rami possono essere ridotti o assenti. L'uropode 3 (U3) è generalmente differente dagli uropodi 1 e 2, possiede un peduncolo più lungo o più corto dei rami di cui quello interno può essere ridotto o assente. Infine, il telson è una struttura unisegmentale situata dorsocaudalmente all'U3, sopra l'apertura anale (Fig. 2). Gli aspetti morfologici degli gnatopodi, dell'uropode 3 e del telson sono alcuni dei criteri per l'inquadramento tassonomico delle specie di Talitridi (Ruffo, 1993).

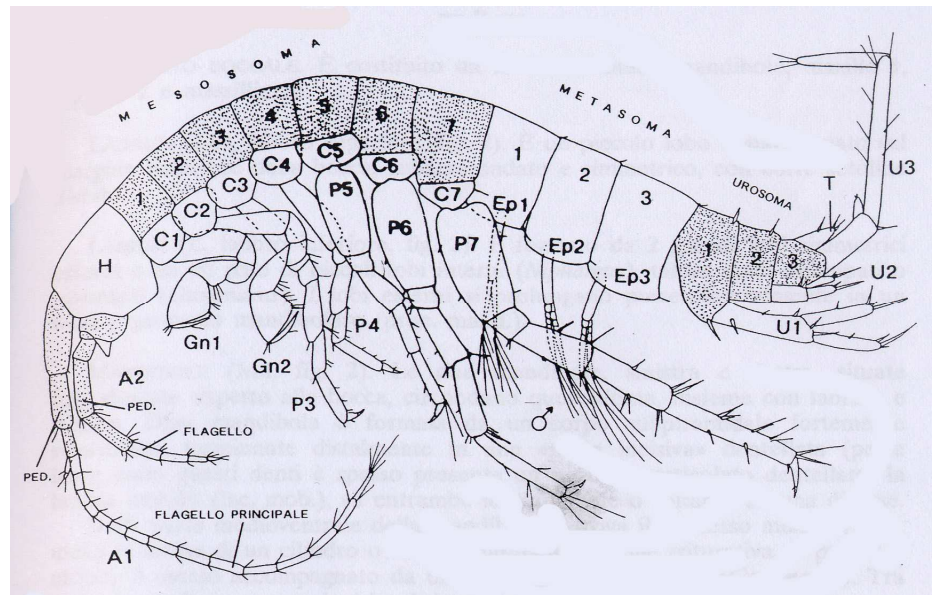


Fig. 2. Morfologia generale esterna di un Anfipode. A1 = antenna prima; A2 = antenna seconda; C1-C7 = coxe 1-7; Ep 1-3 = piastre epimerali 1-3; Gn1-Gn2 = gnatopodi 1 e 2; P3-P7 = pereopodi 3-7; ped. = peduncolo; U1-U3 = uropodi 1-3; T = telson; (da Karaman, 1993).

I Gammaridi sono Anfipodi perlopiù bentonici, benché parecchi possano nuotare, anche se non frequentemente. La spinta per il nuoto è fornita dai pleopodi e, in alcuni gruppi, dagli uropodi. Nello staccarsi dal substrato la spinta iniziale è garantita usualmente da uno scatto all'indietro dell'addome.

La famiglia Talitridae è l'unico raggruppamento dell'ordine Amphipoda adattato alla vita sulla terraferma, anche se sempre legata ad ambienti umidi. Infatti, pur vivendo fuori dall'acqua, i talitridi hanno conservato le branchie per gli scambi gassosi. L'aria deve essere umida, e i talitridi sono costretti a vivere nella sabbia bagnata, sotto i detriti, o nella lettiera di foglie intrisa d'acqua nelle foreste lontane dal mare.

Dalla letteratura è noto che, a differenza di altri talitridi, in *Talitrus saltator* il dimorfismo sessuale non è accentuato; le dimensioni sono, infatti, di circa 13 mm per il maschio e 12 mm per la femmina e il secondo gnato-pode del maschio non è subchelato come in altre specie di Talitridi. Il dimorfismo sessuale si manifesta nelle antenne seconde (A2) più lunghe nei maschi rispetto alle femmine (Ruffo, 1993). Su talitridi della Gran Bretagna, Williams (1987) ha osservato che i giovani nascono indistintamente con 4 articoli nel flagello dell'antenna seconda e che, nelle mute successive, la femmina aggiunge, simmetricamente su entrambi i flagelli, un articolo, mentre il maschio due. Il numero degli articoli del flagello antennale, dunque, può essere utilizzato per conoscere l'età dell'animale, una volta noto il periodo che intercorre tra una muta e la successiva.

*Talitrus saltator* ha una struttura corporea che ne garantisce velocità, agilità di deambulazione e salti (da cui il nome della specie) fino a diversi centimetri da terra; in particolare, grazie alla forma arcuata del corpo, per saltare estende improvvisamente all'indietro l'addome e il telson ricavandone la spinta necessaria.

*Talitrus saltator* vive nelle spiagge sabbiose del Mediterraneo, dell'Atlantico Nordorientale e del Baltico Meridionale. I talitridi trascorrono tutta la loro vita sulla stessa spiaggia e si muovono dalla zona intertidale a quella sopralitorale e anche nelle zone retrostanti adattando la propria zonazione in funzione delle caratteristiche del substrato, delle fonti trofiche e anche delle condizioni meteorologiche e delle fasi di marea (Scapini *et al.*, 1992).

La nutrizione di *Talitrus saltator* è generalmente saprofaga (detritivora), prevalentemente su materiale organico spiaggiato, e quindi ha un ruolo fondamentale nella catena alimentare dell'ecotono della costa sabbiosa.

Sulle coste mediterranee, poiché l'escursione tidale è limitata, i detriti lasciati dal mare non sono in quantità abbondante, e dunque la migrazione alla ricerca del cibo può avere un raggio piuttosto ampio, fino alla duna (Scapini *et al.*, 1992).

Per limitare il rischio di disidratazione *Talitrus saltator* presenta una spiccata attività durante la notte, periodo nel quale emerge dalla sabbia umida e va alla ricerca di cibo. In generale si notano due picchi giornalieri di attività: uno subito dopo il tramonto e uno poco prima dell'alba. Eventuali condizioni

climatiche avverse possono sopprimere o deprimere uno di questi due picchi (Scapini *et al.*, 1992). Invece, durante il giorno i talitri preferiscono rimanere infossati nella sabbia umida. Da tale substrato fuoriescono solo in caso di pericolo: disseccamento della sabbia, sommersione, azione di scavo da parte di un predatore. In caso di disidratazione, i talitri hanno evoluto un comportamento di fuga verso il mare, mentre, in caso di sommersione, tenderanno ad allontanarsi da esso; la pioggia e le mareggiate determinano una maggiore dispersione verso l'interno (Scapini, 1997).

Alle latitudini mediterranee, *Talitrus saltator* si riproduce nel periodo tra marzo e ottobre, in cui le condizioni climatiche sono più favorevoli alla nascita dei piccoli. E' stata notata la presenza di picchi riproduttivi in corrispondenza dei periodi primaverile e autunnale (più accentuata in questo secondo periodo, perché i piccoli nati in primavera sono già in grado di riprodursi), mentre poche nascite avvengono nel periodo estivo a causa dell'alta temperatura che non favorisce la sopravvivenza dei piccoli (Marques *et al.*, 2003).

La crescita dell'individuo prosegue attraverso mute periodiche, fino al raggiungimento della maturità sessuale, circa 3 o 4 mesi dopo la nascita.

#### **1.4. *Talitrus saltator* come modello di studio dell'asimmetria fluttuante e come bioindicatore**

*Talitrus saltator* (Fig. 3) è stato oggetto di numerosi studi che hanno condotto a una dettagliata conoscenza della sua zonazione e distribuzione (ad esempio, Pavesi *et al.*, 2009), dinamica di popolazione (Marques *et al.*, 2003), dei suoi adattamenti fisiologici (ad esempio, Morrill & Spicer, 1998) e comportamentali (una *review* in Scapini, 2006) e della struttura genetica di popolazione (De Matthaëis *et al.*, 2000; Ketmaier *et al.*, 2005).



Fig. 3. *Talitrus saltator* (da: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Talitrus\\_saltator\\_2a.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Talitrus_saltator_2a.jpg)).

La vastità degli studi su *Talitrus saltator* e su altre specie di talitridi e la loro presenza su spiagge soggette a vari tipi d'impatti (Defeo *et al.*, 2009; Dugan *et al.*, 2010) fanno dei talitridi dei buoni candidati come bioindicatori degli stress ambientali, sia naturali sia antropici, a carico delle spiagge sabbiose. In particolare, l'uso di *Talitrus saltator* come bioindicatore ha il vantaggio di consentire confronti su un'ampia area geografica (quella della distribuzione della specie) e negli anni (gli individui vivono all'incirca un anno e ci sono due o tre generazioni all'anno). Inoltre si tratta di una specie relativamente diffusa con popolazioni abbondanti ed è abbastanza resistente per cui può essere rinvenuta anche su spiagge relativamente inquinate e/o disturbate (Scapini & Morgan, 2002). Per tale ragione, non funge da bioindicatore in base alla sua presenza/assenza bensì in base alle differenze tra le diverse popolazioni che possono denunciare le differenze in termini di impatti tra le spiagge di provenienza; inoltre, può fungere da allarme precoce di stress prima che la popolazione scompaia a causa di severi impatti ambientali (Scapini & Morgan, 2002). Ad esempio, è stato proposto di utilizzare la dinamica delle popolazioni di *Talitrus saltator* come bioindicatore degli stress ambientali provocati da attività legate al turismo (Weslawski *et al.*, 2000; Fanini *et al.*, 2005; Ugolini *et al.*, 2008). Per valutare la capacità portante degli ecosistemi delle spiagge sabbiose sarebbe importante individuare precocemente gli effetti degli impatti mediante bioindicatori la cui stima non dipenda dallo sforzo di campionamento né dall'abbondanza delle popolazioni in un particolare momento dell'anno.

Un buon candidato come precoce bioindicatore degli stress ambientali potrebbe essere il livello di asimmetria fluttuante.

La notevole mole di studi effettuati su *Talitrus saltator*, la sua ampia diffusione con popolazioni abbondanti, la sua relativa resistenza e, ovviamente, il suo essere un organismo con simmetria bilaterale e organizzazione metamerica rendono questa specie un affidabile organismo modello per studi sull'asimmetria fluttuante.

Il livello medio di asimmetria fluttuante, rinvenuto nelle popolazioni soggette a differenti gradi di impatto, rappresenterebbe dunque il bioindicatore dello stress ambientale.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è stato quello di verificare, su *Talitrus saltator*, l'ipotesi delle asimmetrie fluttuanti, formulata da Møller & Swaddle (1997), attraverso una serie di analisi morfometriche su quattro popolazioni soggette a impatti di natura diversa. L'intento era, in caso di verifica positiva della suddetta ipotesi, quello di proporre l'asimmetria fluttuante come bioindicatore di impatto a carico degli ecosistemi delle spiagge sabbiose. Essendo un fenomeno di popolazione, il nucleo centrale della ricerca è stato il confronto del livello di asimmetria fluttuante delle popolazioni in esame. In particolare, l'obiettivo era quello di analizzare l'eventuale relazione del livello di asimmetria fluttuante con gli impatti delle attività legate al turismo, con l'inquinamento di acqua e sedimenti da idrocarburi o pesticidi, con le condizioni climatiche e escursioni di marea e, anche, con la taglia degli individui.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Descrizione dei siti di studio

Sono state scelte quattro popolazioni di *Talitrus saltator* (Montagu, 1808) viventi nelle seguenti spiagge sabbiose (Fig. 4 e Tabella 1):

1. Maganuco – Sicilia Sudorientale – Canale di Malta (provincia di Ragusa, Italia) - 36°43'01,00" N – 14°49'13,62" E, campionata il 21 e 23 agosto 2008. Chiamerò tale popolazione Maganuco August.

2. Bruca – Sicilia Sudorientale – Canale di Malta (provincia di Ragusa, Italia) – 36°44'07,65" N – 14°40'41,75" E, campionata il 25 agosto 2008. Chiamerò tale popolazione Bruca August.

3. Collelungo – Toscana Meridionale – Parco Regionale della Maremma (provincia di Grosseto, Italia) – 42°38'10,14" N – 11°04'07,95" E. Per questa popolazione ho eseguito due campionamenti, in anni e stagioni differenti, il 3 ottobre 2008 e il 21 aprile 2010. Chiamerò tali popolazioni, rispettivamente, Collelungo October e Collelungo April.

4. Damgan – Bretagna Meridionale – (Dipartimento di Morbihan, Francia) – 47°31'00",45" N - 02°34'47",45 W, campionata il 29 agosto 2009. Chiamerò tale popolazione Damgan August.

Le caratteristiche dei siti di campionamento sono riassunte e confrontate in Tabella 1.

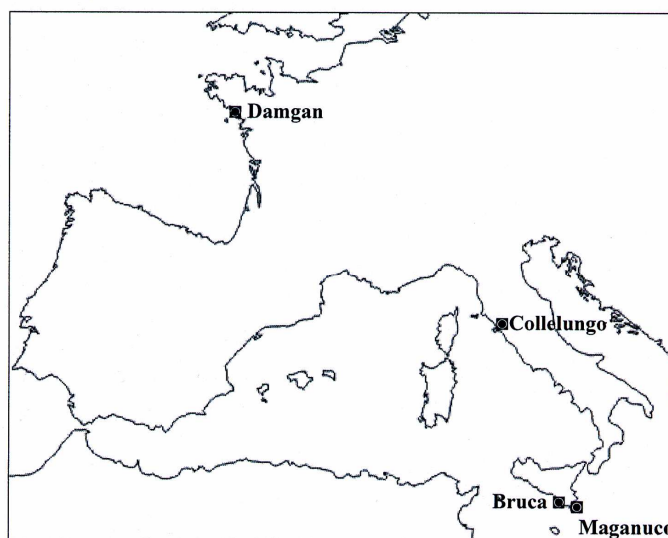


Fig. 4. Siti di campionamento.

**Tabella 1. Caratteristiche dei siti di campionamento.**

<b>Spiaggia</b>	<b>Maganuco</b>	<b>Bruca</b>	<b>Collelungo</b>	<b>Damgan</b>
Lunghezza	890 m	1630 m	4400 m	1560 m
Profondità massima (in bassa marea diurna)	80,0 m	27,5 m	32,7 m	50,9 m
Profondità nel punto di cattura (in bassa marea diurna)	45,9 m	27,5 m	32,7 m	32,4 m
Orientamento medio (perpendicolare alla linea di riva)	174°	234°	211°	190°
Vegetazione dunale	Sì	Sì, in più villette dietro le dune	Sì	Solo nei 300 m attorno alla zona di cattura
Limiti laterali	Scogli su entrambi i lati	Scogli su un lato, ghiaia e scogli sull'altro	Scogli su un lato, ghiaia e scogli sull'altro	Scogli su entrambi i lati
Vie di accesso	6, di cui 3 frequentemente usate	3, di cui 2 adiacenti e frequentemente usate	2	3 principali e numerose secondarie
Corsi d'acqua o canali di scolo	No	Sì, un canale di scolo dalle serre, situate nel vicino entroterra, scarica nel mare a 678 m dal punto di campionamento	Sì, riva sinistra del fiume Ombrone a 5051 m dal punto di campionamento	Sì, un canale di scolo a 1090 m dal punto di campionamento
Area protetta	No	No	Sì	No
Presenza di turisti	Sì, specialmente in agosto	Sì, specialmente in agosto	Sì, specialmente in aprile e maggio	Sì, specialmente in agosto
Pulizia della sabbia	Sì, meccanica, in agosto	No	No	Sì, meccanica, in agosto
Presenza di taliridi	Nella parte orientale della spiaggia (non molto frequentata dai turisti)	Dappertutto ad eccezione dei 380 m attorno agli accessi principali	Dappertutto	Solo nei 170 m attorno alla zona di cattura (pochi accessi, no pulizia)
Date dei campionamenti	21, 23 agosto 2008	25 agosto 2008	3 ottobre 2008; 21 aprile 2010	29 agosto 2010
Area di cattura dei talitridi	17 m <sup>2</sup>	21 m <sup>2</sup>	10 m <sup>2</sup> ; 17 m <sup>2</sup>	20 m <sup>2</sup>
Numero di talitridi catturati	50	80	114; 115	110
Densità nell'area di cattura (individui/ m <sup>2</sup> )	2,9	3,8	11,4; 6,8	5,5



Alla luce dell'ipotesi di Møller & Swaddle (1997), la scelta dei siti di campionamento è stata indirizzata a individuare popolazioni provenienti da spiagge impattate e popolazioni viventi in spiagge non impattate o meno impattate, al fine di confrontare il loro livello di asimmetria fluttuante.

La spiaggia di **Maganuco** (Fig. 5a) è caratterizzata da un impatto turistico crescente ma concentrato nel mese di agosto e da un inquinamento cronico da idrocarburi, giacché, a largo di quel litorale, vengono eseguite trivellazioni per la ricerca e l'estrazione del petrolio. In particolare, la spiaggia è situata vicino al porto di Pozzallo che funge da base di supporto per Vega, la più grande piattaforma petrolifera del Mediterraneo che si trova a 12 miglia dalla costa (Fig. 5b).

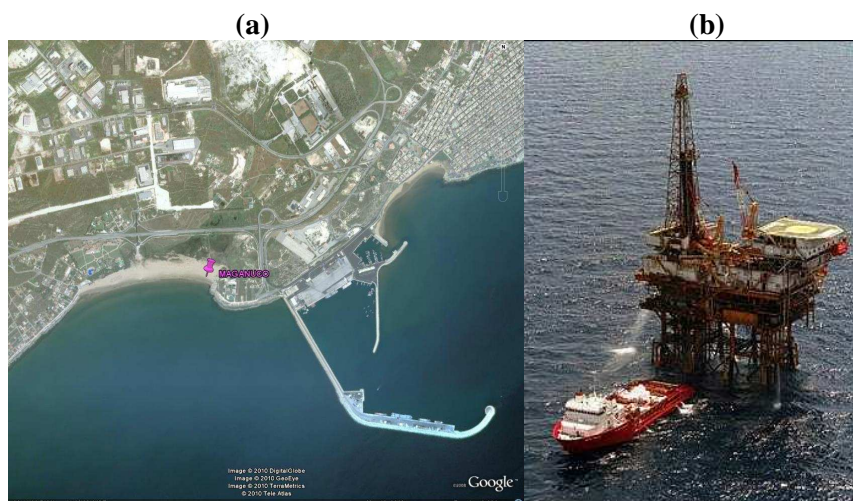


Fig. 5. a) Spiaggia di Maganuco con il punto di campionamento e il porto di Pozzallo (da Google Earth, 10 maggio 2009); b) Piattaforma petrolifera Vega. (da: <http://www.greencity.it/news/2564/riprende-l-attivita-della-piattaforma-petroliera-vega.html>; 25 giugno 2010).

Sulla spiaggia di Maganuco, come in molte altre del litorale ragusano, è comune imbattersi in residui catramosi legati alle attività estrattive, all'intenso traffico marittimo, specie di petroliere, e anche al lavaggio (illegale) delle loro cisterne.

Nell'altra spiaggia siciliana, **Bruca**, oltre al crescente impatto turistico (ad agosto) e al cronico inquinamento da idrocarburi, si aggiunge la presenza, nel vicino entroterra, di vasti impianti di serricoltura ove si fa uso di pesticidi, una quota dei quali, tramite le acque irrigue di drenaggio, è scaricata direttamente in mare attraverso due canali di scolo (Fig. 6).

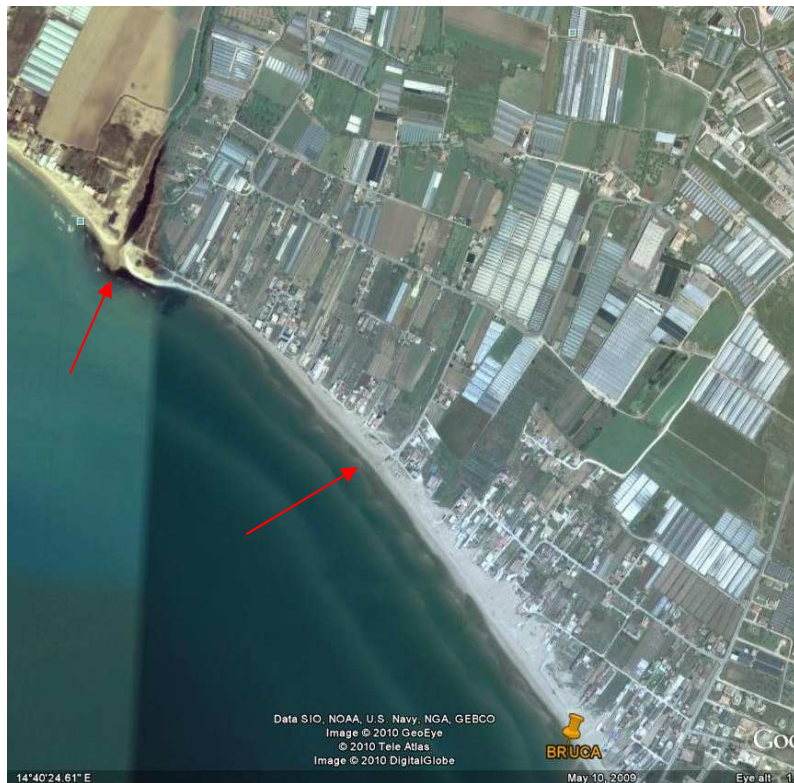


Fig. 6. Spiaggia di Bruca con il punto di campionamento e gli impianti di serricoltura nel vicino entroterra. Le frecce indicano lo sbocco dei canali di scolo delle acque reflue di drenaggio delle serre (da Google Earth, 10 maggio 2009).

Si tenga conto che le correnti marine della zona sono in assoluta prevalenza da Ovest per cui i reflui scaricati in mare vanno a investire la zona di cattura dei talitri.

La spiaggia di **Collelungo** è stata da me considerata quella presumibilmente non impattata o, comunque, meno impattata delle altre spiagge selezionate poiché inserita all'interno di una riserva naturale, il Parco Regionale della Maremma (Fig. 7), che è una zona non inquinata, nei cui dintorni si pratica obbligatoriamente agricoltura biologica e dove le acque di drenaggio sono periodicamente monitorate per eventuali contaminazioni chimico-microbiologiche. La spiaggia è, inoltre, relativamente, non impattata dal turismo (Fanini *et al.*, 2005). Su questa spiaggia ho effettuato due campionamenti in anni e stagioni diverse per evidenziare eventuali effetti stagionali sul livello di asimmetria fluttuante.



Fig. 7. a) Spiaggia di Collelungo con il punto di campionamento (da Google Earth, 3 settembre 2004); b) Vista della spiaggia dal retroduna (da: [http://www.meteoclima.net/it15/index.php?option=com\\_content&view=category&id=59&Itemid=109](http://www.meteoclima.net/it15/index.php?option=com_content&view=category&id=59&Itemid=109)).

La spiaggia di **Damgan** in Bretagna (Fig. 8) è stata scelta poiché, oltre al crescente impatto turistico (ad agosto), è soggetta a forti escursioni di marea e a condizioni climatiche diverse dal Mediterraneo. L'idea era di saggiare l'eventuale influenza di tali condizioni sul livello di asimmetria fluttuante della popolazione. Un ulteriore motivo della scelta era che, spostandosi verso latitudini maggiori, aumentano le dimensioni degli individui delle popolazioni della stessa specie. Volevo verificare, infatti, un'eventuale influenza della taglia degli individui sui livelli di asimmetria fluttuante.



Fig. 8. Spiaggia di Damgan con il punto di campionamento (da Google Earth, 24 settembre 2002).

### 3.2. Campionamento

Seguendo tecniche di campionamento già precedentemente utilizzate in studi di dinamica e struttura di popolazione (Scapini, 2002; Marques *et al.*, 2003; Fanini *et al.*, 2005), individuavo, nell'ambito della spiaggia, la zona di

massima frequenza dei talitridi, e poi, smuovendo lo strato sabbioso superficiale, catturavo solo talitridi adulti mediante un aspiratore entomologico (Fig. 9). Poi misuravo l'area di campionamento per quantificare lo sforzo di campionamento e ottenere una misura della densità dei talitridi nell'area di cattura (Fig. 10). I talitridi poi erano trasferiti in un contenitore di plastica contenente sabbia umida della medesima spiaggia e dotato di buchi per permettere l'aerazione. Nella stessa giornata del campionamento o entro l'indomani, per ogni popolazione, trasferivo singolarmente non meno di 50 talitridi adulti dentro provette eppendorf riempite precedentemente con etanolo assoluto (99,9%) che, poi, erano stoccate alla temperatura di  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Fig. 9. L'autore nell'attività di campionamento a Damgan (Bretagna, Francia, 29 agosto 2009). Si vede l'aspiratore entomologico e il contenitore per il momentaneo stoccaggio dei talitridi catturati.



Fig. 10. Area di campionamento delimitata (Damgan, 29 agosto 2009).

### 3.3. Analisi morfometriche e genetiche

In ogni individuo ho esaminato un carattere bilaterale meristico ossia il numero degli articoli del flagello delle antenne seconde (A2) che è indicativo, inoltre, dell'età del talitro.

Per quanto concerne i caratteri metrici, il criterio basilare nella scelta dei segmenti bilaterali da misurare è stato la costanza e chiarezza dei punti di repere poiché da ciò sarebbero dipese l'accuratezza e la precisione delle misure. Il secondo criterio è stato quello di evitare di legare la misura di un carattere ad un altro carattere. Ad esempio, l'utilizzo di una spina come punto di repere di un segmento ne avrebbe condizionato la misura, dato che quest'ultima sarebbe dipesa dal punto in cui la spina si era sviluppata nonché dalla sua lunghezza e orientamento. Il terzo principio era analizzare solo segmenti rettilinei, dato che prendevo le misure direttamente per mezzo del micrometro inserito nell'oculare dello stereomicroscopio, senza far uso di foto e di analisi delle immagini. Rispetto a misurazioni effettuate da foto allo stereomicroscopio, la misura diretta nello stesso strumento diminuisce il numero di passaggi che portano al dato finale, riducendo così il numero di errori. La foto, infatti, implica la messa a fuoco con la macchina digitale diminuendo, specie a 50X, la chiarezza dei punti di repere. Si consideri, inoltre, che per ridurre l'entità dell'errore di misura, effettuavo due misurazioni dei caratteri metrici bilaterali. La foto, una volta fatta, non consente di spostare il segmento alla ricerca di una posizione migliore, nel senso che entrambe le misurazioni devono essere effettuate sullo stesso reperto digitale, mentre, nelle misure dirette, la seconda volta è possibile che si individui un orientamento migliore sul piano. Infine, ho scelto di non misurare due o più segmenti della stessa appendice, ad esempio *merus* e *carpus*, giacché essi correlano sia negli esemplari simmetrici sia in quelli schiettamente asimmetrici (osservazione personale) per cui questa si sarebbe rivelata un'analisi morfometrica ridondante.

Invece, tenuto conto dello sviluppo anamorfico dei crostacei (prima la parte anteriore del corpo, poi quella posteriore) i pereopodi P3, P4, P5, P6 e P7 erano i più adatti per lo scopo della ricerca. Ho deciso di utilizzare i pereopodi P4 e P5 di destra e di sinistra per l'analisi genetica dopo aver verificato, adattando il metodo *salting out* di Miller *et al.* (1988), che da essi era possibile estrarre, una sufficiente quantità di DNA e amplificare alcuni frammenti genici. Invece i pereopodi P3, P6 e P7 di destra e di sinistra sono stati scelti per l'analisi morfometrica, non solo perché si sviluppano in tempi differenti, ma anche perché sono di dimensioni progressivamente crescenti.

In queste appendici, i *meri* sono i migliori segmenti per quanto concerne chiarezza e costanza dei punti di repere e per la facilità di misurazione con l'ingrandimento 50X (Fig. 11). A tal proposito, si consideri che negli studi sull'asimmetria fluttuante è importante utilizzare unità di misura che non siano troppo grandi in rapporto all'effettiva asimmetria poiché, in caso contrario, pur in presenza di asimmetria fluttuante del carattere in esame, si avrebbe

leptocurtosi, ossia un addensamento dei valori misurati al centro della distribuzione. Per questo motivo ho scelto di utilizzare l'ingrandimento 50X. In base ad una serie di osservazioni preliminari, ho verificato che per i *meri* dei pereiopodi P6 e P7 il lato più idoneo alle misurazioni era quello posteriore osservato dalla faccia interna del segmento. Inoltre, per entrambi i segmenti, il repere prossimale era il punto più distale della lieve incisura tra *merus* e ischiopodite, mentre il punto di repere distale era rappresentato dall'apice del ginocchio con esclusione della spina (in base al secondo criterio). Per i *meri* dei pereiopodi P3, il lato più idoneo era quello anteriore osservato dalla faccia esterna del segmento, con punti di repere identici a quelli dei pereiopodi P6 e P7.

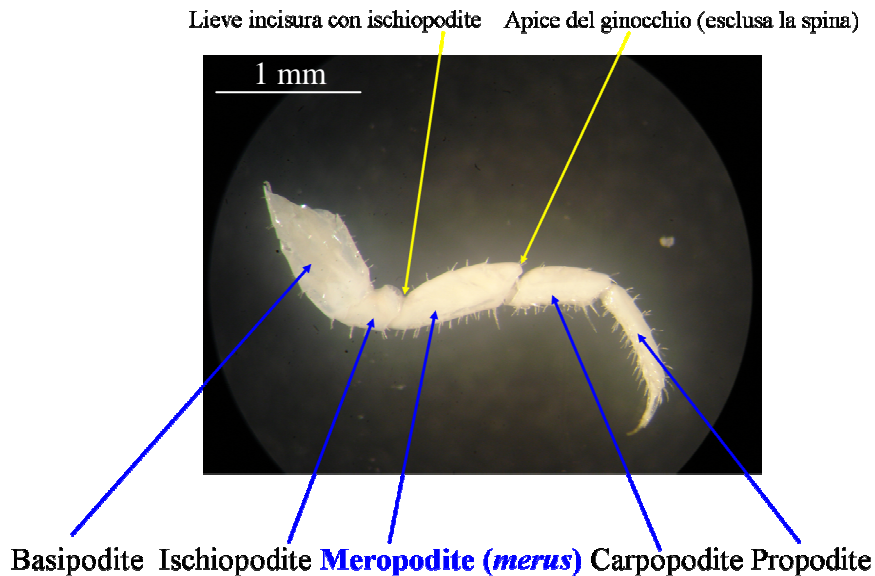


Fig. 11. Pereiopode P3 destro osservato allo stereomicroscopio ad ingrandimento 50X. Sono indicati i principali segmenti che formano l'appendice e i punti di repere prossimale e distale del *merus*.

Infine, ho misurato anche la lunghezza della capsula cefalica come indicatore delle dimensioni complessive del corpo del talitro (Marques *et al.*, 2003).

La Figura 12 e la Tabella 2 riassumono le appendici e i segmenti scelti per le analisi genetiche e morfometriche e i relativi punti di repere.

La Fig. 13 mostra, al microscopio elettronico a scansione, in corrispondenza dell'articolazione tra *merus* e *carpus* del pereiopode P6 destro, il punto di repere distale del *merus*.

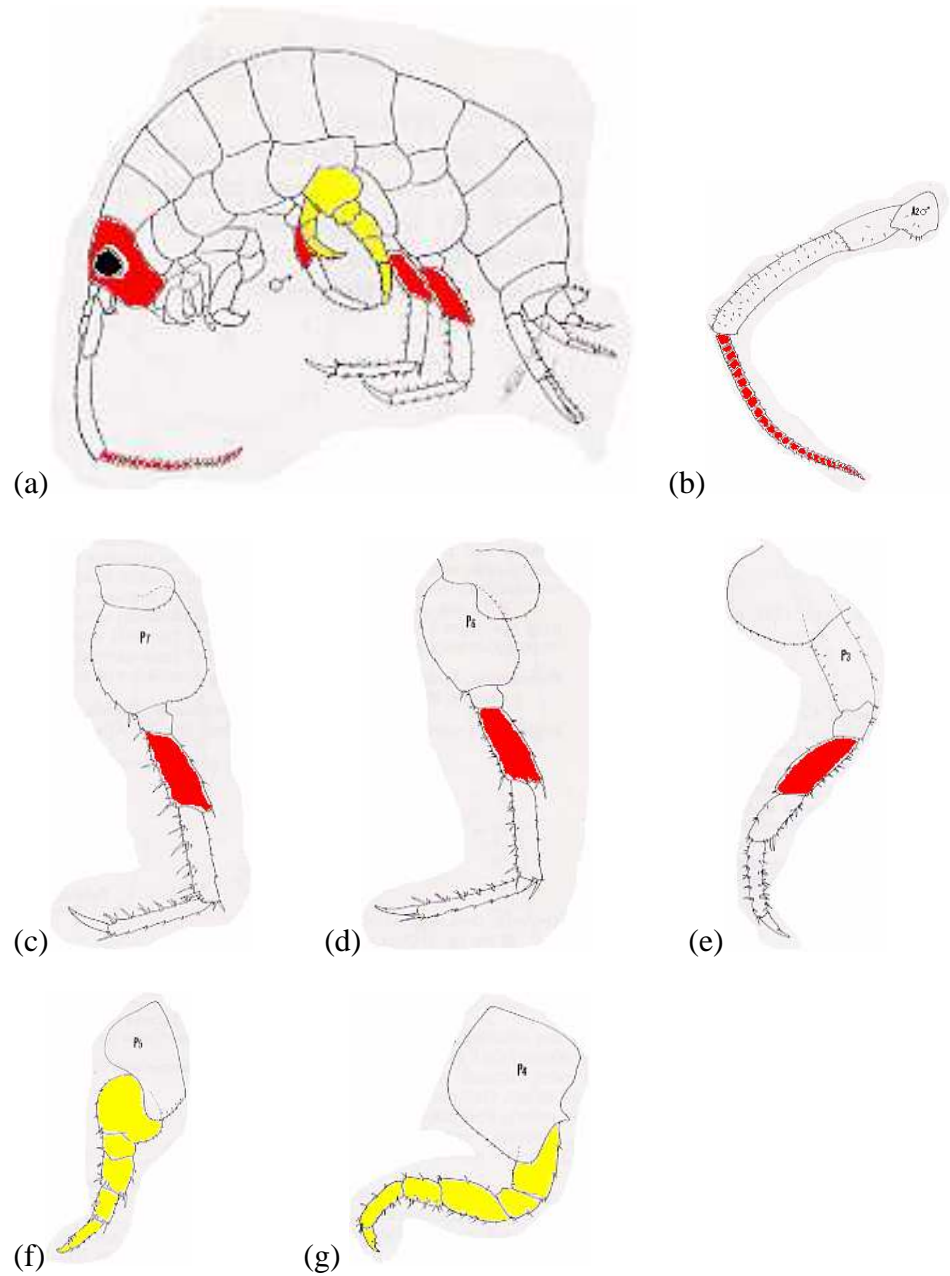


Fig. 12. Rappresentazione descrittiva di a) *Talitrus saltator*. In giallo le appendici usate per le analisi genetiche, in rosso i segmenti utilizzati per le analisi morfometriche. b) Articoli del flagello delle antenne seconde; c) *Merus* del pereopode P7; d) *Merus* del pereopode P6; e) *Merus* del pereopode P3; f) Pereiopode P5; g) Pereiopode P4 (modificata da Ruffo, 1993).

**Tabella 2. Segmenti misurati e punti di repere utilizzati.**

	Capsula cefalica	Antenne seconde Destra e Sinistra (A2)	Pereiopodi P3 Destro e Sinistro	Pereiopodi P6 Destro e Sinistro	Pereiopodi P7 Destro e Sinistro
Segmento	-	Flagello	<i>Merus</i>	<i>Merus</i>	<i>Merus</i>
Faccia	-	-	Esterna	Interna	Interna
Lato	Destro	-	Anteriore	Posteriore	Posteriore
Punto di repere prossimale	Estremità posteriore della capsula	-	Punto più distale della lieve incisura con ischiopodite	Punto più distale della lieve incisura con ischiopodite	Punto più distale della lieve incisura con ischiopodite
Punto di repere distale	Base della antenna prima	-	Apice del ginocchio (esclusa la spina)	Apice del ginocchio (esclusa la spina)	Apice del ginocchio (esclusa la spina)

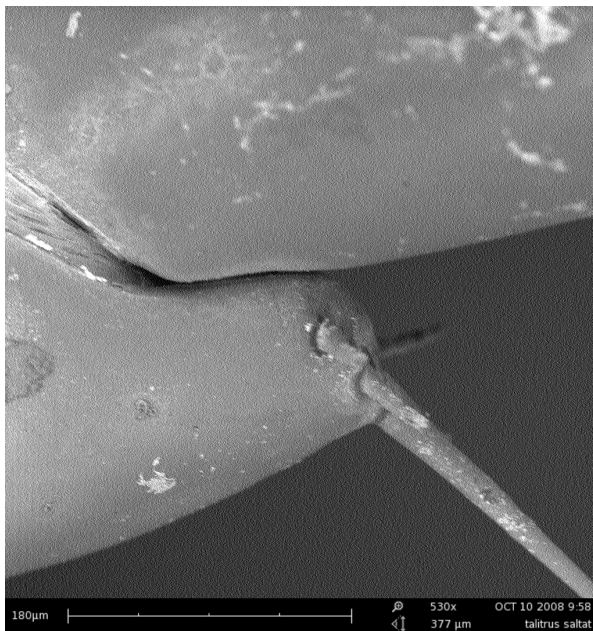


Fig. 13. Articolazione tra *merus* e *carpus* del pereopode P6 destro col punto di repere distale del *merus* (foto al microscopio elettronico a scansione ad ingrandimento 530X).



Ho messo a punto un protocollo, di seguito illustrato, per garantire le migliori condizioni per compiere analisi morfometriche e genetiche sullo stesso individuo, per evitare fratture o mescolamento delle appendici e, infine, per ridurre l'entità dell'errore di misura umano.

Ogni individuo era posto in un pozzetto di vetro dalla base piana (le cosiddette saliere), riempito con etanolo assoluto e osservato allo stereomicroscopio (Wild). Per mezzo di pinzette sterilizzate mediante flambatura, da ogni talitro prelevavo i pereiopodi P4 e P5 di destra e di sinistra e trasferivo queste appendici in provette eppendorf piene di etanolo assoluto per le successive analisi genetiche. Poi, per ciascun individuo, allestivo due vetrini portaoggetto, uno per le appendici di destra e uno per quelle di sinistra; sui lati corti di ogni vetrino riportavo le scritte "Capo" e "Telson" mentre sui lati lunghi scrivevo "Prossimale" e "Distale" in modo da avere quattro punti di riferimento che mi consentissero di posizionare correttamente i pereiopodi e ridurre il rischio di confonderli. Poi prelevavo dal talitro i pereiopodi P7, P6 e P3 di destra e li posizionavo sul vetrino portaoggetto di "Destra", dopo ripetevo la procedura per i pereiopodi di sinistra (Fig. 14).

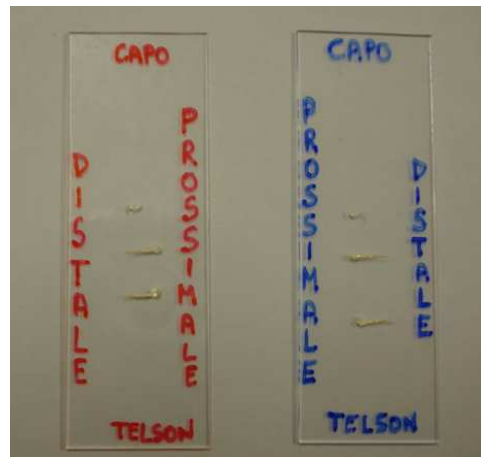


Fig. 14. Vetrini portaoggetto Sinistro (in rosso) e Destro (in blu) con i rispettivi pereiopodi P3, P6 e P7.

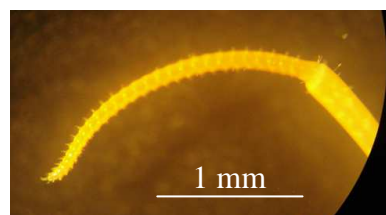


Fig. 15. Flagello dell'antenna seconda osservata allo stereomicroscopio ad ingrandimento 50X.

Utilizzando l'ingrandimento 50X, contavo il numero di articoli del flagello delle antenne seconde di destra e di sinistra (Fig. 15). Poi, usando le chiavi dicotomiche (Karaman, 1993; Ruffo, 1993), identificavo la specie cui apparteneva l'esemplare sotto osservazione. Tutti gli individui catturati erano *Talitrus saltator*, ad eccezione di due, entrambi provenienti dalla spiaggia di Bruca che, avendo gli uropodi terzi (U3) rotti, non potevano con certezza essere identificati come *Talitrus saltator*. Pertanto, il numero complessivo di talitri di Bruca da 50 si è ridotto a 48 individui.

Per ogni individuo, poi, determinavo il sesso di appartenenza. I maschi si riconoscono per la presenza di due peni che appaiono come sottili tubicini situati, l'uno di fronte all'altro, sulla faccia ventrale del talitro a livello del settimo mesosomite (Fig. 16).

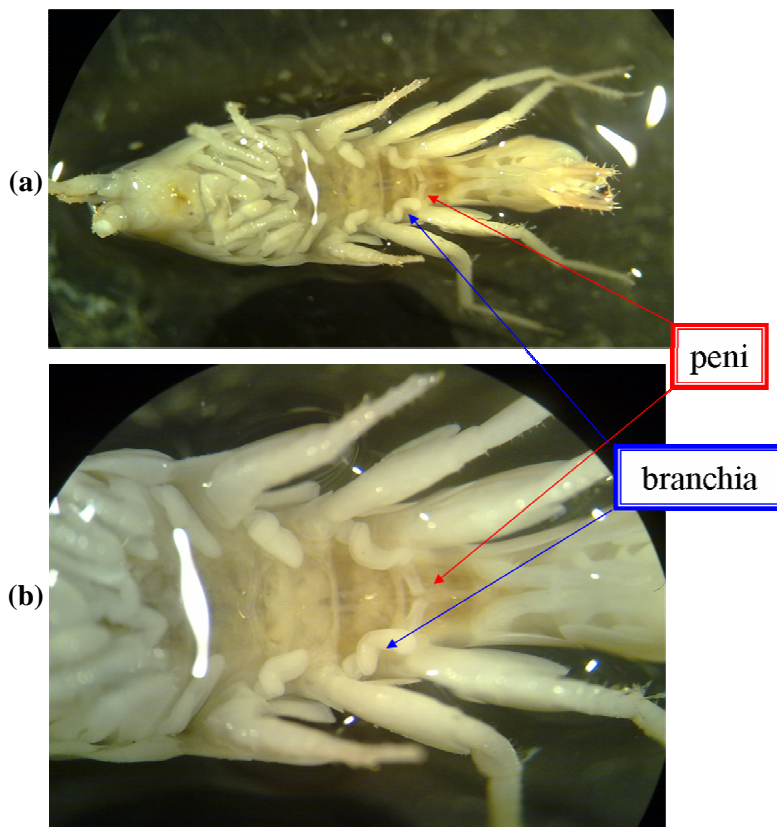


Fig. 16. Esemplare di maschio di *Talitrus saltator* osservato allo stereomicroscopio. Sono evidenziati i due peni e alcune branchie. (a) ingrandimento 12X; (b) ingrandimento 25X (foto del Dott. S. Gambineri).

Le femmine si riconoscono per la presenza di due file bilaterali di sottili lamine triangolari dette oostegiti, visibili sulla faccia ventrale dell'individuo dal secondo al quinto mesosomite. Si distinguono femmine mature e immature. Le femmine mature (Fig. 17) sono dotate di oostegiti sviluppati e, soprattutto, provvisti di setole che, allacciandosi con le controlaterali, permettono la formazione della sacca, detta marsupio, ove sono accolti le uova e, successivamente, i piccoli in via di sviluppo. In questi casi contavo il numero delle uova o dei piccoli. Le femmine immature (Fig. 18) si distinguono poiché hanno oostegiti piccoli e privi di setole.

Con un ingrandimento di 25X, staccavo la capsula cefalica e la sistemavo nel pozzetto di vetro in modo che mostrasse il suo lato destro (Fig. 19); poi misuravo la lunghezza dalla base dell'antenna prima fino all'estremità posteriore della capsula cefalica. Il resto del talitro e la capsula cefalica erano poi riposti nell'ependorf originaria. Dopo, ponendo, a turno, sotto lo stereomicroscopio, i vetrini portaoggetto di destra e di sinistra, disarticolavo i *meri* dai rispettivi pereopodi in modo da avere una localizzazione ancora più chiara dei punti di repere. I *meri* dei pereopodi P7 e P6 erano quindi disposti in modo da rivolgere allo stereomicroscopio la loro faccia interna, mentre i *meri* dei pereopodi P3 vi rivolgevano la loro faccia esterna. Per avere un maggior contrasto di luce, ponevo uno sfondo nero sotto il vetrino portaoggetto (Fig. 20).

Utilizzando l'ingrandimento 50X, eseguivo due misurazioni del lato posteriore dei *meri* dei pereopodi P7 e P6 e del lato anteriore dei *meri* dei pereopodi P3. Eseguivo le due misurazioni dello stesso *merus* nella stessa giornata con un intervallo di almeno tre ore fra loro e durante questo periodo di tempo analizzavo altri campioni in modo da non essere condizionato dai precedenti risultati. Le misure ottenute con lo stereomicroscopio erano convertite in micron tramite opportuni calcoli di conversione.

Ho personalmente eseguito tutti i campionamenti e le misurazioni in modo da ridurre l'errore dipendente da eventuali campionamenti selettivi e quello imputabile all'impiego di misuratori differenti.

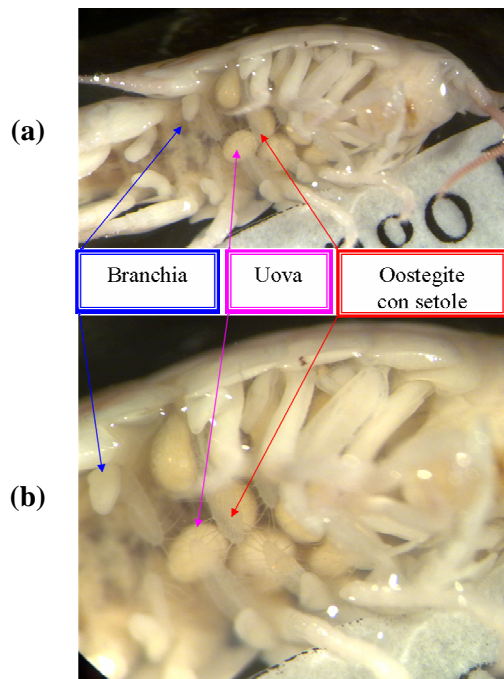


Fig. 17. Esemplare di femmina matura di *Talitrus saltator* osservata allo stereomicroscopio. Sono evidenziati alcuni oostegiti con setole, alcune branchie e uova. (a) ingrandimento 16X; (b) ingrandimento 32X (foto del Dott. S. Gambineri).

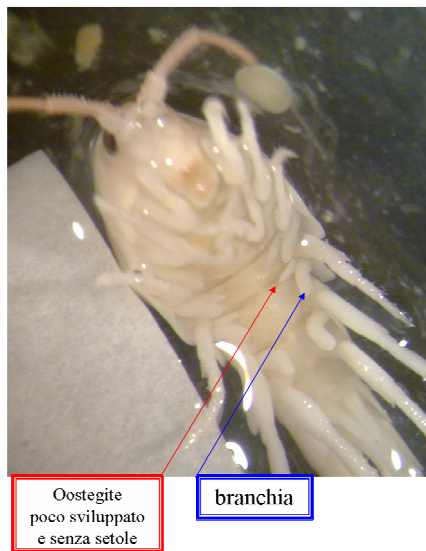


Fig. 18. Esemplare di femmina immatura di *Talitrus saltator* osservato allo stereomicroscopio. Sono evidenziati alcuni piccoli oostegiti e le branchie. Ingrandimento 16X (foto del Dott. S. Gambineri).

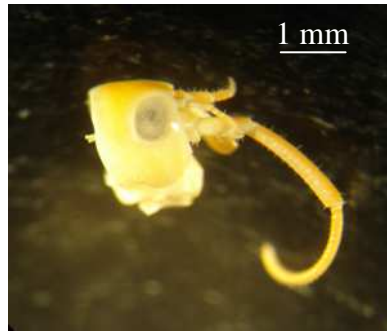
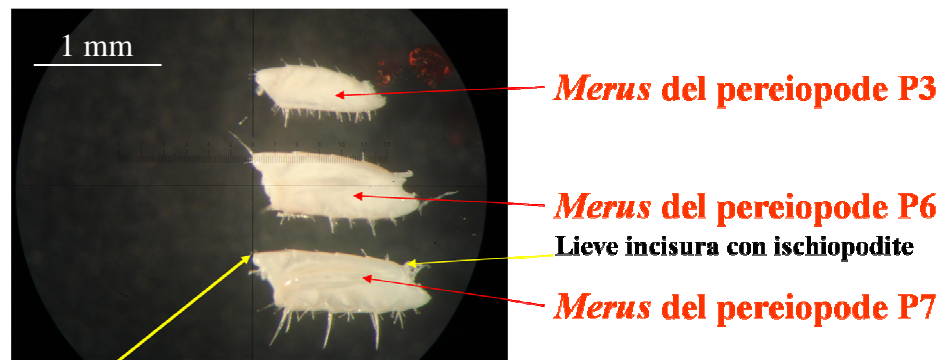


Fig. 19. Capsula cefalica di *Talitrus saltator* staccata dal resto del corpo, osservata allo stereomicroscopio ad ingrandimento 25X.



**Apice del ginocchio (esclusa la spina)**

Fig. 20. *Meri* di *Talitrus saltator* disarticolati dal resto dei rispettivi pereopodi di sinistra, osservati allo stereomicroscopio ad ingrandimento 50X.

### 3.4. Analisi Statistica

Per le analisi statistiche il livello di significatività utilizzato è stato del 5%.

Il  $\chi^2$  test è stato usato per valutare l'eventuale scostamento dall'atteso della *sex ratio* di ogni campione delle popolazioni in studio.

La procedura di analisi statistica dell'asimmetria fluttuante è stata realizzata prendendo spunto da Palmer & Strobeck (1986) e Palmer (1994) e usando Excel e S-Plus 6 per Windows.

Negli studi sull'asimmetria fluttuante, è importante escludere gli *outlier* dall'analisi statistica, in quanto sono una fonte comune di distribuzioni asimmetriche o di leptocurtosi. I valori delle differenze tra parte destra (R) e sinistra (L) di pochi individui (*outlier*), all'interno di un campione grande ed altrimenti distribuito normalmente, possono deviare dallo zero in modo

insolitamente rilevante. Pertanto, in primo luogo, escludevo quegli individui che mancavano di un'appendice da una parte del corpo e la possedevano dall'altra, oppure avevano un'appendice ridotta a un semplice abbozzo non misurabile da una parte del corpo e l'appendice controlaterale normale. Casi simili erano quelli di esemplari in cui, pur essendo presenti le appendici da sottoporre alle analisi morfometriche, si rilevavano delle fratture nei *meri* prima delle misurazioni con conseguente impossibilità di una corretta misura. Erano, infine, assimilabili a questi ultimi casi quelli di fratture conseguenti al tentativo di rilievo dei punti di repere che erano "incassati" nel segmento adiacente. Più precisamente, tutte queste tipologie di talitri erano designati NA (*Not Available*), cioè dato non disponibile. Negli NA, la mancanza di uno dei due dati di un carattere bilaterale avrebbe determinato dei valori molto alti della differenza tra parte destra (R) e sinistra (L) del corpo andando a influenzare pesantemente l'indice di asimmetria fluttuante.

I talitri rimasti dopo l'esclusione degli NA erano sottoposti alla ricerca, mediante *box plot*, degli *outlier*. Gli *outlier* sono individui che, per il loro essere *minus* o *plus* varianti, si collocano al di fuori della distribuzione gaussiana. Mediante la loro esclusione ottenevo distribuzioni dei dati che si avvicinavano il più possibile a quella normale, che è condizione basilare per l'applicazione dei test parametrici (*F*-test, *t*-test, ANOVA).

Per ciascuno dei caratteri esaminati eseguivo la ricerca degli *outlier* mediante i *box plot* sia considerando gli individui del campione nel loro complesso sia differenziandoli in base al sesso. Nel caso dei *meri*, inoltre, effettuavo l'analisi mediante *box plot* per ciascuna delle due misure effettuate. Se un talitro era un *outlier*, poniamo per il flagello antennale, lo scartavo dall'analisi statistica di tale carattere ma non da quella concernente gli altri. Un talitro che, in una qualsiasi delle analisi dei *meri*, era stato classificato come NA o era stato individuato come *outlier* per mezzo dei *box plot*, era eliminato dalla successiva analisi statistica di tutti i *meri* sia per comodità di analisi dei dati, sia per ragioni di prudenza statistica, sia per poter utilizzare un indice composito di asimmetria fluttuante (CFA, vedi dopo) che implicava per forza avere individui con tutti i *meri* integri. In genere, comunque, si trattava sempre degli stessi individui, nel senso che se un talitro era *outlier* per la prima misura quasi sempre lo era anche per la seconda, oppure se era *outlier* per il *merus* di destra, molto spesso lo era anche per quello di sinistra o, infine, se era *outlier* nell'analisi dei *meri* in generale, spesso lo era anche nell'analisi dei *meri* condotta differenziando per sesso.

L'esclusione degli NA e degli *outlier* si basa sulla considerazione che i loro valori estremi sono da imputare a severe deformità congenite oppure a incidenti verificatisi nel corso della vita e questi eventi non sono rumore nello sviluppo che è il fenomeno che voglio indagare (Palmer, 1994).

La media e l'errore standard (SE) delle misure della capsula cefalica o dei *meri* o del numero degli articoli dei flagelli delle antenne seconde sono stati calcolati escludendo gli NA e gli *outlier*. Negli istogrammi relativi alla

distribuzione dei valori di ciascuno dei caratteri in studio, gli *outlier* sono riportati in tratteggio.

Per i caratteri metrici, ho usato i test *F* e *t* per confrontare la prima e la seconda misura di ogni segmento. Allorché ho potuto escludere un significativo contributo dell'errore di misura, ho calcolato la media tra le due misure per le successive analisi statistiche. Per ciascun carattere ho diviso il campione in base al sesso per controllare l'eventuale presenza di dimorfismo sessuale. Quando non riscontravo dimorfismo sessuale, i dati di maschi e femmine erano cumulati per le successive analisi statistiche.

Per ogni carattere bilaterale ho verificato l'eventuale presenza di asimmetria direzionale mediante l'*one-sample t-test*. La normalità delle distribuzioni è stata controllata con tecniche grafiche.

Il livello di asimmetria fluttuante è stato calcolato mediante l'indice  $FA1 = \text{Media } |R - L|$  (Palmer, 1994), ossia la media del valore assoluto delle differenze tra parte destra (R) e sinistra (L) del corpo. Si tratta, probabilmente, dell'indice di asimmetria maggiormente utilizzato per la sua facilità di calcolo e di comprensione, raccomandato per campioni con  $n > 30$  e impiegato senza difficoltà nella procedura ANOVA di confronto fra tre o più campioni.

In abbinamento al suddetto indice di asimmetria fluttuante, seguendo i consigli di Palmer & Strobeck (1986) e di Møller & Swaddle (1997), ho applicato anche l'indice  $FA2 = \text{Media } (|R - L| / ((R + L)/2))$ . L'indice FA2 ha gli stessi pro e contro dell'indice FA1 tranne che, a differenza di quest'ultimo, non è influenzato da un'eventuale dipendenza dalla taglia della differenza in valore assoluto tra parte destra (R) e sinistra (L). Esso, infatti, opera una correzione, a livello individuale, per la taglia, in maniera tale da ridurre il rischio che il livello di asimmetria fluttuante sia condizionato dalla taglia e, quindi, attenuando il rischio di false positività.

Infine, per ulteriore controllo dell'andamento dei risultati, ho applicato l'indice  $FA5 = \Sigma (R - L)^2 / N$  che però, al pari dell'indice FA1, non opera nessuna correzione per la taglia.

Inoltre, seguendo le indicazioni di Leung *et al.* (2000), ho calcolato un indice composito di asimmetria fluttuante (CFA) per ciascun individuo *i* così definito:

$$CFA_i = \sum_{j=1}^k \frac{FA_{ij}}{\text{avg}FA_j}$$

dove  $FA = |R - L|$ ,  $\text{avg}FA_j$  è l'asimmetria fluttuante media per il carattere *j*, e *k* è il numero totale di caratteri considerati.

L'ANOVA a una via è stata utilizzata per confrontare le popolazioni per ciascun carattere e per il livello di asimmetria fluttuante.

## 4. RISULTATI

### 4.1. Densità nell'area di cattura e *sex ratio*

Le popolazioni campionate avevano differenti densità nell'area di cattura (individui/m<sup>2</sup>): Maganuco 2,9, Bruca 3,8, Collelungo 11,4 a ottobre 2008 e 6,8 ad aprile 2010, Damgan 5,5.

A Damgan, Maganuco e Collelungo April è stata osservata una lieve prevalenza delle femmine, ma la *sex ratio* non differisce significativamente dall'atteso 1:1. Invece a Collelungo October è significativamente sbilanciata verso le femmine (0,50,  $\chi^2$  -test:  $p < 0,05$ ), e a Bruca verso i maschi (2,69,  $\chi^2$  -test:  $p < 0,01$ ) (Tabella 3 e Fig. 21). I risultati circa la *sex ratio* di Collelungo October e Collelungo April sono in linea con precedenti studi di dinamica di questa popolazione condotti da Marques *et al.* (2003).

Tabella 3. *Sex ratio* dei campioni esaminati.

Popolazioni	Maganuco August	Bruca August	Collelungo October	Collelungo April	Damgan August
n	50	48	54	54	54
Maschi	19	35	18	21	25
Femmine	31	13	36	33	29
<i>Sex ratio</i> (M/F)	0,61	2,69	0,50	0,64	0,86
$\chi^2$ test	<i>n.s.</i>	$p < 0,01$	$p < 0,05$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>



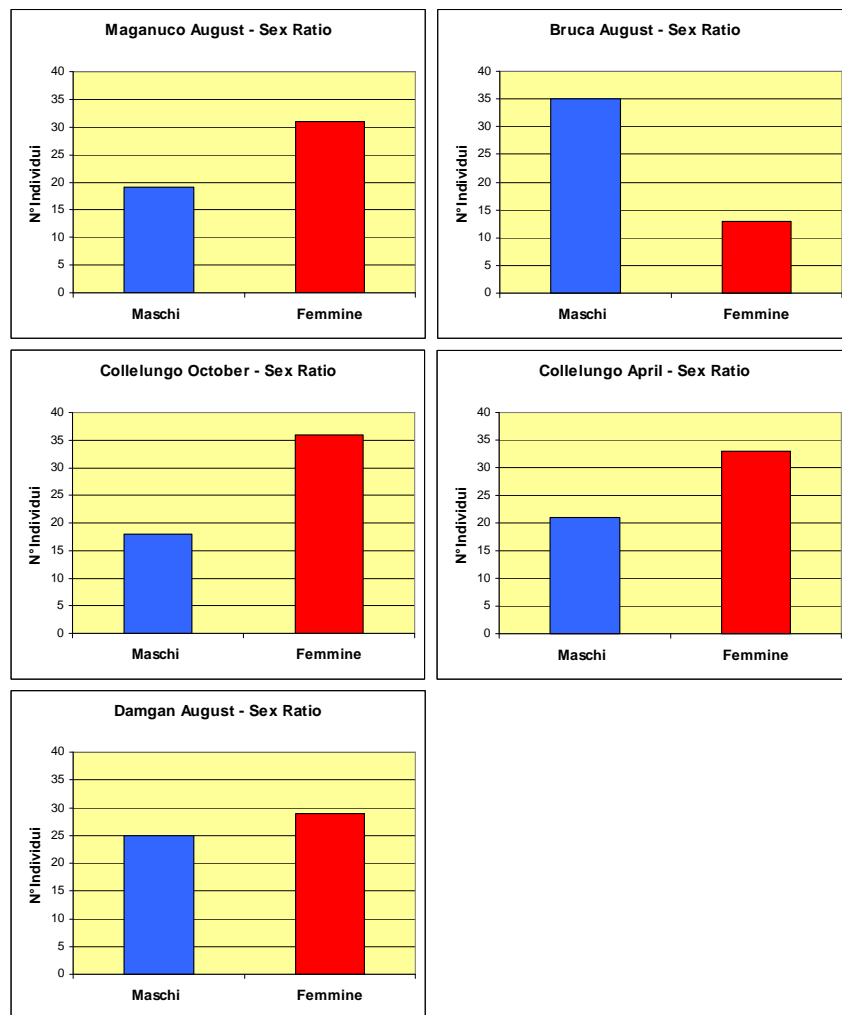


Fig. 21. Sex ratio nelle popolazioni saggiate.

#### 4.2. Analisi genetiche

L'estrazione del DNA dei talitri ha funzionato bene utilizzando l'insieme dei quattro pereopodi P5 e P4. Anche con i due soli pereopodi P6 oppure con i due P7 è possibile ottenere simili quantità di DNA giacché, in questi casi, si tratta di pereopodi più grandi rispetto ai P4 e P5. Come materiale per estrarre il DNA ho provato anche i quattro pereopodi P6 e P5 o cinque pereopodi (due P7, due P6 e un P5) ma, con queste ultime due fonti, ho riscontrato fenomeni di superamplificazione dipendenti da un'eccessiva quantità

di DNA dovuta all'impiego, in fase di estrazione, di troppe appendici peraltro di grandi dimensioni.

Ho poi realizzato l'amplificazione della regione Folmer del gene mitocondriale codificante per la subunità I della citocromo c ossidasi (COI) usando i *primer* LCO (*Reversal*) e HCO (*Forward*), ottimizzando il processo in termini di temperatura di *annealing* e quantità di reagenti per la PCR (Fig. 22); ho iniziato un analogo procedimento anche per il gene della proteina mitoribosomiale 16S.

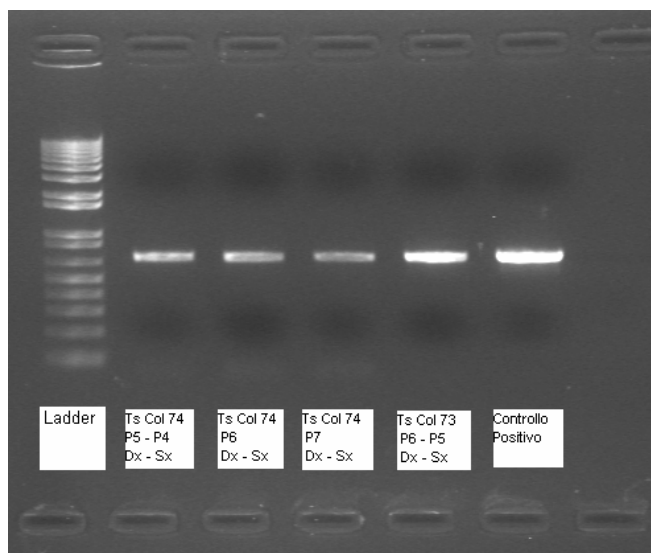


Fig. 22. Elettroforesi in gel d'agarosio di amplificato della regione Folmer del gene mitocondriale codificante per la COI di *Talitrus saltator* di Collelungo October. DNA estratto da coppie bilaterali di pereopodi (P5 e P4; P6; P7; P6 e P5).

Tuttavia, le analisi genetiche sui campioni delle popolazioni studiate non fanno parte di questa tesi ma saranno svolte in una fase successiva, una volta verificata l'applicabilità del confronto del livello di asimmetria fluttuante come bioindicatore degli impatti sugli ecosistemi delle spiagge sabbiose.

#### 4.3. Individui NA e outlier

La Tabella 4 riporta, per ogni popolazione, il numero di talitri esaminati e quelli effettivamente sottoposti alle successive analisi statistiche dopo l'esclusione degli NA e degli outlier.

La più alta percentuale d'individui NA e outlier per le antenne è stata rinvenuta a Maganuco August mentre per i *meri* dei pereopodi l'ho riscontrata nella popolazione di Collelungo October; infine, per la capsula cefalica, il

maggior numero di NA e *outlier* è stato riscontrato a Collelungo October e a Damgan August (Fig. 23).

Tra gli *outlier*, segnalo il caso di un 4% di individui del campione di Collelungo October che, in un lato del corpo, aveva i *meri* dei pereiopodi P6 più lunghi dei meri dei pereiopodi P7. Nel 9% degli esemplari della popolazione di Damgan, i *meri* erano molto fragili e già parzialmente o totalmente fratturati prima di poterli misurare oppure si sono fratturati nel tentativo di disarticularli dai segmenti adiacenti con cui manifestavano un attaccamento visco-elastico. Inoltre i *meri* apparivano rinsecchiti, schiacciati come se mancassero i muscoli interni, ripiegati su stessi, e i punti di reperi prossimali erano impossibili da rilevare in quanto apparivano stranamente erosi con mancanza dell'esoscheletro nell'area prossimale del segmento, soprattutto sulle facce utilizzate per il rilievo delle misure (interna sul P6 e P7 ed esterna sul P3), meno sulle facce opposte. Il fenomeno riguardava tutti i *meri* oggetto dell'analisi morfometrica e, anche per questo motivo, ho definito tale fenomeno sindrome mero-proximale, ipotizzando che la suddetta percentuale di talitri della Bretagna fosse affetta da una qualche patologia, forse gli effetti di un'infezione. In questi casi, inclusi tra gli NA, era evidentemente impossibile il rilievo delle misure tranne che negli individui in cui la sindrome era ancora agli esordi. Tuttavia, il fenomeno non riguardava solo i *meri* ma anche gli altri segmenti dei pereiopodi e, nel 4% dei casi, coinvolgeva anche la capsula cefalica che appariva sfrangiata, semifratturata, col punto di reperi prossimale non rilevabile e con i tessuti di struttura visco-elastica.

**Tabella 4. Numero di talitri esaminati e analizzati statisticamente per ciascun carattere dopo l'esclusione degli NA e degli *outlier*.**

Popolazioni	Talitri esaminati	Capsula cefalica	Numero di articoli del flagello dell'antenna seconda	<i>Meri</i> dei pereiopodi P7, P6 e P3
Maganuco August	50	49	41	43
Bruca August	48	48	43	46
Collelungo October	54	52	46	46
Collelungo April	54	54	51	48
Damgan August	54	52	53	48

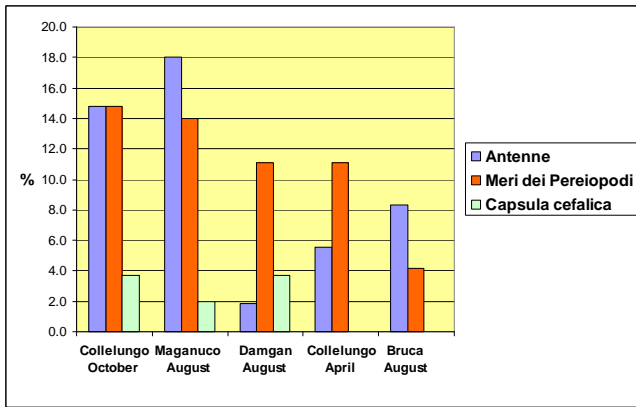


Fig. 23. Percentuali di NA e *outlier* per i caratteri misurati in ogni popolazione. NA = individuo con appendice mancante o non misurabile; *outlier* = individuo estraneo alla curva di normalità (metodo dei *box plot*).

#### 4.4. Capsula cefalica

Nella Fig. 24 sono riportati i *box plot* e gli istogrammi delle distribuzioni della lunghezza della capsula cefalica di ciascuna popolazione considerandola complessivamente, mentre nella Fig. 25 sono riportati quelli in cui gli individui di ciascuna popolazione sono stati suddivisi in base al sesso. Dato che in nessuna delle popolazioni esaminate è emersa alcuna differenza significativa tra femmine e maschi (Tabella 5), mi sono sentito legittimato a cumulare i dati dei due sessi per avere i dati complessivi sulla lunghezza media della capsula cefalica (Fig. 26).

I talitri di Damgan hanno dimensioni della capsula cefalica significativamente maggiori di quelle di tutte le altre popolazioni (ANOVA:  $p < 0,001$ ). I talitri di Collelungo April hanno dimensioni della capsula cefalica significativamente ( $p < 0,01$ ) maggiori dei talitri della stessa popolazione catturati a ottobre. Le due popolazioni siciliane hanno una capsula cefalica significativamente (ANOVA:  $p < 0,001$ ) più piccola delle altre popolazioni analizzate e non si differenziano fra loro per tale carattere.

Una preliminare osservazione dei dati mi aveva suggerito un'ulteriore analisi, ossia di suddividere il campione non solo in base al sesso ma anche in relazione alla tipologia di femmine, mature e immature. L'analisi delle capsule cefaliche condotta distinguendo maschi, femmine immature e femmine mature non ha evidenziato alcuna significativa differenza nelle popolazioni di Maganuco, Bruca, Collelungo October e Damgan (Fig. 27 a, b, c, d). Invece, nella popolazione di Collelungo April (Fig. 27 e) è emerso che le femmine mature hanno una capsula cefalica significativamente (ANOVA:  $p < 0,01$ ) più lunga non solo delle femmine immature ma anche dei maschi.

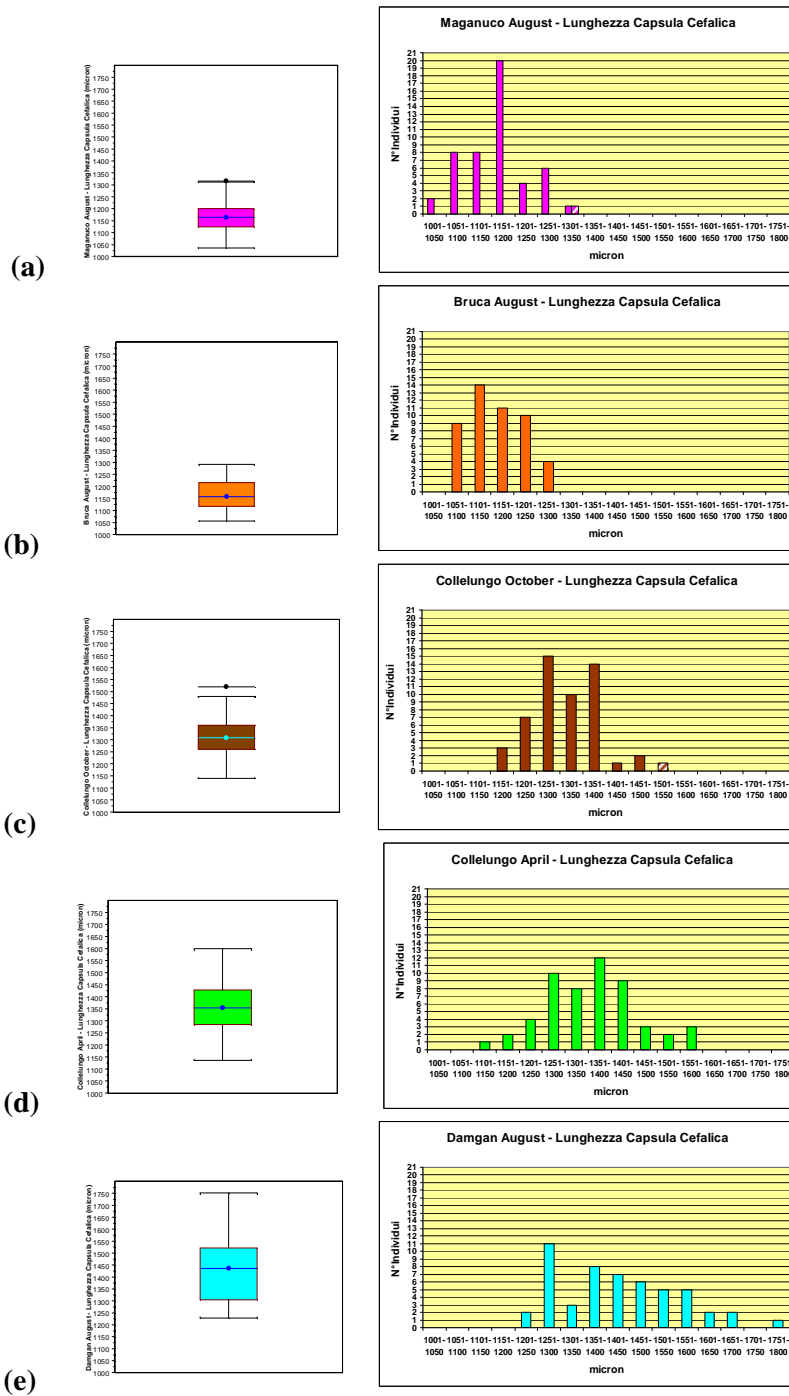


Fig. 24. *Box plot* e distribuzioni della lunghezza della capsula cefalica di a) Maganuco August; b) Bruca August; c) Collelungo October; d) Collelungo April; e) Damgan August. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

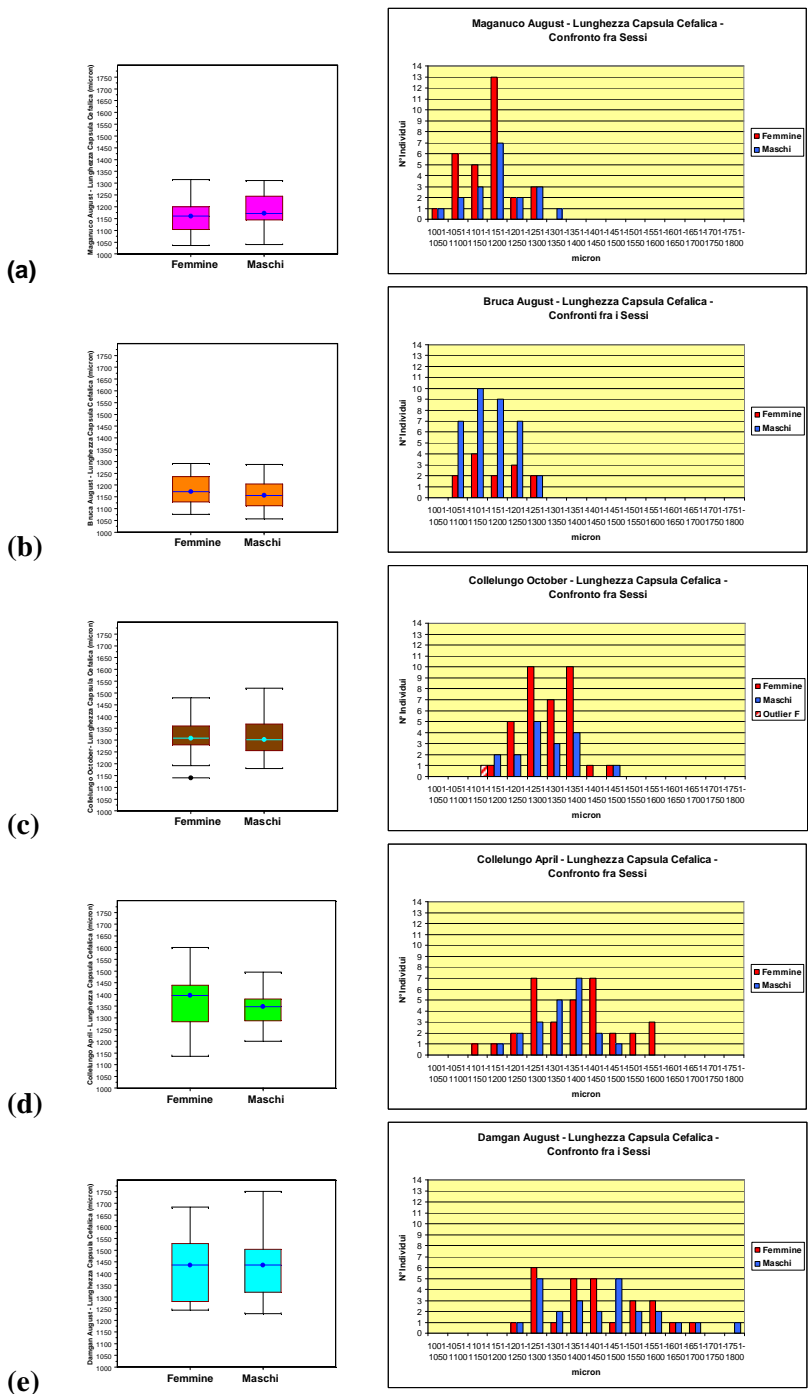


Fig. 25. Box plot e distribuzioni della lunghezza della capsula cefalica di femmine (in rosso) e maschi (in blu) di a) Maganuco August; b) Bruca August; c) Collelungo October; d) Collelungo April; e) Damgan August. In tratteggio sono indicati gli outlier.

**Tabella 5. Lunghezza media  $\pm$  SE della capsula cefalica ( $\mu\text{m}$ ): confronti fra sessi con *F*-test e *t*-test.**

Popolazioni	Maganuco August	Bruca August	Collelungo October	Collelungo April	Damgan August
Femmine: Media $\pm$ SE	1160,00 $\pm$ 11,05	1178,46 $\pm$ 19,47	1314,86 $\pm$ 10,36	1373,94 $\pm$ 19,75	1420,30 $\pm$ 24,12
Maschi: Media $\pm$ SE	1181,47 $\pm$ 17,40	1157,94 $\pm$ 10,56	1302,35 $\pm$ 19,07	1336,95 $\pm$ 16,17	1436,32 $\pm$ 27,33
<i>F</i> -test	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$p < 0,05$	<i>n.s.</i>
<i>t</i> -test	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

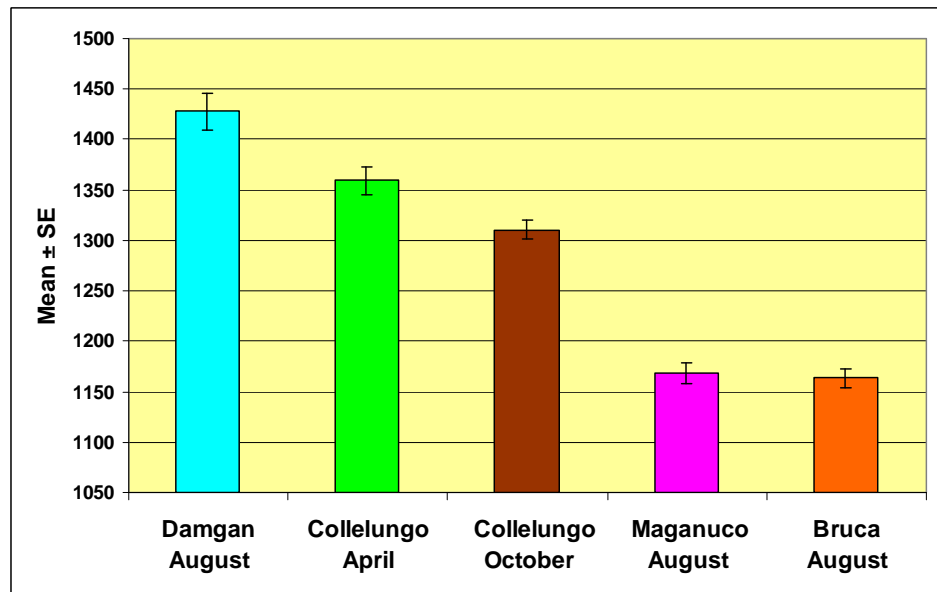


Fig. 26. Lunghezza media  $\pm$  SE ( $\mu\text{m}$ ) della capsula cefalica nelle popolazioni studiate (ANOVA:  $p < 0,001$ ).

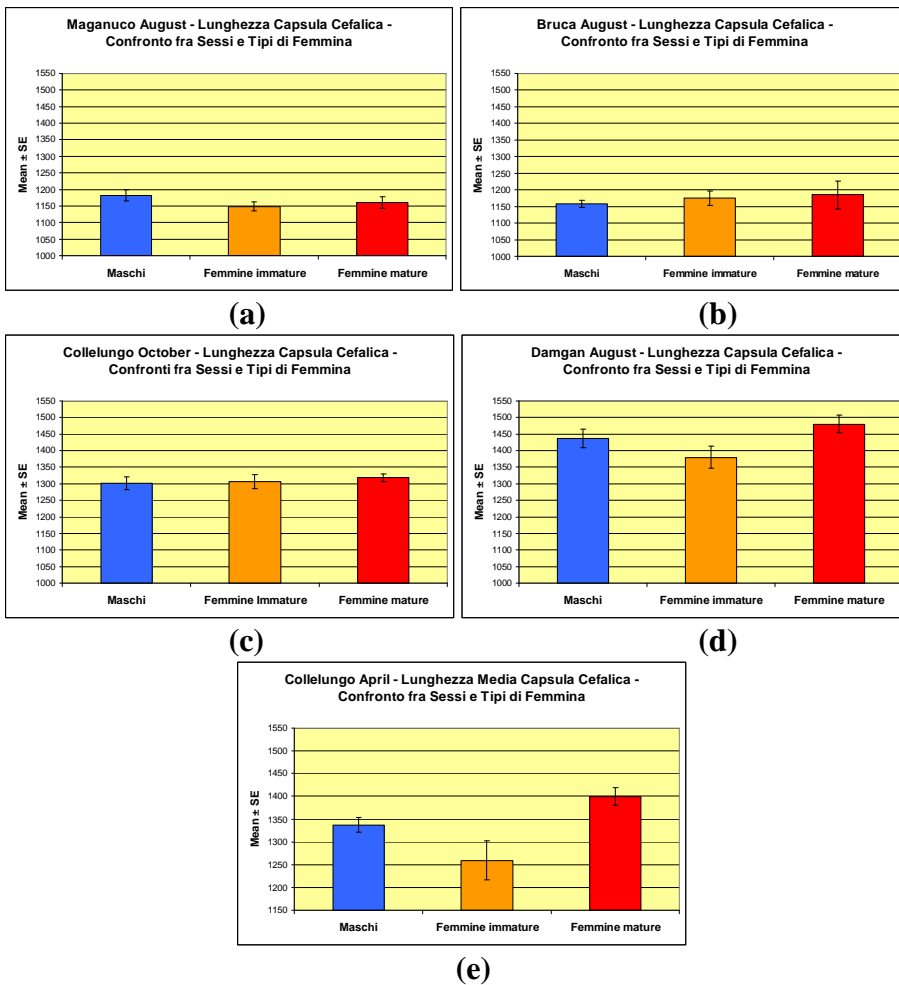


Fig. 27. Lunghezza media  $\pm$  SE ( $\mu\text{m}$ ) della capsula cefalica in a) Maganuco August; b) Bruca August; c) Collelungo October; d) Damgan August; e) Collelungo April.

#### 4.5. Flagello delle antenne seconde

Nelle Figg. 28 e 29 sono riportati i *box plot* e gli istogrammi delle distribuzioni delle frequenze del numero degli articoli del flagello delle antenne seconde. Un primo sguardo alle distribuzioni ha subito fatto sorgere, in tutte le popolazioni, il sospetto di una bimodalità. Pertanto, anche alla luce dei dati in letteratura (Ruffo, 1993), per tale carattere ho considerato separatamente femmine e maschi ottenendo così, per ciascun sesso, delle distribuzioni normali. In tutte le popolazioni c'è stata la conferma di un dimorfismo sessuale, con i maschi che hanno un numero di articoli del flagello delle antenne seconde significativamente maggiore delle femmine, sia nell'antenna destra sia in quella



sinistra ( $t$ -test:  $p < 0,001$ ) (Tabella 6). Quindi, per questo carattere non ho potuto cumulare i dati di maschi e femmine e ho condotto un'analisi separata.

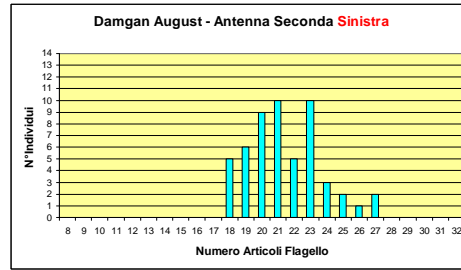
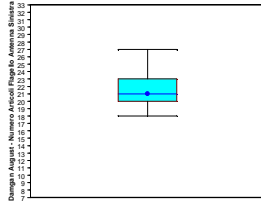
Il dimorfismo sessuale si è manifestato in tutte le popolazioni, anche se è apparso in una misura più o meno marcata (Fig. 30 per l'antenna sinistra e Fig. 31 per l'antenna destra). Nel caso della popolazione di Damgan August (Figg. 30 a, 31 a) si osserva che i dati di femmine e maschi, sia a sinistra sia a destra, sono ancora parzialmente sovrapposti mentre lo sono di meno nelle popolazioni di Collelungo October (Figg. 30 b, 31 b), Maganuco August (Figg. 30 c, 31 c) e Bruca August (Figg. 30 d, 31 d). Infine, nella popolazione di Collelungo April (Figg. 30 e, 31 e) femmine e maschi appaiono come due gruppi nettamente distinti. La Fig. 32, che riassume i dati relativi al numero medio di articoli del flagello delle antenne seconde nelle femmine e nei maschi di ciascuna popolazione, evidenzia il dimorfismo sessuale e in essa si osserva che la maggiore differenza tra maschi e femmine si verifica, sia nell'antenna sinistra sia in quella destra, nella popolazione di Collelungo April.

Confrontando il numero medio di articoli nelle popolazioni saggiate, si osserva che sia le femmine sia i maschi di Damgan August hanno un numero di articoli del flagello delle antenne seconde, sia a sinistra sia a destra, significativamente (ANOVA:  $p < 0,001$ ) minore rispetto alle altre popolazioni (Fig. 33).

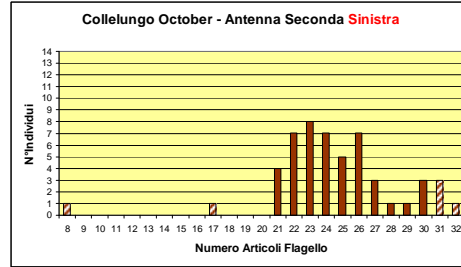
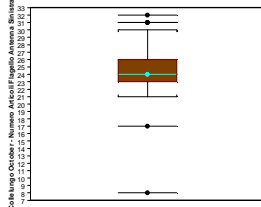
Oltre a ribadire il dimorfismo sessuale del numero degli articoli del flagello delle antenne seconde, la Fig. 32, consente, in prima approssimazione, di effettuare, all'interno dello stesso sesso di ogni popolazione, dei confronti tra la media degli articoli dei flagelli delle antenne di sinistra e di destra. In generale, si osserva, sia nei maschi sia nelle femmine, una media simile, ossia una generale simmetria bilaterale. Tuttavia, nella popolazione di Collelungo October la media dell'antenna destra, soprattutto nei maschi ma anche nelle femmine, appare maggiore di quella dell'antenna sinistra. Pertanto, allo scopo di verificare un'eventuale presenza di asimmetria direzionale, per ogni sesso ho elaborato i grafici delle distribuzioni delle differenze tra antenna destra (R) e sinistra (L) per il numero di articoli del flagello (Fig. 34) e poi applicato l'*one-sample t*-test. Le differenze R-L hanno una distribuzione normale e una media non significativamente diversa dallo zero in tutte le popolazioni saggiate tranne, come accennato prima, per Collelungo October in cui, sia nelle femmine sia nei maschi, la media è significativamente ( $p < 0,05$ ) maggiore di zero ossia esiste un'asimmetria direzionale destra per le antenne (Fig. 35).

Il livello di asimmetria fluttuante delle altre popolazioni è stato calcolato mediante l'indice  $FA1 = \text{Media } |R - L|$ . Ho confrontato il livello di asimmetria fluttuante del numero di articoli del flagello delle antenne seconde con l'ANOVA a una via e non è emersa alcuna differenza significativa tra le popolazioni campionate (Fig. 36).

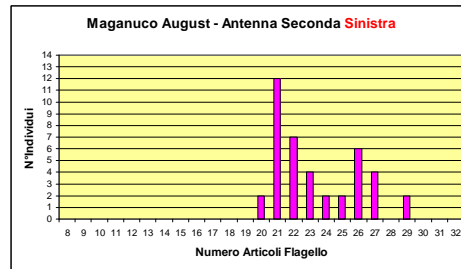
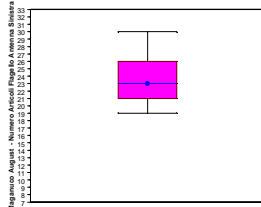
(a)



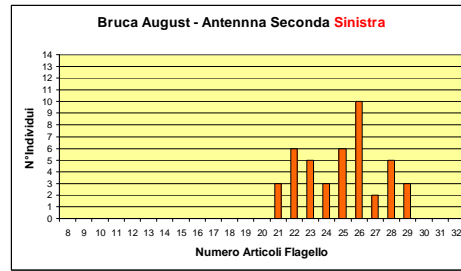
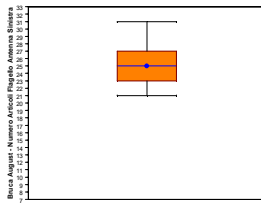
(b)



(c)



(d)



(e)

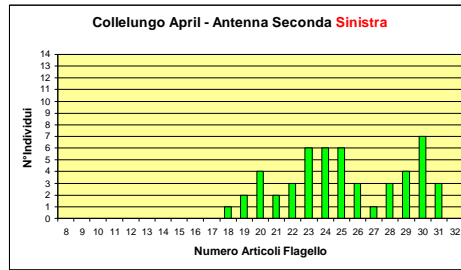
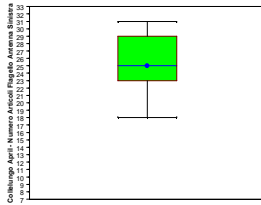


Fig. 28. *Box plot* e distribuzioni del numero di articoli del flagello dell'antenna seconda **sinistra** nelle popolazioni di a) Damgan August; b) Collelungo October; c) Maganuco August; d) Bruca August; e) Collelungo April. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

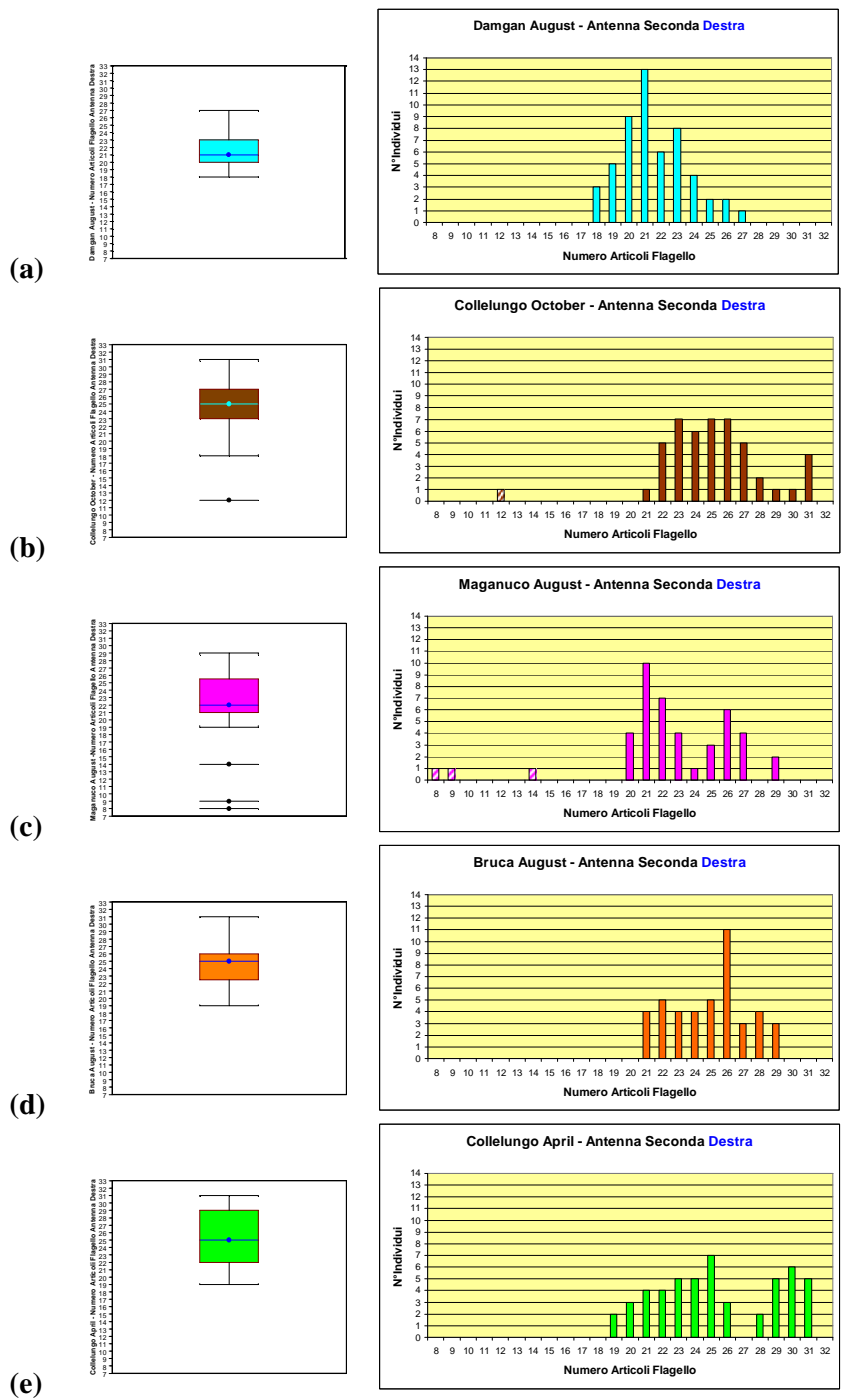


Fig. 29. *Box plot* e distribuzioni del numero di articoli del flagello dell'antenna seconda **destra** nelle popolazioni di a) Damgan August; b) Collelungo October; c) Maganuco August; d) Bruca August; e) Collelungo April. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

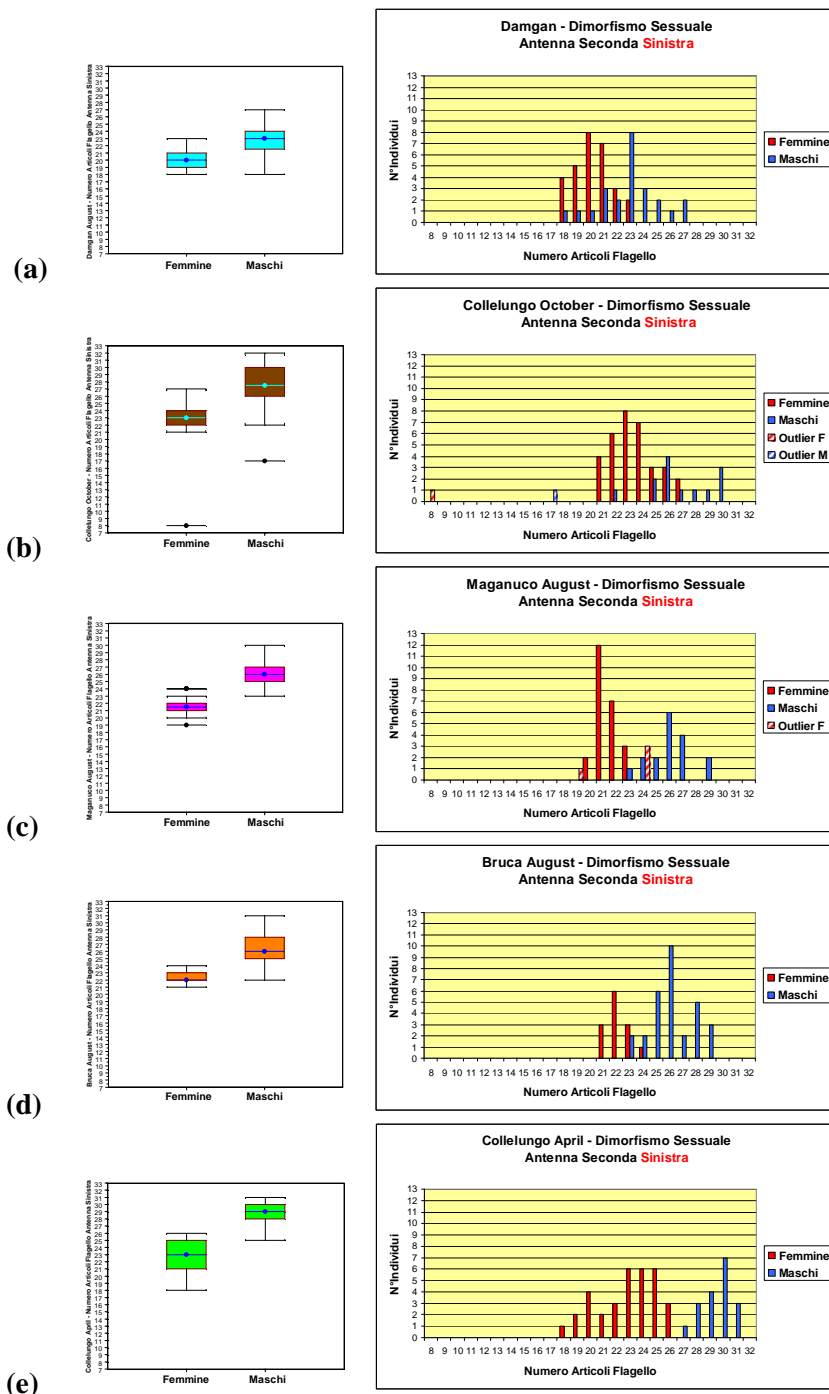


Fig. 30. Dimorfismo sessuale del numero di articoli del flagello dell'antenna seconda **sinistra** nelle popolazioni di a) Damgan August; b) Collelungo October; c) Maganuco August; d) Bruca August; e) Collelungo April. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

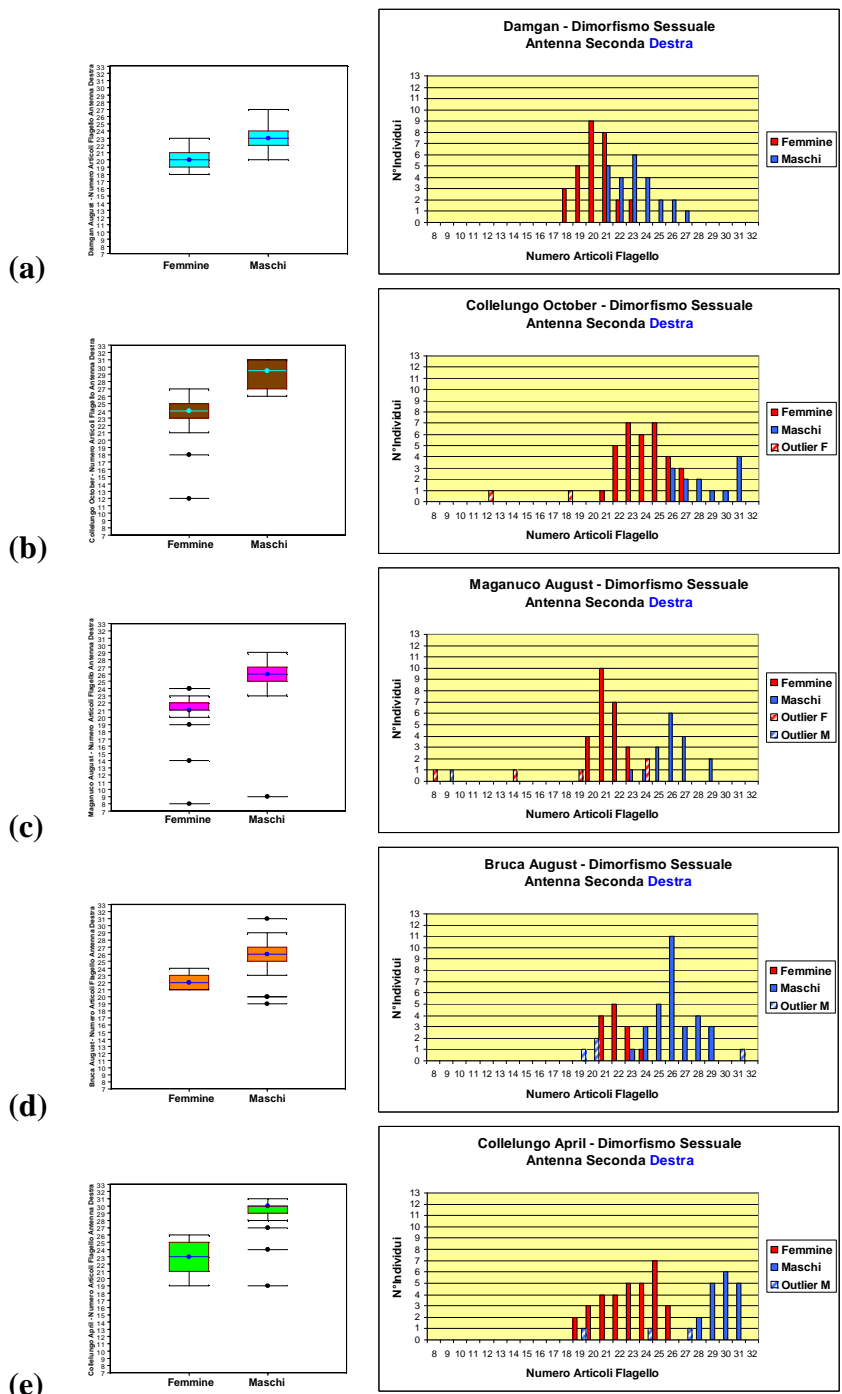


Fig. 31. Dimorfismo sessuale del numero di articoli del flagello dell'antenna seconda **destra** nelle popolazioni di a) Damgan August; b) Collelungo October; c) Maganuco August; d) Bruca August; e) Collelungo April. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

**Tabella 6. Numero di articoli del flagello delle antenne seconde: confronti fra femmine e maschi con *F*-test e *t*-test.**

Popolazione		Antenna	Femmine	Maschi	<i>F</i> -test	<i>t</i> -test
Collelungo April	n		33	18		
Collelungo April	Media ± SE	Sinistra	22,8 ± 0,4	29,4 ± 0,3	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,001
Collelungo April	Media ± SE	Destra	23,0 ± 0,4	29,8 ± 0,2	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,001
Collelungo October	n		33	13		
Collelungo October	Media ± SE	Sinistra	23,5 ± 0,3	26,9 ± 0,7	<i>n.s.</i>	<i>p</i> < 0,001
Collelungo October	Media ± SE	Destra	24,1 ± 0,3	28,5 ± 0,6	<i>n.s.</i>	<i>p</i> < 0,001
Bruca August	n		13	30		
Bruca August	Media ± SE	Sinistra	22,2 ± 0,2	26,2 ± 0,3	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> < 0,001
Bruca August	Media ± SE	Destra	22,1 ± 0,3	26,2 ± 0,3	<i>n.s.</i>	<i>p</i> < 0,001
Maganuco August	n		24	17		
Maganuco August	Media ± SE	Sinistra	21,5 ± 0,2	26,1 ± 0,4	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> < 0,001
Maganuco August	Media ± SE	Destra	21,4 ± 0,2	26,1 ± 0,4	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> < 0,001
Damgan August	n		29	24		
Damgan August	Media ± SE	Sinistra	20,2 ± 0,3	22,9 ± 0,5	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> < 0,001
Damgan August	Media ± SE	Destra	20,2 ± 0,2	23,2 ± 0,4	<i>n.s.</i>	<i>p</i> < 0,001

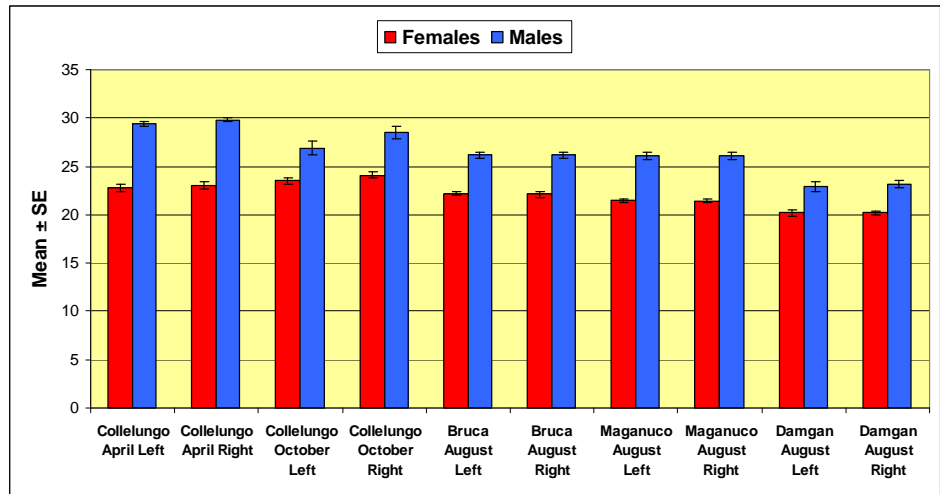


Fig. 32. Dimorfismo sessuale: numero medio  $\pm$  SE di articoli del flagello delle antenne seconde di sinistra e di destra in ciascuna popolazione esaminata. In rosso sono riportate le femmine, in blu i maschi. ( $t$ -test:  $p < 0,001$ ).

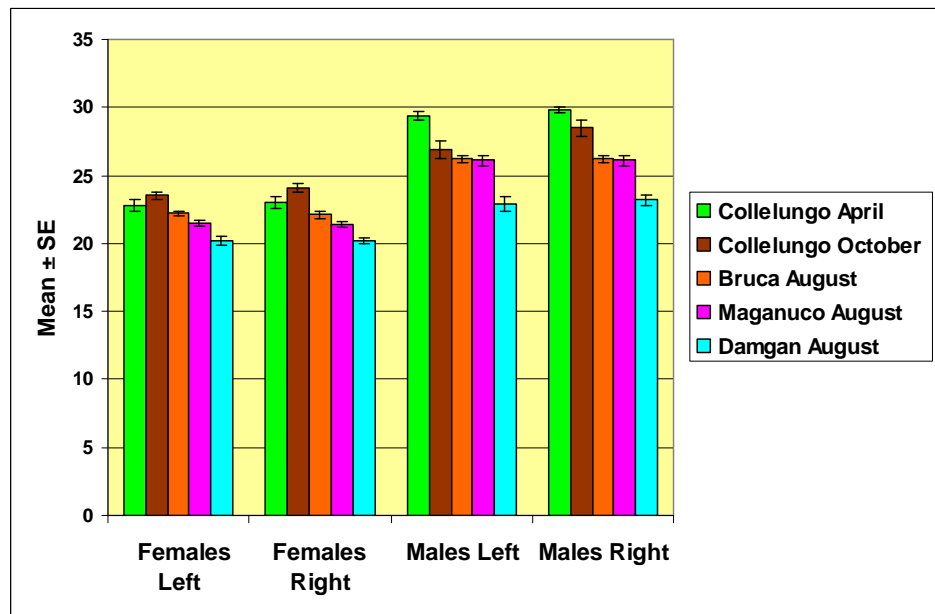


Fig. 33. Numero medio  $\pm$  SE di articoli del flagello delle antenne seconde nelle popolazioni analizzate (ANOVA:  $p < 0,001$ ).

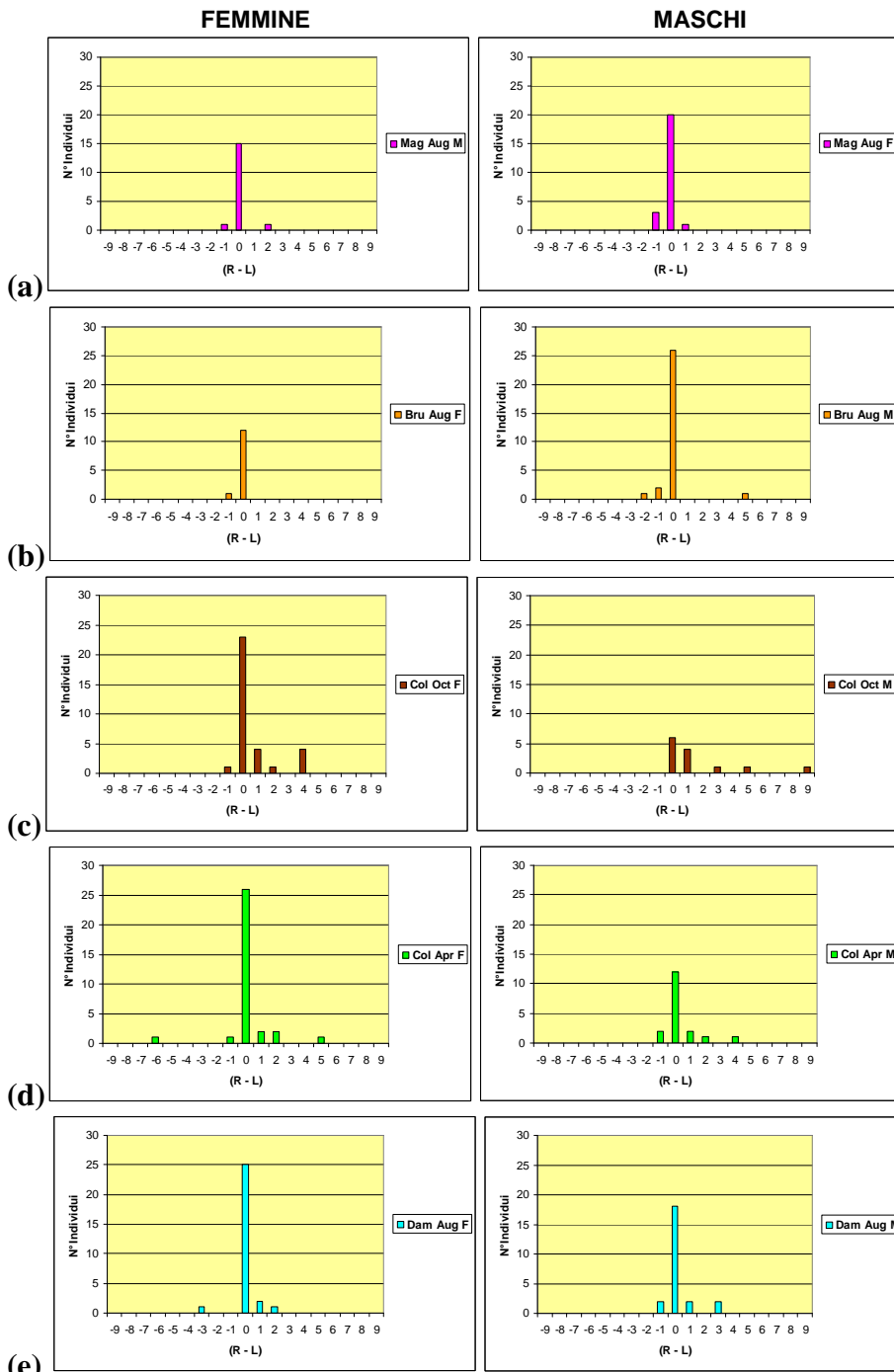


Fig. 34. Distribuzioni dei valori delle differenze (R – L) fra il numero di articoli dei flagelli dell'antenna destra (R) e sinistra (L) nei due sessi in a) Maganuco August; b) Bruca August; c) Collelungo October; d) Collelungo April; e) Damgan August.



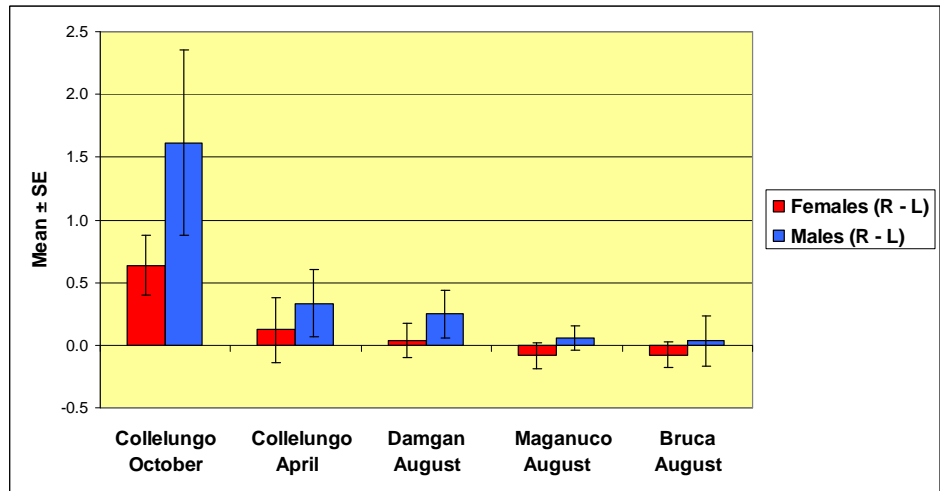


Fig. 35. Medie ( $\pm$ SE) delle differenze (R - L) fra il numero degli articoli dei flagelli delle antenne seconde destra (R) e sinistra (L) nelle femmine (in rosso) e nei maschi (in blu) nelle popolazioni analizzate.

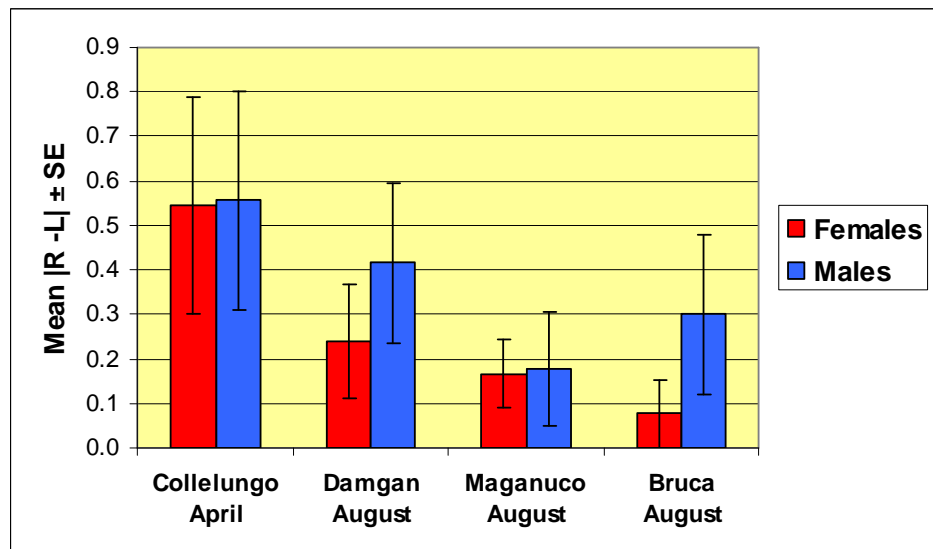


Fig. 36. Valori medi ( $\pm$ SE) di asimmetria fluttuante (calcolati con l'indice FA1 = Media  $|R - L|$ ) del numero di articoli del flagello delle antenne seconde nelle femmine (in rosso) e nei maschi (in blu).

#### 4.6. Meri dei pereiopodi

Nelle Figure 37 – 46 sono riportati i *box plot* e gli istogrammi delle distribuzioni della lunghezza dei *meri* dei pereiopodi P7, P6 e P3 di sinistra e di destra per la prima e seconda misura di ciascuna popolazione considerandola complessivamente, mentre nelle Figure 47 – 56 sono riportati i *box plot* e gli istogrammi in cui gli individui di ciascuna popolazione sono stati suddivisi in base al sesso.

Non ho mai rinvenuto differenze significative tra la prima e la seconda misura in tutte le popolazioni e in tutti i *meri*, sia a sinistra sia a destra, sia considerando gli individui complessivamente, sia all'interno di ogni sesso. Pertanto, avendo escluso un significativo contributo dell'errore di misura, per ciascun segmento ho calcolato la media tra la prima e la seconda misura per le successive analisi statistiche.

Nella Tabella 7 sono riportati le lunghezze medie ( $\pm$ SE) dei *meri* dei pereiopodi P7, P6, P3, di sinistra e di destra, nelle femmine e nei maschi di ciascuna popolazione e gli esiti dei test di confronto. Per ciascun *merus* non c'è mai una significativa differenza tra femmine e maschi nelle popolazioni di Damgan, Collelungo October e Bruca. Nella popolazione di Maganuco è emersa significatività ( $p < 0,05$ ) dell'*F*-test nel confronto fra maschi e femmine per i *meri* dei pereiopodi P3 di sinistra, ma il *t*-test, come in tutti gli altri precedenti confronti, non è risultato significativo. Pertanto, per queste popolazioni, ho cumulato i dati di maschi e femmine. Invece nella popolazione di Collelungo April, i maschi hanno i *meri* dei pereiopodi P7 e P3, sia a sinistra sia a destra, significativamente ( $p < 0,05$ ) più lunghi delle femmine; l'andamento delle medie è analogo per il P6, ma non c'è differenza statisticamente significativa.

Con l'ANOVA a una via, ho confrontato la lunghezza media dei *meri* di ciascun pereiope nelle cinque popolazioni ed è emersa una significativa differenza (ANOVA:  $p < 0,001$ ). I talitri di Collelungo April, sia i maschi sia le femmine, hanno i *meri* dei pereiopodi P7 e P6, sia a destra sia a sinistra, più lunghi di quelli delle altre popolazioni mentre i talitri di Maganuco sono quelli con i *meri* più corti. Si osserva che i talitri di Damgan hanno i *meri* dei pereiopodi P3, sia a destra sia a sinistra, significativamente più lunghi di quelli delle altre popolazioni ( $p < 0,001$ ) (Fig. 57 e Tabella 8).

Per verificare l'eventuale presenza di asimmetria direzionale, ho elaborato i grafici delle distribuzioni delle differenze delle lunghezze dei *meri* di destra (R) e di sinistra (L) e poi applicato l'*one-sample t*-test. Per la popolazione di Collelungo April ho tenuto separati femmine e maschi; tuttavia, le distribuzioni delle differenze erano normali e le medie non si discostavano significativamente dallo zero (Fig. 58), per cui, almeno per questo carattere, mi sono sentito legittimato a cumulare maschi e femmine. A Maganuco, Bruca, Collelungo October e Collelungo April (considerando insieme maschi e femmine) le distribuzioni erano normali e avevano medie che non si

discostavano significativamente dallo zero per tutti i pereiopodi e, quindi, ho escluso la presenza di asimmetria direzionale (Fig. 59). Invece, i talitri di Damgan, come si vede meglio nella Fig. 60, al pari delle altre popolazioni, non hanno manifestato asimmetria direzionale nei *meri* dei pereiopodi P7 e P6, ma hanno mostrato un'asimmetria direzionale destra nei *meri* dei pereiopodi P3 (*one-sample t-test*:  $p < 0,05$ ). I grafici mostravano normalità, per cui ho scartato l'antisimmetria.

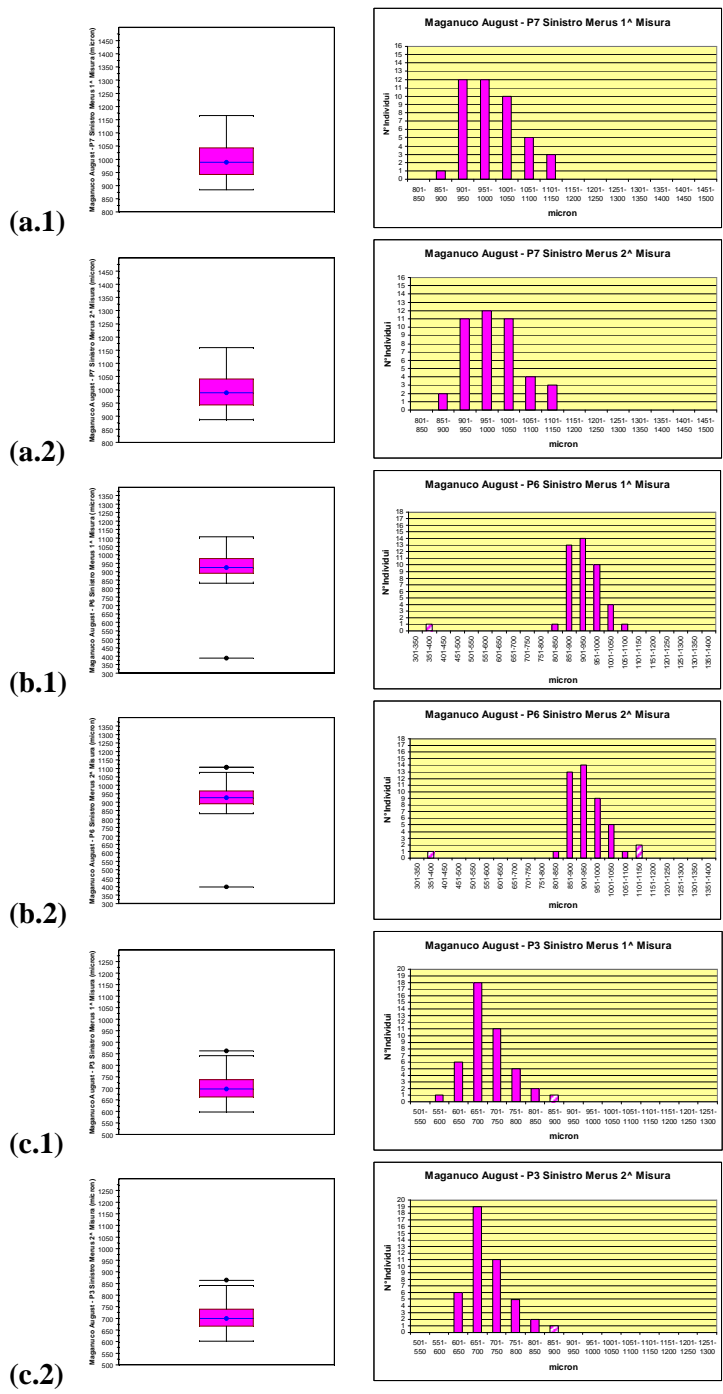


Fig. 37. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **sinistra** nella popolazione di **Maganuco August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

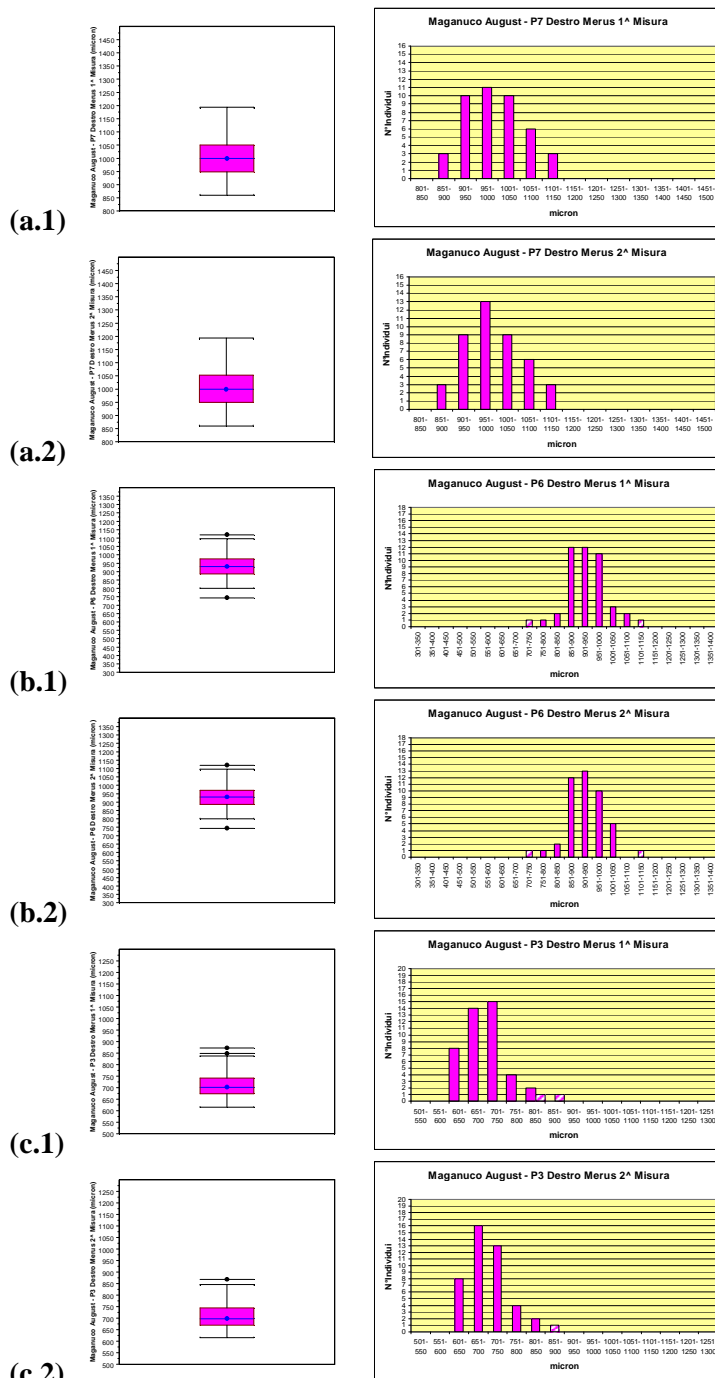


Fig. 38. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **destra** nella popolazione di **Maganuco August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

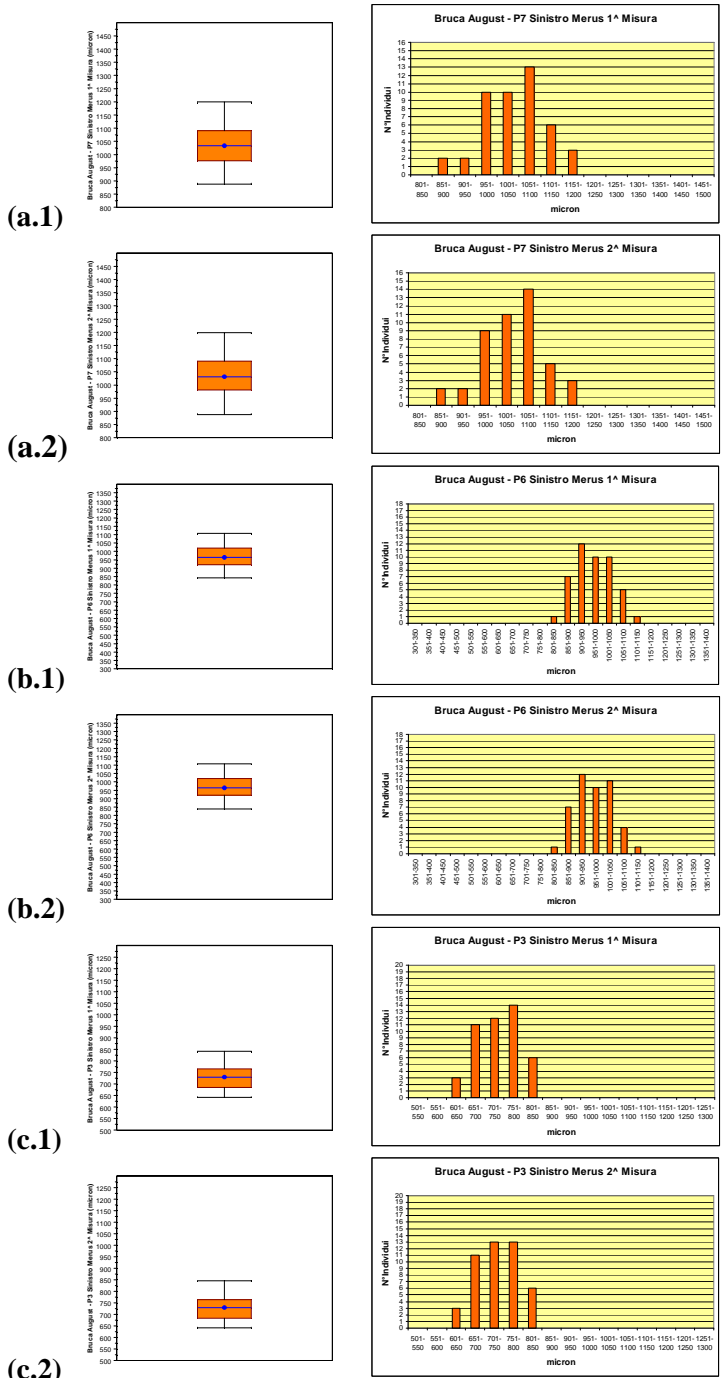


Fig. 39. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereopodi di **sinistra** nella popolazione di **Bruca August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura.

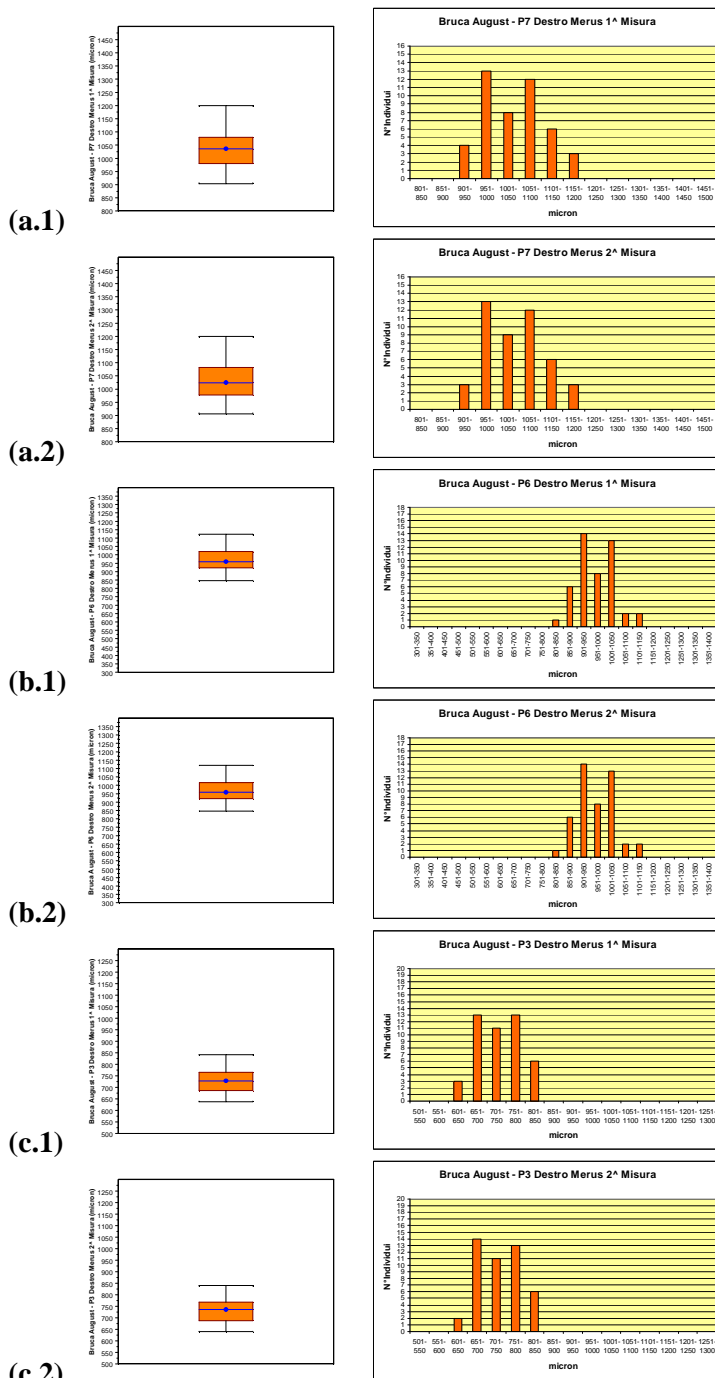


Fig. 40. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **destra** nella popolazione di **Bruca August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura.

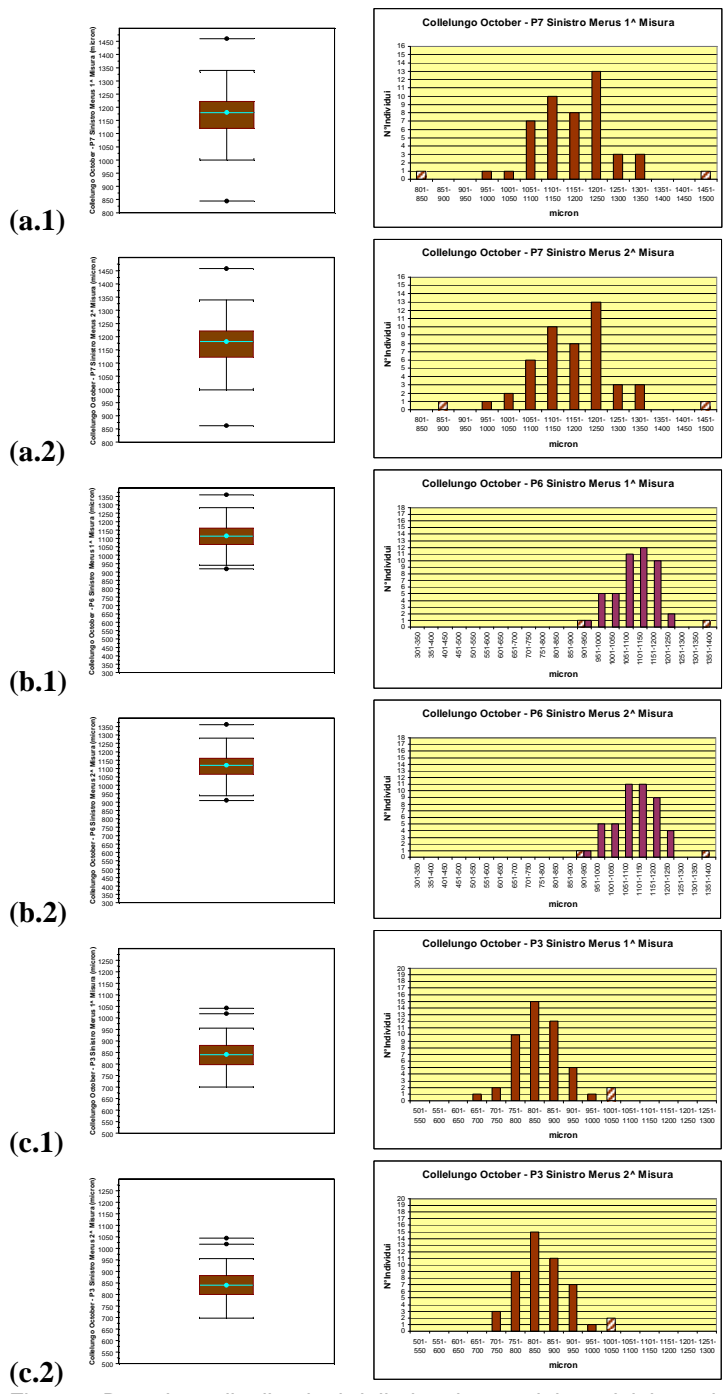


Fig. 41. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **sinistra** nella popolazione di **Collelungo October**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.



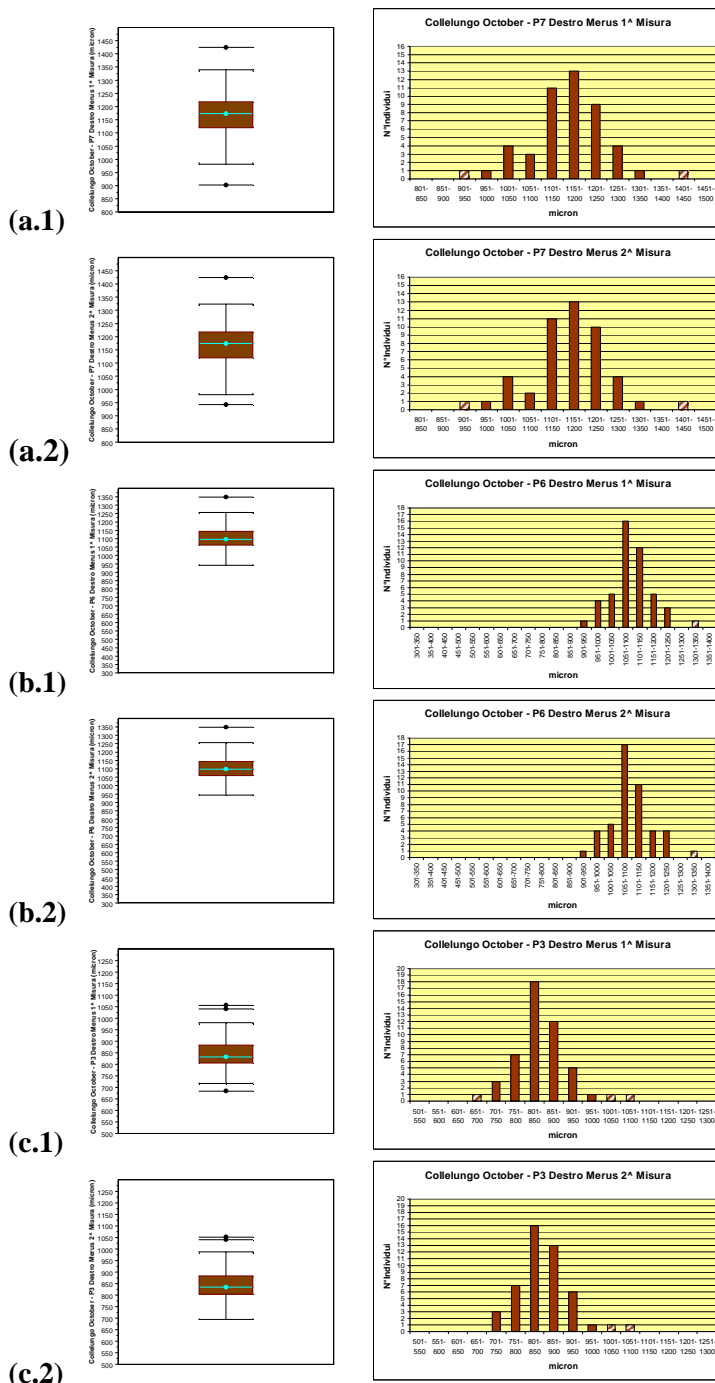


Fig. 42. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **destra** nella popolazione di **Collelungo October**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

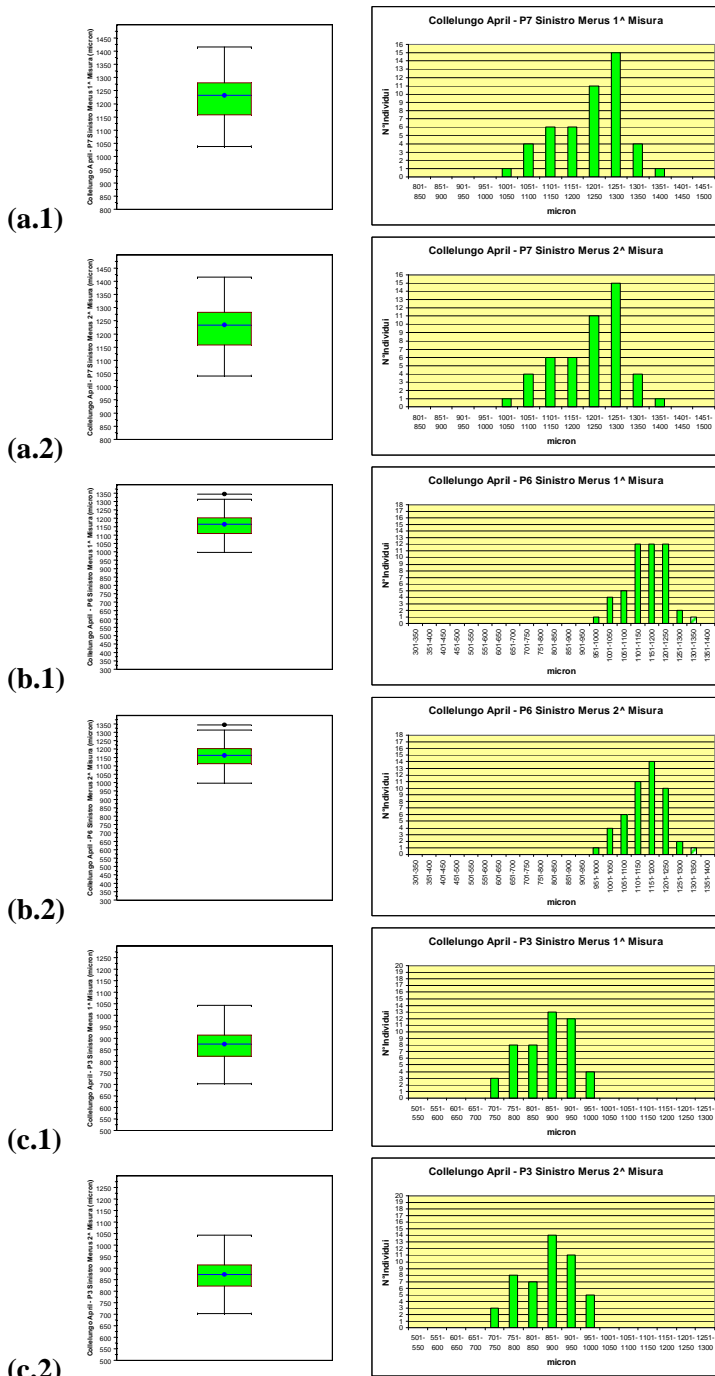


Fig. 43. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **sinistra** nella popolazione di **Collelungo April**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

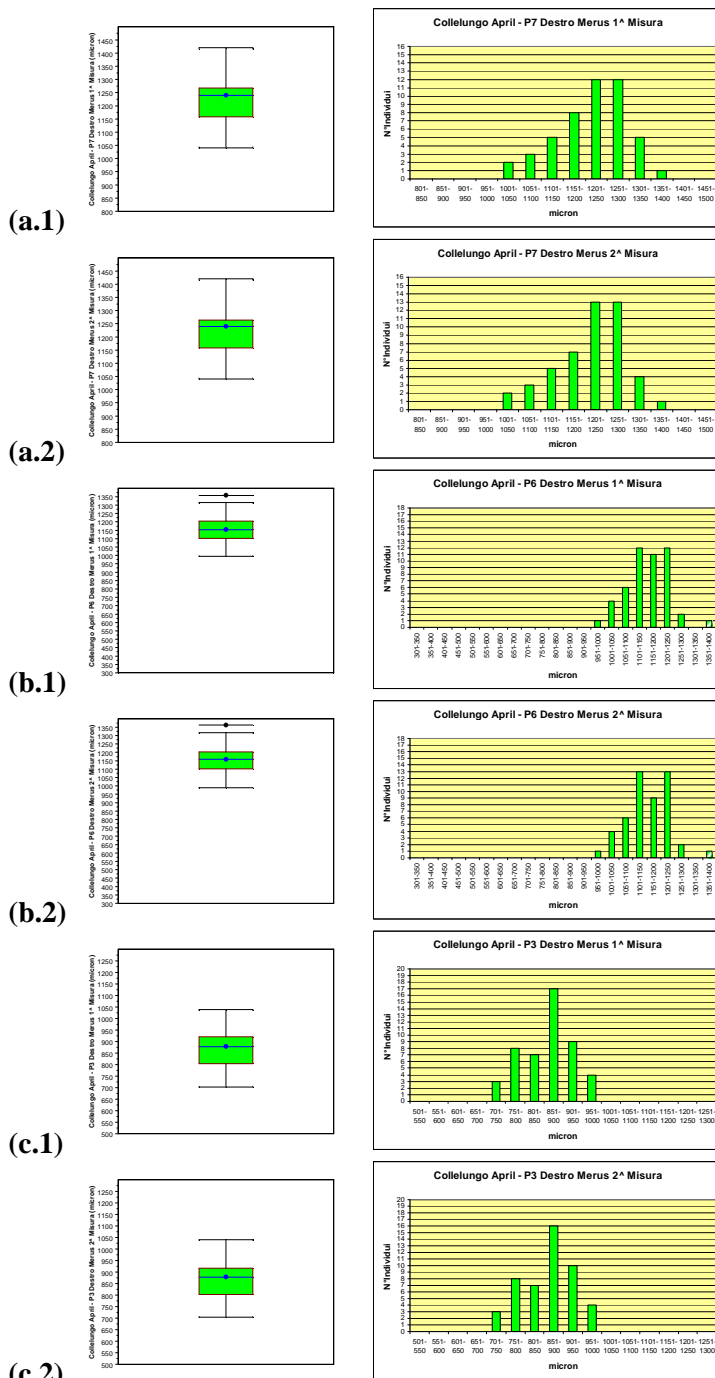
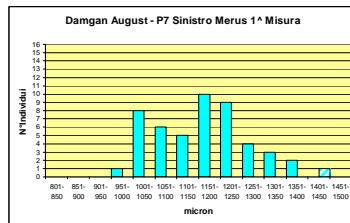
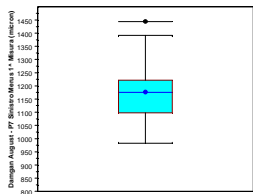
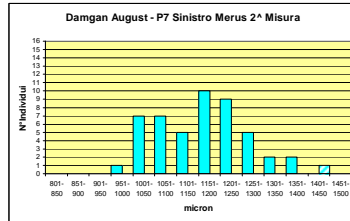
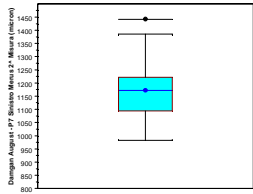


Fig. 44. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **destra** nella popolazione di **Collelungo April**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

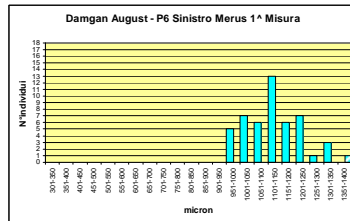
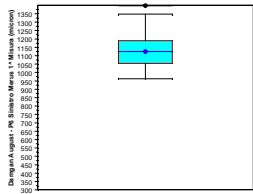
(a.1)



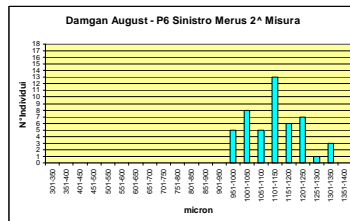
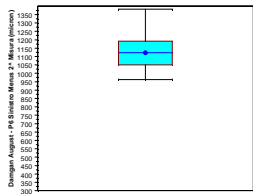
(a.2)



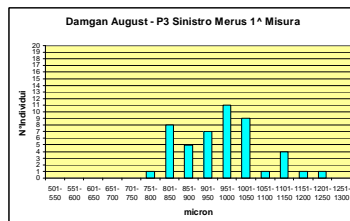
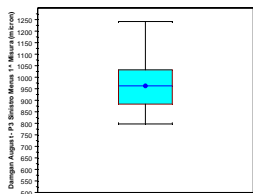
(b.1)



(b.2)



(c.1)



(c.2)

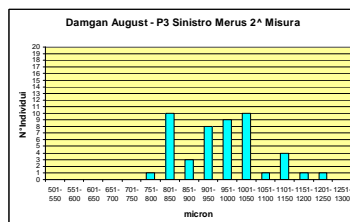
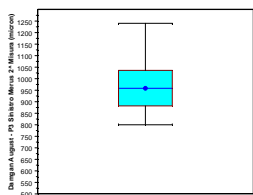


Fig. 45. Box plot e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **sinistra** nella popolazione di **Damgan August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

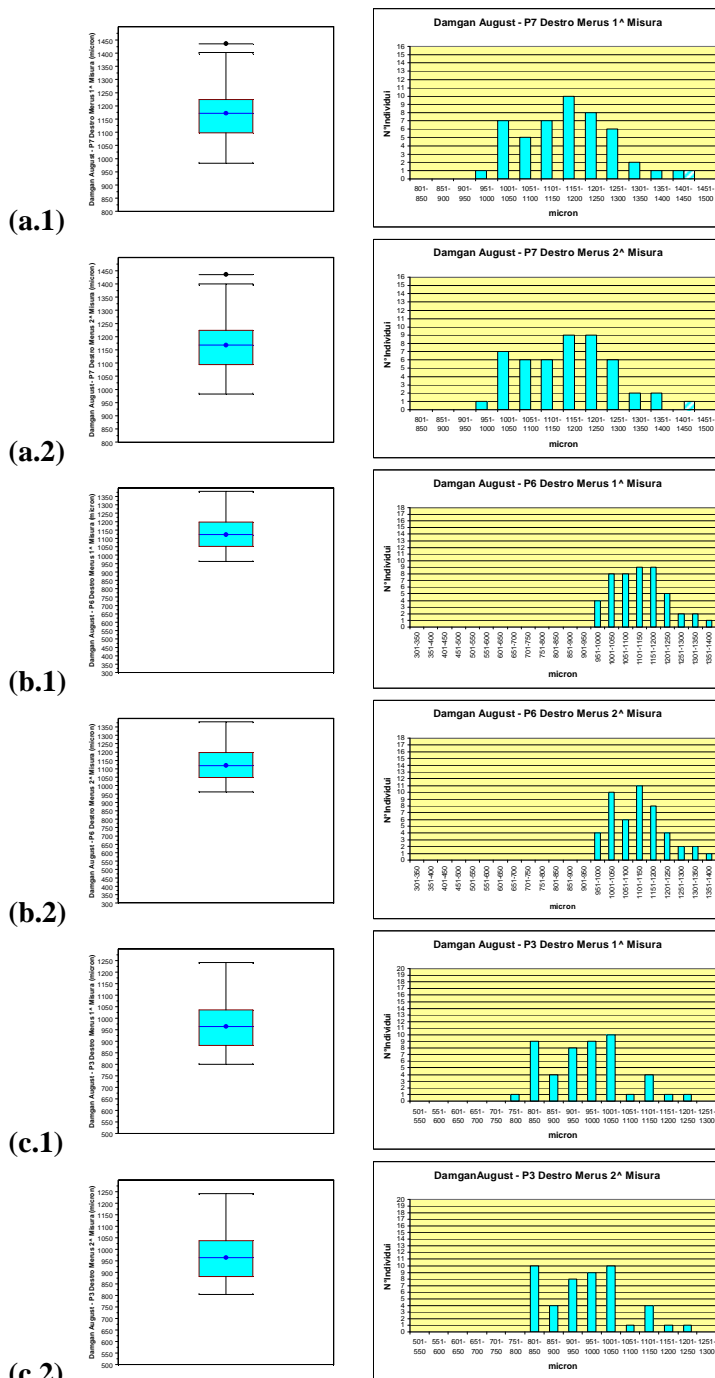


Fig. 46. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **destra** nella popolazione di **Damgan August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

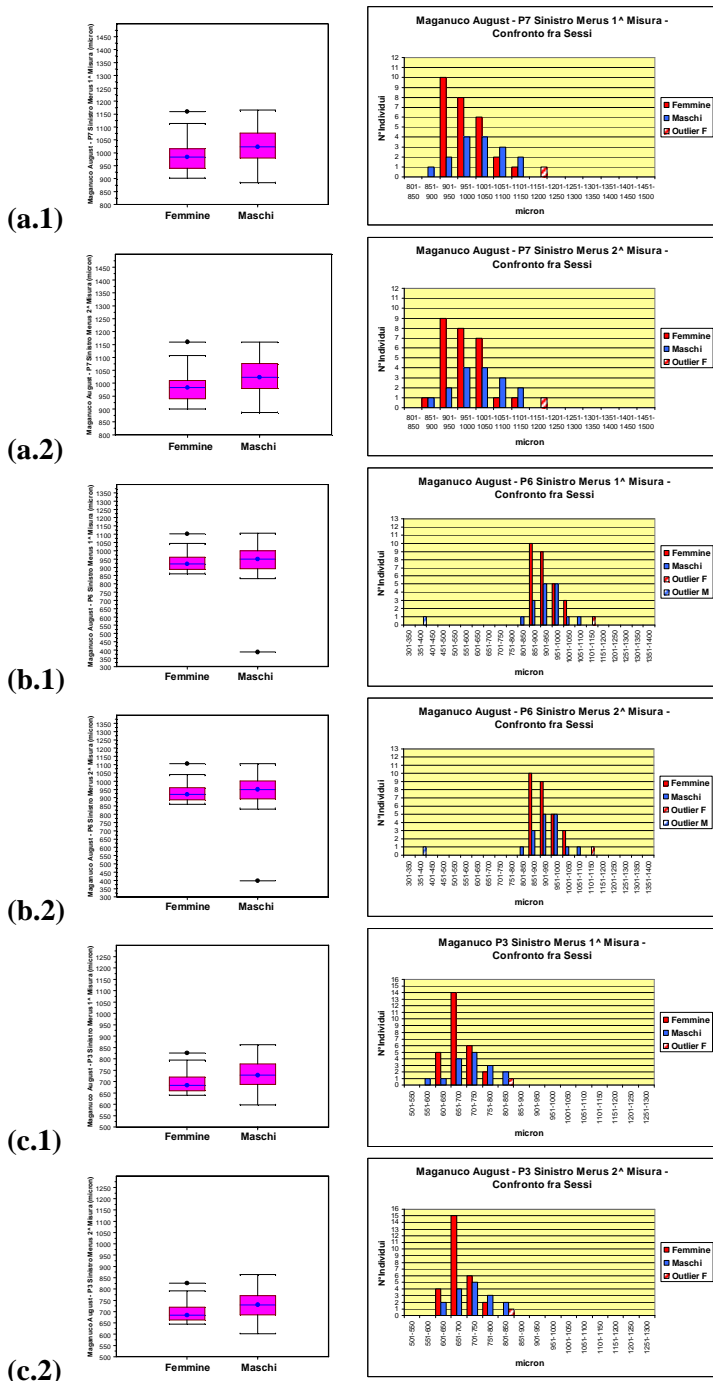


Fig. 47. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereopodi di **sinistra** in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Maganuco August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

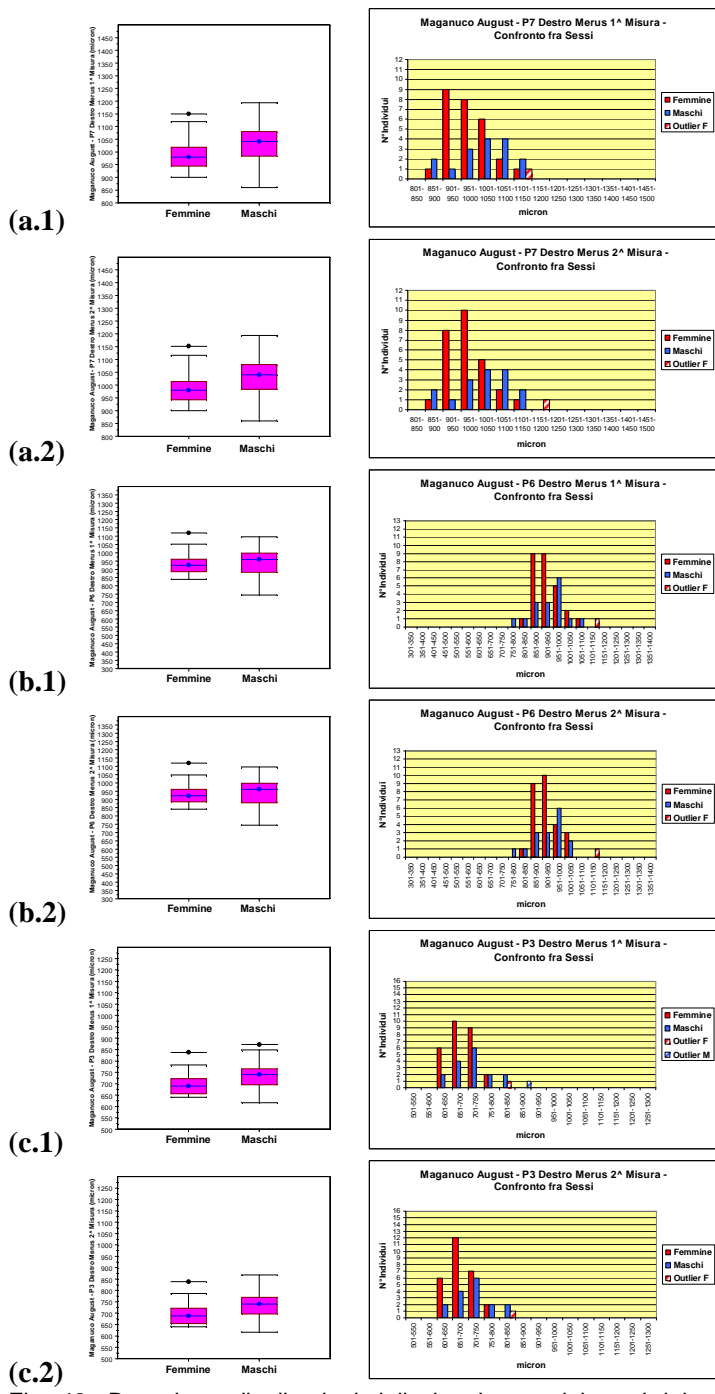


Fig. 48. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **destra** in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Maganuco August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

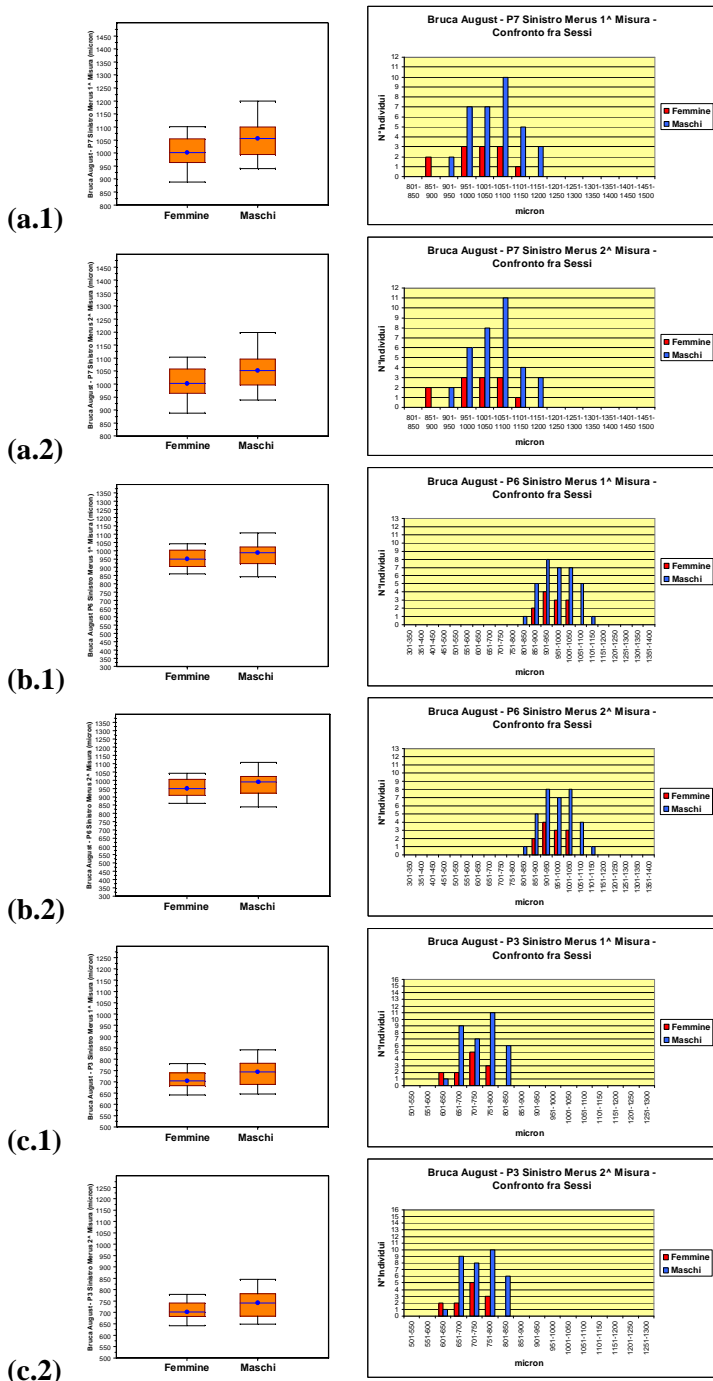


Fig. 49. Box plot e distribuzioni delle lunghezze dei meri dei periopodi di sinistra in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Bruca August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura.



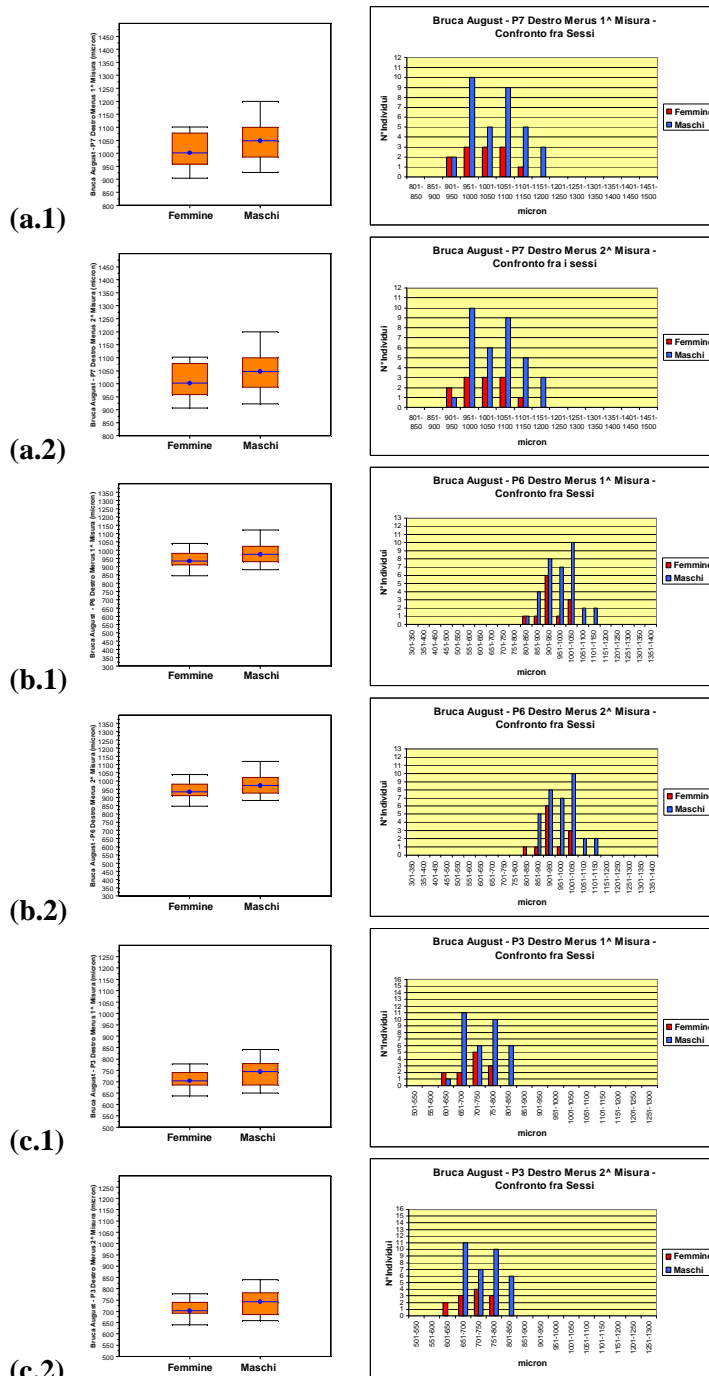
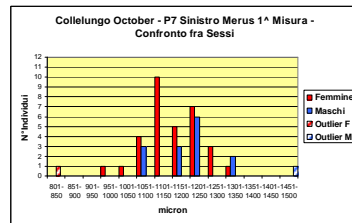
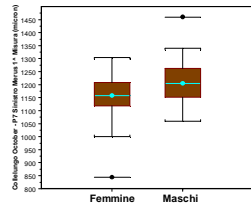
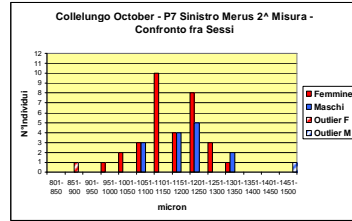
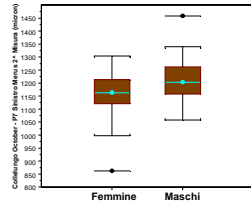


Fig. 50. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiododi di **destra** in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Bruca August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura.

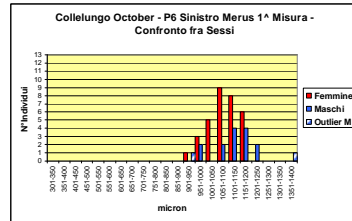
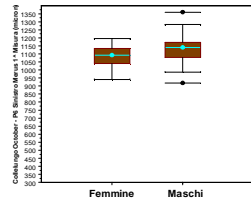
(a.1)



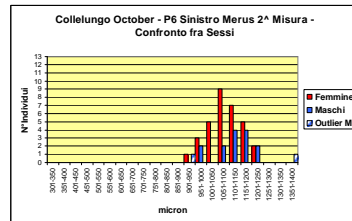
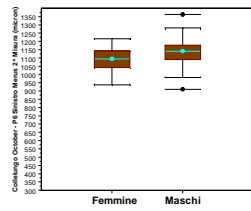
(a.2)



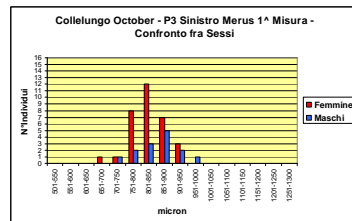
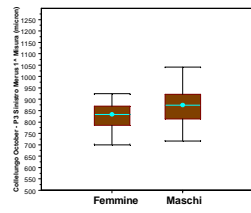
(b.1)



(b.2)



(c.1)



(c.2)

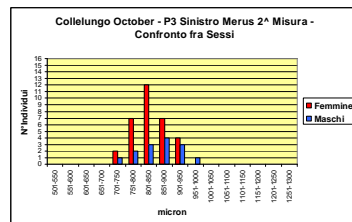
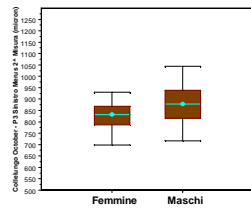


Fig. 51. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei periopodi di **sinistra** in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Collelungo October**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

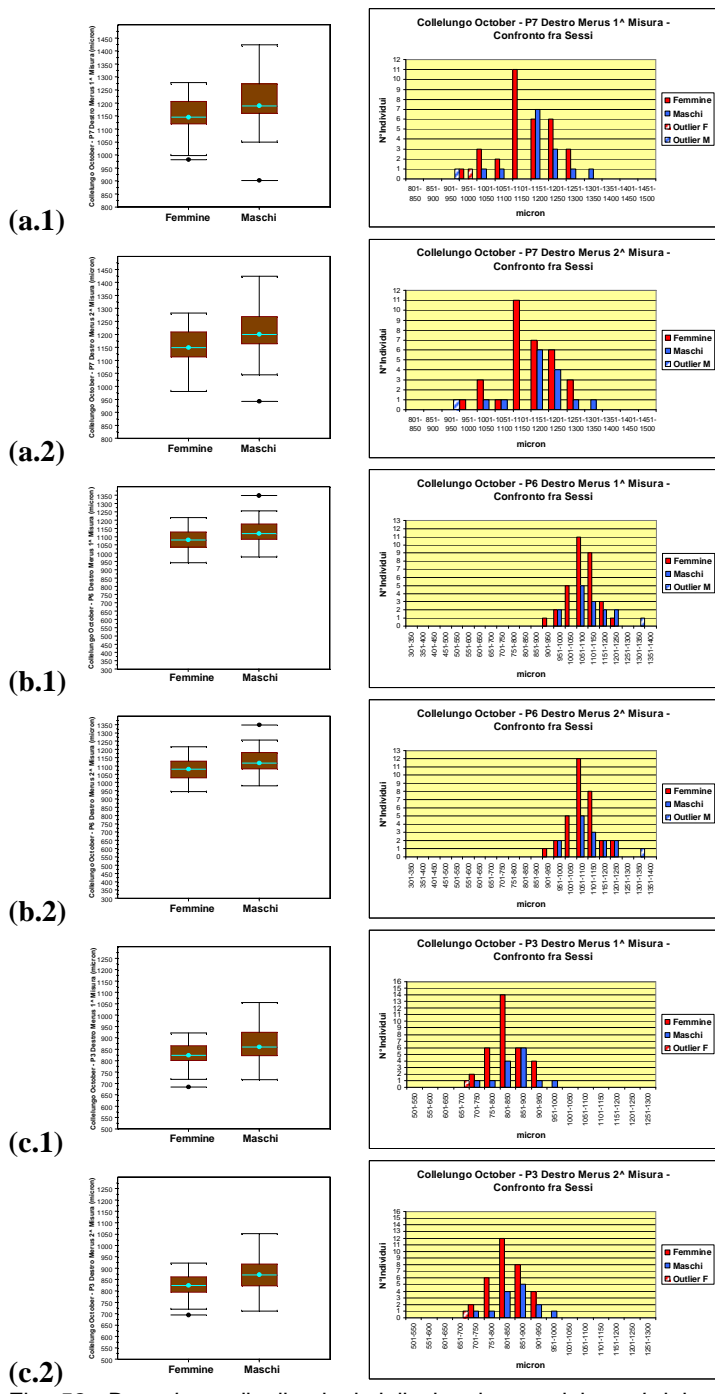


Fig. 52. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiododi di **destra** in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Collelungo October**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

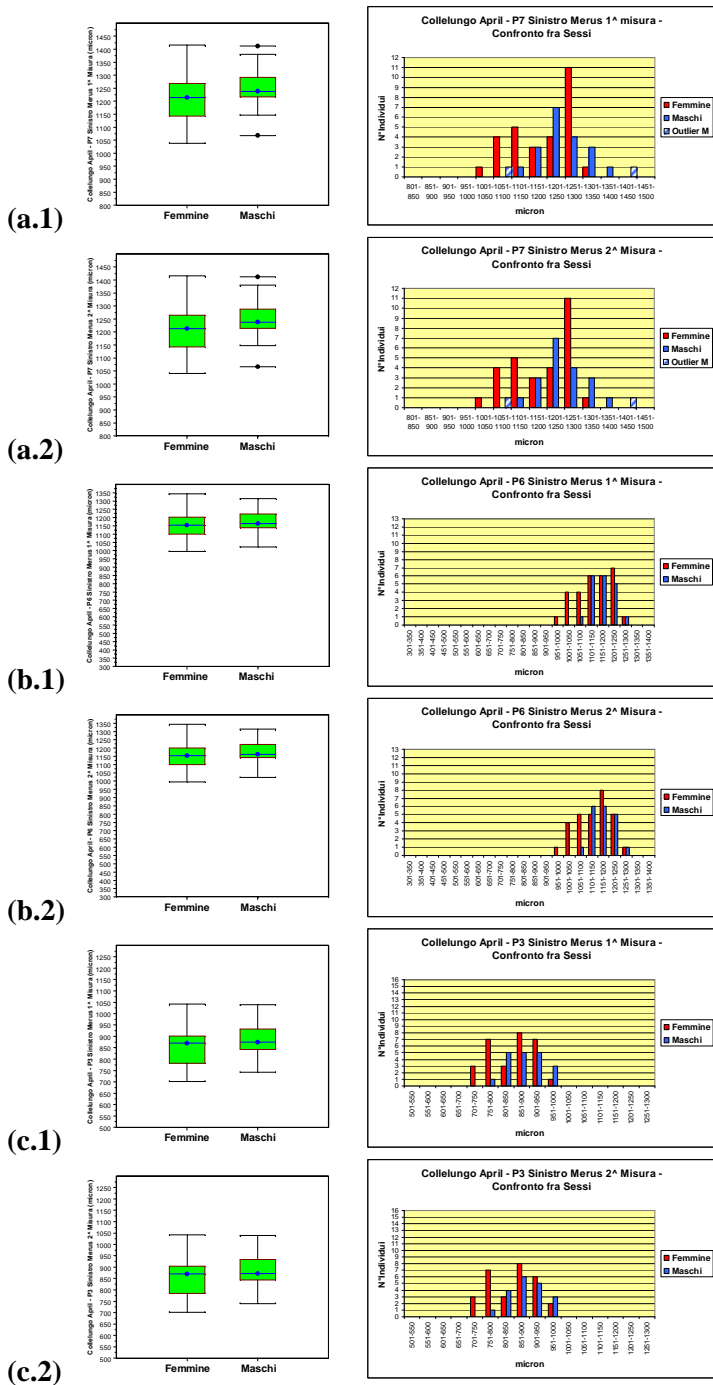


Fig. 53. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei periopodi di **sinistra** in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Collelungo April**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

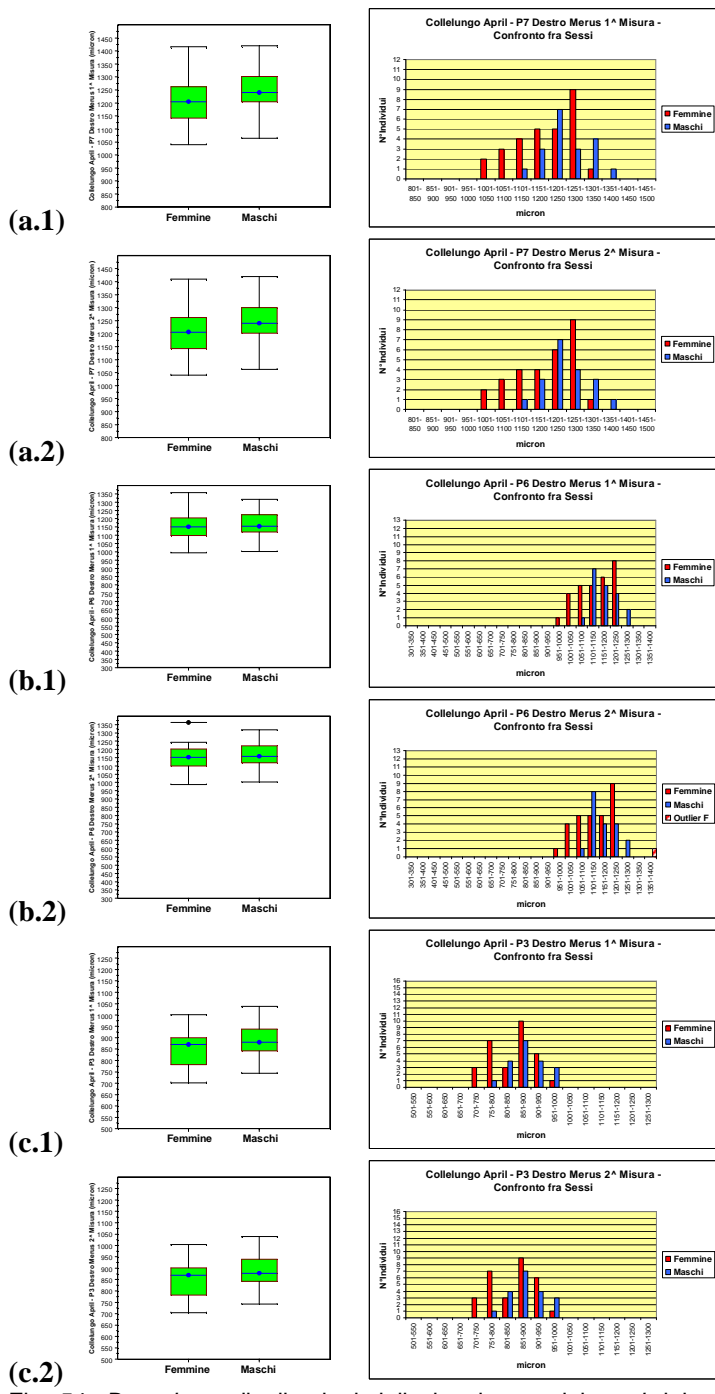


Fig. 54. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiododi di **destra** in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Collelungo April**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

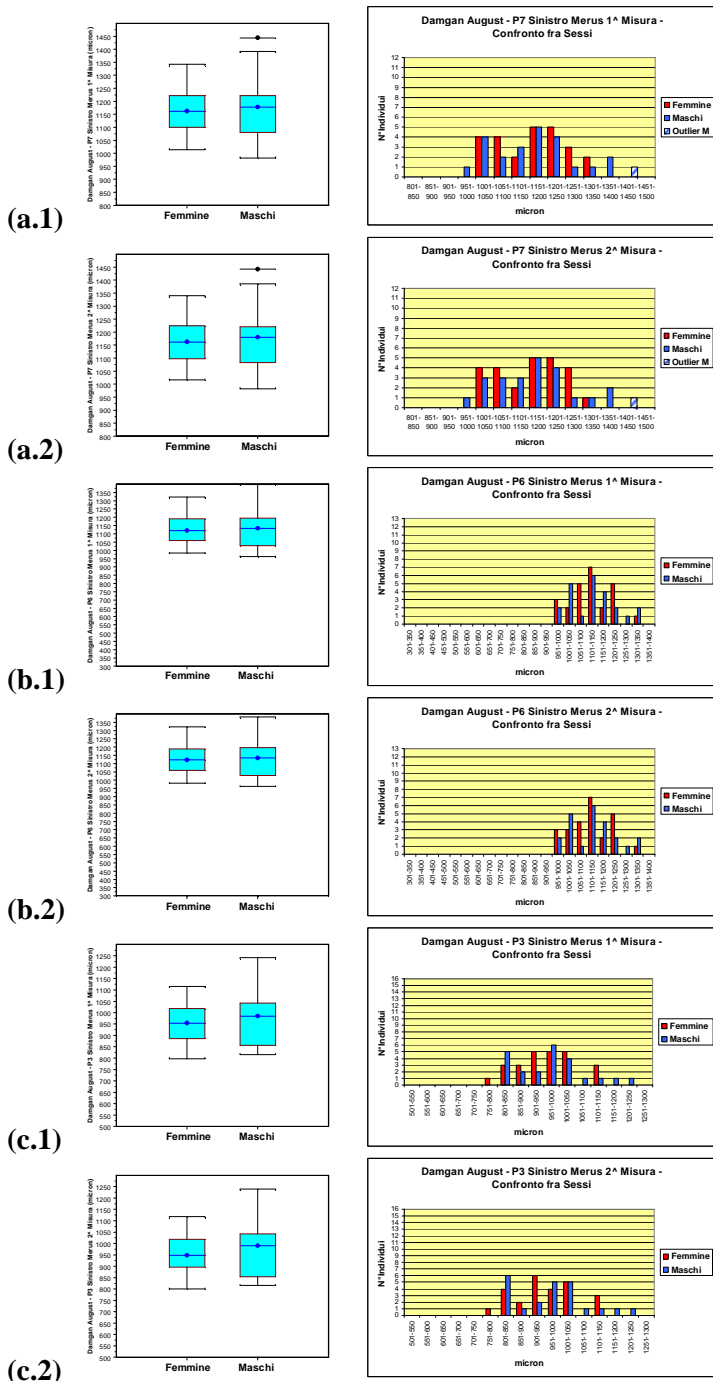


Fig. 55. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei periopodi di **sinistra** in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Damgan August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

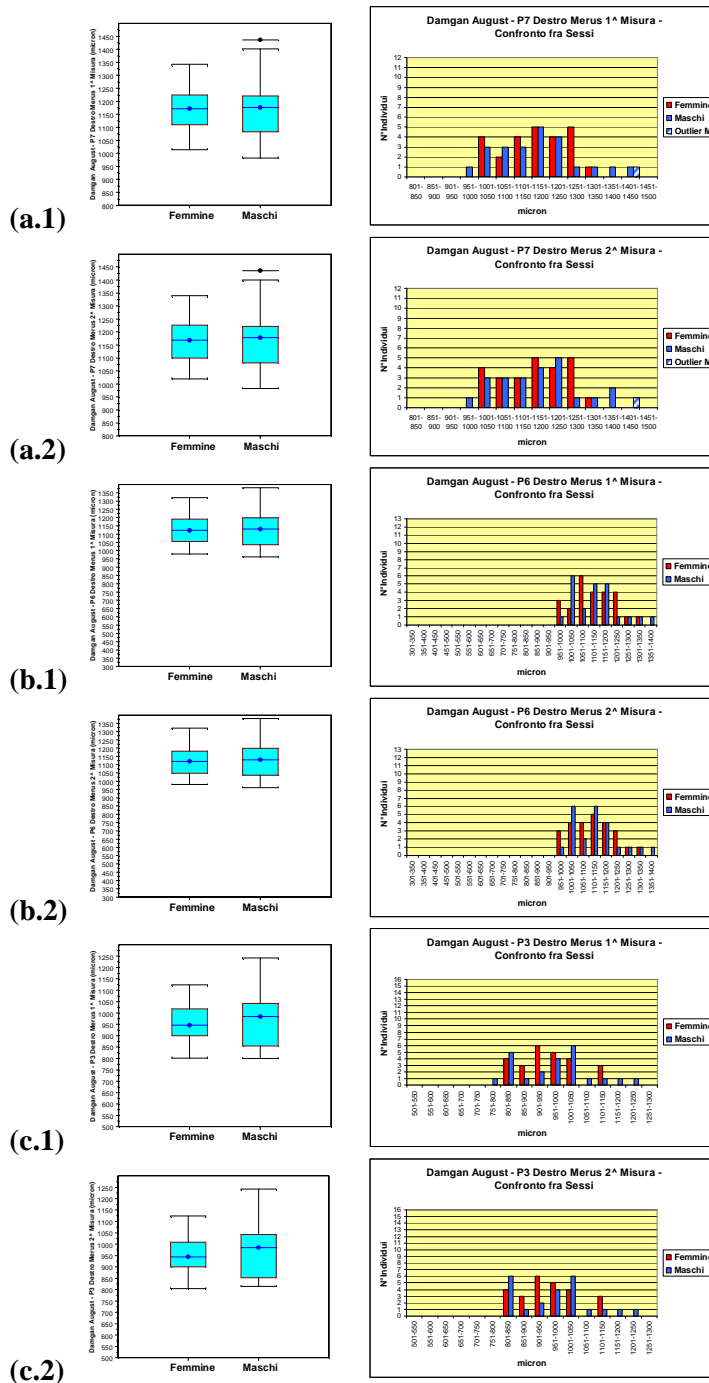


Fig. 56. *Box plot* e distribuzioni delle lunghezze dei *meri* dei pereiopodi di **destra** in femmine (in rosso) e maschi (in blu) della popolazione di **Damgan August**. a) P7; b) P6; c) P3; 1) prima misura; 2) seconda misura. In tratteggio sono indicati gli *outlier*.

**Tabella 7. Lunghezza media  $\pm$  SE ( $\mu\text{m}$ ) dei meri dei pereiopodi P7, P6 e P3 di sinistra e di destra nelle femmine e nei maschi di ogni popolazione analizzata. Confronti fra i due sessi con *F*-test e *t*-test.**

Popolazione	Pereiopodi	Femmine	Maschi	<i>F</i> -test	<i>t</i> -test
Collelungo April	n	29	19		
Collelungo April	P7 sinistro	1199,38 $\pm$ 14,97	1249,26 $\pm$ 13,49	<i>n.s.</i>	$p < 0,05$
Collelungo April	P7 destro	1195,83 $\pm$ 14,52	1249,42 $\pm$ 13,64	<i>n.s.</i>	$p < 0,05$
Collelungo April	P6 sinistro	1143,17 $\pm$ 13,95	1170,42 $\pm$ 11,85	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Collelungo April	P6 destro	1141,14 $\pm$ 13,66	1168,37 $\pm$ 13,18	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Collelungo April	P3 sinistro	846,24 $\pm$ 12,92	885,47 $\pm$ 12,68	<i>n.s.</i>	$p < 0,05$
Collelungo April	P3 destro	845,14 $\pm$ 13,07	886,26 $\pm$ 12,62	<i>n.s.</i>	$p < 0,05$
Damgan August	n	25	23		
Damgan August	P7 sinistro	1166,28 $\pm$ 18,15	1167,57 $\pm$ 22,95	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Damgan August	P7 destro	1168,56 $\pm$ 18,23	1168,09 $\pm$ 22,57	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Damgan August	P6 sinistro	1124,08 $\pm$ 17,94	1128,65 $\pm$ 22,50	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Damgan August	P6 destro	1123,36 $\pm$ 18,50	1129,87 $\pm$ 22,23	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Damgan August	P3 sinistro	949,52 $\pm$ 18,65	973,91 $\pm$ 23,51	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Damgan August	P3 destro	953,88 $\pm$ 18,33	976,22 $\pm$ 24,00	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Collelungo October	n	32	14		
Collelungo October	P7 sinistro	1161,31 $\pm$ 13,11	1189,93 $\pm$ 20,96	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Collelungo October	P7 destro	1154,84 $\pm$ 12,63	1189,00 $\pm$ 19,98	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Collelungo October	P6 sinistro	1090,09 $\pm$ 11,54	1126,71 $\pm$ 19,64	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Collelungo October	P6 destro	1081,97 $\pm$ 11,79	1112,00 $\pm$ 19,32	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Collelungo October	P3 sinistro	831,03 $\pm$ 9,76	853,79 $\pm$ 18,41	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Collelungo October	P3 destro	829,53 $\pm$ 9,18	854,93 $\pm$ 18,61	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Bruca August	n	12	34		
Bruca August	P7 sinistro	1006,92 $\pm$ 20,54	1051,21 $\pm$ 12,05	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Bruca August	P7 destro	1009,50 $\pm$ 18,94	1048,00 $\pm$ 12,20	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Bruca August	P6 sinistro	951,67 $\pm$ 17,85	977,94 $\pm$ 11,45	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Bruca August	P6 destro	947,33 $\pm$ 17,78	980,15 $\pm$ 11,18	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Bruca August	P3 sinistro	710,75 $\pm$ 13,04	740,76 $\pm$ 9,61	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Bruca August	P3 destro	712,08 $\pm$ 13,41	739,79 $\pm$ 9,59	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Maganuco August	n	27	16		
Maganuco August	P7 sinistro	980,74 $\pm$ 10,13	1016,88 $\pm$ 18,24	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Maganuco August	P7 destro	979,96 $\pm$ 10,16	1015,56 $\pm$ 19,74	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Maganuco August	P6 sinistro	926,52 $\pm$ 9,45	940,63 $\pm$ 14,99	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Maganuco August	P6 destro	925,19 $\pm$ 9,78	936,75 $\pm$ 18,00	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>
Maganuco August	P3 sinistro	690,67 $\pm$ 7,47	722,25 $\pm$ 15,58	$p < 0,05$	<i>n. s.</i>
Maganuco August	P3 destro	691,89 $\pm$ 7,81	720,25 $\pm$ 14,59	<i>n. s.</i>	<i>n. s.</i>



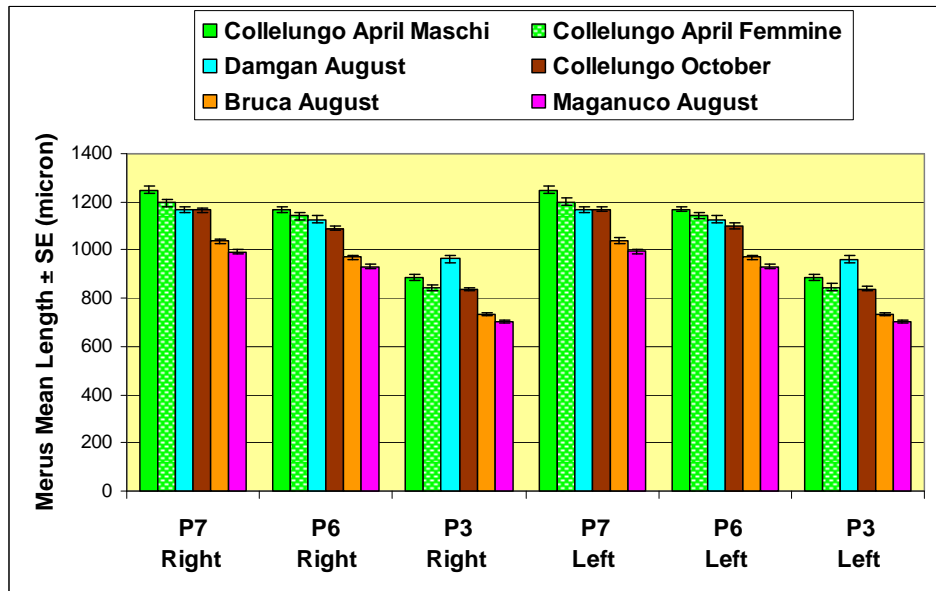


Fig. 57. Lunghezza media  $\pm$  SE ( $\mu\text{m}$ ) dei *meri* dei pereopodi P7, P6 e P3 di destra e di sinistra nelle popolazioni esaminate.

Tabella 8. Lunghezza media  $\pm$  SE ( $\mu\text{m}$ ) dei *meri* dei pereopodi P7, P6 e P3 di destra e di sinistra nelle popolazioni analizzate.

Popolazione	P7 Destro	P6 Destro	P3 Destro	P7 Sinistro	P6 Sinistro	P3 Sinistro
Collelungo April Maschi	1249,4 $\pm$ 13,6	1168,4 $\pm$ 13,2	886,3 $\pm$ 12,6	1249,3 $\pm$ 13,5	1170,4 $\pm$ 11,9	885,5 $\pm$ 12,7
Collelungo April Femmine	1195,8 $\pm$ 14,5	1141,1 $\pm$ 13,7	845,1 $\pm$ 13,1	1199,4 $\pm$ 15,0	1143,2 $\pm$ 14,0	846,2 $\pm$ 12,9
Damgan August	1168,3 $\pm$ 14,2	1126,5 $\pm$ 14,2	964,6 $\pm$ 14,9	1166,9 $\pm$ 14,3	1126,3 $\pm$ 14,1	961,2 $\pm$ 14,8
Collelungo October	1165,2 $\pm$ 10,8	1091,1 $\pm$ 10,2	837,3 $\pm$ 8,6	1170,0 $\pm$ 11,2	1101,2 $\pm$ 10,2	838,0 $\pm$ 8,8
Bruca August	1038,0 $\pm$ 10,5	971,6 $\pm$ 9,6	732,6 $\pm$ 8,0	1039,7 $\pm$ 10,7	971,1 $\pm$ 9,7	732,9 $\pm$ 8,0
Maganuco August	993,2 $\pm$ 9,9	929,5 $\pm$ 9,0	702,4 $\pm$ 7,5	994,2 $\pm$ 9,6	931,8 $\pm$ 8,1	702,4 $\pm$ 7,7

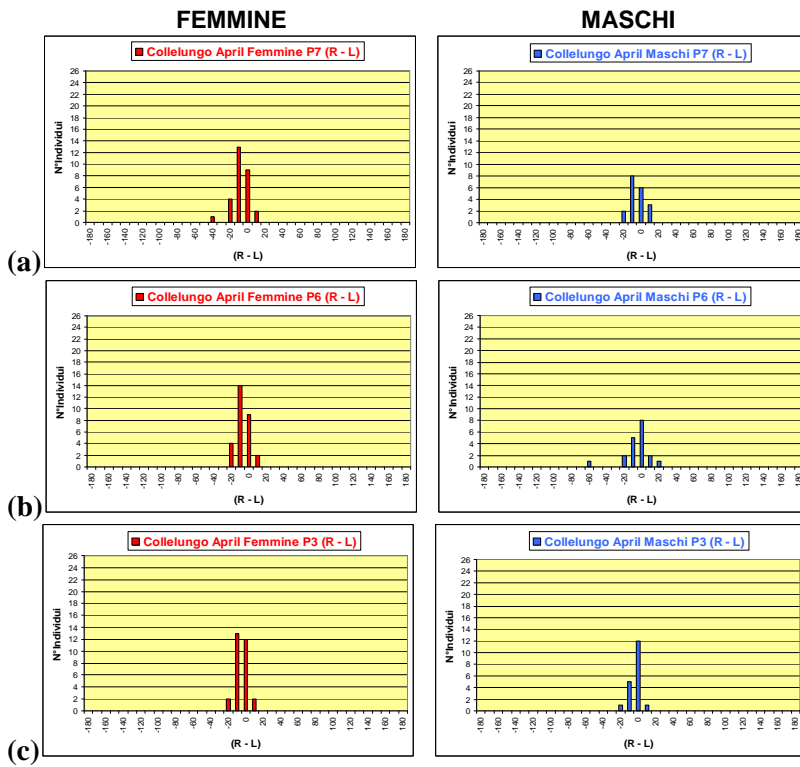


Fig. 58. Distribuzioni dei valori delle differenze (R – L) tra i *meri* dei pereiopodi (a) P7, (b) P6 e (c) P3 di destra (R) e sinistra (L) nelle femmine e nei maschi della popolazione di Collelungo April.

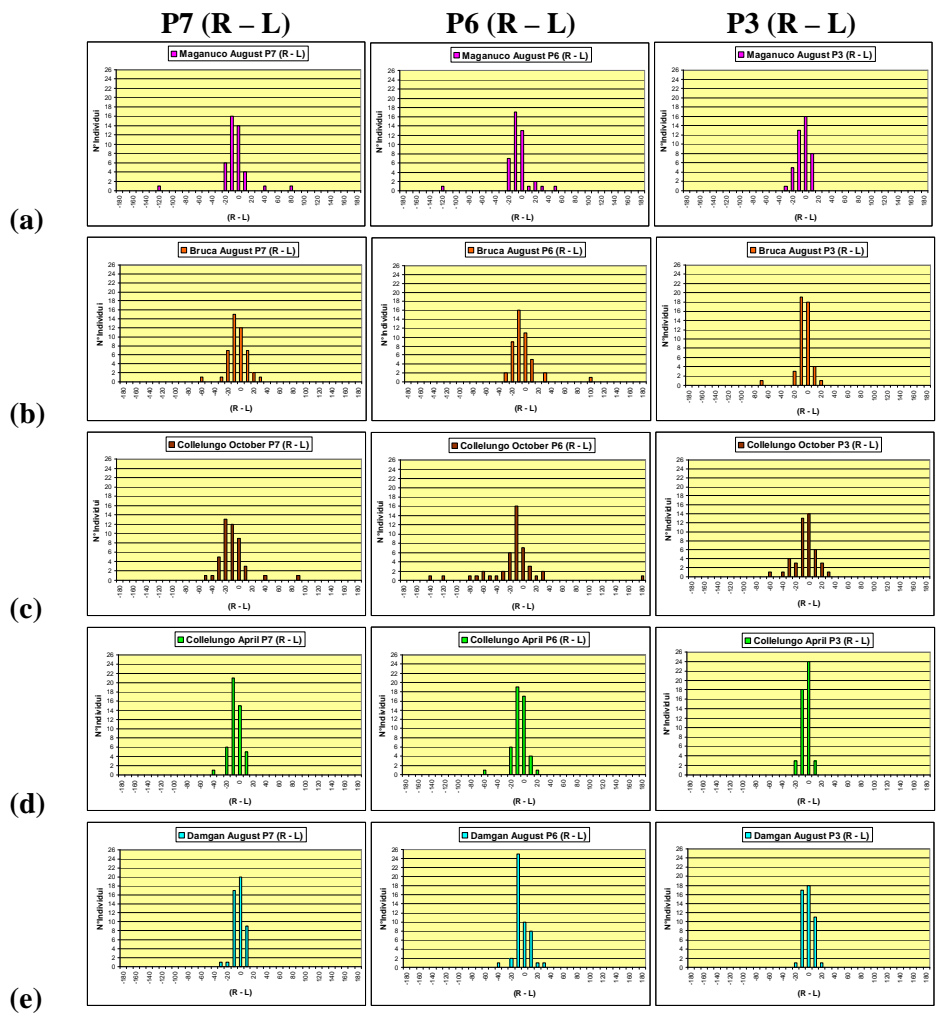


Fig. 59. Distribuzioni dei valori delle differenze (R – L) tra i *meri* dei periopodi P7, P6 e P3 di destra (R) e di sinistra (L) nelle popolazioni di a) Maganuco August; b) Bruca August; c) Collelungo October; d) Collelungo April; e) Damgan August.

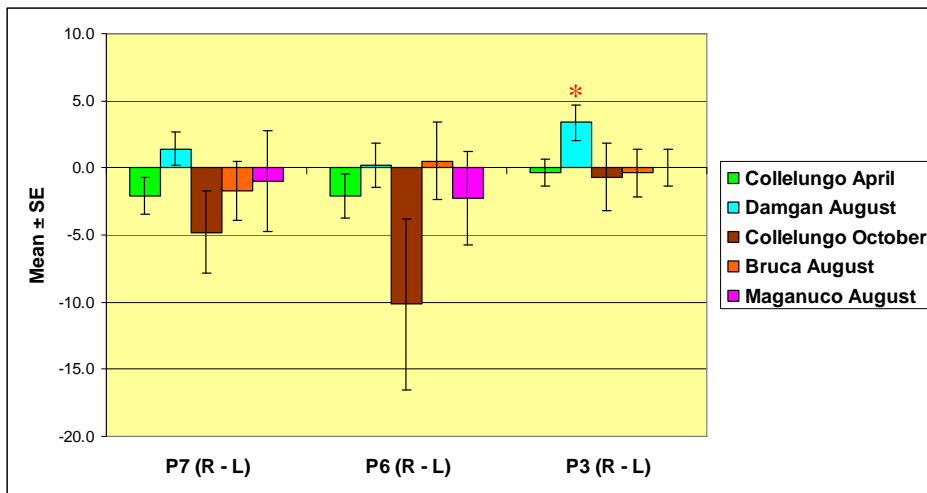


Fig. 60. Media ( $\pm$ SE) delle differenze (R – L) nella lunghezza dei *meri* dei pereiopodi P7, P6 e P3 di destra (R) e di sinistra (L) nelle popolazioni studiate. L'asterisco indica significatività con l'*one-sample t-test* ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7. Asimmetria Fluttuante dei *meri* dei pereiopodi

Per calcolare il livello di asimmetria fluttuante dei *meri* dei pereiopodi delle popolazioni campionate ho utilizzato l'indice  $FA1 = \text{Media } |R - L|$  (Palmer, 1994), che è la media del valore assoluto delle differenze tra lato destro e sinistro. Le differenze tra le popolazioni sono state testate con l'ANOVA a una via. I talitri di Collelungo October manifestano un livello di asimmetria fluttuante significativamente maggiore di quello di tutte le altre popolazioni nei *meri* dei pereiopodi P7, P6 e P3 (Fig. 61).

Il livello di asimmetria fluttuante è significativamente maggiore nei *meri* dei pereiopodi P6 e P3 ( $p < 0,001$ ), mentre si colloca ad un grado di significatività minore nel *merus* del P7 ( $p < 0,05$ ). Inoltre, si evidenzia una differenza stagionale nel livello di asimmetria fluttuante di Collelungo. Infatti, i talitri di Collelungo April hanno un livello di asimmetria fluttuante significativamente minore rispetto a quelli di ottobre.

Applicando gli altri indici di asimmetria fluttuante, i risultati sono del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti con l'indice FA1. Con l'indice FA2 diminuisce il valore della significatività sul P6 (da  $p < 0,001$  a  $p < 0,01$ ) (Fig. 62). Con l'indice FA5 i risultati sono simili, ma la significatività scompare sul P7 e diventa quella tipicamente accettata in ambito biologico sul P6 e sul P3 (Fig. 63). Applicando l'indice Composito di Asimmetria Fluttuante (CFA) non è emersa alcuna significatività (ANOVA).

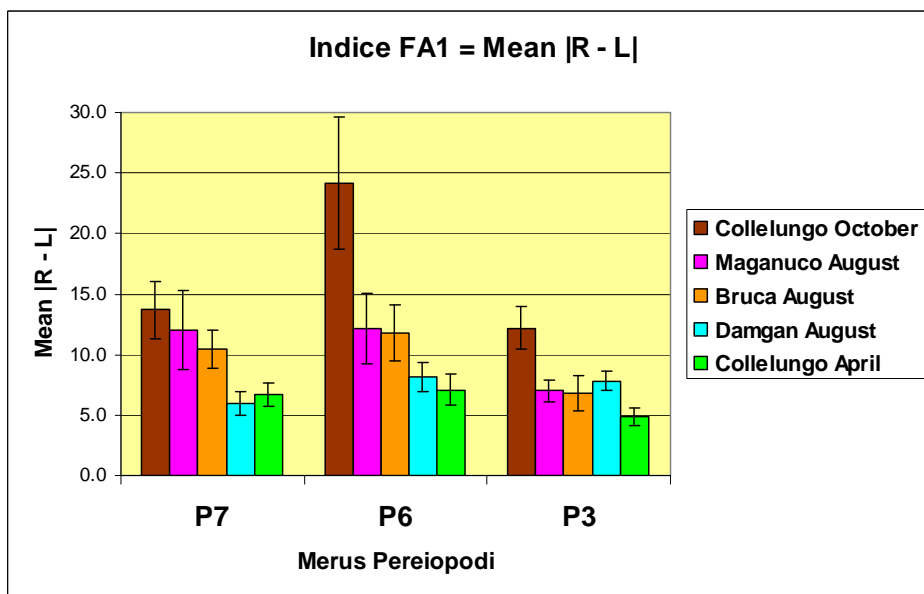


Fig. 61. Valori medi ( $\pm$ SE) di asimmetria fluttuante (calcolati con l'indice FA1 = Media  $|R - L|$ ) dei *meri* dei pereiopodi P7, P6 e P3 nelle popolazioni studiate.

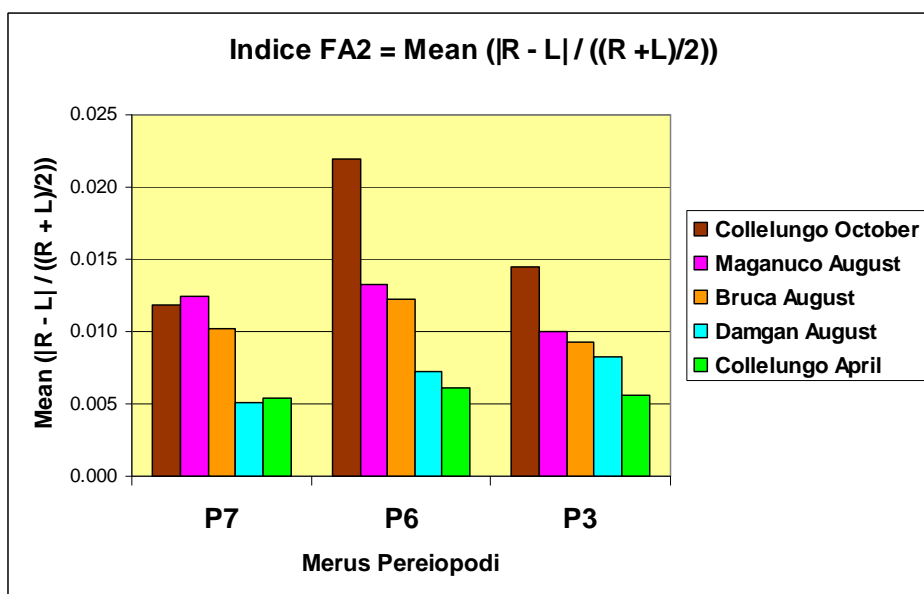


Fig. 62. Valori medi di asimmetria fluttuante (calcolati con l'indice FA2 = Media  $(|R - L| / ((R + L)/2))$ ) dei *meri* dei pereiopodi P7, P6 e P3 nelle popolazioni studiate.

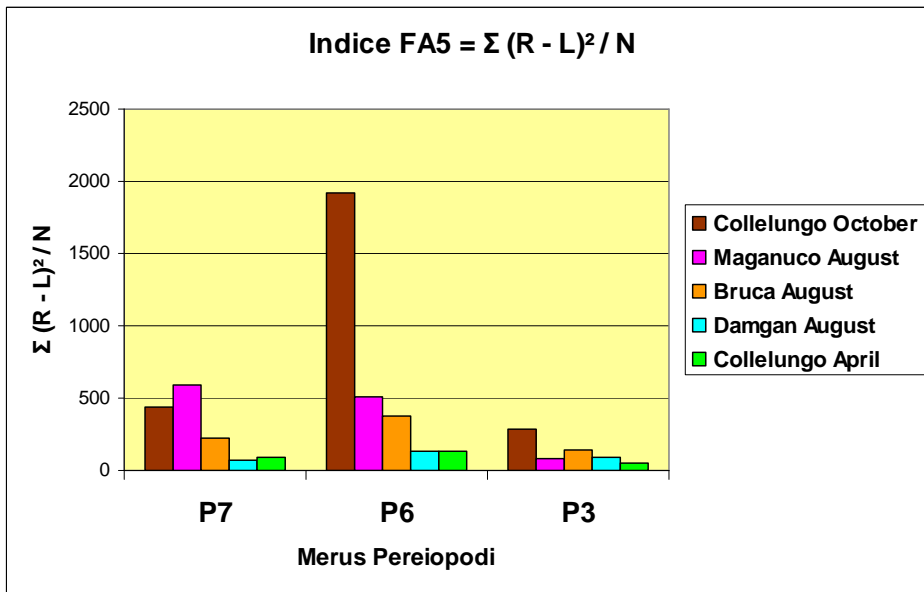


Fig. 63. Valori medi di asimmetria fluttuante (calcolati con l'indice  $FA5 = \Sigma (R - L)^2 / N$ ) dei *meri* dei pereiopodi P7, P6 e P3 nelle popolazioni studiate.

## 5. DISCUSSIONE

I campioni da me studiati erano rappresentativi delle rispettive popolazioni poiché queste erano abbondanti sulle spiagge campionate, con presenza di femmine mature e di giovani anche se, per gli scopi di questa ricerca, catturavo solamente talitri adulti. I campionamenti sono stati eseguiti da me personalmente e con la stessa metodica su tutte le spiagge. I risultati circa la *sex ratio* di Collelungo a ottobre e ad aprile sono in linea con precedenti studi di dinamica di questa popolazione condotti da Marques *et al.* (2003). Solo per i talitri di Collelungo è, attualmente, disponibile uno studio completo della dinamica di popolazione (Marques *et al.*, 2003).

Un dato curioso riguarda un individuo della popolazione di Damgan nella cui provetta ho rinvenuto un talitro nato da poco, poi un altro piccolo è emerso dalla faccia ventrale del talitro allorché l'ho deposto nel pozzetto di vetro per iniziare l'analisi morfometrica. Quindi, ritenevo fosse una femmina. Poi ho individuato i due peni e la mancanza di oostegiti escludeva che si trattasse di un intersesso. Dunque, si trattava di un maschio. Si può ipotizzare che i due piccoli, appena nati o emersi da qualche femmina disturbata, si siano attaccati al primo adulto che capitava. Questo comportamento permette ai piccoli di ricavare indirettamente protezione, oltre all'aerazione della sabbia in cui stanno infossati.

Il metodo di cattura mediante aspiratore entomologico è considerato quello meno invasivo per questa specie e quindi ho ritenuto che le percentuali di *outlier* rinvenute nei campioni fossero quelle effettivamente presenti nelle rispettive popolazioni e non determinate dal metodo di cattura che, peraltro, è stato sempre lo stesso per tutte le popolazioni.

Un dato interessante riguarda un comportamento dei talitri di Damgan che, quando vengono disturbati, stanno fermi, probabilmente per non segnalare la loro presenza ad un eventuale predatore; questo loro comportamento si prolunga "fino alla fine" nel senso che passano parecchi secondi prima che essi comincino a reagire, tentando di fuggire saltando, una volta introdotti nelle eppendorf piene di etanolo assoluto. Invece, i talitri mediterranei, solitamente, quando disturbati non stanno fermi, ma tendono subito a fuggire; altrettanto immediata era la loro risposta di fuga appena trasferiti dentro le eppendorf. Si potrebbe ipotizzare che il comportamento dei talitri di Damgan si sia evoluto per sfuggire alla vista dei predatori che, in quella spiaggia, sono spesso uccelli (gabbiani).

Il rilievo che i talitri di Damgan abbiano dimensioni significativamente maggiori di quelle di tutte le altre popolazioni come conferma la significativa differenza delle dimensioni della capsula cefalica, e che le due popolazioni di Maganuco e Bruca abbiano, al contrario, una capsula cefalica significativamente più piccola delle altre popolazioni analizzate sembra

confermare il fenomeno per cui alle latitudini maggiori aumentano le dimensioni corporee delle popolazioni della stessa specie. Questo fenomeno è confermato, sul versante meridionale delle popolazioni campionate, anche considerando la lunghezza media dei *meri* dei pereopodi che ha il valore minore nelle due popolazioni siciliane, sia a destra sia a sinistra, con un minimo a Maganuco. Invece, sul versante settentrionale del fenomeno, i risultati sembrano apparentemente contraddittori dato che i talitri di Damgan hanno i *meri* dei pereopodi P3, sia a destra sia a sinistra, significativamente più lunghi di quelli delle altre popolazioni, ma questo non riguarda anche i *meri* dei pereopodi P6 e P7. A tal proposito si può invocare un'allometria, forse dipendente dall'età, ossia una crescita non armoniosa del corpo dell'individuo con i pereopodi P3 che crescono prima degli altri pereopodi. In queste stesse appendici, i talitri di Damgan manifestano un'asimmetria direzionale destra e si può ipotizzare che in questa fase di crescita non ci sia ancora la perfetta simmetria bilaterale. Se l'ipotesi che i talitri di Damgan siano ancora in crescita fosse corretta, si potrebbe prevedere che campioni della medesima popolazione catturati in periodi successivi ad agosto possano possedere *meri* dei pereopodi P6 e P7 più lunghi di quelli rinvenuti nel campione da me analizzato. La suddetta ipotesi trova comunque sostegno nel dato concernente i flagelli delle antenne seconde dei talitri di Damgan che, nonostante il primato delle dimensioni della capsula cefalica, sorprendentemente, hanno un numero di articoli significativamente minore rispetto alle altre popolazioni il che indicherebbe che questi individui – seppure adulti e di grandi dimensioni – siano ancora soggetti a crescere.

I talitri di Collelungo April hanno dimensioni significativamente maggiori dei talitri della stessa popolazione catturati a ottobre. Si può ipotizzare che i talitri di Collelungo April siano più vecchi di quelli catturati a ottobre. Questo risultato, peraltro, è in linea con le osservazioni di Marques *et al.* (2003) sulla dinamica di questa popolazione.

Nella popolazione di Collelungo April, più vecchia rispetto a quella di Collelungo October, si osserva, inoltre, dimorfismo sessuale della capsula cefalica con dimensioni più grandi nelle femmine mature rispetto ai maschi. Tenuto conto che gli oostegiti si estendono dal 2° al 5° mesosomite, si può ipotizzare che lo sviluppo sessuale delle femmine, caratterizzato da crescita dimensionale degli oostegiti e comparsa delle setole, sia accompagnato, per ragioni strutturali, anche dall'aumento dimensionale della capsula cefalica che è il tagma più prossimo a quello della regione oostegitica e che questo fenomeno si renda evidente nei talitri più anziani. E' un dato ancora iniziale che mi limita a proporre conscio, tuttavia, che il campionamento non è stato finalizzato a questo scopo e che tra i maschi, seppure depurati dagli *outlier*, potrebbero annidarsi dei "giovani" che abbassano la media e che, a differenza delle femmine, non è possibile discriminare morfologicamente. Comunque, la presenza di giovani maschi potrebbe essere scartata partendo dal rilievo che nella popolazione di Collelungo April i maschi sono quelli che, in media, fra



tutte le popolazioni analizzate, hanno, sia a sinistra sia a destra, il maggior numero di articoli del flagello delle antenne seconde che è un indicatore dell'età dei talitri (Fig. 33).

La ricerca ha confermato il dimorfismo sessuale del flagello delle antenne seconde in *Talitrus saltator* (Ruffo, 1993). Tuttavia, nelle diverse popolazioni, il dimorfismo sessuale sembra manifestarsi in maniera più o meno marcata. In particolare sembra meno accentuato nella popolazione “più giovane” ossia Damgan (come desunto dal numero di articoli del flagello delle antenne seconde) e più marcato in quella “più vecchia” ossia Collelungo April. In questa stessa popolazione, il dimorfismo sessuale tende a manifestarsi anche in altri caratteri, con la prevalenza dei maschi per la lunghezza dei *meri* dei pereopodi P7 e P3 e prevalenza delle femmine mature nella lunghezza della capsula cefalica.

E' stata osservata asimmetria direzionale destra del flagello delle antenne seconde nella popolazione di Collelungo October. E' noto che le antenne hanno un ruolo sensoriale, che sono usate dai maschi per l'accoppiamento e che servono a tutti i talitri per chiudere la buca nella sabbia, ma, anche alla luce di questi ruoli funzionali, appare arduo spiegare le ragioni della presenza dell'asimmetria direzionale in Collelungo October ma non nelle altre popolazioni. D'altra parte, Møller & Swaddle affermano che quando per un dato carattere si manifesta asimmetria direzionale non è più possibile scindere gli effetti dello stress ambientale dal fattore genetico. L'assenza di differenze significative nel livello di asimmetria fluttuante in un carattere meristico come il numero degli articoli del flagello delle antenne seconde indicherebbe, in accordo con Møller & Swaddle (1997), che il livello di stress ambientale a carico delle spiagge studiate non ha raggiunto livelli molto elevati.

Quando è stata programmata la strategia di campionamento, l'attesa era quella di rinvenire, rispetto alla popolazione di Collelungo, più alti livelli di asimmetria fluttuante e più basse densità nelle due popolazioni siciliane a causa dell'inquinamento chimico e del crescente impatto turistico. Maganuco e Bruca sono soggette a inquinamento cronico da idrocarburi, come testimoniato dai residui catramosi ivi rinvenibili, e a Bruca c'è anche lo scarico in mare di pesticidi attraverso le acque reflue di drenaggio delle serre situate a poca distanza dalla spiaggia. Invece, contrariamente ad ogni aspettativa, i talitri di Collelungo October – proprio quelli provenienti dal Parco Regionale della Maremma – manifestano un livello di asimmetria fluttuante nei *meri* dei pereopodi P7, P6 e P3 maggiore di quello di tutte le altre popolazioni esaminate. E' interessante il fatto che questa è stata la popolazione in cui avevo riscontrato la maggiore percentuale di *outlier* per i *meri* dei pereopodi, non solo con individui *minus* o *plus* varianti, ma anche con individui in cui i pereopodi erano mancanti oppure aberranti nel senso di avere i *meri* dei P6 più lunghi dei

*meri* dei P7 il che non rientra nell'anatomia normale degli Anfipodi. Anche Servia *et al.* (2004b), esaminando popolazioni di larve del Dittero *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) provenienti da siti con differenti tipi e gradi di impatto, sia naturale sia antropico, hanno scoperto più elevati livelli di asimmetria fluttuante nella stessa popolazione di larve ove avevano trovato la più elevata frequenza di individui deformati.

Le due popolazioni siciliane, impattate in maniera simile dall'afflusso turistico e dall'inquinamento da idrocarburi e in modo diverso per quello da pesticidi, hanno un livello di asimmetria fluttuante significativamente inferiore rispetto a quello di Collelungo October e non si differenziano fra loro per tale carattere. Anche Barca-Bravo *et al.* (2008) hanno ottenuto risultati negativi riguardo al possibile uso del livello di asimmetria fluttuante delle popolazioni di *Talitrus saltator* come bioindicatore di stress ambientale dovuto a inquinamento chimico da petrolio. Anche se su appendici diverse rispetto al mio lavoro, questi autori hanno confrontato il livello di asimmetria fluttuante di tre popolazioni di *Talitrus saltator* di spiagge della Galizia spagnola diversamente impattate dal naufragio della petroliera *Prestige* nel 2002. È stato rinvenuto un maggior livello di asimmetria fluttuante nella popolazione proveniente dalla spiaggia più soggetta ad attività legate al turismo e all'industria piuttosto che in quelle provenienti dalle spiagge inquinate dal petrolio fuoriuscito dalla *Prestige*. L'assenza di un significativo livello di asimmetria fluttuante nelle popolazioni di *Talitrus saltator* esposte a inquinamento di acqua e sedimenti da petrolio (Spagna e Sicilia) e da pesticidi (Sicilia) può essere indicativa di elevati livelli di resistenza in questa specie.

Il livello di asimmetria fluttuante è maggiore nei *meri* dei pereopodi P6 e P3, minore nel *merus* del P7, che è il più lungo e che si sviluppa dopo gli altri due. Il minore livello di asimmetria sul *merus* del P7 potrebbe essere spiegato facendo riferimento alla maggiore lunghezza di tale appendice rispetto ai P6 e P3, per cui svolgerebbe un ruolo fondamentale nel bilanciamento di un corpo compresso bilateralmente (Schellenberg, 1942, pp. 139–140) ossia per l'equilibrio statico e dinamico (camminare e saltare) dell'animale. L'asimmetria sul P7 potrebbe essere selezionata contro. In altri termini, i percorsi di sviluppo che portano alla simmetria bilaterale dei *meri* dei P7 dovrebbero essere più canalizzati nel senso di Waddington (1979) rispetto a quelli che approdano allo sviluppo dei *meri* dei P6 e dei P3. Nel famoso paesaggio epigenetico di Waddington (Fig. 64) i percorsi di sviluppo della simmetria bilaterale dei *meri* dei pereopodi P7 sarebbero rappresentati da valli molto profonde, difficili da varcare.

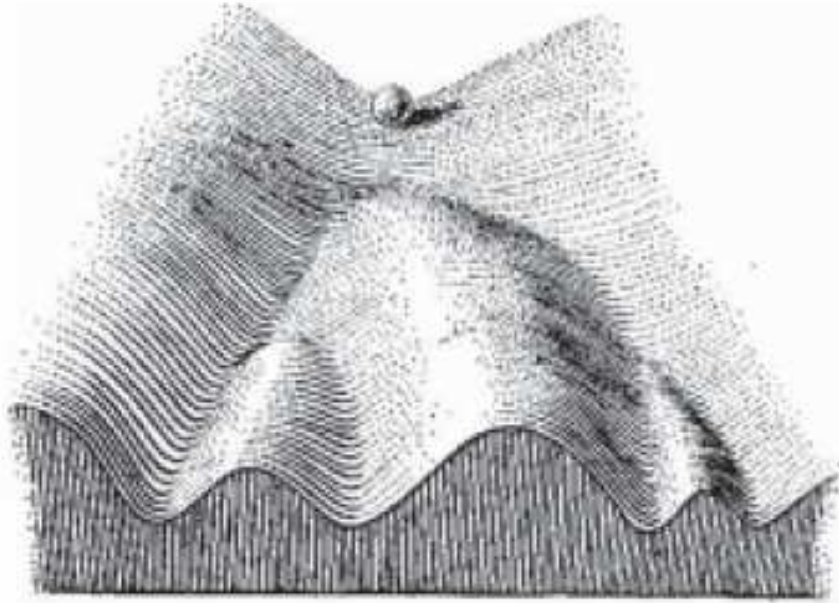


Fig. 64. Il paesaggio epigenetico di Waddington (da Waddington, 1979).

In accordo con Palmer & Strobeck (1986), le differenze nel livello di asimmetria fluttuante tra i caratteri possono fornire un criterio per ordinarli in termini del loro significato funzionale per un organismo, con poca o nulla conoscenza a priori di come questi caratteri realmente funzionino.

Il rinvenimento di un minore livello di asimmetria fluttuante proprio sul *merus* più lungo è, inoltre, un indice della bontà delle misure da me effettuate visto che, come da letteratura, maggiori livelli di asimmetria fluttuante si riscontrano spesso proprio nelle appendici e negli arti più lunghi a causa degli errori di misura che sono strutturalmente più rilevanti per i segmenti di maggiore lunghezza. L'applicazione di altri indici di asimmetria fluttuante, almeno per il caso in studio, è servita solo a confermare i risultati già avuti con l'indice FA1.

Infine, è stata dimostrata una differenza stagionale nel livello di asimmetria fluttuante di Collelungo dato che i talitri di Collelungo April hanno un livello di asimmetria fluttuante significativamente minore rispetto a quelli di Collelungo October.

Inizialmente, per spiegare il maggiore livello di asimmetria fluttuante della popolazione di Collelungo October confrontata con le impattate popolazioni siciliane, avevo ipotizzato che la differenza latitudinale potesse avere un ruolo decisivo nel senso che la popolazione di Collelungo, vivendo più a settentrione, potesse, nel periodo di sviluppo dei talitri, essere esposta a

condizioni climatiche più severe, ad esempio burrasche durante la primavera, rispetto alle popolazioni siciliane. Lo scarso livello di asimmetria fluttuante rinvenuto nella popolazione di Collelungo del mese di aprile (quindi svernante) e lo scarso livello di asimmetria fluttuante della popolazione di Damgan – quest’ultima esposta alle condizioni climatiche dell’Atlantico settentrionale – mi hanno fatto escludere questa ipotesi. Anche Servia *et al.* (2004a), esaminando popolazioni di larve del Dittero *Chironomus riparius* (Meigen, 1804), hanno escluso che le variazioni climatiche che si verificano nel corso dell’anno abbiano un significativo effetto sul livello di asimmetria fluttuante. Pertanto, per spiegare l’alto livello di asimmetria fluttuante di Collelungo October e, di contro, lo scarso livello di asimmetria fluttuante della stessa popolazione ad aprile, si possono invocare altre cause, anche coesistenti.

1) Gli asimmetrici sono stati selezionati contro; inoltre, a tale selezione possono aver contribuito anche le più dure condizioni dell’inverno rispetto all’estate.

2) I talitri di aprile, che hanno svernato e che sono più vecchi di quelli di ottobre, nel corso delle mute hanno compensato le asimmetrie.

Le ipotesi 1) e 2) portano entrambe al risultato che una popolazione più vecchia ha meno individui asimmetrici.

3) Sebbene all’interno di una riserva naturale, la spiaggia di Collelungo ha una relativa presenza di visitatori, talvolta anche a cavallo (osservazioni personali). Ho, dunque, considerato il possibile ruolo degli impatti meccanici dovuti al calpestio dei visitatori che, attraverso il Parco Regionale della Maremma, giungono sulla spiaggia di Collelungo.

La Fig. 65 e la Tabella 9 (colonna di sinistra) illustrano gli ingressi totali al Parco Regionale della Maremma negli anni dal 2006 al 2010 cumulando i dati relativi ai mesi corrispondenti. I mesi con il maggior numero di ingressi al Parco sono quelli di maggio e aprile periodo nel quale si concentra il 46% ( $64.235 + 58.734 = 122.969$ , 46% del totale di 265.651) dei visitatori del Parco. Un secondo picco si osserva nel mese di agosto col 13% di visitatori (35.799 su 265.651). Invece i mesi da ottobre a marzo sono quelli con il minor numero di ingressi (13% dei visitatori ma spalmati nell’arco di sei mesi).

La Fig. 66 e la Tabella 9 (colonna di destra) relativi ai soli itinerari che, attraverso il Parco Regionale della Maremma, consentono l’accesso specifico alla spiaggia di Collelungo, confermano che la grande maggioranza degli ingressi si ha nei mesi di maggio e aprile, periodo nel quale si concentra il 54% ( $74.979$  su  $138.722$ ) dei visitatori che accedono alla spiaggia di Collelungo. Di converso, si riduce l’importanza quantitativa del mese di agosto, periodo nel quale giunge sulla spiaggia solo l’8% dei visitatori ( $11.007$  su  $138.722$ ). Evidentemente, in quel periodo, complici le alte temperature stagionali e il cammino relativamente lungo per accedere alla spiaggia attraverso il parco, i visitatori preferiscono altri itinerari, quelli che non portano alla spiaggia. Un’ulteriore motivo dei minori ingressi osservati in agosto è la prevenzione antincendi a causa della quale alcuni itinerari del parco sono chiusi e agli altri vi

si accede solo in gruppo e sotto la supervisione di una guida. Anche senza attraversare il parco, è possibile raggiungere la spiaggia di Collelungo, ma attraverso un accesso che implica un percorso a piedi di 5 km (Fanini *et al.*, 2005). Complessivamente, si accentua l'importanza quantitativa delle visite nei mesi di aprile e maggio. Questi dati, derivanti dal cumulo degli ingressi nei mesi corrispondenti degli anni dal 2006 al 2010, vengono confermati nella Fig. 67 ove, per i soli itinerari che portano alla spiaggia di Collelungo, sono confrontati i vari anni e mesi: si osserva sempre che i mesi più "caldi" per gli ingressi alla spiaggia di Collelungo sono aprile e maggio. Quello è proprio il periodo di sviluppo dei talitri. Nel caso in studio, tenuto conto della dinamica di questa popolazione (Marques *et al.*, 2003), si osserva, come illustrato nella Fig. 68, che gli individui di Collelungo October sono nati nella primavera precedente e, quindi, si sono sviluppati in un periodo di grande impatto meccanico sulla spiaggia dovuto all'afflusso dei visitatori attraverso il Parco Regionale della Maremma; invece i talitri di Collelungo April, nati verso settembre-novembre dell'anno precedente, sono stati sottoposti a minori impatti meccanici durante il periodo del loro sviluppo. A differenza di quanto visto finora a Collelungo, nelle spiagge di Damgan o in quelle siciliane, nel periodo di sviluppo dei talitri, cioè nei mesi di aprile e maggio, c'è un afflusso notevolmente più limitato di visitatori mentre c'è una presenza relativamente alta di turisti durante il mese di agosto. Infatti, in questo mese, a Maganuco ho rilevato la scomparsa dei talitri nella parte occidentale della spiaggia, nelle vicinanze di un villaggio vacanze e dei principali accessi e dove, dunque, il flusso turistico è più elevato. Analogamente, a Bruca i talitri sono rinvenibili dappertutto tranne che nei 380 m attorno ai due accessi principali. A Damgan, in agosto, i talitri erano assenti in tutta quella parte della spiaggia ove aggettano gli ingressi principali e dove viene praticata, mediante trattore, la pulizia meccanica della sabbia; i talitri di Damgan erano confinati alla zona di spiaggia dove ci sono ingressi secondari e dove non giunge il trattore per la presenza di un tratto di scogli che ne impedisce l'accesso. Si rilevi, tuttavia, che in agosto, in Sicilia sudorientale e in Bretagna meridionale, i talitri nati in primavera sono già sviluppati e, almeno nel Mediterraneo, una nuova generazione si sviluppa nei successivi mesi autunnali.

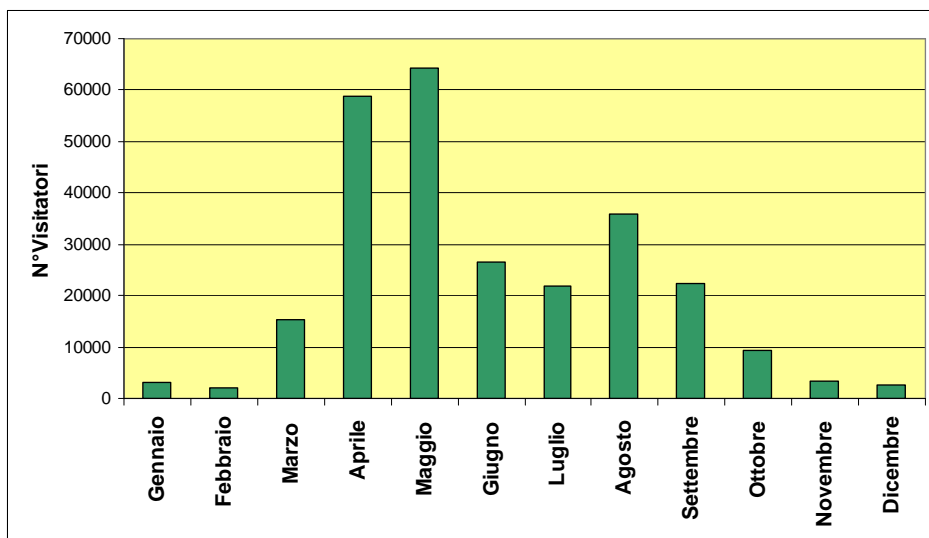


Fig. 65. Ingressi al Parco Regionale della Maremma dal 2006 al 2010. Confronto fra mesi (dati forniti dalla Direzione del Parco Regionale della Maremma).

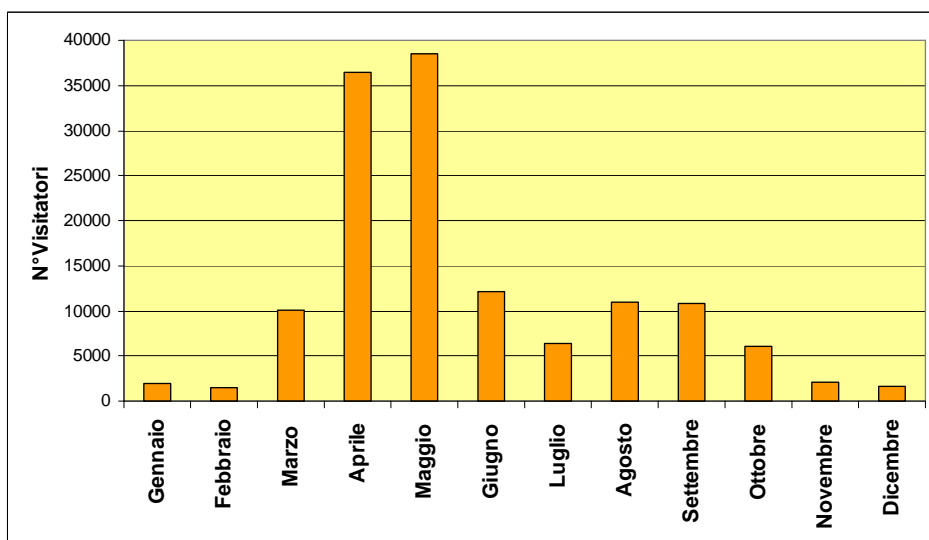


Fig. 66. Ingressi al Parco Regionale della Maremma dal 2006 al 2010 per i soli itinerari includenti la spiaggia di Collerlungo. Confronto fra mesi (dati forniti dalla Direzione del Parco Regionale della Maremma).

**Tabella 9. Numero di visitatori del Parco Regionale della Maremma dal 2006 al 2010 (sono stati cumulati i dati dei mesi corrispondenti) (dati forniti dalla Direzione del Parco Regionale della Maremma).**

	<b>Tutti gli itinerari</b>	<b>Itinerari solo per Collelungo</b>
Gennaio	3.154	1.980
Febbraio	2.087	1.488
Marzo	15.333	10.083
Aprile	58.734	36.500
Maggio	64.235	38.479
Giugno	26.634	12.163
Luglio	21.954	6.439
Agosto	35.799	11.007
Settembre	22.482	10.758
Ottobre	9.270	6.140
Novembre	3.270	2.073
Dicembre	2.699	1.612
<b>TOTALE</b>	<b>265.651</b>	<b>138.722</b>

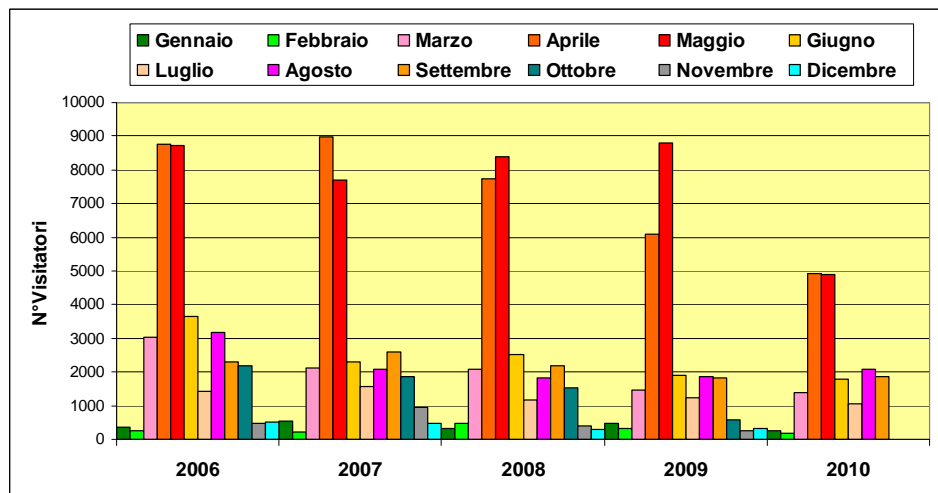


Fig. 67. Ingressi al Parco Regionale della Maremma dal 2006 al 2010 per i soli itinerari includenti la spiaggia di Collelungo. Confronto fra anni e fra mesi (dati forniti dalla Direzione del Parco Regionale della Maremma).

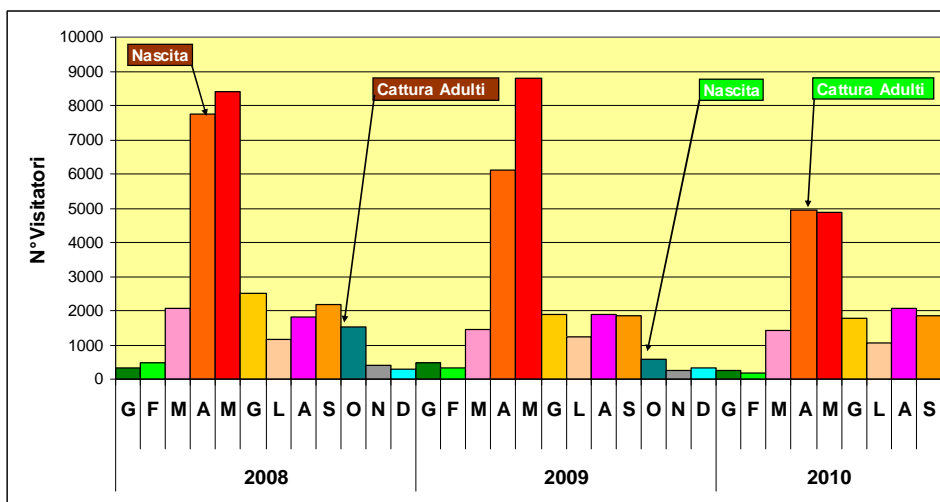


Fig. 68. Ingressi al Parco della Maremma per i soli itinerari includenti la spiaggia di Collelungo nei periodi di nascita, sviluppo e cattura dei campioni Collelungo October (in marrone) e Collelungo April (in verde). Confronto fra anni e fra mesi.

L'ipotesi 3) circa il differente livello di asimmetria fluttuante nelle popolazioni studiate sembra trovare ulteriore sostegno nei dati concernenti la densità. Infatti, almeno nell'area di cattura, nelle due spiagge siciliane, a Damgan e a Collelungo April ho rinvenuto valori di densità minori rispetto a Collelungo October. Questa bassa densità potrebbe essere attribuita agli impatti del calpestio dovuto all'elevato numero di turisti e visitatori nel periodo di campionamento, agosto per Maganuco, Bruca e Damgan, aprile per Collelungo. Comunque, per trarre conclusioni più solide circa la densità delle popolazioni, sarebbe necessaria una differente strategia di campionamento con catture effettuate più volte nel corso dell'anno e includendo anche i giovani (Fanini *et al.*, 2009). E' interessante, comunque, il rilievo che il livello maggiore di asimmetria fluttuante non si riscontra nelle popolazioni con minore densità.

Sorge spontanea la domanda circa il meccanismo con cui gli impatti meccanici dovuti al calpestio andrebbero a disturbare l'armonioso sviluppo della simmetria bilaterale dei pereopodi. Infatti, nella cornice delle conoscenze ecologiche, risulta più facile comprendere l'effetto di un inquinante chimico, solitamente spiegato ipotizzando una sua inibizione competitiva con i reagenti di una qualche catena metabolica oppure un'azione repressiva nei confronti dell'espressione di alcuni geni. Analogamente, deficit nutrizionali o temperature avverse potrebbero rallentare certe catene metaboliche o l'espressione di certi geni. Nel caso delle asimmetrie si può pensare all'influenza di tali fattori nei confronti di catene metaboliche coinvolte nella produzione di induttori



morfogenetici o nei confronti dei geni per la bilateralità. Gli impatti meccanici sono stati considerati solo *a latere* nell'ipotesi di Møller & Swaddle dato che, tra gli stress ambientali, i due autori citano anche gli stress uditivi che, in comune con gli impatti dovuti al calpestio dei turisti, potrebbero avere simili modalità di azione. Rispetto ai controlli, è stato rinvenuto un maggiore livello di asimmetria fluttuante dei femori e dei primi molari mandibolari e mascellari di ratti esposti a stress uditivi durante la fase di sviluppo intrauterino o anche durante il *post partum* per un numero di giorni uguale a quello della gravidanza (Møller & Swaddle, 1997, pp. 144–145).

Si ricordino, poi, gli esperimenti di embriologia che hanno dimostrato, tramite centrifugazione o altri trattamenti analoghi a carico delle uova o degli embrioni nei primi stadi, la possibilità di alterare lo sviluppo di un organismo in seguito alla modificazione della distribuzione nel citoplasma di sostanze induttrici il futuro destino morfogenetico (Buiatti, 1984, pp. 54–70). Sulla scorta di questi studi di embriologia sperimentale, potrebbe essere ipotizzato che gli impatti meccanici determinino un'alterazione nella simmetrica distribuzione degli induttori di campi morfogenetici bilaterali. Le conseguenze potrebbero essere lievi casuali differenze nel tasso di divisione cellulare tra i due lati e/o piccole casuali differenze nei tassi dei processi fisiologici tra le cellule bilaterali.

## 6. CONCLUSIONI

Gli ecosistemi sono tra i più alti livelli di organizzazione della materia vivente. Pertanto, la valutazione del loro stato di benessere necessita l'impiego di parametri ad alto livello d'integrazione. Questi possono essere caratteristiche di popolazione (ad esempio, stagionalità del ciclo vitale, struttura di età, *sex ratio*, variabilità genetica, caratteri fisiologici e comportamentali) oppure caratteristiche delle comunità (ad esempio, presenza di specie alloctone, livello di biodiversità). Tuttavia, alcuni di questi parametri possono dipendere dallo sforzo di campionamento e dall'abbondanza delle popolazioni in particolari periodi dell'anno.

Nel caso della specie oggetto della presente ricerca, si può affermare che l'uso di *Talitrus saltator* come bioindicatore ha il vantaggio di consentire confronti su una vasta area geografica – la distribuzione della specie – e durante tutto l'anno in quanto questa è la durata media del ciclo di vita. Infatti, l'impiego di *Talitrus saltator* come bioindicatore è stato proposto da vari autori per diversi caratteri come la struttura della popolazione (Fanini *et al.*, 2005), la variabilità genetica (Ugolini *et al.*, 2004), l'abbondanza e il comportamento di orientamento (Fanini *et al.*, 2007).

Lo scopo della tesi era di verificare l'ipotesi delle asimmetrie fluttuanti di Møller & Swaddle (1997), in *Talitrus saltator*, confrontando il livello di asimmetria fluttuante di alcune popolazioni soggette a differenti stress con il successivo scopo, in caso di verifica positiva dell'ipotesi, di proporre questa caratteristica di popolazione – che è un carattere quantitativo dello sviluppo – come bioindicatore degli impatti ambientali a carico degli ecosistemi delle spiagge sabbiose.

E' emerso che l'asimmetria fluttuante della lunghezza dei *meri* dei pereopodi di *Talitrus saltator* non può essere usata come bioindicatore degli stress chimici a carico degli ecosistemi delle spiagge sabbiose. Infatti, essa non aumenta in quelle popolazioni che sono cronicamente (spiagge di Maganuco e Bruca in Sicilia) o acutamente (spiagge della Galizia Spagnola, cfr. Barca-Bravo *et al.*, 2008) esposte a inquinamento da idrocarburi o a inquinamento cronico da pesticidi (spiaggia di Bruca).

Dalla presente ricerca è risultato, invece, che l'asimmetria fluttuante della lunghezza dei *meri* dei pereopodi P3, P6 e P7 di *Talitrus saltator* potrebbe aumentare a causa degli impatti meccanici dovuti al calpestio dei turisti durante il periodo di sviluppo individuale; quindi, usando i suddetti caratteri metrici, il confronto del livello di asimmetria fluttuante delle popolazioni di *Talitrus saltator* potrebbe essere un buon bioindicatore degli stress meccanici subiti stagionalmente dagli ecosistemi delle spiagge sabbiose. Essendo la specie relativamente resistente nei confronti degli impatti, le differenze tra le popolazioni possono essere usate come un allarme precoce di stress meccanici prima che la popolazione si estingua a causa di severe pressioni ambientali come hanno dimostrato Węśławski *et al.* (2000) evidenziando la

riduzione e/o la scomparsa di *Talitrus saltator* nelle spiagge dove la pressione turistica è elevata. Dato che la maggiore *sensibilità* agli stress meccanici si riscontra a carico dei *meri* dei pereiopodi P3, cui seguono quelli dei P6, mentre la maggiore *resistenza* all'innalzamento del livello di asimmetria fluttuante si riscontra nei *meri* dei pereiopodi P7, probabilmente per una maggiore canalizzazione dello sviluppo della simmetria bilaterale di quest'appendice a causa del suo ruolo funzionale, ai fini di utilizzare le differenze tra popolazioni come allarme precoce di stress meccanici, i *meri* dei pereiopodi P3 e P6 sono quelli da analizzare per primi. Essi, inoltre, hanno il vantaggio di essere più corti e quindi meno soggetti a errori di misurazione. Questo bioindicatore potrebbe essere utile nella scelta delle opzioni gestionali degli ecosistemi delle spiagge sabbiose.

L'asimmetria fluttuante della lunghezza dei *meri* dei pereiopodi di *Talitrus saltator* sembra presentare il vantaggio di non dipendere dallo sforzo di campionamento né dall'abbondanza delle popolazioni in un particolare momento dell'anno. Tuttavia, giacché l'asimmetria fluttuante presenta variazioni stagionali, l'applicazione di questo bioindicatore ha come presupposto la conoscenza della dinamica della popolazione sulla quale esso viene misurato, oltre che del periodo in cui agiscono gli stress meccanici.

In conclusione, tenendo opportunamente conto del periodo di sviluppo dei talitri, della dinamica delle popolazioni in esame e del periodo in cui agiscono i fattori stressanti, particolarmente la stagionalità delle attività legate al turismo, i livelli di asimmetria fluttuante dei *meri* dei pereiopodi P6 e soprattutto P3 possono essere considerati un efficace e precoce bioindicatore degli stress meccanici a carico degli ecosistemi delle spiagge sabbiose.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Barca-Bravo, S., Servia, M. J., Cobo, F. & González, M.A.** 2008. The effect of human use of sandy beaches on developmental stability of *Talitrus saltator* (Montagu, 1808) (Crustacea, Amphipoda). A study on fluctuating asymmetry. *Marine Ecology*, **29** (1), 91–98.
- Boncinelli, E., Mallamaci, A. & Lavoragna G.** 1994. Vertebrate homeobox genes. *Genetica*, **94** (2-3), 127–140.
- Buiatti, M.** 1984. *Le frontiere della genetica. Il codice della vita fra scienza e società*. Editori Riuniti, Roma, 140 pp.
- Crickmore, M.A. & Mann, R.S.** 2006. Hox Control of Organ Size by Regulation of Morphogen Production and Mobility. *Science*, **313**, 63–68.
- De Matthaeis, E., Davolos, D., Cobolli, M. & Ketmaier, V.** 2000. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations of four talitrid species in the Mediterranean Sea. *Evolution*, **54** (5), 1606–1613.
- Defeo, O., McLachlan, A., Schoeman, D.S., Schlacher, T.A., Dugan, J., Jones, A., Lastra, M. & Scapini, F.** 2009. Threats to sandy beach ecosystems: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **81**, 1–12.
- Dugan, J.E., Defeo, O., Jaramillo, E., Jones, A.R., Lastra, M., Nel, R., Peterson, C.H., Scapini, F., Schlacher, T. & Schoeman, D.S.** 2010. Give Beach Ecosystems Their Day in the Sun. *Science*, **329**, 1146.
- Emlen, D.J. & Allen, C.E.** 2004. Genotype and Phenotype: Physiological Control of Trait Size and Scaling in Insects. *Integrative and Comparative Biology*, **43**, 617–634.
- Fanini, L., Marchetti, G.M., Scapini, F. & Defeo, O.** 2007. Abundance and orientation responses of the sandhopper *Talitrus saltator* to beach nourishment and groynes building at San Rossore natural park, Tuscany, Italy. *Marine Biology*, **152** (5), 1169–1179.
- Fanini, L., Marchetti, G.M., Scapini, F. & Defeo, O.** 2009. Effects of beach nourishment and groynes building on population and community descriptors of mobile arthropodofauna. *Ecological Indicators*, **9**, 167–178.
- Fanini, L., Martín Cantarino, C. & Scapini, F.** 2005. Relationships between the dynamics of two *Talitrus saltator* populations and the impacts of activities linked to tourism. *Oceanologia*, **47** (1), 93–112.
- Holland, P.W.H. & Hogan, B.L.M.** 1988. Expression of homeo box genes during mouse development: a review. *Genes & Development*, **2**, 773–782.
- Hughes, C. L. & kaufman, T.C.** 2002. Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. *Evolution & Development*, **4** (6), 459–499.
- Karaman, G. S.** 1993. *Crustacea Amphipoda of freshwaters (in Italian)*. *Fauna d'Italia*. Edizioni Calderini, Bologna, XXXI, 337 pp.

- Ketmaier, V., De Matthaeis, E., Fanini, L., Rossano, C. & Scapini, F.** 2010. Variation of genetic and behavioural traits in the sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) along a dynamic sand beach. *Ethology Ecology Evolution*, **22(1)**, 17–35.
- Ketmaier, V., Iuri, V. & De Matthaeis, E.** 2005. Genetic resources and molecular markers in *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) from the beach of Smir. *Travaux de l'Institut Scientifique, Rabat série générale*, **4**, 55–59.
- Leung, B., Forbes, M.R. & Houle, D.** 2000. Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: comparing efficacy of analyses involving multiple traits. *The American Naturalist*, **155(1)**, 101–115.
- Lewontin, R.C.** 1998. *Gene, organismo e ambiente*. Editori Laterza, Roma-Bari, 112 pp.
- Marques, J.C., Gonçalves, S. C., Pardal, M. Â., Chelazzi, L., Colombini, I., Fallaci, M., Bouslama, M. F., El Gtari, M., Charfi-Cheikhrouha, F. & Scapini, F.** 2003. Comparison of *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) biology, dynamics, and secondary production in Atlantic (Portugal) and Mediterranean (Italy and Tunisia) populations. *Estuarine, Coastal and Shelf Sciences*, **58S**, 127–148.
- Mayr, E.** 1942. *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia University Press, New York, 334 pp.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, J.F.** 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA form human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **16**, 1215.
- Møller, A. P. & Swaddle, J.P.** 1997. *Asymmetry, development stability and evolution*. Oxford University Press, Oxford, 291 pp.
- Morritt, D. & Spicer, J. I.** 1998. The physiological ecology of talitrid amphipods: an update. *Canadian Journal of Zoology*, **76**, 1965–1982.
- Nam, J. & Nei, M.** 2005. Evolutionary Change of the Numbers of Homeobox Genes in Bilateral Animals. *Molecular Biology and Evolution*, **22 (12)**, 2386–2394.
- Neville, A.C.** 1976. *Animal Asymmetry*. Edward Arnold, London, 60 pp.
- Palmer, A.R.** 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: *Developmental instability: its origins and evolutionary implications* (Ed. by T.A. Markow) pp. 335–364. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Palmer, A.R. & Strobeck, C.** 1986. Fluctuating asymmetry: measurements, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **17**, 391–421.
- Pavesi, L., Chelazzi, L., Iannilli, V., Lucchesi, B., Renzi, A. & De Matthaeis, E.** 2009. Abundance, temporal distribution and zonation patterns of talitrids on two Apulian sandy beaches (southern Italy). *Vie et Milieu and Environment*, **59**, 7–20.

- Ruffo, S. (ed.)** 1993. *The Amphipoda of the Mediterranean. Part 3.* Mémoires de l'Institut Océanographique, Monaco, 577–813.
- Ruppert, E.E. & Barnes, R.D.** 1997. *Zoologia degli Invertebrati. III Edizione.* Piccin, Padova, 1056 pp.
- Scapini, F.** 1997. Variation in Scototaxis and Orientation Adaptation of *Talitrus saltator* Populations Subjected to Different Ecological Constraints. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **44**, 139–146.
- Scapini, F.** 2006. Keynote papers on sandhoppers orientation and navigation. *Marine and Freshwater Behaviour Physiology*, **39** (1), 73–85.
- Scapini, F., Buiatti, M., De Matthaeis & E., Mattoccia, M.** 1995. Orientation behaviour and heterozygosity of sandhopper populations in relation to stability of beach environments. *Journal of Evolutionary Biology*, **8** (1), 43–52.
- Scapini, F., Chelazzi, L., Colombini, I. & Fallaci, M.** 1992. Surface activity, zonation and migrations of *Talitrus saltator* on a Mediterranean beach. *Marine Biology*, **112**, 573–581.
- Scapini, F. & Morgan, E.** 2002. Bioassays for estimation of beach stability and ecosystem quality. In: *Baseline research for the integrated sustainable management of Mediterranean sensitive coastal ecosystems. A manual for coastal managers, scientists and all those studying coastal processes and management in the Mediterranean* (Ed. by F. Scapini) pp. 120–122. Istituto Agronomico per l'Oltremare, Florence, Italy.
- Schellenberg, A.** 1942. *Flohkrebsse oder Amphipoda.* Die Tierwelt Deutschlands, **40** (IV), 252 pp.
- Servia, M.J., Cobo, F. & González, M.A.** 2004a. Effects of short-term climatic variations on fluctuating asymmetry levels in *Chironomus riparius* larvae at a polluted site. *Hydrobiologia*, **523**, 137–147.
- Servia, M.J., Cobo, F. & González, M.A.** 2004b. Multiple-trait analysis of fluctuating asymmetry levels in anthropogenically and naturally stressed sites: a case study using *Chironomus riparius* Meigen, 1804 larvae. *Environmental Monitoring and Assessment*, **90**, 101–112.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48** (5–6), 526–532.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaporti & M., Focardi, S.** 2008. The amphipod as a bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349–357.
- Waddington, C. H.** 1979. *Evoluzione di un evoluzionista.* Armando Editore, Milano, 432 pp.
- Węśławski, J.M., Stanek, A., Siewert, A. & Beer, N.** 2000. The sandhopper (*Talitrus saltator*, Montagu, 1808) on the Polish Baltic coast. Is it a victim of increased tourism? *Oceanological Studies*, **29** (1), 77–87.

**Williams, J.A.** 1987. The relationship between antennal segment number and moulting in *Talitrus saltator* (Montagu 1808), (Amphipoda, Talitridae). *Crustaceana*, **53(3)**, 243-252.





## 8. PUBBLICAZIONI

### 8.1. Can fluctuating asymmetry in *Talitrus saltator* (Montagu, 1808) (Crustacea, Amphipoda) populations be used as a bioindicator of stress on sandy beach ecosystems?

OCEANOLOGIA, 52 (2), 2010.  
pp. 1–22.

© 2010, by Institute of  
Oceanology PAS.

#### KEYWORDS

Amphipoda  
*Talitrus saltator*  
Development  
Fluctuating asymmetry  
Sandy beaches

OTTAVIO OTTAVIANO

FELICITA SCAPINI

Department of Evolutionary Biology 'Leo Pardi',  
University of Florence,  
Via Romana 17, IT-50125 Florence, Italy;

e-mail: ottavio.ottaviano@unifi.it, scapini@unifi.it

Received 21 December 2009, revised 6 May 2010, accepted 11 May 2010.

#### Abstract

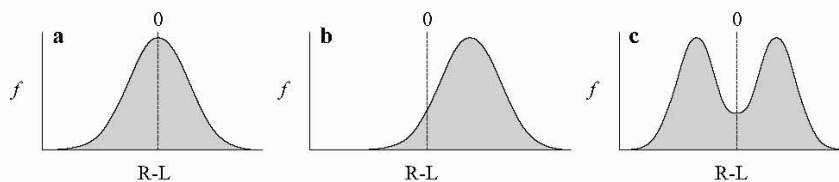
This study focused on verifying the fluctuating asymmetry hypothesis in the crustacean *Talitrus saltator*, which lives in sandy beaches. We analysed three populations, one from an unpolluted Tuscan beach relatively free of tourism, and two from Sicilian beaches, which have been increasingly used for tourism and have been exposed to hydrocarbon/pesticide pollution. Results confirmed the sexual dimorphism in the second antennae flagella, which in the Tuscan population presented directional asymmetry. This population had a significant level of fluctuating asymmetry in the P6 and P3 meri. The results showed the importance of the developmental stage during which environmental mechanical stresses act.

#### 1. Introduction

The aim of our research was to verify the fluctuating asymmetry hypothesis (Møller & Swaddle 1997) in the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* (Montagu 1808) in order to postulate this population characteristic (in the case of a verification of the hypothesis) as an indicator of environmental stress on sandy beach ecosystems. Fluctuating asymmetry is defined at population level as a random slight deviation of a morphological character

The complete text of the paper is available at <http://www.iopan.gda.pl/oceanologia/>

from perfect bilateral symmetry. Body asymmetry is measured through the differences between the right and left elements of bilateral characters of an organism in a population sample. It is usually the result of the different development of the two body sides of an individual. From a statistical point of view, fluctuating asymmetry follows two rules: the values of the differences between the right (R) and left (L) body sides are (1) normally distributed, and (2) have the mean around zero (as a certain number of individuals have a character more developed on one side of the body and the same number of individuals have the same character more developed on the other side). The variance of the frequency distribution characterises the asymmetry level of each character. The analysis of statistical properties makes it possible to distinguish fluctuating asymmetry from other kinds of asymmetry, that is, directional asymmetry and antisymmetry (Figure 1, Palmer 1994). Directional asymmetry is observed when one side tends to be more developed than the other one. In this case it is possible to predict which side of the character will be greater before its development. In directional asymmetry the values of the differences between the right and left sides of the body are normally distributed, but with the mean significantly different from zero. In directional asymmetry development path deviations are oriented towards a specific direction and genetically coded. Antisymmetry occurs when one side of a character is larger than the other one, but there is no preference for one side. Therefore, it is not possible to predict which side will be larger. An example in crustaceans is the male fiddler crab (the genus *Uca*). These crabs begin their life with two large signal claws, similarly developed. Developmental asymmetry is determined by which of the two claws will first be damaged or lost. The damaged or lost claw will grow again, but will be small, like those of females. This will happen in a random way, with 50% occurring on the right side and 50% on the left; then there is a typical bimodal distribution (in the same sample there are two groups of individuals which tend to develop claws in opposite ways) or a platycurtic (broad-peaked) distribution of the R-L difference



**Figure 1.** Three common frequency distributions of R-L (difference values between right and left body sides) in bilateral organisms: a) fluctuating asymmetry; b) directional asymmetry; c) antisymmetry (from Palmer 1994, modified)

values around a mean of zero (Palmer & Strobeck 1986, Møller & Swaddle 1997). Møller & Swaddle's (1997) hypothesis asserts that whenever, during development, there are genetic or environmental stresses, asymmetries of the bilateral structure of an organism will occur. Among genetic stresses we count mutations, a high degree of homozygosity, hybridisation that divides coadapted gene sets, inbreeding, intense periods of directional selection; all these phenomena interfere with the organism's genomic balance, reducing its ability to buffer random developmental mistakes that will eventually result in body asymmetries. Environmental stresses, e.g. adverse temperatures, chemical pollution or food shortage, can further destabilise organisms during sensitive phases of their development. Therefore, populations showing different levels of fluctuating asymmetry are very likely subjected to different degrees of stress. The bilateral characters of an individual are distinguished in: 1) meristic characters, which are in a discrete quantity and can be counted; asymmetry of these characters is usually suggestive of extremely high levels of stress; 2) metric characters, i.e. distance measures between two points of the body; metric characters are more sensitive indicators of the developmental stability of an organism (Møller & Swaddle 1997).

We used the supralittoral amphipod *Talitrus saltator*, a common species of sandy beach communities in the north-eastern Atlantic, southern Baltic and Mediterranean, to test for the possible relation between fluctuating asymmetry and the degree of environmental stress acting on beach ecosystems. The species has a number of characteristics that make it a reliable model organism for this kind of research. First, its morphology (bilateral symmetry and metameric organisation) is particularly well suited to morphometric analyses (Barca-Bravo et al. 2008). Second, the species is relatively widespread with abundant populations (Scapini & Morgan 2002). Third, this species is robust enough to be found also in relatively polluted and/or disturbed beach ecosystems; for this reason it cannot be considered an indicator species of impact for its presence/absence, but differences between local populations may reflect differences between beaches (Scapini & Morgan 2002). Nevertheless, a reduction and/or disappearance of *T. saltator* populations was documented from beaches where tourist pressure was high (Węśławski et al. 2000). It was suggested that the dynamics of *T. saltator* populations could be used as a bioindicator of environmental stress caused by activities linked to tourism (Jędrzejczak 2004, Fanini et al. 2005). More importantly, *T. saltator* has been the subject of extensive studies, which has led to a detailed knowledge of the species' population dynamics (Marques et al. 2003), behavioural adaptations (a review in Scapini 2006) and population genetic structure (De Matthaëis et al. 2000, Ketmaier et al. 2005). The genetic homeostasis hypothesis

(Lerner 1954) received support from interdisciplinary researches based on the simultaneous analysis of molecular markers and orientation behaviour related to shoreline stability (Scapini et al. 1995, Ketmaier et al. 2010).

The present study focused on morphometry. For each individual, we examined one meristic bilateral character (the number of articles of the second antennae flagellum) and three metric bilateral characters, which are associated with different periods of the development of individuals (length of the merus of the P3, P6 and P7 pereopods). In addition, we measured the length of the cephalic capsule as a proxy of body size (Marques et al. 2003). We studied three populations: two from south-eastern Sicily and one from Tuscany. The Sicilian populations have been exposed to hydrocarbon (this is a zone of marine oil drilling) and pesticide pollution (from greenhouses). Furthermore, in recent years these beaches have been increasingly used for tourism. The Tuscan population came from a natural park, the Maremma Regional Park, an unpolluted location relatively free from tourism (Fanini et al. 2005). We evaluated the degree of fluctuating asymmetry in the three populations to study possible relations with the impacts of activities linked to tourism and oil or pesticide pollution of water and sediments.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study site description and sampling

We sampled three populations from the following sandy beaches (Figure 2 and Table 1):

1. Italy – southern Tuscany – Maremma Regional Park (province of Grosseto) – Collelungo ( $42^{\circ}38'10.14''\text{N} - 11^{\circ}04'07.95''\text{E}$ ).
2. Italy – south-eastern Sicily – Malta Channel (province of Ragusa) – Maganuco ( $36^{\circ}43'01.00''\text{N} - 14^{\circ}49' 13.62''\text{E}$ ).
3. Italy – south-eastern Sicily – Malta Channel (province of Ragusa) – Bruca ( $36^{\circ}44'07.65''\text{N} - 14^{\circ}40'41.75''\text{E}$ ).

After moving the superficial layer of sand, we captured talitrids using an entomological aspirator. We collected only adult talitrids and the samples consisted of about 50 individuals for each population. Then we measured the sampling area. Talitrids were then transferred to a glass container containing moist sand from the same beach and with perforations to ensure aeration. On the same day of the sampling, or on the following day, the talitrids were placed singly into Eppendorf tubes filled with absolute ethanol (99.9%), and thereafter stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Table 1.** Characteristics of the study sites

Beach	Collelungo (Tuscany)	Maganuco (Sicily)	Bruca (Sicily)
length	4400 m	890 m	1630 m
maximum width (diurnal low tide)	32.73 m	80 m	27.50 m
width at the capture point (diurnal low tide)	32.73 m	45.90 m	27.50 m
mean orientation (perpendicular to the shoreline)	211°	174°	234°
dune vegetation	yes	yes	yes (small cottages behind the dunes)
lateral boundaries	rocks on one side, gravel and rocks on the other side	rocks on both sides	rocks on one side, gravel and rocks on the other side
access points	2	6, of which 3 frequently used	3, of which 2 are adjoining and frequently used
stream or drain	yes, left bank of the Ombrone River, 5051 m from the sampling point	no	yes, a drain from greenhouses located behind flows into the sea, 678 m from the sampling point
protected area	yes	no	no
tourist presence	yes, especially in April and May	yes, especially in August	yes, especially in August
sand cleaning	no	yes, mechanical, in August	no
presence of tali- trids	everywhere on the beach	in the eastern part of the beach (not very frequented by tourists)	everywhere, except in the 380 m around the main access points
sampling dates	3 October 2008	21–23 August 2008	25 August 2008
area in which we collected about 50 talitrids	10 m <sup>2</sup>	17 m <sup>2</sup>	21 m <sup>2</sup>
number of collect- ed talitrids	54	50	50
density (individuals m <sup>-2</sup> )	5.4	2.9	2.4
presence of tali- trids after one year	yes, more abundant	yes	yes, but with lower density, the beach was slightly narrower

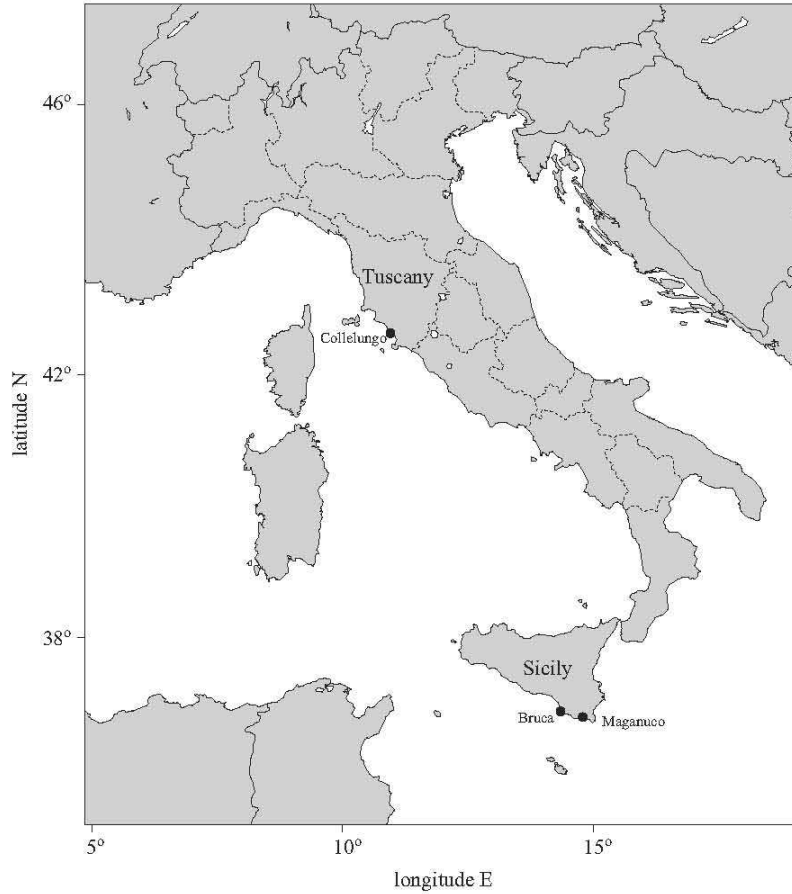
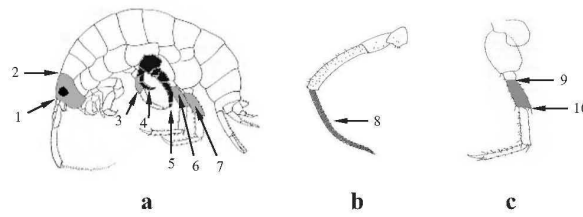


Figure 2. Location of the study sites

## 2.2. Morphometric measurements

The first basic criterion for the choice of bilateral segments to measure was the clarity and constancy of landmarks. The second was to avoid linking the measure of one trait to another. For example, the use of a spine as the landmark of a segment would give a biased measure, by proceeding from the point where the spine develops and depending on its length and orientation. The third principle was to analyse rectilinear segments, as we took the measures directly by the micrometer eyepiece of the stereomicroscope, without taking photos and performing image analyses. Finally, we did not measure two or more segments of the same appendage, e.g. the merus and carpus, as they correlate (personal observation). In view of the anamorphic



**Figure 3.** Diagram illustrating: a) *Talitrus saltator*. In black – the appendages that will be used for genetic analyses, in grey – the segments used for morphometric analyses, 1. distal landmark of the cephalic capsule, base of the first antenna, 2. proximal landmark, posterior end of the cephalic capsule, 3. merus of the P3 pereiopod, 4. P4 pereiopod, 5. P5 pereiopod, 6. merus of the P6 pereiopod, 7. merus of the P7 pereiopod; b) The second antenna, 8. articles of the flagellum (in grey); c) P6 pereiopod, the merus is shown in grey, 9. proximal landmark, light notch with the ischiopodite, 10. distal landmark, apex of the knee (disregarding the spine)

**Table 2.** Segments measured and landmarks used

	Cephalic capsule	Right and left second antennae (A2)	Right and left P3 pereiopods	Right and left P6 pereiopods
segment		flagellum	merus	merus
face			outer	inner
side	right		anterior	posterior
proximal landmark	posterior end of the capsule		light notch with ischiopodite	light notch with ischiopodite
distal landmark	base of the first antenna		apex of the knee (disregarding the spine)	apex of the knee (disregarding the spine)
		Right and left P7 pereiopods		
segment	merus			
face	inner			
side	posterior			
proximal landmark	light notch with ischiopodite			
distal landmark	apex of the knee (disregarding the spine)			

development of crustaceans (first the anterior part of the body, then the posterior), the P3, P4, P5, P6 and P7 pereiopods were suitable for our aims. We decided to use the right and left P4 and P5 pereiopods for genetic

analyses, as it is possible to extract a sufficient quantity of DNA from them (study in progress), while the right and left P3, P6 and P7 pereopods were shown to be the best candidates for the morphometric analyses. In these appendages the merus is the best segment with regard to landmarks and ease of measuring at the magnification of 50x. When studying fluctuating asymmetry it is important that the units used are not too large in relation to the actual asymmetry. According to our observations, the posterior side was the most suitable for the P6 and P7 meri; for both segments, the distal landmark was the apex of the knee (disregarding the spine), while the proximal one was the light notch with the ischiopodite, best observed looking from the inner face of the segment. For the P3 merus, the anterior side was the most suitable, with the same landmarks as for the P6 and P7 meri, but best observed from the external face of the segment. Figure 3 and Table 2 summarise the segments and appendages chosen for the genetic and morphometric analyses and the landmarks.

Below we give the protocol we prepared to ensure the best conditions for the morphometric and genetic analyses of each individual, to avoid breakage or confusion of appendages, and finally, to reduce the impact of human measurement error. Each individual was placed in a little glass sink filled with absolute ethanol and was observed under a stereomicroscope. From each sandhopper we took the right and left P4 and P5 pereopods by means of sterilised dissecting forceps and transferred these appendages into an Eppendorf tube filled with absolute ethanol for subsequent genetic analyses. For each individual we prepared two histology slides, one for the right appendages and the other for the left. On the short sides of the slides we wrote 'Head' and 'Telson', on the longer ones we wrote 'Proximal' and 'Distal' as reference points to ensure all the segments were properly placed and to reduce the risk of confusion. Then we took the right P7, P6 and P3 pereopods and placed them on the 'Right' histology slide; we did the same for the left appendages. Using 50x magnification, we counted the number of flagella articles of the right and left second antennae. Then, using morphological keys (Karaman 1993, Ruffo (ed.) 1993) we identified the species the sandhopper under observation belonged to. All the individuals captured were *Talitrus saltator*, but two, both from Bruca beach, had broken third uropods, so they could not be definitively identified as *T. saltator*. Therefore the total number of individuals for Bruca decreased to 48. For each sandhopper we defined the sex by recording, in males, the two penes, which appear as two small opposite tubes in the ventral face of the individual at the seventh mesosomite level. We recognised females from the oostegites, two contralateral lines of thin foils visible in the ventral face of the sandhoppers from the second to the fifth mesosomite. For



each female, we determined whether it was immature (small oostegites), fully developed (small setae on the oostegites, which, interlacing with the opposite ones, create a bag, the marsupium) or with eggs/hatched juveniles in the marsupium; in the last case we counted the number of eggs or hatched juveniles. Using 25x magnification, we detached the cephalic capsule and placed it to show its right side; then we measured its length from the base of the right first antenna to the posterior end of the capsule. We stored the remains of the sandhopper in its original Eppendorf tube. Successively, putting the 'Right' and 'Left' histology slides under the stereomicroscope one at a time, we disarticulated the meri of the P7, P6 and P3 pereopods from the rest of each appendage. This procedure allowed for a better identification of the landmarks. The P7 and P6 meri showed their inner face, while the P3 merus showed the outer one. To achieve a better contrast we used a black background under the slides. Using 50x magnification, we performed two measurements of the posterior sides of the P7 and P6 meri and of the anterior side of the P3 meri. We carried out two measurements of the same merus of each sandhopper on the same day, with a time lapse of at least three hours. Between the two measurements of the same merus, we analysed other samples, so that the observer was not conditioned by the previous outcomes.

The metric measures obtained by the stereomicroscope were converted to micrometers by suitable conversion calculations. The samplings and measurements of sandhoppers were both performed by the same person to reduce the error due to different observers.

### 2.3. Statistical analysis

The analysis of fluctuating asymmetry (FA) was performed as recommended by Palmer & Strobeck (1986) and Palmer (1994) using Excel and S-Plus 6 for Windows. The significance level was 5%.

Outliers are a common source of skew or leptokurtosis in studies of fluctuating asymmetry. The difference values between the right and left sides of the body (R-L) in a few individuals in a large and otherwise normally distributed sample, may deviate unusually far from zero. Sandhoppers that were lacking in one of the bilateral appendages were outliers, as this strong difference between the values of the two sides of their body would have seriously affected the fluctuating asymmetry index. We excluded outliers from the analyses also because their values may be related to physical damage or severe deformities, and these events are not developmental noise (Palmer 1994). Thus, before performing the tests for measurement error, box plots of the right and left sides and of the cephalic capsule were made and screened for outliers. If one sandhopper was an outlier, e.g. for the

second antennae, we excluded it only from the statistical analysis of the second antennae, but not from that of other traits. If one sandhopper was an outlier for any of the pereopods we excluded it from the statistical analysis of all pereopods. Table 3 reports the numbers of sandhoppers collected and those actually subjected to further statistical analyses for each trait.

**Table 3.** Number of sandhoppers collected and statistically analysed for each trait in each population after the exclusion of outliers by box plots

Population	Collected sandhoppers	Cephalic capsule	Number of articles of the second antenna flagellum	P7, P6 and P3 merus
Collelungo	54	52	46	46
Maganuco	50	49	41	43
Bruca	48	48	43	46

The chi-square test was used to test the sex ratio of the sample of each population. For metric traits we used the  $F$  and  $t$  tests to compare the first and the second measures of a segment. Having ruled out significant contributions of human measurement error, the two replica measurements were averaged for further analysis. For each trait, we divided the population samples according to sex to check whether there was sexual dimorphism. When this was absent, males and females were put together for further analysis. For each bilateral trait the presence of directional asymmetry was tested by one-sample  $t$ -test. Normality was tested using graphical techniques. The fluctuating asymmetry levels were analysed with the index  $FA1 = \text{Mean } |R-L|$  (as defined by Palmer 1994). One-way ANOVAs were used to test differences among populations for each of the traits and for fluctuating asymmetry levels.

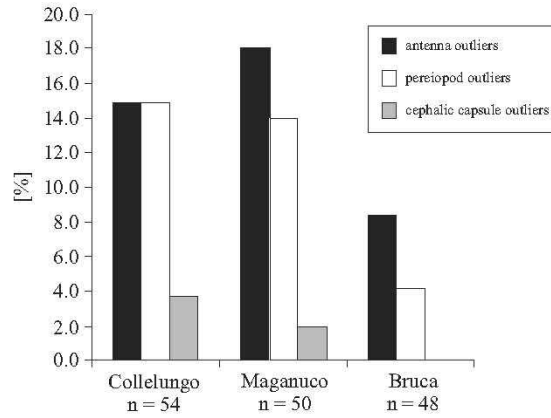
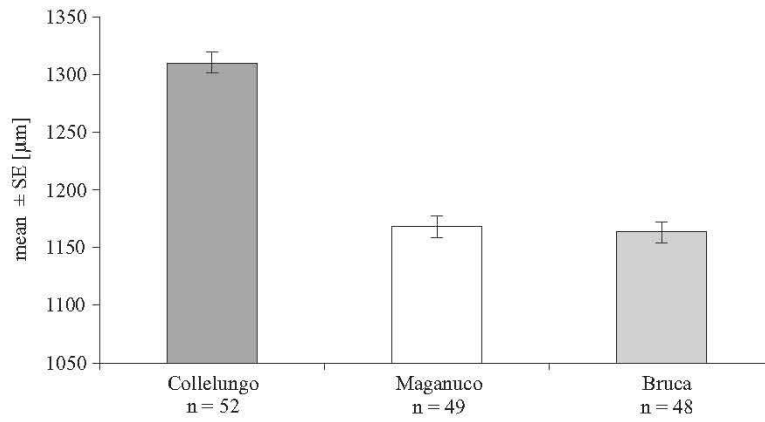
### 3. Results

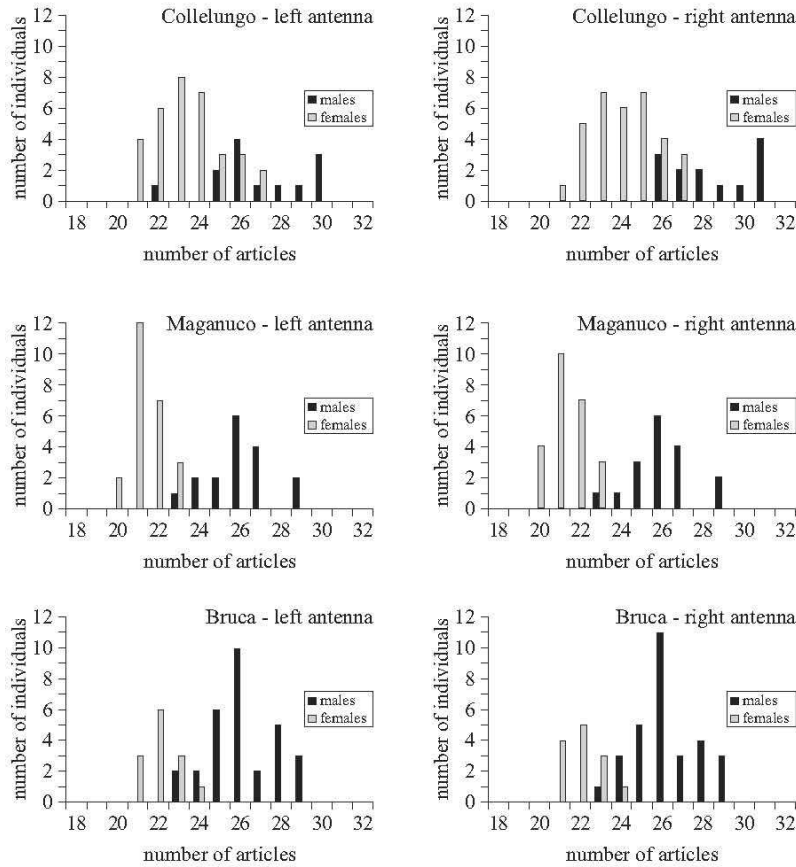
The sex ratios (males/females) of the samples were significantly female biased in the Collelungo population (0.50,  $\chi^2$ -test:  $p < 0.05$ ), but significantly male biased in the Bruca population (2.69,  $\chi^2$ -test:  $p < 0.01$ ); in the Maganuco population females were more abundant than males but the sex ratio was not significantly different from the expected balance of 1:1 (Table 4).

Comparing the three samples we observed that in Collelungo and Maganuco there were the highest percentages of outliers for all the traits measured, while the Bruca population had the lowest ones (Figure 4).

**Table 4.** Sex ratio in the three populations

Population	Collelungo	Maganuco	Bruca
n	54	50	48
n males	18	19	35
n females	36	31	13
sex ratio	0.50	0.61	2.69
$\chi^2$ -test	p < 0.05	n. s.	p < 0.01

**Figure 4.** Percentage of outliers for the traits measured in the three populations**Figure 5.** Mean length  $\pm$  SE [ $\mu\text{m}$ ] of the cephalic capsule in the three populations



**Figure 6.** Sexual dimorphism of the number of articles of the second antennae flagella

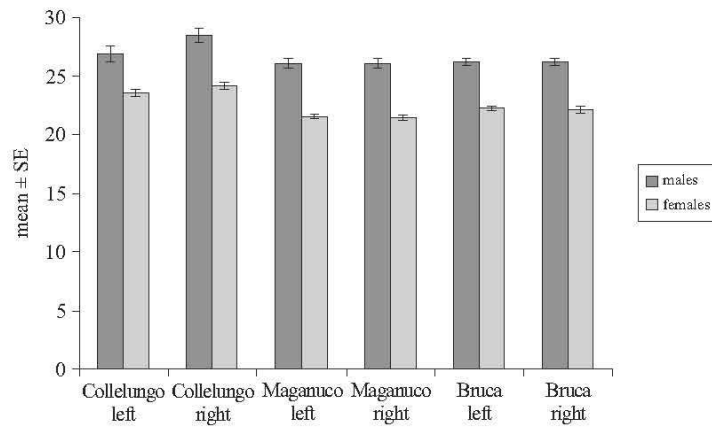
**Table 5.** Cephalic capsule length [ $\mu\text{m}$ ]: comparison between sexes by  $F$  and  $t$  tests

Population	Collelungo	Maganuco	Bruca
male mean $\pm$ SE	1302.35 $\pm$ 19.07	1181.47 $\pm$ 17.40	1157.94 $\pm$ 10.56
female mean $\pm$ SE	1314.86 $\pm$ 10.36	1160.00 $\pm$ 11.05	1178.46 $\pm$ 19.47
$F$ -test	n. s.	n. s.	n. s.
$t$ -test	n. s.	n. s.	n. s.

Sandhoppers from Collelungo had significantly (ANOVA:  $p < 0.001$ ) larger cephalic capsules than those of the two Sicilian populations, which did not differ from each other (Figure 5). We checked whether there was any

sexual dimorphism of the cephalic capsules, but there were no significant differences (Table 5).

As regards the number of articles of the second antennae flagella, considering males and females together, graphically the data were not normally distributed in either of the three populations. Therefore, we divided each sample according to sex and obtained normally distributed data for each sex. In each population, we found significant sexual dimorphism, with males having a greater number of articles than females, on both the right and left antennae (*t*-test:  $p < 0.001$ ) (Figures 6, 7 and Table 6).



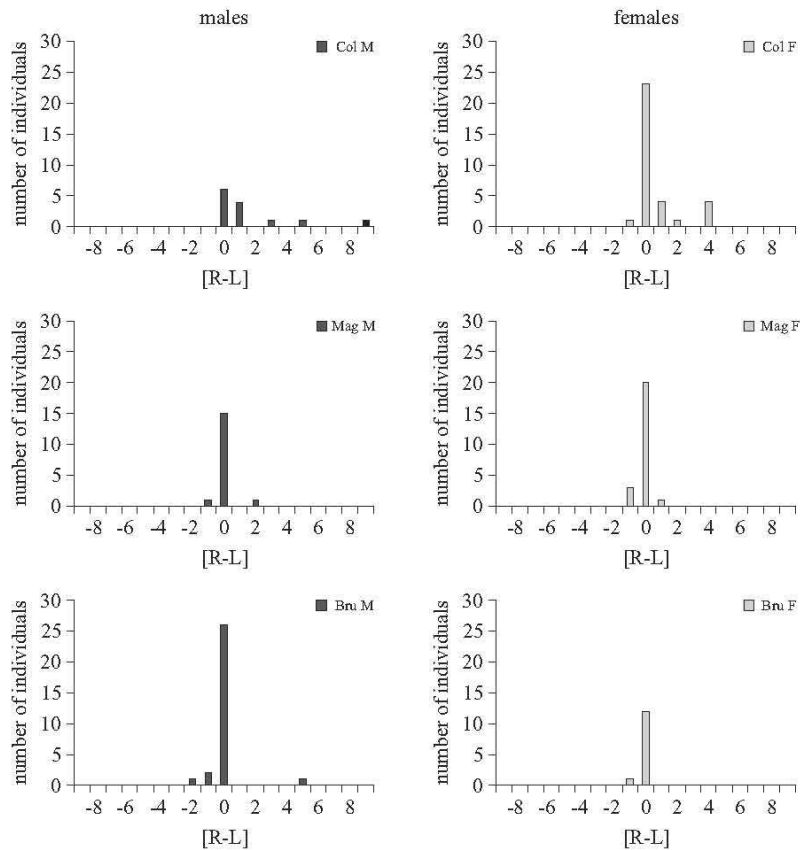
**Figure 7.** Sexual dimorphism: mean number  $\pm$  SE of articles in the second antennae flagella

**Table 6.** Number of articles of the second antennae flagella: comparisons between males and females

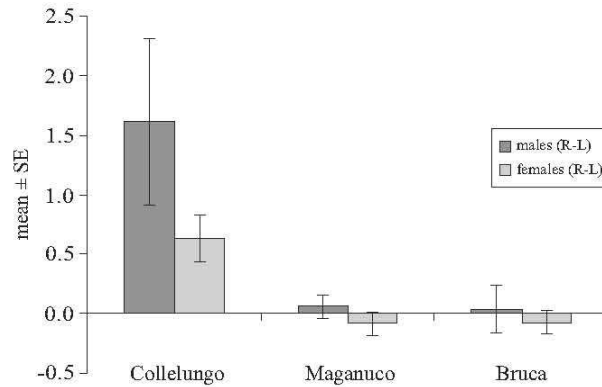
Population		Side	Males	Females	<i>F</i> -test	<i>t</i> -test
Collelungo	n		13	33		
Collelungo	mean $\pm$ SE	left	26.9 $\pm$ 0.7	23.5 $\pm$ 0.3	n. s.	$p < 0.001$
Collelungo	mean $\pm$ SE	right	28.5 $\pm$ 0.6	24.1 $\pm$ 0.3	n. s.	$p < 0.001$
Maganuco	n		17	24		
Maganuco	mean $\pm$ SE	left	26.1 $\pm$ 0.4	21.5 $\pm$ 0.2	$p < 0.05$	$p < 0.001$
Maganuco	mean $\pm$ SE	right	26.1 $\pm$ 0.4	21.4 $\pm$ 0.2	$p < 0.05$	$p < 0.001$
Bruca	n		30	13		
Bruca	mean $\pm$ SE	left	26.2 $\pm$ 0.3	22.2 $\pm$ 0.2	$p < 0.05$	$p < 0.001$
Bruca	mean $\pm$ SE	right	26.2 $\pm$ 0.3	22.1 $\pm$ 0.3	n. s.	$p < 0.001$

In each sex, we tested the right and left antennae for the presence of directional asymmetry, analysing the values of the differences between the right and left sides (R-L). In the Collelungo population both males and females had a significantly (one-sample  $t$ -test:  $p < 0.05$ ) greater number of articles in the right antenna flagellum than in the left one. In the Maganuco and Bruca sandhoppers, there was no significant difference between the right and left antennae in either sex. Therefore, right directional asymmetry may be present in the Collelungo population (Figures 8 and 9).

For each of the P7, P6 and P3 pereopod meri, we compared the first and second measures of the same side of a segment using  $F$  and  $t$  tests. We did

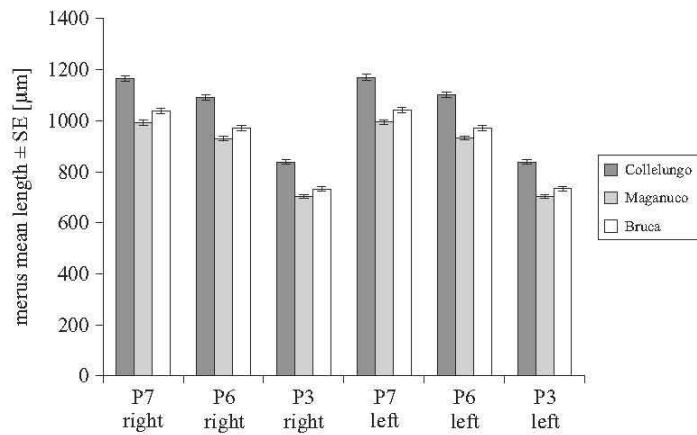


**Figure 8.** Distributions of the difference values between the number of articles of the right and left second antennae flagella (R-L) in each sex in the three populations. Col = Collelungo; Mag = Maganuco; Bru = Bruca; M = Males; F = Females



**Figure 9.** Means ( $\pm$ SE) of the differences between the number of articles of the right and left second antennae flagella (R-L) in each sex in the three populations

not find any significant difference between the first and the second measures in any populations for any meri, for either the right or left sides. Therefore, having ruled out any significant contribution of human measurement errors, the two replica measurements of each side were averaged for further analysis. To check whether there was any sexual dimorphism of the meri, we divided each population according to sex. In the Collelungo and Bruca populations no significant difference between sexes was found in any pereiopods. In the Maganuco population the  $F$ -test showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) when males and females were compared for the left merus of the P3



**Figure 10.** Mean length  $\pm$  SE [ $\mu$ m] of the right and left meri of the P7, P6 and P3 pereiopods in the Collelungo, Maganuco and Bruca populations

Table 7. Mean length  $\pm$  SE [ $\mu\text{m}$ ] of the right and left P7, P6, P3 meri in males and females in each population: comparisons between sexes by  $F$  and  $t$  tests

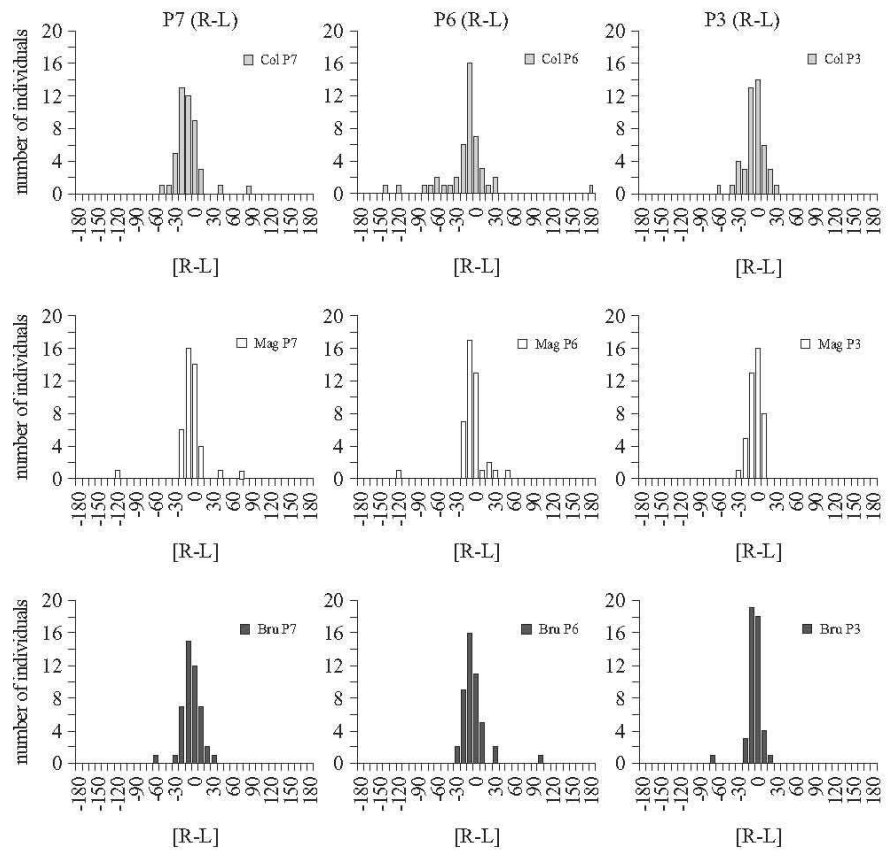
Population	Pereiopods	Side	n	Males	Females	$F$ -test	$t$ -test
Collelungo	P7	left	n	14	32		
Collelungo			mean $\pm$ SE	1189.93 $\pm$ 20.96	1161.31 $\pm$ 13.11	n. s.	n. s.
Collelungo	P7	right		1189.00 $\pm$ 19.98	1154.84 $\pm$ 12.63	n. s.	n. s.
Collelungo	P6	left		1126.71 $\pm$ 19.64	1090.09 $\pm$ 11.54	n. s.	n. s.
Collelungo	P6	right		1112.00 $\pm$ 19.32	1081.97 $\pm$ 11.79	n. s.	n. s.
Collelungo	P3	left		853.79 $\pm$ 18.41	831.03 $\pm$ 9.76	n. s.	n. s.
Collelungo	P3	right		854.93 $\pm$ 18.61	829.53 $\pm$ 9.18	n. s.	n. s.
Maganuco			n	16	27		
Maganuco	P7	left		1016.88 $\pm$ 18.24	980.74 $\pm$ 10.13	n. s.	n. s.
Maganuco	P7	right		1015.56 $\pm$ 19.74	979.96 $\pm$ 10.16	n. s.	n. s.
Maganuco	P6	left		940.63 $\pm$ 14.99	926.52 $\pm$ 9.45	n. s.	n. s.
Maganuco	P6	right		936.75 $\pm$ 18.00	925.19 $\pm$ 9.78	n. s.	n. s.
Maganuco	P3	left		722.25 $\pm$ 15.58	690.67 $\pm$ 7.47	p < 0.05	n. s.
Maganuco	P3	right		720.25 $\pm$ 14.59	691.89 $\pm$ 7.81	n. s.	n. s.
Bruca			n	34	12		
Bruca	P7	left		1051.21 $\pm$ 12.05	1006.92 $\pm$ 20.54	n. s.	n. s.
Bruca	P7	right		1048.00 $\pm$ 12.20	1009.50 $\pm$ 18.94	n. s.	n. s.
Bruca	P6	left		977.94 $\pm$ 11.45	951.67 $\pm$ 17.85	n. s.	n. s.
Bruca	P6	right		980.15 $\pm$ 11.18	947.33 $\pm$ 17.78	n. s.	n. s.
Bruca	P3	left		740.76 $\pm$ 9.61	710.75 $\pm$ 13.04	n. s.	n. s.
Bruca	P3	right		739.79 $\pm$ 9.59	712.08 $\pm$ 13.41	n. s.	n. s.



pereiopods; yet, as in all other comparisons, the *t*-test was not significant (Table 7). Thus, we considered the two sexes together.

Using one-way ANOVA, we compared the length of the meri of each pereiopod in the three populations. In the Collelungo sandhoppers the meri of the right and left P7, P6 and P3 pereiopods were significantly longer than in the Sicilian populations ( $p < 0.001$ ). Moreover, in the Bruca talitrids the meri of the right and left P7, P6 and P3 pereiopods were significantly longer than in the Maganuco population ( $p < 0.01$ ) (Figure 10).

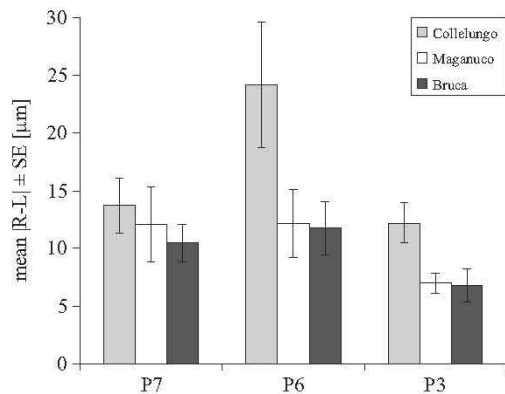
In all populations and in all meri the values of the differences between the right and left sides (R-L) were normally distributed and their means were not significantly different from zero (one-sample *t*-test), so we excluded



**Figure 11.** Distributions of the difference values (R-L) between the right (R) and left (L) meri of the P7, P6 and P3 pereiopods in the three populations. Col = Collelungo; Mag = Maganuco; Bru = Bruca

directional asymmetry (Figure 11). The plots showed normality, thus antisymmetry was discarded.

The fluctuating asymmetry levels of the three populations were analysed by the  $FA1 = \text{Mean } |R-L|$  index (Palmer 1994), and the differences among the populations were tested by one-way ANOVA. The Collelungo sandhoppers had a significantly greater level of fluctuating asymmetry in the P6 meri and in the P3 meri than the Sicilian populations ( $p < 0.05$ ). The fluctuating asymmetry levels of the Maganuco and Bruca populations did not significantly differ from each other. No significant difference among the three populations was found for the P7 merus, which is the longest of the three meri measured and develops later (Figure 12).



**Figure 12.** Fluctuating asymmetry values ( $FA1 \text{ index} = \text{Mean } |R-L| \pm SE$ ) for the meri of the P7, P6 and P3 pereiopods in the three populations

#### 4. Discussion

We may assume that the three samples analysed were representative of the respective populations, which were abundant and contained ovigerous females and juveniles (personal observations); for the purposes of this study we sampled only adults. As the sandhoppers were captured by the same person using the same method, we assumed that the sex ratios recorded in the samples reflected those actually existing in the populations at the moment of sampling. As regards outliers for the measured traits, we inferred that those percentages were real and not to be ascribed to the method of capture. The use of entomological aspirators to capture small arthropods is generally assumed to be a non-invasive method.

The study confirmed the sexual dimorphism of the second antennae flagella in *Talitrus saltator* (Ruffo (ed.) 1993). Sexual dimorphism in this

species seems to be limited to this trait and does not extend to the cephalic capsule or to the meri of the P3, P6 and P7 pereopods. Yet we think this result, especially for the meri, merits further analysis.

Right directional asymmetry was observed in the second antenna flagellum in the Collelungo population. The sensory function of the antennae and their role in closing the burrow in the sand are known (Schellenberg 1942, pp. 139–140, and personal observations). Directional asymmetry is more likely in bilateral sensory organs (Møller & Swaddle 1997). However, the right directional asymmetry in the Collelungo sandhoppers, but not in the Maganuco and Bruca sandhoppers, remains to be explained.

In the merus of the P3 and P6 pereopods, the Collelungo sandhoppers showed a higher fluctuating asymmetry level than the Sicilian populations. The absence of fluctuating asymmetry in the merus of the P7 pereopod, the longest one, may be linked to its functional importance for the balance of a laterally compressed body (Schellenberg 1942, pp. 139–140). According to the same line of thinking, we suggest that the merus of the P3 pereopod has the highest level of fluctuating asymmetry because it is not used for balancing, but for crawling on the sand. Even though it is located within a nature reserve, the Collelungo beach has a relatively high presence of visitors (sometimes on horseback, personal observations) during April and May, which is the period of sandhopper development; during the summer months, for fire prevention, the nature reserve is closed to visitors, so it is possible to reach the beach only on foot from an entrance 5 km away (Fanini et al. 2005). In contrast, the two Sicilian beaches are not frequented during the period of sandhopper development, whereas there is a relatively high presence of tourists during August. In this month, in Maganuco we noticed the disappearance of sandhoppers from the western part of the beach, in the vicinity of a holiday village and the main access points, where the tourist flow is greatest. Similarly, sandhoppers were found everywhere on the Bruca beach, except in the 380 m around the two main access points. It must be stressed that in southern Sicily in August the sandhoppers born in spring are already developed and a new generation develops in the following autumn months (personal observations). Taking into account the developmental stage in which environmental stresses act, fluctuating asymmetry levels of the meri of the P6 pereopod and especially the P3 pereopod may be postulated as a bioindicator of mechanical stress (e.g. direct trampling) on sandy beach ecosystems. The use of *T. saltator* populations as bioindicators has the advantage that comparisons can be drawn over a wide geographical area (the species distribution) and throughout the year (mean life cycle of the species). This has been suggested by several authors for different traits:

population structure (Fanini et al. 2005), genetic variability (Ugolini et al. 2004), abundance and orientation behaviour (Fanini et al. 2007). Here we suggest the fluctuating asymmetry level, which is a quantitative trait of development.

Another possible explanation of the higher fluctuating asymmetry level observed in the Collelungo sandhoppers as compared with the Sicilian populations analysed could be the latitudinal difference. Weather stress, e.g. storms during spring and early summer, may negatively influence sandhopper development. This hypothesis could be tested by evaluating the fluctuating asymmetry level in populations from higher latitudes (this study is under preparation).

A further use of the fluctuating asymmetry level as a bioindicator of environmental stress could be its relation with pollution levels. In south-eastern Sicily oil drilling occurs in the coastal sea, and it is common to find tarry residues from oil wells or the illegal flushing of oil tankers in the sand of beaches (included those we examined, personal observations). Besides, at Bruca beach drainage waters containing pesticides from greenhouses backing the beach are discharged into the sea. However, we did not find any difference between the two Sicilian populations analysed, and their fluctuating asymmetry levels were lower than those of the Collelungo population. Also Barca-Bravo et al. (2008) obtained a negative result regarding the possible use of the fluctuating asymmetry level in *T. saltator* populations as a bioindicator of environmental stress due to oil pollution. These authors compared three populations from Spanish beaches differently impacted by the Prestige oil spill in 2002. They found a higher level of fluctuating asymmetry in the population from the beach most subject to activities linked to tourism and industry than in the populations from oil polluted beaches. The absence of a significant level of fluctuating asymmetry in the *T. saltator* populations exposed to oil (Spain and Sicily) and pesticide (Sicily) pollution of water and sediments may reflect high levels of tolerance.

## Acknowledgements

We thank the staff of the Maremma Regional Park (Grosseto, Italy) for allowing us to perform the sampling.

## References

- Barca-Bravo S., Servia M. J., Cobo F., Gonzalez M. A., 2008, *The effect of human use of sandy beaches on developmental stability of Talitrus saltator (Montagu, 1808) (Crustacea, Amphipoda). A study on fluctuating asymmetry*, Mar. Ecol., 29 (1), 91–98.

- De Matthaëis E., Davolos D., Cobolli M., Ketmaier V., 2000, *Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations of four talitrid species in the Mediterranean Sea*, *Evolution*, 54 (5), 1606–1613.
- Fanini L., Martín Cantarino C., Scapini F., 2005, *Relationships between the dynamics of two *Talitrus saltator* populations and the impacts of activities linked to tourism*, *Oceanologia*, 47 (1), 93–112.
- Fanini L., Marchetti G. M., Scapini F., Defeo O., 2007, *Abundance and orientation responses of the sandhopper *Talitrus saltator* to beach nourishment and groynes building at San Rossore natural park, Tuscany, Italy*, *Mar. Biol.*, 152 (5), 1169–1179.
- Jędrzejczak M. F., 2004, *Sandy coastline ecosystem management – Bridging sustainability and productivity of sandy beaches*, The 3rd IUCN World Conservation Congr., Bangkok, Thailand, 17–25 November 2004, Knowledge Marketplace Rep., 9 pp.
- Karaman G. S., 1993, *Crustacea Amphipoda of freshwaters (in Italian)*. *Fauna d'Italia*, Ediz. Calderoni, Bologna, XXXI, 337 pp.
- Ketmaier V., De Matthaëis E., Fanini L., Rossano C., Scapini F., 2010, *Variation of genetic and behavioural traits in the sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) along a dynamic sand beach*, *Ethol. Ecol. Evol.*, 22 (1), 17–35.
- Ketmaier V., Iuri V., De Matthaëis E., 2005, *Genetic resources and molecular markers in *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) from the beach of Smir*, *Trav. Inst. Scient.*, Rabat Sér. Gén. 4, 55–59.
- Lerner I. M., 1954, *Genetic homeostasis*, Oliver and Boyd, Edinburgh, 134 pp.
- Marques J. C., Gonçalves S. C., Pardal M. Â., Chelazzi L., Colombini I., Fallaci M., Bouslama M. F., El Gtari M., Charfi-Cheikhrouha F., Scapini F., 2003, *Comparison of *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) biology, dynamics, and secondary production in Atlantic (Portugal) and Mediterranean (Italy and Tunisia) populations*, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 58 (S), 127–148.
- Møller A. P., Swaddle J. P., 1997, *Asymmetry, development stability and evolution*, Oxford Univ. Press, Oxford, 291 pp.
- Palmer A. R., 1994, *Fluctuating asymmetry analyses: a primer*, [in:] *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*, T. A. Markow (ed.), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 335–364.
- Palmer A. R., Strobeck C., 1986, *Fluctuating asymmetry: measurements, analysis, patterns*, *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 17, 391–421.
- Ruffo S. (ed.), 1993, *The Amphipoda of the Mediterranean. Part 3*, Mém. Inst. Océanogr., Monaco, 577–813.
- Scapini F., 2006, *Keynote papers on sandhoppers orientation and navigation*, *Mar. Freshw. Behav. Phy.*, 39 (1), 73–85.
- Scapini F., Buiatti M., De Matthaëis E., Mattoccia M., 1995, *Orientation behaviour and heterozygosity of sandhopper populations in relation to stability of beach environments*, *J. Evolution. Biol.*, 8 (1), 43–52.

- Scapini F., Morgan E., 2002, *Bioassays for estimation of beach stability and ecosystem quality*, [in:] *Baseline research for the integrated sustainable management of Mediterranean sensitive coastal ecosystems. A manual for coastal managers, scientists and all those studying coastal processes and management in the Mediterranean*, F. Scapini (ed.), Inst. Agronom. Oltremare, Florence, 120–122.
- Schellenberg A., 1942, *Flohkrebse oder Amphipoda*, Tierw. Deutschlands, 40 (I–IV), 252 pp.
- Ugolini A., Borghini F., Calosi P., Bazzicalupo M., Chelazzi G., Focardi S., 2004, *Mediterranean Talitrus saltator (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination*, Mar. Pollut. Bull., 48 (5–6), 526–532.
- Węśławski J. M., Stanek A., Siewert A., Beer N., 2000, *The sandhopper (Talitrus saltator, Montagu 1808) on the Polish Baltic coast. Is it a victim of increased tourism?*, Oceanol. Stud., 29 (1), 77–87.

## **8.2. The possible use of sandhoppers as bioindicators of environmental stress on sandy beaches** (in press in *Zoologica Baetica*)

### **Posibilidades de utilización de talitridos como bioindicadores de estrés ambiental en playas de arena**

**Scapini Felicita, Ottaviano Ottavio**

Department of Evolutionary Biology “Leo Pardi”, University of Florence, via Romana 17, 10125 Florence, Italy, [scapini@unifi.it](mailto:scapini@unifi.it)

**Key words:** sandhoppers, talitrids, sandy beaches, bioindicators, fluctuating asymmetry

**Palabras clave:** talitridos, playas de arena, bioindicadores, asimetría fluctuante

#### ***Abstract***

Several studies have addressed the biology and behavioural adaptations of sandhoppers, common and widespread inhabitants of sandy beaches in temperate areas. The increasing stress (both natural and anthropogenic) to which beaches are subject around the world has posed the question of the choice of good bioindicators to monitor changes in sandy beach ecosystems and propose management options for their conservation. Sandhoppers carry out their whole life cycle on the same beach throughout the year, so they may integrate the effects of environmental changes over a yearly time scale in population features. Moreover, throughout their life cycle, sandhoppers occupy various zones of the beach, from the intertidal zone up and behind the dunes, integrating the local spatial scale that is of interest for the management of sandy beaches. Comparisons among populations from beaches subject to different stressful factors have been conducted over a wide geographical scale (that of the species distribution) and a large base of data exists. Population characteristics, such as seasonality of the life cycle, age structure, sex ratio and genetic variation, as well as behavioural and physiological traits, have shown a potential for their use as suitable bioindicators of environmental stress on beaches. In this study, following the hypothesis of Møller and Swaddle we propose the level of fluctuating asymmetry as a bioindicator of mechanical stress during the critical phases of development.

#### ***Resumen***

Muchos estudios previos han tenido como objetivo la biología y las adaptaciones comportamentales de talitridos, que son comunes y ampliamente difundidos en playas de arena de áreas templadas. El aumento de estrés (natural o de origen humano), al que las playas están expuestas a nivel mundial, ha levantado la necesidad de seleccionar bioindicadores adecuados para el monitoreo de cambios que afectan los ecosistemas de las playas y la

proposición de prácticas de manejo para su conservación. Los talitridos desarrollan su entero ciclo vital en la misma playa de origen, durante todo el año, así que en las características de las poblaciones se pueden integrar los efectos de las variaciones ambientales a lo largo de una escala temporal de un año. Además, durante su desarrollo, los talitridos ocupan diferentes zonas de la playa, de la zona intermareal hacia las dunas, cubriendo, a escala local, la entera zona de interés para manejo de playas. Se han comparado poblaciones de playas afectadas por diferentes factores de estrés, en una amplia escala geográfica (coincidente con la de la distribución de la especie), alcanzando una larga base de datos. Las características de población, como estacionalidad del ciclo vital, clases de edad, sex ratio y variación genética, así como componentes comportamentales y fisiológicas, han resultado potenciales bioindicadores de estrés ambiental sobre playas de arena. En este estudio proponemos la asimetría fluctuante, según el hypothesis de Møller y Swaddle, como bioindicador de estrés mecánico ocurriente durante las fases críticas del desarrollo de los individuos.

### **Introduction**

Sandhoppers, e.g. the amphipod talitrids *Talitrus saltator* and *Talorchestia spp.*, are widespread and common inhabitants of sandy beaches in temperate areas and represent an important trophic link (scavengers) between the land and the sea. A rich literature exists on these species, on its zonation and distribution (e.g. Pavesi *et al.*, 2009), life cycle (e.g. Marques *et al.*, 2003), physiological (e.g. Morritt & Spicer, 1998) and behavioural (review in Scapini, 2006) adaptation over a range of beaches. Sandhoppers carry out their whole life cycle on the same beach and move from the intertidal to the supratidal zones and back by adjusting their zonation to the current substrate and trophic features as well as weather conditions and tidal phases (Scapini *et al.*, 1992). The wide and sound baseline of data on the same species in sandy beaches that are subject to increasing pressures and threats (Defeo *et al.*, 2009; Dugan *et al.*, 2010) makes sandhoppers good candidates as bioindicators of environmental stress. The use of talitrids as bioindicators has the advantage to allow comparisons across a wide geographic range (that of the distribution of the species) and throughout years (broods are produced each month, with two or three generations a year, and individuals may live for about one year). Moreover, being the species relatively robust against impacts, differences among populations may be used as early warning indicators of stress, before the populations disappear completely under severe environmental pressures (Scapini, 2002).

The sandhoppers have been repeatedly proposed as bioindicators of the pressure of human trampling on sandy beaches (e.g. Weslawski *et al.*, 2000a, 2000b, 2000c; Fanini *et al.*, 2005; Ugolini *et al.*, 2008). Trampling is an increasing pressure on sandy beaches due to their increasing use for recreational activities. To estimate the carrying capacity of these ecosystems under pressure, it is important to define an early warning bioindicator of trampling, whose estimates



would not depend on the sampling efforts and the abundance of the population at that particular time of the year.

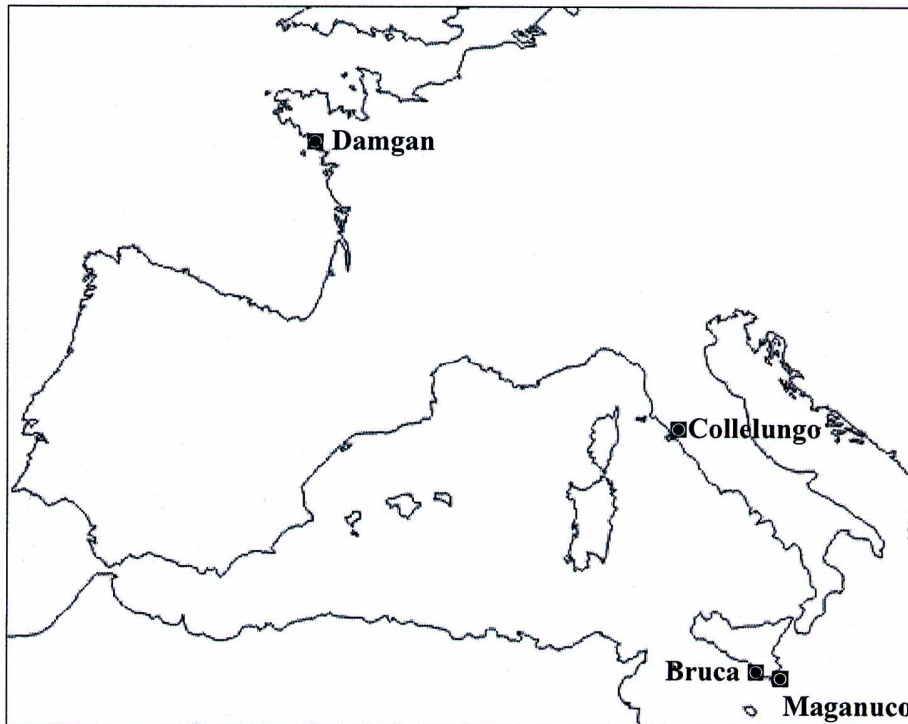
A good candidate for early warning of environmental stress is the level of fluctuating asymmetry (FA) as proposed by Møller and Swaddle (1997) for bilateral organisms. The factor of interest is the correct development of the bilateral symmetry in the individuals of a particular population. The mean level of fluctuating asymmetry found in populations subject to different levels of impact would then represent the bioindicator of environmental stress. The development of an organism depends on the interactions, throughout time, of its genes and the environment where development occurs. FA is a population phenomenon defined by random slight deviations of one morphological character from a perfect bilateral symmetry. FA is measured by the differences between the right and left sides of bilateral characters in the individuals of a population. Statistically, FA follows two rules: the differences between right (R) and left (L) body sides are normally distributed and have a mean around zero, as under ideal conditions a certain number of individuals have a character more developed on one side of the body and the same number of individuals has the same character more developed on the other side. The variance of the frequency distribution characterizes the asymmetry level of each character. According to the hypothesis suggested by Møller and Swaddle (1997), each time that genetic or environmental stresses are acting during development, asymmetries may derive in the bilateral structure of the organisms. Stressful factors of genetic origin may be mutations, high levels of homozygosity, hybridation that disrupts coadaptated genes and/or selection pressures. In all of these cases, the capacity of the organism to buffer environmental stress is affected. Environmental stressful factors may be: extreme temperatures and humidities, chemical pollution, decreased food availability, etc. Therefore, populations that show relatively high levels of fluctuating asymmetry may have been subject to stressful factors.

### ***Material and Methods***

#### **Study sites and sampling**

We sampled four populations of *Talitrus saltator* (Montagu, 1808) from the following sandy beaches (Fig. 1):

1. Maganuco – south-eastern Sicily – Malta Channel (province of Ragusa, Italy) – 36°43'01.00"N 14°49' 13.62"E, sampled the 21/08/2008 and 23/08/2008;
2. Bruca – south-eastern Sicily – Malta Channel (province of Ragusa, Italy) – 36°44'07.65"N 14°40'41.75"E, sampled the 25/08/2008;
3. Collelungo – southern Tuscany – Maremma Regional Park (province of Grosseto, Italy) – 42°38'10.14"N 11°04'07.95"E, sampled the 03/10/2008 and 21/4/2010;
4. Damgan - Brittany (Department of Morbihan, France) – 47°31'00.45"N 02°34'47.45" W, sampled the 29/08/2009.



**Figure 1.** Location of the study sites with U.T.M. coordinates. Damgan (30T531633.08 E, 5262681.39 N); Collelungo (32T669625.22 E, 4722485.92 N); Bruca (33S471274.31 E, 4065574.73 N); Maganuco (33S483965.40 E, 40633487.86 N).

We chose these sampling sites to compare the levels of FA of populations exposed to increasing tourism impact (Maganuco, Bruca and Damgan), to a chronic pressure of oil pollution (Maganuco and Bruca), and to pesticide pollution (Bruca), with the FA of the Collelungo population that lives within a relatively non-impacted natural park. The Atlantic (Damgan) population was chosen to compare the effects of more severe tidal and climatic pressures. We also analysed eventual seasonal effects on FA by comparing samples of the same population (Collelungo) collected in spring and autumn.

After moving the superficial layer of sand, we captured talitrids using an entomological aspirator. We collected only adult talitrids and the samples consisted of about 50 individuals for each population. Then we measured the sampling area to quantify the sampling effort and calculate the density of each population. Talitrids were then transferred to a glass container containing moist sand from the same beach and with perforations on the top to ensure aeration. On the same day of the sampling, or on the following day, the talitrids were placed singly into Eppendorf tubes filled with absolute ethanol (99.9%), and thereafter stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Morphometric measurements**

The first basic criterion for the choice of the bilateral segments to measure was the clarity and constancy of landmarks; the second was to avoid linking the measure of one trait to another (for example, the use of a spine as the landmark of a segment would give a biased measure, by proceeding from the point where the spine develops and depending on its length and orientation); the third principle was to analyse rectilinear segments; finally, we did not measure two or more segments of the same appendage, e.g. the merus and carpus of a pereopod, as they may correlate. In consideration of the anamorphic development of crustaceans, the right and left P3, P6 and P7 (P=pereopod) were the best candidates for the morphometric analyses. In these appendages the merus is the best segment with regard to landmarks and ease of measuring at the magnification of 50X. When studying FA it is important that the units used are not too large in relation to the actual measure. According to our observations, the posterior side was the most suitable for the P6 and P7 meri; for both segments, the distal landmark was the apex of the knee (disregarding the spine), while the proximal one was the light notch with the ischiopodite, best observed looking from the inner face of the segment. For the P3 merus, the anterior side was the most suitable, with the same landmarks as for the P6 and P7 meri, but best observed from the external face of the segment. For a better identification of the landmarks we disarticulated the meri of the P3, P6 and P7 from the rest of each appendage. We performed two measurements of the anterior side of the P3 meri and of the posterior sides of the P6 and P7 meri; we carried out two measurements of the same merus of each sandhopper on the same day, with a time lapse of at least three hours. Between the two measurements of the same merus, we analysed other samples, so that the observer was not conditioned by the previous measures. The metric measures obtained by the stereomicroscope were converted to micrometers by suitable conversion calculations. For each specimen we identified the species and defined the sex. The samplings and measurements of sandhoppers were both performed by the same person to reduce the eventual bias due to different observers.

### **Statistical analysis**

The analysis of FA was performed as recommended by Palmer and Strobeck (1986) and Palmer (1994); we used Excel and S-Plus 6 for Windows; the significance level was 5%. Sandhoppers that were lacking one of the bilateral appendages were discarded from the analysis as this strong difference between the values of the two sides of their body would have seriously affected the FA index. We excluded outliers from the analyses also because their values may be related to physical damage or severe deformities, and these events can not be considered developmental noise (Palmer, 1994). Thus, before performing the tests for measurement errors, box plots of the right and left sides were made and screened for outliers. If a sandhopper was an outlier for any of the pereopods we excluded it from the statistical analysis of all pereopods. To check whether

there was any sexual dimorphism of the meri, we divided each population according to sex. In the Bruca and Collelungo populations no significant difference between sexes was found in any pereopods. In the Maganuco population the *F*-test showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) when males and females were compared from the left merus of the P3; yet, as in all other comparisons, the *t*-test was not significant. Thus, we considered the two sexes together. Chi-square test was used to test the sex ratio of the sample of each population. For metric traits we used the *F* and *t* tests to compare the first and the second measures of a segment. Having ruled out significant contributions of human measurement error, the two replica measurements were averaged for further analysis.

For each bilateral trait the presence of directional asymmetry was tested by *one-sample t*-test. Normality was tested using graphical techniques. The FA levels were analysed using the index  $FA1 = \text{Mean } |R - L|$  (as defined by Palmer, 1994; R=length of the right merus, L=length of the left merus). One-way ANOVAs were used to test differences among populations for each of the traits and for FA levels.

### **Results**

The sampled populations had different densities (individuals/m<sup>2</sup>): Maganuco 2.9, Bruca 3.8, Collelungo 11.4 in October 2008 and 6.8 in April 2010; Damgan 5.5.

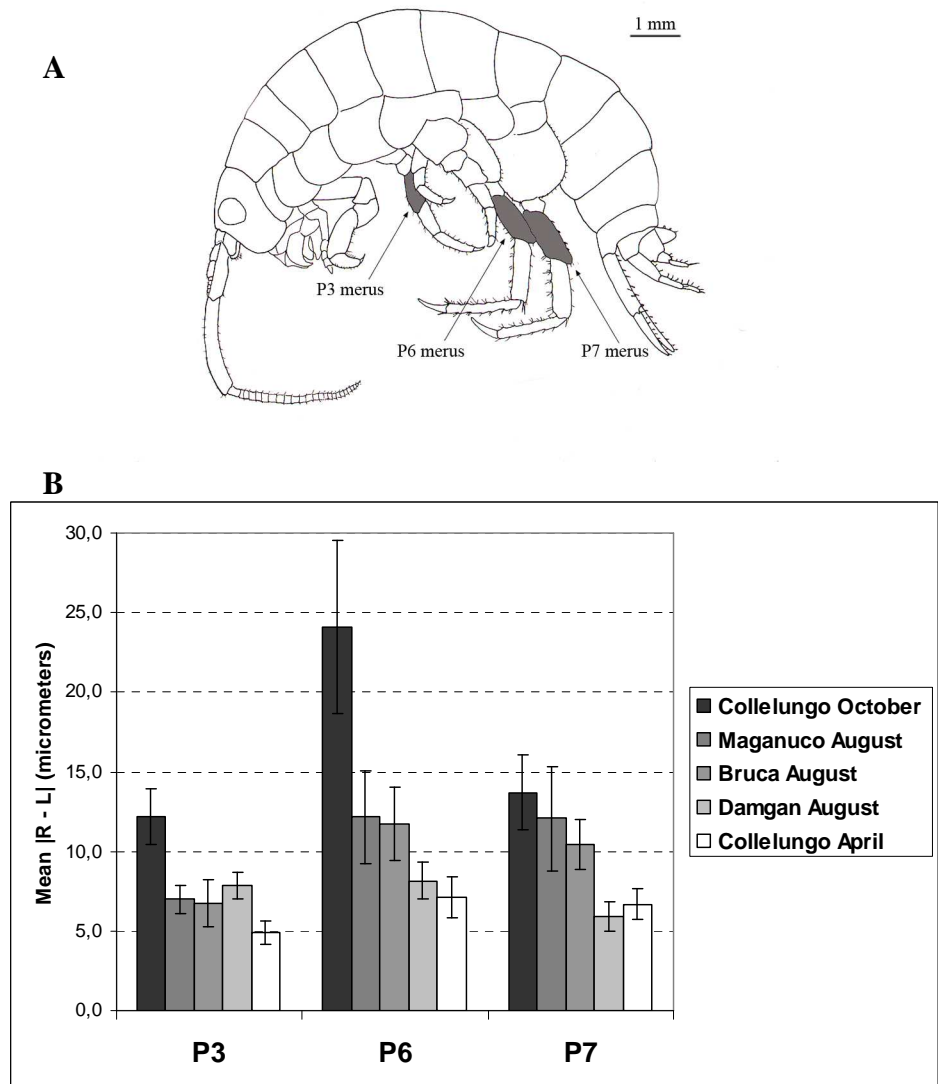
The sex ratios (males/females) of the samples were significantly female biased in the Collelungo population in October 2008 (0.50,  $\chi^2$ -test:  $p < 0.05$ ), but significantly male biased in the Bruca population (2.69,  $\chi^2$ -test:  $p < 0.01$ ); in the Maganuco and Damgan populations females were more abundant than males, but the sex ratio was not significantly different from the expected balance of 1:1.

Considering all the pereopods together, we observed the highest percentages of outliers in Collelungo 2008 (14.8%), while the Bruca population had the lowest one (4.2%).

Using one-way ANOVA, we compared the length of the meri of each pereopod in the populations. We found a significant difference among them (ANOVA:  $p < 0.001$ ). In the Collelungo April population the meri of the right and left P6 and P7 were longer than in the other populations. The Damgan population had the longest P3 ( $p < 0.001$ ). The Maganuco population had the shortest P3, P6 and P7 ( $p < 0.001$ ).

In all populations and in all meri the values of the differences between the right and left sides (R-L) were normally distributed and their means were not significantly different from zero (*one-sample t*-test), except for the P3 in the Damgan population that showed a right directional asymmetry. We excluded directional asymmetry for all the other cases. The plots showed normality, thus antisymmetry was also discarded.

The Collelungo October sandhoppers had a significantly higher level of fluctuating asymmetry in the P3 ( $p < 0.001$ ), P6 ( $p < 0.001$ ) and P7 ( $p < 0.05$ ) meri than the other populations (Fig. 2).



**Figure 2. A:** *Talitrus saltator*. In grey – the segments used for morphometric analyses (meri of P3, P6 and P7); P=pereiopod. (From Ruffo, 1993, modified).  
**B:** Fluctuating asymmetry values (FA1 index = Mean  $|R - L| \pm SE$ ; Palmer, 1994) for the meri of the P3, P6 and P7 in the populations of Collelungo October (sampled on 3/10/2008), Maganuco (sampled on 21 and 23/08/2008), Bruca (sampled on 25/08/2008), Damgan (sampled on 29/08/2009) and Collelungo April (sampled on 21/04/2010). P=pereiopod; FA=fluctuating asymmetry; R=length of the right merus; L=length of the left merus; SE = standard error.

## **Discussion**

When we planned the sampling strategy, we expected higher levels of FA and lower densities in the two Sicilian populations (Maganuco and Bruca) in comparison to the Collelungo one, in consideration of the chemical pollution and the increasing (in the last fifteen years) tourism impact in this area. The two Sicilian populations are subject to chronic oil pollution, as documented by tarry residues on the beach, as well as to pesticide discharge in the Bruca beach.

However, our analyses did not highlight any difference between the two Sicilian populations and their FA levels were significantly lower than that of Collelungo October population. Also Barca-Bravo *et al.* (2008) did not observe increasing levels of FA in Galician (Spain) populations of *T. saltator* that had been subject to pulse stress from the oil spill of Prestige shipwreck (2002) in comparison to populations impacted by chronic pressures of activities linked to tourism and industry. The absence of high levels of FA following chemical pollution may be attributed to high levels of tolerance expressed by talitrid populations. Thus, FA levels in *T. saltator* populations can not be used as bioindicators of chemical stress on sandy beaches. However, other elements of the ecosystems may be affected.

In contrast, the Collelungo population showed a significantly higher level of FA in October. This beach is not chemically polluted, being located within a natural park. In the surroundings of the park biological agriculture is the rule and the drainage waters are controlled for chemicals (Scapini & Nardi, 2007). Nevertheless, the Collelungo beach has a relatively high presence of visitors during April and May, the period of development of *T. saltator* (Marques *et al.*, 2003), while during the summer months the park is closed to visitors for fire prevention, so it is possible to reach the beach only on foot from an entrance 5 km away from the sampling site (Fanini *et al.*, 2005). In contrast, the two Sicilian beaches are not frequented during the period of sandhopper development, whereas there is a relatively high presence of tourists during August. It must be stressed that in August the sandhoppers born in spring are already developed.

The latitudinal difference between the Tuscan (Collelungo) and Sicilian (Bruca and Maganuco) sampling sites may affect the FA levels, by disturbing development during spring. For this reason we analysed the Damgan population, located at a higher latitude on the Atlantic coast and thus subject to tidal and climate conditions different from the Mediterranean ones. Also the comparison between the samplings performed at the same locality (Collelungo) in spring and autumn may clarify this point. The low level of fluctuating asymmetry observed in both Collelungo April and in the Damgan populations excludes a climate impact on meri bilateral development.

The sandhoppers collected in April at Collelungo were older than those collected in summer and autumn (Marques *et al.*, 2003). This may explain the low level of fluctuating asymmetry observed in Collelungo April. In older

populations asymmetric sandhoppers may have died or may have compensated asymmetries throughout moults.

The current dynamics of the shoreline of Collelungo, subject to erosion at one end of the beach (the side of the Ombrone River mouth) and accretion at the other one, may cause a stress to the *T. saltator* population, which was observed in the genetic structure and orientation behaviour (Ketmaier *et al.*, 2010). However, these morphodynamic factors cannot explain the relatively high levels of FA observed in October in the Collelungo population and the low ones observed in April in the same population. The difference is better explained by the population dynamics (Marques *et al.*, 2003).

Regarding densities, we found lower densities in the two Sicilian populations as expected from the impacts acting on these beaches. However, the differences among populations were not marked and the order of magnitude was similar for all the populations sampled. The lower densities of the Sicilian populations in comparison with the other ones may be attributed to the impact of trampling in the sampling period. However, a different sampling strategy, conducted in different times of the year and including also juveniles, would be necessary to derive conclusions on this point (Fanini *et al.*, 2009). It is interesting that the FA levels do not appear linked to density levels.

An interesting and unexpected finding of this study was the low FA level in the meri of P7. This is the longest pereopod and, according to Møller and Swaddle (1997), higher levels of FA are to be expected in longer structures in comparison with shorter ones, except when a bilateral symmetry is physiologically useful and thus subject to a stabilising selection. In his basic monograph, Schellenberg (1942, pp. 139–140) described the movements of *T. saltator* and stressed the importance of a balanced use of P7 during crawling and hopping. In contrast, the merus of P3 pereopod showed the highest levels of FA.

### **Conclusions**

Ecosystems are among the highest levels of organization of living matter. Therefore, the assessment of the ecosystem quality should be made through parameters of a high level of integration. These are population characteristics (e.g. seasonality of the life cycle, age structure, sex ratio and genetic variation, as well as behavioural and physiological traits) or community features (e.g. presence of allochthonous species and biodiversity level). Some of these parameters, however, may depend on the sampling efforts and the abundance of the populations at that particular time of the year. Apparently FA levels in sandhopper populations avoid these constraints and are sensitive enough to mechanical factors (e.g. trampling). Following the present study we propose the level of FA of *T. saltator* as an early warning bioindicator of mechanical stress of sandy beach ecosystems. We also recommend to estimate FA levels of the meri of P3 and P6 because they are shorter and thus less subject to measurements errors. Considering the season of development of *T. saltator*, the

FA levels should be related both to the life cycle of the population and the seasonality of the mechanical stressful factors, particularly the seasonality of the activities linked to tourism.

### **Acknowledgements**

This paper is dedicated to the late lamented professor Sandro Ruffo.

We wish to thank the direction of the Parco Regionale della Maremma for allowing the sampling in the park.

### **Bibliography**

- BARCA-BRAVO, S., SERVIA, M. J., COBO, F. & GONZALEZ, M.A., 2008. The effect of human use of sandy beaches on developmental stability of *Talitrus saltator* (Montagu, 1808) (Crustacea, Amphipoda). A study on fluctuating asymmetry. *Marine Ecology*, 29: 91–98.
- DEFEO, O., MCLACHLAN, A., SCHOEMAN, D.S., SCHLACHER, T.A., DUGAN, J., JONES, A., LASTRA, M. & SCAPINI, F., 2009. Threats to sandy beach ecosystems: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81: 1–12.
- DUGAN, J.E., DEFEO, O., JARAMILLO, E., JONES, A.R., LASTRA, M., NEL, R., PETERSON, C.H., SCAPINI, F., SCHLACHER, T. & SCHOEMAN, D.S., 2010. Give Beach Ecosystems Their Day in the Sun. *Science*, 329: 1146.
- FANINI, L., MARCHETTI, G.M., SCAPINI, F. & DEFEO, O., 2009. Effects of beach nourishment and groynes building on population and community descriptors of mobile arthropodofauna. *Ecological Indicators*, 9: 167–178.
- FANINI, L., MARTIN-CANTARINO, C. & SCAPINI, F., 2005. Relationships between the dynamics of two populations and the impacts of activities linked to tourism. *Oceanologia*, 47: 93–112.
- KETMAIER, V., DE MATTHAEIS, E., FANINI, L., ROSSANO, C. & SCAPINI, F., 2010. Variation of genetic and behavioural traits in the sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) along a dynamic sand beach. *Ethology Ecology & Evolution*, 22: 17–35.
- MARQUES, J. C., GONÇALVES, S. C., PARDAL, M. A., CHELAZZI, L., COLOMBINI, I., FALLACI, M., BOUSLAMA, M. F., EL GTARI, M., CHARFI-CHEIKHROUHA, F. & SCAPINI, F., 2003. Comparison of *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) biology, dynamics, and secondary production in Atlantic (Portugal) and Mediterranean (Italy and Tunisia) populations. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 58, Supplement 1: 127–148.
- MØLLER, A. P. & SWADDLE, J. P., 1997. *Asymmetry, Development Stability and Evolution*. Oxford University Press. Oxford, 291 pp.
- MORRITT, D. & SPICER, J. I., 1998. The physiological ecology of talitrid amphipods: an update. *Canadian Journal of Zoology*, 76: 1965–1982.
- OTTAVIANO, O. & SCAPINI, F., 2010. Can fluctuating asymmetry in *Talitrus saltator* (Montagu, 1808) (Crustacea, Amphipoda) populations be used as a bioindicator of stress on sandy beach ecosystems? *Oceanologia*, 52: 259–280.



- PALMER, A.R., 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer, [in:] *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*, T.A. Markow (ed.), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 335–364.
- PALMER, A.R. & STROBECK, C., 1986. Fluctuating asymmetry: measurements, analysis, patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 17: 391–421.
- PAVESI, L., CHELAZZI, L., IANNILLI, V., LUCCHESI, B., RENZI, A. & DE MATTHAEIS, E., 2009. Abundance, temporal distribution and zonation patterns of talitrids on two Apulian sandy beaches (southern Italy). *Vie et Milieu and Environment*, 59: 7–20.
- RUFFO, S. (ed.), 1993. *The Amphipoda of the Mediterranean*, Part 3, Gammaridea, Memoires de l'Institut Oceanographique, Fondation Albert I, Prince de Monaco, Monaco, 813 pp.
- SCAPINI, F. (ed.), 2002. *Baseline research for the integrated sustainable management of Mediterranean sensitive coast ecosystems*. IAO. Firenze, 223 pp.
- SCAPINI, F., 2006. Keynote papers on sandhopper orientation and navigation. *Marine and Freshwater behaviour and Physiology*, 39: 73–85.
- SCAPINI, F., CHELAZZI, L., COLOMBINI, I., & FALLACI, M., 1992. Surface activity, zonation and migrations of *Talitrus saltator* on a Mediterranean beach. *Marine Biology*, 112: 573–581.
- SCAPINI, F. & NARDI, M., 2007. *Il Parco Regionale della Maremma e il suo territorio*. Pacini. Pisa, 256 pp.
- SCHELLENBERG, A., 1942. Flohkrebse oder Amphipoda. In: *Die Tierwelt Deutschlands* 40 (vol. IV), Verlag von Gustav Fischer. Jena, 252 pp.
- UGOLINI, A., UNGHERESE, G., SOMIGLI, S., GALANTI, G., BARONI, D., BORGHINI, F., CIPRIANI, N., NEBBIAI, M., PASSAPONTI, M. & FOCARDI, S., 2008. The amphipod as a bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, 65: 349–357.
- WESLAWSKI, J.M., KUPIDURA, K. & ZABICKI, M., 2000a. Sandhoppers, *Talitrus saltator* (Montagu), at the Polish Baltic coast: seasonal and spatial distribution patterns, *Crustaceana*, 73: 961–969.
- WESLAWSKI, J.M., STANEK, A., SIEWERT, A. & BEER, N., 2000b. The sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) on the Polish Baltic coast. Is it a victim of increased tourism? *Oceanological Studies*, 29: 77–87.
- WESLAWSKI, J.M., URBAN-MALINGA, B., KOTWICKI, L., OPALINSKI, K., SZYMELFENIG, M. & DUTKOWSKI, M., 2000c. Sandy coastlines: are there conflicts between recreation and natural values? *Oceanological Studies*, 29: 5–18.



## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio la Prof.ssa Felicità Scapini, vivace guida intellettuale, e i Dott. Lucia Fanini, Simone Gambineri e Claudia Rossano per la collaborazione all'attività di ricerca. Un particolare grazie a Simone, per il suo sostegno e i preziosi consigli durante la redazione di questa tesi.

Ringrazio, inoltre, la Direzione del Parco Regionale della Maremma (Grosseto, Italia) per avermi permesso di effettuare i campionamenti nella spiaggia di Collelungo. Ringrazio, in particolare, la Dott.ssa Laura Tonelli dell'Ufficio Tecnico e la Dott.ssa Catia Biliotti del Settore Amministrativo dell'Ente Parco Regionale della Maremma per avermi fornito i dati sull'affluenza dei visitatori del Parco.

