

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**Struttura e dinamica di popolazione di
Axinella polypoides (Schmidt, 1862)
(Porifera, Demospongiae) presso l'Isola
Gallinara (SV)**

Tesi di laurea in Ricerca Scientifica Subacquea

Relatore

Presentata da

Prof. Marco Abbiati

Francesca Lisi

Correlatori

Dr. Massimo Ponti

Dr. Carlo Cerrano

(III sessione)
Anno Accademico 2010/2011

SOMMARIO

ABSTRACT	5
1 SCOPO	7
2 INTRODUZIONE	9
2.1 INQUADRAMENTO SISTEMATICO E DISTRIBUZIONE	13
2.2 MORFOLOGIA	15
2.3 DESCRIZIONE DELLE TIPOLOGIE CELLULARI	16
2.4 RIPRODUZIONE E CICLO VITALE	20
2.4.1 Riproduzione sessuale	20
2.5 CRESCITA	21
2.6 ALIMENTAZIONE.....	22
2.7 ECOLOGIA DELLO STADIO ADULTO	23
2.7.1 Temperatura.....	23
2.7.2 Illuminazione.....	24
2.7.3 Idrodinamismo e sedimentazione	25
2.8 MORIE	26
2.9 PREDAZIONE.....	27
3 MATERIALI E METODI	29
3.1 AREA DI STUDIO	29
3.1.1 Punto di immersione.....	32
3.2 MISURE DI TEMPERATURA	33
3.3 ANALISI DELLA POPOLAZIONE	33
3.4 CRESCITA	34
3.4.1 Analisi di Horton.....	35
3.4.2 Analisi di immagine.....	37
3.5 ANALISI ISTOLOGICHE	38
3.5.1 Procedura per istologia con microtomo criostato.....	38
3.5.2 Lettura al microscopio	40
3.6 ANALISI STATISTICHE	40
4 RISULTATI	43
4.1 ANDAMENTO DELLA TEMPERATURA.....	43
4.2 ANALISI DELLA POPOLAZIONE	43
4.3 CRESCITA	45
4.4 ANALISI ISTOLOGICHE	49
5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	55
6 BIBLIOGRAFIA	59
7 RINGRAZIAMENTI	69

ABSTRACT

I poriferi rappresentano un importante campo di ricerca anche in ambito applicativo in quanto potenzialmente utili come fonte di metaboliti secondari da impiegarsi in ambito clinico (antitumorali, antibiotici, antivirali, ecc.) e industriale (antifouling). I processi di biosilificazione interessano invece per aspetti legati alle biotecnologie marine. Questo Phylum ha un importante ruolo strutturale e funzionale nell'ecologia dei popolamenti bentonici, in quanto può essere dominante in numerosi habitat e svolgere un ruolo ecologico fondamentale nelle dinamiche degli ecosistemi marini. Per questo, la variazione spaziale e temporale della loro abbondanza può avere effetti considerevoli su altri membri della comunità. Lo studio delle dinamiche di popolazione e del ciclo riproduttivo dei poriferi potrebbe permettere di valutare come i cambiamenti climatici ne influenzino la crescita e la riproduzione e potrebbe quindi fornire una base per lo sviluppo di corrette tecniche di gestione ambientale. La spugna *Axinella polypoides* è inserita all'interno delle liste di protezione della Convenzione di Berna e di Barcellona, dove sono elencate le specie da proteggere perché minacciate o in pericolo di estinzione. Questa specie, avendo una morfologia eretta, è fortemente minacciata soprattutto da attività antropiche quali pesca e ancoraggi, ma nonostante questo la letteratura relativa ad essa è scarsa. La sua importanza è legata soprattutto al recente utilizzo come modello per numerosi esperimenti. *A. polypoides* rappresenta, infatti, il più basso livello nella scala evolutiva in cui sono stati rinvenuti meccanismi biochimici cellulari di reazione all'aumento di temperatura (incremento dell'attività ADP-ribosil ciclasica, sintesi di ossido nitrico) tipici degli organismi superiori. Lo scopo di questa tesi è di aumentare le conoscenze sull'ecologia e sulla biologia di questo porifero, al fine di consentire una migliore predisposizione di eventuali piani di tutela. Dallo studio delle colonie effettuato presso l'Isola Gallinara (SV), emerge una dinamica di crescita lenta, limitata alle parti apicali dei rami, ed un ciclo riproduttivo estivo, coerentemente con quanto osservato per altre specie mediterranee del

genere *Axinella*. Le analisi istologiche effettuate hanno mostrato variabilità temporale nella densità e nella dimensione di particolari cellule sferulose, che si ipotizza siano collegate a fenomeni di proliferazione cellulare e rigenerazione in seguito a danni. È stata individuata inoltre la presenza di una particolare tipologia cellulare dendritica la cui funzione si ritiene abbia affinità con le funzioni sensoriali di Phyla superiori. Queste osservazioni, e l'evidente vulnerabilità della specie agli impatti antropici, hanno evidenziato la necessità di sviluppare adeguati piani di monitoraggio e di conservazione.

1 SCOPO

I poriferi rappresentano ormai da molto tempo un importante campo di ricerca anche in ambito applicativo in quanto potenzialmente utili come fonte di metaboliti secondari da impiegarsi in ambito clinico (antitumorali, antibiotici, antivirali, ecc.) e industriale (*antifouling*). I processi di biosilificazione interessano invece per aspetti legati alle biotecnologie marine, potenzialmente utili come modello biomimetico nella produzione di fibre ottiche o nanostrutture silicee. Per questo motivo alcune specie sono a rischio di sovrasfruttamento, e sono quindi state inserite all'interno di liste di protezione (Convenzione di Barcellona, Allegato II).

Axinella polypoides è una specie fortemente minacciata soprattutto da attività antropiche quali pesca e ancoraggi, ma nonostante questo la letteratura relativa ad essa è scarsa, probabilmente a causa del suo range batimetrico di distribuzione, che si attesta tra i -25 ed i -300 metri (Relini e Tunesi, 2009), profondità fino ad alcuni anni fa difficilmente raggiungibile per studi scientifici. Lo scopo di questa tesi è di aumentare le conoscenze sull'ecologia e sulla biologia di questo porifero, al fine di consentire una migliore predisposizione di eventuali piani di tutela nei confronti di ambienti particolarmente pregiati come il coralligeno di falesia, caratterizzato da una elevatissima diversità, in alcuni casi paragonabile al livello di diversità noto per gli ambienti tropicali, e inserito nella lista delle biocenosi bentoniche da proteggere secondo il RAC/SPA di Tunisi.

2 INTRODUZIONE

Al fine di proteggere le specie e gli habitat la cui conservazione richiede la cooperazione di vari Stati, la “Convenzione relativa alla conservazione della vita selvatica e dell’ambiente naturale in Europa” (Berna, 19 settembre 1979), ratificata in Italia con legge 5 agosto 1981 n. 503, presenta una lista di organismi selvatici che costituiscono un patrimonio naturale di valore estetico, scientifico, culturale, ricreativo, economico ed intrinseco che va preservato e trasmesso alle generazioni future. La convenzione riconosce anche il loro ruolo fondamentale per il mantenimento degli equilibri biologici e sottolinea che la conservazione degli habitat naturali è uno degli elementi essenziali della protezione e della conservazione della flora e della fauna selvatiche. All’interno dell’Allegato II, dove sono elencate le specie di fauna rigorosamente protette, è inserito anche il porifero *Axinella polypoides* (Schmidt, 1862). Successivamente, le parti contraenti della Convenzione di Barcellona (1995) nell’ambito del Protocollo SPA/BIO (*Specially Protected Areas and Biological Diversity in the Mediterranean*) rilevarono la necessità di adottare criteri comuni per valutare le zone che sarebbero state proposte per entrare a far parte della lista dei siti naturali d’interesse conservazionistico. Nel 1999 il CAR/ASP (Centro Regionale di attività per le aree specialmente protette del Protocollo ASP/BIO) ha preparato le liste di riferimento di habitat e di specie meritevoli di salvaguardia da utilizzare per l’individuazione dei siti da proteggere. *A. polypoides* è inserita all’interno dell’Allegato II, dove sono elencate le specie da proteggere perché minacciate o in pericolo di estinzione. Come tutte le specie erette viene facilmente danneggiata da palamiti, reti ed altri attrezzi da pesca. Il suo habitat è piuttosto circoscritto (fondi duri o detritici circalitorali) ed essendo particolarmente cospicua si presta alla raccolta indiscriminata ed ingiustificata (Relini e Tunesi, 2009).

I poriferi in generale hanno un importante ruolo strutturale e funzionale nell’ecologia dei popolamenti bentonici, come grandi

filtratori sessili, e sono notevolmente abbondanti e longevi (Wulff, 2006a). Anche se questi organismi modulari possono essere dominanti in numerosi habitat e svolgere un ruolo ecologico fondamentale nelle dinamiche degli ecosistemi marini, il loro studio non ha ricevuto lo stesso livello di attenzione degli organismi clonali (Cerrano, 2011). È molto importante però monitorarne i popolamenti in quanto questo taxon ha la capacità di influenzare le altre comunità bentoniche attraverso la superiorità competitiva (Bell e Barnes, 2003), la longevità (Ayling, 1983) e l'alterazione del flusso idrodinamico circostante (Hiscock, 1983). Per questo, la variazione spaziale e temporale della loro abbondanza può avere effetti considerevoli su altri membri della comunità (Bell et al., 2006). Lo studio delle dinamiche di popolazione e del ciclo riproduttivo di questi organismi bentonici potrebbe permettere di valutare come i cambiamenti climatici ne influenzino la crescita e la riproduzione e potrebbe quindi fornire una base per lo sviluppo di corrette tecniche di gestione ambientale.

A dispetto dell'ampia distribuzione dei poriferi, i dati riguardanti il loro pattern ed il tasso di crescita sono disponibili solo per un numero limitato di specie, aumentando per gli habitat temperati freddi (Tanaka, 2002) e per gli habitat tropicali (Hoppe, 1988). Ancora pochi studi riportano dati sulla crescita delle spugne Mediterranee (Garrabou e Zabala, 2001; Teixido et al., 2009). Inoltre molti fattori influiscono sulla distribuzione e la crescita delle specie di poriferi, e tra questi troviamo la sedimentazione (Könnecker, 1973; Cerrano et al., 2007), il substrato (Barthel e Tendal, 1993; Bavestrello et al., 2000), la luce (Cheshire e Wilkinson, 1991), l'idrodinamismo, l'esposizione all'aria e l'altezza della scogliera (Barnes, 1999), i livelli di nutrienti, la crescita algale (Storr, 1976), la durata della vita larvale (Leys e Ereskovsky, 2006), la batimetria (Alvarez et al., 1990; Witman e Sebens, 1990), la competizione e la cooperazione (Wulff, 2006a), le difese chimiche (Wright et al., 1997) e i possibili predatori (Dunlap e Pawlik, 1996).

In generale la perdita nelle popolazioni di poriferi è difficile da quantificare in quanto, contrariamente ai coralli, che hanno un solido scheletro calcareo, le spugne si disgregano velocemente dopo la loro morte, senza lasciare tracce. Wulff (2006b) ha documentato la dinamica di popolazione di poriferi di barriera corallina su un periodo di 14 anni. Le osservazioni hanno sottolineato la perdita esclusivamente di specie a morfotipo incrostante o massivo, ed un mantenimento della popolazione di spugne a morfologia eretta. Cambiamenti drastici nei parametri ambientali, quali salinità, temperatura e sedimentazione sono considerati come possibili cause di questo declino, benché i dati ottenuti sottolineino anche l'incidenza di fattori eziologici patogeni. Storicamente, gli agenti patogeni hanno causato ingenti perdite nelle popolazioni di poriferi (Smith, 1941), anche se la loro individuazione è più difficile rispetto ad altri organismi. L'importanza delle malattie nel determinare le comunità di poriferi può essere valutata solo attraverso un monitoraggio sufficientemente frequente da individuare il progresso della malattia prima che l'organismo scompaia completamente. Nelle specie con morfologia massiva spesso la patologia è invisibile fino a che non raggiunge la superficie esterna dell'organismo, mentre nelle specie a morfologia eretta la progressione della malattia può essere seguita giornalmente lungo i rami. Sia la diffusione della malattia che il recupero sono favoriti nelle spugne ramificate rispetto a quelle massive, in quanto seguono un modello geometrico (Wulff, 2006c): infatti, nelle forme massive, gli agenti patogeni si possono diffondere all'interno della spugna radialmente, mentre nelle forme erette solo nella direzione dei rami. In aggiunta, la frammentazione asexuale, molto più attuabile nelle spugne arborescenti, può bloccare la diffusione delle patologie e favorire un recupero più rapido.

L'importanza di *A. polypoides* è legata soprattutto al suo frequente utilizzo come modello per numerosi esperimenti (Van de Vyer e Buscema, 1985; Zocchi et al. 2001; Giovine et al., 2001). La sua ampia distribuzione nel Mar Mediterraneo, inoltre, ne fa un organismo facilmente reperibile. Un fattore di grande importanza

nella scelta di questa specie come organismo base per numerosi studi è il suo ampio range di reazioni osservabili in condizioni differenti. Come osservato da Van de Vyer e Buscema (1985), questa specie, messa a contatto con differenti materiali, non solo è in grado di discriminare tra *self* e *non-self*, ma anche tra differenti *non-self*, sia viventi che inerti. Questa capacità discriminativa si ritiene sia dovuta alle stesse reazioni immunologiche cellulari di organismi più evoluti. Tuttavia il fatto più sorprendente è che la reazione di questo organismo non è uniforme, ma varia in relazione all'associazione alla quale viene sottoposta. Questa capacità è impressionante in un gruppo così primitivo, in quanto altri gruppi filogenetici più evoluti, come Nemertini o Artropodi, non mostrano nemmeno meccanismi di riconoscimento allogenico. Un altro fattore che rende questa specie un interessante modello di studio è il collegamento, osservato da Zocchi et al. (2001), tra stress di tipo meccanico e termico ed incremento dell'attività ADP-ribosil ciclasica, legata alla mobilitazione del calcio nell'organismo, e quindi a differenti funzioni, quali: la regolazione del ciclo cellulare (nei protisti) (Masuda et al., 1997), la fertilizzazione degli oociti (negli invertebrati) (Lee, 1996), la secrezione di insulina e la proliferazione cellulare (nei mammiferi) (Takasawa et al., 1993; Zocchi et al., 1998). Hellmich e Strumwasser (1991) hanno osservato in *Aplysia californica* (Mollusca, Gastropoda) l'attività ADP-ribosil ciclasica relegata in grossi granuli presenti all'interno degli ovotestis. Cellule sferulose ricche di granuli sono state osservate in *A. polypoides*, associate a fenomeni rigenerativi (Van de Vyver e Buscema, 1985) e in *Chondrosia reniformis* (Bonasoro et al., 2001). In *A. polypoides*, l'ADP-ribosil ciclasi, enzima responsabile per la sintesi di cADPR dal NAD⁺, è attivato dall'aumento di temperatura tramite un meccanismo protein kinasi A (PKA) dipendente, indotto dall'acido abscisico (ABA). *A. polypoides* rappresenta il più basso livello nella scala evolutiva in cui è stato rinvenuto questo meccanismo, tipico degli organismi superiori. L'attività ADP-ribosil ciclasica si ritiene abbia un ruolo nella regolazione del metabolismo basale cellulare ed il suo incremento è stato considerato come un

possibile elemento in grado di aumentare la resistenza fisiologica della specie agli stress termici e ad eventuali danneggiamenti meccanici, oltre ad aumentarne la plasticità (Zocchi et al., 2001, 2003). Questa grande plasticità osservata, rende complesso lo studio della specie, giustificando almeno in parte le lacune ancora oggi presenti sulla biologia ed ecologia della specie. Un'altra osservazione importante su *A. polypoides* è stata condotta da Giovine et al. (2001), che hanno osservato, in occasione di stress termici, l'attività dell'enzima ossido nitrico-sintetasi (NOS) in corrispondenza di cellule con una particolare forma fusiforme e dendritica. L'attività di sintesi dell'ossido nitrico (NO) è legata nei molluschi, negli insetti e nei celenterati, alla risposta cellulare a stimoli sensoriali ed è legata a specifiche cellule nervose. L'inaspettato aumento di NO in risposta all'aumento della temperatura suggerisce che questa molecola si possa essere evoluta nei poriferi come segnale cellulare di stress ambientale. Lo studio ha evidenziato una corrispondenza tra la produzione di NO e le cellule dendritiche della spugna, coordinate in una sorta di rete all'interno del parenchima e probabilmente collegate a funzioni sensoriali. Nuovamente questa specie presenta un complesso percorso biochimico noto solo per Phyla superiori.

2.1 Inquadramento sistematico e distribuzione

Regno	Animalia
Phylum	Porifera
Classe	Demospongiae
Sottoclasse	Ceractinomorpha
Ordine	Halichondrida
Famiglia	Axinellidae
Genere	Axinella
Specie	<i>Axinella polypoides</i> (Schmidt, 1862)

La posizione sistematica della famiglia Axinellidae (Porifera, Demospongiae) è estremamente controversa. Questo gruppo sistematico fu assegnato da Ridley e Dendy (1886) al vecchio ordine

Monaxonida e successive revisioni lo inclusero prima nell'ordine Halicondrida (Topsent, 1928; de Laubenfels, 1936) e successivamente nell'ordine Axinellida (Lévi, 1955; Bergquist, 1967, 1978). Recentemente van Soest et al. (1990) hanno ridescritto l'ordine Halicondrida, includendo in esso anche l'ordine Axinellida. Attualmente la famiglia Axinellidae comprende 16 generi e Hooper e Bergquist (1992) arrivano ad elencare fino a 50 generi, la cui definizione si basa su descrizioni approssimative riguardanti la morfologia d'insieme e l'habitat. Le spugne del genere *Axinella* sono normalmente considerate un chiaro esempio di specie simpatriche ad areali sovrapposti, ma presentano un quadro di difficile interpretazione, a causa delle poche notizie sulla biologia ed ecologia a nostra disposizione (Cerrano et al., 2005).

La specie *Axinella polypoides* predilige fondali rocciosi e detritici, spesso alla base di falesie, caratterizzati da un elevato idrodinamismo. È comune nella fascia batimetrica dei 25-40 m ma è stata ritrovata fino a 300 m di profondità. È diffusa nel Mediterraneo e nell'Atlantico orientale, spingendosi a Nord sino all'Irlanda e a Sud sino a Madeira (Relini e Tunesi, 2009) (Figura 2.1).

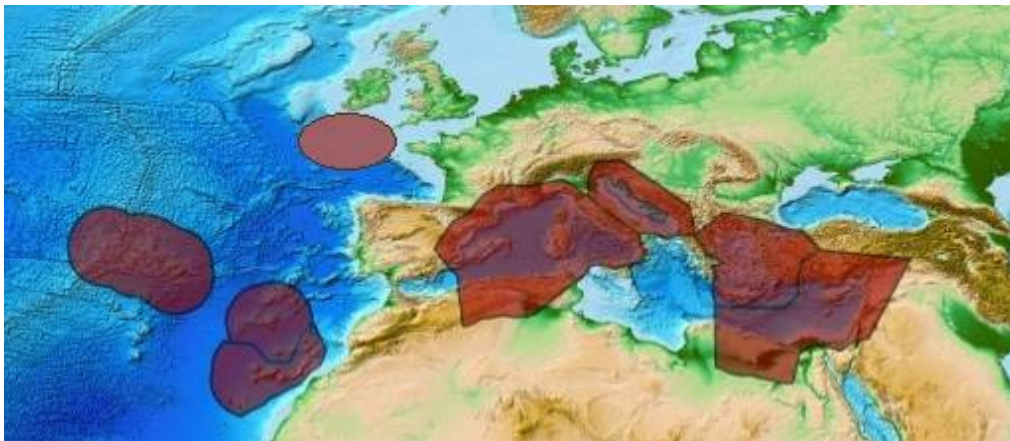


Figura 2.1 Areale di distribuzione di *Axinella polypoides* (Da <http://www.marinespecies.org/porifera/porifera.php?p=taxdetails&id=132487>, modificata sulla base di Relini e Tunesi, 2009).

2.2 Morfologia

Il Phylum Porifera comprende organismi pluricellulari, caratterizzati da una notevole semplicità strutturale e dall'assenza di tessuti differenziati. La funzionalità delle spugne è garantita dalle cellule che, pur specializzate, sono in grado di riacquistare un'elevata motilità e totipotenza. In questi organismi, in cui molti aspetti importanti della fisiologia e biologia riproduttiva devono essere ancora chiariti, anche l'approccio di tipo ecologico è molto difficile in considerazione dell'ampiezza delle risposte legate all'elevata plasticità organizzativa. L'assenza di veri e propri organi, la mancanza di un centro di coordinazione, la reversibilità dei processi di differenziazione cellulare e l'organizzazione modulare del sistema acquifero conferiscono ai poriferi un elevato grado di plasticità morfologica; non esiste, infatti, ad eccezione di rari casi, una morfologia esterna ben definita per ogni specie, e i cambiamenti di forma interspecifici che si osservano non sono necessariamente legati ai fattori ecologici (Pansini e Pronzato, 1990; Gaino et al., 1991; Manconi e Pronzato, 1991).

Axinella polypoides, come tutti gli esponenti della famiglia Axinellidae, presenta una forma arborescente ramificata, lobata o a ventaglio di color giallo oro tendente all'arancio (Sarà, 1972; Hartman, 1982). È sorretta da un robusto peduncolo e raggiunge uno sviluppo dal fondo di 40 cm di media. Ha una struttura solida e flessibile, che le consente di sopravvivere a correnti con velocità elevata. La colonia si dispone perpendicolarmente alla corrente predominante, avvantaggiandosi così delle particelle alimentari sospese trasportate nell'acqua (Uriz et al., 2003). I rami hanno sezione circolare od ovale, un diametro di 1-2 cm e apici piuttosto arrotondati; questi si dicotomizzano e a volte anastomizzano. Sulla superficie liscia, leggermente vellutata per via delle spicole, sono ben visibili numerosi osculi (1-2 mm di diametro), dalla tipica forma stellata, dai quali la spugna espelle l'acqua filtrata.

Lo scheletro ectosomale è assente, mentre lo scheletro coanosomale è costituito da un asse verticale di megasclere disposte longitudinalmente ed aggregate da spongina, che, prolungandosi anche nei rami, fornisce particolare robustezza all'organismo. È presente anche uno scheletro extra assiale plumoreticolato, che si dirama verso la superficie della spugna. Le spicole silicee che costituiscono quest'organismo sono stili (lunghezza 350-450 μm , spessore fino a 10 μm) e oxee (lunghezza 150-300 μm , spessore fino a 12 μm) che presentano una leggera curvatura (Figura 2.2). Le microsclere presenti sono microrafidi molto sottili, di lunghezza 20-25 μm , raccolti in tricodragmi (Relini e Tunesi, 2009).

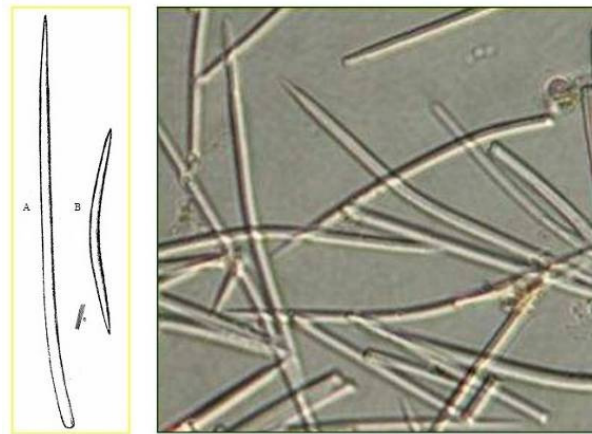


Figura 2.2 A) Esempio di spicola stilo; B) esempio di spicola oxea. A fianco; fotografia al microscopio ottico di spicole di *Axinella polypoides* (Da Cerrano et al., 2005).

2.3 Descrizione delle tipologie cellulari

La caratterizzazione delle tipologie cellulari si basa sulla loro ubicazione e morfologia. Generalmente si distinguono tre regioni principali: l'ectosoma, il coanosoma e l'asse centrale. Ognuna delle regioni è caratterizzata da tipologie cellulari specifiche, la cui presenza e distribuzione varia in relazione al periodo stagionale in cui vengono osservate. Come descritto da Bergquist (1978) i tipi cellulari più rappresentativi di tutte le Demospongiae sono:

Pinacociti: cellule allungate, con funzione di rivestimento (esopinacociti se sulla superficie esterna; endopinacociti se a

tappezzare i canali del sistema acquifero). Hanno una morfologia ed una dimensione variabile (3,5-30 μm) in relazione alla funzione svolta ed alla posizione dell'organismo.

Coanociti: cellule flagellate di piccole dimensioni, tendenzialmente sferiche, e dotate di un collare di microvilli citoplasmatici. Con il movimento del flagello creano la pressione che movimentata l'acqua all'interno delle camere flagellate.

Archeociti: Sono grosse cellule ameboidi che si trovano nel mesoilo; svolgono un ruolo principale nei processi digestivi, sono in grado di fagocitare particelle presso il pinacoderma e ricevere dai coanociti materiale da digerire. Queste cellule sono definite "totipotenti" in quanto sono in grado di differenziarsi in altri tipi cellulari più specializzati a seconda delle necessità.

Lofociti: si tratta di grosse cellule dotate di una spiccata motilità, facilmente riconoscibili per la produzione di una gran quantità di collagene fibrillare che viene rilasciato dalla parte posteriore della cellula quando questa si muove. La banda di collagene rimane ancorata alla membrana cellulare e sembra costituire una sorta di coda in movimento.

Collenciti: Sono i principali responsabili della secrezione di fibrille di collagene, e morfologicamente sono molto simili ai coanociti. L'attività secretoria di queste cellule è dimostrata dalla presenza di numerose fibre di collagene accollate alle cellule stesse o collocate nel mesoilo adiacente a collenciti.

Oociti: nei primi stadi sono mobili nel mesoilo e hanno forma irregolare. Raggiunto un diametro di 20 μm , vengono circondati da cellule follicolari e nutrici. Le nutrici vengono inglobate a mano a mano dagli oociti, che raggiungono un diametro finale di circa 140 μm dopo averne inglobate circa un migliaio. Questa massa citoplasmatica è fondamentale per il nutrimento dei primi stadi embrionali. Finita la crescita degli oociti, avviene la divisione meiotica con la formazione del gamete maturo; a questo punto può avvenire la fecondazione (Figura 2.3).

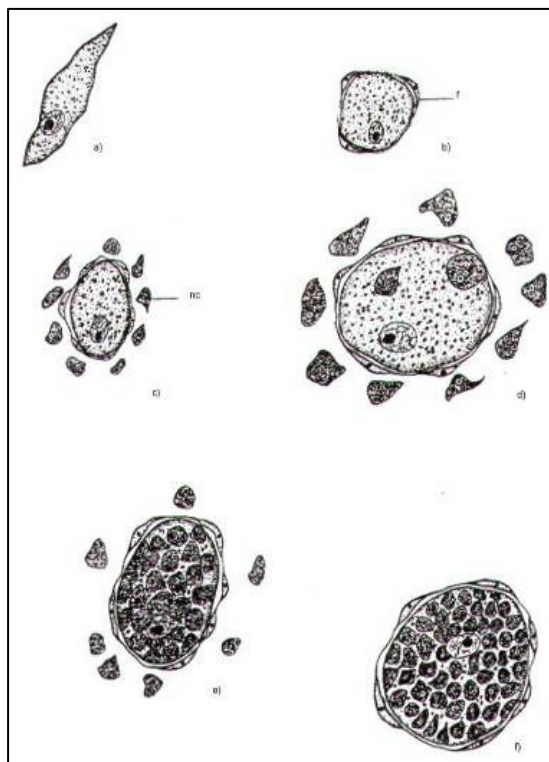


Figura 2.3 Maturazione oociti: a) Oocita mobile; b) Giovane oocita racchiuso da uno strato di cellule follicolari (F); c) inizio dell'aggregazione delle cellule nutrici; d,e) incorporazione delle cellule nutrici; f) oocita maturo (Da Bergquist, 1978)

Cellule sferulose: cellule mobili che contengono granuli sferici di grandi dimensioni, occupanti quasi tutto lo spazio intracellulare (Figura 2.4). Sono le cellule più numerose sulla superficie e sul bordo dei canali esalanti. La natura del contenuto dei granuli varia ampiamente nei vari gruppi sistematici e riflette la ricchezza degli inclusi citoplasmatici. In alcune specie, all'interno dei granuli è stata osservata la presenza di batteri simbiotici (Bertrand e Vacelet, 1971). Alcune tipologie di queste cellule sono state collegate a fenomeni di escrezione dei loro contenuti all'interno del mesoilo o nel lume dei canali esalanti, tramite fenomeni sia di rottura dell'intera cellula, sia di rilascio dei singoli granuli (Simpson, 1984; Harrison e De Vos, 1991). Lo studio dei granuli ha portato all'identificazione parziale dei materiali da essi secreti, che sono stati identificati parzialmente come lecitine (Bretting e Königsmann, 1979). Queste cellule sembrano risentire delle concentrazioni extracellulari di calcio: in *Axinella* sp. la presenza di Ca^{++} ne stabilizza la struttura, mentre la sua assenza le

porta alla rottura (Bretting e Königsmann, 1979). L'osservazione di filamenti e sostanze paracrystalline ancora da identificare all'interno dei granuli ha portato alcuni autori a suggerire che possano essere responsabili anche della secrezione delle fibrille di collagene (Pavans de Ceccatty e Thiney 1964a, 1964b), il componente specifico della matrice organica extracellulare (Garrone, 1978), o delle fibre di spongina (Bretting et al., 1983). In *Chondrilla nucula* la funzione trofica di queste cellule sembra invece essere predominante (Gaino e Pronzato, 1983). In *Chondrosia reniformis*, queste cellule sono state individuate intorno ai canali acquiferi, dove sembrano espellere attivamente il loro contenuto in condizioni di aumentata plasticità della spugna (fase di colatura) (Bonasoro et al., 2001). In *Axinella polypoides* è stata osservata la migrazione questa tipologia cellulare dalla zona interna del tessuto alla zona di contatto, in occasione di esperimenti di trapianto, e si ritiene perciò che abbia una funzione nel meccanismo di rigetto dei tessuti *non-self* (Van de Vyer e Buscema, 1985).

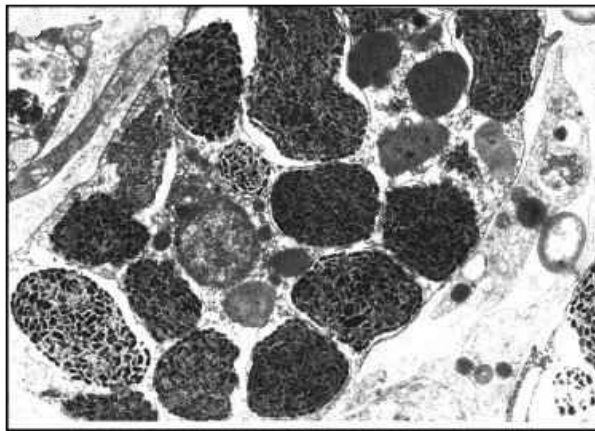


Figura 2.4 Cellula sferulosa fotografata al TEM.

Cellule dendritiche: cellule peculiari fusiformi, osservate da Giovine et al. (2001) in *Axinella polypoides* e legate ad attività di sintesi di ossido nitrico.

2.4 Riproduzione e ciclo vitale

I poriferi si riproducono sia sessualmente, con formazione di gameti, sia asessualmente, tramite frammentazione, con produzione di gemme o gemmule. L'affidarsi ai due tipi di riproduzione durante l'anno può essere messo in relazione con le strategie riproduttive della specie, ma anche con le condizioni ambientali (Sarà, 1992). L'ordine Axinellida presenta generalmente una condizione gonocorica, con maturazione sincrona di oociti relativamente piccoli e con poco materiale di riserva (Sarà, 1992).

2.4.1 Riproduzione sessuale

A differenza di tutti gli altri metazoi, i poriferi non hanno un'area somatica definita per lo sviluppo delle cellule germinali, e le cellule del mesoilo si differenziano in oociti e spermatozoi quando l'organismo entra nella fase riproduttiva (Harrison e De Vos, 1991). Se si escludono poche specie a corpo estremamente sottile, nelle quali i gameti sono prodotti nella parte inferiore del soma, oociti e spermatozoi possono essere generati in qualsiasi area del mesoilo. Per quanto riguarda l'oogenesi, alcuni autori attribuiscono l'origine dei gameti femminili nelle Demospongiae agli archeociti (Bergquist, 1978). Gli stimoli ambientali che inducono queste trasformazioni cellulari sono poco conosciuti (Fell, 1974; Simpson, 1984), sebbene la temperatura sia considerata il fattore chiave (Sarà e Vacelet, 1973; Fell, 1974; Simpson, 1984). La riproduzione si ritiene quindi che possa avvenire solo all'interno di un certo intervallo di temperatura, differente per le diverse specie e, probabilmente, anche per la stessa specie in località differenti (Simpson, 1980). Anche la disponibilità degli alimenti, il fotoperiodo e la regressione cellulare possono assumere diversa importanza nelle varie specie (Van de Vyver e Willenz, 1975).

2.5 Crescita

A dispetto dell'alta diversità e ubiquità delle spugne marine, gli studi sulla dinamica di crescita dei poriferi sono scarsi. Questi studi sarebbero di particolare interesse nelle aree temperate, dove i *pattern* di crescita sono fortemente influenzati dalla stagionalità. Si ritiene che la crescita dei poriferi sia essenzialmente indeterminata e che gli esemplari subiscano incrementi esponenziali nelle dimensioni. In generale la crescita viene limitata da numerosi fattori che la inibiscono, ed una crescita esponenziale è raramente raggiungibile in condizioni naturali (Sebens, 1987). I fattori che possono causare variabilità nella crescita delle spugne sono la taglia, l'età, i danni e le condizioni ambientali (Ayling, 1983; Handley et al., 2003). L'effetto di questi fattori sulla crescita dei poriferi non è del tutto chiaro. Studiando il loro tasso di crescita, si potrebbe avere una visione più chiara. In campo sono stati descritti andamenti stagionali di crescita, e numerosi ricercatori (Barthel, 1986; Garrabou e Zabala, 2001; Page et al., 2005; De Caralt et al., 2008) hanno individuato una relazione positiva tra la temperatura ed i tassi di crescita. Un altro fattore che influisce sulla crescita è la disponibilità di nutrienti (Duckworth e Pomponi, 2005).

L'organizzazione del sistema acquifero costituisce un punto di riferimento nella definizione delle spugne come organismi modulari. In essi ogni singolo modulo è formato dal complesso di canali, cellule e camere che originano un insieme strutturale e funzionale per convogliare l'acqua ad un singolo osculo. Pertanto, a differenza di altri organismi coloniali, come ad esempio Briozoi e Cnidari, in cui ogni individuo rappresenta un modulo, nei poriferi tale definizione è puramente convenzionale in quanto non è possibile delimitare i confini di ogni modulo. Tuttavia questa tipologia di crescita, modulare e ramificata, permette alle spugne di sviluppare una struttura ottimale per l'ambiente in cui vivono, modificando forma e taglia in modo da ottenere sempre le migliori prestazioni possibili. Forma e dimensione di un organismo inoltre influenzano la sua

funzione nella comunità e permettono considerazioni sulla sua storia vitale, in particolare se l'organismo è stato oggetto di disturbi antropici e/o naturali, e presenta perciò delle anomalie morfologiche (Cerrano, 2012).

Axinella polypoides è caratterizzata da un alto tasso di plasticità e di crescita (Donadey et al., 1990) e può raggiungere la maggiore dimensione tra le spugne Mediterranee, con un'altezza massima superiore ad un metro ed un complesso ed irregolare schema di ramificazione (Basile et al., 2009) (Figura 2.5).



Figura 2.5 Esempio di *Axinella polypoides*

(http://www.nikidive.com/Galleries/galleries/PlongeeBouteilles/2010/2010-07-11_WE_PCOM/IMG_9449.jpg)

2.6 Alimentazione

Come tutti i poriferi, *Axinella polypoides* non possiede un apparato digerente, è un filtratore attivo che si nutre di materiale particellare estremamente fine; questo avviene tramite meccanismi di fagocitosi e pinocitosi. Le particelle alimentari sono selezionate in base alle dimensioni e sono vagliate durante il loro passaggio attraverso le camere flagellate; soltanto particelle con dimensioni comprese tra 2 e 10 μm possono entrare negli ostii. Le particelle grosse (5-50 μm) sono fagocitate dai pinacociti che rivestono i canali inalanti e da archeociti che fuoriescono dal mesoilo; sono state anche descritte popolazioni di archeociti che ripuliscono la superficie esterna del

pinacoderma. Le particelle più fini sono trattenute dai coanociti, mediante il loro collare, e successivamente ingerite; le particelle di dimensioni inferiori ad 1 μm , sono rimosse ed inglobate dai coanociti direttamente sulla superficie della cellula. La digestione negli archeociti avviene in vacuoli, detti fagosomi; nei coanociti, invece il materiale ingerito viene rapidamente portato alla base della cellula e trasferito a cellule ameboidi del mesoilo, principalmente archeociti, dove la digestione può procedere.

L'escrezione dei prodotti di scarto, principalmente ammoniaca, come anche gli scambi gassosi, avvengono per diffusione attraverso il coanoderma (Brusca e Brusca, 1990; Mitchell et al., 1991; Bergquist, 1978).

2.7 Ecologia dello stadio adulto

I fattori ambientali chimico-fisici che influenzano maggiormente la distribuzione e la fisiologia dello stadio adulto di tutti i poriferi sono temperatura, illuminazione, idrodinamismo, sedimentazione (Sarà e Vaclet, 1973; Storr, 1976; Walther et al., 2002; Simpson, 1980).

2.7.1 Temperatura

La temperatura è il principale fattore ecologico fondamentale (Kinne, 1970) e si ritiene sia responsabile della distribuzione geografica e batimetrica delle spugne. Variazioni repentine di temperatura ed il superamento di determinati valori possono portare alla morte di un gran numero di individui (Sarà e Vacelet, 1973). Il rischio di essere sottoposti a valori di temperatura letali è elevato soprattutto per le spugne di acqua dolce e per le specie delle zone intertidali, più soggette a forti variazioni ambientali; queste spugne sono euriterme e sono in grado di affrontare i periodi di stress termico (disseccamento o congelamento) ricorrendo a diversi sistemi quali la produzione di corpi di resistenza (gemme o gemmule), il rallentamento del metabolismo, la riduzione o la degenerazione del proprio corpo.

Esistono poi specie stenoterme che generalmente vivono a maggiori profondità dove le condizioni ambientali sono più stabili.

Anche la crescita somatica è determinata dalla temperatura, così come molte altre attività fisiologiche dei poriferi: filtrazione, produzione e rilascio spermatozoi, ricettività delle uova al momento della fecondazione e liberazione delle larve. In *Hippospongia lachne*, ad esempio, il rilascio delle larve comincia ad una temperatura media dell'acqua di circa 23° C ed aumenta fino alla temperatura di 28° C. Il numero di individui che liberano larve diminuisce però bruscamente (di circa il 45%) se si verifica un ulteriore incremento termico (1-2 gradi) (Storr, 1976). Recenti scoperte portano ad una visione più realistica della dinamica riproduttiva delle spugne, mostrando che la relazione tra la temperatura dell'acqua e la gametogenesi non segue sempre un *pattern* facilmente generalizzabile. Una chiara comprensione della relazione tra l'attività riproduttiva e la temperatura potrebbe essere quindi di grande importanza se si vogliono valutare e predire gli effetti dei cambiamenti climatici sugli invertebrati marini (Walther et al., 2002).

2.7.2 Illuminazione

La luce è un fattore importante per la crescita soprattutto nel caso di simbiosi con organismi autotrofi (Wilkinson, 1980). L'illuminazione influenza inoltre l'orientamento dei poriferi sul substrato. La maggior parte delle Demospongiae delle zone superficiali tende a prediligere aree riparate dalla luce come le praterie di posidonia e le pareti a strapiombo; questo probabilmente per limitare il gran numero di epibionti che si possono sviluppare in condizioni di elevata illuminazione e che possono rendere difficoltosa la filtrazione. A profondità maggiori (25-30 m), dove la luce è più flebile, le spugne colonizzano anche superfici orizzontali. Le spugne spesso presentano, in relazione all'illuminazione, variazioni di colore; le specie sciafile solitamente sono poco colorate, mentre quelle fotofile presentano colori anche molto vivaci. I pigmenti possono essere sintetizzati dalla spugna stessa, o dati dall'associazione con alghe unicellulari; per

esempio in alcuni spongillidi la colorazione verde o bruna è data rispettivamente dalla presenza di zoochlorelle o zooxantelle che non sono digerite direttamente, ma, in risposta a segnali chimici dell'ospite, rilasciano prodotti della fotosintesi e altri metaboliti utilizzabili dall'animale (Sarà e Vacelet, 1973). Alcune specie modificano la loro colorazione in relazione a variazioni di intensità luminosa. A titolo esemplificativo *Petrosia ficiformis* in ambiente illuminato assume una colorazione marrone-violacea, grazie all'associazione facoltativa con le cianofitiche che si distribuiscono nella parte più esterna del corpo della spugna, definita simbiocortex da Simpson (1980), mentre nelle zone scarsamente illuminate è bianca in quanto i simbionti essendo fotoautotrofi, non sopravvivono. *Spongia officinalis* presenta esemplari di colore biancastro nelle zone buie, gli stessi diventano neri quando esposti alla luce. Ciò avviene in quanto la luce attiva la sintesi di pigmenti melaninici che si accumulano nel corpo dell'animale (Sarà e Vacelet, 1973). L'illuminazione quindi influisce sul colore della spugna, sia indirettamente favorendo al suo interno la presenza di simbionti, che conferiscono all'ospite la loro tipica colorazione, sia direttamente stimolando nell'animale la sintesi di pigmenti endogeni.

2.7.3 Idrodinamismo e sedimentazione

Le correnti e l'idrodinamismo sono fattori ecologico-ambientali molto importanti per i poriferi, in particolare per le spugne delle acque superficiali, dove questi fenomeni sono più accentuati. Una forte turbolenza, causata da onde o correnti troppo violente, impedisce alla larva di fissarsi al substrato e può danneggiare individui adulti strappandone parti o sradicandoli dal fondo. Viceversa un ristagno eccessivo determina deposito di sedimenti sulla superficie della spugna, rendendole la filtrazione molto difficoltosa. Solitamente i popolamenti più numerosi si trovano dove le correnti raggiungono una velocità di 3 km h^{-1} (Sarà e Vacelet, 1973). A parità di esposizione, l'idrodinamismo influisce anche sulla morfologia globale e sullo scheletro; di fatto è stato osservato che nelle zone a forte

agitazione prevalgono spugne piatte o incrostanti con scheletro robusto e compatto, mentre in acque più tranquille sono frequenti individui con forme massive e scheletro più esile (Storr, 1976). Queste diverse morfologie sono state riscontrate anche in individui appartenenti alla stessa specie ma soggetti a condizioni ambientali diverse; *Hymeniacidon sanguinea* in zone ad elevato idrodinamismo ha forma incrostante, mentre nelle acque calme delle lagune o degli stagni salmastri si presenta massiva e ramificata (Sarà e Vacelet, 1973). I movimenti dell'acqua possono influire inoltre sulla riproduzione sessuale controllando la dispersione degli spermatozoi e delle larve; un elevato idrodinamismo abbassa le probabilità di fecondazione dell'uovo, poiché diluisce velocemente gli spermatozoi (Sarà e Vacelet, 1973).

La sedimentazione è un parametro strettamente dipendente dall'idrodinamismo. Sedimenti grossolani trasportati da forti correnti possono danneggiare il corpo della spugna, mentre acque calme favoriscono la deposizione di materiale fine che può ostruire le aperture inalanti impedendo all'animale di respirare e nutrirsi; per questo, se la sedimentazione è elevata, le spugne si insediano preferibilmente su superfici verticali o in anfratti riparati. Alcuni esemplari, tuttavia, riescono a vivere anche su superfici orizzontali grazie a particolari adattamenti quali la presenza di peduncoli o fasci di spicole che sollevano la spugna dal substrato fangoso, la produzione di una placca forata che chiude l'osculo sulla sommità o ancora la specializzazione di lunghe papille a funzione inalante o esalante, sporgenti dal sedimento che ricopre la spugna (Sarà e Vacelet, 1973).

2.8 Morie

La temperatura è un parametro ecologico fondamentale che influenza molti aspetti della vita acquatica, e un significativo cambiamento termico nella colonna d'acqua può danneggiare gravemente i popolamenti marini costieri (Schubel et al., 1978). Carballo (2008) recentemente ha suggerito che la disponibilità di cibo e la temperatura

giochino un ruolo sinergico sulla dinamica di popolazione dei poriferi. Come descritto da Cerrano et al. (2001) le anomalie di temperatura e salinità verificatesi nel 1998 nelle acque antistanti l'Isola Gallinara hanno influito sui popolamenti di *Petrosia ficiformis*, presenti a profondità comprese tra 0 e -5 m, dando origine a fenomeni di *bleaching* con conseguente necrosi degli organismi considerati. Da ciò si può supporre che la scarsità di eventi di moria documentati sulle colonie di *Axinella polypoides* sia legata a fattori riguardanti la sua ecologia, prima tra tutti la distribuzione batimetrica, che essendo inferiore alla profondità del termocline estivo, non espone abitualmente le colonie a grandi variazioni di temperatura della colonna d'acqua. Anche altri fattori, legati alla sua fisiologia, sono stati osservati e relazionati con la resistenza agli stress. In *A. polypoides* infatti, Zocchi et al. (2001), osservarono un collegamento tra stress di tipo meccanico e termico ed incremento dell'attività ADP-ribosil ciclastasi, legata alla mobilitazione del calcio negli organismi, e quindi a differenti funzioni, quali: la regolazione del ciclo cellulare (protisti), la fertilizzazione degli oociti (invertebrati), la secrezione di insulina e la proliferazione cellulare (mammiferi). Questa elevata attività ciclastica è stata considerata come un possibile elemento in grado di aumentare la resistenza fisiologica della specie agli stress.

2.9 Predazione

Le spugne, avendo un corpo molle ed essendo sessili, sembrano essere fisicamente vulnerabili alla predazione. La teoria principale riguardante la funzione dei metaboliti secondari delle spugne è che agiscano come deterrente da potenziali predatori (Pawlik, 1992, 1993). È stato osservato da Pawlik et al. (1995) e da Wilson et al. (1999) che tutte le specie tropicali della famiglia Axinellidae studiate producono estratti grezzi che fungono da deterrente alla predazione da parte del labride *Thalassoma bifasciatum*. In Mediterraneo *Axinella cannabina* è predata dal nudibranco *Phyllidia flava* (Wägele e Klussmann-Kolb, 2005), e su *Axinella polypoides* vivono spesso associati,

probabilmente come parassiti, un copepode specializzato alla vita epibionte ed una specie di endoprocto per ora non identificati a livello tassonomico (Cerrano com. pers.).

3 MATERIALI E METODI

Lo studio di *Axinella polypoides* è stato svolto per mezzo di immersioni scientifiche subacquee in ARA, dal 19/08/2011 al 14/02/2012 presso l'Isola Gallinara.

L'analisi delle fotografie per la misurazione delle colonie è avvenuta tramite software di elaborazione grafica ImageJ.

Per lo studio delle fasi riproduttive e delle tipologie cellulari sono stati prelevati dalle colonie dei campioni apicali, per procedere successivamente alla loro istologia. Questa metodica ci ha permesso di analizzare bimestralmente la presenza e le dimensioni delle varie tipologie cellulari ricercate negli apici delle colonie

3.1 Area di studio

L'isola Gallinara si affaccia nel tratto di costa tra Capo S. Croce e punta di Vadino, tra i centri urbani di Alassio e Albenga, nella Liguria occidentale. Pur essendo a poca distanza dalla costa, presenta caratteristiche di limitata urbanizzazione e l'influenza del fiume Centa e delle acque reflue urbane appare relativa (Figura 3.1). La fortunata situazione ambientale dell'isola si deve anche al suo mancato sviluppo edilizio ed al vigente regime di divieti legati alla proprietà (divieto di sbarco) ed alla presenza di ordigni bellici e reperti archeologici sui fondali (divieto di immersione in alcune zone fino all'anno 2004).

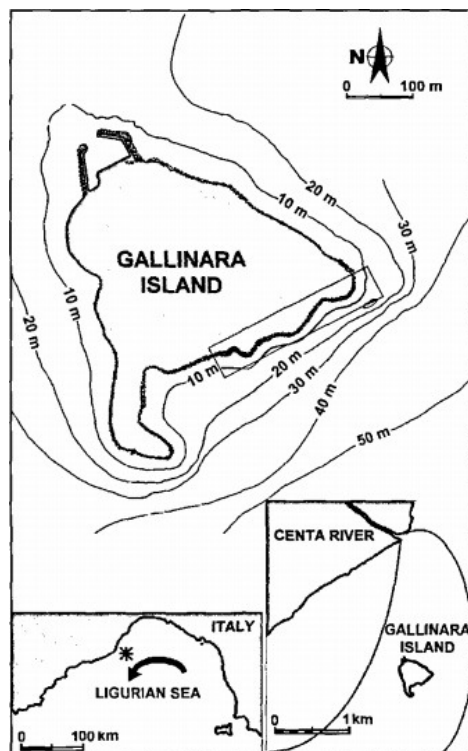


Figura 3.1 Posizione geografica dell'Isola Gallinara (asterisco nel riquadro di sinistra). Il riquadro di destra indica la posizione dell'Isola e della corrente fluviale del fiume Centa (Da Cerrano et al., 2001)

La costa dell'isola si presenta alta e scoscesa, costituita da quarziti di colore grigio chiaro in banchi dello spessore di qualche centimetro. La direzione degli strati è la stessa dell'antistante Capo S. Croce, da cui l'isola si ritiene si sia separata a causa di un'ingressione marina quaternaria e dell'erosione dovuta al trasposto di materiale sabbioso proveniente dal vicino fiume Centa (Orsino, 1975). La forma dell'isola è approssimativamente triangolare, col vertice sud prolungato in uno stretto promontorio piegato verso est (Punta Falconara) (Figura 3.2).



Figura 3.2 Isola Gallinara.

All'estremità settentrionale si apre un porticciolo, mentre il vertice orientale prende il nome di Punta Sciusciaù. I lati occidentale e nord-orientale dell'isola sono caratterizzati da brevi falesie con popolamenti algali, cui verso i 10-15 m di profondità seguono praterie di fanerogame o fondi molli. Il lato sud-orientale presenta maggiore varietà di situazioni ambientali e ricchezza di popolamenti biologici, oltre ad emergenze naturalistiche tra le più significative dell'intera riviera di ponente. La falesia rocciosa giunge sino a 35 m di profondità ed ospita vari popolamenti algali, cui segue un coralligeno dominato da grandi poriferi massivi e/o eretti (Figura 3.3). I fondi biodetritici sottostanti presentano una componente a briozoi ed uno strato elevato a gorgoniacei. Lo studio prende in esame i popolamenti di *Axinella polypoides* presenti in questa zona, nel sito d'immersione denominato Sciusciaù.

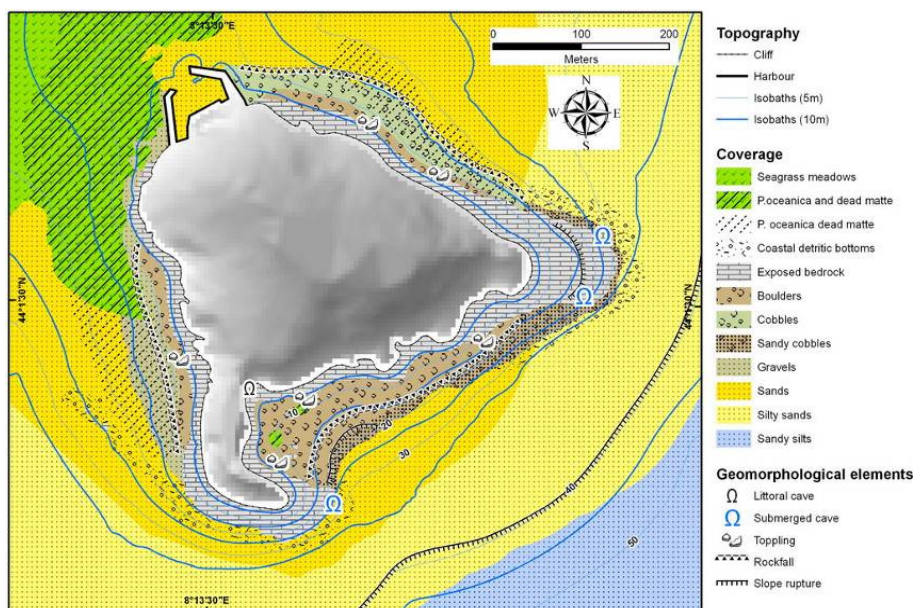


Figura 3.3 Carta dei fondali circostanti l'Isola Gallinara (Gentile concessione di SEAMap srl).

3.1.1 Punto di immersione

Il punto di immersione si trova su punta Sciusciaù (44° 01' 30'' N, 8° 13' 47'' E). Il profilo sommerso è caratterizzato da un ampio terrazzo suborizzontale tra 6-8 e 12 m che separa due ripide pareti rocciose: più in profondità si ha un ampio tratto roccioso a minore pendenza, cui segue un fondale sabbioso-detritico con alcuni affioramenti rocciosi. Si tratta della parte dell'isola più esposta al mare aperto e le prime fasce batimetriche sono interessate da associazioni legate al forte regime idrodinamico. Al di sotto dei 17 m di profondità si sviluppa un popolamento algale sciafilo ad affinità circolitorale, dominato da *Cystoseira zosteroides*, nel quale si osserva anche un'importante componente animale costituita da poriferi, briozoi e tunicati. In questa zona si trovano cavità lunghe anche diversi metri, che ospitano facies a poriferi, madreporari e briozoi, riconducibili a popolamenti di grotta semioscura e oscura. Al di sotto di questa fascia (22-25 m) troviamo popolamenti di substrato duro, riconducibili al coralligeno dell'orizzontale inferiore della roccia litorale. In questa zona si ha particolare sviluppo di una facies caratterizzata da cnidari, briozoi e numerosi grossi esemplari di poriferi, tra cui molte colonie di *Axinella polypoides*.

3.2 Misure di temperatura

Le misure di temperatura dell'acqua sono state acquisite da computer subacquei utilizzati in immersioni effettuate presso Punta Sciusciaù nell'anno 2011. Tramite porta ad infrarossi sono stati trasferiti i profili immersione al software SmartTRAK (UWATEK) e successivamente sono stati esportati in Excel per analizzare l'andamento nel tempo della temperatura in relazione alle fasce di profondità e al ciclo biologico della spugna.

3.3 Analisi della popolazione

Per analizzare la popolazione di *Axinella polypoides* presente su una superficie di 1000 m² circa, in una fascia batimetrica compresa tra i 25 e i 35 m (Figura 3.4), sono state prese in considerazione 25 colonie, suddivise in due gruppi, relativamente alla loro profondità (S: *shallow*, 11 colonie tra i 25 e i 28 m di profondità; D: *deep*, 14 colonie tra i 32 ed i 35 m di profondità).

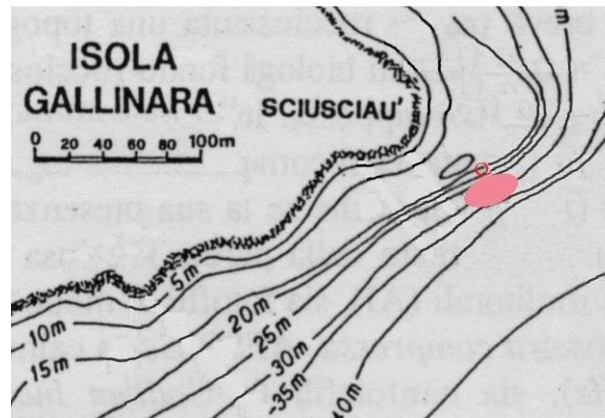


Figura 3.4 Area di studio (modificato sulla base di Balduzzi et al, 1992).

Degli organismi studiati è stata segnata la profondità e sono stati seguiti i parametri:

- diametro basale,
- altezza massima,
- numero di rami,
- eventuali anastomosi.

Nell'ambito di queste misurazioni sono stati raccolti dati relativi alla presenza di lenze da pesca nell'area di studio e si è proceduto alla loro rimozione dalle colonie.

3.4 Crescita

Per studiare la crescita, 6 colonie tra i 25 ed i 28 m e 9 tra i 32 ed i 35 m di profondità (Figura 3.5) sono state marcate con cartellini in PVC inseriti nella roccia sottostante (Figura 3.6). Sulle colonie marcate sono stati svolti studi sul tasso di crescita tramite osservazioni fotografiche.

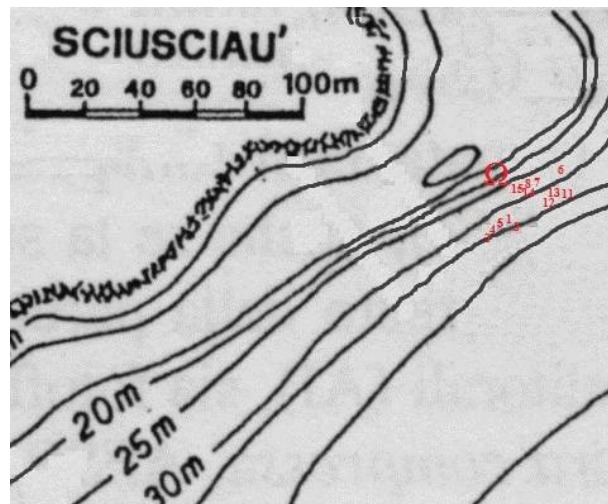


Figura 3.5 Mappa delle colonie marcate (modificato sulla base di Balduzzi et al, 1992).



Figura 3.6 Alcune tra le colonie studiate.

Durante lo studio alcuni cartellini si sono distaccati dalla roccia, causando l'impossibilità di proseguire con il monitoraggio delle colonie ad essi corrispondenti (8, 9, 10). I campionamenti fotografici subacquei sono stati svolti ogni 50 giorni circa (le cattive condizioni del mare durante il periodo autunnale e invernale hanno impedito un regolare monitoraggio mensile), utilizzando macchine fotografiche digitali compatte, con scafandro e dotate di flash esterni. Per analizzare la crescita dei rami, ogni colonia è stata fotografata lateralmente, utilizzando un riferimento dimensionale (un quadrato reticolato di dimensioni 50x50 cm posto il più aderente possibile alla colonia e parallelo alla linea di costa) inserito all'interno del campo della foto e necessario per la successiva calibrazione del software ImageJ.

Inoltre, per verificare se la crescita della colonia avvenga solo nelle parti apicali, come sostenuto da Kaandorp e De Kluijver (1992), o anche nelle altre parti dell'organismo, alcune colonie sono state marcate con spilli di plastica inseriti nel tessuto fino alla capocchia. Due sono stati inseriti alla base della colonia, perpendicolarmente all'asse centrale e perpendicolari tra loro. Altri sono stati inseriti su due rami, introducendoli in numero di due per ramo, uno partendo dall'apice e parallelamente all'asse centrale (per marcare il limite superiore dell'apice) e l'altro perpendicolare ad esso a una distanza di circa 5 cm dall'apice.

3.4.1 Analisi di Horton

La grande plasticità nelle forme dei poriferi, dovuta all'esposizione ai movimenti dell'acqua, è un fenomeno ben conosciuto (Bidder, 1923; Warburton, 1960; Barthel, 1991). Questo porta a notevoli difficoltà nell'analisi della crescita di questi organismi.

In questo studio l'analisi della crescita è stata eseguita numerando i rami con disposizione parallela al piano della foto tramite l'ordinamento proposto da Horton-Strahler (Horton, 1945; Strahler 1952) (Figura 3.7). Successivamente, ad ogni ramo misurabile della colonia, è stato attribuito un codice alfanumerico che ne permette il

riconoscimento. I segmenti di rami sono stati numerati in modo crescente a partire dagli apici. I rami senza nessuna ramificazione vengono definiti di ordine primario (“primari”), con $\omega=1$. Due rami primari che si intersecano danno origine ad un ramo di ordine secondario (“secondario”), con $\omega=2$. Due rami secondari che si intersecano danno origine ad un ramo di ordine terziario (“terziario”), con $\omega=3$, etc. Se un ramo di ordine superiore al primo si interseca con un ramo di ordine ad esso inferiore ($\omega_1 \neq \omega_2$), il ramo che viene originato risulta di ordine pari a quello superiore ($\omega=\max(\omega_1, \omega_2)$).

Una volta definito l’ordine di appartenenza di ogni ramo secondo l’analisi di Horton, si è proseguito con l’attribuzione del nome di ciascuno utilizzando un codice alfanumerico numero-lettera-numero, ovvero 01 (“numero colonia”) – A (“lettera dell’alfabeto corrispondente al numero dell’ordine” A: primario; B: secondario; C: terziario) - 01 (“numero ramo”, progressivamente crescente in ordine di apparizione visiva a partire dalla parte in basso a sinistra procedendo verso l’alto a destra della colonia).

Eventuali rami cresciuti in seguito, intersecando necessariamente rami già denominati, vengono considerati come facenti parte dell’ordine del ramo da cui hanno origine, senza modificare la nomenclatura precedentemente definita. Questo è necessario per permettere l’osservazione nel tempo degli stessi rami e quindi la loro crescita progressiva.

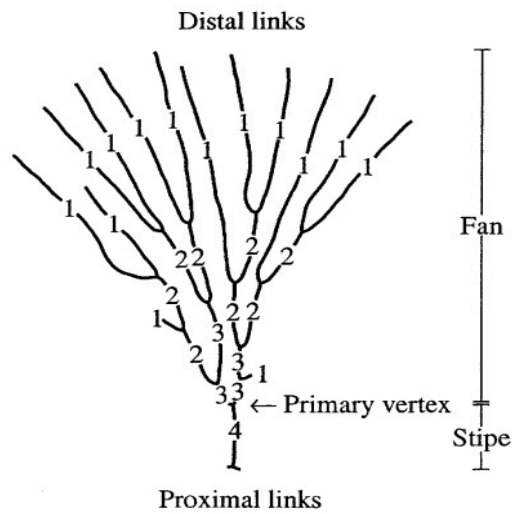


Figura 3.7 Ordinamento Horton-Strahler (Da Abraham, 2001)

3.4.2 *Analisi di immagine*

Per le misurazioni delle colonie è stato utilizzato il software ImageJ 1.44p (National Institute of Health, USA), programma di elaborazione di immagini basato sui pixel. Questo programma è in grado di svolgere diverse funzioni, quali misurare lunghezze e aree, effettuare calcoli statistici (media, minimo, massimo, deviazione standard), generare istogrammi e modificare immagini. Nel presente studio è stato utilizzato per misurare la lunghezza dei rami delle colonie effettivamente misurabili. Questo è stato possibile utilizzando il riferimento metrico inserito all'interno delle fotografie (Figura 3.8), che viene confrontato dal software con la lunghezza dei rami, permettendo così di estrapolare una misura la cui crescita può essere analizzata nel tempo. La misurazione di crescita dei rami è stata eseguita posizionando una linea spezzata lungo l'asse centrale di ogni ramo precedentemente codificato tramite l'analisi di Horton e procedendo alla successiva misurazione.

L'accrescimento è stato valutato sia in termini assoluti, espresso come mm giorno^{-1} , sia in termini relativi, cioè in percentuale della lunghezza iniziale, espresso in $\%$ di crescita mese^{-1} .



Figura 3.8 Una delle immagini utilizzate per l'analisi di crescita.

3.5 Analisi istologiche

L'analisi istologica è stata svolta su 4 frammenti apicali di circa 5 cm di lunghezza raccolti bimestralmente (settembre, novembre, gennaio) da differenti colonie tra quelle non numerate presenti all'interno dell'area di studio. Da ognuno di questi campioni è stato prelevato un frammento per l'analisi istologica. Per verificare eventuali differenze nelle tipologie cellulari a seconda della posizione nell'apice si è proceduto come segue:

- da due dei campioni il frammento per l'analisi istologica è stato prelevato nella zona apicale,
- dagli altri due campioni nella zona centrale (2,5 cm circa dall'apice).

I campioni sono stati successivamente pretrattati e si è proceduto al loro congelamento per ottenere sezioni da taglio posizionabili su vetrini ed osservabili al microscopio.

3.5.1 Procedura per istologia con microtomo criostato

La presenza all'interno di *Axinella polypoides* di spicole silicee comporta alcune difficoltà nell'analisi istologica, quindi prima di procedere all'analisi, il campione è stato pretrattato per eliminarle. La procedura istologica è stata effettuata seguendo il seguente protocollo:

- Tagliare il frammento di apice (in funzione delle dimensioni massime dei supporti dello strumento) dalla zona desiderata.
- Sciacquare abbondantemente il frammento con acqua distillata per eliminare la soluzione di formalina al 4%.
- In un becker di plastica preparare una soluzione di acido fluoridrico al 5%.
- Inserire il frammento nella soluzione per 30 minuti al fine di sciogliere le spicole silicee.
- Sciacquare attentamente i campioni con acqua distillata per eliminare eventuali residui di acido fluoridrico.
- Mettere 200 ml circa di esano in un becker di plastica e lasciarlo in congelatore a -80°C per un tempo sufficiente a congelarne 1/3 (3-4 ore).
- Mettere i supporti in alluminio (*chuck*) in ghiaccio in modo che non si formi condensa.
- Disporre i campioni già pretrattati in gruppi sul *chuck*, marcandone la posizione sul retro del supporto.
- Aiutandosi con una pinza, immergere i *chuck* (con i campioni rivolti verso l'alto) nell'esano per circa 30 secondi, dopo di che ripetere la stessa operazione girando il *chuck*, e facendo attenzione a non toccare la parte già congelata dell'esano per evitare che i frammenti si staccino dal *chuck*. Questo procedimento porta all'espulsione di tutta l'acqua presente all'interno del campione.
- Avvolgere il *chuck* nella stagnola (precedentemente siglata con i numeri dei campioni), coprire con parafilm e riporre rapidamente a -80°C per almeno 24 ore.
- Pretrattare un numero sufficiente di vetrini per i campioni con ϵ -poli-L-lisina 1% al fine di favorire l'adesione delle sezioni.
- Inserire il *chuck* nel microtomo criostato (MICROM HM 505N di MICROM International GmbH) mantenuto alla temperatura di -35°C .
- Sezionare i frammenti al microtomo criostato con spessore di taglio di $10\ \mu\text{m}$.

- Trasferire le sezioni su vetrini da microscopia tramite adesione a caldo.
- Colorare le sezioni con una soluzione satura di blu di toluidina.
- Essiccare i vetrini in stufa a 45°C per qualche minuto.
- Chiudere con vetrini copri-oggetto con resina Eukitt per la conservazione a lungo periodo.

3.5.2 Lettura al microscopio

Il Blu di Toluidina è un colorante basico che forma complessi metacromatici con gli acidi nucleici e le proteine. Osservando il vetrino al microscopio, le cellule appaiono di colore azzurro a causa della reazione del substrato con il colorante. Una volta colorata la sezione ed aggiunto il vetrino copri-oggetto, i campioni sono stati osservati al microscopio ed è stato misurato il numero e le dimensioni delle cellule.

L'osservazione dei vetrini è stata svolta attraverso microscopio ottico Nikon Eclipse 50i, dotato di telecamera Nikon DS-5M ed interfacciato a PC con l'unità di controllo Nikon DS-U1. Per la misurazione delle dimensioni cellulari è stato utilizzato il software EclipseNet calibrato tramite vetrino millimetrato.

Con un ingrandimento variabile da 40x a 400x, sono state determinate la densità e le dimensioni delle tipologie cellulari nei campioni raccolti, per determinare lo stadio del ciclo riproduttivo nelle date di campionamento ed eventuali variazioni temporali nella morfologia delle altre cellule riscontrate. La densità è stata calcolata come numero di cellule mm^{-2} e la dimensione è stata misurata su 20 cellule *random* per ogni vetrino.

3.6 Analisi statistiche

L'accrescimento medio assoluto e relativo è stato valutato mediante test T di Student per verificare la differenza da zero. La differenza tra i valori medi è stata valutata tramite analisi della varianza permutazionale (PERMANOVA) usando il software statistico

PRIMER 6+. Per le singole variabili, la matrice di dissimilarità è stata creata sulla base della distanza euclidea. Per le analisi istologiche sono stati presi in considerazione i fattori Posizione (Po: 2 livelli fissi: apicale, centrale) e Data (Da: 3 livelli fissi: 05/09/2011, 19/11/2011, 14/01/2012). Quando meno di 999 permutazioni uniche erano disponibili, si è ricorsi al test asintotico di Monte Carlo, il cui risultato è indicato con P(MC). Il *pair-wise* test è stato utilizzato successivamente nel caso di interazione Po × Da significativa, per distinguere tra i livelli dei fattori risultati significativi. Il livello di significatività adottato per tutte le analisi è $\alpha = 0,05$.

4 RISULTATI

4.1 Andamento della temperatura

L'analisi dei profili di immersione raccolti ha portato all'estrapolazione di profili di temperatura per le due fasce batimetriche S (*shallow*: -25 m) e D (*deep*: -35). Sono state riscontrate differenze dovute alla presenza, ad una profondità di circa 30 m, del termoclino estivo, mentre durante il resto dell'anno la temperatura rimane relativamente costante lungo la colonna d'acqua (Figura 4.1).

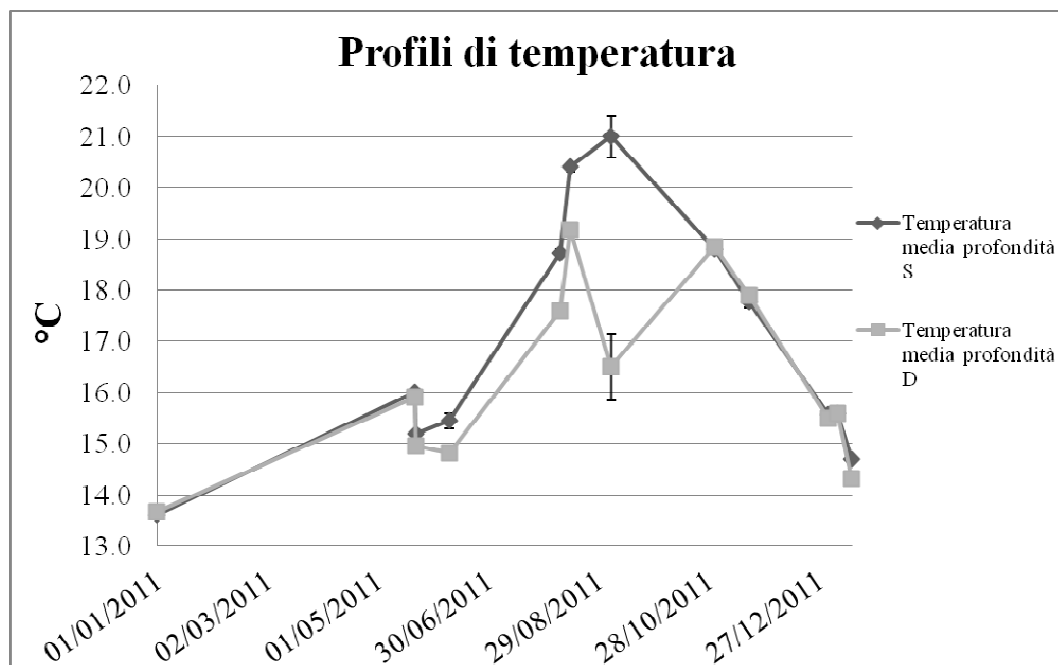


Figura 4.1 Andamento medio (\pm e.s.) delle temperature nelle due fasce di profondità (S: -25m, D: -35m) per il periodo di studio.

4.2 Analisi della popolazione

I dati morfometrici raccolti sono stati analizzati per verificare eventuali relazioni allometriche. Dall'osservazione notiamo una grande variabilità all'interno dell'area di studio. Le colonie, infatti, come si può osservare nella Tabella 4.1, hanno un ampio range di variazione per quanto riguarda tutti e quattro i parametri analizzati. La

variazione è elevata sia all'interno dei gruppi S e D, sia su tutta la popolazione considerata.

Tabella 4.1 Tabella riassuntiva dei dati morfometrici raccolti.

	Profondità (m)	Diametro (cm)	Altezza (cm)	N rami	N anastomosi
S min	25.7	0.5	9	6	0
S Max	28	2.6	37	15	10
D min	32.3	0.5	5	0	0
D Max	35.1	6	80	27	7
MIN	25.7	0.5	5	0	0
MAX	35.1	6	80	27	10

Il diametro basale delle colonie non differisce significativamente tra i due gruppi, e si attesta sul valore di 1.628 ± 0.124 cm (media \pm e.s.) (Figura 4.2).

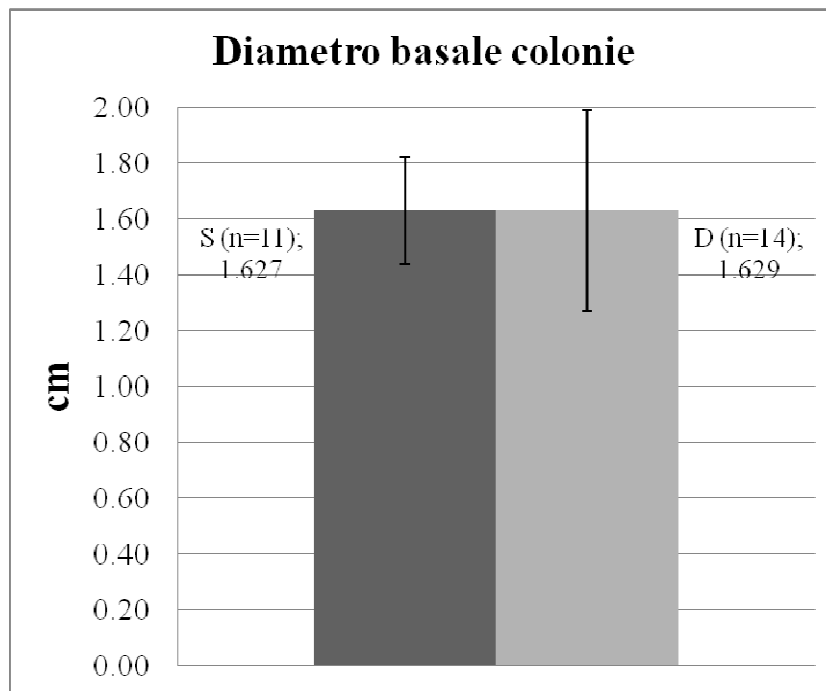


Figura 4.2 Diametro basale medio (\pm e.s.) delle colonie in analisi.

L'altezza delle colonie invece mostra una differenza significativa tra i due gruppi di profondità. Le colonie più superficiali, infatti, sono alte 22 ± 3.0 cm (media \pm e.s.), quelle più profonde 28.75 ± 4.98 cm (media \pm e.s.) (Figura 4.3).

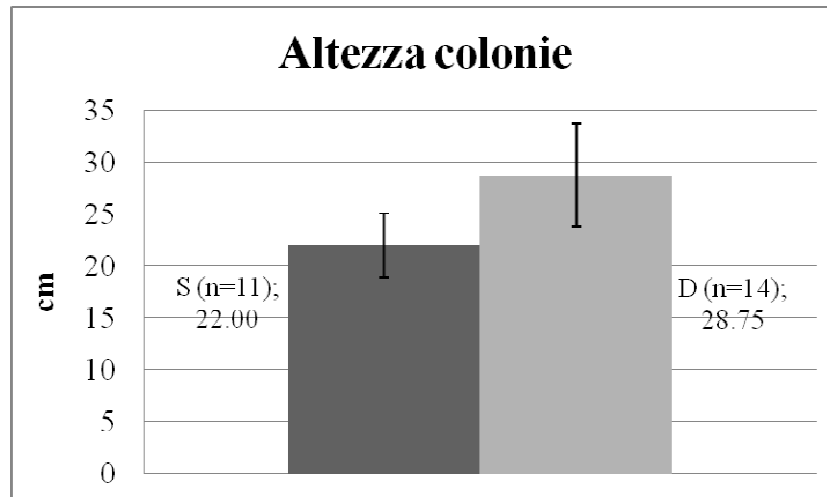


Figura 4.3 Altezza media (\pm e.s.) delle colonie in analisi.

Il numero dei rami non presenta differenze significative tra le due colonie, attestandosi sul valore di 10.08 ± 1.28 rami (media \pm e.s.) (Figura 4.4).

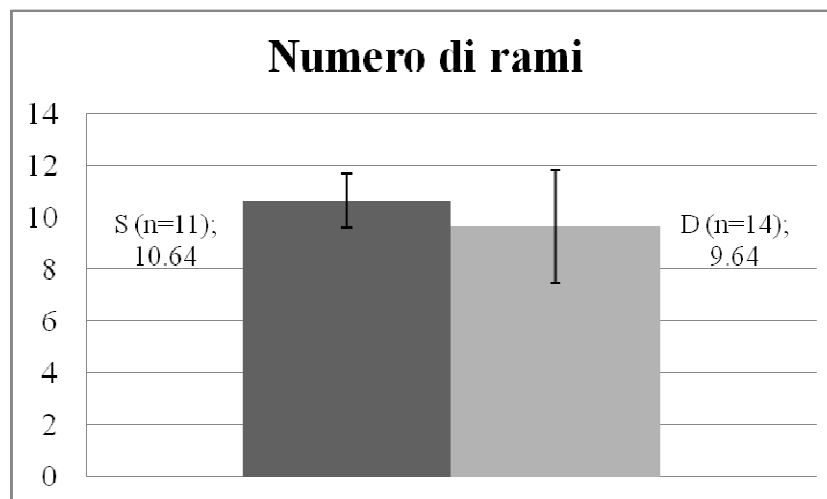


Figura 4.4 Numero di rami medio (\pm e.s.) per le colonie in analisi.

Sulle colonie studiate è stata riscontrata la presenza di cinque lenze da pesca, e si è proceduto alla loro rimozione.

4.3 Crescita

Il campionamento fotografico ha permesso di misurare un numero complessivo di 105 rami, suddivisi come segue: 78 primari, 21 secondari, 6 terziari.

Si è potuto osservare che nel complesso la crescita assoluta su tutti i rami considerati non è differente da zero e quindi non appare significativa per il periodo di studio. I rami sono cresciuti di $0,0118 \pm 0,0125 \text{ mm giorno}^{-1}$ (media \pm e.s.). Osservando la crescita assoluta media per gruppi di appartenenza, si osserva, anche in questo caso, che valori non sono significativamente diversi da zero. Non è stato possibile quindi misurare una crescita assoluta significativa per nessuna dei tre ordini di appartenenza (Figura 4.5).

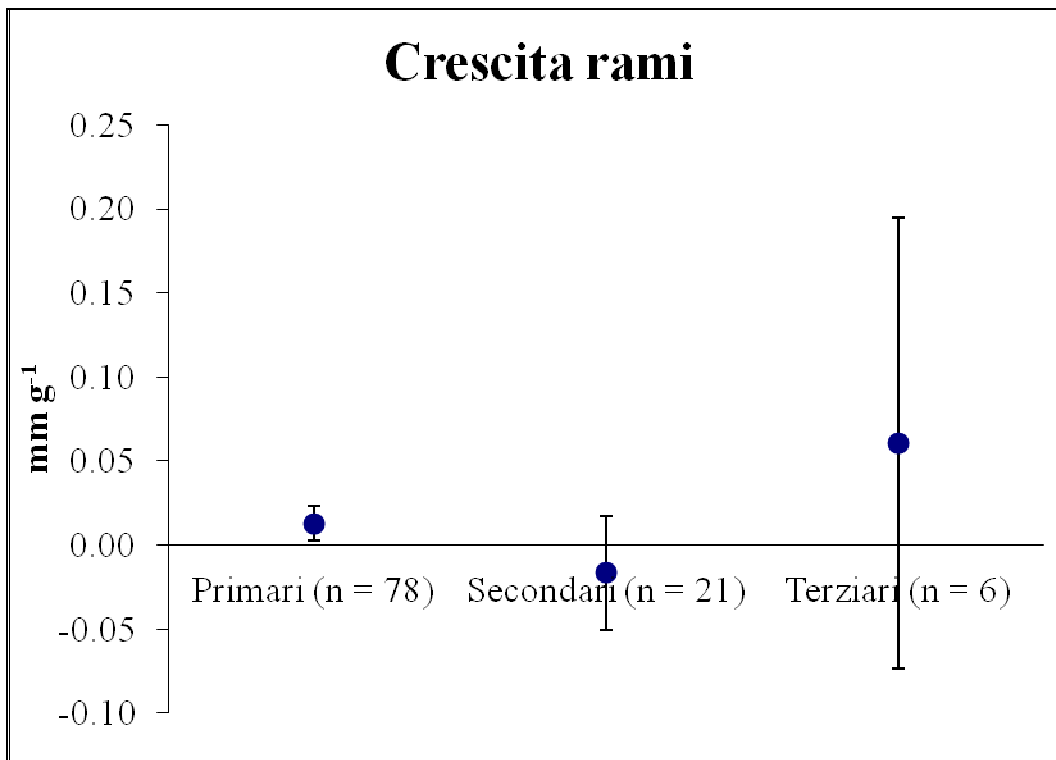


Figura 4.5 Crescita media (\pm e.s.) assoluta dei rami, suddivisi per ordine di appartenenza.

In termini di crescita relativa mensile dei rami per ordine di appartenenza, è stato possibile osservare, per i rami primari, una crescita media significativamente diversa da zero e pari allo $1,53 \pm 0,47 \text{ \% mese}^{-1}$ (media \pm e.s.), confermata dal test T di Student. I rami di ordine secondario e terziario non hanno invece mostrato crescita mensile significativa (Figura 4.6).

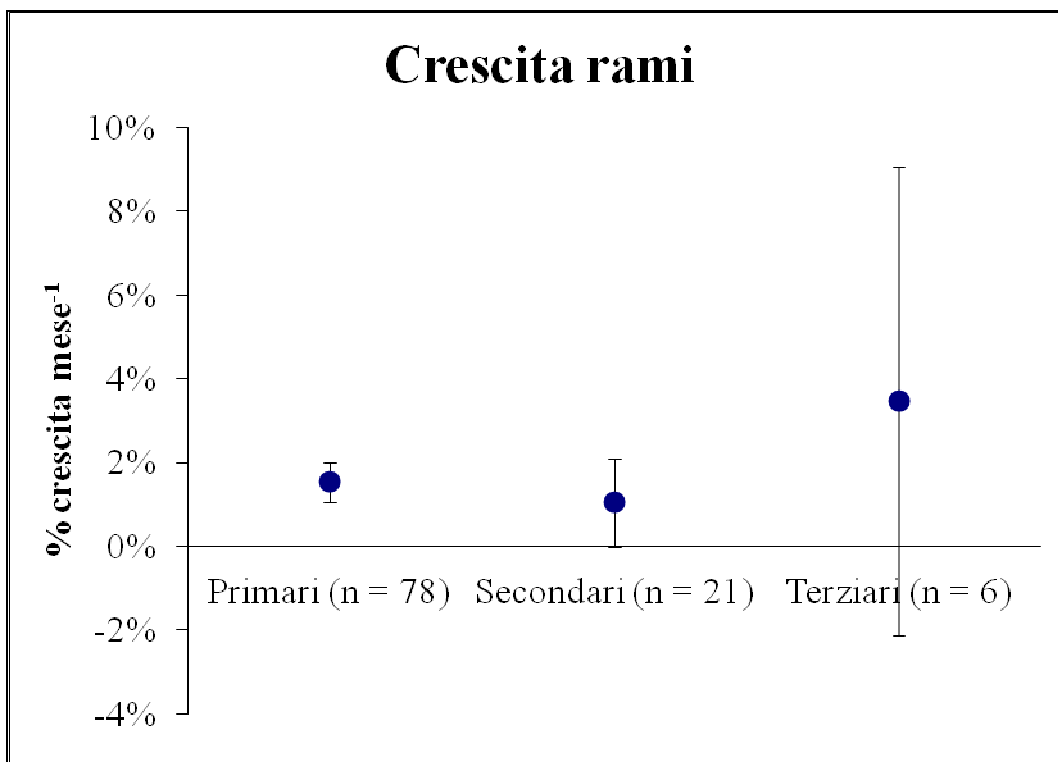


Figura 4.6 Crescita media (\pm e.s.) relativa mensile dei rami, suddivisi per ordine di appartenenza.

Nell'ultimo periodo è stata osservata la presenza di fenomeni di necrosi (Figura 4.7) e di regressione di alcuni degli apici (Figura 4.8). Questi fenomeni potrebbero essere dovuti alla risposta al tentativo di marcare con spilli il limite superiore degli apici al fine di valutare la crescita a lungo termine di alcuni apici. La tecnica è stata utilizzata con successo in altre specie a crescita arborescente (Kaandorp et al., 1992), ma *Axinella polypoides* ha reagito negativamente a questo trattamento.



Figura 4.7 Apici di *Axinella polypoides* in necrosi.



Figura 4.8 Regressione del ramo centrale (codificato 14A04).

Infatti, monitorando le colonie marcate è stato osservato un fenomeno di espulsione da parte delle stesse degli spilli in plastica inseriti al loro interno per le analisi di crescita. La maggior parte degli spilli, infatti, durante il terzo campionamento fotografico, a distanza di soli due mesi dall'inserimento (19/11/2011), non è stata rinvenuta sulle colonie nelle quali erano stati inseriti. Nel caso della parte basale della colonia 2 è stato possibile osservare e fotografare chiaramente una delle fasi del processo di espulsione (Figura 4.9), che avviene tramite un'evidente invaginazione dell'ectosoma.



Figura 4.9 Colonia 2, particolare dell'espulsione degli spilli (foto scattata il 14/01/2012).

4.4 Analisi istologiche

Dall'analisi istologica dei vetrini ottenuti dai campioni raccolti nelle tre date, non è stata riscontrata la presenza di oociti.

L'osservazione ha evidenziato però un gran numero di strutture cellulari sferulose. In istogramma è rappresentata la densità media delle cellule sferulose per mm^2 (Figura 4.10).

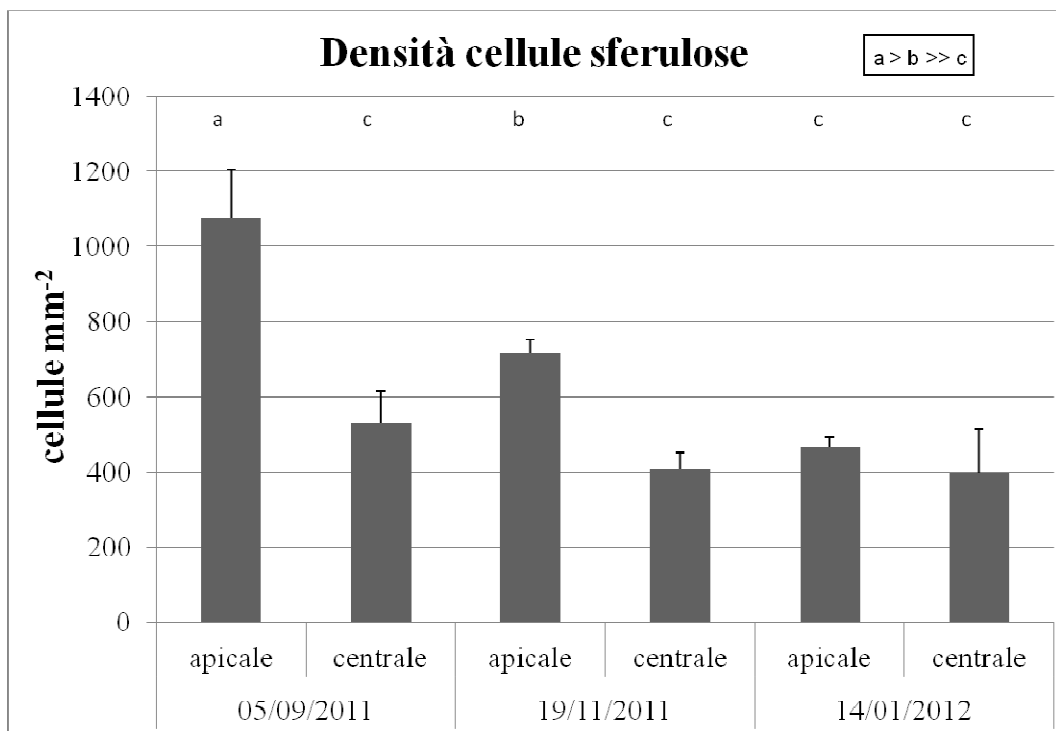


Figura 4.10 Densità media (+ e.s.) delle cellule sferulose all'interno dei campioni analizzati, le lettere in alto indicano le differenze significative.

Le differenze di densità di queste cellule nelle tre date e nelle posizioni apicale e centrale dei rami, sono state analizzate con analisi della varianza permutazionale a due vie (PERMANOVA) che ha mostrato differenze significative in relazione alla interazione tra i due fattori (Po x Da: $P < 0,05$), come si può osservare nella Tabella 4.2.

Tabella 4.2 Test PERMANOVA sui dati di densità delle cellule sferulose.

Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Unique perms
Posizione	1	3168	3168.7	16.732	0.0008	9845
Data	2	3227	1613.6	8.5209	0.0025	9953
PoxDa	2	1341	670.5	3.5407	0.0467	9948
Res	20	3787	189.4			
Total	25	11400				

Dai *pair-wise* tests emerge che esistono differenze significative all'interno del livello "apicale" tra le varie date. Due delle combinazioni (05/09/2011-14/01/2012; 19/11/2011-14/01/2012) mostrano una differenza altamente significativa ($P(MC) < 0,01$), mentre la combinazione 05/09/2011- 11/19/2011 mostra una

differenza significativa ($P(MC)<0,05$). Relativamente al livello “centrale” non emerge una significativa differenza tra le date ($P(MC)>0,05$).

La differenza all’interno delle date di campionamento tra le varie posizioni è significativa per il campionamento del 05/09/2011 ($P(MC)<0,05$), ed è altamente significativa ($P(MC)<0,01$) per il campionamento del 19/11/2011. La differenza non appare invece significativa per la data 14/01/2012 ($P(MC)>0,05$).

La dimensione media delle cellule sferulose è rappresentata nell’istogramma (Figura 4.11).

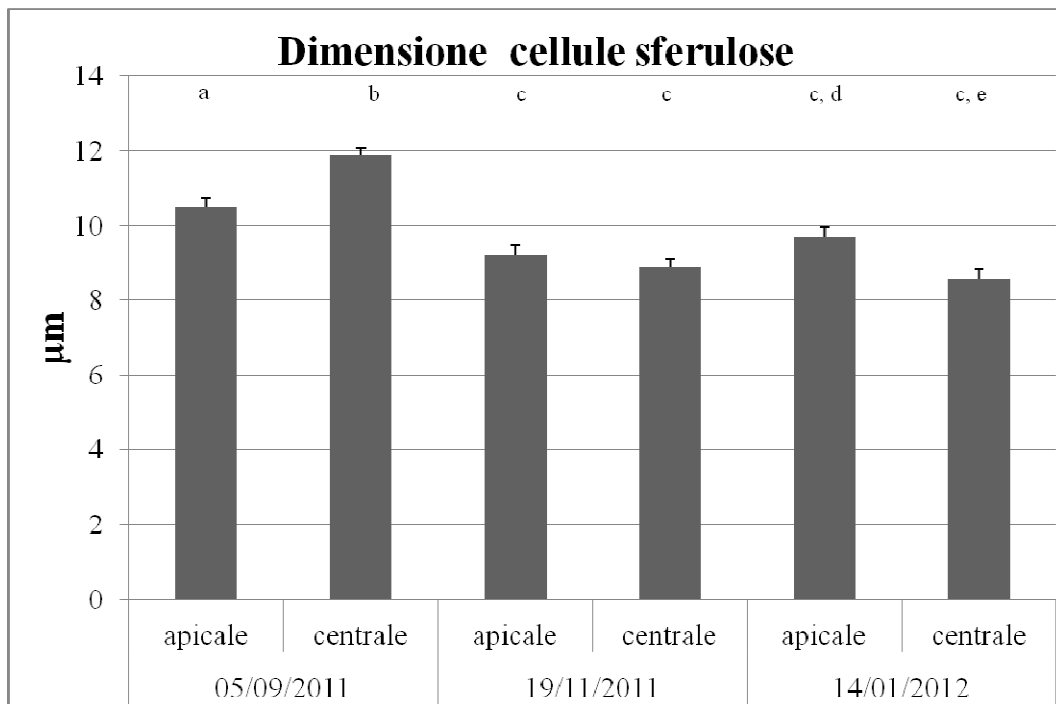


Figura 4.11 Dimensione media (+ e.s.) delle cellule sferulose misurate all’interno dei campioni analizzati, le lettere in alto indicano le differenze significative.

Anche per le dimensioni di queste cellule ci sono differenze altamente significative in relazione alla interazione tra i due fattori (Po x Da: $P<0,01$).

Tabella 4.3 Test PERMANOVA sui dati di dimensione delle cellule sferulose.

Source	df	SS	MS	Pseudo-F	P(perm)	Unique perms
Posizione	1	0.0016	0.0016	0.0007	0.9789	9848
Data	2	230.79	115.39	52.176	0.0001	9952
PoxDa	2	63.583	31.791	14.375	0.0001	9946
Res	233	515.31	2.2116			
Total	238	809.51				

Dai *pair-wise* tests emerge che esistono differenze significative tra le varie date all'interno del livello "apicale". La combinazione tra le due date 05/09/2011-19/11/2011 mostra una differenza altamente significativa ($P < 0,01$), la combinazione 05/09/2011-14/01/2012 mostra una differenza significativa ($P < 0,05$), mentre la combinazione 05/09/2011- 14/01/2012 non mostra differenze significative ($P > 0,05$) relativamente alle dimensioni delle cellule sferulose (Tabella 4.4).

Tabella 4.4 PAIR-WISE TEST per coppie di livelli del fattore "Data" all'interno del livello "apicale" del fattore "Posizione", sulla base dei dati di dimensione delle cellule sferulose.

Groups	t	P(perm)	Unique perms
05/09/2011, 19/11/2011	3.904	0.0006	1725
05/09/2011, 14/01/2012	2.3113	0.0214	1707
19/11/2011, 14/01/2012	1.3127	0.1925	1716

Relativamente al livello "centrale" due delle combinazioni (05/09/2011-19/11/2011; 05/09/2011-14/01/2012) mostrano differenze altamente significative ($P < 0,01$), mentre la differenza per la combinazione 19/11/2011-14/01/2012 non appare significativa ($P > 0,05$) (Tabella 4.5).

Tabella 4.5 PAIR-WISE TEST per coppie di livelli del fattore "Data" all'interno del livello "centrale" del fattore "Posizione", sulla base dei dati di dimensione delle cellule sferulose.

Groups	t	P(perm)	Unique perms
05/09/2011, 19/11/2011	9.8449	0.0001	3412
05/09/2011, 14/01/2012	10.286	0.0001	2216
19/11/2011, 14/01/2012	1.1741	0.2495	2772

La differenza all'interno delle date di campionamento tra le varie posizioni appare altamente significativa ($P < 0,01$) per il campionamento del 05/09/2011 e per il campionamento del

14/01/2012. La differenza non appare invece significativa per la data 19/11/2011 ($P>0,05$) (Tabella 4.6).

Tabella 4.6 PAIR-WISE TEST per coppie di livelli (apicale, intermedio) del fattore “Posizione” all’interno dei livelli del fattore “Data”, sulla base dei dati di dimensione delle cellule sferulose.

Groups	t	P(perm)	Unique perms
Within level '05/09/2011' of factor 'Data'	4.4937	0.0001	1632
Within level '19/11/2011' of factor 'Data'	0.7674	0.4548	2707
Within level '14/01/2012' of factor 'Data'	3.0186	0.0029	1797

L’osservazione al microscopio ha evidenziato anche la presenza, in alcuni campioni, di cellule dendritiche e fusiformi (Figura 4.12), già osservate in *A. polypoides* da Giovine et al. (2001). La loro dimensione è stata misurata, ed è risultata essere variabile tra i 6 ed i 16 μm . La distribuzione nelle sezioni è risultata essere molto irregolare con aree di accumulo individuate occasionalmente in prossimità dell’ectosoma.

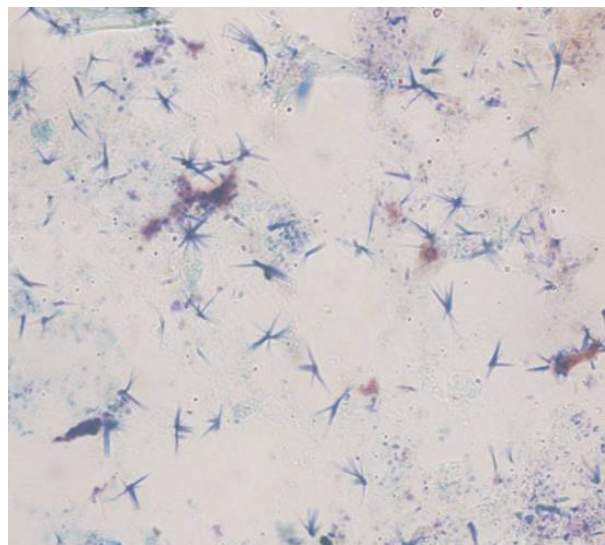


Figura 4.12 Cellule dendritiche osservate all’interno delle sezioni analizzate.

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo studio è la fase iniziale uno studio a più lungo termine sul ciclo vitale e accrescimento di *Axinella polypoides*, nonché sulle possibili modificazioni che potrebbero subire le popolazioni di questa specie a seguito dei cambiamenti climatici e degli impatti antropici. Gli ecosistemi marini, infatti, stanno affrontando un declino a livello globale delle specie sessili in molte comunità bentoniche, questo dovuto all'aumento del regime di disturbo dovuto ai cambiamenti globali ed agli impatti antropici (Bellwood et al., 2004; Halpern et al., 2008; Levin e Dayton, 2009). Per questo, le conoscenze riguardanti i processi demografici delle specie sessili a grande scala spaziale e temporale stanno diventando cruciali, soprattutto per specie molto longeve. I cambiamenti nei parametri ambientali, quali salinità, temperatura e sedimentazione a cui si assiste sono considerati come possibili cause di declino nelle popolazioni di poriferi, anche se i dati ottenuti sottolineano la frequente incidenza di fattori eziologici patogeni (Wulff 2006b). L'importanza delle malattie nel determinare le comunità di poriferi può essere valutata solo attraverso un monitoraggio sufficientemente frequente da individuare il progresso della malattia prima che l'organismo scompaia completamente. Come osservato da Wulff (2006c), i meccanismi di recupero e di rigenerazione dalle malattie sono favoriti nelle spugne ramificate e questo in alcuni casi potrebbe aver provocato cambiamenti nella struttura dei popolamenti bentonici, portando ad un declino delle specie massive in favore delle specie a morfologia eretta.

Dalle analisi condotte sulle colonie di *A. polypoides* emerge l'assenza di oociti nel periodo di studio. Questo è probabilmente legato ad un ciclo riproduttivo prevalentemente estivo, come osservato da Magnino (1998) per *Axinella verrucosa*, presso il promontorio di Portofino.

L'analisi dei tassi di crescita non mostra, nel periodo di studio, una crescita significativa in termini assoluti. Relativamente alla crescita

percentuale mensile, invece, emerge una significatività della crescita per i rami primari. Questa osservazione è in linea con le osservazioni di Kandoorp e De Kluijver (1992) che descrissero una dinamica di crescita limitata agli apici dei rami. Questo indica un ridotto o nullo accrescimento nel periodo autunnale e invernale, in linea con le osservazioni fatte da Zocchi et al. (2001) e da Basile et al. (2009) che evidenziano una correlazione tra l'incremento della temperatura e i fenomeni di rigenerazione dei tessuti e l'aumento dell'attività ADP-ribosil ciclasica. L'enzima ADP-ribosil ciclasi ha un ruolo fondamentale nella mobilizzazione del calcio intracellulare, e, in specie evolutivamente superiori, è legata a fenomeni di proliferazione cellulare. Questo fenomeno potrebbe essere inoltre collegato alla presenza e al numero di cellule sferulose nelle parti apicali della colonia, significativamente differente nelle tre date di campionamento. Queste osservazioni sono coerenti con l'andamento osservato da Magnino (1998) per *A. verrucosa*. Per le cellule sferulose, si potrebbe ipotizzare un loro ruolo nell'accrescimento (duplicazione cellulare) degli apici nel periodo estivo; l'aumento della temperatura dell'acqua, infatti, incrementa l'attività ADP-ribosil ciclasica (Zocchi et al., 2001), permettendo una maggiore mobilitazione di calcio extracellulare, e influenzando quindi positivamente con il mantenimento della struttura di queste cellule (Bretting e Königsmann, 1979). Come osservato da Van de Veyer e Buscema (1985) le cellule sferulose sembrano possedere una funzione nei meccanismi rigenerativi dei tessuti in seguito a trapianti *non-self*, e quindi si potrebbe supporre che abbiano una funzione anche nei meccanismi di crescita.

L'osservazione dei fenomeni di espulsione degli spilli da parte di *A. polypoides* sottolinea la sua elevata plasticità, come studiato da Van de Veyer e Buscema (1985) e da Zocchi et al. (2001). Questa capacità non è riscontrabile in tutti i poriferi e sottende una capacità di riconoscimento dei corpi estranei che conferma l'importanza di questa specie come modello utile alla comprensione di processi biologici anche complessi presenti già alla base della scala evolutiva. Durante lo studio alcune tra le colonie marcate sono state liberate da lenze

abbandonate, impigliate sui fondali e avvolte alle spugne. Questo ha rappresentato un ulteriore limite all'interpretazione dei dati ed ha messo in evidenza l'urgente necessità di sviluppare adeguati piani di conservazione verso questa specie che, nonostante l'inclusione nelle liste di protezione, raramente è sottoposta a misure di tutela specifiche.

6 BIBLIOGRAFIA

- Abraham, E. R., 2001. The fractal branching of an arborescent sponge. *Marine Biology*. 138: 503-510.
- Alvarez, B., Diaz, M. C., Laughlin, R. A., 1990. The sponge fauna on a fringing coral reef in Venezuela. I. Composition, distribution and abundance. In: Rützler, K. (Ed.), *New perspectives in sponge biology*. *Smithsonian Institution Press*, Washington, D. C.: 358-366.
- Ayling, A. L., 1983. Growth and regeneration rates in thinly encrusting demospongiae from temperate waters. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 165: 343-352.
- Balduzzi A., Bianchi C., Cattaneo R. et al., 1992. Primi lineamenti di bionomia bentica dell'isola Gallinara. *Atti del 10° Congresso A.I.O.L.*: 603-617.
- Barnes, D. K. A., 1999. High diversity of tropical intertidal zone sponges in temperature, salinity and current extremes African. *J. Ecol.* 37 (4): 424-434.
- Barthel, D., 1986. On the ecophysiology of the sponge *Halichondria panicea* in Kiel Bight. I. Substrate specificity, growth and reproduction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 32: 291-298.
- Barthel, D., 1991. Influence of different current regimes on the growth form of *Halichondria panicea* Pallas. In: Reitner J, Keupp H (eds.) *Fossil and Recent sponges*. *Springer-Verlag*, Berlin: 387-394.
- Barthel, D., Tendal, O. S., 1993. The sponge association of the abyssal Norwegian Greenland Sea: species composition, substrate relationships and distributions. *Sarsia* 78: 83-96.
- Basile, G., Cerrano, C., Radjas, O., Povero, P., Zocchi, E., 2009. ADP-ribosyl cyclase and abscisic acid are involved in the seasonal growth and in post-traumatic tissue regeneration of Mediterranean sponges. *J.E.M.B.E.*, 381: 10-17.
- Bavestrello, G., Cerrano, C., Puce, S., Bianchi, C. N., Calcinai, B., Cattaneo-Vietti, R., Morri, C., Sarà, M., 2000. Bio-mineralogy as a structuring factor for marine epibenthic communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 193: 241-249.
- Bell, J. J., Barnes, D. K. A., 2000. A sponge diversity centre within a marine island. *Hydrobiologia*. 440: 55-64.
- Bell, J. J., Barnes, D. K. A., 2003. The importance of competitor identity, morphology and ranking methodology to outcomes in interference competition: an example of sponges. *Mar. Biol.* 143: 415-426.

- Bell, J. J., Smith, D., 2004. Ecology of sponges (Porifera) in the Wakatobi region, south-eastern Sulawesi, Indonesia: richness and abundance. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 84: 581-591.
- Bell, J. J., Burton, M., Bullimore, B., Newman, P., Lock, K., 2006. Morphological monitoring of subtidal sponges. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 311: 79-91.
- Bellwood, D., Hughes, T., Folke, C., Nyström, M., 2004. Confronting the coral reef crisis. *Nature.* 429: 827-833.
- Bergquist, P. R., 1967. Addition to the sponge fauna of the Hawaiian islands. *Micronesica*, 3: 159-173.
- Bergquist P.R., 1978. Sponges. *Hutchinson & Co*, London: 1- 268.
- Bertrand, J. C., Vacelet, J., 1971. L'association entre Eponges cornées et bactéries. *C. R. Acad. Sc. Paris.*, 273: 638-641.
- Bidder, G. P., 1923. The relation of the form of a sponge to its currents. *Q. Jl microsc. Sci.* 67: 293-323.
- Bonasoro, F., Wilkie, I., Bavestrello, G., Cerrano, C., Carnevali, M. D., 2001. Dynamic structure of the mesohyl in the sponge *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae). *Zoomorphology*, 121: 109-121.
- Bretting, H., Jacobs, G., Donadey, C., Vacelet, C., 1983. Immunohistochemical studies on the distribution and the function of the D-galactose-specific lectins in the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). *Cell Tissue Res.*, 229: 551-571.
- Bretting, H., Königsmann, K., 1979. Investigations on the lectin producing cells in the sponge *Axinella polypoides*. *Cell Tissue Res.*, 201: 487-497.
- Brusca R.C. & Brusca G.J., 1990. Invertebrates Phylum Porifera: the sponges. *Sinauer Associates*, Sunderland, USA: 181-210.
- Carballo, J. L., Vega, C., Cruz-Barraza, J. A., Yanez, B., Nava, H., Avila, E., Wilson, M., 2008. Short- and long-term patterns of sponge diversity on a rocky tropical coast evidence of large-scale structuring factors. *Mar. Ecol.* 29: 216-236.
- Cerrano, C., 2012. Strategie di crescita in poriferi e cnidari. *Biol. Mar. Mediterr.* 18 (1): 116-122.
- Cerrano, C., Magnino, G., Sarà, A., Bavestrello, G., Gaino, E., 2001. Necrosis in a population of *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae) in relations with environmental stress. *Ital. J. Zool.* 68: 131-136.

- Cerrano C., Palma M., Pantaleo U., Previati M., Scinto A., 2005. La Fauna Marina dei fondali rocciosi antistanti Imperia: descrizione e valutazione dello stato di salute. Progetto in collaborazione con il Centro di Educazione Ambientale del Comune di Imperia e finanziato dal Comune di Imperia.
- Cerrano, C., Calcinai, B., Di Camillo, C. G., Valicano, L., Bavestrello, G., 2007. How and why do sponges incorporate foreign material? Strategies in Porifera. In: Custódio, M. R., Hajdu, E., Lôbo-Hajdu, G., Muricy, G. (eds.), *Porifera Research: Biodiversity, Innovation & Sustainability*: 239-246.
- Cheshire, A. C., Wilkinson, C. R., 1991. Modelling the photosynthetic production by sponges on Davies Reef, Great Barrier Reef. *Mar.Biol.* 109: 13-18.
- Dayton, P. K., 1978. Observations of growth, dispersal and population dynamics of some sponges in McMurdo Sound Antarctica. In: Levi, C., Boury-Esnault, N. (Eds.), *Sponge biology. Colloq. Int. CNRS* 291: 271-282.
- De Caralt, S., Uriz, M. J., Wijffels, R. H., 2008. Grazing, differential size-class dynamics and survival of the Mediterranean sponge *Corticium candelabrum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 360: 97-106.
- De Laubenfels, M. W., 1936. A discussion of the sponge fauna of the Dry Tortugas in particular, and the West Indies in general, with material for a revision of the families and orders of the Porifera. *Pap. Tortugas. Lab.*, 30: 1-225.
- Diaz, M. C., Alvarez, B., Laughlin, R. A., 1990. General features of Cuban sponge communities. In: Rützler, K. (Ed.), *New perspectives in sponge biology. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.*: 367-375.
- Donadey, C., Paris, J., Vacelet, J., 1990. Occurrence and ultra structure of microraphides in *Axinella polypoides*. In: Rützler, K. (Ed.), *New perspectives in sponge biology. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.*: 259-263.
- Duckworth, A.R., Pomponi, S.A., 2005. Relative importance of bacteria, microalgae and yeast for growth of the sponge *Halichondria melanadocia* (De Laubenfels, 1936): a laboratory study. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 323: 151-159.
- Dunlap, M., Pawlik, J. R., 1996. Video-monitored predation by Caribbean reef fish on an array of reef and mangrove sponges. *Mar. Biol.* 126: 117-123.
- Fell, P.E., 1974. Porifera. In: *Reproduction of Marine Invertebrates: Acoelomate and Pseudocoelomate Metazoan*. Giese, A. C., Pearse, J. S. (Eds.), *Academic Press, New York, NY*: 51-132.

- Gaino, E., Pronzato, R., 1983. Étude en microscopie électronique du filament des formes étirées chez *Chondrilla nucula*, Schmidt (Porifera, Demospongiae). *Ann. Sci. Nat. Zool. Paris.*, 5: 221-234.
- Gaino E., Pansini M., Pronzato R. & Cicogna F., 1991. Morphological and structural variations in *Clatrina clatrus* (Porifera, Calciospongiae). In: J. Reitner and H. Keupp (Eds.). Fossil and recent sponges. *Springer – Vrelag Berlin Heidelberg*: 360-371.
- Garrabou, J., Zabala, M., 2001. Growth dynamics in four Mediterranean Demosponges. *Est. Coast. Shelf Sci.* 52: 293-303.
- Garrone, R., 1978. Phylogenesis of connective tissue. Morphological aspects and biosynthesis of sponge intercellular matrix. *Karger*, Basel.
- Giovine, M., Pozzolini, M., Favre, A., Bavestrello, G., Cerrano, C., Ottaviani, F., Chiarantini, L., Cerasi, A., Cangiotti, M., Zocchi, E., Scarfi, S., Sarà, M., Benatti, U., 2001. Heat stress-activated, calcium-dependent nitric oxide synthase in sponges. *Nitric Oxide*, 5 (5): 427-431.
- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., et al., 2008. A global map of human impact on marine ecosystems. *Science*. 319: 948.
- Handley, S. Kelly, S., Kelly, M., 2003 Non-destructive video image analysis method for measuring growth in sponge farming; preliminary results from the New Zealand bath-sponge *Spongia (Heterofibria) manipulatus*. *NZ J. Mar. Freshw. Res.* 37: 613-621.
- Harrison, F. W., De Vos, L., 1991. Porifera. In: Harrison, F. W. (Eds.,) *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Wiley-Liss*, New York: 29-89
- Hartman, W. D., 1982. Porifera. In: Synopsis and classification of living organisms. *McGraw-Hill*, New York.
- Hellmich, M. R., Strumwasser, F., 1991. Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme. *Cell Regul.*, 2: 193-202.
- Hiscock, K., 1983. Water movement. In: Earll, R., Erwin, D.G. (Eds.), Sublittoral ecology. The ecology of the shallow sublittoral benthos. *Clarendon Press*, Oxford: 58-96
- Hooper, J. N., Bergquist, P. R., 1992. *Cymbastela*, a new genus of lamellate coral reef sponges. *Mem. Queensl. Mus.*, 32 (1): 99-137.
- Hoppe, W. F., 1988. Growth, regeneration and predation in three species of large coral reef sponges. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 50: 117-125.

- Horton, R. E., 1945. Erosional development of streams and their drainage basins: Hydrophysical approach to quantitative morphology. *Bulletin of the Geological Society of America*. 56: 275-370.
- Kaandorp, J. A., De Kluijver, M.J., 1992. Verification of fractal growth models of the sponge *Haliclona oculata* (Porifera; class Demospongiae) with transplantation experiments. *Mar.Biol.* 113: 133-143.
- Kaandorp, J. A., Kübler, J.E., 2001. The algorithmic beauty of seaweeds, sponges and corals. *Springer*. Heidelberg, Germany.
- Kinne, O., 1970. Temperature – Animals – Invertebrates. In: Kinne, O. (ed.). *Marine Ecology Vol. I. Wiley-interscience Press*, London: 407-456.
- Könnecker, G., 1973. Littoral and benthic investigations on the West Coast of Ireland. I. The sponge fauna of Kilkieran Bay and adjacent areas. Section A: faunistic and ecological studies. *Proc. R. Ir. Acad.* 73B, 450-472 26.
- Koopmans, M., Wijffels, R. H., 2008. Seasonal growth rate of the sponge *Haliclona oculata* (Demospongiae, Haplosclerida). *Marine Biotechnology*. 10: 502-510.
- Lee, H. C., 1996. Cyclic ADP-ribose and calcium signaling in eggs. *Biol. Signals*, 5: 101-110.
- Lévi, C., 1955. Les clavaxinellides Démosponges Tétractinomorphes. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 92 (2):78-87.
- Levin, L. A., Dayton, P. K., 2009. Ecological theory and continental margins: where shallow meets deep. *Trends in Ecology & Evolution*. 24: 606-617.
- Leys, S. P., Ereskovsky, A. V., 2006. Embryogenesis and larval differentiation in sponges. *Can. J. Zool.* 84: 262-287.
- Manconi R., Pronzato R., 1991. Life cycle of *Spongilla lacustris* (Porifera, Spongilliidae): a cue for environmental– dependent phenotype. *Hydrobiologia*, 220: 150-160.
- Magnino, 1998. I Poriferi del genere *Axinella* nel Mar Ligure: morfologia, citologia e riproduzione in relazione a parametri ambientali. Tesi di dottorato di ricerca in Scienze Ambientali Marine. Università degli studi di Genova.
- Masuda, W., Takenaka, S., Tsuyama, S., Tokunaga, M., Inui, H., Miyatake, K., 1997. Oscillation of ADP-ribosyl cyclase activity during the cell cycle and function of cyclic ADP-ribose in a unicellular organism, *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.*, 405: 104-106.

- Mitchell, L.G., Mutchmor, J.A, Dolphin, W.D., 1991. Zoologia. *Zanichelli*, Bologna: 489-500.
- Orsino, F., 1975. Flora e vegetazione delle isole Gallinara e Bergeggi (Liguria Occidentale). *Webbia*, 29: 595-644.
- Page, M. J., Webb, V., Northcote, P.T., Mackey, S., Handley, S., 2005. Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge *Mycale hentscheli* (Demospongiae, Poecilosclerida). *Aquaculture*. 250: 256-269
- Pansini M., Pronzato R., 1990. Observation on the dynamics of a Mediterranean Sponge community. 3d Int. Sponge conf. 1985. In: Rützler, K. (Ed.), New perspectives in sponge biology. *Smithsonian Institution Press*, Washington, D. C.: 404-415.
- Pavans de Ceccatty, M., Thiney, Y., 1964a. Essai d'interprétation de la fibrogenèse cellulaire du collagène chez l'Eponge *Tethya lyncurium* Lmck. *Vie Milieu Suppl.*, 17: 129-146.
- Pavans de Ceccatty, M., Thiney, Y., 1964b. Données complémentaires sur l'origine et la fibrogenèse du collagène che l'Eponge *Tethya lyncurium* Lmck. *J. Microscopie*, 3: 46-47.
- Pawlik, J. R., 1992. Chemical defense of benthic marine invertebrates. In: Paul V. J. (Ed.). Ecological Roles of Marine Natural Products. *Cornell Univ. Press*, Ithaca, N. Y.: 164-188.
- Pawlik, J. R., 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.* 93: 1911-1922.
- Pawlik, J. R., Chanas, B., Toonen, R. J., Fenical, W. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 127: 183-194.
- Relini, G., Tunesi, L., 2009. Le specie protette del Protocollo SPA/BIO (Convenzione di Barcellona) presenti in Italia. Schede descrittive per l'identificazione. *Biol. Mar. Mediterr.* 6 (Suppl.2): 77-80.
- Ridley, S.O., Dendy, A., 1887. Report on the Monaxonida collected bu H.M.S. Challenger during the years 1873-1876. Rep. Scient. Results Challenger. *Zoology*, 20 (59): 1-275.
- Sarà, M., 1972. Guida ai Poriferi della fauna italiana. Quad. Civ. Staz. Idrobiol. Milano, 3-4: 53-97.
- Sara' M., 1992. Porifera. In: Adiyodi KG (Eds.) Reproductive biology of invertebrates, vol V. *Oxford & IBH Publishing*, New Delhi: 1-29.

- Sarà, M., Vacelet, J., 1973. Ecologie des Démosponges. In: *Traité de Zoologie. III. Anatomie, Systematique, Biologie. Spongiares. Grasse PP, Masson et Cie, Paris: 462-576.*
- Schubel, J. R., Coutant, C. C., Woodhead, P. M. J., 1978. Thermal effects of entrainment. In: Schubel, J. R., Marcy Jr., B. C. (Eds.), *Power plant entrainment: A biological assessment. Academic Press, NY: 19-93. Chapter 2.*
- Sebens, K. P., 1987. The ecology of indeterminate growth in animals. *Annual Review in Ecology and Systematics. 18: 371-407.*
- Simpson, T. L., 1980. Reproductive processes in sponges: a critical evaluation of current data and view. *Int. Journ. Inv. Reprod. 2: 251-269.*
- Simpson, T. L., 1984. Gamete, embryo, larval development. In: *The Cell Biology of Sponges. Simpson TL, Springer Verlag, Berlin: 341-413.*
- Smith, F. G. W., 1941. Sponge disease in British Honduras, and its transmission by water currents. *Ecology. 22: 415-421*
- Storr, J. F., 1976. Ecological factors controlling sponge distributions in the Gulf of Mexico and the resulting zonation. In: Harrison, F. W., Cowden, R. R. (Eds.), *Aspects of Sponge Biology. New York Academic Press, New York: 261-276.*
- Strahler, A. N., 1952. Hypsometric (area-altitude) analysis of erosional topography. *Geol. Soc. Am. Bull.. 63: 1117-1142.*
- Takasawa, S., Nata, K., Yonekura, H., Okamoto, H., 1993. Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells. *Science, 259: 370-373.*
- Tanaka, K., 2002. Growth dynamics and mortality of the intertidal encrusting sponge *Halichondria okadai* (Demospongiae, Halichondrida). *Mar. Biol. 140: 383-389.*
- Teixido, N., Pineda, O.C., Garrabou, J., 2009. Decadal demographic trends of a long-lived temperate encrusting sponge. *Mar. Ecol. Prog. Ser. 375: 113-124.*
- Topsent, E., 1928. Spongiaires de l'Atlantique et de la Méditerranée provenant des croisières du Prince Albert I^{er} de Monaco. *Rés. Camp. Sci. Albert I^{er} Monaco: 1-376.*
- Van De Vyver G., Willenz P.H., 1975. An experimental study of the life cycle of the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* in its natural surroundings. *Wilhelm Roux' Archi. 177: 41-52.*

- Van de Vyer, G., Buscema, M. 1985. Diversity of immune reactions in the sponge *Axinella Polypoides*. 3d Int. Sponge conf. 1985. In: Rützler, K. (Ed.), New perspectives in sponge biology. *Smithsonian Institution Press*, Washington, D. C.: 96-101.
- Van Soest, R. W. M., 1990. Demospongiae higher taxa classification reexamined. In: Reitner J, Keupp H (eds.) Fossil and Recent sponges. *Springer-Verlag*, Berlin: 54-71.
- Wägele, H., Klussmann-Kolb, A., 2005. Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda) – more than just slimy slugs. Shell reduction and its implications on defence and foraging. *Frontiers in Zoology* 2005, 2(1): 3.
- Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., Fromentin, J. M., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature*. 416: 389-395.
- Warburton, F. E., 1960. Influence of Currents on Form of Sponges. *Science*, N. Y. 132: 89.
- Wilkinson, C. R., 1980. Cyanobacteria symbiotic in marine sponges. In: Schwemmler, W., Schenk, H.E. (Eds.), Endocytobiology. *Walter de Gruyter*, Berlino: 553-563.
- Wilson, D. M., Puyana, M., Fenical, W, Pawlik, J.R., 1999. Chemical defense of Caribbean reef sponge *Axinella corrugata* against predatory fishes. *Journal of Chemical Ecology*. 25 (12): 2811-2823.
- Witman, J. D., Sebens, K. P., 1990. Distribution and ecology of sponges at a subtidal rock ledge in the central Gulf of Maine. In: Rützler, K. (Ed.), New perspectives in sponge biology. *Smithsonian Institution Press*, Washington, D. C.: 391-396.
- Wright, J. T., Benkendorff, K., Davis, A. R., 1997. Habitat associated differences in temperate sponge assemblages: the importance of chemical defence. *J. Exp. Biol. Ecol.* 213: 199-213.
- Wulff, J. L., 2001. Assessing and monitoring coral reef sponges: why and how? *Bull. Mar. Sci.* 69(2): 831-816.
- Wulff, J., 2006a. Rapid diversity and abundance decline in a Caribbean coral reef sponge community. *Biol. Conserv.*, 127: 167-176.
- Wulff, J. L., 2006b. Ecological interactions of marine sponges. *Can. J. Zool.* 84: 146-166.

- Wulff, J. L., 2006c. A simple model of growth form-dependent recovery from disease in coral reef sponges, and implications for monitoring. *Coral Reefs*, 25: 419-426.
- Zocchi, E., Daga, A., Usai, C., Franco, L., Guida, L., Bruzzone, S., Costa, A., Marchetti, C., De Flora, A., 1998. Expression of CD38 increases intracellular calcium concentration and reduces doubling time in HeLa and 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 273: 8017-8024.
- Zocchi E., Carpaneto A., Cerrano C., Bavestrello G., Giovine M., Bruzzone S., Guida L., Luisa F., Usai C., 2001. The temperature-signaling cascade in sponges involves a heat-gated cation channel, abscisic acid and cyclic ADP-ribose. *PNAS*, 98 (26): 14859-14864.
- Zocchi, E., Basile, G., Cerrano, C., Bavestrello, G., Giovine, M., Bruzzone, S., Guida, L., Carpaneto, A., Magrassi, R., and Usai, C., 2003. ABA- and cADPR-mediated effects on respiration and filtration downstream of the temperature-signaling cascade in sponges. *J. Cell Sci.*, 116: 629-636.

7 RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto vorrei cominciare con i canonici ringraziamenti accademici: grazie a Massimo Ponti per la cura e la precisione con cui mi ha seguita. Grazie a Carlo Cerrano, per l'attenzione e la disponibilità, a Monica Previati per l'aiuto nei campionamenti e per le decine e decine di e-mail a cui ha risposto con pazienza. Grazie anche ai responsabili del diving Center "Continente Blu" Alassio per il supporto logistico, a Marco Palma, Ubaldo Pantaleo, a Claudio, Sara Buratti ed al laboratorio di Fisiologia per l'aiuto fornito con le analisi istologiche. Infine grazie a Fulvia Paglia ed a SEAMap srl Environmental consultancy per i dati gentilmente concessi.

Ora, passiamo a ringraziamenti più informali... Per quanto non sia una grande amante della consuetudine, il primo ringraziamento ed il più sentito va a Mamma e Papà. Senza il loro amore, la loro santissima pazienza nel seguirmi e nell'incitarmi verso tutto ciò che di bello volessi fare e, per essere un po' veniale, senza i miliardi che hanno speso per il mio mantenimento in questi anni, dubito che sarei arrivata fino a questo punto! Grazie! Anche se non lo dico spesso, vi voglio bene!

Grazie alla Nonna, alla Zia ed alla mia Cugirella, per il bene e l'affetto che mi dimostrano sempre.

Ed infine ultimi, ma non meno importanti, gli amici... Cominciando con chi, più di tutti, ha condiviso con me gioie e dolori di questa valle di lacrime per più di due anni... Grazie Sami per aver sopportato le mie innumerevoli manie più che hai potuto! Grazie alla mia sbonzamica per eccellenza, Alisar, e grazie a quella recentemente acquisita, Alice, per le risate e la compagnia nelle situazioni più improbabili. Grazie ai miei nipotini, Antonellino e Vicio, per aver fatto sì che avessi qualcuno di cui prendermi cura con affetto. Grazie ai miei sardi preferiti Aurora, Caterina e Claudio, per la bontà ed il sorriso che li contraddistinguono sempre. Grazie a Mariella e RosaAngela, per avermi accolta innumerevoli volte come una di

famiglia. Grazie agli amici di casa, Chiara, Claudia, Alice, Emma, Marta, Cecilia, per esserci anche se ci sentiamo e ci vediamo poco. Grazie anche a Diego. Grazie alle mie due Alessie, che vedo di rado, ma che sento sempre vicine. Grazie agli amici conosciuti a Ravenna ed in Spagna... Per non fare torti dimenticando qualcuno, dato che sono sicura succederebbe, la finisco qua, e ringrazio tutti per essermi stati vicini, chi per anni, chi anche solo per un minuto.

Senza il sostegno di quella che considero una seconda famiglia, sarebbe stato tutto più difficile.