

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN ECOLOGIA

XXIII ciclo

**Diversified bet-hedging ed effetti materni in
Heterocypris (Crustacea: Ostracoda)**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. DeLeo Giulio

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa Rossi Valeria

Dottorando:
Sandro Galdi

INDICE

RIASSUNTO

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE	pp 6
Bet-hedging	
Bet-hedging come effetto materno	
Gli organismi clonali	
Le pozze temporanee	
Gli ostracodi	
OBIETTIVI	pp 16

CAPITOLO 2

GLI OSTRACODI	pp 17
Caratteristiche generali	
Il genere <i>Heterocypris</i> (Crustacea: Ostracoda)	
<i>Heterocypris incongruens</i>	
<i>Heterocypris barbara</i>	
Il genere <i>Heterocypris</i> sull'isola di Lampedusa	
CAMPIONAMENTO	pp 29
DETERMINAZIONE DELLE CONDIZIONI SPERIMENTALI	pp 31
TRATTI MISURATI E ANALIZZATI	pp 36
ANALISI STATISTICHE	pp 39

CAPITOLO 3

<u>ESPERIMENTO 1- Valutazione empirica preliminare dell'esistenza di una strategia di ripartizione del rischio connesso alla riproduzione</u>	pp 40
Obiettivo e giustificazione dell'attività	
Materiali e metodi	
Risultati	
Spunti di discussione	
<u>ESPERIMENTO 2- Studio del diversified bet-hedging su linee clonali</u>	pp 64
Obiettivo e giustificazione dell'attività	
Materiali e metodi	
Risultati	
Spunti di discussione	
<u>ESPERIMENTO 3- Diversified bet-hedging come risultante degli effetti materni trans generazionali</u>	pp 80
Obiettivo e giustificazione dell'attività	

Materiali e metodi
Risultati
Spunti di discussione

ESPERIMENTO 4- I tratti in femmine clonali di *H. incongruens* nate da uova non durature a schiusa ritardata pp 98

Obiettivo e giustificazione dell'attività
Materiali e metodi
Risultati
Spunti di discussione

ESPERIMENTO 5- L'effetto materno è l'unico determinante della strategia di schiusa? pp 115

Obiettivo e giustificazione dell'attività
Materiali e metodi
Risultati
Spunti di discussione

ESPERIMENTO 6- Ruolo della densità nella produzione di uova durature in *H. incongruens*.....pp 125

Obiettivo e giustificazione dell'attività
Materiali e metodi
Risultati
Spunti di discussione

ESPERIMENTO 7- Analisi dei tratti vitali e del polifenismo in due generazioni clonali successive di *H. barbara* traslocate a diverse condizioni ambientali pp 135

Obiettivo e giustificazione dell'attività
Materiali e metodi
Risultati
Spunti di discussione

CAPITOLO 4
DISCUSSIONE pp 160

CONCLUSIONI pp 168

APPENDICE pp 169

BIBLIOGRAFIA pp 177

RIASSUNTO

In questa tesi di dottorato è descritta una delle pochissime evidenze sperimentali di una strategia di “diversified bet hedging”. Per definizione questa strategia prevede che la ripartizione del rischio connesso alla riproduzione in ambienti effimeri imprevedibili si manifesti come polimorfismo fenotipico espresso a meno di polimorfismo genetico. Nella fattispecie, in ben 3 linee evolutive dell’ostracode del genere *Heterocypris* è descritta la produzione di tre diverse tipologie di uova: durature, non durature a schiusa precoce e non durature a schiusa tardiva. Il polimorfismo viene espresso anche in linee clonali mantenute in laboratorio in condizioni controllate e tali da non costituire un “proxy” dell’ambiente in cui potrà o meno crescere e riprodursi che la generazione successiva. Il polimorfismo si mantiene per 5 generazioni successive, la proporzione dei tre diversi tipi di uova cambia con la generazione fino a raggiungere il valore massimo di equiripartizione. Dopo 5 generazioni di acclimatazione in condizioni controllate di laboratorio, le femmine clonali smettono di produrre uova durature e uova non durature a schiusa tardiva: le femmine producono solo uova non durature a schiusa precoce. Alla sesta generazione, il tasso intrinseco di crescita, e quindi la fitness a breve termine delle linee clonali aumenta significativamente e poi varia con le generazioni. I risultati ottenuti fanno ipotizzare che la strategia di diversified bet hedging sia regolata da un effetto materno che si protrae ben oltre le 2 generazioni normalmente considerate in letteratura. L’effetto materno trans-generazionale sembra manifestarsi attraverso un meccanismo di tipo “effetto dose”. La strategia si manifesta sia che gli organismi nascano da uova durature sia che nascano da uova non durature a schiusa tardiva o precoce. I piccoli che nascono da uova non durature a schiusa tardiva hanno però una fitness diversa da quelli che nascono da uova non durature a schiusa precoce. L’effetto materno trans-generazionale è reversibile e non impedisce alle generazioni acclimate di rispondere in modo appropriato a stimoli ambientali che rappresentano “proxy” di condizioni sfavorevoli.

Sulla ripartizione del rischio sono stati pubblicati i risultati di molti studi di tipo teorico ma sono molto rare le evidenze empiriche e sperimentali, soprattutto in riferimento ad organismi animali. Il ruolo dell’effetto materno nella plasticità fenotipica e nelle risposte previste dalla teoria della ripartizione del rischio apre prospettive molto interessanti per l’ecologia evoluzionistica. In particolare, l’interpretazione dei risultati descritti fa

ipotizzare che acclimatazione ed evoluzione rapida possano coincidere e che sia realistico pensare alla convergenza tra tempi ecologici e tempi evolutivi. Oltre alle importanti evidenze legate alla plasticità fenotipica trans-generazionale, questo lavoro pone le basi per far luce sul ruolo dell'effetto materno sull'evoluzione rapida, su scala ecologica, delle popolazioni. Il ruolo dell'effetto materno e, in definitiva dell'eredità epigenetica, ha implicazioni significative nel campo della biologia evolutiva e rappresenta una nuova dimensione per l'ecologia.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Gli organismi viventi hanno evoluto una varietà di strategie per fronteggiare la modificazione delle condizioni ambientali. Per esempio, per mettersi al riparo dalle conseguenze di condizioni ambientali ostili gli organismi possono disperdersi nello spazio (migrazione) o nel tempo (forme di dormienza). Per superare questa limitazione e conservare le funzioni vitali, gli organismi devono quindi poter ripartire il rischio connesso alla riproduzione in ambienti potenzialmente ostili.

Fluttuazioni ambientali possono promuovere sia variabilità fenotipica (Bull, 1987) che polimorfismi genetici (Ellner & Hairstone, 1994).

Gli ecologi evuzionisti definiscono tradizionalmente 4 differenti strategie che gli organismi possono adottare per far fronte agli ambienti variabili: a) specializzazione, gli organismi sviluppano strutture o comportamenti per meglio far fronte a determinate specifiche situazioni contingenti; b) generalizzazione, gli organismi adottano strategie generaliste che permettono loro di non azzerare la fitness in tutti gli scenari che si possono presentare c) plasticità fenotipica, fattori ambientali inducono la produzione di differenti fenotipi da un unico genotipo; d) bet-hedging, un organismo ripartisce il proprio potenziale riproduttivo tra tutti i fenotipi possibili; In accordo con i recenti sviluppi teorici in biologia evuzionistica, queste strategie 'pure' non devono essere percepite come discrete, ma piuttosto come casi speciali entro una strategia spaziale che include differenti combinazioni di tali strategie (Dewitt & Langerhans, 2004).

Bet-hedging

Una formulazione quantitativa e probabilistica del problema relativo alla decisione da prendere di fronte all'incertezza è stata tracciata nella prima metà del XVIII secolo dal matematico svizzero Daniel Bernoulli. Questa formulazione conteneva i principi dell'evoluzione come risposta al rischio connesso con un l'evento riproduttivo. Bernoulli ci insegnò a misurare il rischio utilizzando la media geometrica e a minimizzarlo ripartendolo in una serie di eventi indipendenti (bet-hedging) (Stearns 2000). Usando la metafora delle uova nel cestino ("do not put all your eggs in one basket") equivale a dire che se devo trasportare delle uova "non riponendo tutte le uova nello stesso cestino" ripartisco il rischio di romperle tutte se l'unico cestino usato per il trasporto mi dovesse cadere (Seeger & Brockmann, 1987; Stearns, 1992). In prospettiva di lungo periodo, un dato genotipo lascerà

più discendenti (avrà quindi una maggior fitness) riducendo la sua crescita potenziale in ogni generazione (ad esempio non producendo solamente uova a schiusa precoce) e ottenendo in cambio una riduzione delle oscillazioni nel numero dei discendenti, (ad esempio investendo in una quota di uova durature che garantiscono la sopravvivenza nel caso di eventi sfavorevoli). Tali oscillazioni potrebbero portare la discendenza a dimensioni nulle interrompendo così la continuità degli eventi riproduttivi (fitness=0). Questa descrizione verbale di come un organismo scommette sulla sopravvivenza dei suoi discendenti rende ragione dell'uso della media geometrica per calcolare la fitness a lungo termine: la probabilità che 'n' eventi indipendenti si verifichino è data dal prodotto della probabilità di ogni n-esimo evento.

Nella seconda metà del XX secolo i biologi evuzionisti hanno elaborato teorie che indicano quali strategie vitali ci si aspetta che evolvano in ambienti imprevedibili. Le diverse risposte sono riconducibili a diversi meccanismi: dal polimorfismo genetico alla plasticità fenotipica (Seger & Brockmann, 1987; Hopper, 1999; Evans & Dennehy, 2005). I modelli illustrano come le strategie di ripartizione del rischio siano favorite in un'ampia gamma di condizioni e quindi siano potenzialmente diffuse in natura (Tammaru *et al.*, 1999) ma, se la ricerca teorica è estremamente vasta, le evidenze empiriche sono piuttosto scarse (Venable, 2007).

Un primo tentativo di classificazione funzionale delle strategie di ripartizione del rischio è stato quello di Seger e & Brokmann (1987): essi definiscono *bet-hedging* l'espressione fenotipica variabile di un singolo genotipo non imputabile a polimorfismo genetico. Questi autori individuano tre tipologie di *bet-hedging*. Con il termine di *conservative bet-hedging* fanno riferimento all'espressione del miglior fenotipo possibile per un determinato ambiente, scelto sulla base di segnali che predicano lo stato futuro dell'ambiente stesso; tale tipologia prevede che un organismo adotti sempre una stessa strategia a basso rischio. Con il termine di *genuine bet-hedging* (successivamente indicato come *diversified bet-hedging* da Philippi & Seger (1989)) indicano invece quella strategia che si osserva in un ambiente caratterizzato da variazione temporale non predetta in nessun modo da segnali ambientali, attraverso la riduzione nella varianza della fitness tra generazioni e l'incremento della varianza fenotipica e della fitness entro generazione. In questo caso un individuo investe in più strategie (fenotipi) contemporaneamente, con una bassa variazione nel successo totale come risultato. Sia il *conservative* che il *diversified bet-hedging*

tendono a massimizzare la media geometrica della fitness (su più generazioni) riducendo la varianza media della fitness entro generazione. Infine, richiamando una definizione di Cooper & Kaplan (1982), Seger & Brockmann (1987) discutono una terza tipologia di bet-hedging: l'*adaptive coin-flipping bet-hedging*. In questo caso si assume che, anno per anno, un individuo “lanci una moneta” e determini in questo modo quale comportamento adottare. In un ambiente con idroperiodo variabile, un approccio di questo tipo permette di adottare un anno una strategia specialista per anni secchi e l'anno successivo una per anni bagnati.

La più recente classificazione delle tipologie di bet-hedging è stata proposta da Olofsson *et al.* (2009), i quali confermano l'esistenza di 3 tipologie di bet-hedging: conservative bet-hedging ('investi in modo sicuro'), diversified bet-hedging ('non mettere tutte le uova in un unico cestino') e 'adaptive coin flipping' ('scegli una strategia a caso da una distribuzione fissa di strategie'). La novità introdotta e discussa da questi autori è che la strategia di bet-hedging di maggiore successo non è sempre quella che minimizza la variazione della fitness di anno in anno. E' stato dimostrato infatti che un approccio di tipo 'adaptive coin flipping' in alcuni casi può avere maggior successo di una strategia generalista con una minima variazione nei valori di fitness tra anni: mescolando due strategie di ripartizione del rischio pure in modo casuale se ne origina infatti una terza che ha la meglio sulle prime due anche nel caso in cui una di queste abbia una media geometrica della fitness minore dell'altra (Cooper & Kaplan, 1982; Kaplan & Cooper 1984; per un esempio numerico, vedere Seger & Brockmann 1987).

In questa tesi, tra le varie tipologie di bet-hedging, si pone l'attenzione su quella definita "diversified bet hedging" (Seger & Brockmann, 1987; Crean & Marshall, 2009).

Questa strategia presuppone variabilità entro generazione di uno o più tratti del ciclo biologico espressa da un singolo genotipo; per esempio un genotipo che produce sia semi o uova durature che semi o uova subitane. Questa variabilità porterà alla riduzione del numero medio di individui presenti e attivi nella popolazione (fitness a breve termine) rispetto ad un genotipo che avesse prodotto semi a germinazione rapida o uova che si fossero schiuse immediatamente in un ambiente favorevole. La stessa variabilità però implica un aumento della fitness a lungo termine, qualora semi o uova non durature non avessero la possibilità di riprodursi e garantire la produzione di generazioni future. Questa modalità di ripartizione del rischio da parte di un unico genotipo che si esprime in modo

fenotipicamente variabile a prescindere dalla variabilità ambientale è una forma particolare di plasticità fenotipica cioè della proprietà di un singolo genotipo di produrre fenotipi diversi in ambienti diversi come risultato dell'interazione tra genotipo e ambiente. In relazione alla ripartizione del rischio il termine “coin-flipping” è utilizzato per indicare la plasticità osservata in condizioni ambientali che cambiano in modo stocastico (Cooper & Kaplan, 1982; Kaplan & Cooper, 1984).

Se la strategia è di tipo strettamente “diversified bet hedging” la plasticità non dovrebbe essere predittiva ma dovrebbe essere la risposta ambientale alle condizioni ambientali che non rappresentano un segnale predittivo della variazione in divenire.

Evidenze empiriche di “diversified bet hedging” sono note solo per alcune piante (*Oenothera*, *Lobelia inflata*, *Biscutella didima*, *Bromus fasciculatus*, *Hymenocarpus circinnatus*), per un imenottero (*Perdita portalis*) tipico di aree desertiche e per un parassita della castagna (*Curculio elephas*) (Danforth, 1999; Menu & Desouhant, 2002, Evans *et al.*, 2007; Simons, 2009). Con l'unica eccezione di *L. inflata*, una pianta infestante con autofecondazione obbligata che in poche generazioni produce linee pure, le strategie di ripartizione del rischio non sono mai state studiate in organismi geneticamente identici (Simons & Johnston 2006). Questi autori attribuiscono almeno un terzo della variazione osservata nel tempo di germinazione in semi geneticamente identici al gradiente microambientale che loro individuano anche in condizioni controllate in una camera di germinazione. Simons (2009) osserva che la variazione nei tempi di germinazione registrata entro questi semi (12.28 giorni, $sd=2.27$) è simile alla variazione che, in semi non geneticamente controllati e cresciuti in campo, consente di massimizzare la fitness (calcolata come media geometrica dei tassi di sopravvivenza delle plantule germinate in 5 stagioni vegetative successive). Il lavoro di Simons (2009) è ad oggi l'unico caso di evidenza empirica di diversified bet-hedging su organismi superiori.

Bet-hedging come effetto materno

Crean & Marshall (2009) propongono il bet-hedging come risultante degli effetti materni in ambienti imprevedibili. Mentre in un ambiente prevedibile le madri hanno buone possibilità di predire l'ambiente dei loro figli e favoriranno un fenotipo medio nei figli attraverso un effetto materno di tipo ‘anticipatorio’ (Marshall & Uller, 2007), in un ambiente di tipo imprevedibile quando la possibilità di predire l'ambiente dei figli da parte

delle madri è bassa, sarà favorito l'incremento della varianza nei fenotipi dei figli mediante l'adozione di una strategia di 'bet-hedging'. In entrambi i casi le strategie adottate sono tese alla massimizzazione della media geometrica della fitness.

Più autori affermano che la variabilità dei tratti del ciclo biologico (quali il tempo di germinazione dei semi, di sviluppo delle uova o la sopravvivenza e la resistenza negli individui delle generazioni successive) che si osserva in condizioni costanti può essere ricondotta al cosiddetto "effetto materno", cioè al condizionamento dello sviluppo delle uova o dei semi da parte delle condizioni, per esempio di età e di nutrizione della madre ed è una forma di ereditarietà epigenetica (Philippi, 1993; LaMontagne & McCauley, 2001; Alekseev & Lampert, 2001; Dyer, 2004). Sakwinska (2004), descrivendo la variabilità fenotipica in organismi clonali nati da madri mantenute in condizioni controllate, parla di "effetto di identità materna persistente".

La teoria della 'life history' suggerisce che lo stato fenotipico della madre, e la percezione che ha questa dell'ambiente nel quale libera la generazione successiva, determina la sua allocazione in termini di quantità e qualità di prole (McCormick, 2009).

Lo studio degli effetti materni è stato oggetto d'interesse fin dall'inizio del secolo scorso. Jennings & Lynch (1928) studiando il rotifero monogononte *Proales sordida* notarono per la prima volta che i figli di madri di età avanzata avevano cicli vitali più brevi e maggiore variabilità nei tassi di sviluppo e fecondità rispetto a figli nati da madri più giovani, introducendo così per la prima volta il concetto di 'effetto transgenerazionale'. Lansing, nel decennio 1940-1950, dimostra che l'età della madre influenza la longevità nel rotifero bdelloideo *Philodina citrina* (King, 1969); quindi il tasso di senescenza è controllato dall'effetto materno che è trasmissibile e cumulativo. Lansing (1947, 1954) ipotizza l'esistenza di un fattore citoplasmatico d'invecchiamento trasmissibile di generazione in generazione: maggiore sarà l'età del genitore e maggiore sarà il fattore trasmesso alla generazione successiva e più breve sarà il suo ciclo vitale. Anche in questo caso l'autore documenta l'esistenza di una memoria transgenerazionale. La Montagne & McCauley, (2001) più recentemente osservano che in *Daphnia pulex* (cladocero con partenogenesi ciclica) un mismatch tra le condizioni ambientali materne e quelle dei figli si traduce in un cambiamento della strategia riproduttiva: gli animali passano da una riproduzione partenogenetica ad una riproduzione sessuata (produzione di efippi). Alekseev & Lampert (2001) osservano che il fotoperiodo influisce sulla produzione di uova durature (soppressa

a giorno breve, significativa a giorno lungo) alla generazione F1 di *D. pulicaria* solo se le madri hanno prodotto i loro piccoli in condizioni di giorno lungo. In linee clonali del rotifero *Brachionus calyciflorus* la percentuale di femmine in grado di riprodursi sessualmente e lasciare uova durature aumenta gradualmente fino alla 18° generazione a partire da madri partenogenetiche nate da uova durature, confermando l'esistenza di una plasticità fenotipica transgenerazionale (Gilbert, 2002). Tale risultato confuta quanto affermato da Lynch (1985), che sosteneva che l'effetto materno transgenerazionale non si protraesse oltre la 2° generazione e che 2 generazioni di acclimatazione bastassero per eliminare gli effetti materni e standardizzare gli esperimenti. Sakwinska (2004) in *Daphnia* osserva un aumento delle dimensioni alla nascita della F1 con l'aumentare dell'età della madre.

Schroder & Gilbert (2009) mostrano che l'effetto materno legato all'età della madre influenza la morfologia del rotifero *B. calyciflorus*: la lunghezza delle spine e le dimensioni corporee della prole aumentano in modo significativo con l'ordine di nascita. Tali risultati non sono altro che un'ulteriore conferma dell'esistenza di un effetto materno transgenerazionale, in particolare legato all'età della madre.

Gli studi sugli effetti materni transgenerazionali si rivelano particolarmente interessanti se si sposa la tesi di Crean & Marshall (2009) che interpretano il diversified bet-hedging come risultante di effetti materni in determinate condizioni ambientali.

Gli organismi clonali

L'utilizzo di organismi geneticamente identici risulta essere presupposto necessario per lo studio del diversified bet-hedging (Simons & Johnston, 2006; Simons, 2009). Gli organismi clonali, come ad esempio gli ostracodi, sono il materiale biologico ideale per separare la componente genetica dalle altre forme di determinazione fenotipica e per valutare l'effetto materno (Gilbert, 2002; Schroder & Gilbert, 2009). Nelle linee clonali, le covate sono caratterizzate da uniformità genetica e il polifenismo delle uova può essere ascrivibile all'età, al comportamento o alle condizioni sperimentate dalla madre (Jenning & Lynch, 1928; Lansing, 1947, 1954; La Montagne & Mc Cauley, 2001; Alekseev & Lampert, 2001; Gilbert, 2002; Schroder & Gilbert, 2009).

Gli organismi clonali sono il materiale ottimale non solo per lo studio degli effetti materni ma anche per studi di plasticità fenotipica, in quanto l'omogeneità genetica degli organismi

clonali permette di imputare la variabilità osservata in organismi posti in condizioni ambientali differenti alla componente ambientale.

Le pozze temporanee

In Europa, le pozze temporanee sono eccezionalmente numerose e ampiamente distribuite. Esse costituiscono la maggior parte delle risorse continentali d'acqua dolce e contribuiscono significativamente alla conservazione della biodiversità dulciacquicola (Oertli *et al.*, 2009). Si tratta di esempi ideali di ambienti variabili che rappresentano i siti ideali per studi ecologici di biologia evoluzionistica e biologia della conservazione in quanto abbondanti e distribuiti su un ampio gradiente latitudinale, longitudinale e altitudinale. Nei primi anni dell'ultimo secolo si registra una crescente produzione scientifica sull'argomento, che vede aumentare il numero di pubblicazioni che trattano di studi su pozze temporanee, in particolare legate alla biodiversità. I corpi d'acqua temporanei non sono altro che 'isole acquatiche' in un paesaggio terrestre. Secondo la teoria delle metapopolazioni, per gli organismi acquatici obbligati, le pozze rappresentano patch fruibili all'interno di una matrice di habitat non sfruttabili. Trattandosi di ambienti variabili, uno dei fattori chiave è rappresentato dalla durata dell'idroperiodo. Di conseguenza assume rilevante importanza il ruolo degli stadi dormienti caratterizzati dalla capacità di resistere a periodi di secca tipici di organismi acquatici obbligati di ambienti di acque temporanee.

Questi ambienti rappresentano inoltre sistemi modello per studi su larga scala e permettono di analizzare l'importanza di fattori regionali rispetto a fattori locali sulla struttura di popolazioni e comunità come ad esempio l'impatto dell'idroperiodo sulla comunità stessa e sul funzionamento dell'ecosistema (De Meester, 2005; Vanschoenwinkel *et al.* 2007).

Gli ostracodi

Il materiale biologico da noi scelto per lo studio di bet-hedging ed effetti materni è rappresentato da crostacei appartenenti alla Classe Ostracoda e in particolare al genere *Heterocypris*.

Lo zooplancton d'acqua dolce offre un target straordinariamente interessante per gli studi di biologia evolutiva. Le popolazioni sono di tali dimensioni da far sì che i campionamenti non siano un fattore di costrizione. Oltre ciò i tempi di sviluppo di tali organismi sono

talmente rapidi da permettere studi di tipo multigenerazionale. Il carattere “insulare” tipico degli ambienti colonizzati da questi organismi cristallizza le frontiere della popolazione offrendo siti eccezionali in cui è possibile osservare i meccanismi di selezione. Il materiale biologico da noi scelto per lo studio del diversified bet-hedging e degli effetti materni consiste in crostacei zooplanctonici appartenenti alla Classe Ostracoda e in particolare al genere *Heterocypris*.

Negli ostracodi d’acqua dolce tipici di habitat temporanei la riproduzione partenogenetica è comune e femmine partenogenetiche producono sia uova durature (forme dormienti e resistenti al disseccamento) che uova non durature (McLay, 1978 a,b; Angell & Hancock, 1989; Rossi & Menozzi, 1990, 1993; Otero *et al.*, 1998). Non vi sono differenze morfologiche evidenti tra le due tipologie di uova.

Si tratta di piccoli crostacei bivalvi che occupano tutte le nicchie acquatiche, dal mare profondo agli ambienti efemerici. Tra i generi che colonizzano ambienti temporanei ritroviamo *Heterocypris*; in questo genere diverse specie sono partenogenetiche. La partenogenesi è apomittica: la meiosi è soppressa e la prole è identica alla madre. Femmine partenogenetiche producono sia uova durature che non durature. Inoltre, tra le uova non durature sono descritte sia uova a schiusa precoce che uova a schiusa ritardata (McLay 1978a,b; Angell & Hancock, 1989; Rossi *et al.* in preparazione). In generale consideriamo le uova a schiusa precoce quelle che schiudono entro il 110° giorno dalla nascita della madre e le uova a schiusa ritardata quelle che schiudono dopo il 110° giorno (Rossi *et al.* in preparazione). La durata del ciclo biologico varia in base alla temperatura, al fotoperiodo e al tipo di clone (interazione tra genotipo e ambiente).

Nelle risaie del nord Italia è stata descritta la successione stagionale di linee clonali specialiste differenti di *Heterocypris incongruens*: cloni di tipo invernale (W) sono i più diffusi negli ambienti continentali, predicibili e stagionali di risaie e pozze temporanee dell’Italia settentrionale (Rossi & Menozzi 1990, 1993; Rossi *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 2006). Gli autori hanno descritto che femmine clonali di tipo W, allevate singolarmente in condizioni controllate di laboratorio che dovrebbero dare indicazione della fine dell’idroperiodo (24-28°C e 16:8 L:D fotoperiodo), producono circa l’80% di uova durature. Gli stessi, in condizioni che non dovrebbero predire la durata dell’idroperiodo (16-24°C e 12:12 L:D fotoperiodo), producono 40% di uova durature e 60 % di uova non durature con schiusa sia precoce che ritardata. Tali condizioni corrispondono a condizioni

stagionali inizio-primaverili/tardo estive e corrispondono ad una predicibilità dell'idroperiodo relativamente bassa. In base a ciò si assume che queste condizioni non siano fonte di stress per le linee clonali di tipo W. In tali condizioni un eventuale polifenismo delle uova potrebbe essere interpretato come una strategia di diversified bet-hedging.

Nei cloni invernali (W) di *H. incongruens* a 24-26°C e fotoperiodo 12:12:L:B i tempi di sviluppo sono molto variabili e vanno dai 18 ai 30 giorni così come i tempi medi di generazione che vanno dai 30 ai 74 giorni. In queste condizioni i cloni producono sia uova durature che uova non durature (Rossi, dati non pubblicati). Femmine di *H. incongruens* provenienti da pozze temporanee dell'isola di Lampedusa e allevate a 16-24°C e fotoperiodo 14:10:L:B - 12:12:L:B producono sia uova durature che uova non durature (Rossi, dati non pubblicati). In questo caso l'età della madre non influisce sul tipo di uova prodotte ma in condizioni di massima imprevedibilità ambientale (16°C, 12:12:L:B), influisce sui tempi di sviluppo delle uova non durature che diminuiscono all'aumentare dell'età della madre. Questo implica fasi di schiusa precoce e tardiva nella dinamica di schiusa delle uova non durature.

In *Eucriprys virens* cloni diversi provenienti da diverse latitudini presentano diversi gradi di voltinismo. Anche in questo caso l'età della madre non influisce sul tipo di uova prodotte. In condizioni di temperatura e fotoperiodo che non danno indicazioni sulla durata dell'idroperiodo, femmine clonali provenienti dal centro Italia e allevate in condizioni costanti producono uova non durature che hanno tempi di sviluppo molto diversi.

Studi effettuati dal mio gruppo di ricerca hanno mostrato che linee apomittiche di entrambe le specie hanno tratti vitali finemente regolati e sincronizzati da segnali ambientali come temperatura e fotoperiodo che permettono la persistenza delle specie sia nelle pozze temporanee stagionali continentali che nelle pozze efemerale dell'area Mediterranea (Rossi & Menozzi 1990, 1993; Otero *et al.* 1998; Rossi *et al.* in preparazione). E' stato inoltre mostrato come il polifenismo delle uova e la fenologia di schiusa siano in relazione con presenza ed età della madre alla deposizione in *E. virens* e in *H. incongruens*, rispettivamente (Rossi *et al.* in preparazione). Altre osservazioni ci hanno permesso di escludere che la produzione di uova durature o non durature potrebbe essere dovuta a costrizioni fisiologiche legate all'invecchiamento della madre. Quando temperatura e fotoperiodo sperimentali o ambientali sono percepite come proxy di un habitat sfavorevole

per la sopravvivenza della prole, anche le femmine partenogenetiche provenienti da Lampedusa producono quasi esclusivamente uova durature (Rossi *et al.*, 2004). In diversi casi, specialmente quando temperatura e fotoperiodo non sono esattamente predittivi dell'avvento di habitat favorevole o sfavorevole, il polifenismo delle uova si osserva sia entro covata che entro generazione in linee clonali allevate in laboratorio a condizioni controllate. Le proporzioni di differenti tipologie di uova e l'asincronia nella schiusa, varia a seconda della linea clonale, della temperatura, del fotoperiodo e della loro interazione. E' stato ipotizzato che l'asincronia nei tempi di schiusa potrebbe essere il risultato di una strategia materna per ridurre la competizione tra fratelli (Rossi *et al.* in preparazione).

OBIETTIVI

Si ipotizza che in ambienti temporanei caratterizzati da un'elevata variabilità, gli organismi evolvano strategie di ripartizione del rischio (bet-hedging) per far fronte all'incertezza.

L'obiettivo principale del progetto è trovare evidenze empiriche di diversified bet-hedging. Si intende inoltre verificare se questo tratto viene trasmesso alle generazioni per effetto materno.

Per rispondere a queste domande sono state utilizzate linee partenogenetiche di *Heterocypris* (Crustacea: Ostracoda) come organismo modello per studiare un tratto potenzialmente caratterizzato da bet-hedging: la produzione di uova durature e non durature a schiusa precoce e tardiva.

La messa a punto di esperimenti di life-table (transgenerazionali) su specie diverse (*H. incongruens*, *H. barbara*) e linee partenogenetiche di diversa provenienza (pozze temporanee di Lampedusa, risaie del nord-Italia) consente di verificare e generalizzare l'ipotesi alla base del lavoro e di valutare se esistono differenze tra habitat e tra popolazioni. Il presupposto è che la strategia sia il risultato di un effetto materno legato alle condizioni di temperatura e fotoperiodo sperimentate dalla madre.

Un ulteriore obiettivo è quello di valutare il ruolo della dipendenza da densità in popolazioni di ostracodi tipici di ambienti temporanei.

CAPITOLO 2

GLI OSTRACODI

Caratteristiche generali

Regno: animale

Phylum: Artropodi

Subphylum: Crostacei

Classe: Ostracodi

Sottoclasse: Myodocopa (Sars, 1866)

Ordine: Myodocopida (Sars, 1866)

Halocyprida (Dana, 18539)

Sottoclasse: Podocopa (Müller, 1894)

Ordine:Platycopida (Sars, 1866)

Podocopida (Sars, 1866)

La classe Ostracoda (Phylum Crustacea) è rappresentata da circa 33.000 tra forme fossili e viventi. Il carapace di questi organismi è mineralizzato e possiede quindi la capacità di fossilizzare. Esistono numerosi record fossili di ostracodi; il più antico risale all'Ordoviciano (circa 490 milioni di anni fa).

Gli ostracodi occupano una grande varietà di habitat: marino, salmastro, dulcicolo e terrestre. Si rinvencono in molti ambienti effimeri ed estremi come le pozze temporanee, i sedimenti alluvionali, le fonti termali e le risaie (Ghetti P.F. & McKenzie K., 1981).

Questa classe comprende animali di piccole dimensioni (0.1-32 mm), con corpo racchiuso all'interno di un carapace bivalve di natura calcarea che può aprirsi o chiudersi grazie a muscoli adduttori che si innestano nella sua parte centrale. La segmentazione corporea è ridotta; il capo presenta 4 paia di appendici (un paio di antenne, uno di antennule e due di mascelle), seguono 3 paia di appendici toraciche (toracipodi) e un paio di rami caudali (furche). L'ontogenesi avviene mediante l'accrescimento ponderale dell'animale che prevede un numero fisso di 8 mute. Durante i passaggi fra uno stadio larvale e quello successivo si verificano: l'accrescimento, l'aumento della consistenza delle valve e la comparsa di nuove appendici. La maturità sessuale viene raggiunta allo stadio adulto e al suo raggiungimento non si ha più accrescimento corporeo. Nelle femmine ovigere, le uova

sono facilmente osservabili attraverso il carapace trasparente (Ghetti P.F. & McKenzie K., 1981).

Le diverse condizioni ambientali alle quali gli ostracodi sono esposti durante l'ontogenesi sono spesso responsabili di una forte variabilità morfologica intraspecifica. La forma e la grandezza del carapace sono generalmente influenzate da una serie di fattori tra cui: la salinità, la temperatura, il fotoperiodo e le disponibilità di risorse alimentari. I fenomeni di plasticità fenotipica che si osservano sono il risultato dell'interazione tra genotipo ambiente questi fattori ambientali (Baltanás *et al.*, 2002; Fiston, 2000).

La temperatura, in particolare, influenza lo sviluppo e le dimensioni corporee degli ostracodi: a temperature elevate i processi di sviluppo degli organismi sono accelerati, il tempo in cui avvengono le mute successive e la calcificazione del carapace è ridotto e di conseguenza si osserva, soprattutto allo stadio adulto, una riduzione delle dimensioni medie del carapace (Bodegat, 1983; Mezquita *et al.*, 1999; Majoran *et al.*, 2000). Al contrario, se la temperatura è relativamente bassa, i processi di sviluppo sono rallentati e le dimensioni medie del carapace risultano significativamente più grandi.

Gli ostracodi mostrano una varietà di attitudini alimentari. Tra essi si ritrovano filtratori, detritivori, erbivori e carnivori. La predazione è normalmente ristretta nei confronti di piccoli invertebrati quali vermi, copepodi e ostracodi. Si riporta che *Eucypris virens* si alimenta sulle sete terminali del fillopode *Tanymastix* ed è soggetto a cannibalismo (Kiefer 1936). *Heterocypris incongruens* spesso attacca piccole prede come *Daphnia magna*, copepodi e altri ostracodi, oligocheti, cladoceri e larve di insetti (Ganning 1971; Meisch 2000). Quello degli spazzini è il gruppo principale, ne sono esempi le stesse specie *E.s virens* e *H. incongruens*. Gli adattamenti morfologici a questo tipo di carnivoria includono un complesso furcale potente che permette a tali organismi di ancorarsi fermamente alla carcassa e smembrarla.

Negli ostracodi d'acqua dolce è nota la capacità di produrre sia uova non durature che uova durature, queste con la capacità di resistere e mantenersi vitali per lunghi periodi (anni), anche in condizioni di disidratazione (Rossi *et al.* 2004). Sono noti inoltre fenomeni di schiusa ritardata sia delle uova non durature (dopo 120 giorni dalla nascita della madre; Rossi *et al.*, in prep.; Havel & Talbott, 1995) e delle uova durature (Mc Lay, 1977). Mc Lay (1977) per la prima volta descrive dinamiche di schiusa di uova durature del genere

Heterociprys in cui si osserva un picco di schiusa ritardato dopo 204 giorni dalla reidratazione dei sedimenti in cui erano presenti inizialmente le uova.

Grazie alla grande abbondanza di fossili e agli alti livelli di tolleranza specie-specifici per le variabili ecologiche (temperatura, salinità e pH), questi animali sono comunemente utilizzati come specie-indicatrici delle condizioni ecologiche presenti e passate (Külköylüoğlu & Dügel, 2004). Recentemente l'interesse per questo gruppo di animali è notevolmente incrementato a causa della straordinaria varietà di strategie riproduttive che questi organismi possono adottare e alcuni casi di simpatria tra popolazioni partenogenetiche e sessuate (Chaplin *et al.* 1994, Rossi *et al.* 2007). In molte specie il rapporto sessi è sbilanciato a favore delle femmine. La determinazione sessuale è di tipo cromosomico e lo squilibrio del rapporto sessi potrebbe essere legato all'elevata incidenza dei cromosomi sessuali multipli. Ancora Chaplin *et al.* (1994) affermano che i due tipi di riproduzione, anfionica e partenogenetica, presenti in molte specie di Ostracodi d'acqua dolce, devono essere considerate due strategie alternative per far fronte al variare delle condizioni ambientali nello spazio e nel tempo. L'elevata diversità clonale osservata negli ostracodi partenogenetici potrebbe trarre origine dall'ibridazione di femmine partenogenetiche e maschi. In 400 milioni di anni di storia evolutiva gli Ostracodi hanno colonizzato tutti i tipi di ambienti acquatici. La loro ampia distribuzione geografica e l'ampia valenza ecologica potrebbero essere la chiave per capire il legame tra le condizioni ambientali e le diverse modalità riproduttive, tuttavia l'elevata incidenza di specie partenogenetiche resta un mistero in parte insoluto (Chaplin *et al.*, 1994).

Gli ostracodi, già ampiamente studiati dal punto di vista morfologico come "fossili guida", rappresentano una realtà negli studi sull'evoluzione del sesso (Butlin & Menozzi, 2000). In molte specie, in particolare quelle d'acqua dolce, si osserva una frequente transizione dalla riproduzione anfimittica a quella partenogenetica (Chaplin *et al.*, 1994) ed è stato descritto il fenomeno della partenogenesi geografica, ovvero la separazione spaziale delle femmine con modalità riproduttive diverse (anfimissi e apomissi) (Suomalainen, 1987). Schön *et al.* (2000) hanno studiato per la prima volta le relazioni filogenetiche tra popolazioni sessuate e partenogenetiche di *E. virens*, che mostrano un tipico pattern di distribuzione legato alla partenogenesi geografica. Le analisi effettuate attraverso il marcatore nucleare ITS1 e il marcatore mitocondriale COI hanno dimostrato la presenza di una divergenza eccezionalmente elevata tra le diverse linee, mentre, le ricostruzioni filogenetiche hanno

accertato l'origine multipla delle linee clonali asessuate a partire dalle popolazioni sessuate. Il confronto tra i dati nucleari e mitocondriali ha altresì permesso di individuare un certo grado di scambio genetico tra le due forme. L'ibridazione intraspecifica rappresenta una strada attraverso la quale combinare i benefici di entrambe le modalità riproduttive e può spiegare come l'asessualità possa persistere anche per lunghi periodi in termini evolutivi. In un precedente studio, Rossi e collaboratori (1998) hanno riscontrato elevati livelli di variabilità genetica nelle popolazioni partenogenetiche di *E. virens* e *H. incongruens*. Su 1200 campioni provenienti da 55 località europee sono stati trovati ben 211 cloni differenti. Le ragioni di questo fenomeno sono quasi del tutto inesplorate, secondo Butlin *et al.* (1998) sono diversi i fenomeni coinvolti: mutazioni all'interno della stessa linea clonale; origini separate da più antenatori sessuati; ibridazione tra forme asessuate e maschi della stessa specie. L'elevata diversità clonale può conferire alle popolazioni apomittiche lo stesso beneficio della variabilità genetica nelle popolazioni anfimittiche. Se un clone può esprimere solo una parte della nicchia, sommando le differenti linee clonali, queste possono esprimere l'intera nicchia ecologica della corrispondente popolazione anfimittica. Oltre agli inaspettati livelli di diversità clonale, le popolazioni partenogenetiche possono trarre beneficio dai fenomeni di plasticità fenotipica che, in alcuni casi, possono incrementare la variabilità morfologica e di conseguenza anche della nicchia ecologica.

Il genere *Heterocypris* comprende circa 50 specie non marine (McKenzie, 1971b) distribuite su diversi continenti ed isole oceaniche (Malmqvist *et al.*, 1997). La tassonomia del gruppo è spesso confusa e di difficile interpretazione. Questo è in parte dovuto all'ampia distribuzione ai fenomeni di plasticità fenotipica (Purper & Wuerding-Maciel, 1974; Sywula & Lorenc, 1981; Benzie, 1984, Carbonel *et al.*, 1998). L'isolamento riproduttivo e il ristretto flusso genico, legato anche alla riproduzione partenogenetica, possono condurre alla divergenza genetica e fenotipica fra popolazioni isolate e all'instaurazione di nuovi gruppi genetici e morfologici (Barraclough & Nee, 2001).

Heterocypris incongruens

Heterocypris incongruens (Ramdohr, 1808) (Crustacea, Ostracoda) (famiglia Cyprididae), è una specie d'acqua dolce diffusa in un areale molto ampio (Sywula & Lorenc, 1981; Pfau, 1982). Segnalazioni di questa specie sono state fatte dalla Norvegia al Ghana (Sars,

1928; Benzie, 1984) e dall'India al Brasile (Battish, 1981, Puerper & Wuerdig-Maciel, 1974).

Il carapace ha una classica forma a fagiolo con un'altezza massima pari a circa la metà della lunghezza. La valva sinistra, di dimensioni leggermente maggiori, abbraccia la destra (carattere tipico del genere). Visto dorsalmente l'animale appare ellittico, anteriormente più stretto che posteriormente. La colorazione dipende fortemente dall'ambiente in cui l'animale vive e può andare dal brunastro al bianco opaco al trasparente (soprattutto in laboratorio). Le valve, inoltre, possono presentare striature e screziature di diverse tinte (Ghetti & Mc Kenzie, 1981).

Le sei impronte dei muscoli adduttori sulle valve, importante carattere sistematico, sono quelle tipiche dei Ciprididi (Ghetti & McKenzie, 1981). *H. incongruens* presenta dimensioni variabili comprese tra 1,5 e 1,7 mm in natura (Gauthier, 1938; Ghetti & McKenzie, 1981). In laboratorio, in un intervallo di temperatura compreso tra 23,3°C e 14,1°C, sono state osservate dimensioni leggermente inferiori comprese tra 1,1 mm e 1,6 mm (Szczechura, 1971).

E' una specie che tollera poco le ampie variazioni di salinità, ben adattata alle basse concentrazioni di ossigeno (Ganning, 1971). Nelle pozze temporanee *H. incongruens* vive prevalentemente nell'interfaccia acqua-sedimento; quando la temperatura è sufficientemente elevata è facile ritrovarlo sulle alghe filamentose, sulle macrofite, oppure natante nella colonna d'acqua. In alcuni periodi dell'anno, presumibilmente quando le condizioni sono particolarmente favorevoli, si possono osservare popolazioni di sorprendente densità e veri e propri agglomerati di individui. *H. incongruens* si nutre di alghe ma può essere considerato un efficiente detritivoro saprofago.

I tempi di sviluppo di questa specie sono fortemente condizionati dalla temperatura. Dati sperimentali di allevamenti in laboratorio indicano valori compresi fra 81 giorni a 10°C e 10 giorni a 30°C (Latifa, 1987). Rossi e collaboratori (Rossi & Menozzi, 1990; Rossi & Menozzi, 1993; Rossi *et al.*, 1996) hanno dimostrato come la temperatura e il fotoperiodo influiscono sui tempi di sviluppo delle uova e dei giovanili e come le variazioni nelle risposte possano essere attribuite a fenomeni di adattamento sviluppati da genotipi diversi. Come in molte altre specie del genere, *H. incongruens* mostra un tipico pattern di partenogenesi geografica. Wohlgemuth (1911), fu tra i primi a descrivere i pattern di distribuzione di popolazioni anfimitiche e partenogenetiche di *H. incongruens* in vari

ambienti acquatici dell'Europa centrale. L'autore spiega l'alternanza spaziale e temporale di popolazioni e generazioni anfimittiche e partenogenetiche come una intrinseca tendenza degli organismi nell'alternare le due modalità riproduttive (partenogenesi ciclica). Inoltre aggiunge che le forme partenogenetiche sono più "stabili" e per riottenere la riproduzione sessuata sono necessarie forti perturbazioni. Oggi sappiamo che i pattern osservati da Wohlgenuth sono riconducibili alla partenogenesi geografica con un quadro che può essere così riassunto: partenogenesi diffusa in Europa settentrionale, anfimissi diffusa in Nord Africa e coesistenza di entrambe le forme in Europa centrale. In accordo con l'ipotesi di McKenzie (1971a), le forme sessuate tendono ad occupare gli ambienti nativi e in accordo con l'ipotesi della ricolonizzazione post-glaciale, l'area circum-mediterranea potrebbe aver rappresentato un rifugio durante l'ultima glaciazione (Horne *et al.*, 1998). Per quanto concerne la partenogenesi, in questa specie è di tipo ameiotico (Rossi *et al.*, 1993), mentre la determinazione del sesso è legata ad un sistema "multi-X": le femmine posseggono 6 paia di cromosomi X mentre i maschi posseggono un paio di cromosomi Y (Schon & Martens, 1998).

H. incongruens è la specie di ostracodi più diffusa nelle risaie del nord Italia ed è tipica e molto diffusa anche in altri ambienti temporanei (Rossi *et al.*, 2006).

Nel Nord Italia sono state descritte differenze morfologiche ed ecologiche fra diverse linee clonali di popolazioni apomittiche di *H. incongruens* (Rossi & Menozzi, 1990; Rossi *et al.*, 1996). Rossi & Menozzi (1990) hanno dimostrato che le variazioni stagionali nelle dimensioni degli organismi osservati in una risaia del nord Italia, sono legate alla successione di cloni geneticamente e fenotipicamente diversi.

L'alta diversità clonale, come osservato in numerosi taxa, può essere il risultato di diversi meccanismi tra cui le mutazioni, l'ibridazione e di poliploidizzazioni. L'ibridazione interspecifica è descritta come un meccanismo finalizzato ad aumentare la variabilità clonale e genetica (Turgeon & Herbert, 1994).



Figura 2.1 – *Heterocypris incongruens*

Le femmine partenogenetiche di *H. incongruens* possono deporre sia uova non durature che uova durature. Queste ultime, prodotte per partenogenesi, garantiscono la dispersione sia spaziale che temporale della specie (Rossi *et al.*, 1991; Rozzi *et al.*, 1991, Rossi *et al.*, 1996). Grazie alla loro particolare resistenza le uova durature possono sopravvivere anche più anni in condizioni di essiccamento ed essere trasportate da vari tipi di vettori (pesci, uccelli, insetti, vento, ecc...). Kornicker & Sohn (1971) hanno segnalato l'esistenza di uova di *H. incongruens* in grado di schiudersi dopo essere state ingerite da un pesce, *Xiphophoius helleri*. In queste uova, gli autori dell'osservazione hanno descritto l'esistenza di una doppia membrana, ma non esistono in letteratura, dati sistematici che permettano di distinguere morfologicamente uova durature da uova non durature

La produzione di uova durature e non durature e la loro fenologia di schiusa ricoprono un ruolo determinante nella dinamica di popolazione di *Heterocypris* (Rossi *et al.*, 2004). Le prime si schiudono solo dopo almeno un ciclo di disidratazione-reidratazione e costituiscono la "banca di uova" che consente la ricolonizzazione delle pozze di anno in anno. Le seconde, si schiudono in condizioni di idratazione permanenti e possono avere tempi di sviluppo molto diversi. Ad esempio sono note dinamiche di schiusa descritte da schiuse precoci (entro 110 giorni dalla nascita della madre) e schiuse tardive (oltre 110 giorni dalla nascita della madre) (Rossi *et al.*, in prep.). Ebbene, ecotipi di risaia distinti geneticamente per i loci polimorfici MPI, PGM e GPI, poste a condizioni di laboratorio che simulano temperatura e fotoperiodo tipiche del periodo estivo, producono quote differenti di uova durature e non durature (Rossi *et al.*, 1996). Cloni di tipo W producono

quasi esclusivamente uova di durata, mentre cloni di tipo S e tipo I uova non durature (Rossi *et al.*, 1996).

Dai dati forniti da Wickstrom & Castenholz (1985) risulta che le uova vive mantengono un colore arancio brillante e diventano bianche con la morte. In condizioni favorevoli una singola femmina può deporre fino a 200 uova nell'arco della sua stagione riproduttiva (Rossi & Menozzi, 1990; Rossi & Menozzi, 1993; Rossi *et al.*, 1996).

Heterocypris barbara

H. barbara (Crustacea, Ostracoda) (Gauthier & Brem, 1928) è una delle oltre trenta specie del genere *Heterocypris* descritte nell'area del Mediterraneo (Martens *et al.*, 2002). L'areale di distribuzione di questa specie comprende la parte occidentale dell'Africa settentrionale (Marocco, Tunisia, Algeria), le Isole Pelagie (Lampedusa, Linosa), la parte orientale della penisola Iberica (Aragóna, La Mancha, Andalusía) e parte dell'Europa centro-orientale (Romania, Ungheria, Moldavia, Ucraina) (Baltanás *et al.*, 1990; Meisch & Forro, 1997).

Sotto il profilo morfologico, le femmine adulte si presentano dorsalmente piuttosto allungate e schiacciate ai lati, lateralmente le valve sono lunghe circa il doppio dell'altezza con il margine superiore piuttosto arcuato e quello inferiore leggermente concavo. La valva sinistra abbraccia la valva destra e, dorsalmente, la sua estremità anteriore è schiacciata, mentre l'estremità posteriore tende ad essere panciuta. Lateralmente, sull'estremità posteriore della valva sinistra, dotata di ispessimenti chitinosi simili a piccoli dentelli, è ben visibile una espansione chiamata lamella ialina che compare solo nell'ultimo stadio di sviluppo (Tondelli, 2001). La valva destra è più piccola e come per la valva sinistra, l'estremità anteriore è schiacciata, mentre quella posteriore è panciuta, la valva destra non porta mai la lamella e i suoi bordi sono delimitati da una netta linea d'inserzione (Fig. 2.2.a, b, c). I maschi, si differenziano dalle femmine per la dimensione corporea generalmente inferiore, per la totale assenza della lamella ialina e per la maggiore abbondanza di tubercoli che si estendono anche oltre il margine posteriore; nelle femmine i tubercoli sono quasi assenti e non superano la regione postero-ventrale (Fig. 2.2).

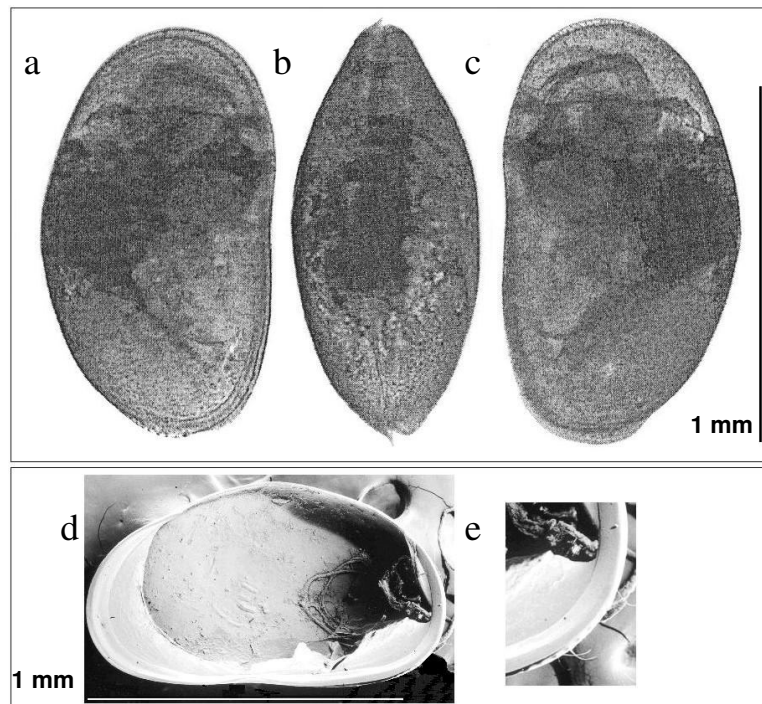


Figura 2.2- *Heterocypris barbara*: I) ♀ adulta; II) ♂ adulto. a) valva destra; b) vista dorsale; c) valva sinistra; d) valva sinistra; e) margine posteriore valva sinistra.

Per l'Algeria e la Tunisia, Gauthier (1928) descrive due varietà di questa specie: *H. barbara inermis* e *H. barbara barbara*, le quali presentano differenti caratteristiche morfologiche ed ecologiche. Dal punto di vista morfologico, *H. barbara inermis* mostra: un maggiore sviluppo della regione posteriore della valva sinistra; un maggior sviluppo della lamella ialina; una sorta di becco nella regione anteriore, non così accentuato nella varietà *barbara*; e l'assenza di tubercoli sulla valva destra.

Esistono relativamente poche informazioni sull'ecologia e sulla biologia della specie. La varietà *barbara* sembra prediligere i corpi d'acqua dolce, mentre la varietà *inermis*, quelli di acque continentali ad alto contenuto salino (Gauthier, 1928; Baltanás *et al.*, 1990). Queste diverse caratteristiche ambientali potrebbero essere responsabili della differenziazione morfologica (Gauthier, 1928). Sempre secondo Gauthier (1928), della varietà *inermis* esisterebbero sia popolazioni bisessuate che popolazioni partenogenetiche. È quindi verosimile che, come in altre specie del genere *Heterocypris*, la riproduzione sia di tipo partenogenetico geografico (Horne *et al.*, 1998). Le popolazioni bisessuate si troverebbero solo in acque continentali salate (Baltanás *et al.*, 1990), mentre le

partenogenetiche si troverebbero in corpi d'acqua dolce in simpatria con popolazioni bisessuate di *H. barbara barbara* (Gauthier, 1928).

Martorella (2004) ha è stato messo in luce come il tipo di uova (durature o non durature) da cui nascono le larve e le condizioni di conducibilità e di temperatura alle quali si sviluppano, influiscono, interagendo fra di loro, sui tempi di sviluppo e sulle dimensioni medie raggiunte dalle femmine adulte di *H. barbara* nella popolazione anfimittica di Aria Rossa (isola di Lampedusa). In particolare la conducibilità sembra direttamente correlata alle dimensioni corporee e inversamente correlata ai tempi di schiusa delle uova e di sviluppo delle larve. Le dimensioni medie delle femmine adulte sembrano inoltre diminuire di generazione in generazione e, a parità di altre condizioni, sono maggiori in femmine nate da uova durature.

Il genere *Heterocypris* sull'isola di Lampedusa

Una popolazione partenogenetica di *Heterocypris incongruens* è stata segnalata all'estremità sud-orientale dell'isola di Lampedusa nella località di Cavallo Bianco (Bellavere *et al.*, 2002) (Fig. 2.3). La specie *Heterocypris barbara*, invece, è stata segnalata per la prima volta in Italia solo recentemente (Rossi *et al.*, 2007). In particolare le segnalazioni provengono da due pozze temporanee (Aria Rossa e Vallone della Forbice C) dell'isola di Lampedusa (Fig. 2.3). La popolazione di Vallone della Forbice C è costituita da femmine partenogenetiche, (riconoscibili per l'assenza della lamella ialina) (Fig. 2.4a), da femmine anfimittiche (dotate di lamella) e da maschi. Quella di Aria rossa è risultata popolata da femmine anfimittiche con lamella e da maschi (Rossi *et al.*, 2007).

Sempre sull'isola di Lampedusa, è stato ritrovato nella pozza di Vallone della forbice P un terzo morfotipo partenogenetico (*H. sp.*), probabilmente originato dall'ibridizzazione delle due specie *H. incongruens* e *H. barbara* (Rossi *et al.*, 2007).

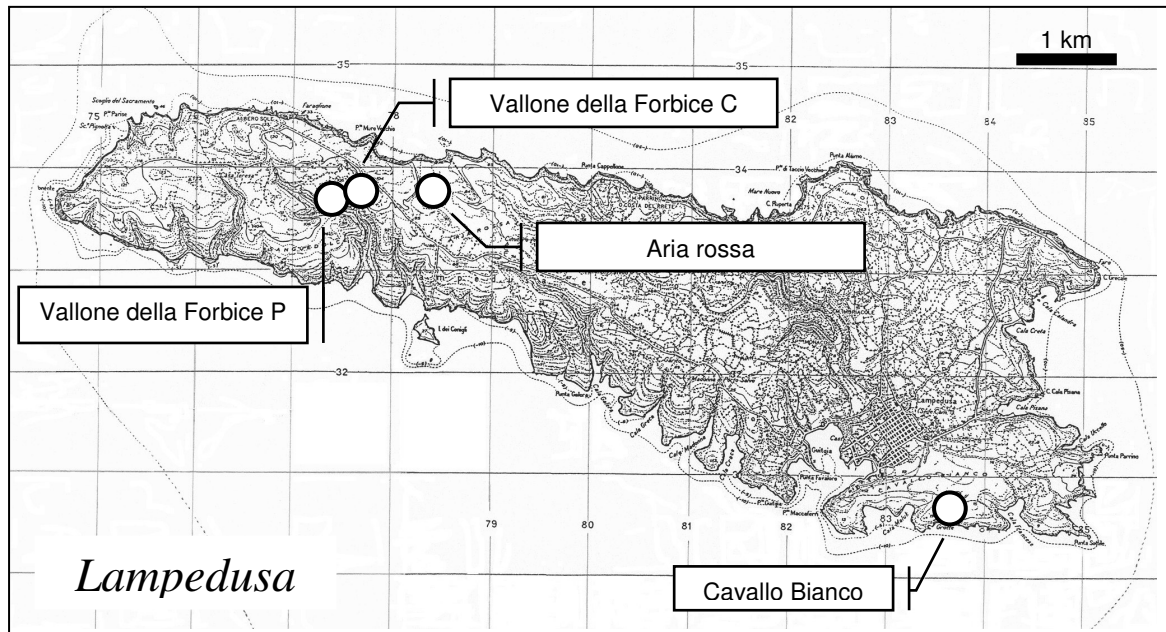


Figura 2.3 - Isola di Lampedusa – Localizzazione delle pozze temporanee.

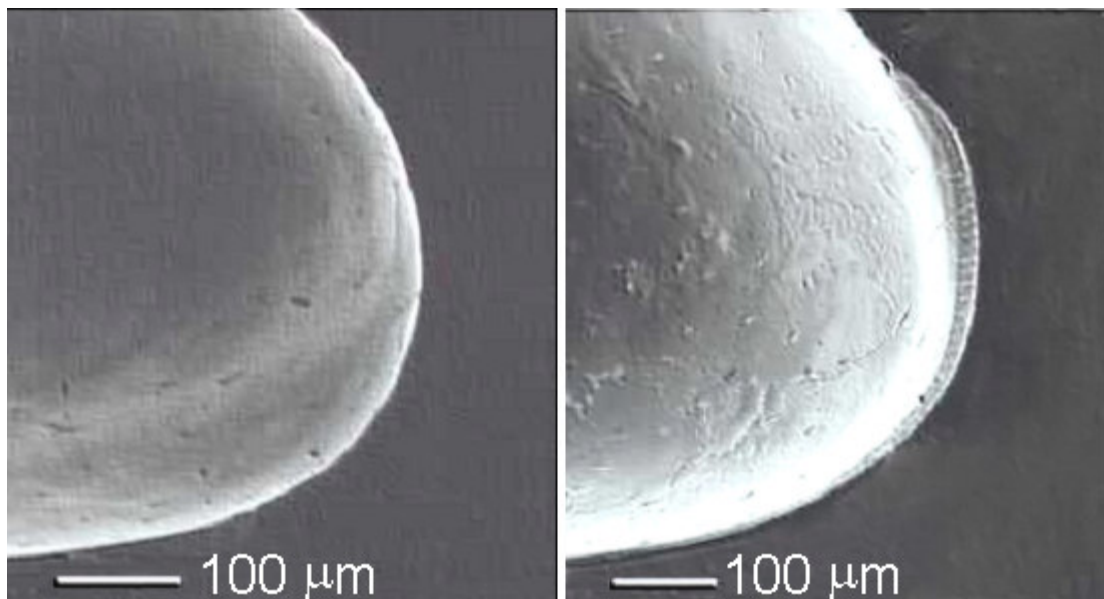


Figura 2.4 - Margine posteriore della valva sinistra di ♀♀ di *Heterocypris* rinvenute a Lampedusa: a) senza lamella ialina; b) con lamella ialina

Tale ipotesi è confermata dai dati relativi ad analisi filogenetiche (Rossi *et al.*, 2007) condotte mediante analisi isoenzimatica di 4 loci polimorfici (MPI, GPI, PGM e ICD2) e analisi di sequenze di DNA mitocondriale ribosomiale 16S (Rossi *et al.*, 2007) e citogenetiche (Severino, 2004), che hanno messo in luce la presenza di almeno tre unità evolutivamente separate. Sulla base dei dati relativi a sequenze di DNA mitocondriale la popolazione di Cavallo Bianco è ascrivibile alla specie *H. incongruens* ed è costituita da femmine partenogenetiche senza lamella. La popolazione di Vallone della Forbice C, indipendentemente dal morfotipo e dalle modalità riproduttive formano un raggruppamento con le femmine di *H. barbara*. La popolazione di Vallone della Forbice P è stata classificata come una forma intermedia, a conferma dell'ipotesi che potrebbe essere stata generata da un processo di ibridizzazione tra le due altre forme presenti sull'isola.

La pozza di Cavallo Bianco si origina in una depressione localizzata in una radura quasi del tutto priva di vegetazione e caratterizzata da terreno sciolto a matrice prevalentemente sabbiosa, le pozze di Vallone della Forbice e, in particolare, Vallone della Forbice C, sono raccolte d'acqua in nicchie rocciose localizzate appunto nel Vallone della Forbice, un residuo fluviale che corre lungo la porzione meridionale dell'isola caratterizzato da una macchia mediterranea piuttosto rigogliosa. Differenti substrati e differenti conformazioni delle pozze potrebbero modificare la durata dell'idroperiodo così come la presenza di vegetazione circostante potrebbe modificare l'apporto di materia organica, alterare l'idrochimica della pozza e modificare i tempi di schiusa delle uova durature (Rossi *et al.* 2004).

CAMPIONAMENTO

Gli organismi utilizzati in questa tesi appartengono a linee evolutive differenti: *H. incongruens*, *H. barbara* e *H. sp.* Relativamente alla specie *H. incongruens* sono stati utilizzati organismi appartenenti a popolazioni provenienti da latitudini diverse e da ambienti diversi: una pozza temporanea dell'isola di Lampedusa (Cavallo Bianco) (Lat 35°30' N Long 12°36' E) e due risaie della Pianura Padana (Lat 44°8'N Long 10°3'E) (Fig. 2.5). Questi due ambienti sono caratterizzati da importanti differenze nell'idroperiodo. A Lampedusa l'idroperiodo è regolato esclusivamente dalle precipitazioni e dall'evapotraspirazione naturale; in risaia l'idroperiodo dipende principalmente dalle pratiche agricole di coltura del riso. Sull'isola di Lampedusa, i corpi d'acqua effimeri si formano solo in seguito ad abbondanti precipitazioni. Queste sono sporadiche e concentrate da Settembre ad Aprile (precipitazioni annuali da 120-579 mm). Nelle risaie del nord-Italia le pratiche colturali prevedono una prima inondazione a Maggio, seguita da almeno 1 ciclo di svuotamento-riempimento per favorire l'attecchimento delle plantule di riso. La risaia è quindi mantenuta inondata fino alla raccolta (mese di Settembre).

Gli organismi delle popolazioni di Lampedusa utilizzati per gli esperimenti sono stati ottenuti reidratando in laboratorio sedimento essiccato campionato sull'isola di Lampedusa (Aprile 2006) nelle 3 diverse pozze oggetto di studio (Cavallo Bianco, Vallone della Forbice C e Vallone della Forbice P). Tali sedimenti sono stati mantenuti in microcosmi per alcuni anni e sottoposti a molteplici processi di reidratazione-disidratazione in laboratorio. In data 4 Novembre 2008 sono stati infine reidratati e successivamente mantenuti in laboratorio sul davanzale di un'ampia finestra in modo da simulare temperatura e fotoperiodo naturali fino alla schiusa delle uova durature da cui è stata ottenuta la generazione sperimentale parentale (P).

In Pianura Padana sono state campionate due risaie distanti approssimativamente 30 km: Budrione in provincia di Modena e La Bigliana in provincia di Reggio nell'Emilia (Fig. 2.6). Per il campionamento in risaia è stato utilizzato un retino da plancton (maglie con luce di 50 µm). In base a risultati ottenuti in precedenza, nella risaia di Budrione sono state individuate 4 diverse linee clonali e nella risaia de La Bigliana ne sono state individuate 5 (Rossi *et al.*, 1996; 2006). La linea clonale di tipo W, definita in base alle caratteristiche di almeno tre marcatori isoenzimatici (MPI, GPI e PGM) è la più diffusa e la più abbondante in queste risaie come in generale nelle pozze temporanee del Nord Italia (Rossi *et al.*, 2006).

Per gli esperimenti sono state utilizzate femmine partenogenetiche apomittiche provenienti dalle due risaie campionate nel nord Italia (Budrione, La Bigliana) e dalle tre pozze temporanee di Lampedusa (Cavallo Bianco, Vallone della Forbice C e Vallone della Forbice P) (*H. incongruens*, *H. barbara*, *Heterocypris sp.*).



Figura 2.5. Italia – Localizzazione dei siti di campionamento.

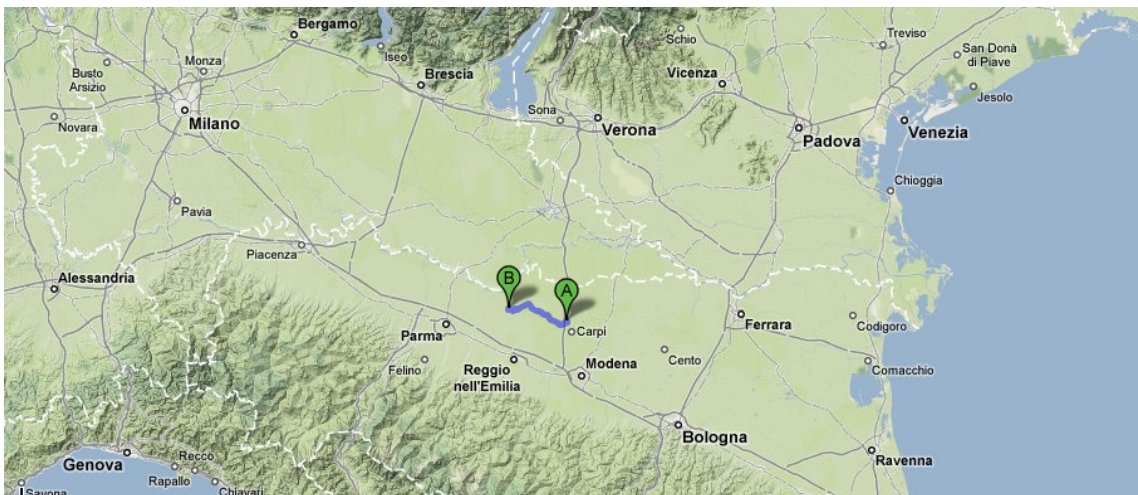


Figura 2.6. Pianura Padana – Localizzazione delle risaie campionate. A. Budrione. B. La Bigliana.

DETERMINAZIONE DELLE CONDIZIONI SPERIMENTALI

Le condizioni sperimentali di temperatura e fotoperiodo utilizzate per studiare il fenomeno del bet-hedging sono:

- . 16°C e fotoperiodo 12:12 L:B per gli organismi di Lampedusa;
- . 24°C e fotoperiodo 12:12 L:B per gli organismi del nord-Italia.

Queste condizioni di allevamento sono state scelte in base a due criteri principali:

- sono adeguate per la crescita e la riproduzione delle linee evolutive di *Heterocypris* (Rossi & Menozzi, 1990; 1993; Rossi *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 2004; 2007);
- non dovrebbero prefigurarsi come informative sulla possibile durata dell'idroperiodo, cioè non sono chiaramente percepibili dagli organismi come predittive di asciutta estiva (o di gelo invernale in risaia come per la maggior parte delle pozze temporanee dell'area padana) e si configurano come condizioni di elevata imprevedibilità ambientale. Queste condizioni sono tese a ricreare le condizioni di temperatura media e fotoperiodo dei mesi in cui è massima l'imprevedibilità dell'idroperiodo.

Imprevedibilità e durata dell'idroperiodo rappresentano i fattori chiave da cui dipende la scelta della strategia riproduttiva degli organismi che colonizzano gli ambienti temporanei. Per individuare le condizioni di massima imprevedibilità per le pozze temporanee dell'isola di Lampedusa e per ipotetiche pozze temporanee della Pianura Padana siamo partiti da serie di dati storici relativi alle temperature minime e massime mensili e alle precipitazioni medie mensili delle zone considerate.

Per Lampedusa sono stati utilizzati i dati relativi a 25 anni inclusi nel periodo 1959–2006. Per la Pianura Padana sono stati utilizzati i dati relativi alle temperature e alle precipitazioni registrate a Parma, considerata come località media della Pianura Padana, nell'arco di 5 anni (2004-2008). I dati di piovosità e temperatura provengono da: bollettini annuali dell'ISTAT, Aeronautica Militare Italiana, SIAS agrometeo, regione Sicilia, ENEA di Lampedusa (AG) e A.R.P.A. Emilia Romagna.

Per prima cosa abbiamo determinato il BIC (Bilancio Idro Climatico) un indicatore utilizzato in agronomia per valutare il contenuto idrico dei suoli. Nelle carte del bilancio idrico climatico i valori positivi indicano condizioni di surplus idrico mentre quelli negativi rappresentano condizioni di deficit idrico. Nel nostro caso surplus idrico è considerato come accumulo di acqua nella pozza e quindi idroperiodo potenziale. Il valore di BIC mensile per ogni località è stato calcolato come differenza tra le precipitazioni (P) e l'evapotraspirazione potenziale (PET). L'evapotraspirazione è l'effetto cumulato dell'evaporazione dalla superficie del terreno e della traspirazione dell'acqua dalle piante. In condizioni di disponibilità idrica non limitante, l'evapotraspirazione da un terreno ricoperto di vegetazione bassa, omogenea, in buono stato vegetativo ed esente da infezioni e malattie è determinata solo dalle condizioni meteorologiche; in queste condizioni standard l'evapotraspirazione prende il nome di evapotraspirazione potenziale (PET). In sintesi, PET

rappresenta i millimetri di acqua che potenzialmente vengono persi per effetto dell'evaporazione e della traspirazione. PET è stata calcolata utilizzando l'approccio empirico proposto da Thornthwaite (1948):

$$\mathbf{PETi(0) = 16 \cdot (10 \cdot T_m / I)^a}$$

$$\mathbf{I = \sum_{1-12} (0,2T_m)^{1,514}}$$

$$\mathbf{a = 6,75 \cdot 10^{-7} \cdot I^3 - 7,71 \cdot 10^{-5} \cdot I^2 + 1,7912 \cdot 10^{-2} \cdot I + 0,49239}$$

$$\mathbf{PET(L) = k \cdot PET(0)}$$

dove:

PETi(0)= evapotraspirazione potenziale mensile a latitudine 0°.

Tm =Temperatura media mensile

PETi(L)= evapotraspirazione potenziale mensile a latitudine L°.

k= fattore di correzione per la latitudine

Dato che il metodo è stato calibrato su zone degli Stati Uniti centrali e orientali è noto che la sua applicazione in aree geografiche diverse può avere molti limiti: in particolare è stata segnalata la sovrastima dell'idroperiodo in climi di tipo mediterraneo (Pereira & Pruitt, 2004). Il principale vantaggio del metodo dipende dal limitato numero di parametri richiesti. Abbiamo escluso l'adozione di fattori di correzione proposti per climi mediterranei (Camargo *et al.*, 1999; Pereira & Pruitt, 2004), che nel nostro caso non portano a variazioni rilevanti rispetto all'approccio Thornthwaite classico (1948). Per il calcolo della PET è stato usato il programma online (<http://onlinecalc.sdsu.edu/>) che richiede come dati di input il valore medio mensile di temperatura dell'aria e la latitudine del sito di riferimento. Il dato relativo alla latitudine è necessario al fine della definizione di una costante (k) che assume valori differenti a seconda della latitudine. Si segnala che l'output del programma online utilizzato fornisce il valore di PET in cm. Per PET>P il valore di BIC è stato posto = 0. Il bilancio idroclimatico medio mensile (P-PET= BIC) e la relativa deviazione standard per Lampedusa e per la Pianura Padana (Parma) è riportato in Figura 2.7.

Relativamente all'isola di Lampedusa valori di BIC>0 sono stati osservati da Ottobre a Marzo: per i mesi di Ottobre, Novembre e Marzo con una frequenza del 20-25% (nei 25 anni considerati); per i mesi di Dicembre, Gennaio e Febbraio con frequenza del 68, 48 e 52% (rispettivamente). Relativamente alla Pianura Padana si osserva un accumulo di acqua nella pozza da Settembre a Maggio: per i mesi di Settembre, Marzo, Aprile e Maggio con una frequenza che va dal 20 al 40%,

mentre per gli altri mesi la frequenza va da un minimo di 60% per i mesi di Ottobre, Gennaio e Febbraio fino al 100% di Novembre e Dicembre.

Nella figura 2.8 è riportato il fotoperiodo (numero di ore di luce giornaliera) e il coefficiente di variazione (CV) mensile dell'indice BIC per Lampedusa e per la Pianura Padana. Il coefficiente di variazione di BIC è stato assunto come stima mensile dell'imprevedibilità dell'idroperiodo (Simons & Johnston, 2003). Assumendo che a valori di imprevedibilità dell'idroperiodo differenti corrispondano differenti valori di rischio connesso alla riproduzione, in tali habitat l'esito dell'evento riproduttivo per gli organismi varia durante l'anno. Per l'arco di tempo considerato, sull'isola di Lampedusa l'imprevedibilità dell'idroperiodo è massima nei mesi in cui l'accumulo di acqua ($BIC > 0$) è meno frequente (Ottobre, Novembre e Marzo). Allo stesso modo in Pianura Padana i mesi in cui l'imprevedibilità dell'idroperiodo risulta massima sono Settembre e Maggio. Le condizioni sperimentali scelte per gli organismi di Lampedusa (16°C e fotoperiodo 12:12 L:B) sono tese a ricreare condizioni vicine a quelle di massima imprevedibilità (mese di Ottobre $21,8^{\circ}\text{C}$ e fotoperiodo 12:12; mese di Marzo $14,1^{\circ}\text{C}$ e fotoperiodo 11:13). Un ulteriore fattore che ci ha indotto alla scelta di tali condizioni è stata l'analisi di esperimenti pregressi: a 16°C e fotoperiodo 12:12 L:B un clone proveniente dalla pozza temporanea di Cavallo Bianco (Lampedusa) ha mostrato fenomeni di diversificazione nella risposta in termini di tipologia di uova prodotte.

In Pianura Padana l'imprevedibilità dell'idroperiodo per una pozza temporanea è massima nei mesi da Marzo a Maggio e nel mese di Settembre. In tali mesi la temperatura media va dai $10,4^{\circ}\text{C}$ di Marzo ai $20,3^{\circ}\text{C}$ di Settembre mentre il fotoperiodo va dalle 10,8 ore di Marzo alle 14,0 ore di Maggio. In risaia le pratiche colturali prevedono inondamenti e disseccamenti molteplici nel periodo di fine Maggio-Giugno (il mese di Giugno è caratterizzato da una temperatura media di $23,4^{\circ}\text{C}$). In questo modo per questi ambienti l'opera dell'uomo modifica leggermente l'imprevedibilità dell'idroperiodo rispetto a quella naturale. Per ricreare condizioni di massima imprevedibilità che tengano conto sia dell'imprevedibilità naturale che di quella determinata dall'uomo le condizioni sperimentali scelte per gli organismi della Pianura Padana (24°C e fotoperiodo 12:12 L:B) sono condizioni di temperatura leggermente superiori a quelle emerse dallo studio dell'imprevedibilità naturale, mentre per il fotoperiodo è stato scelto un valore intermedio tra il valore minimo del mese di Marzo e il valore massimo del mese di Giugno. Inoltre in esperimenti pregressi organismi appartenenti a cloni W provenienti da risaia in tali condizioni hanno fatto osservare fenomeni di diversificazione nella risposta in termini di tipologia di uova prodotte.

Per quanto riguarda le pozze di Lampedusa la copertura vegetale è completamente assente in Cavallo Bianco, mentre i taxa tipici della macchia mediterranea caratterizzano le zone circostanti le pozze di Forbice P e Forbice C. Considerando che la definizione di PET assume la presenza di una

copertura vegetale bassa, omogenea e in buono stato possiamo affermare che la nostra stima del BIC e quindi della durata dell'idroperiodo è realistica se non addirittura in difetto per questi siti.

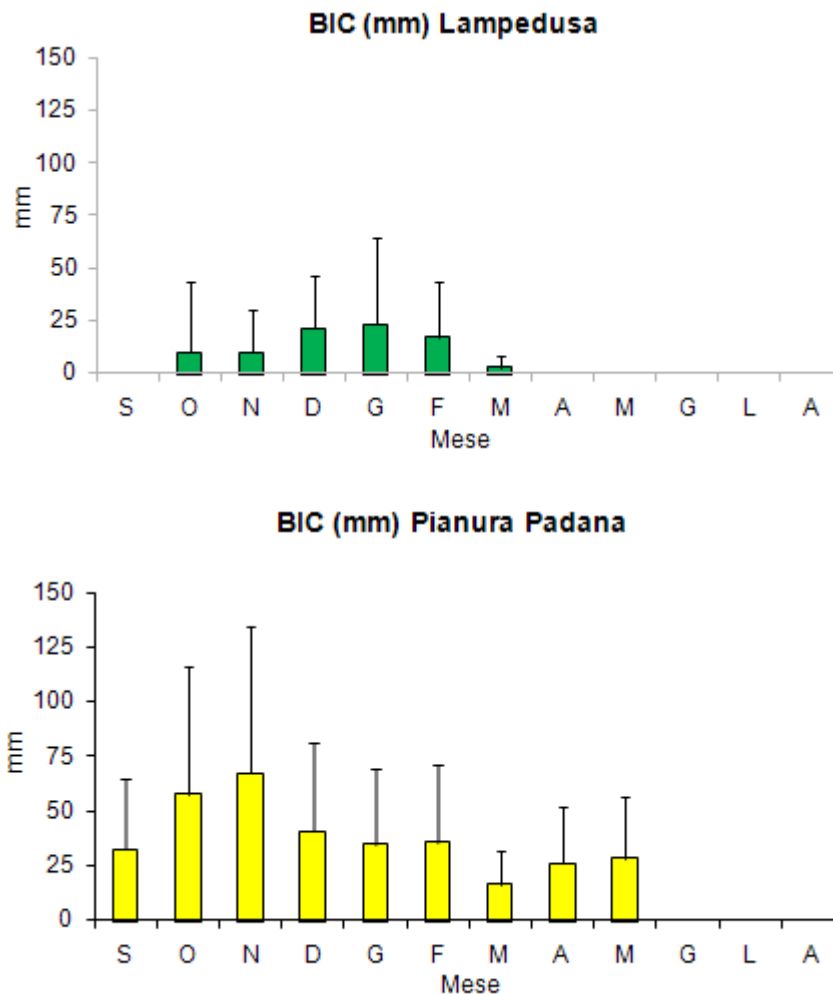
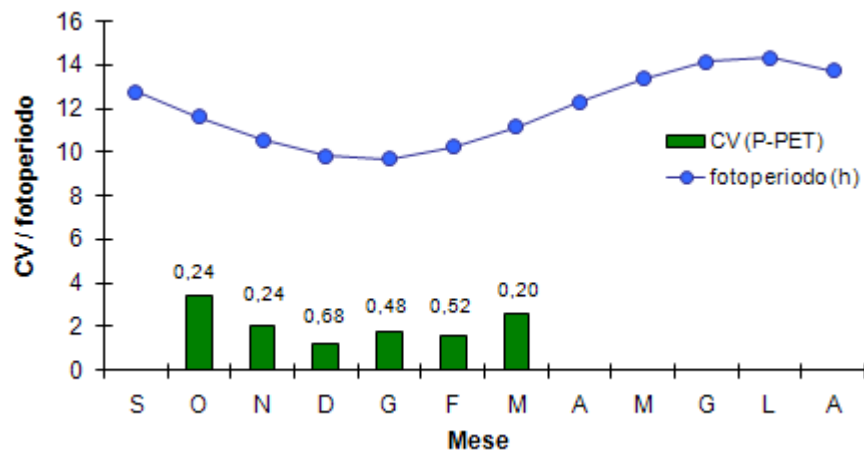


Figura 2.7– Stime medie mensili dei millimetri di pioggia accumulati (BIC) in una pozza. Le barre d'errore indicano la deviazione standard relativa ai mm di acqua che potenzialmente si accumulano nelle pozze di Lampedusa (calcolo sul periodo 1929-2007) e della Pianura Padana (calcolo sul periodo 2004-2008).

a.



b.

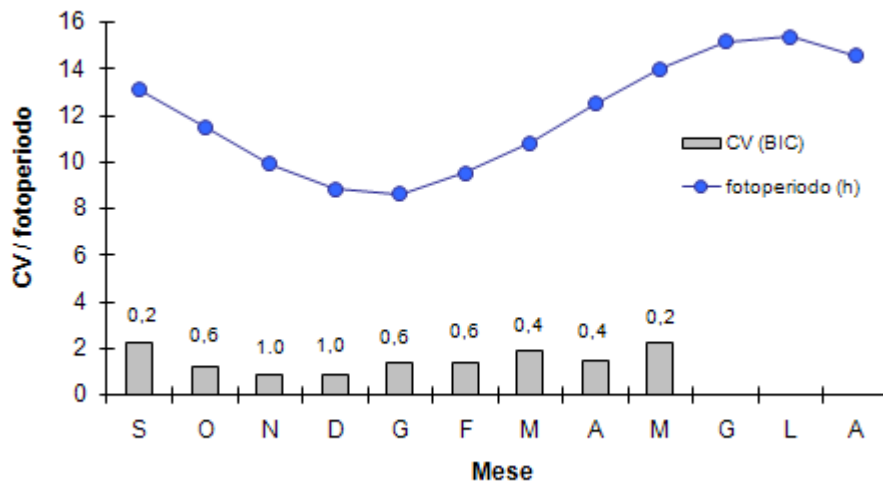


Figura 2.8 – Durata del periodo di luce giornaliero (ore di luce al giorno) e distribuzione del coefficiente di variazione dei millimetri di acqua accumulata mensilmente a Lampedusa (a: calcolo sul periodo 1929-2007) e nella Pianura Padana (b.: calcolo sul periodo 1993-2009). In numero riportato su ciascuna colonna dell'istogramma indica la probabilità (calcolata sugli anni per cui abbiamo a disposizione i dati di precipitazione e temperatura) che quel mese sia caratterizzato da un valore di BIC >0.

TRATTI MISURATI E ANALIZZATI

Durante gli esperimenti, gli organismi sono stati allevati e studiati in differenti condizioni sperimentali per più generazioni, al fine di rilevare e registrare le modificazioni di alcuni tratti del loro ciclo vitale. Per ciascuna generazione entro ciascuna popolazione appartenente a ciascuna linea evolutiva, le osservazioni sono state effettuate due volte a settimana e il livello dell'acqua nei pozzetti è stato mantenuto costante. Durante ogni osservazione è stata registrata la sopravvivenza delle femmine progeneratrici, segnalata la presenza/assenza di uova deposte ed infine contati e rimossi i nuovi nati. Le osservazioni sono durate fino al 230° giorno dalla nascita del primo nato di ciascuna generazione. Dopo questo intervallo di tempo le uova non schiuse e considerate vitali, ossia che avevano mantenuto un colore arancio brillante e forma regolare, sono state contate e classificate come uova durature.

Sul totale delle uova non durature prodotte (numero di piccoli prodotti) sono state conteggiate le quote di uova non durature a schiusa precoce ('early') e ritardata ('delayed'). Le prime si assume siano quelle uova che schiudono entro il 110° giorno dalla nascita della madre, le altre quelle che schiudono dopo il 110° e prima del 230° giorno dalla nascita della madre.

Per ogni femmina sono state registrate:

- età alla morte (sul totale delle femmine isolate),
- età alla morte (sul totale delle femmine riprodotte),
- età alla deposizione della prima covata (o età alla riproduzione, o tempo di sviluppo),
- tempo medio di generazione 1 (età della madre alla schiusa del suo primo uovo),
- tempo medio di generazione 50 (età della madre alla nascita del 50% dei suoi piccoli),
- tempo medio di generazione 100 (età della madre alla nascita del 100% dei suoi piccoli),
- lunghezza delle valve delle femmine adulte,
- larghezza delle valve delle femmine adulte,
- numero e percentuale di piccoli prodotti,
- percentuale delle uova non durature a schiusa precoce prodotte ('early'),
- percentuale delle uova non durature a schiusa ritardata prodotte ('delayed'),
- numero e percentuale di uova durature prodotte,
- numero totale di uova vitali prodotte.

I tempi medi di generazione sono stati così calcolati:

- TMG1: corrisponde al tempo intercorso tra la nascita della madre e il giorno in cui si osserva la prima schiusa;
- TMG50: corrisponde al tempo intercorso tra la nascita della madre e il giorno in cui la percentuale di schiusa cumulativa delle uova non durature (uova schiuse entro il giorno 230) raggiunge il 50%;

-TMG100: corrisponde al tempo intercorso tra la nascita della madre e il giorno in cui la percentuale di schiusa cumulativa delle uova non durature (uova schiuse entro il giorno 230) raggiunge il 100%;

Per ogni popolazione e ogni generazione è stato calcolato il tasso intrinseco di crescita (r) come proposto da Huey & Barrigan (2001). Tali autori in un'analisi demografica e sulla fitness di organismi ectotermi indicano come valida e applicabile la seguente approssimazione:

$$r = \ln R_0 / TMG$$

in cui:

- R_0 (tasso netto di riproduzione)
- TMG (tempo medio di generazione)

Nel nostro caso:

R_0 è stato calcolato come sommatoria delle forme giovanili nate entro 230° giorno di osservazione rispetto al numero di femmine isolate per popolazione per generazione. femmine isolate);

TMG è stato utilizzato il valore di TMG50.

Per ogni popolazione e ogni generazione è stata riportata la curva di schiusa delle uova non durature.

La variabilità del valore del tasso intrinseco di crescita (r) è stata calcolata utilizzando la tecnica di ricampionamento 'jackknife', implementando un algoritmo in R (versione 2.8). Tale tecnica permette di stimare la variabilità di r ricalcolandone il valore n volte (dove n è il numero di osservazioni, cioè di femmine per generazione per popolazione) escludendo una osservazione per volta dal dataset.

Per ciascuna femmina entro generazione ed entro popolazione è stato calcolato l'indice di equiripartizione (E) tra le tipologie di uova prodotte come:

$$E = (1 / \sum p_i^2) / 3$$

in cui:

- p_1 = proporzione di uova durature ('resting');
- p_2 = proporzione di uova non durature a schiusa precoce ('early');
- p_3 = proporzione di uova non durature a schiusa ritardata ('delayed').

L'indice E indica quanto è 'equa' la ripartizione del potenziale riproduttivo di un organismo tra i tre fenotipi possibili. Per ciascuna generazione, entro ciascun clone e popolazione è stato calcolato il valore medio (mediante funzione mean () in R (versione 2.8)) e la deviazione standard dell'indice E (mediante funzione sd () in R (versione 2.8)).

Per l'indice di equiripartizione (E) è stato calcolato il tasso di evoluzione (H) in termini di "differenze tra medie in unità di deviazione standard" come proposto da Gingerich (1993). Tale tasso si misura in "haldane", dal nome dell'autore che per primo propose di quantificare il tasso di evoluzione di un tratto in termini dell'ammontare di variazione (Haldane, 1937).

$$H = ((X_2/S_p) - (X_1/S_p)) / g$$

in cui:

- X_1 = valore medio del tratto al tempo 1;
- X_2 = valore medio del tratto al tempo 2;
- g = numero di generazioni che separano la popolazione all'istante 1 e la popolazione all'istante 2.
- S_p = deviazione standard 'pooled'

dove

$$S_p = (SS_1 + SS_2) / ((n_1 - 1) + (n_2 - 1))$$

in cui:

- SS_1 = deviazione standard del tratto della popolazione al tempo 1;
- SS_2 = deviazione standard del tratto della popolazione al tempo 2;
- n_1 = numero di individui al tempo 1;
- n_2 = numero di individui al tempo 2.

Tale parametro è stato calcolato soltanto in quegli esperimenti in cui sono state studiate almeno 3 generazioni successive. Sotto tale numero di generazioni risulterebbe impossibile fare inferenze sui processi di evoluzione rapida.

ANALISI STATISTICHE

Le medie dei tratti misurati sono state confrontate con ANOVA uni o multifattoriali testando le interazioni tra fattori. Nel caso dei fattori 'popolazione' e 'clone' è stata applicata un'ANOVA nested. L'analisi della varianza è stata effettuata mediante la funzione 'aov ()' disponibile in R (versione 2.8).

Nell'esperimento 4 è stato effettuato un test di covarianza ANCOVA utilizzando il tasso intrinseco di crescita come covariata, la generazione come variabile categorica e i principali tratti vitali come variabili continue (funzione lm() in R (versione 2.8)). Un'ulteriore ANCOVA è stata implementata utilizzando la generazione come covariata, il clone come variabile categorica e i tratti interessati vitali come variabili continue.

Nel caso di confronti a coppie è stato utilizzato il test t di Student servendosi della funzione 'pairwise.t.test ()' in R

Le curve di schiusa delle uova non durature sono state confrontate con il test di Kolmogorov-Smirnov, mediante la funzione 'ks.test ()' disponibile nel pacchetto 'stats' in R (versione 2.8).

CAPITOLO 3

ESPERIMENTO 1- Valutazione empirica preliminare dell'esistenza di una strategia di ripartizione del rischio connesso alla riproduzione.

OBIETTIVO E GIUSTIFICAZIONE DELL'ATTIVITA'

L'esistenza di una strategia di ripartizione del rischio è stata valutata analizzando linee partenogenetiche appartenenti a specie differenti (*H. incongruens*, *H. barbara* e una linea partenogenetica probabilmente ibrida tra le due) e popolazioni di diversa provenienza (risaie del nord-Italia e pozze temporanee di Lampedusa,). Lo studio dei tratti vitali in più generazioni successive, in particolare la produzione di varie tipologie di uova, dovrebbe consentire di valutare l'esistenza e descrivere la diffusione di una strategia riproduttiva di ripartizione del rischio di tipo diversified bet-hedging in specie diverse dello stesso genere ed entro la stessa specie (*H. incongruens*) confrontando popolazioni diverse provenienti da latitudini diverse e da habitat diversi. Gli organismi sono stati allevati in condizioni che non danno indicazione sulla possibile durata dell'idroperiodo. L'ipotesi principale è che la strategia di ripartizione del rischio si manifesti attraverso la produzione di uova di tipo diverso: durature, non durature a schiusa rapida e non durature a schiusa tardiva. In linee clonali provenienti da 5 popolazioni differenti sono state analizzate 6 generazioni successive.

MATERIALI E METODI

Il materiale di Lampedusa è stato ottenuto reidratando in laboratorio (4 Novembre 2008) sedimento essiccato campionato sull'isola di Lampedusa (Aprile 2006) nelle 3 diverse località (Cavallo Bianco, Vallone della Forbice C e Vallone della Forbice P) dove è noto si formino le pozze durante la stagione invernale. I sedimenti sono stati successivamente mantenuti in laboratorio sul davanzale di un'ampia finestra in modo da simulare temperatura e fotoperiodo naturali fino alla schiusa delle uova durature da cui si è originata la generazione sperimentale parentale (P).

In materiale proveniente dalla Pianura Padana è stato campionato nel Maggio 2008. Nella risaia di Budrione un primo campionamento è stato effettuato il 9 maggio 2008 a 3 giorni dall'inondamento (inizio dell'idroperiodo, giorno "0") e un secondo campionamento è stato effettuato il 16 maggio 2008 (Tab. 3.1.1). Al momento del primo campionamento la colonna d'acqua misurava circa 30 cm e la densità degli animali era molto bassa. Durante il secondo campionamento la colonna d'acqua misurava circa 10 cm (la risaia stava andando incontro ad un primo disseccamento previsto dalle pratiche di coltivazione del riso) e la popolazione raggiungeva densità elevatissime.

Nella risaia La Bigliana il campionamento è stato effettuato il 23 maggio 2008, a 8 giorni dall'inondamento. Al momento del campionamento la colonna d'acqua era di circa 30 cm e la densità degli animali molto bassa.

I campioni sono stati trasportati in laboratorio e sottoposti a sorting allo stereomicroscopio per isolare femmine ovigere di *H. incongruens* da utilizzare per gli esperimenti in laboratorio. Queste femmine, nate da uova durature, costituiscono la generazione parentale (P).

Tabella 3.1.1 – Dati relativi al campionamento nelle pozze temporanee di Lampedusa e nelle risaie del nord-Italia. (La risaia di Budrione (MO) è composta da 2 specchi d’acqua. La risaia de La Bigliana (RE) è invece composta da un unico specchio).

	<i>Lampedusa</i>			<i>Nord-Italia</i>		
	C. Bianco	Forbice P	Forbice C	Budrione 1	Budrione 2	Bigliana
<i>CAMPIONAMENTO 1</i>						
Data campionamento	16/04/2006	16/04/2006	16/04/2006	-	-	-
Profondità acqua	0 cm	0 cm	0 cm	-	-	-
Tipo di campione	fanghi secchi	fanghi secchi	fanghi secchi	-	-	-
Ora campionamento	15.00	15.00	15.00	-	-	-
Data reidratazione fanghi	04/11/2008	04/11/2008	04/11/2008	-	-	-
N° ostracodi isolati	48	48	32	-	-	-
<i>CAMPIONAMENTO 2</i>						
Data campionamento	-	-	-	09/05/2008	09/05/2008	-
Profondità acqua	-	-	-	25 cm	20 cm	-
Tipo di campione	-	-	-	organismi vivi	organismi vivi	-
Ora campionamento	-	-	-	15.00	16.00	-
Data inondamento risaia	-	-	-	06/05//08	06/05//08	-
N° ostracodi isolati	-	-	-	17	7	-
<i>CAMPIONAMENTO 3</i>						
Data campionamento	-	-	-	-	16/05/2008	-
Profondità acqua	-	-	-	-	circa 10 cm	-
Tipo di campione	-	-	-	-	organismi vivi	-
Ora campionamento	-	-	-	-	15.00	-
Data inondamento risaia	-	-	-	-	06/05//08	-
N° ostracodi isolati	-	-	-	-	48	-
<i>CAMPIONAMENTO 4</i>						
Data campionamento	-	-	-	-	-	23/05/2008
Profondità acqua	-	-	-	-	-	30 cm
Tipo di campione	-	-	-	-	-	organismi vivi
Ora campionamento risaia	-	-	-	-	-	16.00
Data inondamento	-	-	-	-	-	15/05/2008
N° ostracodi isolati	-	-	-	-	-	16

Per l’allestimento della generazione parentale sono state utilizzate: 48 femmine provenienti da Cavallo Bianco, 48 femmine provenienti da Vallone della Forbice P, 32 femmine provenienti da Vallone della Forbice C, 58 femmine provenienti da Budrione e 16 femmine provenienti da La Bigliana (Tabella 3.1.2). Le femmine della generazione parentale, provenienti dalle diverse popolazioni sono state isolate in piastre multipozzetto.

Tabella 3.1.2 – Per ciascuna popolazione è indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova e il numero di femmine che hanno prodotto almeno un piccolo.

	POPOLAZIONE	N	Femmine con uova	Femmine con piccoli
RISAIA	<i>Budrione</i>	58	52	50
	<i>La Bigliana</i>	16	12	13
POZZE	<i>Cavallo Bianco</i>	48	46	39
	<i>Forbice P</i>	48	34	27
	<i>Forbice C</i>	32	20	15

Procedure sperimentali

I figli della generazione parentale (P) sono stati contati e rimossi e, con i primi nati (48-72 h di età) è stata allestita la generazione F1. Allo stesso modo con i primi nati della generazione F1 è stata allestita la F2 e così via fino alla generazione F5. Lynch (1985) afferma che due generazioni sono necessarie al fine di eliminare gli effetti materni. Le prime due generazioni sono state considerate generazioni di acclimatazione che dovrebbero servire per eliminare l'effetto materno derivante dal fatto che la generazione parentale è nata da uova durature ed ha trascorso parte della vita in ambiente naturale. A partire dalla generazione 3 l'ipotesi è quella di osservare l'effetto delle condizioni sperimentali una volta eliminati i retaggi parentali legati alla schiusa da uova durature e all'accrescimento in natura.

Le condizioni sperimentali dovrebbero ricreare le condizioni di temperatura media e fotoperiodo dei mesi in cui è massima l'imprevedibilità dell'idroperiodo nelle diverse aree di provenienza degli animali organismi:

.per gli organismi di Lampedusa: 16°C e fotoperido 12:12 L:B;

.per gli organismi del nord-Italia a 24°C e fotoperiodo 12:12 L:B.

L'esperimento iniziato il 15 luglio 2008 è terminato il 2 gennaio 2010.

Per ciascuna femmina sono stati registrati ed analizzati i tratti descritti nel capitolo 2.

RISULTATI

Per le linee evolutive provenienti dalle pozze di Lampedusa non è stato possibile completare l'analisi delle generazioni fino alla F5. La generazione F3 di Cavallo Bianco non ha prodotto un numero di piccoli vitali sufficiente per allestire la generazione successiva così come la generazione F4 di Vallone della Forbice P e di Vallone della Forbice C (Tab. 3.1.4). Quindi, per gli organismi di Lampedusa, si è deciso di riportare solo i dati relativi a 4 generazioni: dalla parentale (P) alla F3.

Per i cloni provenienti dalle risaie del Nord Italia è stato possibile seguire 6 generazioni successive, dalla parentale (P) alla F5 (Tab. 3.1.3).

I tratti vitali delle diverse linee evolutive (*H. incongruens*, *H. barbara*, *H. sp*) sono simili, anche se presentano alcune differenze interessanti (Tab. 3.1.3, Tab. 3.1.4 e Fig. 3.1.6, 3.1.7). Per esempio, l'età alla morte (28-77 giorni) e l'età alla riproduzione (27-41 giorni) di *H. incongruens* variano entro generazione, ma i valori sono sempre inferiori rispetto a quelli osservati in *H. sp* (età alla morte 90-120 giorni, età alla riproduzione 41-56 giorni) e in *H. barbara* (età alla morte 91-157 giorni, età alla riproduzione 43-97 giorni). Emergono differenze anche tra femmine della stessa specie, *H. incongruens*, provenienti da diversa latitudine: femmine di Cavallo Bianco (Lampedusa) mostrano età alla morte (45-77 giorni) ed età alla riproduzione (28-41 giorni) più elevate rispetto a femmine provenienti dalle risaie (età alla morte 28-52 giorni, età alla riproduzione 16-29 giorni). Le femmine di *H. incongruens* provenienti dalla risaia hanno un tasso intrinseco di crescita (r) che, in generale, è di un ordine di grandezza superiore a quello osservato per le femmine di Lampedusa, sia considerando la stessa specie che considerando specie diverse.

Nel caso delle popolazioni della Pianura Padana il numero e la percentuale di femmine che depongono tutte le tipologie di uova aumenta con la generazione. Tale aumento corrisponde ad una diminuzione del numero di cloni studiati per ciascuna generazione. A Lampedusa non emerge un simile andamento all'aumentare della generazione e al ridursi del numero delle linee clonal

Nelle 5 popolazioni studiate, oltre alle differenze nei valori medi si osservano differenze nelle variabilità dei tratti (in termini di deviazione standard). Tra le femmine di Lampedusa la variabilità è generalmente maggiore che tra le femmine delle risaie della Pianura Padana (età alla morte, tempo di sviluppo, tempo medio di generazione) (Tab. 3.1.3, 3.1.4).

Negli organismi di risaia la percentuale di uova durature tende ad aumentare con la generazione mentre nelle femmine di Lampedusa un trend simile si osserva in Cavallo Bianco ma non in Vallone della Forbice P e C (Fig. 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 e 3.1.5).

In tutte le linee evolutive e le popolazioni studiate vi sono evidenze di polifenismo nelle uova: le femmine clonali producono sia uova durature, sia uova non durature a schiusa precoce (che schiudono entro il giorno 110°) che uova non durature a schiusa ritardata (che schiudono oltre il giorno 110°).

Tabella 3.1.3 – Per ognuna delle 6 generazioni (P, F1, F2, F3 F4, F5) delle popolazioni di Budrione e La Bigliana sono indicati la numerosità del campione e i valori medi, con la relativa deviazione standard (DEV.ST) dei tratti misurati. E' indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R), il numero di femmine che hanno dato origine ad almeno un piccolo e il numero di cloni potenziali presenti. L'età media alla morte (in giorni) è stata calcolata sia sul totale delle femmine isolate (E1) sia sul totale delle femmine che si sono riprodotte (E2). Il tempo medio di generazione è stato calcolato come: numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la nascita della sua prima figlia (TMG1), numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 50% delle uova non durature prodotte (TMG50) e numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 100% delle uova non durature prodotte (TMG100).

	Nord Italia											
	Budrione						Bigliana					
	P	1°	2°	3°	4°	5°	P	1°	2°	3°	4°	5°
Femmine isolate (N)	58	39	42	47	69	47	16	57	48	48	48	45
Femmine con uova (R)	52	16	10	38	59	34	12	23	32	35	46	35
Femmine con piccoli (r)	48	15	10	35	51	32	12	21	29	34	45	33
R/N (%)	0,9	0,4	0,2	0,8	0,9	0,7	0,8	0,4	0,7	0,7	1,0	0,8
N° cloni	58	10	7	3	2	2	16	12	6	3	3	2
Età alla morte 1 (E1)	27,6	30,5	27,6	40,4	45,5	46,5	36,4	35,0	38,3	41,6	44,3	46,8
DEV.ST	2,86	14,19	13,39	10,61	13,72	15,44	7,88	14,58	17,70	15,59	10,42	16,39
Età alla morte 2 (E2)	27,8	36,6	36,2	42,4	48,5	51,9	37,2	42,8	46,6	49,0	45,0	51,7
DEV.ST	2,73	16,10	13,67	8,29	11,65	12,27	8,38	11,96	14,81	10,18	9,81	14,79
Età alla riproduzione	17,2	22,8	23,5	20,9	22,2	28,7	15,5	28,3	23,4	22,3	20,0	25,3
DEV.ST	2,65	7,28	3,95	5,12	4,08	5,46	3,93	6,79	6,26	5,16	4,02	4,98
Tempo generazione1	26,0	37,2	42,8	32,3	48,5	68,5	21,2	51,2	34,9	38,2	55,9	43,9
DEV.ST	21,71	15,47	17,82	13,42	27,33	37,67	4,15	20,11	12,59	13,37	24,13	19,48
Tempo generazione50	29,6	41,0	70,4	56,5	83,6	105,1	14,9	61,7	57,3	57,6	77,9	59,7
DEV.ST	25,60	17,94	21,57	60,48	37,67	40,17	5,91	18,20	18,59	17,81	30,29	34,48
Tempo generazione100	46,6	50,2	85,9	115,0	159,6	157,4	16,5	71,9	85,8	133,0	125,0	120,2
DEV.ST	39,46	19,54	26,46	60,48	52,77	41,73	6,41	23,70	29,70	47,63	41,74	54,74
Lunghezza	1,6	1,3	1,2	1,3	1,3	1,2	1,5	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2
DEV.ST	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,15	0,05	0,14	0,08	0,08	0,10
Larghezza	0,9	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
DEV.ST	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,09	0,04	0,07	0,07	0,06	0,07
Piccoli	5,5	5,1	21,4	26,5	30,6	13,6	5,2	8,3	25,8	37,5	13,4	24,9
DEV.ST	6,81	3,70	27,65	20,89	24,65	11,83	3,24	16,85	27,00	29,89	11,68	20,28
Uova durature	0,6	0,1	0,7	1,0	6,9	5,0	0,3	1,8	2,1	2,5	5,9	4,3
DEV.ST	1,73	0,25	2,16	1,82	7,42	5,21	0,85	3,45	3,64	4,44	7,26	7,68
Uova totali	6,0	5,2	22,1	27,6	37,5	18,6	5,5	10,1	27,9	40,0	19,3	29,2
DEV.ST	6,78	3,62	28,71	21,23	26,45	13,45	2,99	18,32	27,56	30,87	14,72	21,47
Tasso intr. di crescita (r)	0,22	0,12	0,13	0,21	0,15	0,09	0,20	0,10	0,19	0,19	0,11	0,15
DEV.ST	0,062	0,058	0,051	0,063	0,069	0,057	0,031	0,113	0,073	0,073	0,074	0,051
Indice di equiripartizione (E)	0,45	0,34	0,40	0,44	0,59	0,98	0,37	0,48	0,44	0,44	0,73	0,52
DEV.ST	0,003	0,000	0,011	0,003	0,005	0,031	0,002	0,023	0,004	0,004	0,013	0,006

Tabella 3.1.4 – Tabella dei tratti vitali delle femmine delle pozze temporanee di Lampedusa. Per ognuna delle 4 generazioni (P, F1, F2, F3) analizzate per le femmine di Cavallo Bianco (cb), Forbice P (fp) e Forbice C (fc) sono indicati la numerosità del campione e i valori medi, con la relativa deviazione standard (DEV.ST) dei tratti misurati. E' indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R), il numero di femmine che hanno dato origine ad almeno un piccolo e il numero di cloni potenziali presenti. Il rapporto R/N indica la sopravvivenza alla riproduzione delle femmine isolate. L'età media alla morte (in giorni) è stata calcolata sia sul totale delle femmine isolate (E1) sia sul totale delle femmine che si sono riprodotte (E2).). Il tempo medio di generazione è stato calcolato come: numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la nascita della sua prima figlia (TMG1), numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 50% delle uova non durature prodotte (TMG50) e numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 100% delle uova non durature prodotte (TMG100).

	Lampedusa											
	Cavallo bianco				Forbice P				Forbice C			
	P	F1	F2	F3	P	F1	F2	F3	P	F1	F2	F3
Femmine isolate (N)	48	48	37	18	48	47	42	48	32	48	48	48
Femmine con uova (R)	46	16	15	11	34	22	30	42	20	44	44	31
Femmine con piccoli	39	16	12	8	27	16	30	33	15	44	44	31
R/N (%)	1	0,3	0,4	0,6	0,7	0,5	0,7	0,9	0,6	0,9	0,9	0,6
N° cloni	48	13	2	1	48	16	8	4	32	5	4	3
Età alla morte 1 (E1)	73,2	47,3	50,1	41,6	116,6	76,5	70,6	93,1	144,6	109,4	90,6	82
DEV.ST	22,88	19,47	15,15	8,41	19,21	41,39	37,37	31,31	28,87	21,42	22,49	46,79
Età alla morte 2 (E2)	77,1	62,8	59,3	44,8	120,4	111,6	90,1	103,2	157,1	104,3	90,9	113,5
DEV.ST	20,08	10,91	11,87	7,82	13,39	24,38	18,11	16,34	20,22	29,53	24,96	16,69
Età alla riproduzione (T)	39,1	41,3	35,3	27,8	56,4	55,7	40,8	47	97,2	47,1	42,9	43,5
DEV.ST	8,09	8,92	5,14	6,34	12,78	9,61	10,07	7,57	17,34	11,86	10,43	9,32
Tempo generazione 1 (TMG1)	103,3	101,4	94,6	56,6	75,5	73	72,9	92	130,3	71,6	61,1	75,6
DEV.ST	56,97	63,59	47,58	22,14	12,44	13,98	48,6	51,37	52,08	39,53	29,16	24,35
Tempo generazione 50 (TMG50)	133,3	105,5	119,6	79,6	86,6	85,7	150,6	138,6	149,5	98,2	88,5	103,9
DEV.ST	63,68	58,19	55,54	21,33	11,59	26,80	73,64	63,07	48,33	46,75	31,31	27,63
Tempo generazione 100 (TMG100)	186,1	129,6	139,3	115,8	149,0	115,3	230,8	196,6	198,4	152,7	135,3	148,2
DEV.ST	63,91	64,58	59,73	61,05	69,28	62,56	58,67	52,39	53,56	62,61	52,47	38,50
Lunghezza	1,2	1,2	1,2	1,4	1,4	1,4	1,5	1,4	1,6	1,3	1,4	1,5
DEV.ST	0,1	0,04	0,07	0,05	0,06	0,09	0,07	0,31	0,15	0,43	0,42	0,09
Larghezza	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8
DEV.ST	0,06	0,03	0,05	0,06	0,04	0,06	0,07	0,08	0,1	0,25	0,25	0,06
Piccoli	7,3	5,7	8,6	3,7	6,9	3,3	16,6	11	12,3	7,1	18,8	24,6
DEV.ST	9,18	12,43	12,44	4,22	7,99	3,85	14,94	8,71	14,78	6,53	15,24	21,76
Uova durature	7,2	2,9	3,8	9,7	6,4	20,7	4	4,2	12,6	3,3	0,5	0,1
DEV.ST	14,46	3,96	7,98	16,81	7,89	20,02	7,85	3,61	16,28	5,53	1,91	0,34
Uova totali	14,6	8,6	12,4	13,4	13,3	23,9	20,6	15,2	24,9	10,4	19,2	24,8
DEV.ST	17,4	12,18	12,66	17,13	13,17	21,99	18,75	9,19	22,97	8,83	15,04	21,68
Tasso intrinseco di crescita (r)	0,04	0,04	0,04	0,05	0,06	0,05	0,04	0,04	0,05	0,06	0,08	0,06
DEV.ST	0,032	0,025	0,022	0,017	0,009	0,012	0,025	0,025	0,017	0,025	0,020	0,018
Indice di equipartizione (E)	0,9	0,8	1,0	0,6	0,7	0,4	0,9	1,0	0,9	0,9	0,4	0,6
DEV.ST	0,04	0,18	0,12	0,13	0,03	0,01	0,04	0,02	0,06	0,02	0,00	0,01

Tabella 3.1.5 – Per ciascuna popolazione è indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R), il numero di femmine che hanno prodotto tutte e tre le tipologie di uova, le femmine che hanno prodotto solo uova durature, le femmine che hanno prodotto solo uova non durature a schiusa precoce ('early') e le femmine che hanno prodotto solo uova non durature a schiusa tardiva ('delayed').

	Budrione						Bigliana					
	P	F1	F2	F3	F4	F5	P	F1	F2	F3	F4	F5
Femmine isolate (N)	58	39	42	47	69	47	16	57	48	48	48	45
Femmine con uova (R)	52	16	10	38	59	34	12	23	32	35	46	35
R/N (%)	0,9	0,4	0,2	0,8	0,9	0,7	0,8	0,4	0,7	0,7	1,0	0,8
Tutte le tipologie	1	0	1	6	35	22	0	0	4	12	25	9
%	1,9	0,0	10,0	15,8	59,3	64,7	0,0	0,0	12,5	34,3	54,3	25,7
Solo uova durature	4	1	0	2	7	1	0	4	1	1	0	1
%	7,7	6,3	0,0	5,3	11,9	2,9	0,0	17,4	3,1	2,9	0,0	2,9
Solo uova non durature 'early'	44	10	8	12	1	0	11	16	11	7	6	7
%	84,6	62,5	80,0	31,6	1,7	0,0	91,7	69,6	34,4	20,0	13,0	20,0
Solo uova non durature 'delayed'	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%	1,9	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

	Lampedusa											
	Cavallo bianco				Forbice P				Forbice C			
	P	F1	F2	F3	P	F1	F2	F3	P	F1	F2	F3
Femmine isolate (N)	48	48	37	18	48	47	42	48	32	48	48	48
Femmine con uova (R)	46	16	15	11	34	22	30	42	20	44	44	31
R/N (%)	1,0	0,3	0,4	0,6	0,7	0,5	0,7	0,9	0,6	0,9	0,9	0,6
Tutte le tipologie	8	2	0	2	10	3	9	20	8	13	2	3
%	17,4	12,5	0,0	18,2	29,4	13,6	30,0	47,6	40,0	29,5	4,5	9,7
Solo uova durature	3	2	3	2	6	4	0	1	4	3	0	0
%	6,5	12,5	20,0	18,2	17,6	18,2	-	2,4	20,0	6,8	-	-
Solo uova non durature 'early'	4	3	4	5	9	2	2	2	2	11	18	4
%	8,7	18,8	26,7	45,5	26,5	9,1	6,7	4,8	10,0	25,0	40,9	12,9
Solo uova non durature 'delayed'	0	1	3	0	0	1	0	0	1	1	1	1
%	-	6,3	20,0	-	-	4,5	-	-	5,0	2,3	2,3	3,2

Il polimorfismo varia tra popolazioni e tra generazioni (Fig. 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5). L'indice di equiripartizione tende ad aumentare con il procedere della generazione soprattutto nel caso di *H. incongruens*, e, in alcuni casi è pari a 1, valore a cui corrisponde la ripartizione massima del potenziale riproduttivo. Ne sono esempio i casi delle generazioni F5 di Budrione (E=0,98), F2 di Cavallo Bianco (E=0,99) e F3 di Vallone della Forbice P (E=0,98) (Fig 3.1.8). Le generazioni con valore massimo di E (che comporta una quota di uova non durature a schiusa ritardata intorno al 30%) variano a seconda della popolazione: F5 per Budrione E=0,98; F4 per la Bigliana E= 0,73; F2 per Cavallo Bianco E=0,99; F3 per Vallone della Forbice P E=0,98 e F1 per Vallone della Forbice C E=0,89. Nelle popolazioni e nelle generazioni con basso valore di E ($E < 0,5$) si osserva una generale preponderanza di uova non durature a schiusa precoce (es P, F1, F2, F3 di Budrione e Bigliana e F2 di Vallone della Forbice C) o di uova durature (es F1 di Vallone della Forbice P).

La dinamica di schiusa delle uova non durature (Fig. 3.1.9, 3.1.10, 3.1.11, 3.1.12, 3.1.13), cambia in modo significativo con le generazioni entro le diverse popolazioni (Tab. 3.1.6). Ad esempio nella popolazione di Budrione il tempo medio di generazione alla schiusa del 100% delle uova (TMG100) aumenta con la generazione (Tab 3.1.3, Fig 3.1.6); si osservano schiuse prevalentemente precoci con 1 (P, F3) o 2 picchi (F1, F2, F4) e soltanto alla F5 si osserva un picco di schiusa tardivo. Nella popolazione de La Bigliana si osservano schiuse prevalentemente precoci (le schiuse ritardate non superano mai l'11% delle schiuse totali) (Fig. 3.1.2) e anche in questo caso il TMG100 aumenta con la generazione (Tab 3.1.3; Fig 3.1.6).

Per quanto riguarda gli animali di Lampedusa nella popolazione di Cavallo Bianco si osservano schiuse tardive in tutte le generazioni ad eccezione della F3. In questo caso il TMG100 diminuisce al passare delle generazioni (Tab 3.1.5; Fig 3.1.7). In Forbice P, invece, il TMG100 tende ad aumentare con le generazioni e si registrano schiuse tardive abbinate a picchi di schiusa precoce (Tab 3.1.5; Fig 3.1.7). In Forbice C gli organismi anticipano inizio e fine della dinamica di schiusa al passare delle generazioni (TMG100 e TMG1 diminuiscono al passare delle generazioni) (Tab 3.1.5; Fig 3.1.7).

In Figura 3.1.14 sono riportati i valori del tasso di evoluzione (H) del tratto E per le generazioni studiate. Il valore di $\log H$ tende a crescere dalla generazione parentale alla F2 per le femmine di Cavallo bianco, diminuisce in Forbice P, mentre non si osservano trend particolari in Forbice C. Nelle popolazioni di Budrione e Bigliana i valori di $\log H$ rimangono relativamente costanti al passare delle generazioni.

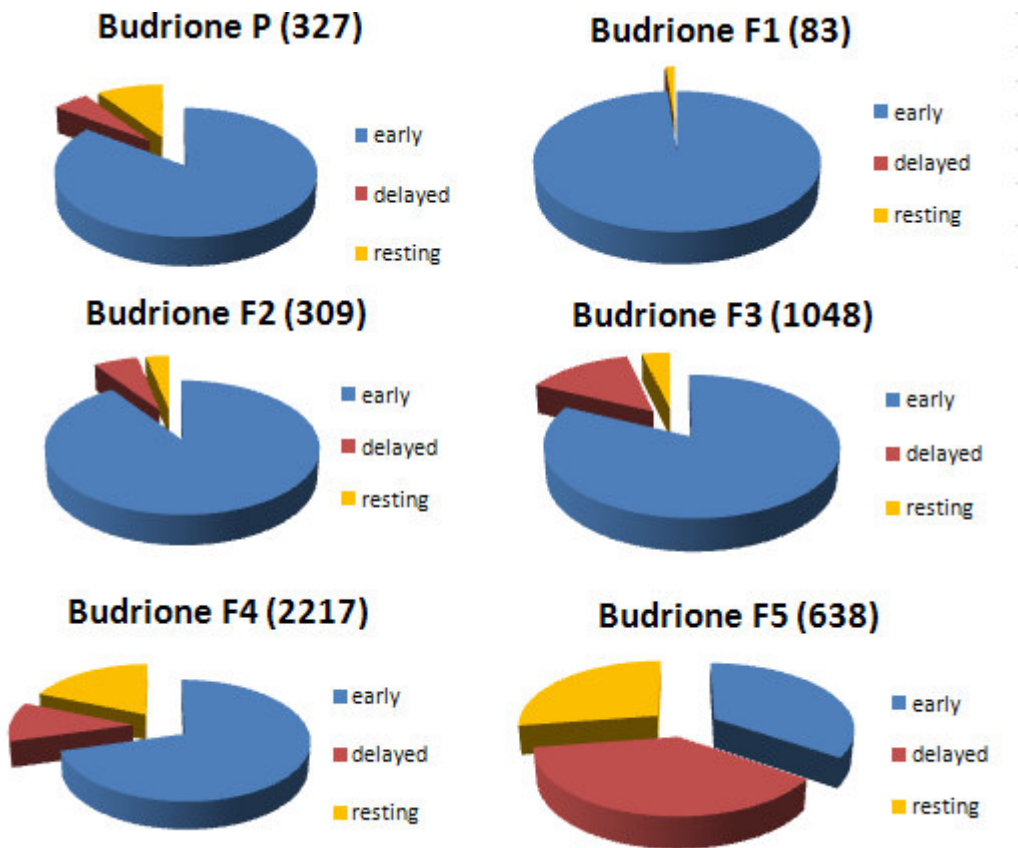


Figura 3.1.1 – Proporzioe delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione di Budrione (nord Italia) per le generazioni P, F1, F2, F3, F4, F5. E’ indicata la popolazione, la generazione e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte per generazione.

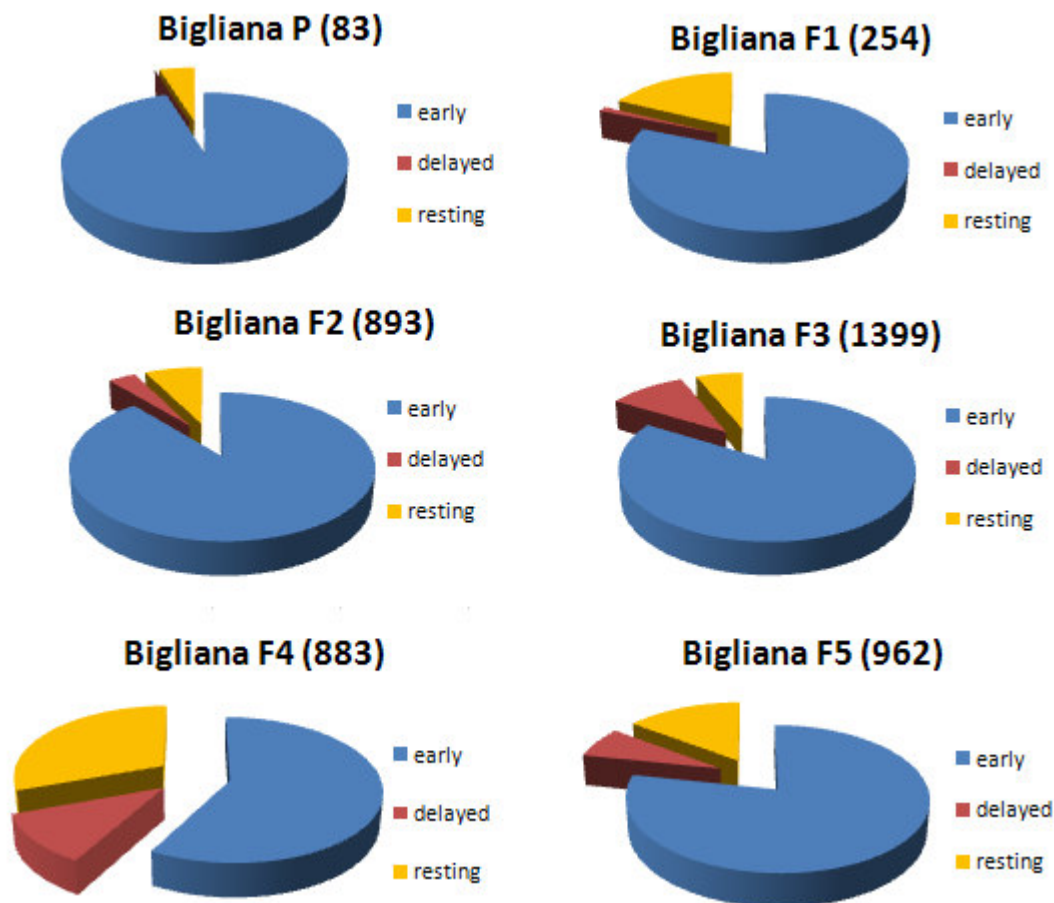


Figura 3.1.2 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione de La Bigliana (nord Italia) per le generazioni P, F1, F2, F3, F4, F5. E’ indicata la popolazione, la generazione e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte per generazione.

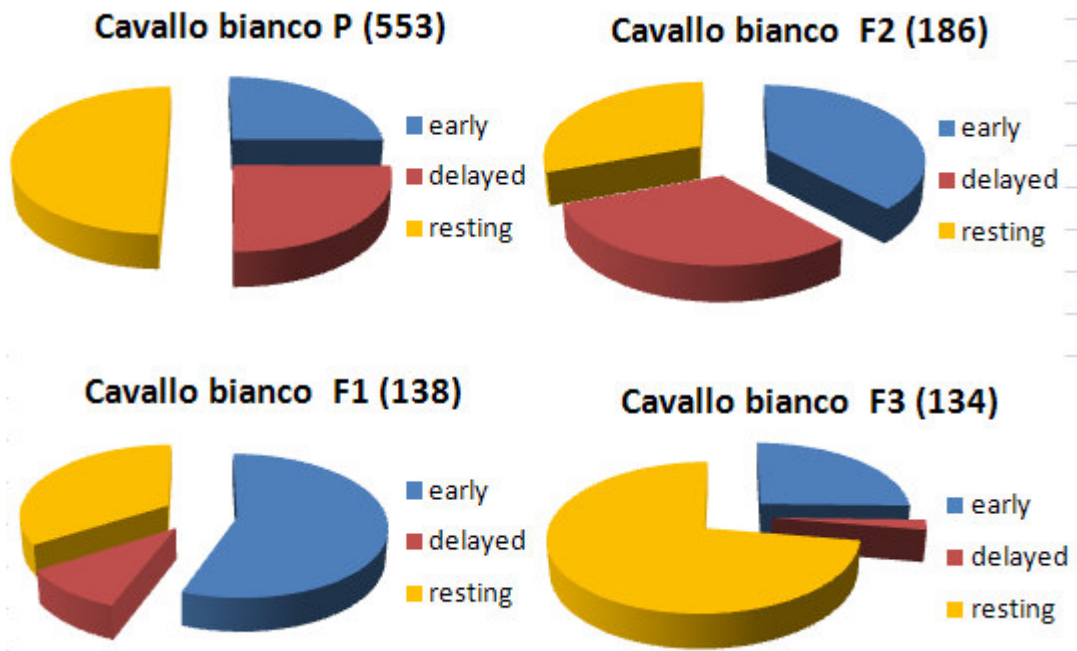


Figura 3.1.3 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione di Cavallo Bianco (Lampedusa) per le generazioni P, F1, F2, F3. E’ indicata la popolazione, la generazione e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte per generazione.

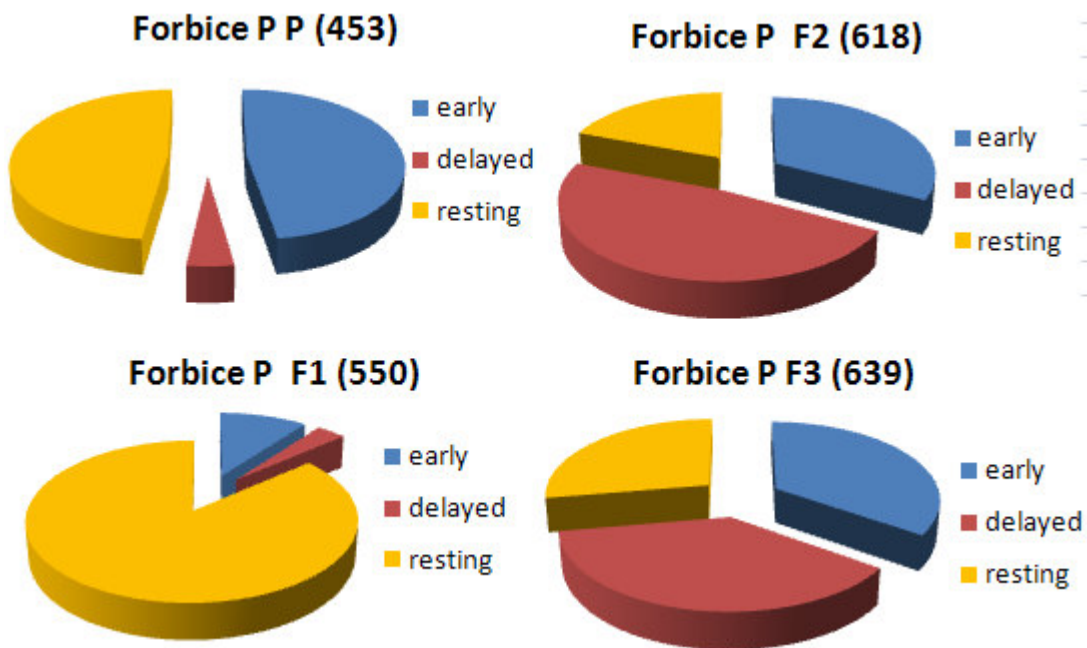


Figura 3.1.4 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *Heterocypris* sp., forma ibrida della popolazione di Forbice P (Lampedusa) per le generazioni P, F1, F2, F3. E’ indicata la popolazione, la generazione e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte per generazione.

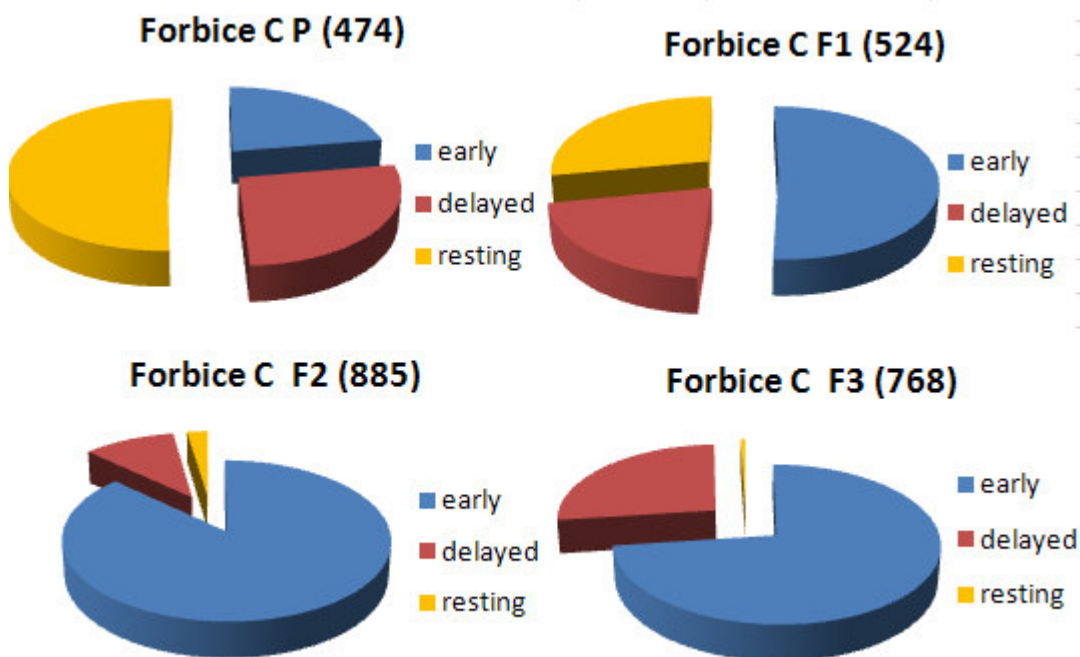


Figura 3.1.5 – Proporzione delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine partenogenetiche di *H. barbara* della popolazione di Forbice C (Lampedusa) per le generazioni P, F1, F2, F3. E’ indicata la popolazione, la generazione e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte per generazione.

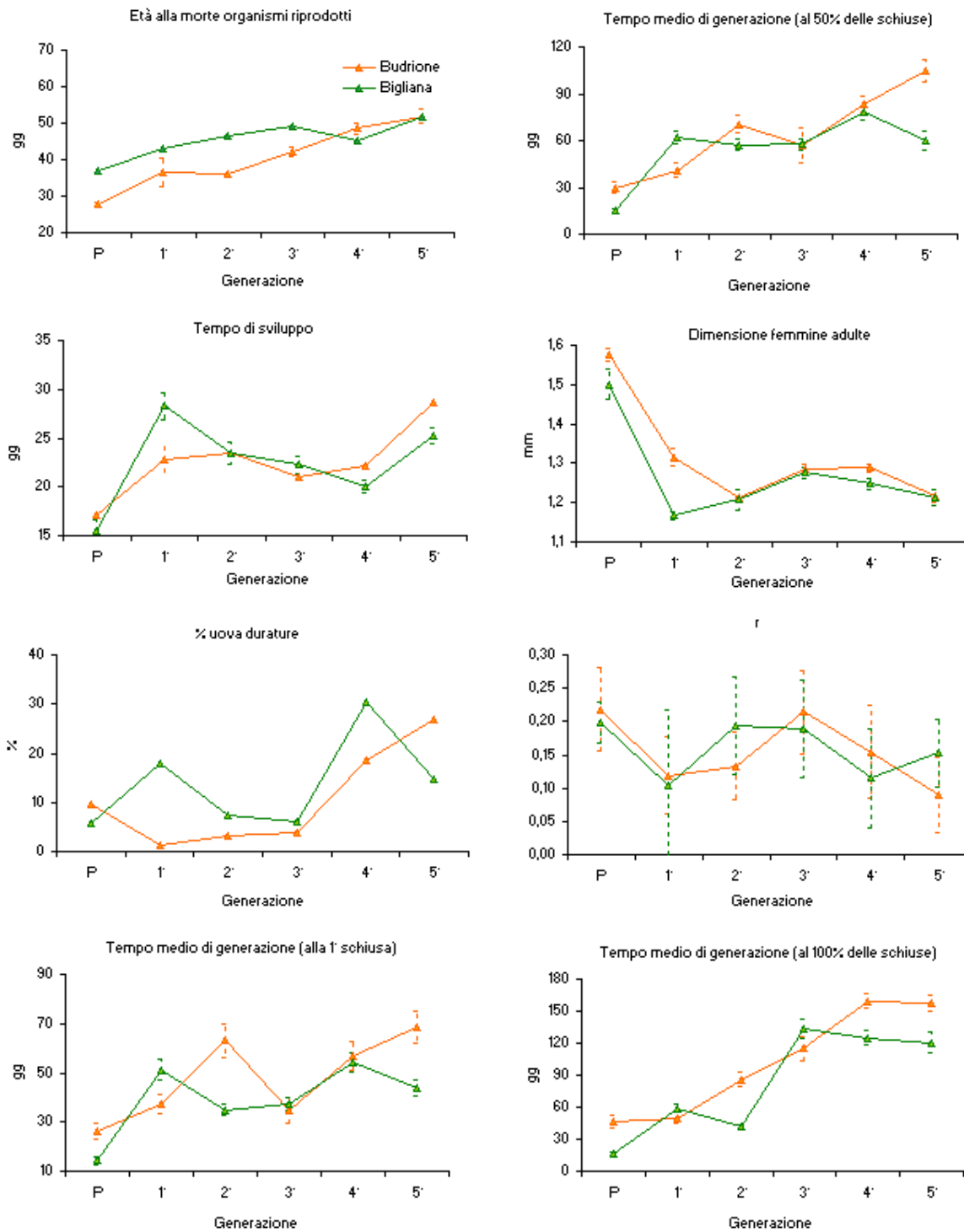


Figura 3.1.6 – Principali tratti vitali misurati per 6 generazioni successive (P, F1, F2, F3, F4, F5) nelle 2 diverse popolazioni provenienti da altrettante risaie del nord Italia (Budrione, La Bigliana). I tratti riportati in figura sono: età alla morte organismi riprodotti, Dimensione femmine adulte, tempo di sviluppo, percentuale uova durature, tempo medio di generazione (TMG1, TMG50, TMG100), tasso intrinseco di crescita misurato a 230 giorni (r).

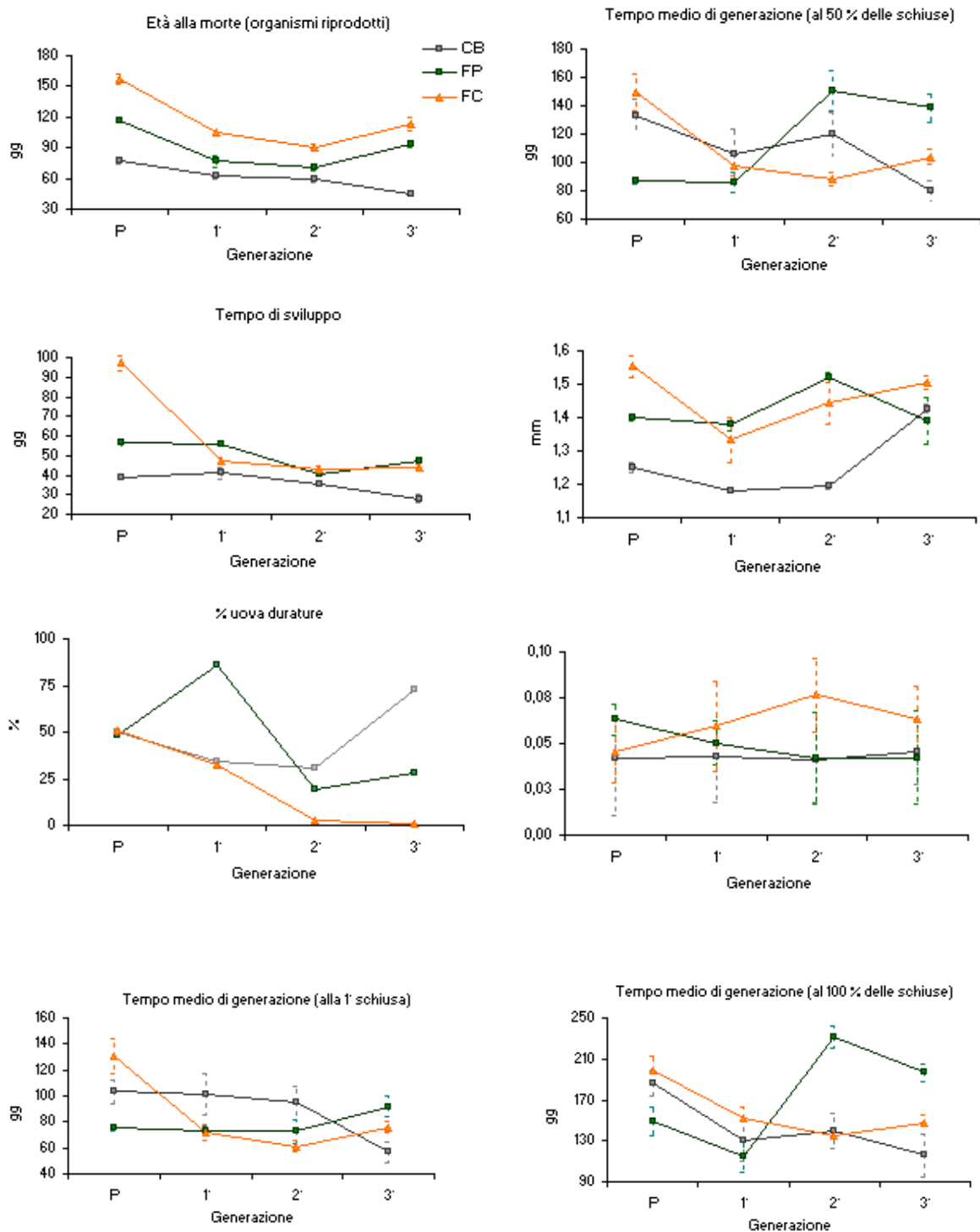
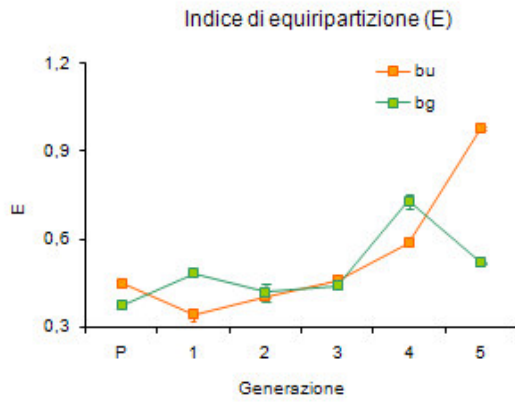


Figura 3.1.7 – Principali tratti vitali misurati per 4 generazioni successive (P, F1, F2, F3) nelle 3 diverse popolazioni provenienti dall’isola di Lampedusa (Cavallo bianco, Forbice P, Forbice C). I tratti riportati in figura sono: età alla morte organismi riprodotti, dimensione femmine adulte, tempo di sviluppo, percentuale uova durature, tempo medio di generazione (TMG1, TMG50, TMG100), tasso intrinseco di crescita misurato a misurato a 230 giorni (r).

a.



b.

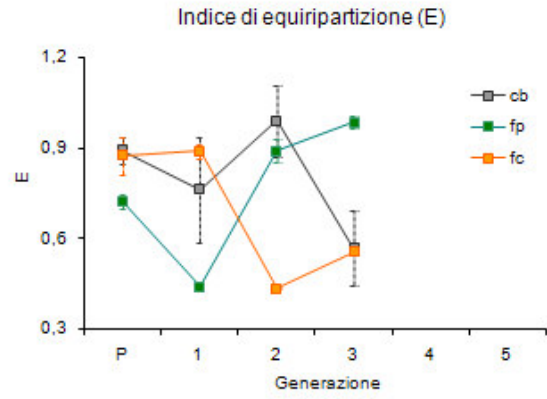


Figura 3.1.8 – Indice di equiripartizione (E). a. Popolazioni provenienti da risaie del nord Italia (Budrione (bu), La Bigliana (bg)). b. Popolazioni provenienti da pozze temporanee dell'isola di Lampedusa (Cavallo bianco (cb), Forbice P (fp), Forbice C (fc)).

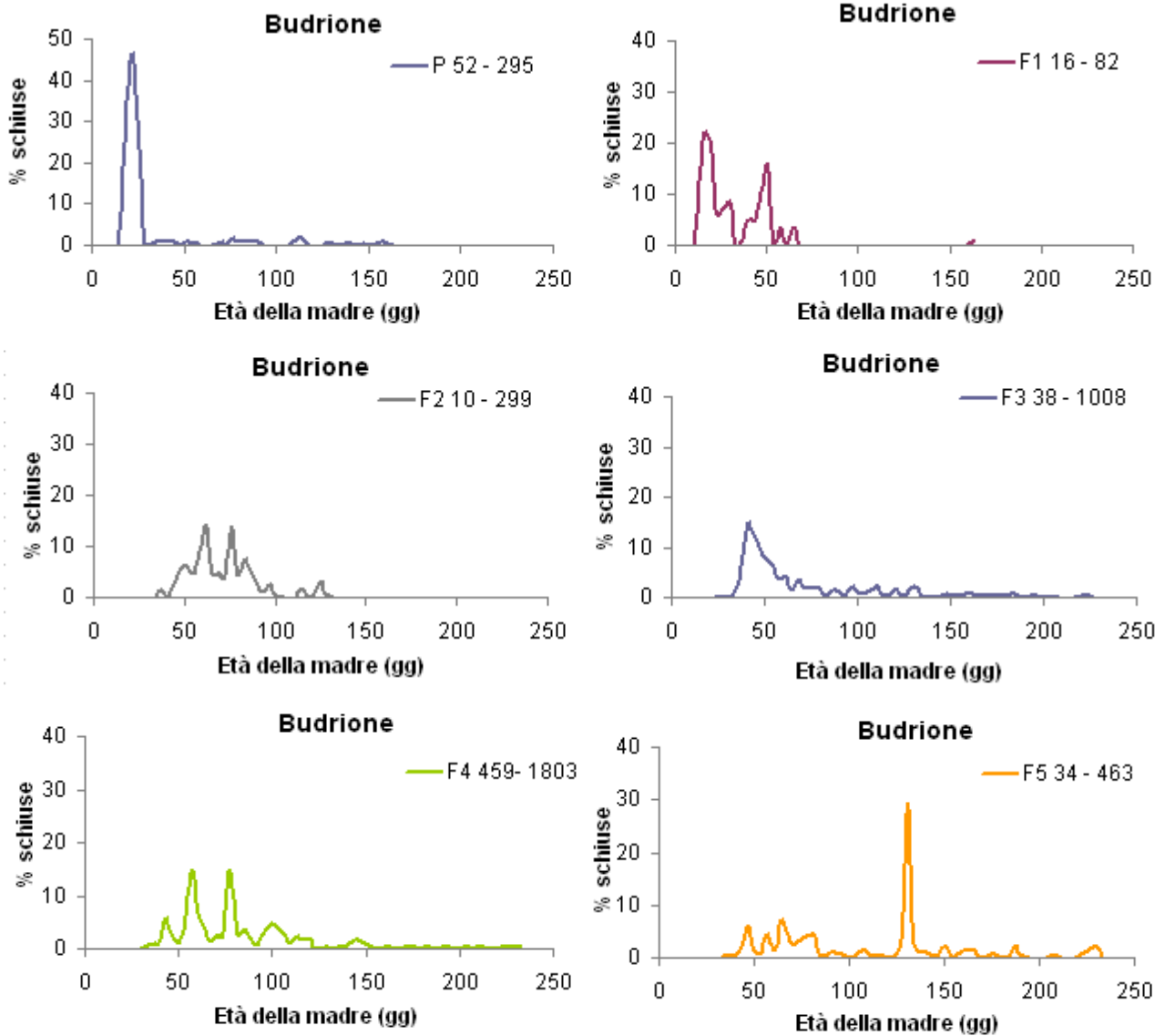


Figura 3.1.9 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni P, F1, F2, F3 degli organismi isolati e provenienti dalla popolazione di Budrione (Nord- Italia). In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

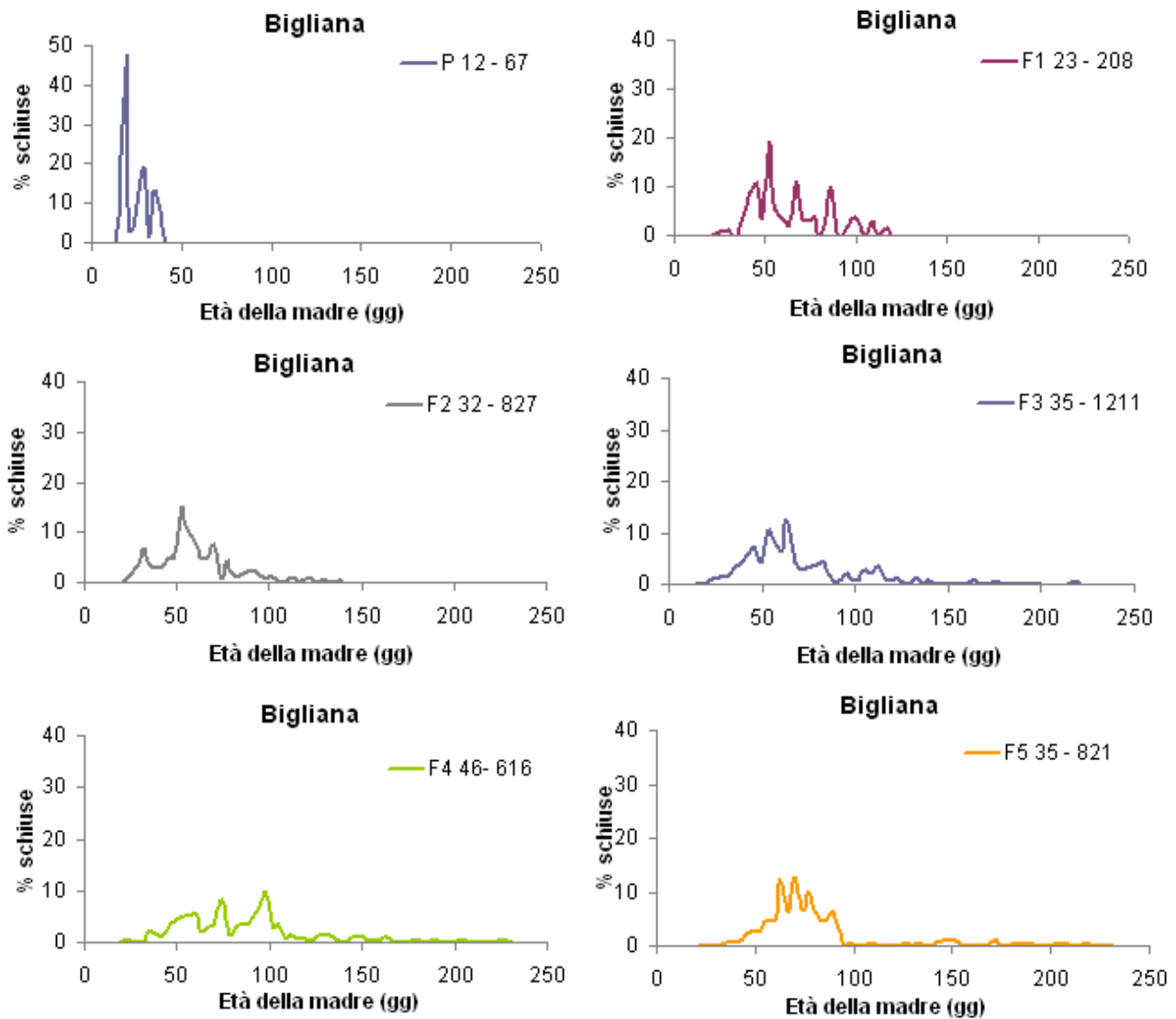


Figura 3.1.10 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni P, F1, F2, F3 degli organismi isolati e provenienti dalla popolazione di Bigliana (Nord-Italia). In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

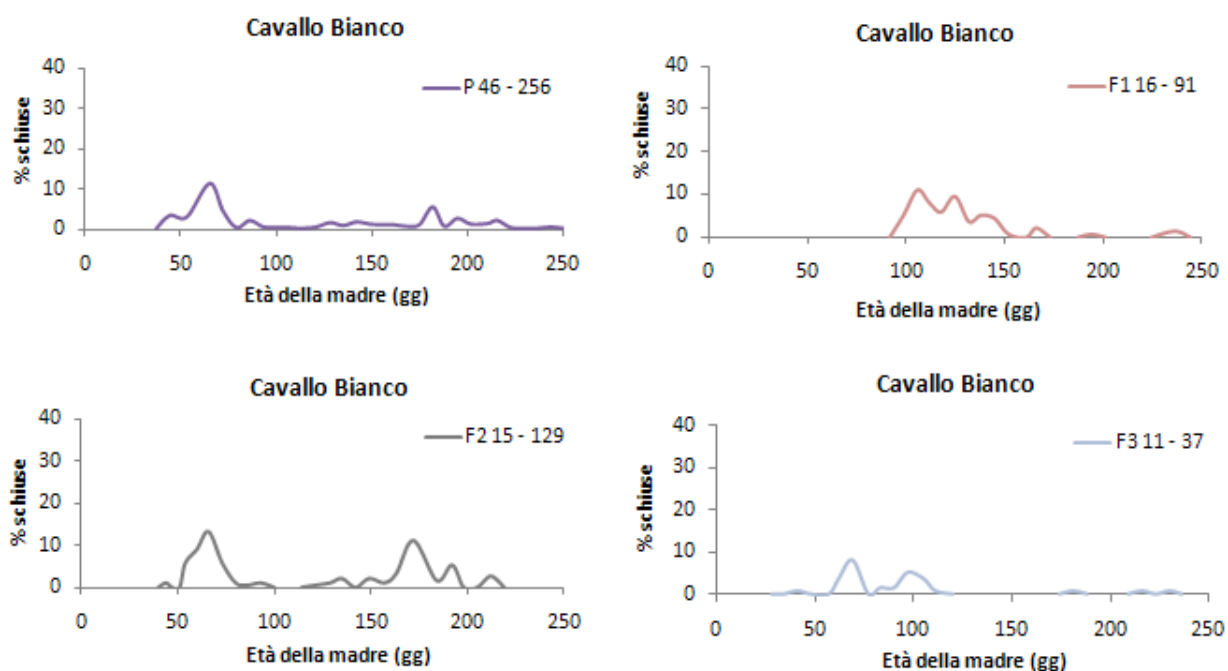


Figura 3.1.11 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni P, F1, F2, F3 degli organismi isolati e provenienti dalla popolazione di Cavallo Bianco (Lampedusa). In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

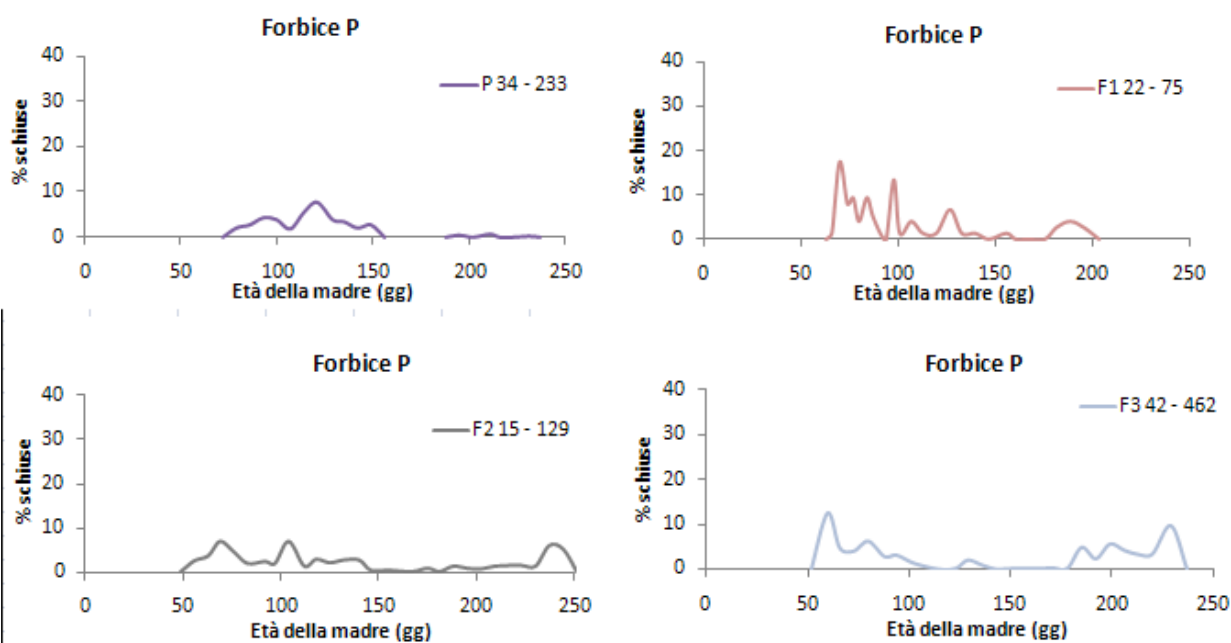


Figura 3.1.12 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni P, F1, F2, F3 degli organismi isolati e provenienti dalla popolazione di Forbice P (Lampedusa). In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

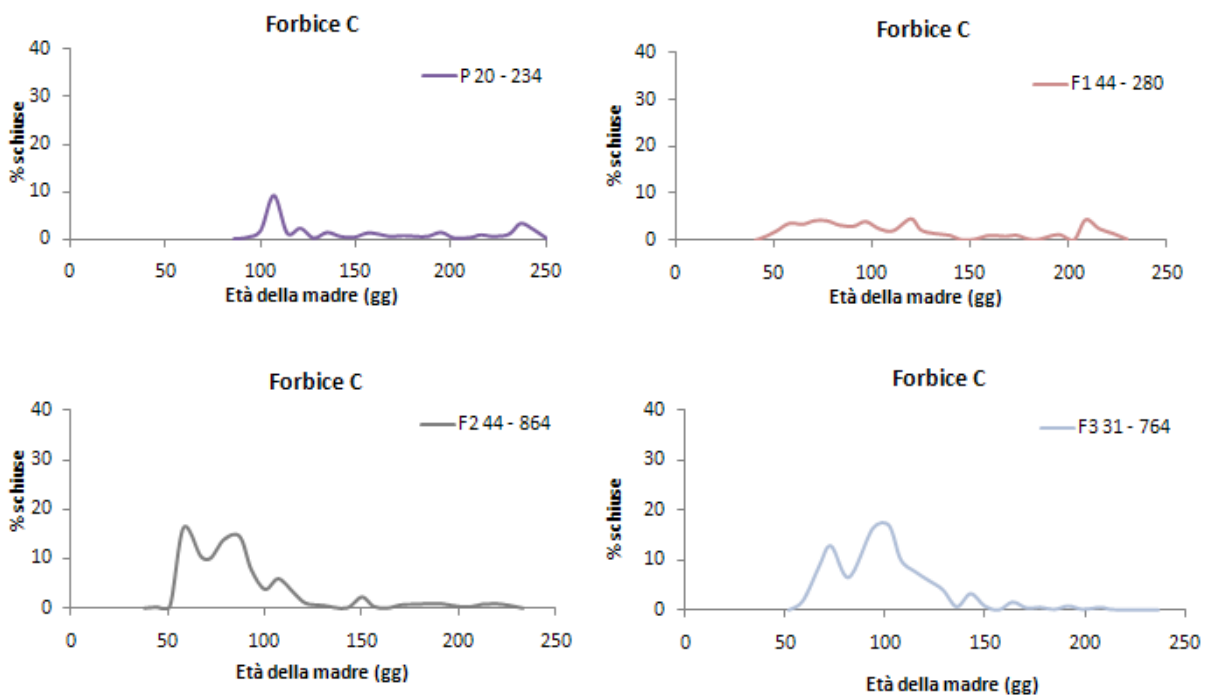


Figura 3.1.13 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni P, F1, F2, F3 degli organismi isolati e provenienti dalla popolazione di Forbice C (Lampedusa). In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

Tabella 3.1.6 a- In tabella sono riportati i valori di distanza calcolati con il test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto a coppie tra curve di schiusa delle uova non durature. Il confronto è stato effettuato tra generazioni entro popolazione. Entro ogni popolazione, per ogni generazione. Nella colonna Test le lettere diverse indicano che le curve di schiusa relative alle diverse generazioni sono tra loro significativamente diverse, lettere uguali indicano che le curve di schiusa non sono significativamente diverse.

Budrione	P	F1	F2	F3	F4	Test
P						A
1	0,14					A
2	0,19	0,16				A
3	0,42	0,56	0,4			B
4	0,53	0,67	0,51	0,17		B
5	0,35	0,49	0,33	0,14	0,18	B

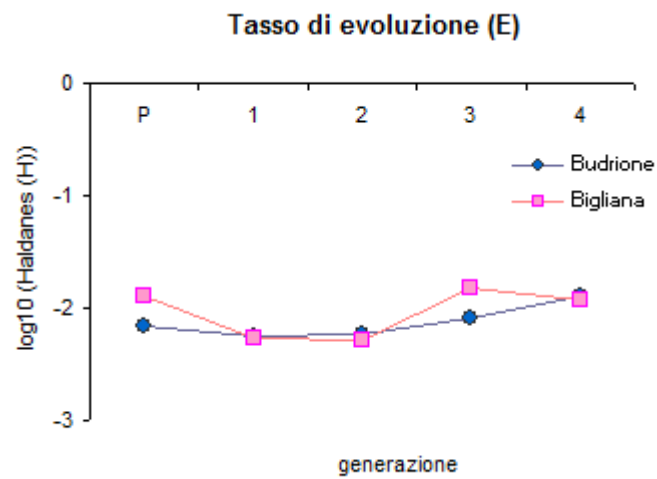
La Bigliana	P	F1	F2	F3	F4	Test
P						A
1	0,31					B
2	0,49	0,18				BD
3	0,77	0,46	0,28			CD
4	0,79	0,47	0,33	0,11		C
5	0,69	0,38	0,20	0,20	0,25	CD

Cavallo Bianco	P	F1	F2	Test
P				A
1	0,46			B
2	0,31	0,15		A
3	0,49	0,13	0,26	B

Forbice P	P	F1	F2	Test
P				AB
1	0,24			A
2	0,31	0,49		B
3	0,14	0,30	0,28	AB

Forbice C	P	F1	F2	Test
P				A
1	0,28			AB
2	0,30	0,27		AB
3	0,47	0,24	0,17	B

a.



b.

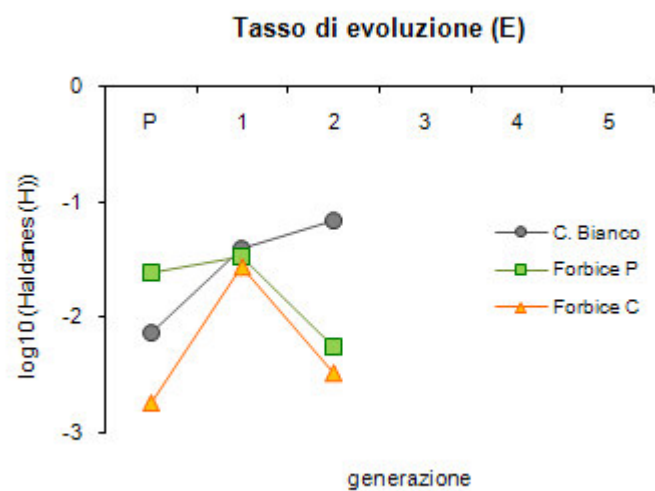


Figura 3.1.14 – Tasso di evoluzione per il tratto Indice di equiripartizione (E) di ogni popolazione.
a. Pianura Padana. B. Lampedusa.

Spunti di DISCUSSIONE

I risultati ottenuti al termine di questo primo esperimento confermano l'esistenza di una strategia di ripartizione del rischio. Femmine di *H. incongruens*, *H. barbara* e della presunta linea ibrida, allevate in condizioni di imprevedibilità ambientale, producono almeno 3 tipologie di uova: uova durature, uova non durature a schiusa precoce e uova non durature a schiusa tardiva).

Se consideriamo l'indice di equiripartizione E come uno stimatore quantitativo della strategia di ripartizione del rischio possiamo concludere che la strategia cambia con la generazione e con la specie.

L'aumento del numero e della percentuale delle femmine che in Pianura Padana depongono tutte le tipologie di uova con la generazione e quindi al diminuire del numero di cloni studiati per ciascuna generazione testimonia che l'osservazione e la selezione della strategia di bet-hedging è legata alla selezione di poche linee clonali che adottano tale strategia

In questo studio sono riportati i primi dati relativi ai tratti vitali della specie *H. barbara*.

I risultati, inoltre, indicano differenze nei tratti osservati tra linee evolutive (*H. incongruens* vs *H. barbara* vs *H. sp.*) provenienti dalla stessa area geografica (Lampedusa), entro la specie *H. incongruens* tra popolazioni provenienti da diverse latitudini (Lampedusa e Pianura Padana) e, entro popolazioni, tra generazioni diverse. Le differenze tra le popolazioni di Lampedusa possono essere imputate sia a differenze genetiche tra le linee evolutive utilizzate che a differenze nelle condizioni sperimentali a cui sono stati sottoposti organismi di differenti popolazioni, così come alle diverse caratteristiche fisico-chimiche delle pozze di provenienza (Rossi *et al.*, 1996; 2006; 2007).

Emergono differenze anche tra femmine della stessa specie, *H. incongruens*, provenienti da diversa latitudine: femmine di Cavallo Bianco (Lampedusa) mostrano età alla morte (45-77 giorni) ed età alla riproduzione (28-41 giorni) più elevate rispetto a femmine provenienti dalle risaie (età alla morte 28-52 giorni, età alla riproduzione 16-29 giorni).

Le differenze osservate tra popolazioni di *H. incongruens* sono riconducibili a diversi fattori:

- 1) fattore genetico: femmine provenienti da differenti latitudini appartengono a linee clonali differenti;
- 2) fattore sperimentale: le femmine di Lampedusa sono state allevate a 16°C, L:B:12:12, mentre le femmine di risaia sono state allevate a 24°C, L:B:12:12.

Le differenze osservate entro popolazioni, tra generazioni, possono dipendere:

- 1) dall'effetto generazione "per se", e, quindi da effetto materno transgenerazionale. Per esempio, la generazione parentale deriva da uova durature schiuse in natura o in microcosmi mantenuti sulla finestra del laboratorio. Le generazioni successive derivano tutte da uova non durature a schiusa precoce deposte da madri allevate in condizioni controllate cresciute a loro volta in ambiente

controllato. Se l'effetto materno dura per due generazioni successive (Lynch, 1985), almeno le differenze che osserviamo tra le prime 2-3 generazioni potrebbero essere attribuite a questo effetto; 2) dall'effetto di selezione che abbiamo operato in laboratorio. La generazione parentale è costituita da un numero variabile di femmine che potrebbero essere sorelle ma potrebbero anche appartenere a cloni diversi, soprattutto nel caso delle popolazioni di Lampedusa. Con il procedere delle generazioni il numero di cloni diminuisce per effetto delle procedure sperimentali adottate e quindi noi stessi abbiamo effettuato una selezione che può essere alla base delle differenze che osserviamo tra generazioni, soprattutto nel caso delle popolazioni di Lampedusa. Nel caso delle risaie, le linee clonali erano verosimilmente tutte di tipo W, come risulta dall'analisi genetica delle popolazioni campionate.

A causa di queste numerose fonti di variabilità si è ritenuto opportuno non procedere con specifiche analisi statistiche dei dati.

Relativamente al tasso di evoluzione del tratto (E) l'attesa è che si selezioni il tratto diversified bet-hedging al passare delle generazioni (mantenendo il valore medio di E più o meno stabile con una deviazione standard che diminuisce all'aumentare della generazione). Il processo artefatto di selezione clonale operato al passare delle generazioni potrebbe interferire con il vero e proprio processo di selezione naturale. Le variazioni del parametro H con le generazioni potrebbero dipendere dall'aver selezionato determinati cloni piuttosto che altri (soprattutto per gli organismi di Lampedusa). L'osservazione di ampie oscillazioni dei valori di H nelle femmine di Lampedusa avvalorata tale ipotesi (Fig. 3.1.14b). Qui ci attendiamo che la variabilità clonale sia più elevata rispetto all'ambiente di risaia (gli organismi di risaia appartengono prevalentemente a linee clonali di tipo W) dove si osservano valori di H relativamente costanti al passare delle generazioni (Fig. 3.1.14a).

In ogni caso, per affermare che la diversificazione nella fenologia di schiusa sia pienamente attribuibile a "genuine bet-hedging" piuttosto che a polimorfismo genetico dobbiamo analizzare la risposta entro singoli cloni. E' quello che faremo nell'esperimento seguente.

ESPERIMENTO 2- Studio del diversified bet-hedging su linee clonali

OBIETTIVO E GIUSTIFICAZIONE DELL'ATTIVITA'

Con l'esperimento precedente abbiamo osservato evidenze di potenziale diversified bet-hedging in popolazioni diverse. Per definizione, il diversified bet-hedging è la risposta diversificata (polifenismo) di un unico genotipo posto in condizioni di imprevedibilità ambientale (Seeger & Brockmann, 1987; Crean & Marshall, 2009). In questa sessione abbiamo rianalizzato parte dei dati dell'esperimento precedente con l'obiettivo di verificare se la strategia di diversified bet-hedging è espressa da singole linee clonali. Abbiamo quindi confrontato i principali tratti del ciclo biologico in tre generazioni successive di 4 linee clonali differenti di *H. incongruens* provenienti da due popolazioni di altrettante risaie del nord-Italia.

MATERIALI E METODI

In questo capitolo vengono analizzati i risultati relativi a 3 generazioni successive (F3, F4, F5) di due linee clonali provenienti dalla risaia di Budrione (bc3, cc1) e 2 linee clonali provenienti dalla risaia La Bigliana (b5, b1), selezionate, acclimatate ed allevate come descritto nell'esperimento precedente in condizioni che simulano l'inizio del periodo d'inondazione (24°C e 12:12 L:B di fotoperiodo). L'analisi genetica ha confermato che tutti i 4 cloni sono di tipo W (Rossi *et al.*, 1996; 2006).

L'analisi di tre generazioni successive F3, F4 e F5 dovrebbe consentire di:

- 1) eliminare l'effetto materno perchè sia le mamme che le nonne della generazione F3 sono nate da uova non durature a schiusa precoce in condizioni controllate di laboratorio a 24°C e 12:12 L:B. Due generazioni di acclimatazione dovrebbero consentire di uniformare la risposta fenotipica.
- 2) verificare se, eliminato l'effetto materno, esiste e persiste un effetto generazione.

L'esperimento, è iniziato il 15 luglio 2008 ed è terminato il 13 maggio 2009.

In questo esperimento le medie dei tratti oggetto d'interesse per ogni clone appartenente a ciascuna popolazione sono state confrontate con una nested-ANOVA multifattoriale considerando i fattori 'popolazione' e 'clone' come 'nested factors'.

RISULTATI

In Tabella 3.2.1 sono riportati i dati relativi ai tratti misurati nei diversi cloni e nelle diverse generazioni. La generazione ha un effetto significativo su tutti i parametri studiati mentre l'effetto del clone è significativo per il tempo di sviluppo e i tratti connessi alla fecondità (numero di piccoli, numero di uova durature, numero totale di uova prodotte, tasso intrinseco di crescita) (Tab. 3.2.3).

Il tasso intrinseco di crescita (r) decresce con la generazione per entrambi i cloni di Budrione mentre per i cloni de La Bigliana non si osservano tendenze evidenti. La percentuale di uova durature

prodotte aumenta al diminuire del tasso intrinseco di crescita e viceversa: risulta quindi sempre crescente al progredire della generazione negli organismi di Budrione, crescente tra F3 e F4 e decrescente tra F4 e F5 negli organismi de La Bigliana (Fig. 3.2.3, 3.2.4).

L'effetto della popolazione risulta statisticamente significativo sul tempo di sviluppo ($p < 0,05$) e sul tempo medio di generazione alla schiusa del 50% ($p < 0,0001$) del 100% ($p < 0,001$) dei piccoli (Tab. 3.2.3).

Tutti i fattori e tutte le interazioni analizzate hanno un effetto significativo ($p < 0,0001$) sull'indice di equiripartizione (Tab. 3.2.3). L'indice di equiripartizione aumenta con la generazione nei cloni di Budrione (bc3, cc1) dove raggiunge valori prossimi a 1 ($E=0,99$ per il clone bc3; $E=0,78$ per il clone cc1) (Tab. 3.2.1). Allo stesso modo in questi due cloni ci si attendeva un aumento con la generazione del numero di femmine che produce contemporaneamente uova durature, uova non durature a schiusa precoce e uova non durature a schiusa tardiva. Questo aumento si osserva dalla F3 e F4, ma non dalla F4 alla F5 (Tab. 3.2.2). Invece, nei cloni de La Bigliana, non è evidente un aumento del valore di E con la generazione (Fig. 3.2.5), anche se i valori di E che si registrano confermano l'esistenza di ripartizione (da 0,4 a 0,7) anche in queste linee clonali. In tutti i casi i valori più bassi di E corrispondono ad un'alta quota di uova non durature a schiusa precoce (Fig. 3.2.1 e 3.2.2). Il test di Kolmogorov-Smirnov evidenzia differenze anche nelle curve di schiusa delle uova non durature tra F4-F5 per il clone bc3 e tra F3-F5 per il clone cc1 di Budrione.

Dall'analisi delle dinamiche di schiusa delle uova non durature si osserva che la F5 in entrambi i cloni di Budrione è la generazione che distribuisce maggiormente le schiuse nel tempo e che fa osservare veri e propri picchi di schiusa ritardati (dopo il giorno 110°) discostandosi dalle generazioni precedenti dove gran parte delle schiuse si registrano prima del 100° giorno. Questo dato è supportato dagli elevati valori di E per questa generazione che comportano oltre ad un'elevata produzione di uova non durature a schiusa ritardata, anche un'elevata produzione di uova durature.

Tabella 3.2.1 – Per ognuna delle 3 generazioni (F3 F4, F5) dei cloni (bc3, cc1, b1, b5) delle popolazioni di Budrione e La Bigliana sono indicati la numerosità del campione e i valori medi, con la relativa deviazione standard (DEV.ST) dei tratti misurati. E' indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R) e il numero di femmine che hanno dato origine ad almeno un piccolo. L'età media alla morte (in giorni) è stata calcolata sia sul totale delle femmine isolate (E1) sia sul totale delle femmine che si sono riprodotte (E2). Il tempo medio di generazione è stato calcolato come: numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la nascita della sua prima figlia (TMG1), numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 50% delle uova non durature prodotte (TMG50) e numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 100% delle uova non durature prodotte (TMG100).

	Bu						Bg					
	bc3			cc1			b5			b1		
	F3	F4	F5	F3	F4	F5	F3	F4	F5	F3	F4	F5
Femmine isolate (N)	21	48	27	25	21	20	40	28	41	5	19	6
Femmine con uova (R)	19	44	22	21	14	14	30	27	30	5	16	6
Femmine con piccoli	15	35	15	18	12	6	25	27	25	5	16	6
R/N (%)	90	92	81	84	67	70	75	96	73	100	84	100
Età alla morte (E1)	39,1	47,6	49,5	38,6	41,1	42,5	40,6	45,3	44,7	39,4	43,0	60,2
DEV. ST	12,80	13,60	13,80	8,90	13,30	17,00	15,80	8,30	16,40	12,80	13,20	8,54
Età alla morte (E2)	42,2	49,2	52,4	40,9	47,3	47,9	47,7	45,7	49,4	43,3	44,8	60,2
DEV. ST	10,00	12,60	10,90	7,50	8,30	14,70	9,90	8,20	15,10	11,00	12,20	8,54
Età alla riproduzione	21,7	22,7	28,8	20,8	21,1	30,4	22,8	21,4	25,7	18,0	19,0	24,6
DEV. ST	5,60	4,40	6,20	4,90	2,90	4,30	5,20	3,40	4,90	2,90	4,10	7,09
Tempo generazione (TMG1)	29,7	48,1	65,5	30,4	49,6	74,5	37,6	48,0	45,8	38,6	65,2	36,0
DEV. ST	9,00	28,00	39,10	10,90	26,50	35,70	9,90	19,60	20,70	27,30	24,30	10,95
Tempo generazione (TMG50)	65,0	71,4	99,8	49,1	98,1	117,0	58,8	75,5	56,7	55,0	71,9	50,6
DEV. ST	45,90	26,50	48,20	24,30	33,80	20,20	23,60	22,70	26,70	14,90	26,60	3,32
Tempo generazione (TMG100)	60,2	69,4	98,3	49,7	94,1	107,0	58,9	74,3	57,8	56,7	76,8	61,5
DEV. ST	38,30	31,50	51,50	28,80	39,00	40,50	27,50	34,30	28,30	36,10	27,30	36,02
Lunghezza	1,3	1,3	1,2	1,3	1,3	1,2	1,3	1,2	1,2	1,3	1,3	1,2
DEV. ST	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,06
Larghezza	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7
DEV. ST	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00	0,10	0,00	0,10	0,07
Piccoli/femmina	20,2	32,9	14,9	18,9	26,0	8,0	35,6	25,0	23,6	35,2	14,4	26,7
DEV. ST	20,70	26,30	12,80	15,30	18,40	9,80	31,50	15,50	20,70	32,00	4,60	20,73
Uova durature/femmina	0,9	7,2	6,3	0,4	6,5	2,2	2,0	5,2	1,8	4,4	7,2	15,2
DEV. ST	1,40	7,90	5,80	1,10	6,20	2,80	4,40	6,00	3,30	4,70	9,00	12,01
Uova totali/femmina	21,1	40,0	21,1	19,2	32,5	10,2	37,6	30,2	25,4	39,6	21,6	41,8
DEV. ST	20,50	28,50	14,20	15,30	17,90	11,10	32,30	19,80	19,70	36,20	12,00	27,54
Tasso intrin. di crescita	0,11	0,10	0,04	0,10	0,07	0,03	0,10	0,06	0,07	0,09	0,03	0,09
DEV. ST	0,080	0,030	0,040	0,060	0,050	0,010	0,030	0,080	0,030	0,040	0,020	0,020
Indice di equiripartizione	0,5	0,6	1,0	0,4	0,7	0,8	0,5	0,7	0,7	0,4	0,6	0,4
DEV. ST	0,01	0,01	0,05	0,00	0,03	0,12	0,09	0,06	0,15	0,00	0,01	0,00

Tabella 3.2.2 – Per ciascuna popolazione è indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R), il numero di femmine che hanno prodotto tutte e tre le tipologie di uova, le femmine che hanno prodotto solo uova durature, le femmine che hanno prodotto solo uova non durature a schiusa precoce ('early') e le femmine che hanno prodotto solo uova non durature a schiusa tardiva ('delayed').

	Budrione						Bigliana					
	bc3			cc1			b5			b1		
	F3	F4	F5	F3	F4	F5	F3	F4	F5	F3	F4	F5
Femmine isolate (N)	21	48	27	25	21	20	40	28	41	5	19	6
Femmine con uova (R)	19	44	22	21	14	14	30	27	30	5	16	6
R/N (%)	90	92	81	84	67	70	75	96	73	100	84	100
Tutte le tipologie	6	24	17	0	8	5	8	17	6	3	6	5
%	31,6	54,5	77,3	-	57,1	35,7	26,7	63,0	20,0	60,0	37,5	83,3
Solo uova durature	2	6	0	0	1	1	2	0	6	0	1	0
%	10,5	13,6	-	-	7,1	7,1	6,7	0,0	20,0	0,0	6,3	-
Solo uova non durature 'early'	4	0	0	9	1	0	6	5	8	1	2	1
%	21,1	-	-	42,9	7,1	-	20,0	18,5	26,7	20,0	12,5	16,7
Solo uova non durature 'delayed'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

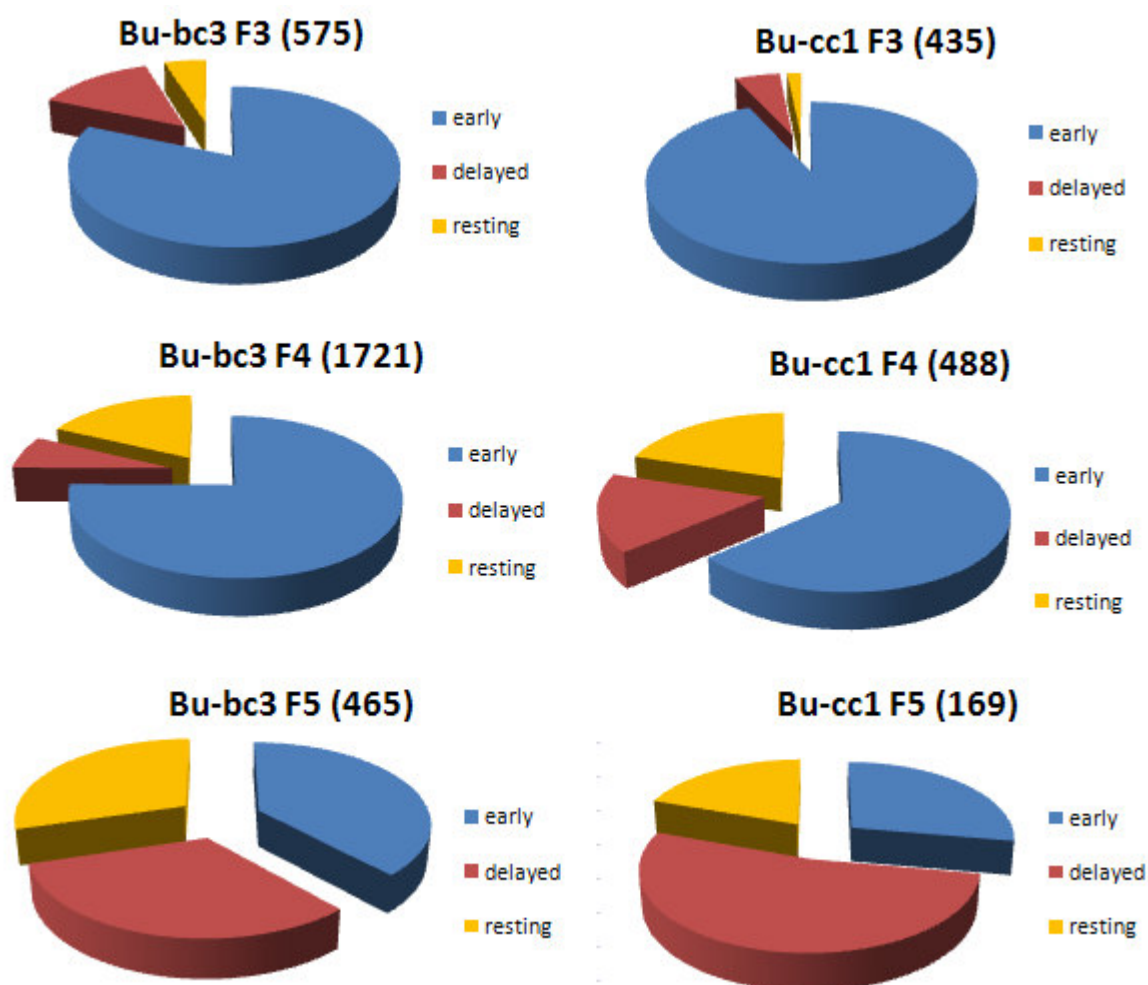


Figura 3.2.1 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione di Budrione (nord Italia) per le generazioni F3, F4, F5. E’ indicata la popolazione (Bu), il clone (bc3, cc1) la generazione e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte per generazione.

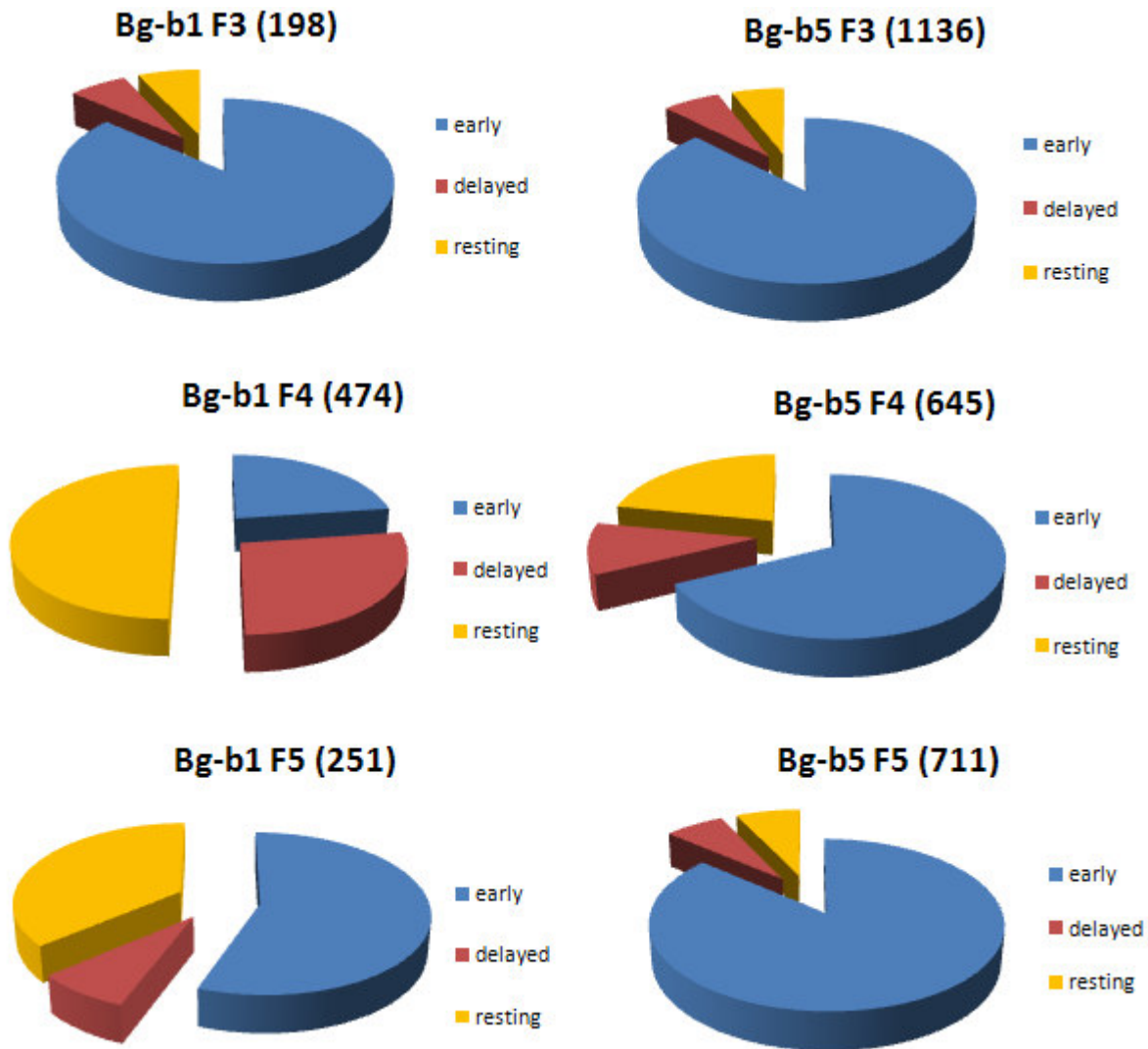


Figura 3.2.2 – Proporzioe delle diverse tipologie di uova prodotte ('early'= uova non durature a schiusa precoce; 'delayed'= uova non durature a schiusa ritardata, 'resting'= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione de La Bigliana (nord Italia) per le generazioni F3, F4, F5. E' indicata la popolazione (Bg), il clone (b1, b5) la generazione e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte per generazione.

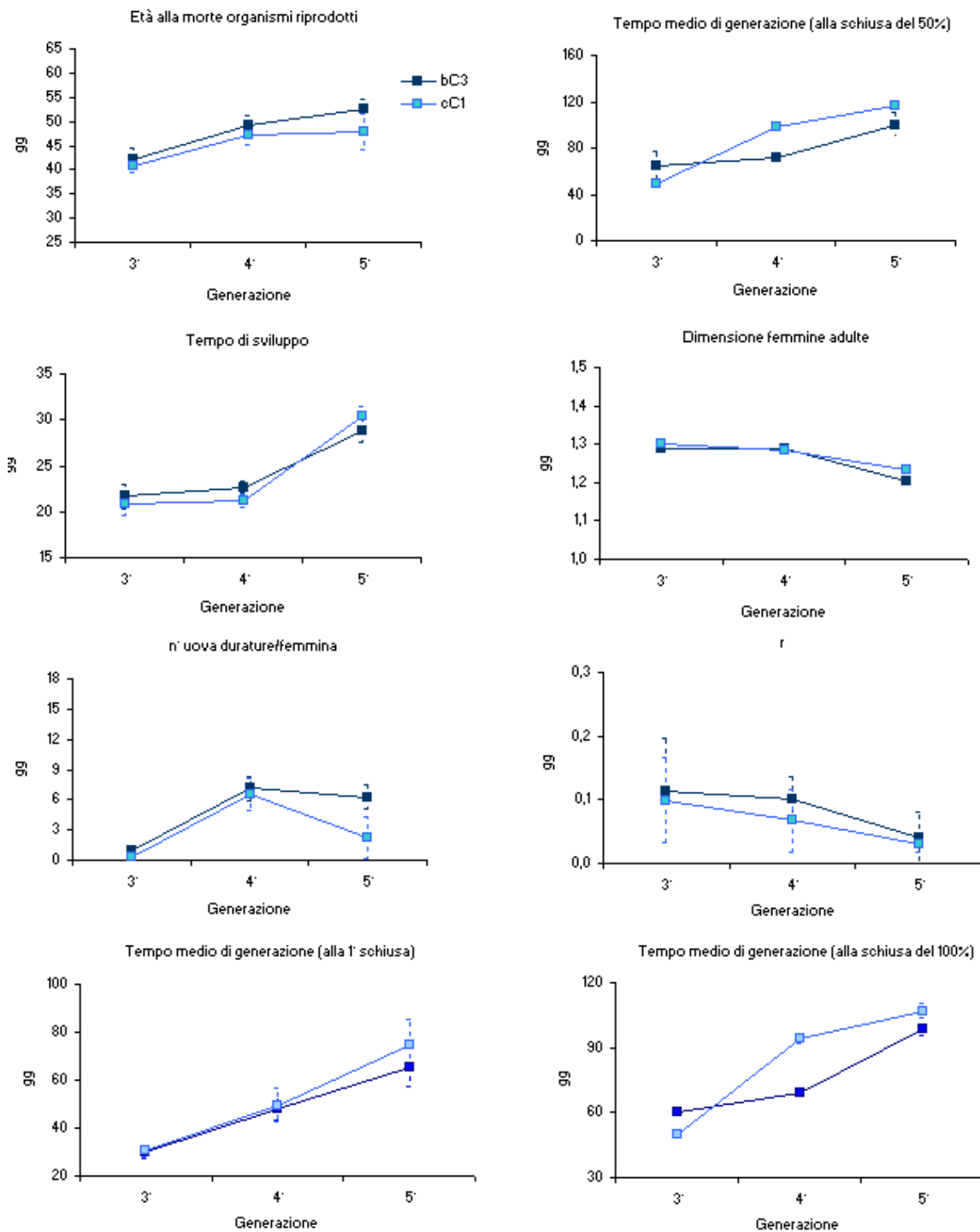


Figura 3.2.3 – Principali tratti vitali misurati per 3 generazioni successive (F3, F4, F5) nei 2 cloni della popolazione di Budrione (bc3, cc1). I tratti riportati in figura sono: età alla morte organismi riprodotti, tempo medio di generazione (TMG1, TMG50, TMG100), tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso intrinseco di crescita misurato a 230 giorni (r).

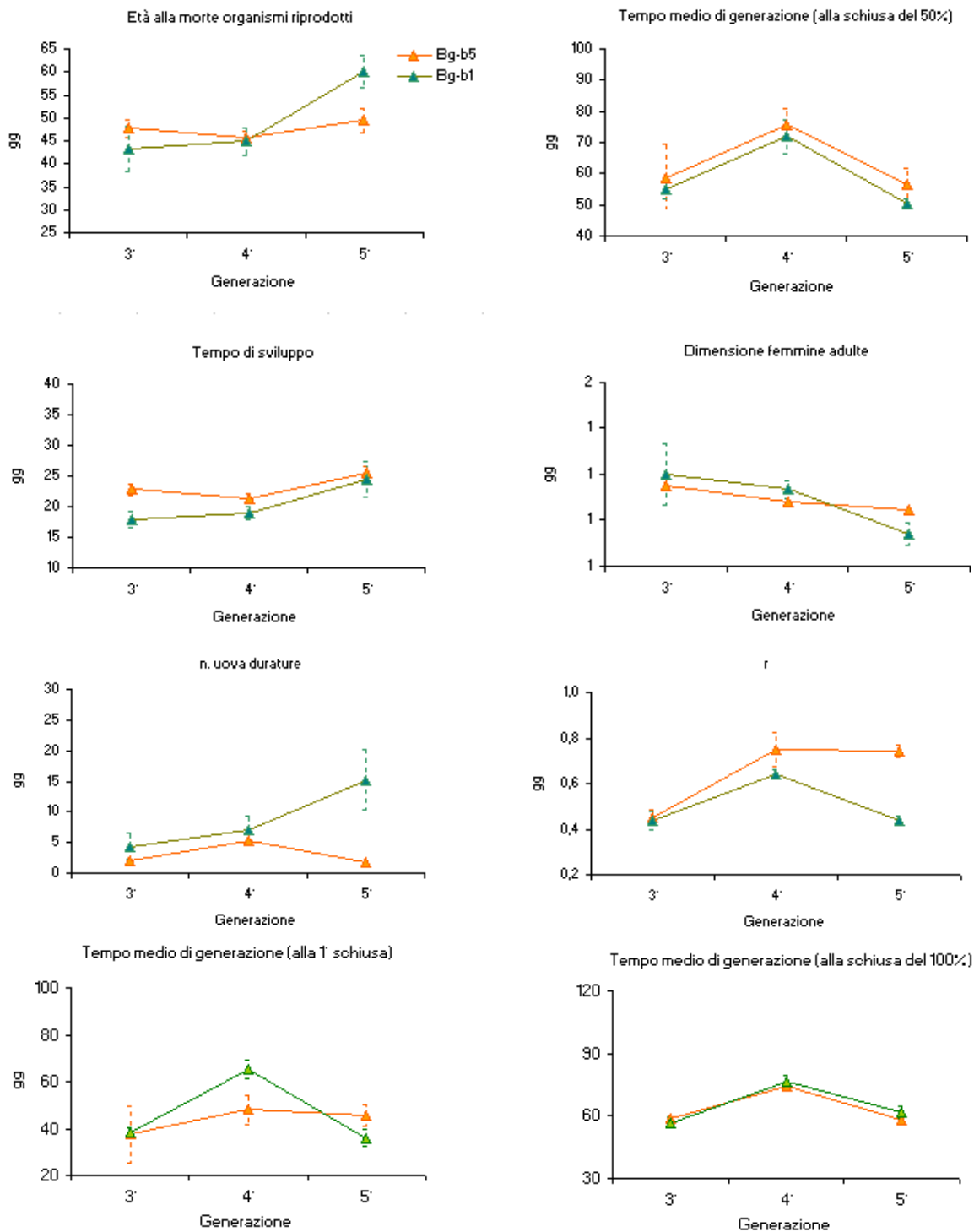


Figura 3.2.4 – Principali tratti vitali misurati per 3 generazioni successive (F3, F4, F5) nei 2 cloni della popolazione de La Bigliana (b1, b5). I tratti riportati in figura sono: età alla morte organismi riprodotti, tempo medio di generazione ((TMG1, TMG50, TMG100), tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso intrinseco di crescita misurato a misurato a 230 giorni (r).

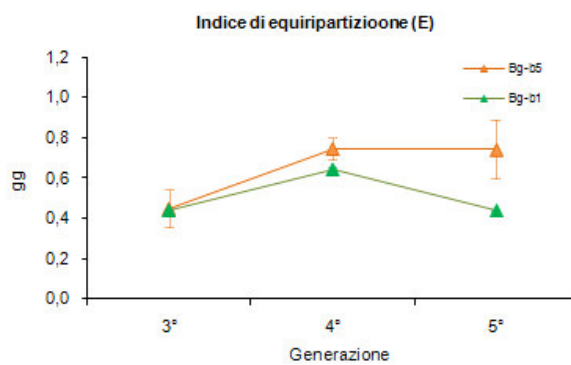
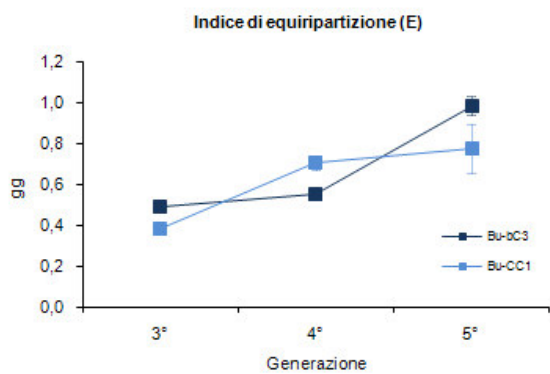


Figura 3.2.5 – Indice di equiripartizione (E). Da sinistra a destra: cloni della popolazione di Budrione (Bu) (bc3, cc1), cloni della popolazione de La Bigliana (Bg) (b1, b5)).

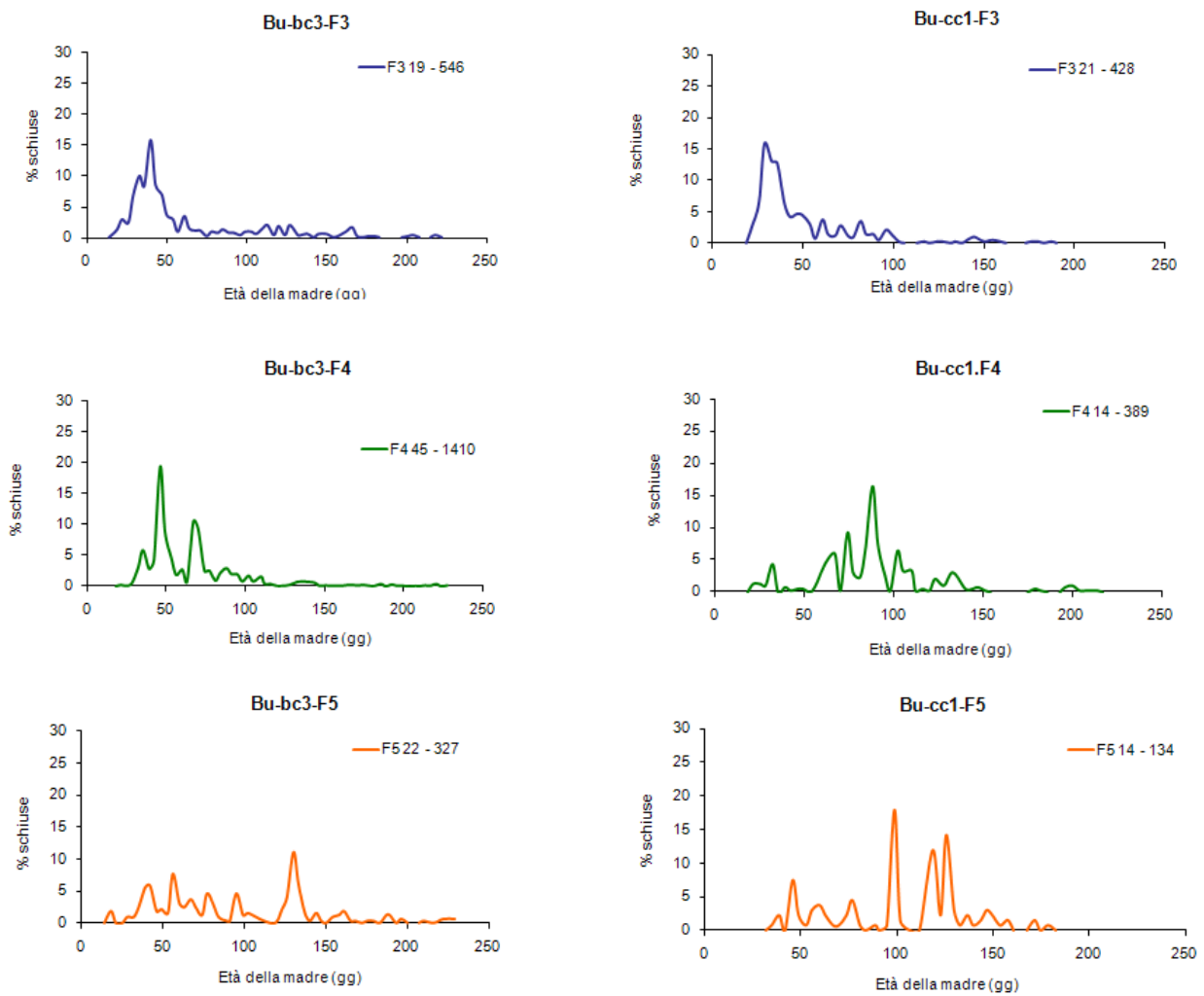


Figura 3.2.6 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni F3, F4, F5 dei cloni bc3 e cc1 provenienti dalla popolazione di Budrione (Bu). In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

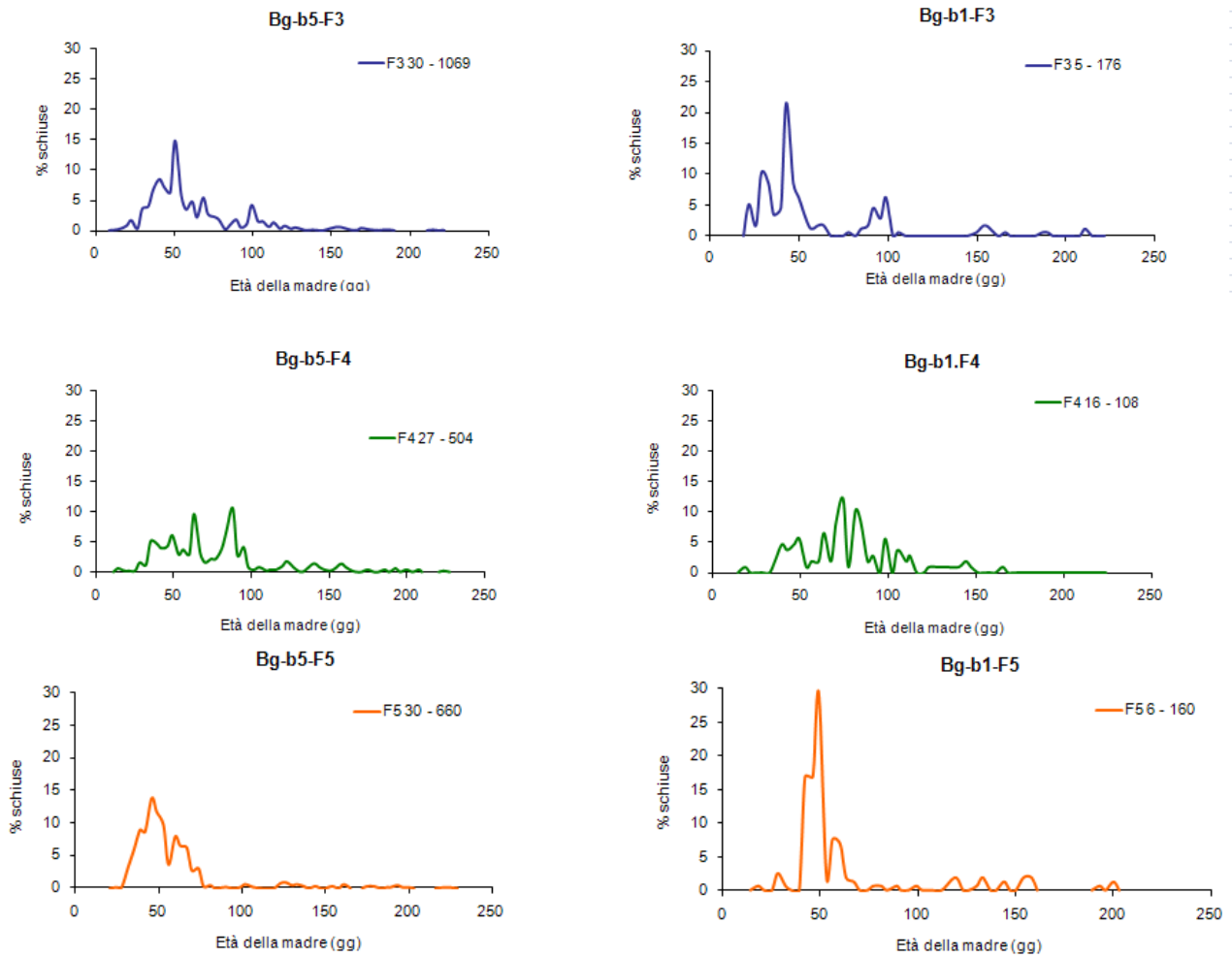


Figura 3.2.7 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni F3, F4, F5 dei cloni b1 e b5 provenienti dalla popolazione de La Bigliana (Bg). In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

Tabella 3.2.3- Tabella di output del test ANOVA. Le differenze testate rispetto ai fattori: popolazione (pop), generazione (gen), clone (clone), interazione popolazione-generazione (popxgen), interazione clone-generazione (clonexgen). L'interazione 'clone-generazione' non è mai significativa tranne che per il tratto E.

Età alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	0.8	0.79	0.0061	0.93761
gen	2	1375.1	687.54	5.3351	0.00541 **
pop:clone	2	436.3	218.13	1.6926	0.18623
pop:gen	2	499.1	249.55	1.9365	0.14647
Residuals	239	30800.4	128.87		

Tempo di sviluppo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	138.7	138.74	6.2153	0.013352 *
gen	2	1830.7	915.34	41.0043	5.198e-16 ***
pop:clone	2	215.3	107.64	4.8219	0.008862 **
pop:gen	2	172.3	86.16	3.8598	0.022415 *
Residuals	236	5268.2	22.32		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	325	325.2	0.5638	0.4535359
gen	2	18076	9038.1	15.6683	4.444e-07 ***
pop:clone	2	1600	800.1	1.3870	0.2520441
pop:gen	2	10730	5365.2	9.3011	0.0001336 ***
Residuals	215	124020	576.8		

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	11476	11475.7	11.8982	0.0006772 ***
gen	2	25807	12903.6	13.3786	3.363e-06 ***
pop:clone	2	2658	1328.8	1.3778	0.2543766
pop:gen	2	27898	13949.0	14.4626	1.289e-06 ***
Residuals	215	205436	964.5		

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	22694	22694.2	9.0169	0.002993 **
gen	2	17978	8989.1	3.5716	0.029800 *
pop:clone	2	12102	6051.1	2.4042	0.092771 .
pop:gen	2	25837	12918.4	5.1327	0.006648 **
Residuals	215	538608	2516.9		

Continua

Continua

Lunghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	0.01516	0.015159	1.7616	0.1859
gen	2	0.18142	0.090711	10.5416	4.338e-05 ***
pop:clone	2	0.00349	0.001745	0.2028	0.8166
pop:gen	2	0.02076	0.010378	1.2060	0.3015
Residuals	210	1.80706	0.008605		

Larghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	0.00055	0.0005545	0.1293	0.7195669
gen	2	0.06297	0.0314832	7.3384	0.0008315 ***
pop:clone	2	0.00914	0.0045685	1.0649	0.3466324
pop:gen	2	0.01355	0.0067761	1.5795	0.2085380
Residuals	209	0.89665	0.0042902		

Piccoli prodotti

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	0	0.0	0.0001	0.994021
gen	2	5105	2552.3	5.6297	0.004072 **
pop:clone	2	5069	2534.7	5.5909	0.004226 **
pop:gen	2	8925	4462.7	9.8435	7.74e-05 ***
Residuals	244	110620	453.4		

Uova durature prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	1.5	1.47	0.0436	0.8348291
gen	2	1047.8	523.90	15.4786	4.756e-07 ***
pop:clone	2	527.9	263.94	7.7979	0.0005235 ***
pop:gen	2	95.2	47.58	1.4058	0.2471783
pop:clone:gen	4	547.3	136.82	4.0423	0.0034301 **
Residuals	240	8123.3	33.85		

Uova totali prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	1	1.1	0.0021	0.96311
gen	2	3359	1679.3	3.2357	0.04103 *
pop:clone	2	4756	2378.0	4.5820	0.01113 *
pop:gen	2	10448	5224.1	10.0659	6.302e-05 ***
Residuals	244	126633	519.0		

r

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
pop	1	0.00065	0.00065	0.2696	0.6041583
gen	2	0.09789	0.04894	20.3703	8.336e-09 ***
clo	2	0.03749	0.01875	7.8026	0.0005401 ***
pop:gen	2	0.05990	0.02995	12.4647	7.714e-06 ***
clo:gen	4	0.00946	0.00236	0.9839	0.4172908
Residuals	208	0.49976	0.00240		

Continua

Continua

Indice di equiripartizione (E)

	Df	SumSq	MeanSq	F value	Pr(>F)	
pop	1	0.2103	0.21030	126.48	< 2.2e-16	***
gen	2	3.3256	1.66281	1000.05	< 2.2e-16	***
clone	2	1.2804	0.64020	385.03	< 2.2e-16	***
pop:gen	2	3.0684	1.53419	922.70	< 2.2e-16	***
clo:gen	4	1.1137	0.27842	167.45	< 2.2e-16	***
Residuals	215	0.3575	0.00166	---		

Tabella 3.2.4 - (a) In tabella sono riportati i valori di distanza calcolati con il test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto a coppie tra curve di schiusa delle uova non durature. Il confronto è stato effettuato tra generazioni entro clone e tra cloni entro generazione. (b) Entro ogni popolazione, entro ogni clone per ogni generazione, lettere diverse indicano che le curve di schiusa sono significativamente diverse, lettere uguali indicano che le curve di schiusa non sono diverse.

a.

	<i>bc3</i>		<i>cc1</i>			<i>bu</i>	<i>bc3-cc1</i>
bu	3	4	3	4		3	0,12
3	-					4	0,20
4	0,20	-	0,09	-		5	0,28
5	0,09	0,26	0,29	0,22			

	<i>b1</i>		<i>b5</i>			<i>bg</i>	<i>b1-b5</i>
bg	<i>F3</i>	<i>F4</i>	3	4		3	0,27
3						4	0,32
4	0,32	-	0,17			5	0,21
5	0,32	0,06	0,24	0,19			

b.

		<i>F3</i>	<i>F4</i>	5
Budrione	bc3	AB	AC	BD
	cc1	BE	CEF	FH
Bigliana	b5	IM	IN	IO
	b1	IR	P	PO

Spunti di DISCUSSIONE

I risultati ottenuti con questo esperimento confermano la presenza di polifenismo nella produzione di uova per entrambe le popolazioni (Budrione, Bigliana) e per tutte le 4 linee clonali studiate (bc3, cc1, b1, b5): le femmine clonali, allevate in condizioni di laboratorio controllate producono uova durature, uova non durature a schiusa precoce e uova non durature a schiusa ritardata. Si può quindi concludere che i 4 cloni studiati, producendo quote variabili delle varie tipologie di uova in condizioni sperimentali che non danno indicazione sulla durata dell'idroperiodo, ripartiscono il rischio legato all'evento riproduttivo adottando una strategia di tipo 'diversified bet-hedging'.

Alcuni tra i tratti principali variano in modo significativo, tra popolazioni (tempo medio di generazione e indice di equiripartizione), tra cloni (tempo medio di sviluppo, numero medio di uova durature e di piccoli prodotti, tasso intrinseco di crescita, indice di equiripartizione). Tutti i tratti, tranne in numero totale di uova prodotte variano al variare della generazione. Tali variazioni riguardano sia il valore medio che la variabilità del tratto (vedere Appendice 2).

I risultati qui discussi sono stati ottenuti in linee clonali acclimatate per due generazioni. L'effetto materno che teoricamente dovrebbe perdersi dopo due generazioni (Lynch, 1985) dovrebbe essere stato eliminato e quindi l'attesa era che, nelle linee partenogenetiche apomittiche utilizzate per l'esperimento, la variabilità dei tratti misurati nelle generazioni si annullasse o si riducesse. Al contrario si osservano differenze significative nei tratti tra generazioni successive (in particolare nei cloni di Budrione). Se escludiamo che, da una generazione all'altra siano intervenute mutazioni, possiamo fare alcune ipotesi.

1) Quello che stiamo osservando è l'effetto legato allo "stress da laboratorio" (Rousseaux *et al.*, 2010). Ad avvalorare questa ipotesi l'osservazione di una generale riduzione del tasso intrinseco di crescita delle popolazioni clonali, l'aumento nell'età alla riproduzione dei tempi di sviluppo e una diminuzione delle dimensioni del carapace. In contrasto il fatto che comunque non diminuisce il numero totale di uova prodotte.

2) Quello che stiamo osservando è un fenomeno di "instabilità di sviluppo" (Spitze & Sadler, 1996).

3) L'effetto materno non viene eliminato da due generazioni di acclimatazione e si prolunga per più generazioni. In effetti non sono molti i lavori che analizzano le norme di reazione in più generazioni successive (Gilbert, 2002).

Per verificare se la risposta osservata può essere legata allo stress o alla variazione della strategia riproduttiva (es. a parità di uova prodotte cambia il loro tipo, aumenta quello delle uova durature o di quelle non durature a schiusa ritardata, mentre diminuisce quello delle uova non durature a schiusa precoce), lo studio è stato prolungato per altre 5 generazioni.

Le differenze tra le due risaie potrebbero dipendere dalle differenze nelle pratiche colturali (nella risaia de La Bigliana gli organismi campionati come generazione parentale potevano appartenere già alla generazione dei nuovi nati da femmine nate da uova durature) o dalla densità delle popolazioni di origine. L'effetto del clone è generalmente associato all'interazione tra clone e popolazione in quanto i tratti delle linee clonali provenienti dalla stessa risaia non sono significativamente diversi. L'unica eccezione si osserva per il numero di uova durature prodotte per la risaia de La Bigliana.

E' interessante notare che l'indice di equiripartizione (E) aumenta passando dalla F3 alla F5 dove, tranne che nel caso del clone b1 de La Bigliana, presenta il valore massimo. Nelle generazioni F5 di Budrione sono chiaramente visibili due picchi di schiusa (Fig. 3.2.6) uno precoce ed uno tardivo. Questo fenomeno di asincronia nelle schiuse può essere interpretato come un meccanismo che consente di ridurre la competizione intraclonale (Vanoverbeke & De Meester, 2009).

Per ottenere le linee clonali in laboratorio è stata inevitabilmente operata una selezione. Questa è avvenuta sulla base della possibilità di ottenere le nuove generazioni quindi in base ai tempi di schiusa (rapidi) e alla numerosità delle schiuse. Quindi, i criteri di selezione utilizzati prescindevano dal fatto che le femmine selezionate facessero bet-hedging. A posteriori possiamo dire che:

nella popolazione di Budrione sono state selezionate 2 linee clonali (bc3 e cc1) originate da femmine parentali che hanno prodotto 100% di uova non durature a schiusa precoce (vedi Appendice 1, Tab. A1.1; Fig A1.1, A1.2); nella popolazione de La Bigliana sono state selezionate 2 le linee clonali (b1 e b5) originate da femmine parentali che hanno prodotto 33% di uova non durature a schiusa precoce e 66% di uova durature (vedi Appendice 1, Tab. A1.1; Fig A1.3, A1.4).

Questo significa che non abbiamo selezionato a priori femmine che attuano bet-hedging;

Il diverso comportamento delle madri della generazione parentale, potrebbe spiegare le differenze osservate tra cloni di diversa provenienza. I cloni potrebbero essere di tipo W ma non essere geneticamente identici, oppure differenze colturali e/o strutturali nelle risaie potrebbero modificare l'espressione fenotipica o le strategie vitali di cloni simili.

ESPERIMENTO 3- Diversified bet-hedging come risultante degli effetti materni transgenerazionali

OBIETTIVO E GIUSTIFICAZIONE DELL'ATTIVITA'

Dai risultati precedenti emerge che la strategia di diversified bet-hedging è diffusa in specie diverse, in diverse popolazioni della stessa specie e in differenti cloni della medesima specie e popolazione. Secondo la definizione classica il diversified bet-hedging si ha quando un singolo genotipo esprime fenotipi diversi in condizioni stabili che non danno informazione sulla prevedibilità dell'ambiente. Si è osservato inoltre che la risposta dei singoli cloni varia con la generazione e non si stabilizza dopo due generazioni di acclimatazione. Al fine di verificare se l'espressione fenotipica diversificata si stabilizza dopo più generazioni di acclimatazione (ovvero se l'effetto materno si protrae per più di due generazioni) o se la variazione tra generazioni riflette uno stress da laboratorio abbiamo confrontato i principali tratti del ciclo biologico in 8 generazioni successive delle due linee clonali di tipo W (bc3, cc1) della risaia di Budrione dopo due generazioni di acclimatazione a 24 °C e fotoperiodo 12:12 L:B.

MATERIALI E METODI

I dati relativi alle generazioni F3, F4 e F5 sono gli stessi dati presentati nell'esperimento precedente ai quali sono stati aggiunti quelli relativi alle generazioni F6, F7, F8, F9, F10 mantenute come le precedenti in condizioni che simulano l'inizio del periodo d'inondazione (24°C e 12:12 L:B di fotoperiodo). Per ciascun clone e per ciascuna generazione è stata allestita 1 piastra multipozzetto (24 pozzetti, 1 animale per pozzetto) utilizzando, per ottenere ogni generazione successiva, i primi nati di ciascuna generazione.

L'esperimento, è iniziato il 15 luglio 2008 ed è terminato il 12 Novembre 2009.

In questo esperimento le medie dei tratti oggetto d'interesse per ogni clone appartenente a ciascuna popolazione sono state confrontate con un'ANOVA bifattoriale considerando i fattori 'clone' e 'generazione'. In questo esperimento per i valori del tasso intrinseco di crescita (r) sono stati inoltre effettuati i confronti a coppie mediante la funzione 'pairwise t-test ()' disponibile in R (versione 2.8).

L'influenza di ciascun tratto vitale a livello di fitness (stimata come tasso intrinseco di crescita misurato a 230 giorni) è stata testata con un test ANCOVA considerando la generazione come fattore (gen) e il tasso intrinseco di crescita come covariata (r). Per i tratti vitali per i quali, in seguito ad una prima analisi grafica (Fig. 3.3.2) sembrava esistere un trend al passare delle generazioni è stata inoltre implementata un'ulteriore ANCOVA considerando il clone come fattore e la generazione come variabile continua covariata.

RISULTATI

In Tabella 4.1.1 sono riportati i dati relativi ai tratti misurati nei due diversi cloni e nelle diverse generazioni.

La generazione ha un effetto altamente significativo ($p < 0,0001$) su tutti i parametri studiati mentre l'effetto del clone è significativo solo per il numero medio di uova durature per femmina ($p < 0,01$) (Tab. 3.3.2). L'interazione 'clone x generazione' ha un effetto significativo sul tempo medio di generazione (50% delle schiuse, $p < 0,001$; 100% delle schiuse, $p < 0,001$), sul numero medio di uova e di piccoli per femmina ($p < 0,001$) e sull'indice di equiripartizione (E) ($p < 0,001$). Il tasso intrinseco di crescita (r) decresce dalla F3 alla F5, per poi aumentare significativamente alla generazione F6 ($p < 0,0001$). Dalla F6 alla F10 si mantiene relativamente costante (Fig. 3.3.2).

Dall'analisi della covarianza che considera il tasso intrinseco di crescita come covariata emerge che soltanto il tempo medio di generazione al 50% delle schiuse ha un impatto significativo ($p < 0,0001$) sul tasso intrinseco di crescita e che tempo di sviluppo ($p < 0,01$), tempo medio di generazione alla schiusa del 100 ($p < 0,0001$) e uova durature prodotte ($p < 0,001$) hanno ripercussioni significative a livello di fitness solo nell'interazione con la generazione (Fig. 3.3.4).

L'analisi della covarianza ANCOVA conferma l'esistenza di un trend crescente per l'età alla morte degli organismi riprodotti ($p < 0,0001$) e decrescente per il tempo medio di generazione al 100% delle schiuse ($p < 0,0001$) (Fig. 3.3.5).

L'indice di equiripartizione (E) si mantiene elevato fino alla generazione F5 dove ha il suo massimo ($E = 0,99$ per clone bc3, $E = 0,85$ per clone cc1). Dalla generazione F6 in poi il valore di E si riduce e si attesta su livelli sempre inferiori a 0,4 (Fig. 3.3.3). Tale riduzione significativa dell'indice di equiripartizione (E) è legata al fatto che il numero e la percentuale di uova durature e di uova non durature a schiusa ritardata diminuiscono fino a raggiungere valori nulli (Fig. 3.3.1; 3.3.2) mentre aumentano il numero e la percentuale di uova non durature a schiusa precoce (Fig. 3.3.1). Ne deriva che al variare di E variano le dinamiche di schiusa delle uova non durature. Infatti, partendo dalla F3 fino alla F5 il numero di schiuse ritardate aumenta, facendo così registrare schiuse anche oltre al 110° giorno (Fig. 3.3.6); dalla F6 in poi invece le schiuse ritardate si avvicinano a 0 e parallelamente per l'indice E si osservano i valori minimi. In Figura 3.3.5 è riportato il tasso di evoluzione relativo al tratto E.

Tabella 3.3.1 – Per ognuna delle 8 generazioni (F3 F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10) dei due cloni (bc3, cc1) della popolazione di Budrione sono indicati la numerosità del campione e i valori medi, con la relativa deviazione standard (DEV.ST) dei tratti misurati. E' indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R) e il numero di femmine che hanno dato origine ad almeno un piccolo. Il rapporto R/N indica la sopravvivenza alla riproduzione delle femmine isolate. L'età media alla morte (in giorni) è stata calcolata sia sul totale delle femmine isolate (E1) sia sul totale delle femmine che si sono riprodotte (E2). Il tempo medio di generazione è stato calcolato come: numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la nascita della sua prima figlia (TMG1), numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 50% delle uova non durature prodotte (TMG50) e numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 100% delle uova non durature prodotte (TMG100).

	Budrione															
	bc3								cc1							
	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Femmine isolate (N)	20	48	27	33	24	24	25	24	25	21	20	13	24	23	23	24
Femmine con uova ®	18	45	23	27	6	24	21	5	21	15	15	11	12	19	17	6
Femmine con piccoli	14	38	22	27	6	24	21	5	19	14	11	11	12	19	17	6
R/N (%)	90	94	85	82	25	100	84	21	84	71	75	85	50	83	74	25
Età alla morte 1	39,1	47,6	49,5	37,1	28,5	49,5	60,1	30,9	39,0	41,1	42,1	40,8	31,5	53,3	51,7	32,0
DEV.ST	12,79	13,63	13,78	15,17	12,99	13,91	15,81	17,09	9,00	13,34	16,64	11,57	12,40	17,83	18,83	15,75
Età alla morte 2	42,2	49,2	52,4	42,7	46,3	49,5	63,8	55,0	41,4	47,3	47,0	44,3	39,8	58,6	60,4	52,0
DEV.ST	9,97	12,64	10,89	9,85	8,94	13,91	11,77	12,39	7,40	8,28	14,60	8,19	10,76	13,23	9,55	6,16
Età alla riproduzione	21,7	22,7	28,3	18,3	15,7	19,9	26,9	30,6	20,3	21,0	30,4	15,5	19,3	18,8	24,5	27,3
DEV.ST	5,59	4,38	5,87	3,65	3,20	2,52	8,34	1,34	5,25	2,85	4,19	3,14	3,75	3,61	4,72	2,07
Tempo generazione 1	29,7	48,1	65,5	28,5	24,3	25,1	32,2	39,0	30,4	49,6	74,5	25,7	25,5	25,2	31,9	31,5
DEV.ST	9,05	28,00	39,08	7,52	8,33	4,10	10,13	6,00	10,86	26,45	35,68	5,76	7,76	4,14	8,14	2,74
Tempo generazione 50	65,0	71,4	99,8	35,5	32,5	39,3	54,1	46,8	49,1	98,1	117,0	32,8	33,6	40,9	47,4	42,8
DEV.ST	45,93	26,46	48,19	8,90	8,46	7,18	16,29	8,67	24,26	33,76	20,19	8,87	7,31	8,46	12,30	9,37
Tempo generazione 100	60,2	69,4	98,3	38,8	33,1	43,0	50,2	48,7	49,7	94,1	107,0	36,7	36,9	44,0	50,5	44,3
DEV.ST	38,29	31,51	51,53	21,87	11,05	17,16	21,56	11,54	28,76	38,99	40,48	30,42	12,46	19,03	22,49	9,72
Lunghezza	1,3	1,3	1,2	1,3	1,3	1,3	1,2	1,3	1,3	1,3	1,2	1,3	1,4	1,3	1,2	1,2
DEV.ST	0,06	0,09	0,09	0,10	0,01	0,06	0,08	0,16	0,10	0,08	0,07	0,08	0,03	0,05	0,07	0,08
Larghezza	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7
DEV.ST	0,06	0,05	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,12	0,04	0,05	0,05	0,04	0,03	0,05	0,05	0,03
Piccoli	20,2	32,9	14,9	54,2	84,2	51,7	67,8	20,0	18,9	26,0	16,0	60,1	36,7	84,2	69,2	41,3
DEV.ST	20,69	26,28	12,79	35,60	31,97	30,07	54,43	9,00	15,26	18,43	32,38	40,32	32,14	30,78	38,94	24,48
Uova durature	0,9	7,2	6,3	0,8	0,0	0,4	0,0	0,2	0,4	6,5	3,9	0,8	0,2	0,6	0,2	0,7
DEV.ST	1,39	7,91	5,77	1,97	0,00	0,97	0,22	0,45	1,09	6,17	8,01	2,40	0,58	1,54	0,53	1,03
Uova totali	21,1	40,0	21,1	55,0	84,2	52,1	67,9	20,2	19,2	32,5	19,9	60,9	36,8	84,7	69,4	42,0
DEV.ST	20,50	28,54	14,21	35,90	31,97	30,17	54,46	8,67	15,28	17,85	39,97	39,83	32,16	31,44	39,04	24,53
Tasso intr. di crescita (r)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
DEV.ST	0,08	0,03	0,04	0,07	0,05	0,03	0,04	0,02	0,07	0,05	0,01	0,05	0,04	0,04	0,04	0,03
Indice di equiripartizione (E)	0,5	0,6	1,0	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,7	0,8	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4
DEV.ST	0,01	0,01	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,03	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

a.

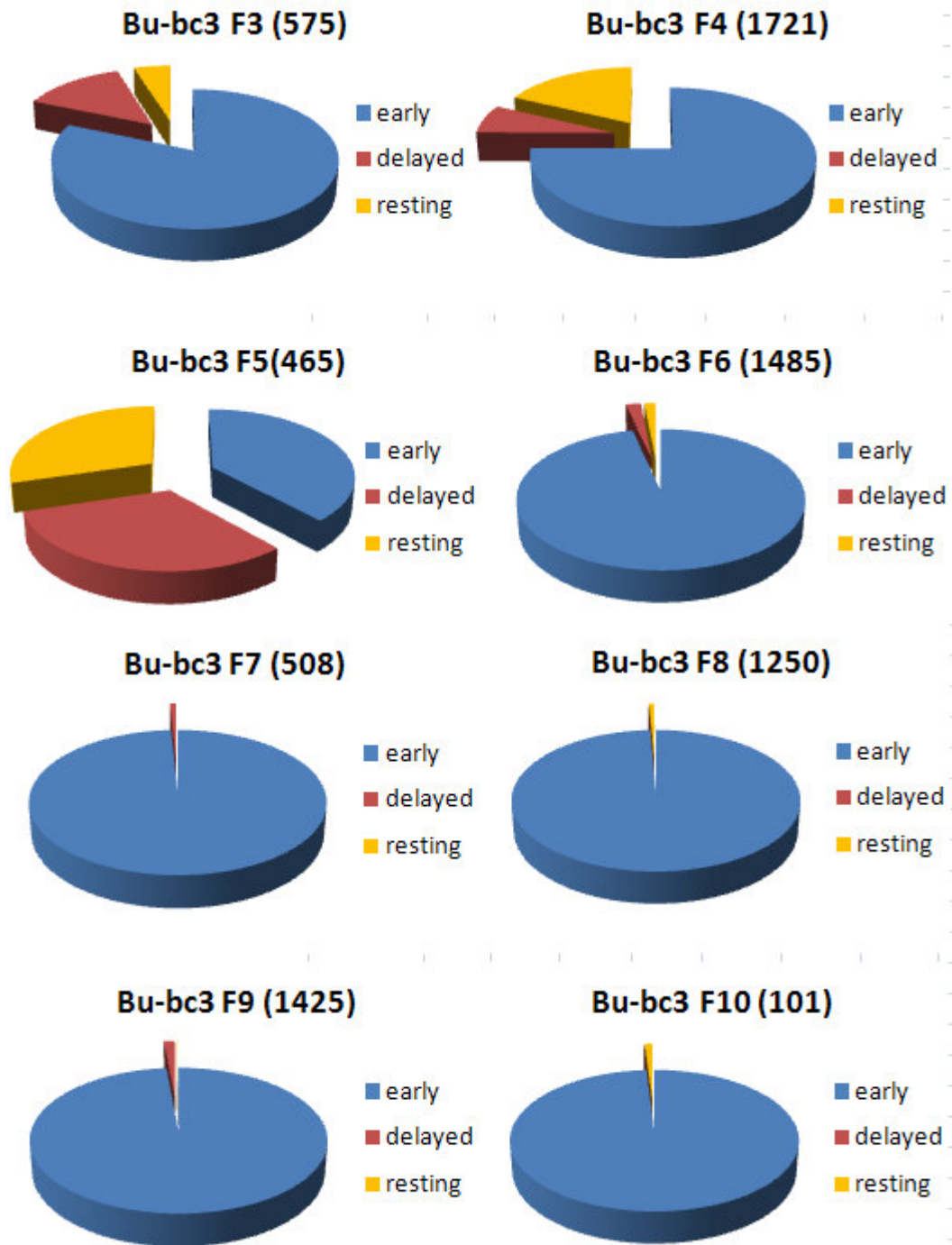


Figura 3.3.1 a. Proporzioe delle diverse tipologie di uova prodotte ('early'= uova non durature a schiusa precoce; 'delayed'= uova non durature a schiusa ritardata, 'resting'= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione de Budrione (nord Italia) per le generazioni F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10. E' indicato il clone (bc3), la generazione (Fx) e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte per generazione.

b.

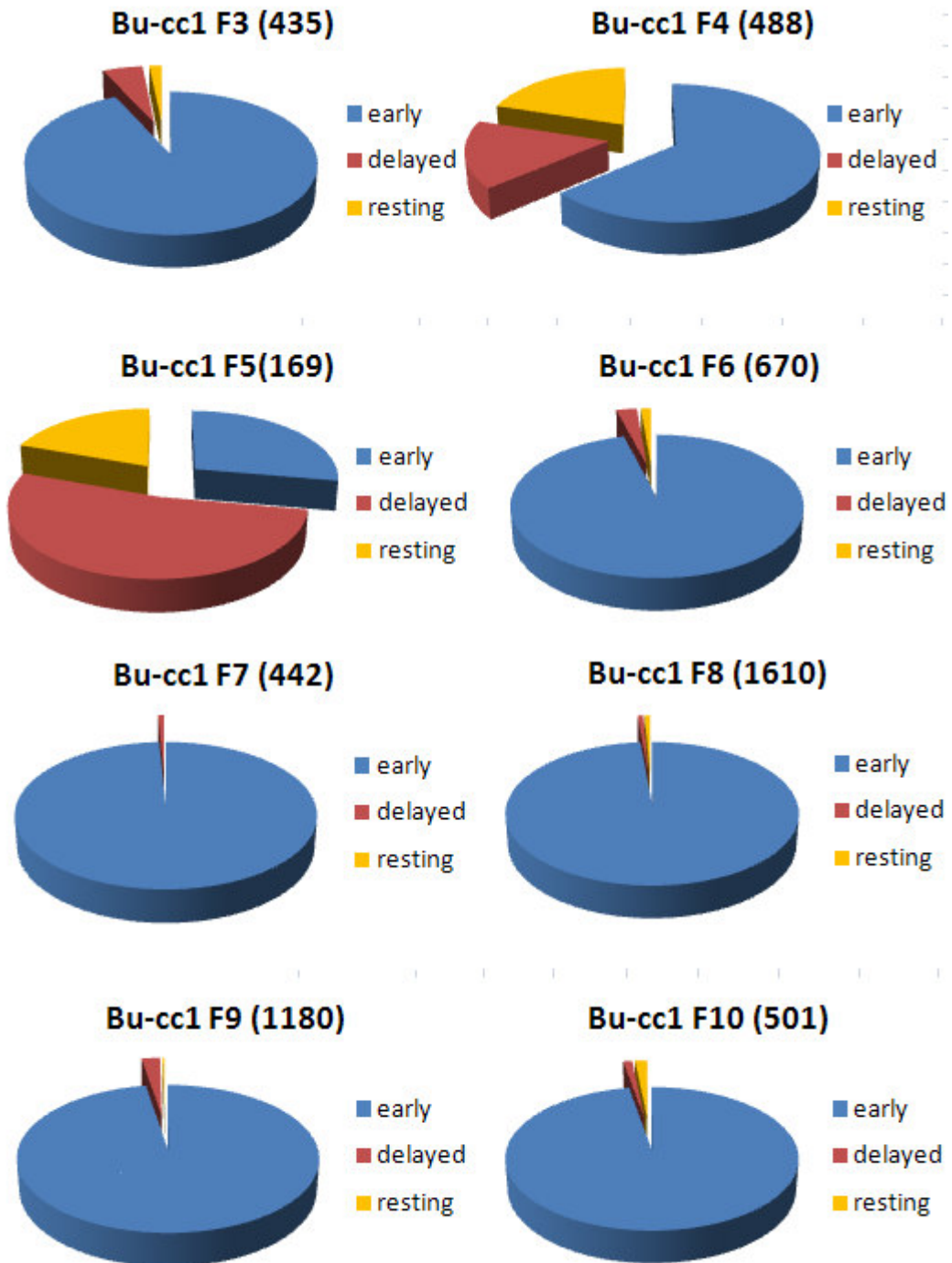


Figura 3.3.1 b. Proporzioe delle diverse tipologie di uova prodotte ('early'= uova non durature a schiusa precoce; 'delayed'= uova non durature a schiusa ritardata, 'resting'= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione di Budrione (nord Italia) per le generazioni F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10. E' indicato il clone (cc1), la generazione (Fx) e il numero totale di uova prodotte per generazione.

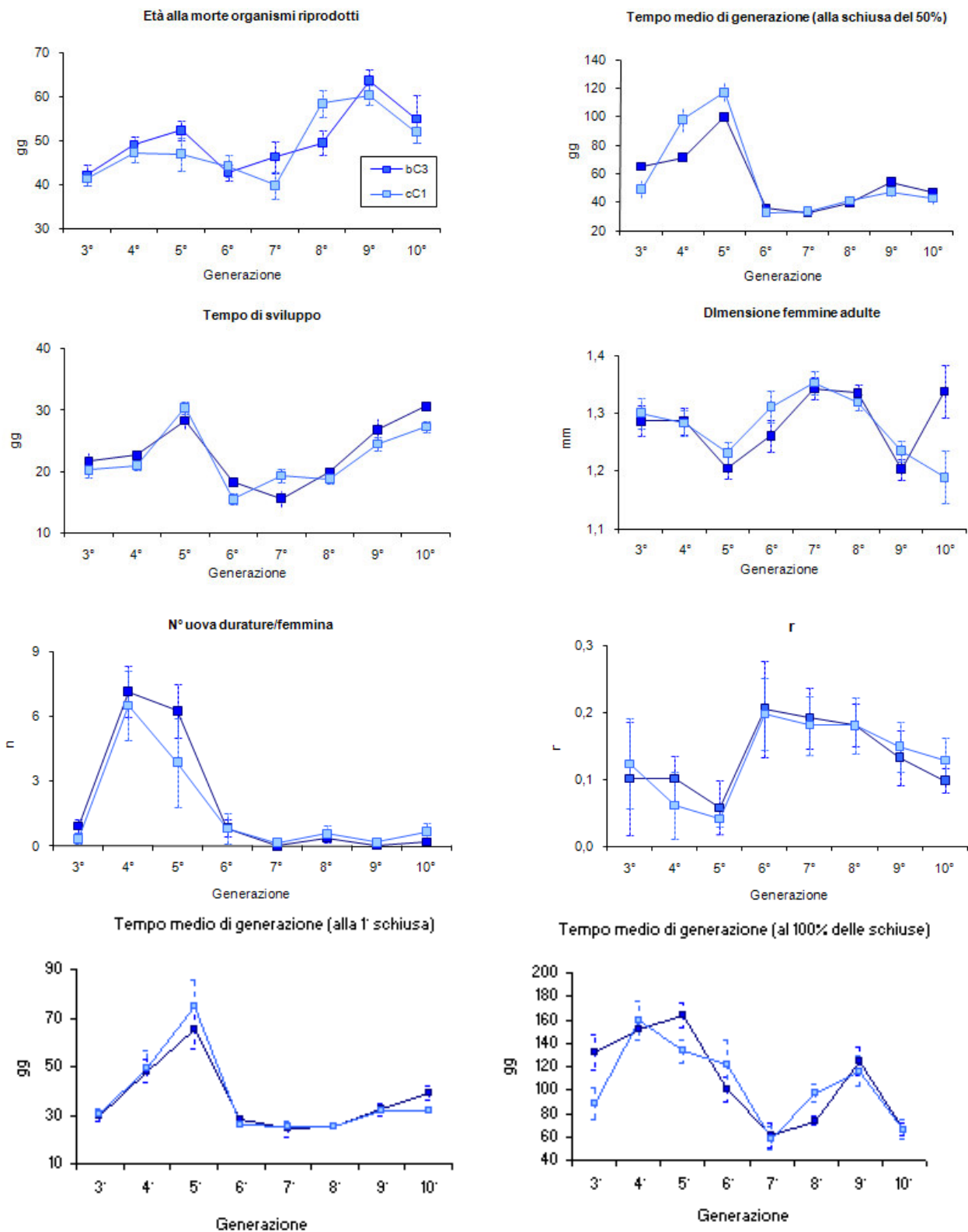


Figura 3.3.2 – Principali tratti vitali misurati per 8 generazioni successive (F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10) nei 2 cloni della popolazione di Budrione (bc3, cc1). I tratti riportati in figura sono: età alla morte organismi riprodotti, tempo medio di generazione (TMG1, TMG50, TMG100), tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso intrinseco di crescita misurato a misurato a 230 giorni (r).

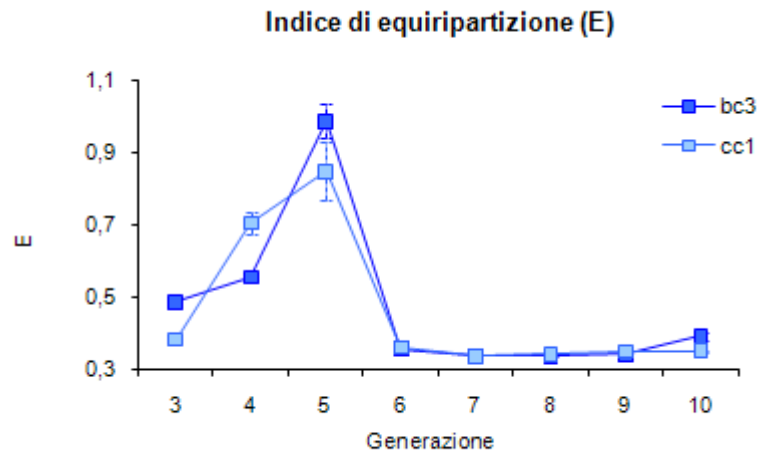


Figura 3.3.3 – Indice di equiripartizione (E).

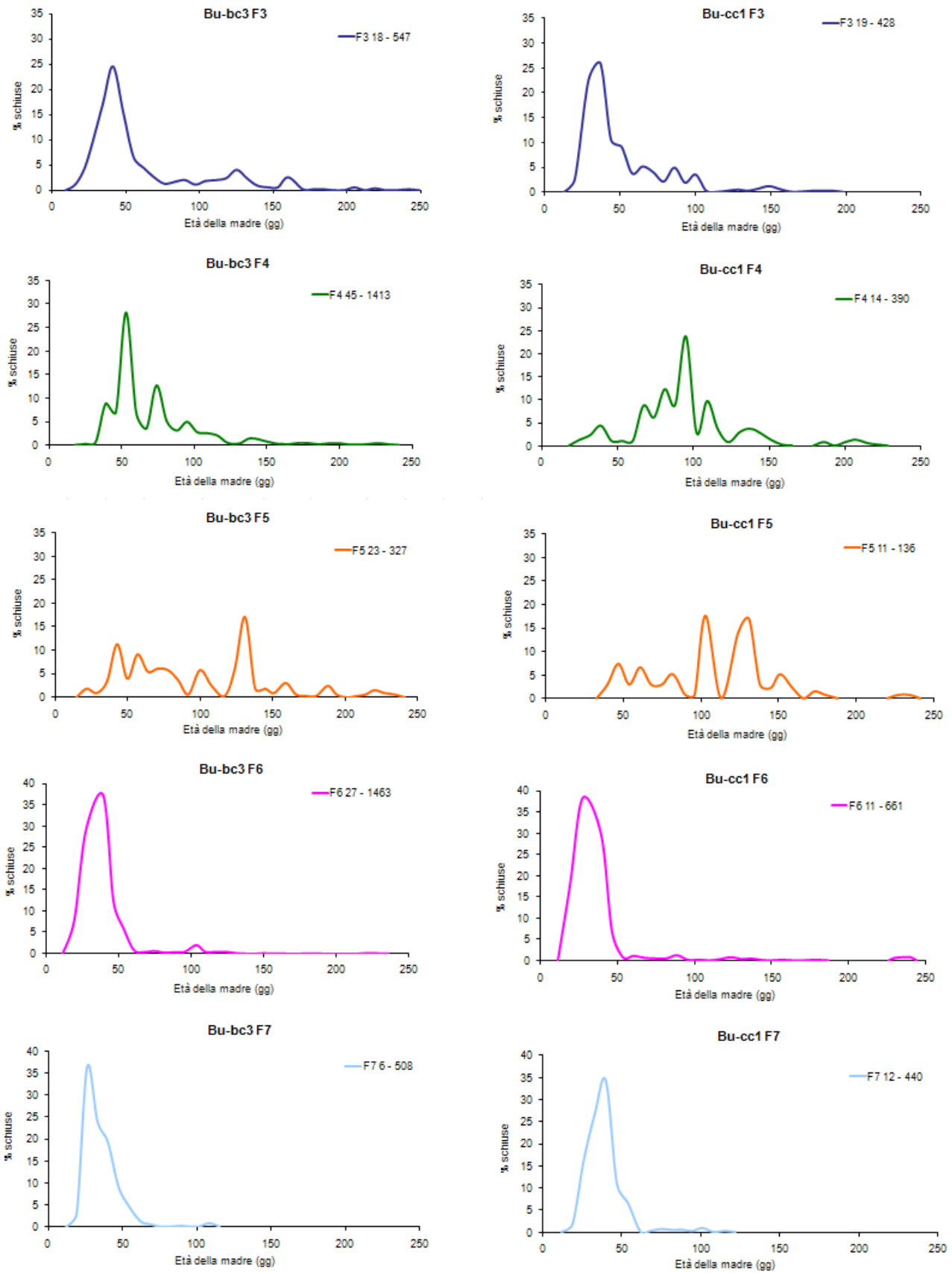


Figura 3.3.4 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni F3-F10 dei cloni bc3 e cc1 provenienti dalla popolazione di Budrione. In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse. Continua

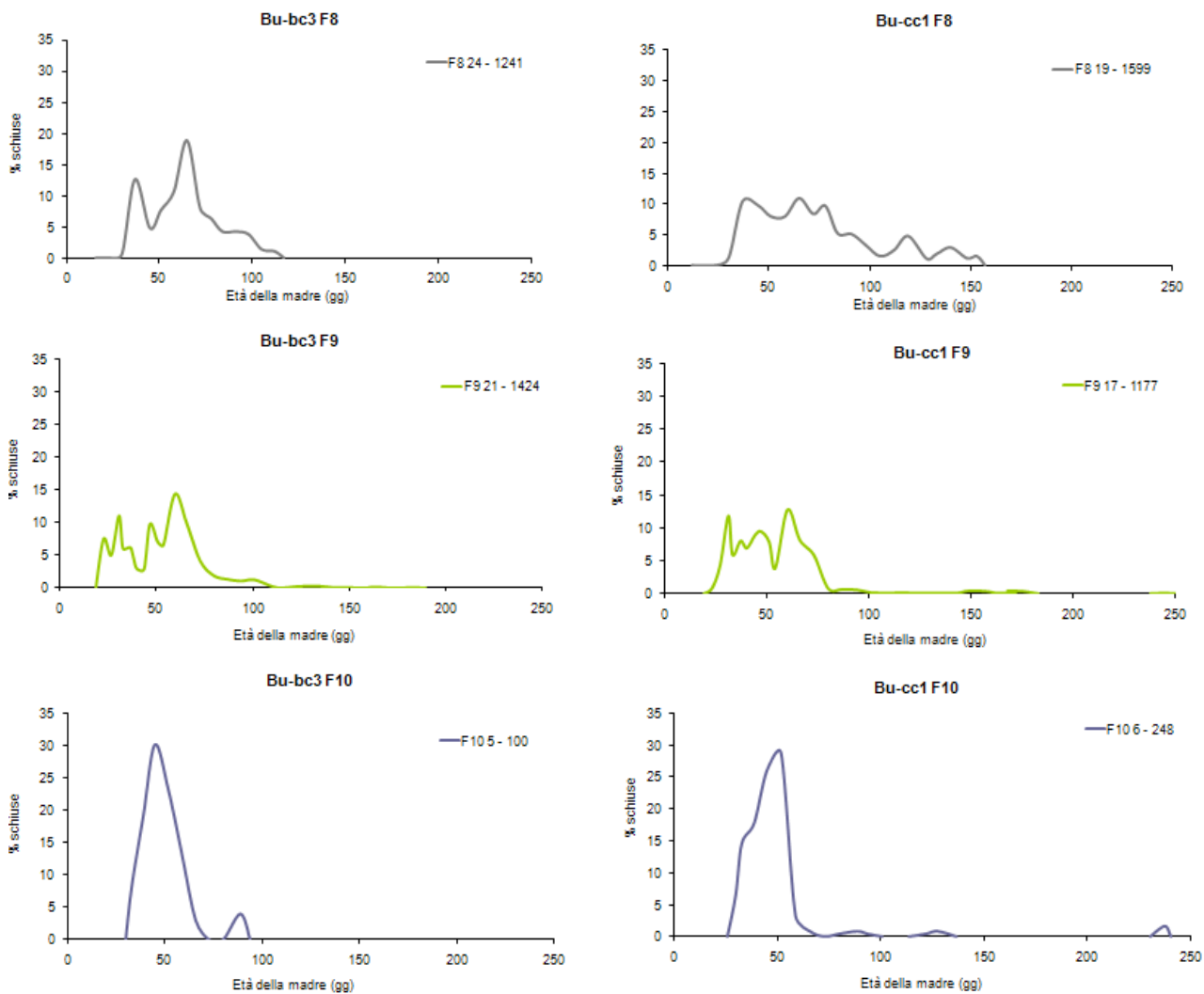


Figura 3.3.4 – Continua Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni F3-F10 dei cloni bc3 e cc1 provenienti dalla popolazione di Budrione. In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

Tabella 3.3.2- Tabella di output del test ANOVA.

Età alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	61	61	0.4922	0.4836
gen	7	11437	1634	13.1603	1.469e-14 ***
clone:gen	7	1233	176	1.4191	0.1976
Residuals	267	33149	124		

Tempo di sviluppo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	68.5	68.5	3.1224	0.07838 .
gen	7	4305.8	615.1	28.0562	< 2e-16 ***
clone:gen	7	216.9	31.0	1.4131	0.20007
Residuals	263	5766.1	21.9		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	579	579	1.5617	0.2126
gen	7	53249	7607	20.5290	< 2e-16 ***
clone:gen	7	811	116	0.3126	0.9479
Residuals	256	91525	371		

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	339	339	0.5900	0.443137
gen	7	143466	20495	35.6740	< 2.2e-16 ***
clone:gen	7	12043	1720	2.9946	0.004871 **
Residuals	256	147650	575		

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	5570	5570	2.3889	0.12343
gen	7	255531	36504	15.6569	< 2e-16 ***
clone:gen	7	33817	4831	2.0720	0.04699 *
Residuals	256	596870	2332		

Lunghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	0.00183	0.00183	0.2357	0.6278
gen	7	0.33741	0.04820	6.2086	1.264e-06 ***
clone:gen	7	0.07912	0.01130	1.4558	0.1847
Residuals	212	1.64592	0.00776		

Continua

Continua

Larghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	0.00366	0.00366	1.0157	0.3147
gen	7	0.21400	0.03057	8.4891	3.730e-09 ***
clone:gen	7	0.03186	0.00455	1.2637	0.2698
Residuals	212	0.76347	0.00360		

Piccoli prodotti

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	319	319	0.3411	0.559695
gen	7	113860	16266	17.3987	< 2.2e-16 ***
clone:gen	7	23075	3296	3.5260	0.001217 **
Residuals	271	253352	935		

Uova durature prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	166.2	166.2	10.2059	0.001566 **
gen	7	1900.0	271.4	16.6712	< 2.2e-16 ***
clone:gen	7	127.2	18.2	1.1161	0.353073
Residuals	270	4395.9	16.3		

Uova totali prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	26	26	0.0269	0.869885
gen	7	96403	13772	14.2435	9.598e-16 ***
clone:gen	7	24188	3455	3.5737	0.001074 **
Residuals	271	262027	967		

r

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	3.48e-07	3.48e-07	0.0001	0.9904
gen	7	0.62444	0.08921	36.9945	<2e-16 ***
clo:gen	7	0.02399	0.00343	1.4212	0.1972
Residuals	246	0.59318	0.00241		

Indice di equiripartizione (E)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	1323	1323	1.4428	0.230768
gen	7	124350	17764	19.3661	< 2.2e-16 ***
clo:gen	7	21985	3141	3.4239	0.001605 **
Residuals	262	240330	917		

Tabella 3.3.3 – Valori di significatività (p) relativi al confronto del tasso intrinseco di crescita misurato a 230 giorni (r) tra coppie di generazioni. Il confronto è stato effettuato con la funzione ‘pairwise t- test’ disponibile in R (versione 2.8).

	F10	F3	F4	F5	F6	F7	F8
F3	ns	-	-	-	-	-	-
F4	ns	0.00044	-	-	-	-	-
F5	0.04514	5.3e-10	0.02295	-	-	-	-
F6	4.5e-07	5.6e-07	< 2e-16	< 2e-16	-	-	-
F7	0.00370	ns	6.5e-09	1.3e-14	ns	-	-
F8	0.00174	0.03514	1.5e-13	< 2e-16	ns	ns	-
F9	ns	ns	0.00025	1.9e-10	2.1e-07	0.08017	0.02345

Tabella 3.3.4 - Tabella di output del test ANCOVA (fattore: generazione; covariata: tasso intrinseco di crescita).

Eta alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	7	0.54982	0.078546	32.3941	<2e-16 ***
eta	1	0.00221	0.002207	0.9100	0.3413
gen:eta	7	0.02229	0.003185	1.3134	0.2455
Residuals	200	0.48494	0.002425		

Tempo di sviluppo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	7	0.51597	0.073711	31.8617	< 2e-16 ***
tsvil	1	0.00767	0.007674	3.3173	0.07006 .
gen:tsvil	7	0.04368	0.006241	2.6975	0.01085 *
Residuals	198	0.45806	0.002313		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	7	0.52577	0.075110	31.6683	<2e-16 ***
tmg1	1	0.00092	0.000919	0.3873	0.5344
gen:tmg1	6	0.00953	0.001589	0.6700	0.6740
Residuals	193	0.45775	0.002372		

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	7	0.59315	0.084735	76.325	< 2.2e-16 ***
tmg50	1	0.17526	0.175258	157.862	< 2.2e-16 ***
gen:tmg50	7	0.13276	0.018965	17.083	< 2.2e-16 ***
Residuals	193	0.25312	0.001110		

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	7	0.60633	0.086618	40.4592	< 2.2e-16 ***
tmg100	1	0.00339	0.003394	1.5853	0.2092336
gen:tmg100	7	0.05480	0.007828	3.6564	0.0009084 ***
Residuals	193	0.50739	0.002141		

Lunghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	6	0.46435	0.077391	29.317	<2e-16 ***
lungh	1	0.00046	0.000457	0.173	0.6780
gen:lungh	6	0.01514	0.002524	0.956	0.4569
Residuals	163	0.43028	0.002640		

Continua

Continua

Larghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	6	0.46435	0.077391	28.8924	<2e-16 ***
largh	1	0.00100	0.001002	0.3739	0.5417
gen:largh	6	0.00826	0.001377	0.5143	0.7970
Residuals	163	0.43661	0.002679		

Piccoli prodotti

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	7	0.55325	0.079036	32.0330	<2e-16 ***
npicc	1	0.00019	0.000195	0.0790	0.7789
gen:npicc	7	0.01432	0.002046	0.8292	0.5641
Residuals	204	0.50334	0.002467		

Uova durature prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	7	0.55419	0.079170	34.9484	< 2.2e-16 ***
nud	1	0.00099	0.000993	0.4381	0.508770
gen:nud	6	0.05270	0.008784	3.8776	0.001093 **
Residuals	204	0.46213	0.002265		

Uova totali prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	7	0.55325	0.079036	32.1647	<2e-16 ***
ntot	1	0.00033	0.000327	0.1332	0.7155
gen:ntot	7	0.01625	0.002321	0.9448	0.4730
Residuals	204	0.50128	0.002457		

Indice di equiripartizione (E)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	7	0.62067	0.088668	38.0449	<2e-16 ***
E	1	0.00229	0.002294	0.9844	0.3221
gen:E	7	0.02321	0.003316	1.4228	0.1967
Residuals	241	0.56168	0.002331		

Tabella 3.3.5 - Tabella di output del test ANCOVA (fattore: clone; covariata: generazione)

Età						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
clone	1	10.38	10.384	2.5442	0.1118	
eta	1	169.12	169.121	41.4357	5.297e-10	***
clone:eta	1	9.69	9.694	2.3750	0.1244	
Residuals	279	1138.74	4.082			

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
clone	1	0.00008	0.000078	0.0188	0.8910	
tmg100	1	0.13816	0.138163	33.5068	2.128e-08	***
clone:tmg100	1	0.00693	0.006929	1.6805	0.1961	
Residuals	249	1.02674	0.004123			

Tabella 3.3.6 - a. In tabella sono riportati i valori di distanza calcolati con il test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto a coppie tra curve di schiusa delle uova non durature. Il confronto è stato effettuato tra generazioni entro clone e tra cloni entro generazione. b. Entro ogni popolazione, entro ogni clone per ogni generazione, lettere diverse indicano che le curve di schiusa sono significativamente diverse, lettere uguali indicano che le curve di schiusa non sono diverse.

a.

bu	bc3								cc1								bu	bc3-cc1
	F3	F4	5	6	7	8	9	3	4	5	6	7	8	9				
F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,26	
F4	0,21	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-	-	-	-	-	-	4	0,21	
5	0,15	0,17	-	-	-	-	-	0,21	0,15	-	-	-	-	-	-	5	0,28	
6	0,48	0,42	0,52	-	-	-	-	0,26	0,46	0,44	-	-	-	-	-	6	0,18	
7	0,54	0,58	0,58	0,41	-	-	-	0,31	0,38	0,37	0,24	-	-	-	-	7	0,12	
8	0,44	0,50	0,50	0,33	0,13	-	-	0,17	0,13	0,11	0,41	0,35	-	-	-	8	0,23	
9	0,31	0,36	0,38	0,24	0,29	0,21	-	0,23	0,21	0,25	0,35	0,45	0,29	-	-	9	0,33	
10	0,62	0,68	0,68	0,51	0,10	0,18	0,39	0,27	0,36	0,32	0,29	0,05	0,35	0,50	-	10	0,16	

b.

		3	4	5	6	7	8	9	10
bc3	A	AB	AC	D	EH	EFH	DEFG	H	
Budrione cc1	A	BI	CI	DL	EL	FI	I	HL	

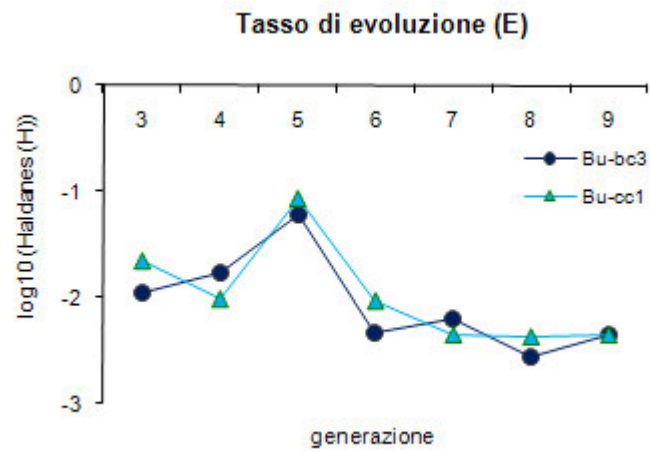


Figura 3.3.5 – Tasso di evoluzione per il tratto Indice di equiripartizione (E).

Spunti di DISCUSSIONE

Il tasso intrinseco di crescita delle linee clonali aumenta in modo significativo alla F6. Questo risultato indicherebbe che la diminuzione del tasso intrinseco di crescita (r) nelle prime 5 generazioni non è legata ad uno stress da laboratorio che riduce la fecondità, ma piuttosto ad una variazione della strategia riproduttiva. In generale, i valori medi dei tratti fenotipici si stabilizzano a partire dalla generazione F6 quando si riduce significativamente anche l'indice di equiripartizione (E) e le femmine clonali iniziano a produrre solo uova non durature a schiusa precoce.

Avendo escluso il ruolo della variabilità genetica, che assumiamo assente entro le linee clonali utilizzate, della variabilità ambientale (intesa come variabilità in termini di temperatura e fotoperiodo controllabili in cella termostata) e della microvariabilità (quale ad esempio l'effetto legato al posizionamento del pozzetto nella piastra che potrebbe avere influito sull'errore sperimentale), la possibile fonte di variabilità che può indurre tali modificazioni nel fenotipo nelle generazioni successive è l'effetto materno.

A questo riguardo possiamo fare alcune ipotesi.

1) l'effetto materno, legato alla nascita della generazione parentale da uova durature schiuse in natura, si manifesta, in molti tratti e, in particolare influisce sulle strategie riproduttive, oltre la generazione F2 e almeno fino alla F5. Il suo effetto sui tratti vitali si modifica di generazione in generazione e sembra esprimersi come un "effetto dose".

2) Dopo 6 generazioni di acclimatazione in laboratorio gli organismi cambiano strategia. Come se, attraverso un processo di acclimatazione transgenerazionale, (in condizioni costanti di temperatura e fotoperiodo 24 °C e fotoperiodo 12:12 L:B) le generazioni successive acquisissero "l'informazione" sulle condizioni che inizialmente percepite come indicatrici di imprevedibilità ambientale, vengono poi percepite come indicatrici di condizioni stabili e favorevoli. Le femmine clonali cambiano strategia e iniziano a produrre solo uova non durature a schiusa precoce. E' come se, con il passare delle generazioni si esaurisse l'effetto materno legato alla nascita in risaia (dalla generazione P alla generazione F5) e ne subentrasse uno nuovo legato all'allevamento in laboratorio. Gli organismi si acclimatano a una condizione ambientale che, con il passare delle generazioni assume diversa valenza: dalle prime generazioni viene precepita come di 'non predicibilità' e poi come favorevole e stabile nel tempo.

Come propongono Crean & Marshall (2009) gli effetti materni possono essere alla base della strategia adottata dagli organismi e che si manifestino sottoforma di 'diversified bet-hedging' in condizioni di imprevedibilità ambientale o di 'effetto di tipo anticipatorio' in condizioni di predicibilità.

In sintesi, saremmo in presenza di un effetto materno transgenerazionale in cui ciascuna generazione influenza la successiva mediante il trasferimento di un' 'informazione' che passa da madre in figlia. In questo scenario sembrerebbe che fattori ambientali come temperatura e fotoperiodo assumano valenza diversa a seconda delle condizioni in cui è cresciuta la generazione precedente.

Relativamente al tasso di evoluzione dell'equiripartizione (E), ci si attende che si selezioni il tratto "diversified bet-hedging" al passare delle generazioni (mantenendo il valore medio di E più o meno stabile con una deviazione standard che diminuisce all'aumentare della generazione). In effetti il tratto sembra selezionarsi positivamente fino alla F5 (trend crescente) poi, per effetto dell'ipotizzato cambio di strategia, il tasso di evoluzione diminuisce in corrispondenza del cambio di strategia e della selezione contro l'equiripartizione (andamento decrescente). Quindi, si fa spazio l'ipotesi che esistano fenomeni di 'evoluzione rapida' (*sensu* Hairston *et al.*, 2005). In questo contesto evoluzione rapida e acclimatazione sembrano coincidere; ciò getta luce sull'ipotesi di una convergenza tra tempi ecologici e tempi evolutivi (Hairston *et al.*, 2005; Hendry & Kinnison, 1999).

A questo punto ci si pongono ulteriori questioni.

1) Dopo 9 generazioni di acclimatazione gli organismi clonali di tipo W sono ancora in grado di rispondere alla variazione del fotoperiodo producendo uova durature quando vengono sottoposte a fotoperiodo inducente? Ovvero, le uova si sciudono solo sulla base delle "informazioni ottenute per via materna" o hanno un "margine di manovra".

2) Se le generazioni successive fossero state ottenute da uova non durature a schiusa tardiva piuttosto che da uova non durature a schiusa precoce avremmo osservato lo stesso tipo di strategia?

Negli esperimenti successivi cercheremo di dare una risposta a questi interrogativi.

ESPERIMENTO 4 – I tratti in femmine clonali di *H. incongruens* nate da uova non durature a schiusa ritardata

OBIETTIVO E GIUSTIFICAZIONE DELL'ATTIVITA'

Partendo dall'ipotesi che la schiusa tardiva delle uova non durature rappresenti una strategia per distribuire nel tempo il rischio legato alla riproduzione, oltre che a ridurre la competizione intraspecifica, con questo esperimento si vuole indagare se nascere da uova non durature e schiusa precoce o tardiva comporta differenze nei tratti del ciclo biologico e nelle strategie vitali adottate.

In questo esperimento sono stati analizzati i tratti del ciclo biologico di 5 generazioni successive di due linee clonali di *H. incongruens* provenienti dalla risaia di Budrione e originate da uova a schiusa tardiva.

Questi tratti sono poi stati confrontati con quelli descritti precedentemente e ottenuti in 5 generazioni successive originate da uova a schiusa precoce delle stesse 2 linee clonali (bc3, cc1) della risaia di Budrione. Le uova a schiusa tardiva e precoce sono state prodotte dalla generazione F5, quella che ha mostrato il massimo livello di equiripartizione.

MATERIALI E METODI

Sono state allestite, seguite, analizzate e confrontate le generazioni F6 e successive, F7, F8, F9, F10 di due linee clonali provenienti dalla risaia di Budrione (bc3, cc1). La generazione F6del è nata da uova a schiusa tardiva (avvenute tra 120-130 giorni dalla nascita delle loro madri) da madri F5. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli relativi alla generazione F6 (e successive, F7, F8, F9, F10) nata da uova a schiusa precoci (avvenute entro 30-40 giorni dalla nascita delle loro madri) di madri F5 i cui risultati sono stati presentati nell'esperimento 3 (Fig. 3.3.4). Da queste due generazioni (F6del e F6,) sono state originate da schiuse precoci le successive generazioni indicate rispettivamente come generazioni di linea 'early' (precoce) indicate come F7, F8, F9, F10 e generazioni di linea 'delayed' (tardiva) indicate come F7del, F8del, F9del, F10del.

Tutti gli organismi sono stati allevati anche in questo caso a 24°C e 12:12 L:B di fotoperiodo.

L'esperimento, è iniziato il 15 luglio 2008 ed è terminato il 31 Gennaio 2010.

In questo caso un test ANOVA multifattoriale oltre agli effetti legati a clone e generazione testa l'effetto singolo e delle interazioni del fattore legato alla nascita da schiuse precoci o tardive. Tale effetto è stato denominato 'htime'. E' stata inoltre effettuata un'analisi di regressione lineare per verificare l'esistenza di trend negli andamenti di alcuni tratti vitali con la generazione.

RISULTATI

L'effetto della generazione è altamente significativo su tutti i tratti (Tab. 3.4.2). L'effetto del clone è significativo solo nel caso del tasso intrinseco di crescita (r) e per l'indice di equiripartizione (E)

(Tab. 3.4.2). L'effetto legato ai tempi di schiusa (precoce o tardiva) è significativo per tutti i tratti esclusi il tempo di sviluppo e il numero di uova durature. Queste ultime sono prodotte in percentuali molto basse da entrambi i cloni in tutte le generazioni. Tutti i tratti sono influenzati anche dall'interazione tra 'generazione' e 'tempo di schiusa' (gen:htime).

Il tempo di sviluppo ($p < 0,0001$) e il tempo medio di generazione alla 1° schiusa ($p < 0,001$) tendono a diminuire con le generazioni nel caso delle generazioni 'delayed' e tendono a crescere nelle generazioni 'early' (Tab. 3.4.3) (Fig. 3.4.2). Sempre per gli organismi 'delayed' si osservano trend crescenti nella lunghezza del carapace ($p < 0,0001$) e nel tempo medio di generazione al 100% delle schiuse ($p < 0,0001$) (Tab. 3.4.3).

L'indice di equiripartizione (E) è inferiore a 0,5 per entrambi i cloni, in tutte le generazioni sia di origine 'early' che di origine 'delayed' (Fig. 3.4.3): vengono prodotte quasi esclusivamente uova non durature a schiusa precoce (Fig. 3.4.1), il numero di uova durature prodotto è trascurabile (Fig. 3.4.1; 3.4.2) e non si osservano picchi di schiusa dopo il 110° giorno (Fig. 3.4.4).

Il test di Kolmogorov Smirnov indica che solo per la generazione F10 dei cloni differenti fanno osservare curve di schiuse differenti. Entro il clone cc1 vi sono differenze significative tra le generazioni F6del-F10del, F7del-F10del e F9del-F10del. Altre differenze significative sono state individuate entro clone ed entro generazione, legate solamente all'origine precoce o ritardata delle uova: ad esempio le generazioni F9-F9del (per il clone cc1) e F10-F10del (sempre per il clone cc1) risultano avere curve di schiusa significativamente differenti (Tab. 3.4.4).

Tabella 3.4.1. –Per le batterie di generazioni originate da schiuse ritardate di uova non durature della generazione F5 di ciascuno dei 2 cloni (bc3, cc1) della popolazione di Budrione sono indicati la numerosità del campione e i valori medi, con la relativa deviazione standard (DEV.ST) dei tratti misurati. E' indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R) e il numero di femmine che hanno dato origine ad almeno un piccolo. L'età media alla morte (in giorni) è stata calcolata sia sul totale delle femmine isolate (E1) sia sul totale delle femmine che si sono riprodotte (E2). Il tempo medio di generazione è stato calcolato come: numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la nascita della sua prima figlia (TMG1), numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 50% delle uova non durature prodotte (TMG50) e numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 100% delle uova non durature prodotte (TMG100).

	Budrione									
	bc3del					cc1del				
	F6del	F7del	F8del	9°del	10°del	6°del	7°del	8°del	9°del	10°del
Femmine isolate (N)	30	29	23	24	24	17	12	25	24	24
Femmine con uova (R)	15	10	21	23	24	8	10	25	23	22
Femmine con piccoli	15	10	21	23	24	8	10	25	23	22
R/N (%)	50,0	34,5	91,3	95,8	100,0	47,1	83,3	100,0	95,8	91,7
Età alla morte (E1)	32,6	31,4	42,5	48,8	44,9	28,0	47,2	45,4	43,2	43,0
DEV. ST	15,30	15,74	7,90	11,32	8,68	15,91	14,90	9,28	10,92	13,16
Età alla morte (E2)	43,8	50,2	43,0	50,5	44,9	40,9	53,0	45,4	44,3	44,8
DEV. ST	13,06	7,18	8,15	8,13	8,68	11,08	4,59	9,28	9,72	12,07
Età alla riproduzione	23,9	23,5	20,7	20,4	20,3	26,5	23,2	21,1	20,7	20,5
DEV. ST	2,56	3,27	3,15	3,41	1,63	2,20	1,93	3,15	3,49	1,47
Tempo generazione (TMG1)	36,1	30,3	26,2	25,0	21,7	37,6	29,9	25,2	28,7	27,8
DEV. ST	12,49	5,19	4,84	0,00	4,10	10,66	2,96	3,67	9,09	4,87
Tempo generazione (TMG50)	39,4	43,4	32,7	41,7	34,3	39,4	42,7	35,8	39,8	41,5
DEV. ST	5,05	6,00	16,92	9,53	5,86	9,25	5,25	7,48	10,31	9,31
Tempo generazione (TMG100)	64,93	54,20	83,52	91,35	84,42	52,13	67,00	84,04	102,61	118,00
DEV. ST	22,74	9,17	39,46	36,26	54,44	16,32	14,28	43,57	30,87	76,72
Lunghezza	1,2	1,3	1,4	1,3	1,4	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4
DEV. ST	0,04	0,03	0,07	0,08	0,08	0,08	0,04	0,10	0,08	0,24
Larghezza	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,9
DEV. ST	0,12	0,04	0,04	0,05	0,05	0,07	0,05	0,07	0,05	0,03
Piccoli/femmina	26,9	40,1	39,4	75,0	68,1	14,9	58,7	44,6	61,8	52,1
DEV. ST	29,12	31,93	17,64	24,19	29,22	18,35	32,72	19,62	31,34	26,13
Uova durature/femmina	0,2	0,0	0,3	0,1	2,0	0,0	0,0	0,3	0,0	2,2
DEV. ST	0,56	0,00	0,56	0,34	3,34	0,00	0,00	0,98	0,21	4,66
Uova totali/femmina	27,1	40,1	39,7	75,2	70,0	14,9	58,7	44,8	61,9	54,3
DEV. ST	29,19	31,93	18,01	24,30	29,80	18,35	32,72	19,93	31,37	26,90
Tasso intrin. di crescita (r)	0,15	0,14	0,20	0,18	0,22	0,11	0,15	0,20	0,17	0,17
DEV. ST	0,019	0,020	0,065	0,035	0,043	0,025	0,020	0,044	0,037	0,037
Indice di equiripartizione (E)	0,34	0,34	0,36	0,34	0,34	0,33	0,33	0,35	0,34	0,34
DEV. ST	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001

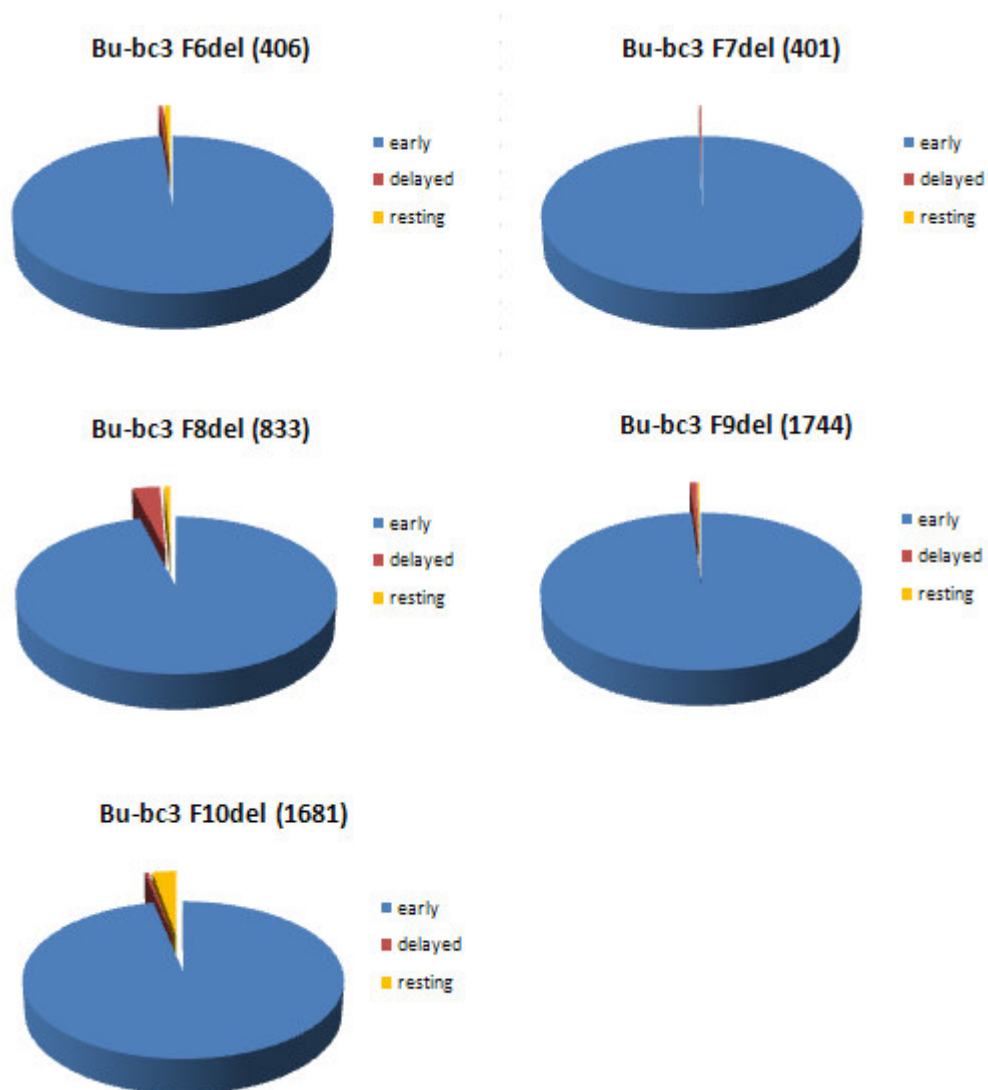


Figura 3.4.1 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione di Budrione (nord Italia) per i cloni bc3 e cc1 per le generazioni originate da schiusa ritardate di uova non durature della generazione F5. E’ indicato il clone, la generazione e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte (continua).

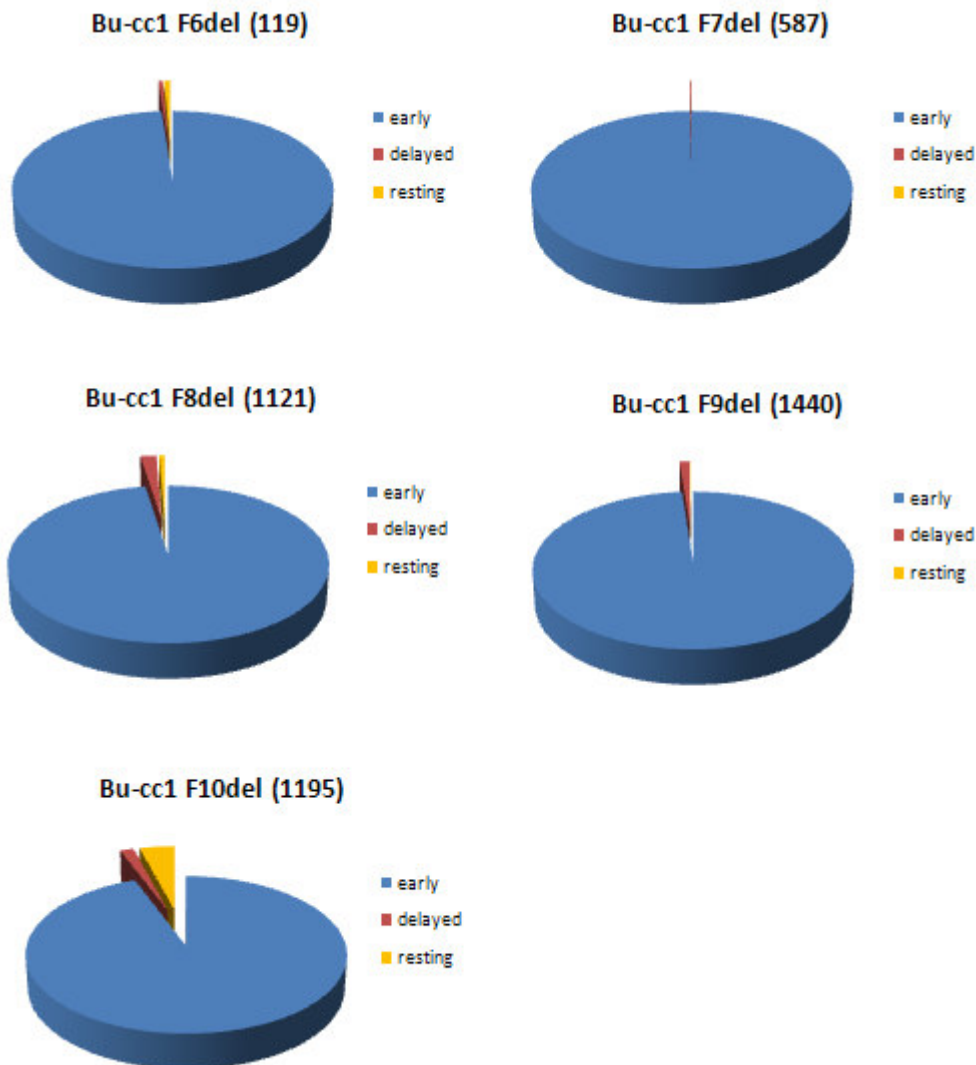


Figura 3.4.1 – continua Proporzioe delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione di Budrione (nord Italia) per i 2 cloni bc3 e cc1 per le generazioni originate da schiuse ritardate di uova non durature della generazione F5. E’ indicato il clone, la generazione e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte.

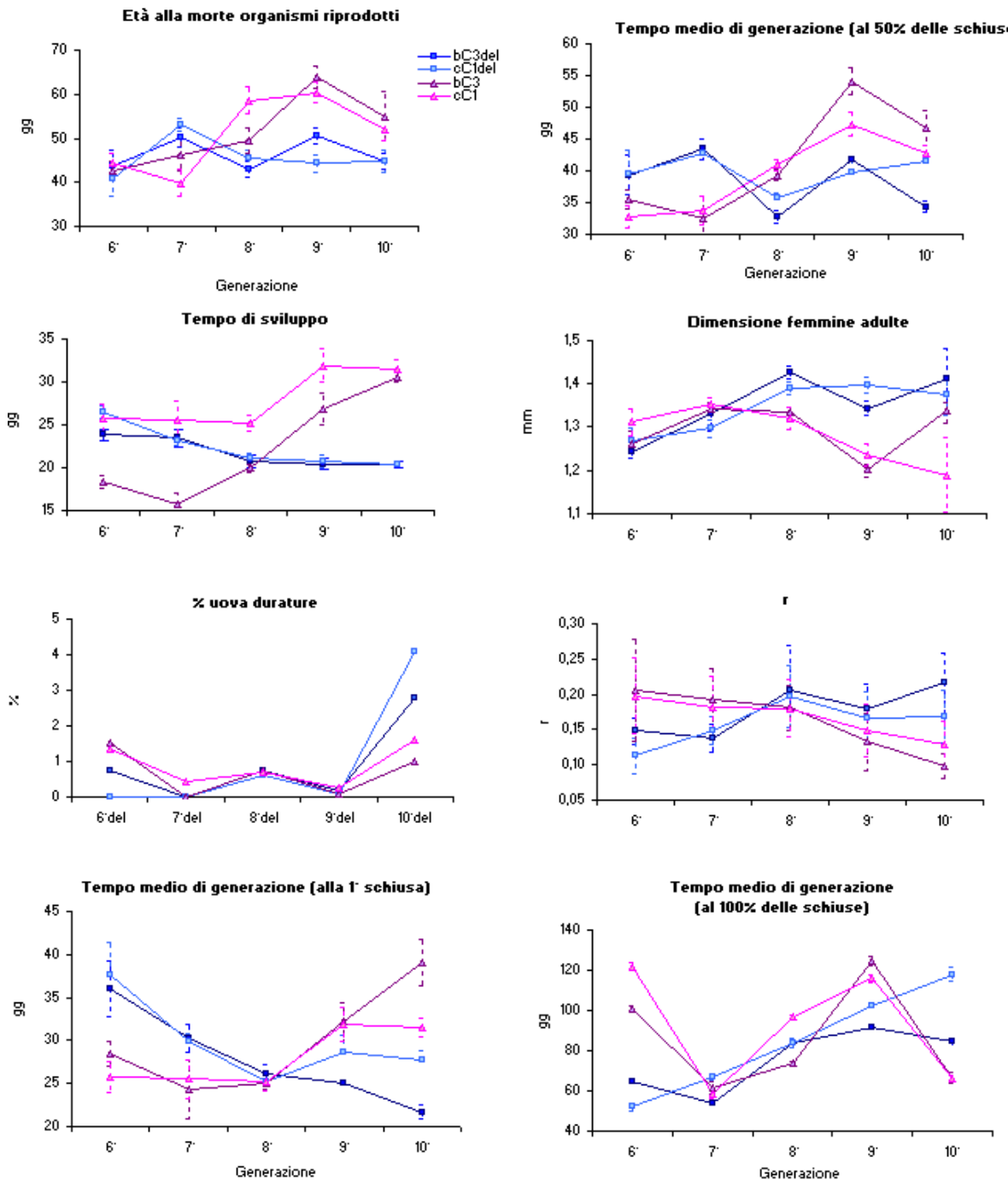


Figura 3.4.2 – Principali tratti vitali misurati per i 2 cloni della popolazione di Budrione (bc3, cc1) per le batterie di generazioni originate da schiuse ritardate di uova non durature della generazione F5. I tratti riportati in figura sono: età alla morte degli organismi riprodotti, tempo medio di generazione (alla schiusa del 50% dei piccoli), tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso intrinseco di crescita misurato a misurato a 230 giorni (r). A confronto sono portate le corrispondenti generazioni originate da uova non durature a schiusa precoce delle generazione F5.

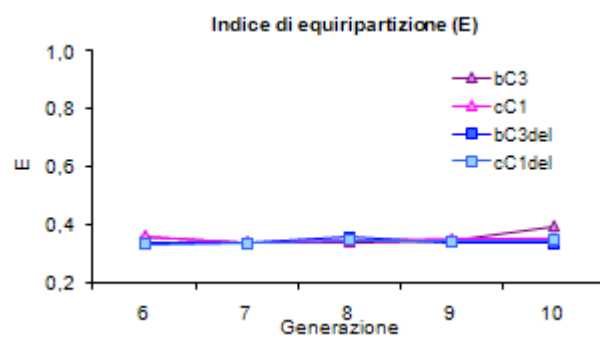


Figura 3.4.3 – Indice di equiripartizione (E).

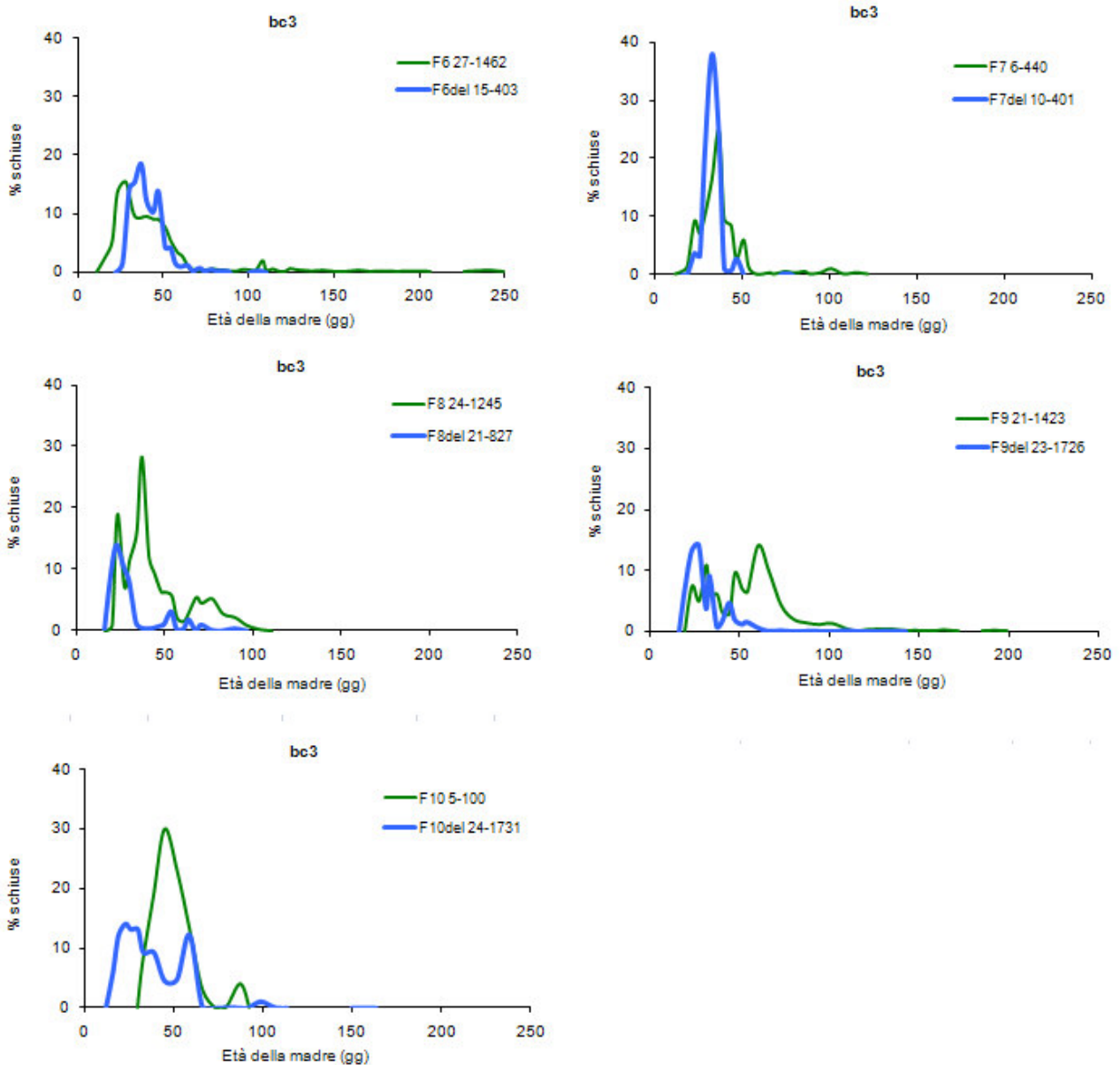


Figura 3.4.4 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni F6del, F7del, F8del, F9del, F10del dei cloni bc3 e cc1 provenienti dalla popolazione di Budrione (Bu) e originate da schiuse ritardate di uova non durature della generazione F5. In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse. Continua

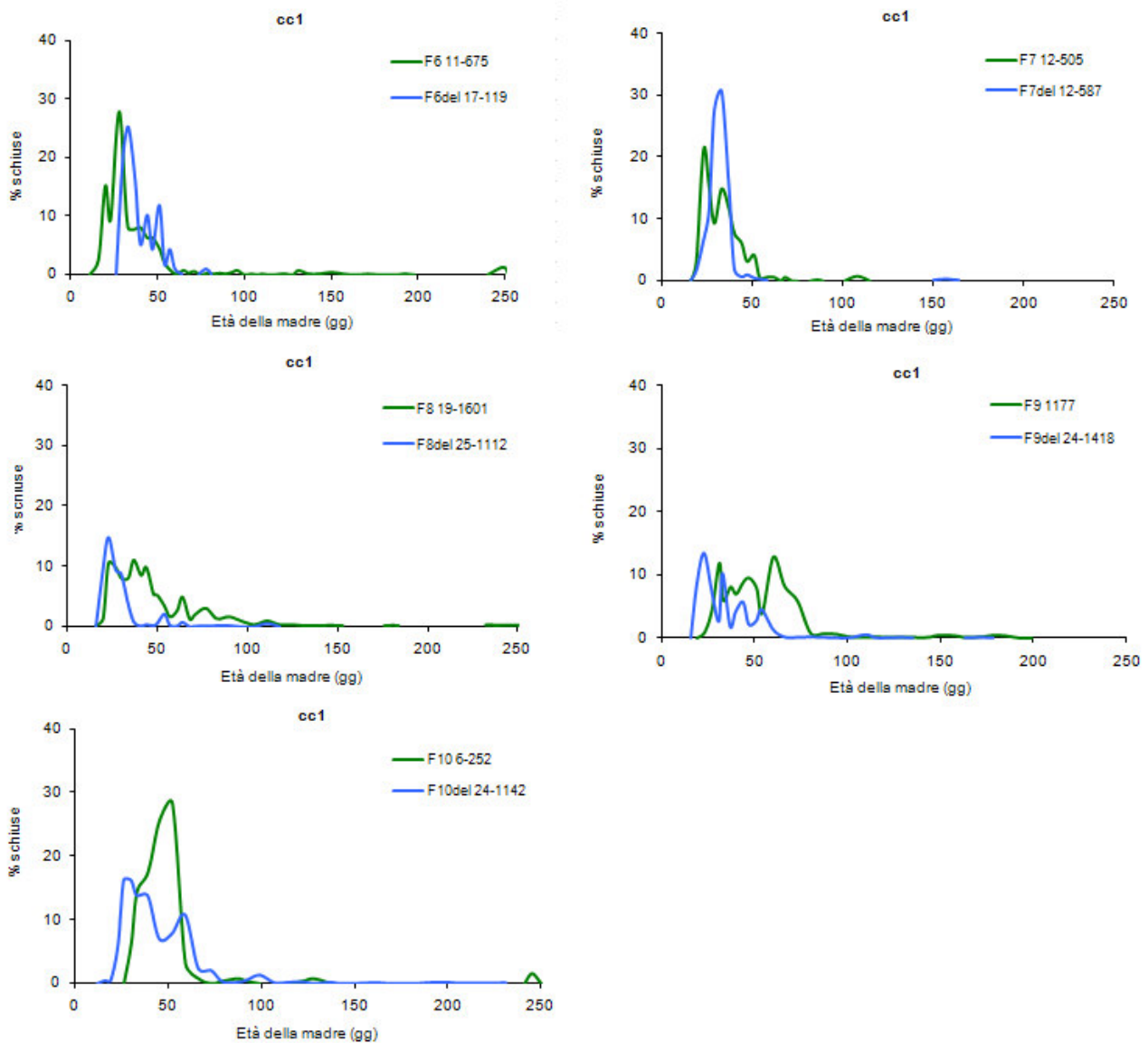


Figura 3.4.4 – continua Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni F6del, F7del, F8del, F9del, F10del dei cloni bc3 e cc1 provenienti dalla popolazione di Budrione (Bu) e originate da schiuse ritardate di uova non durature della generazione F5. In legenda, per ciascuna generazione, è riportato il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

Tabella 3.4.2- Tabella di output del test ANOVA.

Età alla morte 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	242	242	1.2186	0.27023
gen	4	24547	6137	30.9186	< 2.2e-16 ***
htime	1	195	195	0.9848	0.32155
clo:gen	4	2400	600	3.0234	0.01765 *
clo:htime	1	13	13	0.0676	0.79499
gen:htime	4	9754	2439	12.2861	1.728e-09 ***
clo:gen:htime	4	1258	315	1.5848	0.17723
Residuals	449	89118	198		

Età alla morte 2

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	10	10	0.0988	0.75346
gen	4	4746	1186	11.2873	1.463e-08 ***
htime	1	3642	3642	34.6449	1.030e-08 ***
clo:gen	4	1226	307	2.9162	0.02160 *
clo:htime	1	38	38	0.3652	0.54606
gen:htime	4	4460	1115	10.6068	4.576e-08 ***
clo:gen:htime	4	417	104	0.9922	0.41197
Residuals	309	32480	105		

Tempo di sviluppo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	13.5	13.5	0.9919	0.32005
gen	4	486.7	121.7	8.9503	7.511e-07 ***
htime	1	0.2	0.2	0.0162	0.89892
clo:gen	4	31.0	7.8	0.5704	0.68429
clo:htime	1	46.3	46.3	3.4041	0.06599 .
gen:htime	4	2383.5	595.9	43.8372	< 2.2e-16 ***
clo:gen:htime	4	124.2	31.1	2.2851	0.06018 .
Residuals	309	4200.3	13.6		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	19.6	19.6	0.4487	0.50344
gen	4	1428.1	357.0	8.1817	2.790e-06 ***
htime	1	0.7	0.7	0.0163	0.89845
clo:gen	4	203.0	50.7	1.1630	0.32719
clo:htime	1	59.5	59.5	1.3633	0.24387
gen:htime	4	3035.6	758.9	17.3916	7.108e-13 ***
clo:gen:htime	4	402.9	100.7	2.3083	0.05801 .
Residuals	307	13396.3	43.6		

continua

continua

Tempo medio di generazione (al 50 % delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	33.5	33.5	0.3534	0.552617
gen	4	5409.9	1352.5	14.2589	1.152e-10 ***
htime	1	888.0	888.0	9.3617	0.002417 **
clo:gen	4	1074.5	268.6	2.8320	0.024870 *
clo:htime	1	421.3	421.3	4.4418	0.035902 *
gen:htime	4	3299.2	824.8	8.6956	1.188e-06 ***
clo:gen:htime	4	200.2	50.1	0.5277	0.715485
Residuals	307	28360.6	94.9		

Tempo medio di generazione (al 100 % delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	5998	5998	3.1082	0.0788824 .
gen	4	64841	16210	8.4001	1.910e-06 ***
htime	1	7691	7691	3.9854	0.0467710 *
clo:gen	4	7314	1828	0.9475	0.4367342
clo:htime	1	227	227	0.1178	0.7316504
gen:htime	4	46305	11576	5.9987	0.0001163 ***
clo:gen:htime	4	11690	2922	1.5144	0.1977765
Residuals	307	598233	1930		

Lunghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	0.00370	0.00370	0.4519	0.50226
gen	4	0.40390	0.10098	12.3317	5.974e-09 ***
htime	1	0.24257	0.24257	29.6242	1.580e-07 ***
clo:gen	4	0.07096	0.01774	2.1667	0.07424 .
clo:htime	1	0.00238	0.00238	0.2902	0.59070
gen:htime	4	0.23982	0.05995	7.3220	1.645e-05 ***
clo:gen:htime	4	0.02176	0.00544	0.6643	0.61753
Residuals	193	1.58033	0.00819		

Larghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	0.00240	0.00240	0.6243	0.4304
gen	4	0.17363	0.04341	11.2794	3.028e-08 ***
htime	1	0.17764	0.17764	46.1581	1.319e-10 ***
clo:gen	4	0.02222	0.00555	1.4432	0.2213
clo:htime	1	0.00024	0.00024	0.0635	0.8014
gen:htime	4	0.13025	0.03256	8.4612	2.606e-06 ***
clo:gen:htime	4	0.01658	0.00415	1.0774	0.3689
Residuals	193	0.74276	0.00385		

continua

continua

Piccoli prodotti

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	42	42	0.0418	0.8381239
gen	4	22539	5635	5.6035	0.0002289 ***
htime	1	7264	7264	7.2238	0.0075829 **
clo:gen	4	9523	2381	2.3675	0.0527481 .
clo:htime	1	1503	1503	1.4947	0.2224117
gen:htime	4	30761	7690	7.6475	6.902e-06 ***
clo:gen:htime	4	16460	4115	4.0921	0.0030162 **
Residuals	310	311734	1006		

Uova durature prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	0.13	0.13	0.0398	0.84200
gen	4	115.14	28.78	9.0332	6.526e-07 ***
htime	1	0.02	0.02	0.0050	0.94371
clo:gen	4	1.00	0.25	0.0788	0.98876
clo:htime	1	0.12	0.12	0.0377	0.84619
gen:htime	4	32.67	8.17	2.5633	0.03847 *
clo:gen:htime	4	0.01	0.001775	0.0006	1.00000
Residuals	309	984.62	3.19		

Uova totali prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	47	47	0.0464	0.8296774
gen	4	21836	5459	5.3657	0.0003440 ***
htime	1	7282	7282	7.1574	0.0078621 **
clo:gen	4	9499	2375	2.3342	0.0556354 .
clo:htime	1	1532	1532	1.5058	0.2207174
gen:htime	4	32543	8136	7.9967	3.801e-06 ***
clo:gen:htime	4	16474	4119	4.0482	0.0032492 **
Residuals	310	315387	1017		

r

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	0.22311	0.22311	116.3577	< 2.2e-16 ***
gen	4	0.89062	0.22265	116.1210	< 2.2e-16 ***
htime	1	0.01723	0.01723	8.9855	0.002966 **
clo:gen	4	0.72359	0.18090	94.3442	< 2.2e-16 ***
clo:htime	1	0.00782	0.00782	4.0806	0.044334 *
gen:htime	4	0.07472	0.01868	9.7422	2.171e-07 ***
clo:gen:htime	4	0.05389	0.01347	7.0266	2.108e-05 ***
Residuals	279	0.53496	0.00192		

continua

continua

Indice di equiripartizione (E)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clo	1	0.000426	0.000426	82.6898	< 2e-16 ***
gen	4	0.033852	0.008463	1641.5223	< 2e-16 ***
htime	1	0.000974	0.000974	188.9519	< 2e-16 ***
clo:gen	4	0.000576	0.000144	27.9073	< 2e-16 ***
clo:htime	1	0.000022	0.000022	4.1707	0.04193 *
gen:htime	4	0.014428	0.003607	699.6275	< 2e-16 ***
clo:gen:htime	4	0.013148	0.003287	637.5722	< 2e-16 ***
Residuals	327	0.001686	0.000005		

Tabella 3.4.3- Tabella di output del test ANOVA effettuato sui risultati della regressione lineare tra alcuni tratti vitali oggetto d'interesse e la generazione. a. linee 'delayed'. b. linee 'early'.

a.

Tempo di sviluppo

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	30.2760	1.3636	22.203	< 2e-16 ***
gen	-1.0500	0.1604	-6.545	6.06e-10 ***

Residual standard error: 2.84 on 179 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.1931, Adjusted R-squared: 0.1886
 F-statistic: 42.84 on 1 and 179 DF, p-value: 6.061e-10

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	48.2897	3.2291	14.955	< 2e-16 ***
gen	-2.4661	0.3799	-6.492	8.08e-10 ***

Residual standard error: 6.725 on 161 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.1906, Adjusted R-squared: 0.186
 F-statistic: 42.14 on 1 and 161 DF, p-value: 8.078e-10

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-7.591	21.245	-0.357	0.721
gen	11.147	2.503	4.454	1.49e-05 ***

Residual standard error: 44.1 on 161 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.1008, Adjusted R-squared: 0.09569
 F-statistic: 19.84 on 1 and 161 DF, p-value: 1.491e-05

Lunghezza

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	1.080447	0.061026	17.705	< 2e-16 ***
gen	0.034056	0.007504	4.538	1.48e-05 ***

Residual standard error: 0.1026 on 108 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.1602, Adjusted R-squared: 0.1524
 F-statistic: 20.6 on 1 and 108 DF, p-value: 1.478e-05

Tabella 3.4.3- Tabella di output del test ANOVA effettuato sui risultati della regressione lineare tra alcuni tratti vitali oggetto d'interesse e la generazione. a. linee 'delayed'. b. linee 'early'.

b.

Tempo di sviluppo

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	30.2760	1.3636	22.203	< 2e-16 ***
gen	-1.0500	0.1604	-6.545	6.06e-10 ***

Residual standard error: 2.84 on 179 degrees of freedom
(67 observations deleted due to missingness)
Multiple R-squared: 0.1931, Adjusted R-squared: 0.1886
F-statistic: 42.84 on 1 and 179 DF, p-value: 6.061e-10

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	48.2897	3.2291	14.955	< 2e-16 ***
gen	-2.4661	0.3799	-6.492	8.08e-10 ***

Residual standard error: 6.725 on 161 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.1906, Adjusted R-squared: 0.186
F-statistic: 42.14 on 1 and 161 DF, p-value: 8.078e-10

Lunghezza

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	1.080447	0.061026	17.705	< 2e-16 ***
gen	0.034056	0.007504	4.538	1.48e-05 ***

Residual standard error: 0.1026 on 108 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.1602, Adjusted R-squared: 0.1524
F-statistic: 20.6 on 1 and 108 DF, p-value: 1.478e-05

Tabella 3.4.4 -In tabella sono riportati i valori di distanza calcolati con il test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto a coppie tra curve di schiusa delle uova non durature della batteria di generazioni originate da uova non durature a schiusa ritardata della generazione F5 (batteria di generazioni 'del'). Il confronto è stato effettuato tra generazioni entro clone (a) e tra cloni entro generazione (c). Lettere diverse indicano che le curve di schiusa sono significativamente diverse, lettere uguali indicano che le curve di schiusa non sono significativamente diverse (b). Entro ciascun clone ogni curva di schiusa delle generazioni 'del' è stata confrontata con quella della corrispondente generazione originata da schiuse precoci (d).

a.

bc3	6del	7del	8del	9del	10del
6del	-	-	-	-	-
7del	0,18	-	-	-	-
8del	0,09	0,2	-	-	-
9del	0,11	0,27	0,09	-	-
10del	0,14	0,24	0,17	0,14	-
cc1	6del	7del	8del	9del	10del
6del	-	-	-	-	-
7del	0,05	-	-	-	-
8del	0,21	0,18	-	-	-
9del	0,23	0,2	0,15	-	-
10del	0,46	0,43	0,24	0,32	-

b.

	6del	7del	8del	9del	10del
bc3	AB	AC	AD	AE	AF
cc1	B	BC	BDHI	BEH	GI

c.

	bc3-cc1
6del	0,17
7del	0,04
8del	0,13
9del	0,09
10del	0,31

d.

	6-6del	7-7del	8-8del	9-9del	10-10del
bc3	0,4	0,22	0,27	0,23	0,27
cc1	0,46	0,14	0,31	0,35	0,36

Spunti di DISCUSSIONE

Il fatto di nascere da uova non durature a schiusa precoce piuttosto che da uova non durature a schiusa tardiva implica differenze nei principali tratti vitali degli organismi e quindi differenze in termini di fitness. Mentre negli organismi originati da schiuse precoci della F5 (linea 'early') la fitness diminuisce al passare delle generazioni (i tempi di sviluppo aumentano, il tempo medio di generazione alla 1° schiusa e al 50 % della schiusa aumentano, il tasso intrinseco di crescita diminuisce), nelle femmine della linea 'delayed' non si osserva una diminuzione della fitness. Al contrario, i tempi di sviluppo diminuiscono e il tasso intrinseco di crescita aumenta.

L'ipotesi di partenza era che le schiuse tardive rappresentassero una strategia per distribuire nel tempo il rischio legato alla riproduzione oltre che a ridurre la competizione intraspecifica. Una possibile interpretazione dei risultati raccolti è che gli organismi originati da schiuse tardive abbiano valori elevati di fitness che si mantengono costanti al passare delle generazioni per vincere la competizione sul lungo termine con organismi nati da schiuse precoci caratterizzati da una fitness che diminuisce con le generazioni.

Le differenze tra linee 'early' e linee 'delayed' non si osservano invece a livello della strategia di ripartizione del rischio, che, dopo avere assunto la massima espressione in termini di equiripartizione alla generazione F5 si riduce in modo significativo fino a valori minimi ($E < 0,4$) sia negli organismi nati da schiuse precoci che in quelli nati da schiuse tardive.

Come osservato negli esperimenti 3.1 e 3.2. il diversified bet-hedging è una strategia diffusa negli organismi del genere *Heterocypris* e la schiusa ritardata di uova non durature è parte integrante di tale strategia.

ESPERIMENTO 5 – L'effetto materno è l'unico determinante della strategia di schiusa?

OBIETTIVO E GIUSTIFICAZIONE DELL'ATTIVITA'

Nell'esperimento 3 abbiamo osservato un cambio di strategia nel passaggio da F5 a F6 nei due cloni di Budrione (bc3, cc1). Tale cambio di strategia comporta una riduzione del polifenismo: a partire dalla F6 non si osservano più schiuse ritardate e non vengono più prodotte uova durature.

Un'ipotesi è che si tratti di un fenomeno di acclimatazione transgenerazionale. In questo caso ci si chiede se le femmine clonali, dopo aver perso i retaggi provenienti dagli antenati nati in ambiente naturale, mantengano la capacità di rispondere alla variazione delle condizioni sperimentali.

Partendo da questa premessa si pongono le seguenti domande:

-dopo 8 generazioni a condizioni controllate e non predittive, come si comportano gli organismi clonali di tipo W posti in condizioni che si prefigurano come indicatrici dell'arrivo della stagione estiva (24°C, 16:8 L:B)?

-tali condizioni inducono un incremento nella produzione di uova di durata per far fronte all'asciutta estiva?

MATERIALI E METODI

E' stato condotto un esperimento in cui sono stati confrontati i tratti vitali della generazione F9 delle due linee clonali (bc3, cc1) di Budrione allevate a 24°C, 12:12 L:B (rielaborazione risultati dell'esperimento 3) e a 24°C, 16:8 L:B. Per entrambe le condizioni sperimentali la generazione F9 è stata allestita utilizzando neonati dalle schiuse precoci di F8 a 24°C, 12:12 L:B.

L'esperimento, iniziato il 19 Marzo 2008 è terminato il 1 Novembre 2009.

In questo caso il test ANOVA multifattoriale, oltre all'effetto del clone testa anche l'effetto singolo e delle interazioni del fattore legato alla condizione sperimentale di allevamento: condizione di imprevedibilità (24°C, 12:12 L:B) e condizione di prevedibilità dell'arrivo della stagione calda (24°C, 16:8 L:B).

RISULTATI

Tutti i tratti considerati variano significativamente ($p < 0,01$) al variare delle condizioni di allevamento (Tab. 3.5.1). Tale effetto risulta altamente significativo ($p < 0,0001$) per, il tempo medio di generazione (alla 1° schiusa e alla schiusa del 50% dei piccoli) e numero di piccoli prodotti. Età alla morte, numero di uova durature e tasso intrinseco di crescita (r) sono significativi per $p < 0,001$. Tempi di sviluppo e lunghezza, variano con $p < 0,01$. Le femmine poste a condizioni di 24°C e 16:8 L:B hanno tempi di sviluppo e tempi medi di generazione più elevati rispetto a femmine mantenute a condizioni di 24°C, 12:12 (Fig. 3.5.2). Il tasso intrinseco di crescita diminuisce e il numero di uova durature prodotte aumenta passando da fotoperiodo breve a fotoperiodo lungo (condizione di

impredicibilità → condizione di predicibilità). L'effetto 'clone' non è mai risultato significativo se non relativamente alle variazioni dell'indice di equiripartizione ($p < 0,01$), mentre l'effetto dell'interazione "condizione sperimentale:clone" è risultato significativo per il tempo medio di generazione (alla schiusa del 50% dei piccoli) ($p < 0,01$) e per il tasso intrinseco di crescita ($p < 0,001$). L'indice di equiripartizione aumenta all'aumentare del fotoperiodo. Tale aumento è riconducibile prevalentemente all'aumento della proporzione di uova durature piuttosto che all'aumento della quota di uova non durature a schiusa ritardata. Le dinamiche di schiusa delle uova non durature non sono statisticamente diverse nelle diverse condizioni ambientali (Tab. 3.5.3).

Tabella 3.5.1 – Per ognuna delle 2 condizioni sperimentali (24°C, L:B:12:12; 24°C, L:B:16:8) e per ciascuno dei 2 cloni (bc3, cc1) della popolazione di Budrione sono indicati la numerosità del campione e i valori medi, con la relativa deviazione standard (DEV.ST) dei tratti misurati. E' indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R) e il numero di femmine che hanno dato origine ad almeno un piccolo. L'età media alla morte (in giorni) è stata calcolata sia sul totale delle femmine isolate (E1) sia sul totale delle femmine che si sono riprodotte (E2). Il tempo medio di generazione è stato calcolato come: numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la nascita della sua prima figlia (TMG1), numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 50% delle uova non durature prodotte (TMG50) e numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 100% delle uova non durature prodotte (TMG100).

	<i>bc3</i>		<i>cc1</i>	
	<i>F9 (24°, 12:12)</i>	<i>F9 (24°, 16:8)</i>	<i>F9 (24°, 12:12)</i>	<i>9° (24°, 16:8)</i>
<i>Femmine isolate</i>	33	24	13	24
<i>Femmine con uova</i>	26	13	11	10
<i>Femmine con piccoli</i>	26	13	11	7
<i>R/N (%)</i>	79	54	85	42
<i>Età alla morte 1</i>	37,1	33,9	40,8	35,0
<i>DEV.ST</i>	2,6	3,9	3,2	3,5
<i>Età alla morte 2</i>	43,4	51,0	44,3	51,3
<i>DEV.ST</i>	1,6	4,7	2,3	3,9
<i>Età alla riproduzione</i>	18,3	30,3	15,5	32,7
<i>DEV.ST</i>	0,6	3,4	0,9	1,4
<i>Tempo generazione1</i>	28,1	51,3	25,7	65,3
<i>DEV.ST</i>	1,3	5,4	1,6	8,8
<i>Tempo generazione50</i>	54,2	64,5	48,8	82,8
<i>DEV.ST</i>	15,8	21,6	13,6	32,5
<i>Tempo generazione100</i>	50,2	66,3	50,5	77,6
<i>DEV.ST</i>	21,6	27,8	22,5	45,6
<i>Lunghezza</i>	1,3	1,3	1,3	1,3
<i>DEV.ST</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Larghezza</i>	0,7	0,8	0,8	0,8
<i>DEV.ST</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Piccoli</i>	54,2	13,0	60,1	8,3
<i>DEV.ST</i>	6,2	3,2	11,2	2,8
<i>Uova durature</i>	0,0	3,8	0,2	3,1
<i>DEV.ST</i>	0,2	7,4	0,5	4,8
<i>Uova totali</i>	64,8	20,6	69,4	14,8
<i>DEV.ST</i>	55,1	19,7	39,0	9,4
<i>Tasso intr. di crescita r</i>	0,1	0,1	0,2	0,1
<i>DEV.ST</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Indice di equiripartizione E</i>	0,3	0,6	0,4	0,6
<i>DEV.ST</i>	0,0	0,1	0,0	0,1

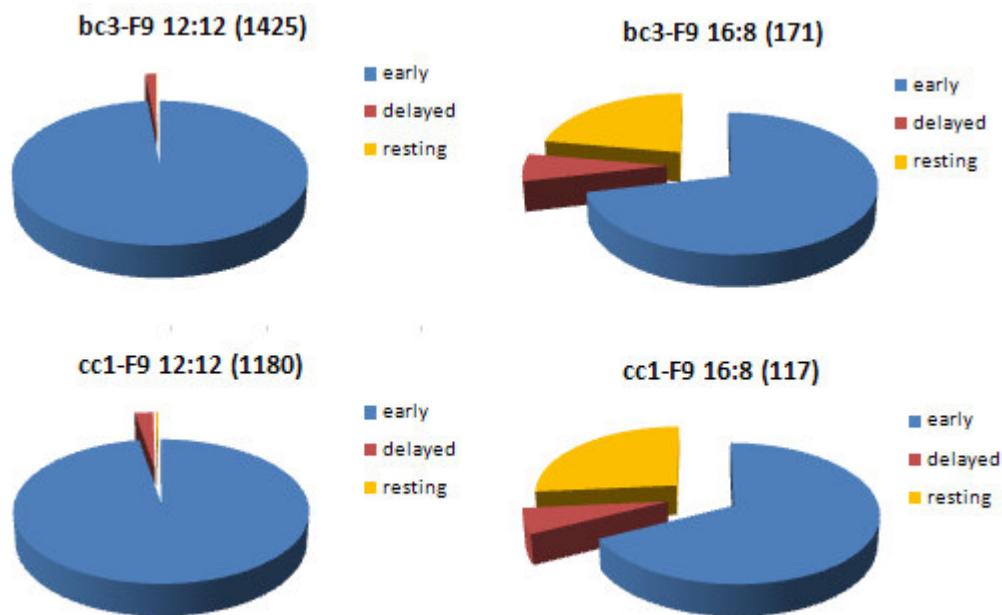


Figura 3.5.1 –Proporzione delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione di Budrione (nord Italia) per i 2 cloni bc3 e cc1 alle 2 condizioni sperimentali testate. E’ indicato il clone, la generazione, le condizioni sperimentali (L:B) e, tra parentesi, il numero totale di uova prodotte.

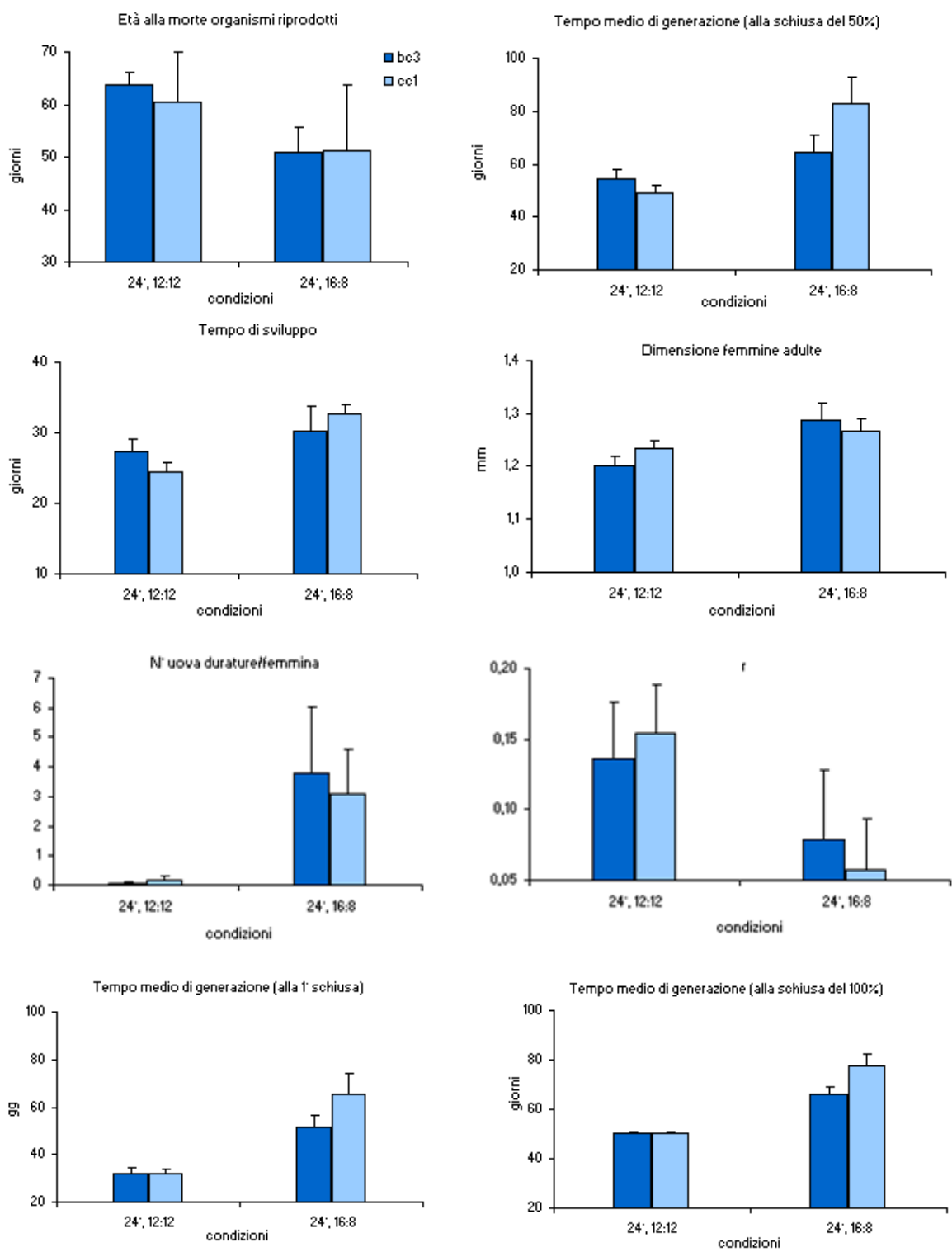


Figura 3.5.2 – Variazione dei principali tratti vitali misurati per i due cloni della popolazione di Budrione (bc3, cc1) alle due condizioni sperimentali testate (24°C, L:B:12:12; 24°C, L:B:16:8).

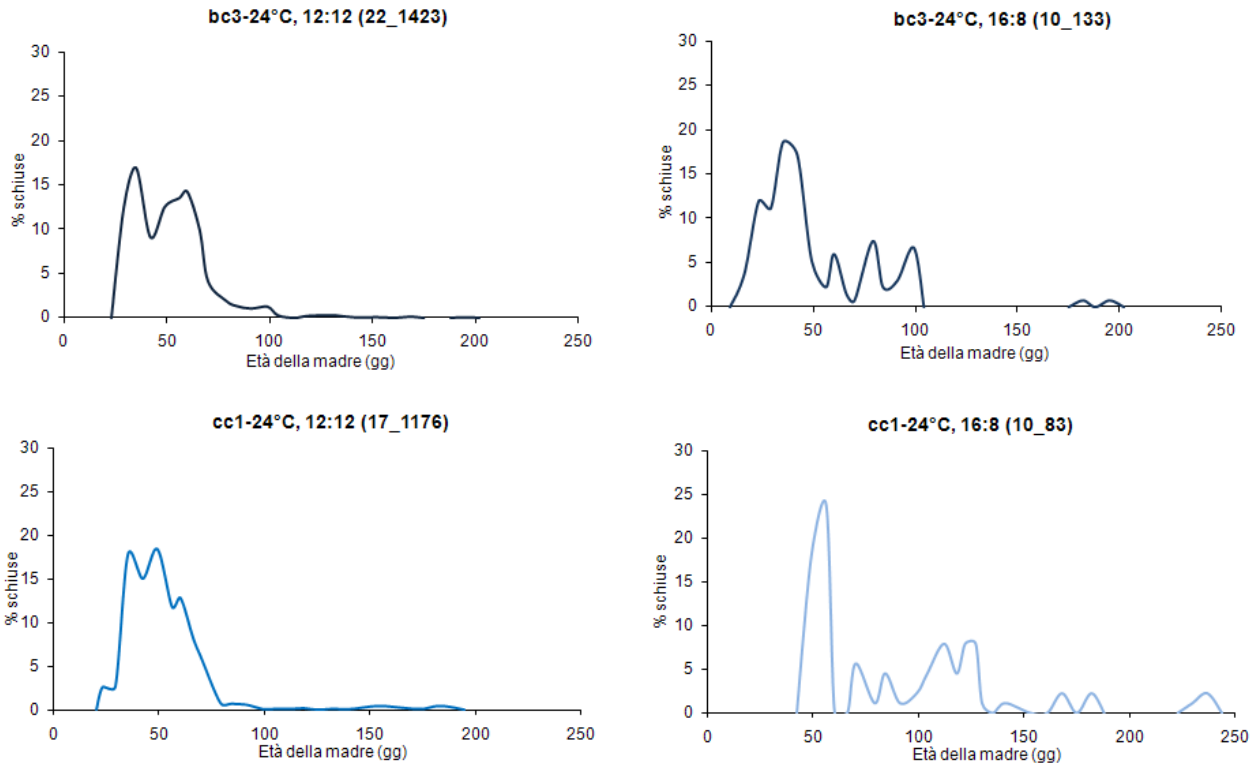


Figura 3.5.3 -Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dai 2 cloni della popolazione di Budrione (bc3, cc1) alle 2 condizioni sperimentali testate (24°C, L:B:12:12; 24°C, L:B:16:8). In legenda è riportato: il nome del clone, le condizioni sperimentali (T°C, L:B) il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

Tabella 3.5.2- Tabella di output del test ANOVA.

Età alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	406.5	406.5	1.2786	0.2611
trat	1	11139.4	11139.4	35.0385	5.5e-08 ***
clone:trat	1	551.7	551.7	1.7352	0.1910
Residuals	92	29248.5	317.9		

Età alla morte organismi riprodotti

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	105.3	105.31	0.7421	0.392722
trat	1	1586.6	1586.55	11.1801	0.001493 **
clone:trat	1	41.9	41.89	0.2952	0.589123
Residuals	55	7805.0	141.91		

Tempo di sviluppo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	6.4	6.44	0.1117	0.73954
trat	1	396.4	396.40	6.8715	0.01130 *
clone:trat	1	86.9	86.94	1.5071	0.22481
Residuals	55	3172.8	57.69		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	374.3	374.3	1.6195	0.2087
trat	1	8392.9	8392.9	36.3114	1.647e-07 ***
clone:trat	1	642.4	642.4	2.7793	0.1014
Residuals	53	12250.3	231.1		

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	143.4	143.4	0.3549	0.5537986
trat	1	6575.8	6575.8	16.2735	0.0001707 ***
clone:trat	1	1716.6	1716.6	4.2481	0.0440349 *
Residuals	53	22224.3	404.1		

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	335	335.5	0.1131	0.7380
trat	1	6	6.1	0.0021	0.9640
clone:trat	1	5348	5348.1	1.8027	0.1852
Residuals	53	154269	2966.7		

Lunghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	0.007589	0.007589	1.0675	0.3077
trat	1	0.031805	0.031805	4.4736	0.0407 *
clone:trat	1	0.000549	0.000549	0.0772	0.7825
Residuals	40	0.284375	0.007109		

Continua

Continua

Larghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	0.001988	0.001988	0.3864	0.537726
trat	1	0.041295	0.041295	8.0262	0.007189 **
clone:trat	1	0.000686	0.000686	0.1333	0.716968
Residuals	40	0.205804	0.005145		

Piccoli prodotti

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	49	49	0.0297	0.8638
trat	1	36331	36331	22.1495	1.745e-05 ***
clone:trat	1	303	303	0.1850	0.6688
Residuals	55	90215	1640		

Uova durature prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	0.02	0.024	0.0019	0.965496
trat	1	148.46	148.459	11.6659	0.001203 **
clone:trat	1	2.27	2.270	0.1783	0.674446
Residuals	55	699.93	12.726		

Uova totali prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	47	47	0.0277	0.8684
trat	1	31835	31835	18.9490	5.887e-05 ***
clone:trat	1	358	358	0.2132	0.6461
Residuals	55	92402	1680		

r

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	0.005545	0.005545	1.9565	0.167302
trat	1	0.023024	0.023024	8.1236	0.006072 **
clo:trat	1	0.028778	0.028778	10.1539	0.002337 **
Residuals	57	0.161550	0.002834		

E

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
clone	1	0.00518	0.00518	4.7802	0.03306 *
trat	1	1.51717	1.51717	1399.9697	< 2e-16 ***
clone:trat	1	0.00004	0.00004	0.0335	0.85538
Residuals	55	0.05960	0.00108		

Tabella 3.5.3 - (a) In tabella sono riportati i valori di distanza calcolati con il test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto a coppie tra curve di schiusa delle uova non durature. Il confronto è stato effettuato tra condizioni sperimentali entro clone e tra cloni entro condizione sperimentale. (b) Lettere diverse indicano che le curve di schiusa sono significativamente diverse, lettere uguali indicano che le curve di schiusa non sono significativamente diverse.

a.

	bc3
bu	24°, 12:12
24°, 16:8	0,11

	cc1
bu	24°, 12:12
24°, 16:8	0,23

b.

bu	bc3-cc1
24°, 12:12	0,21
24°, 16:8	0,11

		24°, 12:12	24°, 16:8
	bc3	A	A
bu	cc1	A	A

Spunti di DISCUSSIONE

Le linee clonali che dopo 8 generazioni di acclimatazione a condizioni di 24°C e fotoperiodo 12:12 L:B (percepite come condizioni che non danno indicazione sul futuro idroperiodo) producono prevalentemente uova non durature, mantengono la capacità di rispondere (producendo forme durature) se spostate a condizioni predittive del disseccamento della risaia (24°C e fotoperiodo 16:8 L:B). La percentuale di uova durature prodotte non raggiunge valori come quelli osservati in cloni di tipo W non acclimatati (Rossi & Menozzi, 1990; 1993; Rossi *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 2006).

Risultati di esperimenti in corso non inclusi in questa tesi di dottorato indicano che dopo due generazioni di acclimatazione a 24°C e fotoperiodo 12:12 L:B, la linea clonale di tipo W generazione posta a 24°C e fotoperiodo 16:8 L:B produce un numero maggiore di uova e una maggiore percentuale di uova durature rispetto a quella qui descritta (Albini *et al.*, in prep.).

Tutto ciò conferma che la strategia di bet-hedging è un processo reversibile modulato dalle condizioni di allevamento della madre e dal numero di generazioni di acclimatazione.

Sono pochi in letteratura i lavori che studiano l'eredità transgenerazionale legata al processo di acclimatazione.

ESPERIMENTO 6 - Ruolo della densità nella produzione di uova durature in *H. incongruens*

OBIETTIVO E GIUSTIFICAZIONE DELL'ATTIVITA'

Come riportato dalla letteratura (Tielborger & Petru, 2010) e come ipotizzato in precedenza la strategia di bet-hedging può essere adottata per ridurre la competizione intraspecifica e intraclonale. In ambienti ad elevata variabilità, infatti, al presentarsi delle condizioni favorevoli un determinato genotipo deve massimizzare la crescita della popolazione, ma allo stesso tempo si deve tutelare da fenomeni di estinzione dell'intera popolazione nel caso di un repentino cambio delle condizioni. Tutto questo senza prescindere dall'ottimizzazione dello sfruttamento delle risorse. Come già discusso, la schiusa ritardata di uova non durature potrebbe essere una di queste strategie. Tra le ipotesi legate al fenomeno delle schiuse ritardate vi è anche quella che giustifica queste schiuse con una riduzione della competizione intraspecifica. Ciò confermerebbe l'importanza del ruolo della densità di popolazione in questi organismi.

Partendo da tali presupposti con questo esperimento si vuole rispondere alle seguenti domande:

- la densità ha un effetto nella scelta della strategia vitale adottata in *H. incongruens*?
- la densità ha un ruolo nella produzione di uova durature in *H. incongruens*?
- la densità elevata (anche osservate in ambiente naturale al momento del campionamento nella risaia di Budrione) può avere conseguenze in termini di fitness per gli organismi della specie *H. incongruens*?

MATERIALI E METODI

E' stato condotto un esperimento in cui sono stati confrontati i tratti vitali di femmine clonali di tipo W provenienti dalla risaia di Budrione ed appartenenti alla specie *H. incongruens* poste in condizioni di densità crescenti (1, 2, 3, 4, 5 femmine / pozzetto che equivalgono a densità comprese tra 0,5 e 2,5 individui/ml). Tutti gli organismi sono stati mantenuti a 24°C, 12:12 L:B. Gli organismi utilizzati per l'esperimento provengono da generazioni F8 (per le condizioni di densità D3 e D5) e F10 (per le condizioni di densità D1, D2 e D4).

L'esperimento, iniziato il 20 Febbraio 2009 è terminato il 29 Settembre 2009.

In questo esperimento le medie dei tratti oggetto d'interesse sono state confrontate con un'ANOVA ad una via che testa l'effetto del fattore densità.

Per il calcolo dei tratti età alla morte e lunghezza alla morte i dati riportati sono frutto della media del tratto considerando tutte le femmine del pozzetto, mentre per i tratti tempo di sviluppo, tempo medio di generazione alla prima schiusa, tempo medio di generazione al 50% delle schiuse, numero di piccoli, numero di uova durature, numero di uova totali e tasso netto di riproduzione i valori riportati fanno riferimento al singolo pozzetto. Il tempo di sviluppo è stato calcolato come il tempo trascorso dalla nascita delle femmine e la deposizione del primo uovo; il tempo medio di

generazione alla 1° schiusa come il tempo trascorso dalla nascita alla 1° schiusa osservata nel pozzetto; il tempo medio di generazione al 50% delle schiuse come il tempo trascorso dalla nascita alla nascita del 50% dei piccoli totali prodotti nel pozzetto e il tempo medio di generazione al 100% delle schiuse come il tempo trascorso dalla nascita alla nascita del 100% dei piccoli totali prodotti nel pozzetto. Sono inoltre stati calcolati i tratti: numero di piccoli per femmina isolata e numero di piccoli per femmina riprodotta.

RISULTATI

I risultati ottenuti confermano che la densità ha un effetto significativo su diversi tratti legati alla fitness degli organismi, a parte il tempo medio di generazione al 50% e al 100% delle schiuse. Il tempo medio di generazione al 50% e al 100% delle schiuse e il tasso netto di riproduzione non fanno osservare trend evidenti all'aumentare della densità nei pozzetti; invece, la percentuale di sopravvivenza alla riproduzione diminuisce, il tempo di sviluppo aumenta, il tempo medio di generazione alla prima schiusa aumenta e il tempo medio di generazione al 100% delle schiuse diminuisce (Tab. 3.6.1).

In nessuna condizione di densità gli organismi producono quote di uova durature maggiori dell'1% (Fig. 3.6.1).

Il test di Kolmogorov-Smirnov non individua distanze significative tra le varie condizioni di densità, anche se dai grafici si può osservare un aumento dei valori del tempo medio di generazione alla 1° schiusa (Fig. 3.6.2) (Tab. 3.6.1).

Tabella 3.6.1. – Per ognuna delle 5 condizioni di densità sperimentate (1, 2, 3, 4, 5 femmine per pozzetto) e sono indicati la numerosità del campione e i valori medi, con la relativa deviazione standard (DEV.ST) dei tratti misurati. E' indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R), il numero di pozzetti per ciascuna densità, il numero di pozzetti con uova per ogni densità, L'età media alla morte (in giorni) è stata calcolata sul totale delle femmine isolate (E1). Il tempo medio di generazione è stato calcolato come: numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la nascita della sua prima figlia (TMG1), numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 50% delle uova non durature prodotte (TMG50) e numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 100% delle uova non durature prodotte (TMG100).

	Densità				
	1 (C)	2	3	4	5
<i>Femmine isolate</i>	24	24	36	48	60
<i>Femmine con uova</i>	22	20	29	36	7
<i>Pozzetti con femmine (repliche)</i>	24	12	12	12	12
<i>Pozzetti con uova (repliche)</i>	22	10	12	9	5
<i>R/N (%)</i>	91,7	83,3	80,6	75,0	11,7
<i>Età alla morte 1</i>	28,1	24,6	33,8	21,3	21,6
<i>DEV.ST</i>	13,50	9,18	15,29	8,70	12,00
<i>Tempo di sviluppo</i>	10,1	12,4	19,4	21,7	27,8
<i>DEV.ST</i>	2,68	4,03	4,06	4,95	1,10
<i>Tempo generazione1</i>	18,1	24,5	25,5	31,8	30,8
<i>DEV.ST</i>	4,11	13,24	4,27	10,17	2,17
<i>Tempo generazione50</i>	38,3	49,0	59,6	36,4	44,8
<i>DEV.ST</i>	21,96	21,31	10,82	8,41	11,43
<i>Tempo generazione100</i>	70,63	81,10	78,64	67,33	61,80
<i>DEV.ST</i>	37,32	7,49	38,25	18,19	24,14
<i>Lunghezza</i>	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2
<i>DEV.ST</i>	0,09	0,09	0,09	0,14	0,17
<i>N totale di piccoli prodotto</i>	335,0	209,0	715,0	202,0	219,0
<i>N. tot piccoli prodotti nel trattamento</i>	15,2	20,9	7,0	22,4	43,8
<i>DEV.ST</i>	12,55	16,94	52,86	17,01	39,20
<i>Piccoli per femm isolata</i>	15,2	10,5	19,9	5,6	9,2
<i>DEV.ST</i>	12,55	8,47	17,62	4,25	7,81
<i>Piccoli per femm ripr.</i>	15,2	10,5	24,6	10,1	29,5
<i>DEV.ST</i>	12,55	8,47	21,74	10,85	27,79
<i>Uova durature</i>	0,0	0	0,25	0,0	0
<i>DEV.ST</i>	0,30	0,00	0,62	0,00	0,00
<i>Uova totali</i>	15,3	20,9	20,1	22,4	43,8
<i>DEV.ST</i>	12,61	16,94	17,56	17,01	39,20
<i>Tasso netto di riproduzione</i>	14,0	8,7	19,9	4,2	3,7
<i>DEV.ST</i>	0,55	0,77	1,6	0,39	0,71

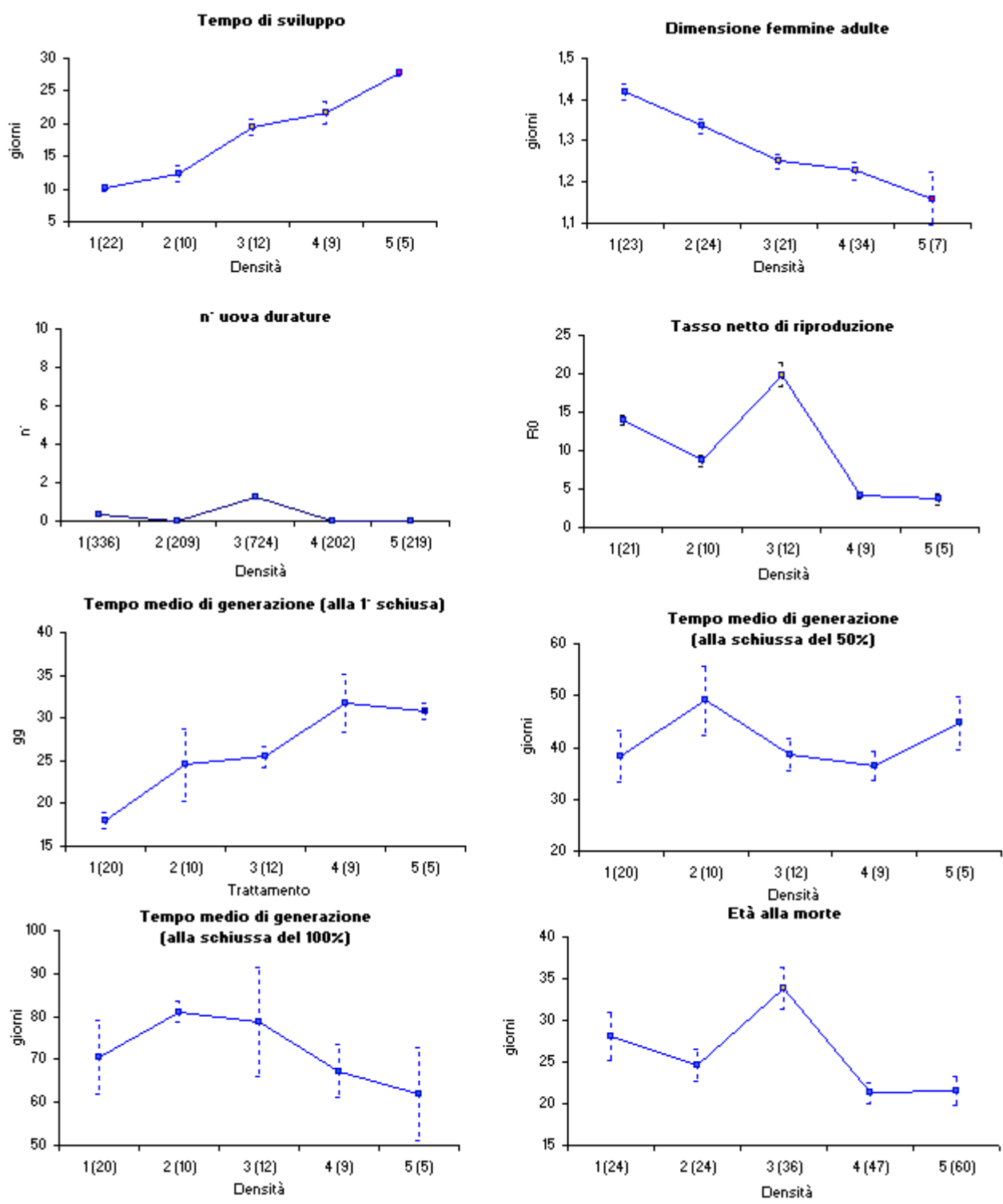


Figura 3.6.1. – Principali tratti vitali misurati per differenti condizioni di densità a 24°C, 12:12:L:B. I tratti riportati in figura sono: tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso netto di riproduzione a misurato a 230 giorni (r), tempo medio di generazione (alla 1° schiusa, alla schiusa del 50% dei piccoli, alla schiusa del 100% dei piccoli), età alla morte e percentuale di sopravvivenza alla riproduzione. Colori differenti indicano differenze statisticamente significative tra generazioni ($p < 0,0001$).
continua

continua



Figura 3.6.1. – Principali tratti vitali misurati per differenti condizioni di densità a 24°C, 12:12:L:B. I tratti riportati in figura sono: tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso netto di riproduzione a misurato a 230 giorni (r), tempo medio di generazione (alla 1° schiusa, alla schiusa del 50% dei piccoli, alla schiusa del 100% dei piccoli), età alla morte e percentuale di sopravvivenza alla riproduzione. Colori differenti indicano differenze statisticamente significative tra generazioni ($p < 0,0001$).

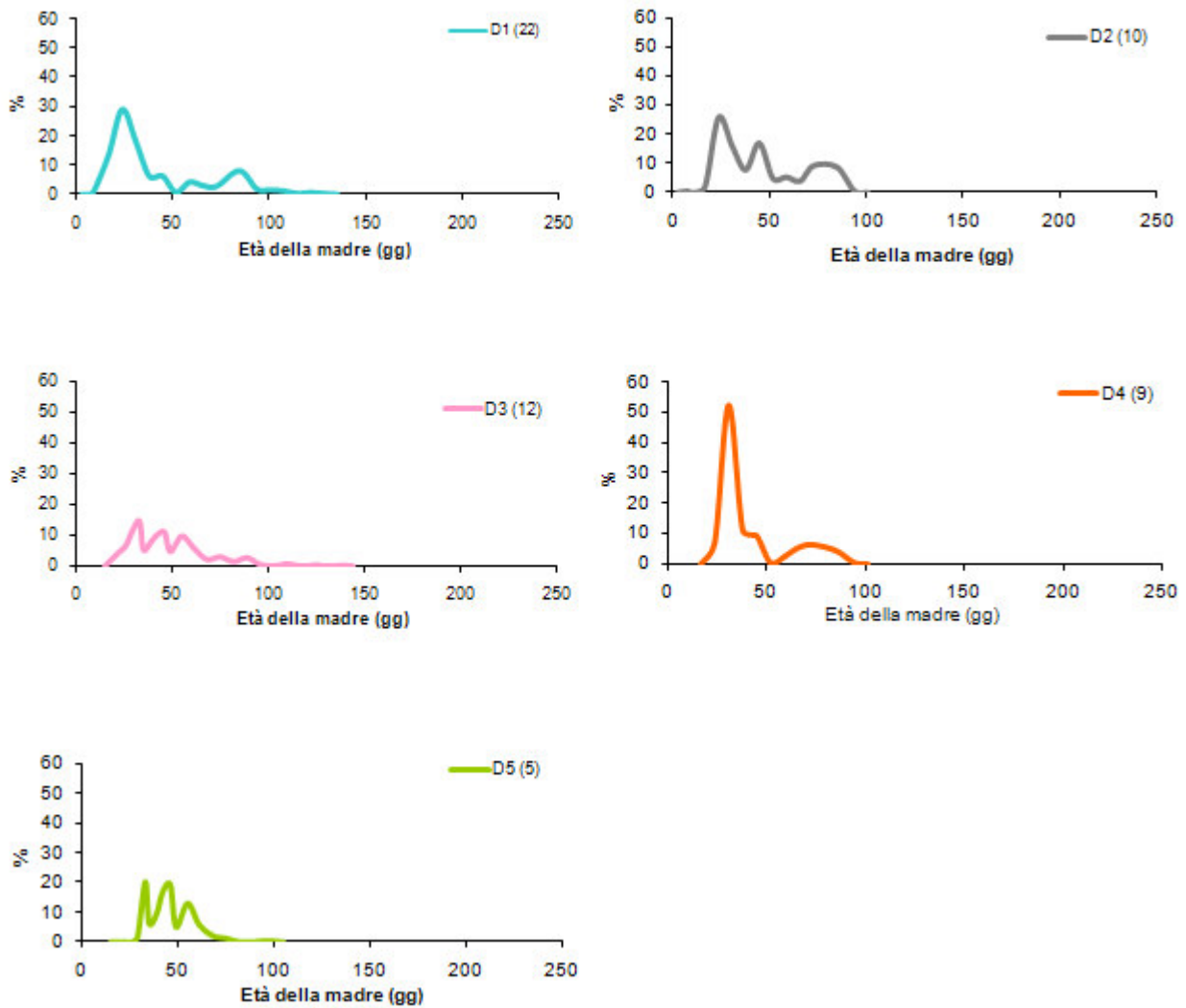


Figura 3.6.2 -Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte a differenti condizioni di densità a 24°C, 12:12:L:B. In legenda è riportata la densità utilizzata e, tra parentesi, il numero di pozzetti in cui sono state prodotte uova.

Tabella 3.6.2- Tabella di output del test ANOVA per i parametri età alla morte e dimensioni alla morte.

Età alla morte					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
dens	4	4640.0	1160.0	9.6106	4.371e-07 ***
Residuals	186	22450.0	120.7		
Lunghezza alla morte					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
dens	4	0.95620	0.23905	17.856	1.898e-11 ***
Residuals	116	1.55295	0.01339		

Tabella 3.6.3- Tabella di output del test ANOVA per i parametri

Tempo di sviluppo					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
dens	4	2022.24	505.56	38.988	6.223e-15 ***
Residuals	51	661.32	12.97		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
dens	4	1512.05	378.01	6.5467	0.0002485 ***
Residuals	51	2944.81	57.74		

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
dens	4	1104.4	276.1	0.9009	0.4704
Residuals	51	15629.4	306.5		

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
dens	4	2027	507	0.5495	0.7002
Residuals	51	45181	922		

r					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trat	4	15.078	3.769	5.2223	0.001160 **
Residuals	58	41.864	0.722		

Tabella 3.6.4- Tabella di output del test di confronto a coppie (per coppie di densità) 'pairwise.t.test ()' per i parametri studiati. In tabella sono riportati i valori di significatività p .

Età alla morte

	1	2	3	4
2	ns	-	-	-
3	0.00017	2.3e-06	-	-
4	ns	ns	2.6e-09	-
5	0.00197	ns	8.8e-13	ns

Dimensioni alla morte

	1	2	3	4
2	n	s-	-	-
3	<2e-16	<2e-16	-	-
4	ns	ns	ns	-
5	<2e-16	<2e-16	0.0012	<2e-16

Tempo di sviluppo

	1	2	3	4
2	ns	-	-	-
3	< 2e-16	< 2e-16	-	-
4	< 2e-16	< 2e-16	ns	-
5	< 2e-16	< 2e-16	1.6e-06	6.3e-08

Numero di piccoli prodotto

	1	2	3	4
2	ns	-	-	-
3	ns	ns	-	-
4	ns	ns	8.0e-05	-
5	1.3e-09	1.3e-11	1.9e-08	4.8e-16

Numero di uova durature prodotte

	1	2	3	4
2	ns	-	-	-
3	ns	ns	-	-
4	ns	ns	0.020	-
5	ns	ns	ns	ns

Numero di uova totali prodotte

	1	2	3	4
2	ns	-	-	-
3	ns	ns	-	-
4	ns	ns	5.6e-05	-
5	1.3e-09	1.3e-11	2.5e-08	4.6e-16

Continua

Continua

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	1	2	3	4
2	ns	-	-	-
3	ns	ns	-	-
4	0.00039	ns	ns	-
5	0.01501	ns	ns	ns

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)

	1	2	3	4
2	ns	-	-	-
3	ns	ns	-	-
4	ns	ns	ns	-
5	ns	ns	ns	ns

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	1	2	3	4
2	ns	-	-	-
3	ns	ns	-	-
4	ns	ns	ns	-
5	ns	ns	ns	ns

R0

	1	2	3	4
2	ns	-	-	-
3	0.0041	0.0221	-	-
4	ns	ns	0.0103	-
5	ns	ns	0.0024	ns

Tabella 3.6.5 -In tabella sono riportati i valori di distanza calcolati con il test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto a coppie tra curve di schiusa delle uova non durature. Il confronto è stato effettuato tra condizioni di densità differenti. Lettere diverse indicano che le curve di schiusa sono significativamente diverse, lettere uguali indicano che le curve di schiusa non sono significativamente diverse.

Densità	1	2	3	4
1	-	-	-	-
2	0,24 (A)	-	-	-
3	0,59 (A)	0,98 (A)	-	-
4	0,19 (A)	0,98 (A)	0,84 (A)	-
5	0,59 (A)	1 (A)	0,98 (A)	0,98 (A)

Spunti di DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano l'ipotesi di un ruolo negativo della densità sulla fitness di questi organismi. Questi risultati giustificano le interpretazioni già fatte in precedenza a proposito della schiusa ritardata di uova non durature per ridurre la competizione intraspecifica e intraclonale. Anche il avanti tempo di schiusa delle prime uova che aumenta all'aumentare della densità di popolazione può essere interpretato come un adattamento teso alla riduzione della competizione intraclonale. Quando una femmina percepisce direttamente o indirettamente di essere in una situazione di elevata densità risponde spostando in avanti la schiusa delle proprie uova.

Alle condizioni sperimentali utilizzate in questo esperimento, la percentuale di uova durature (sempre <1%) non aumenta con la densità. Le basse percentuali di uova durature prodotte potrebbero dipendere, sia della densità utilizzata (non sufficientemente stringente) sia dal fatto che gli organismi utilizzati per l'esperimento provengono da generazioni F8 e F10 acclimatati negli esperimenti precedenti (vedi Esperimento 3). A tale proposito però si nota che nell'Esperimento 5 femmine della F9, se spostate a condizioni di temperatura e fotoperiodo inducenti la produzione di forme durature, iniziavano a produrre tale tipologia di uova. Quindi, supponendo che la capacità di rispondere agli stimoli esterni non venga persa anche dopo 8-9-10 generazioni possiamo concludere che le condizioni di densità testate non sono condizioni inducenti la produzione di forme durature.

In natura femmine adulte dello stesso clone a densità di 1600 ind/ cc non si riproducono (Albini comunicazione personale).

ESPERIMENTO 7 - Analisi dei tratti vitali e del polifenismo in due generazioni clonali successive di *H. barbara* traslocate a diverse condizioni ambientali

OBIETTIVO E GIUSTIFICAZIONE DELL'ATTIVITA'

Dai nostri dati emerge che le condizioni in cui è cresciuta la madre hanno un ruolo fondamentale nella definizione delle strategie vitali. Gli esperimenti precedenti sono stati condotti in condizioni costanti di laboratorio, che non sono cambiate anche per 10 generazioni successive. Questa condizione è molto diversa da quello che succede in natura. In particolare, a parte le ovvie variazioni della temperatura, anche il fotoperiodo varia nell'arco delle stagioni. Assumendo che il tempo medio di generazione di *Heterocypris* vari tra 21 e 130 giorni possiamo calcolare la variazione media della lunghezza del periodo di luce in questo arco temporale nelle aree studiate, nelle stagioni in cui è possibile che si formino le pozze (da circa 10 a circa 12 ore di luce).

Con questo esperimento vogliamo valutare:

- 1) se anche linee clonali di *H. barbara* adottano una strategia di bet-hedging;
- 2) se e come variano i tratti in organismi le cui madri sono nate e cresciute in condizioni differenti da quelle dei figli;
- 3) se e come le condizioni in cui sono nate e cresciute le madri possono influire sui tratti dei figli;
- 4) se, attraverso l'effetto materno gli organismi sono in grado di "percepire" la successione stagionale.

MATERIALI E METODI

Come materiale di partenza sono state utilizzate uova durature disidratate. Tali uova sono state deposte da femmine clonali di *H. barbara* originariamente provenienti dalla pozza di Forbice C dell'isola di Lampedusa e mantenute in laboratorio a condizioni di temperatura e fotoperiodo naturali per più generazioni e più cicli di disidratazione-reidratazione. La generazione parentale è stata originata a seguito della reidratazione di tali uova durature.

Alcune di queste uova sono state reidratate a 16°C 10:14 L:B altre a 24°C 12:12 L:B condizioni di minima e massima imprevedibilità ambientale, rispettivamente. Inoltre, mentre la prima condizione sperimentale dovrebbe essere percepita inequivocabilmente come indicatrice dell'inizio della stagione invernale, la seconda potrebbe indicare alternativamente l'inizio dell'autunno o l'inizio della primavera. Nel primo caso gli organismi nascerebbero e crescerebbero all'inizio della stagione favorevole, nel secondo caso alla fine della stagione favorevole. Le strategie da adottare nei due casi dovrebbero essere differenti. Una migliore percezione della stagione potrebbe venire dall'esperienza materna. Se le femmine di F1 crescono a 24°C 12:12 L:B, essendo nate da femmine parentali nate e cresciute a 16°C 10:14 L:B potrebbero "supporre" di essere in primavera. Se le

femmine di F1 crescono a 24°C 12:12 L:B, essendo nate da femmine parentali nate e cresciute a 24°C 12:12 L:B potrebbero “supporre” di essere in autunno.

Come già premesso, tutte le femmine appartengono alla medesima linea clonale.

Dalle uova schiuse a condizioni primaverili sono state isolate 21 femmine con cui è stata allestita una generazione parentale che è stata mantenuta alle stesse condizioni di temperatura e fotoperiodo (24°C 12:12 L:D). Allo stesso modo dalle uova schiuse a condizioni invernali (16°C 10:14 L:B) sono state isolate 13 femmine con cui è stata allestita una seconda generazione parentale mantenuta anche in questo caso alle condizioni di fotoperiodo breve.

I piccoli di F1 nati da schiuse di uova non durature precoci sono stati poi ripartiti come da schema (Tab. 3.7.1) al fine di originare 4 piastre multipozzetto da 12 individui ciascuna.

Tabella 3.7.1 – Disegno sperimentale

Generazione	F1	
Parentale	16° 10:14	24° 12:12
16° 10:14	12	12
24° 12:12	12	12

L'esperimento, è iniziato il 5 Ottobre 2009 ed è terminato il 1 Settembre 2010.

I risultati sono stati analizzati mediante un test ANOVA ad una via considerando la condizione sperimentale come fattore. I dati relativi a ciascuna generazione sono stati analizzati separatamente, in quanto i livelli del fattore sono differenti per le due generazioni studiate (vedere Tab 3.7.1).

Successivamente è stato effettuato un test ANOVA ad una via considerando la generazione come fattore ed analizzando i dati relativi a ciascuna condizione sperimentale separatamente. In questo caso entro ciascuna condizione sperimentale il dataset per la F1 prevede i dati delle sole femmine nate da madri vissute alle medesime condizioni delle figlie (solo 2 linee sperimentali su 4) (vedere Tab. 3.7.1).

I confronti a coppie sono stati effettuati con il test t di Student mediante la funzione ‘pairwise t-test ()’ disponibile in R (versione 2.8).

RISULTATI

Dai risultati ottenuti si osserva che né gli organismi della generazione parentale né quelli della generazione F1 producono uova durature (0% nella generazione P; 0,1 % nella F1). Le uova non durature a schiusa ritardata sono invece prodotte, ma in percentuale molto bassa (2-5%) e quasi la totalità delle uova prodotte sono del tipo 'non durature a schiusa precoce' (95-100%) (Fig. 3.7.1).

Per la generazione parentale l'effetto legato alle condizioni sperimentali di allevamento risulta sempre significativo ad eccezione dei tratti: tempo medio di generazione al 100% delle schiuse, numero di piccoli, numero di uova durature e numero di uova totali prodotte (Tab. 3.7.2a).

A 16°C e fotoperiodo 10:14 L:B le femmine della generazione parentale hanno una speranza di vita (età alla morte), tempi di sviluppo e tempi medi di generazione (TMG1, TMG50, TMG1000) superiori a quelli delle femmine nate e cresciute a 24°C e 12:12 L:B. A 16°C e fotoperiodo 10:14 L:B si osserva una diminuzione delle dimensioni medie e del tasso intrinseco di crescita degli organismi della generazione parentale (Fig. 3.7.2a).

Per la generazione F1 l'effetto legato alle condizioni sperimentali di allevamento risulta sempre altamente significativo ad eccezione del tempo medio di generazione al 50% delle schiuse al 100% delle schiuse e alla larghezza del carapace. Le condizioni di allevamento della madre condizionano in modo significativo tutti i tratti ad eccezione del tempo di sviluppo e dei tempi medi di generazione (Tab. 3.7.2b). L'interazione tra i due fattori risulta altamente significativa per i tratti tempo di sviluppo, tempo medio di generazione (alla prima schiusa, al 50% delle schiuse), tasso intrinseco di crescita e indice di equiripartizione.

Confrontando tra loro organismi della F1 posti alle stesse condizioni sperimentali, ma con madri che hanno sperimentato condizioni differenti si notano interessanti risultati. Per femmine allevate a 24 °C 24°C 12:12 L:B l'aver avuto madri cresciute a 16°C e fotoperiodo 10:14 L:B comporta avere speranza di vita e tempo di sviluppo significativamente inferiori e tasso intrinseco significativamente maggiore rispetto a femmine che hanno avuto madri vissute a 24°C 12:12 L:B (Fig. 3.7.3; Tab. 3.7.4.). Anche la variabilità del tasso intrinseco di crescita assume valori molto maggiori. (Fig. 3.7.2b).

In organismi allevati in condizioni invernali, il fatto di aver avuto madri vissute in condizioni primaverili/autunnali piuttosto che invernali comporta una età alla morte e un tempo medio di generazione 50% più elevati e tempi di sviluppo, di generazione alla 1° schiusa e dimensioni inferiori (Fig. 3.7.2b; Tab. 3.7.4.).

Né a condizioni invernali, né a condizioni primaverili/autunnali questa linea clonale produce uova durature (Fig. 3.7.1).

Entro ciascuna delle condizioni sperimentate (24°C, 12:12L:B, 16°C, 10:14:L:B) i confronti tra generazione parentale e generazione F1 (originata da madri mantenute alle medesime condizioni) sono altamente significative le differenze per i tratti: età alla morte, tempi di sviluppo e di generazione (alla 1° schiusa e al 50% delle schiuse) e tasso intrinseco di crescita (Tab. 3.7.3) (Fig. 3.7.4. e 3.7.5.). Il tempo medio di generazione al 100% delle schiuse varia con la generazione in modo altamente significativo per gli organismi allevati a condizioni invernali mentre per quelli mantenuti a condizioni primaverili/autunnali le variazioni di questo tratto non sono significative.

Le differenze tra le curve di schiusa delle uova non durature prodotte dalla generazione parentale relative ad entrambe le condizioni sperimentate non sono significative (Tab. 3.7.5. e 3.7.6.), anche se dall'osservazione dei grafici (Fig. 3.7.6) si osserva un ritardo nella prima schiusa per gli organismi mantenuti a condizioni invernali.

Lo stesso test non individua differenze significative nemmeno tra le curve di schiusa delle uova non durature prodotte dalla generazione F1 per tutte le combinazioni sperimentate. Nonostante ciò dai grafici (Fig. 3.7.6) si osserva che solo nelle linee che sperimentano le condizioni primaverili/autunnali alla F1 si osserva un picco di schiusa dopo il 100° giorno, anche se basso (<5% delle schiuse totali). Si nota inoltre che gli organismi mantenuti per entrambe le generazioni a condizioni invernali concentrano tutte le schiuse in pochissimi giorni (15 giorni), a differenza delle altre linee che le distribuiscono su un periodo di almeno 50 giorni.

Le analisi statistiche sul tratto indice di equiripartizione (E) non sono state effettuate perchè quasi la totalità delle uova prodotte sono uova non durature a schiusa precoce ($E=0,3-0,4$) (Fig. 3.7.3).

Tabella 3.7.1 – Per ognuna delle condizioni di laboratorio sperimentate per il clone studiato della popolazione di Forbice C (Lampedusa) sono indicati la numerosità del campione e i valori medi, con la relativa deviazione standard (DEV.ST) dei tratti misurati. E' indicato il numero di femmine isolate (N), il numero di femmine che hanno prodotto uova (R) e il numero di femmine che hanno dato origine ad almeno un piccolo. L'età media alla morte (in giorni) è stata calcolata sia sul totale delle femmine isolate (E1) sia sul totale delle femmine che si sono riprodotte (E2). Il tempo medio di generazione è stato calcolato come: numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la nascita della sua prima figlia (TMG1), numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 50% delle uova non durature prodotte (TMG50) e numero di giorni intercorsi tra la nascita di ogni femmina e la schiusa del 100% delle uova non durature prodotte (TMG100).

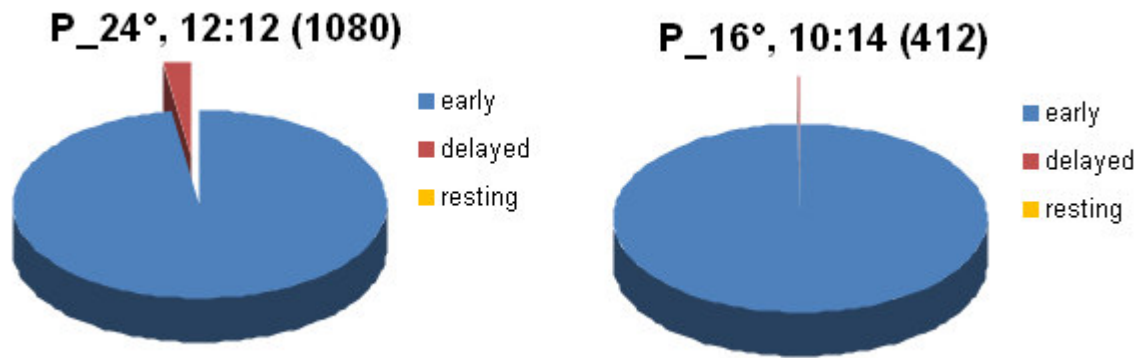
a. Generazione parentale

	PARENTALE	
	24°C, 12:12	16°C, 10:14
Femmine isolate (N)	21	13
Femmine con uova ®	21	13
Femmine con piccoli	21	13
R/N (%)	1,0	1,0
Età alla morte (E1)	66,6	94,5
DEV.ST	8,03	5,72
Età alla morte (E2)	66,6	94,5
DEV.ST	8,03	5,72
Età alla riproduzione	35,9	47,3
DEV.ST	3,21	1,97
Tempo generazione 1	40,6	55,5
DEV.ST	3,92	5,65
Tempo generazione 50	52,0	71,2
DEV.ST	5,53	8,51
Tempo generazione 100	83,6	94,8
DEV.ST	38,81	17,62
Lunghezza	1,4	1,6
DEV.ST	0,09	0,06
Larghezza	0,8	0,9
DEV.ST	0,06	0,03
Piccoli	51,4	31,7
DEV.ST	22,49	33,24
Uova durature	0,0	0,0
DEV.ST	0,00	0,00
Uova totali	51,4	31,7
DEV.ST	22,49	33,24
Tasso intrinseco di crescita (r)	0,1	0,1
DEV.ST	0,01	0,01
Indice di equiripartizione (E)	0,3	0,3
DEV.ST	0,00	0,00

b. Generazione F1

	F1			
	24°C, 12:12		16°C, 10:14	
	da 24°C, 12:12	da 16°C 10:14	da 24°C, 12:12	da 16°C, 10:14
F. isolate (N)	12	12	12	12
F. con uova (R)	12	12	12	12
F. con piccoli (r)	12	12	12	12
R/N (%)	1,0	1,0	1,0	1,0
Età alla morte (E1)	56,3	43,6	63,2	56,5
DEV.ST	5,99	8,06	9,79	6,30
Età alla morte (E2)	56,3	43,6	65,5	57,0
DEV.ST	5,99	8,06	5,54	6,36
Età alla ripr.	25,8	15,8	22,5	30,6
DEV.ST	1,86	4,96	1,97	2,11
T. generazione 1	29,8	22,3	29,5	45,3
DEV.ST	1,86	8,02	3,88	10,99
T. generazione 50	41,3	35,3	39,8	49,2
DEV.ST	3,55	12,84	5,04	9,81
T. generazione 100	72,0	60,9	64,5	54,4
DEV.ST	29,14	30,81	18,86	7,17
Lunghezza	1,4	1,4	1,4	1,5
DEV.ST	0,06	0,11	0,02	0,03
Larghezza	0,8	0,8	0,8	0,9
DEV.ST	0,04	0,06	0,02	0,05
Piccoli	62,2	32,6	39,3	5,5
DEV.ST	26,55	26,47	23,08	4,61
Uova durature	0,0	0,0	0,1	0,0
DEV.ST	0,00	0,00	0,30	0,00
Uova totali	62,2	32,6	39,4	5,0
DEV.ST	26,55	26,47	23,01	4,67
T. intr. di crescita (r)	0,2	0,2	0,2	0,1
DEV.ST	0,01	0,06	0,02	0,02
I. di equiripartiz.(E)	0,4	0,4	0,3	0,3
DEV.ST	0,00	0,00	0,00	0,00

a. Generazione parentale



b. Generazione F1

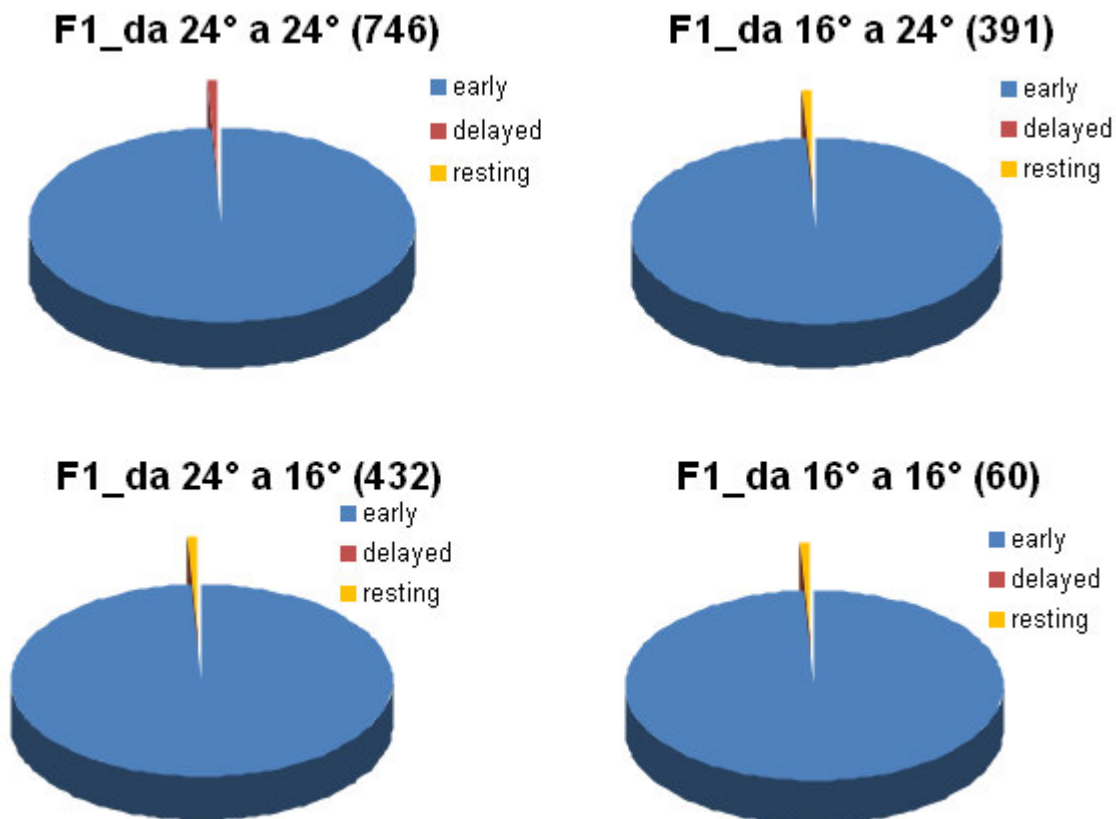


Figura 3.7.1 – Proporzioe delle diverse tipologie di uova prodotte ('early'= uova non durature a schiusa precoce; 'delayed'= uova non durature a schiusa ritardata, 'resting'= uova durature) da femmine di *H. barbara* della popolazione di Forbice C (Lampedusa) per le generazioni P ed F1. E' indicata la generazione, la condizione sperimentale e il numero totale di uova prodotte per generazione.

a. Generazione Parentale

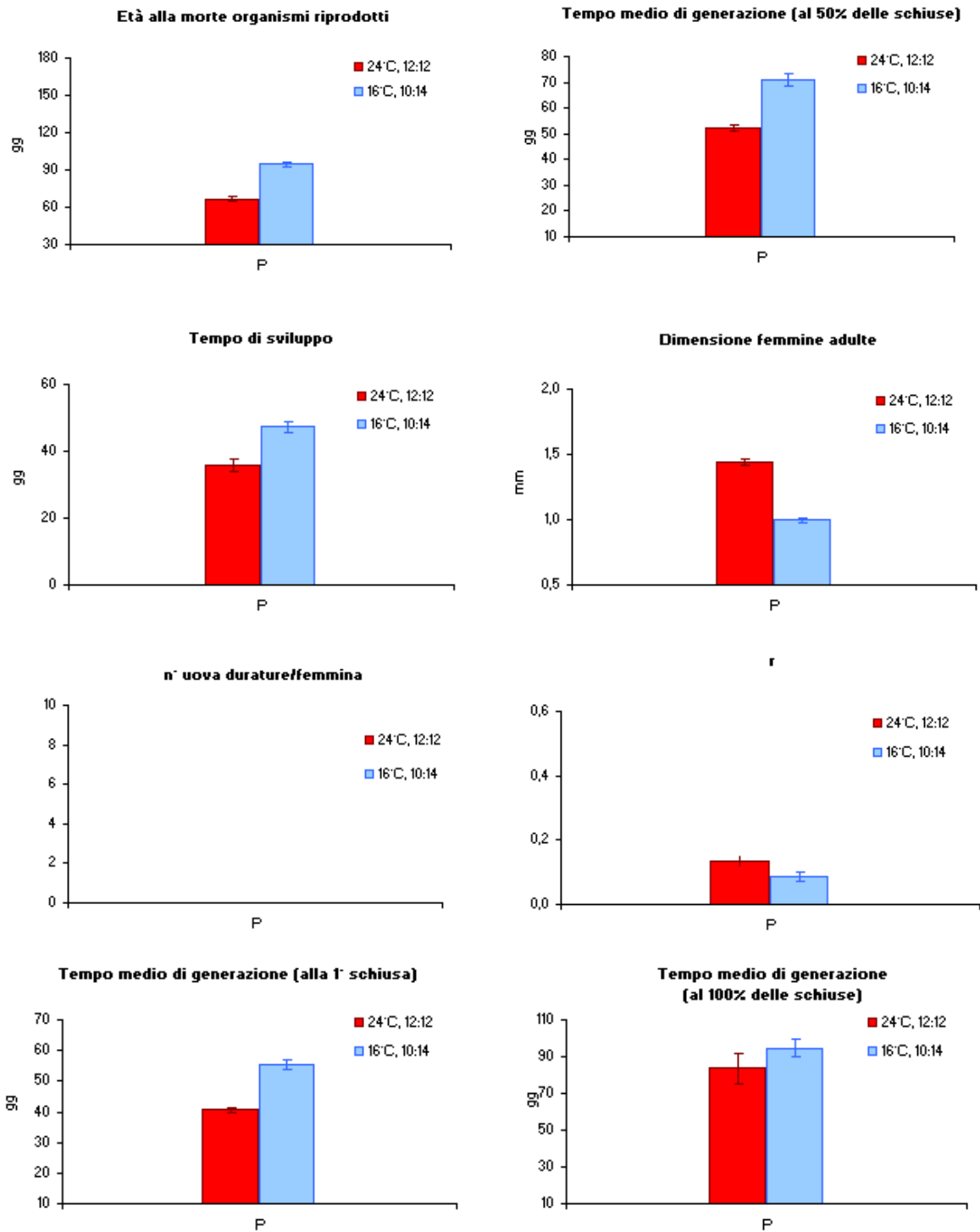


Figura 3.7.2 – Principali tratti vitali misurati per generazione Parentale ed F1 in un clone della popolazione di Forbice C (Lampedusa). I tratti riportati in figura sono: età alla morte organismi riprodotti, tempo medio di generazione (alla 1° schiusa, al 50% delle schiuse, al 100% delle schiuse), tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso intrinseco di crescita misurato a 230 giorni (r).

b. Generazione F1

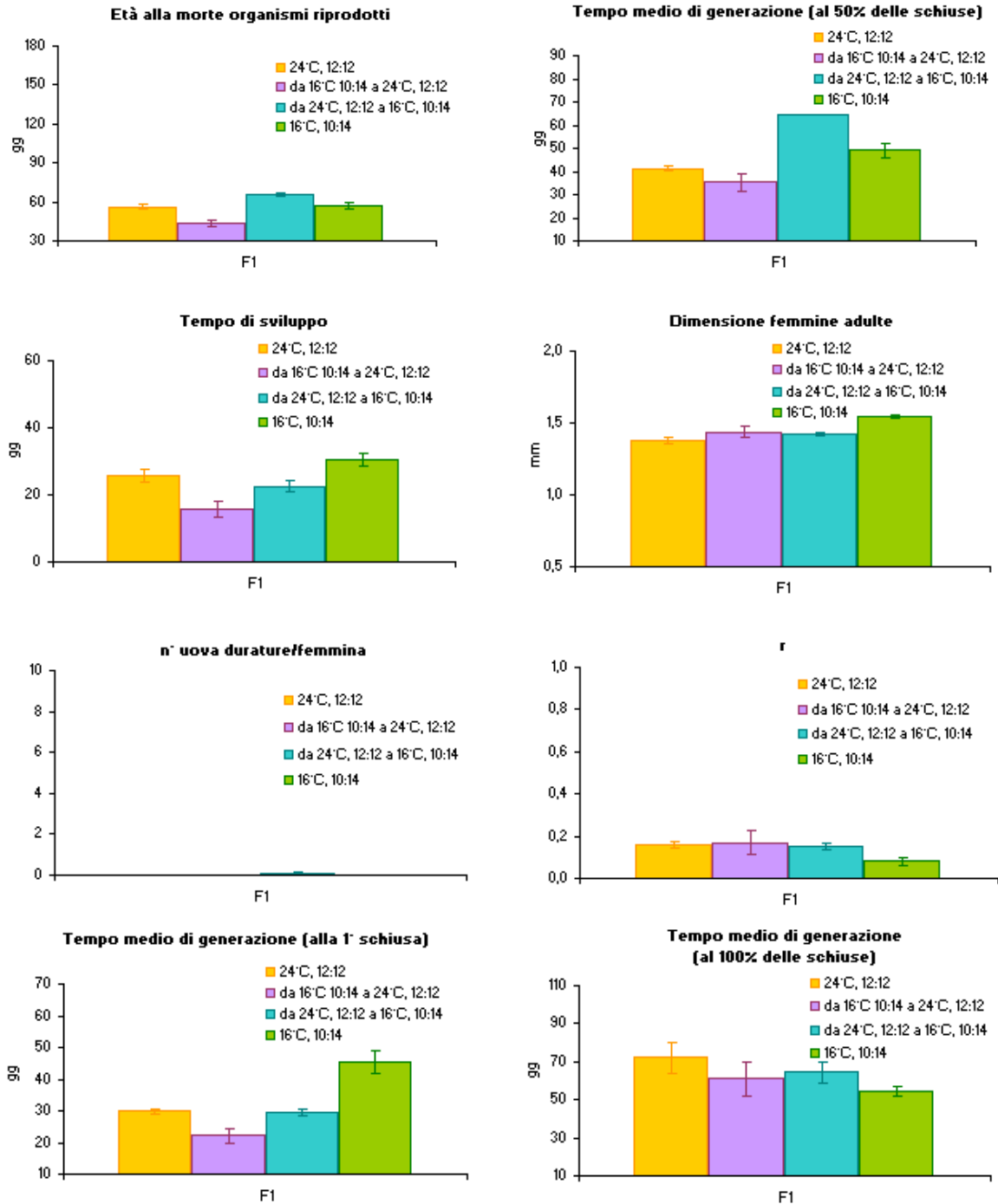
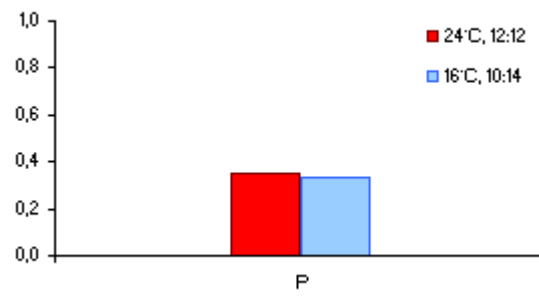


Figura 3.7.2 – Principali tratti vitali misurati per generazione Parentale ed F1 in un clone della popolazione di Forbice C (Lampedusa). I tratti riportati in figura sono: età alla morte organismi riprodotti, tempo medio di generazione (alla 1° schiusa, al 50% delle schiuse, al 100% delle schiuse), tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso intrinseco di crescita misurato a 230 giorni (r).

a. Generazione Parentale



b. Generazione *F1*

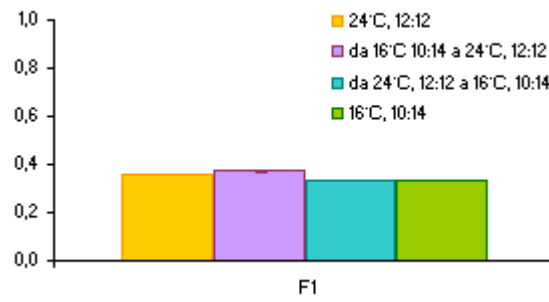


Figura 3.7.3 – Indice di equiripartizione (E).

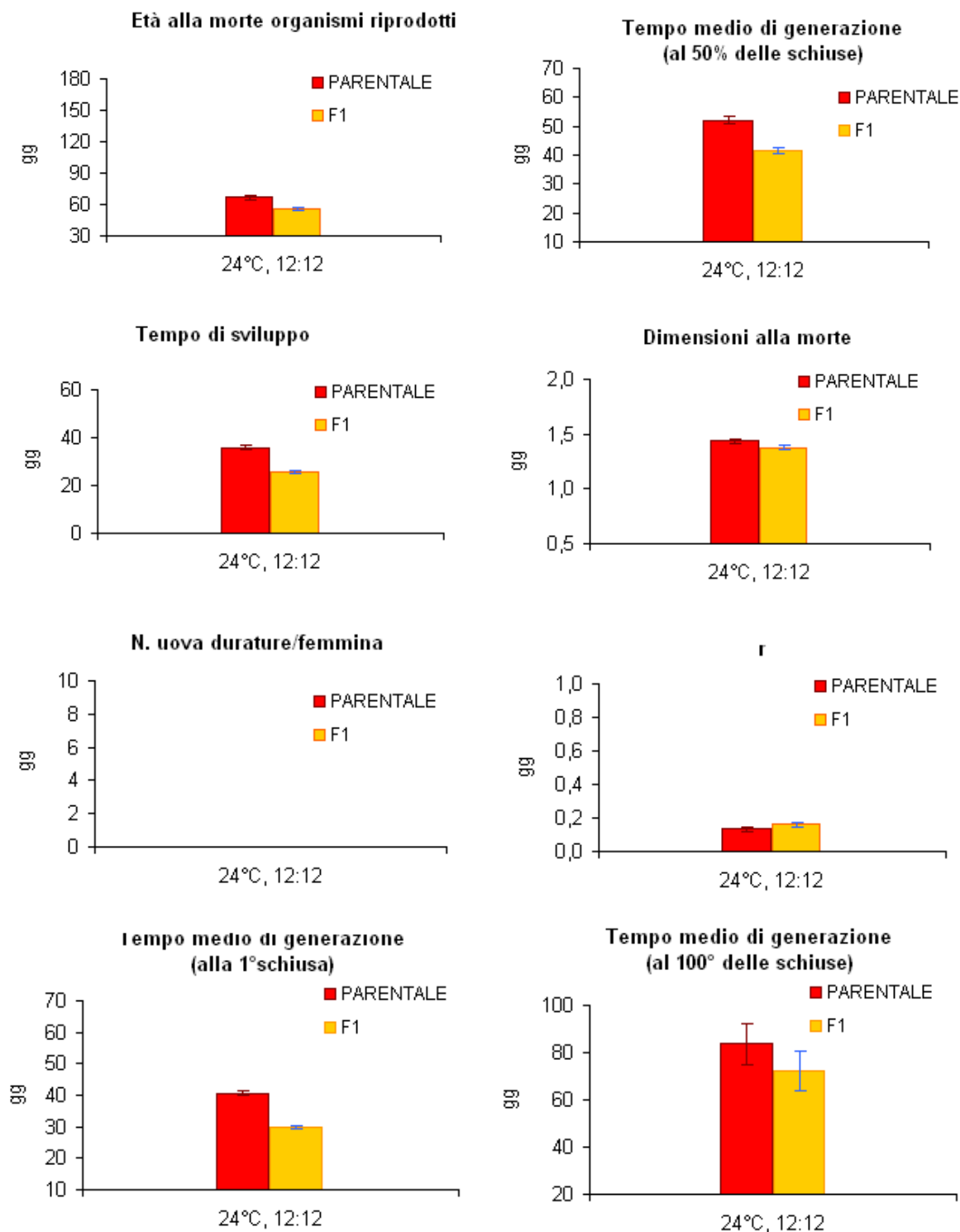


Figura 3.7.4 - Principali tratti vitali misurati per generazione parentale ed F1 (originata da madri mantenute alle medesime condizioni) in un clone della popolazione di Forbice C (Lampedusa) alla condizione sperimentale (primaverile) di temperatura 24°C e fotoperiodo 12:12:L:B. I tratti riportati in figura sono: età alla morte organismi riprodotti, tempo medio di generazione (alla 1° schiusa, al 50% delle schiuse, al 100% delle schiuse), tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso intrinseco di crescita misurato a misurato a 230 giorni (r).

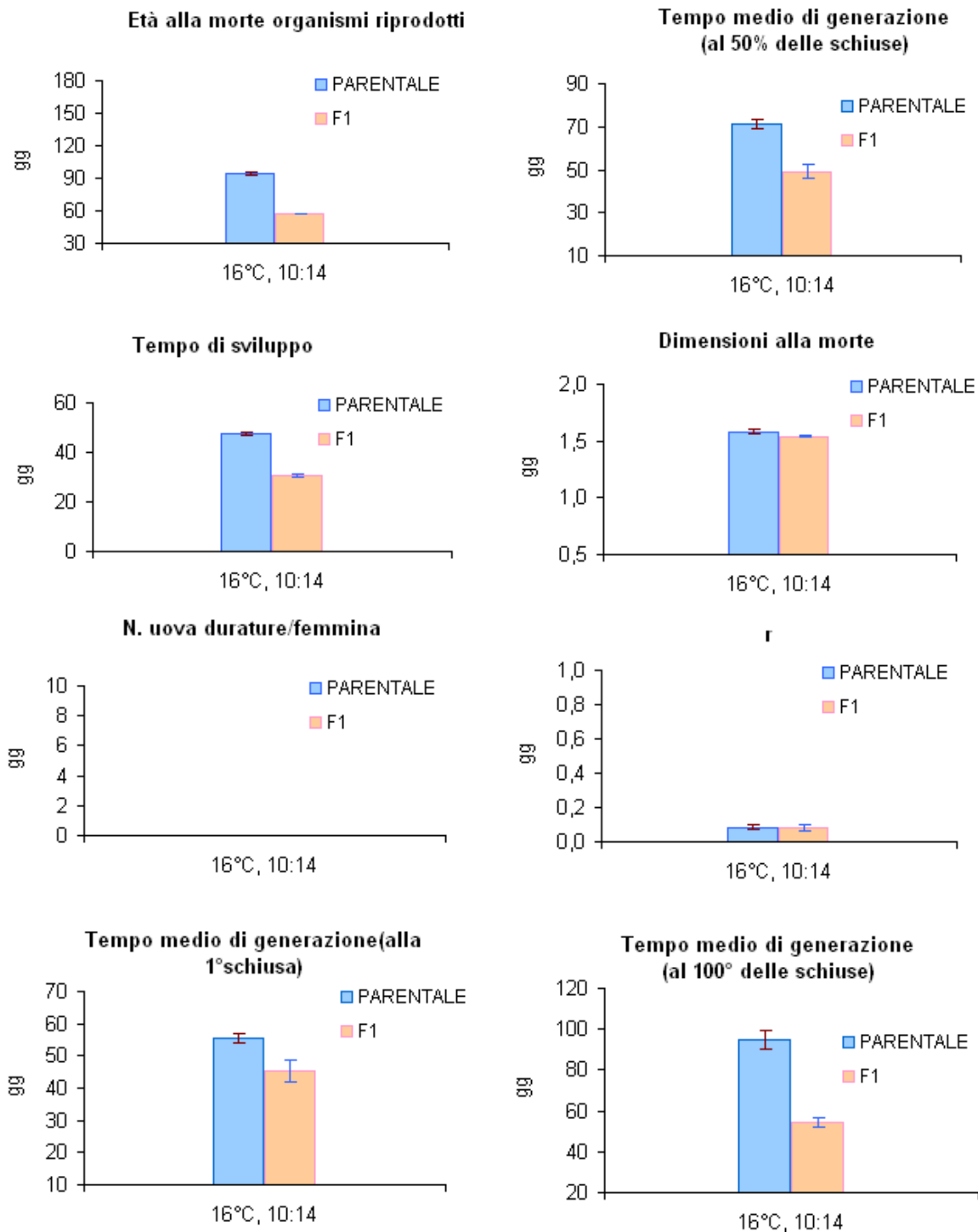


Figura 3.7.5 - Principali tratti vitali misurati per generazione parentale ed F1 in un clone della popolazione di Forbice C (Lampedusa) alla condizione sperimentale di temperatura 16°C e fotoperiodo 10:14:L:B (invernale). I tratti riportati in figura sono: età alla morte organismi riprodotti, tempo medio di generazione (alla 1° schiusa, al 50% delle schiuse, al 100% delle schiuse), tempo di sviluppo, dimensione femmine adulte, numero di uova durature, tasso intrinseco di crescita misurato a 230 giorni (r).

Tabella 3.7.2- Tabella di output del test ANOVA. Si testa l'effetto del fattore 'condizione sperimentale' entro ciascuna generazione.

a. Generazione Parentale

Età alla morte 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	6280.2	6280.2	119.45	2.466e-12 ***
Residuals	32	1682.4	52.6		

Età alla morte 2

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	6280.2	6280.2	119.45	2.466e-12 ***
Residuals	32	1682.4	52.6		

Tempo di sviluppo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	1044.04	1044.04	132.27	6.658e-13 ***
Residuals	32	252.58	7.89		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	1787.26	1787.26	82.865	2.145e-10 ***
Residuals	32	690.18	21.57		

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	2945.8	2945.75	62.11	5.421e-09 ***
Residuals	32	1517.7	47.43		

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	1007	1006.8	0.9852	0.3284
Residuals	32	32701	1021.9		

Lunghezza

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	0.138413	0.138413	21.2	0.0001039 ***
Residuals	25	0.163222	0.006529		

Larghezza

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	0.029658	0.029658	10.787	0.00302 **
Residuals	25	0.068738	0.002750		

Numero di piccoli

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	3127.6	3127.6	4.2819	0.04668 .
Residuals	32	23373.9	730.4		

---Continua

Continua
 Numero di uova durature

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	0	0		
Residuals	32	0	0		

 Numero di uova totali

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	1	3127.6	3127.6	4.2819	0.04668 .
Residuals	32	23373.9	730.4		

 r

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condiz	5	0.295339	0.059068	22.087	1.791e-13 ***
Residuals	74	0.197901	0.002674		

b. Generazione F1

Età alla morte 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	1121.3	1121.33	18.9776	7.805e-05 ***
condizF1	1	1180.1	1180.08	19.9719	5.444e-05 ***
condizP:condizF1	1	108.0	108.00	1.8278	0.1833
Residuals	44	2599.8	59.09		

Età alla morte 2

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	1315.57	1315.57	30.3610	2.005e-06 ***
condizF1	1	1480.24	1480.24	34.1613	6.641e-07 ***
condizP:condizF1	1	48.74	48.74	1.1248	0.2950
Residuals	42	1819.89	43.33		

Tempo di sviluppo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	20.89	20.89	2.2397	0.142
condizF1	1	391.59	391.59	41.9809	8.116e-08 ***
condizP:condizF1	1	939.15	939.15	100.6820	1.014e-12 ***
Residuals	42	391.77	9.33		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	109.36	109.36	2.2607	0.1404
condizF1	1	1374.33	1374.33	28.4107	3.856e-06 ***
condizP:condizF1	1	1524.18	1524.18	31.5084	1.533e-06 ***
Residuals	41	1983.33	48.37		

Continua

Continua

Tempo medio di generazione (al 50° delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	11.88	11.88	0.1586	0.692547
condizF1	1	400.32	400.32	5.3453	0.025877 *
condizP:condizF1	1	661.68	661.68	8.8351	0.004928 **
Residuals	41	3070.57	74.89		

Tempo medio di generazione (al 100° delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	1235.0	1235.04	2.1270	0.1523
condizF1	1	548.1	548.10	0.9440	0.3370
condizP:condizF1	1	2.5	2.46	0.0042	0.9484
Residuals	41	23806.0	580.64		

Lunghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	0.075385	0.075385	17.1285	0.0002481 ***
condizF1	1	0.058266	0.058266	13.2387	0.0009864 ***
condizP:condizF1	1	0.006772	0.006772	1.5388	0.2241059
Residuals	31	0.136436	0.004401		

Larghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	0.010846	0.0108461	5.1764	0.02996 *
condizF1	1	0.005718	0.0057183	2.7291	0.10863
condizP:condizF1	1	0.001724	0.0017236	0.8226	0.37142
Residuals	31	0.064954	0.0020953		

Piccoli prodotti

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	11489.8	11489.8	22.9779	2.075e-05 ***
condizF1	1	7180.4	7180.4	14.3599	0.0004756 ***
condizP:condizF1	1	51.5	51.5	0.1029	0.7499466
Residuals	42	21001.5	500.0		

Uova durature prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	0.02174	0.021739	1.0043	0.3220
condizF1	1	0.02372	0.023715	1.0957	0.3012
condizP:condizF1	1	0.02372	0.023715	1.0957	0.3012
Residuals	42	0.90909	0.021645		

Continua

Continua

Uova totali prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	11489.8	11489.8	22.9495	2.095e-05 ***
condizF1	1	7180.4	7180.4	14.3421	0.0004789 ***
condizP:condizF1	1	51.5	51.5	0.1028	0.7500959
Residuals	42	21027.5	500.7		

r

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
condizP	1	0.003551	0.0035507	3.4894	0.06892 .
condizF1	1	0.030790	0.0307902	30.2587	2.213e-06 ***
condizP:condizF1	1	0.024615	0.0246151	24.1901	1.458e-05 ***
Residuals	41	0.041720	0.0010176		

Tabella 3.7.3- Tabella di output del test ANOVA. Si testa l'effetto del fattore 'generazione entro ciascuna condizione sperimentale.

a. Condizioni primaverili/autunnali (24°C, 12:12:L:B)

Età alla morte 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	813.52	813.52	14.981	0.0005228 ***
Residuals	31	1683.39	54.30		

Età alla morte 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	813.52	813.52	14.981	0.0005228 ***
Residuals	31	1683.39	54.30		

Tempo di sviluppo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	787.46	787.46	100.02	3.197e-11 ***
Residuals	31	244.06	7.87		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	902.13	902.13	81.013	3.721e-10 ***
Residuals	31	345.20	11.14		

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	868.85	868.85	34.239	1.874e-06 ***
Residuals	31	786.67	25.38		

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	1022	1022	0.8273	0.3701
Residuals	31	38315	1236		

Lunghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	0.018060	0.018060	2.599	0.1219
Residuals	21	0.145926	0.006949		

Larghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	0.002041	0.002041	0.6294	0.4364
Residuals	21	0.068110	0.003243		

Piccoli prodotti

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	880.5	880.5	1.5276	0.2258
Residuals	31	17868.8	576.4		

Continua

Continua

Uova durature prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	0	0		
Residuals	31	0	0		

Uova totali prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	880.5	880.5	1.5276	0.2258
Residuals	31	17868.8	576.4		

r

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	0.0048991	0.0048991	23.168	3.666e-05 ***
Residuals	31	0.0065554	0.0002115		

b. Condizioni invernali (16°, 14:10:L:B)

Età alla morte 1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	9028.8	9028.8	250.13	7.509e-14 ***
Residuals	23	830.2	36.1		

Età alla morte 2

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	8396.1	8396.1	231.69	3.656e-13 ***
Residuals	22	797.2	36.2		

Tempo di sviluppo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	1656.02	1656.02	398.98	1.369e-15 ***
Residuals	22	91.31	4.15		

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	592.50	592.50	8.4681	0.008373 **
Residuals	21	1469.33	69.97		

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	2724.19	2724.19	32.967	1.065e-05 ***
Residuals	21	1735.29	82.63		

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	9211.2	9211.2	46.18	1.014e-06 ***
Residuals	21	4188.7	199.5		

Continua

Continua

Lunghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	0.009237	0.009237	4.3008	0.05122 .
Residuals	20	0.042956	0.002148		

Larghezza alla morte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	0.005658	0.005658	3.1641	0.09048 .
Residuals	20	0.035762	0.001788		

Piccoli prodotti

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	4101.8	4101.8	6.6986	0.01678 *
Residuals	22	13471.5	612.3		

Uova durature prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	0	0		
Residuals	22	0	0		

Uova totali prodotte

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	4101.8	4101.8	6.6986	0.01678 *
Residuals	22	13471.5	612.3		

r

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
gen	1	0.0000016	1.5580e-06	0.0075	0.9318
Residuals	21	0.0043665	2.0793e-04		

Tabella 3.7.4- Valori di significatività (p) ottenuti come output del test di confronto a coppie t di Student. Confronto tra differenti linee sperimentali per organismi appartenenti alla generazione F1. Il codice a 4 cifre individua una singola linea sperimentale

(linea 2424= generazione Parentale a 24°C, 12:12L:B e generazione F1 a 24°C, 12:12L:B

linea 2416= generazione Parentale a 24°C, 12:12L:B e generazione F1 a 16°C, 10:14L:B

linea 1624= generazione Parentale a 16°C, 10:14L:B e generazione F1 a 24°C, 12:12L:B

linea 1616= generazione Parentale a 16°C, 10:14L:B e generazione F1 a 16°C, 10:14L:B)

Età alla morte 1

	1616	1624	2416
1624	0.0010*	-	-
2416	0.2358	9e-07***	-
2424	1.0000	0.0013*	0.1968

Età alla morte 2

	1616	1624	2416
1624	9.3e-05***	-	-
2416	0.02408	3.4e-09***	-
2424	1.00000	0.00016**	0.00937*

Tempo di sviluppo

	1616	1624	2416
1624	5.4e-14***	-	-
2416	1.2e-06***	2.2e-05***	-
2424	0.0025*	3.1e-09***	0.0952

Tempo medio di generazione (alla 1° schiusa)

	1616	1624	2416
1624	9.1e-09***	-	-
2416	3.4e-05***	0.10	-
2424	3.3e-05***	0.07	1.00

Tempo medio di generazione (al 50% delle schiuse)

	1616	1624	2416
1624	0.0034	-	-
2416	0.1037	1.0000	-
2424	0.2390	0.5822	1.0000

Tempo medio di generazione (al 100% delle schiuse)

	1616	1624	2416
1624	1.00	-	-
2416	1.00	1.00	-
2424	0.57	1.00	1.00

Lunghezza alla morte

	1616	1624	2416
1624	0.0065*	-	-
2416	0.0042*	1.0000	-
2424	6.4e-05***	0.3596	1.0000

continua

continua

Larghezza alla morte

	1616	1624	2416
1624	0.440	-	-
2416	0.198	1.000	-
2424	0.083	1.000	1.000

N° piccoli

	1616	1624	2416
1624	0.0349.	-	-
2416	0.0058*	1.0000	-
2424	1.9e-06***	0.0140.	0.1105

N° uova durature

	1616	1624	2416
1624	1.00	-	-
2416	0.93	0.88	-
2424	1.00	1.00	0.88

N° uova totali

	1616	1624	2416
1624	0.0351.	-	-
2416	0.0059*	1.0000	-
2424	1.9e-06***	0.0141.	0.1109

r

	1616	1624	2416
1624	3.8e-06***	-	-
2416	0.134	0.008*	-
2424	0.034.	0.026.	1.000

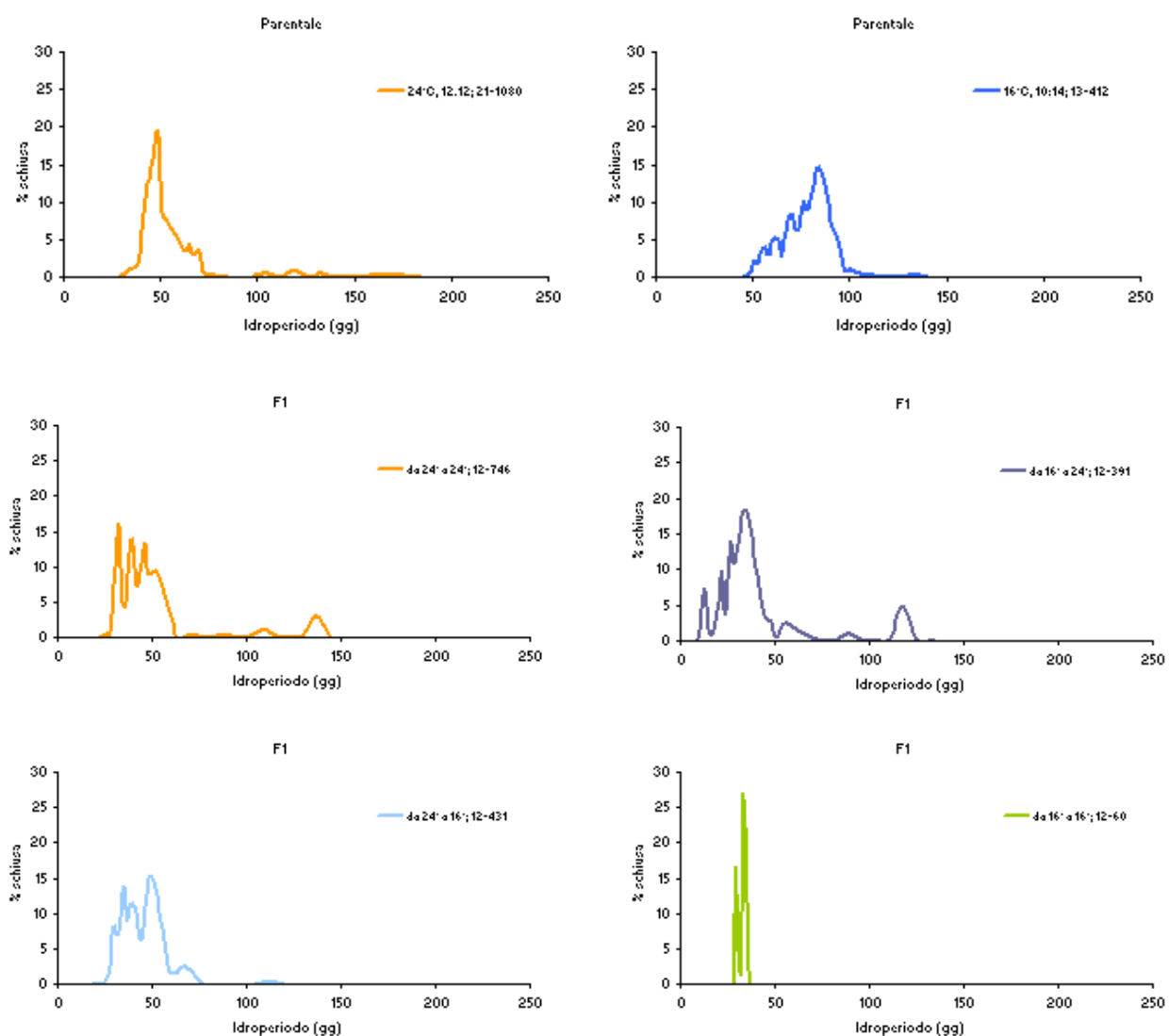


Figura 3.7.6 - Dinamica di schiusa delle uova non durature prodotte dalle generazioni Parentale ed F1 di un clone proveniente dalla popolazione di Forbice C. In legenda, per ciascuna generazione, sono riportate le condizioni sperimentali, il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova schiuse.

Tabella 3.7.5 - In tabella (a) sono riportati i valori relativi al valore di distanza calcolato con il test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto a coppie tra curve di schiusa delle uova non durature, il confronto è stato effettuato entro generazione tra condizioni sperimentali. (b) Entro ogni generazione, lettere diverse indicano che le curve di schiusa sono significativamente diverse, lettere uguali indicano che le curve di schiusa non sono diverse.

a.

P		F1			
	24°, 12:12	da 24°C a 24°C	da 16°C a 24°C	da 24°C a 63°C	da 16°C a 16°C
16°C, 10:14	0,15	da 24°C a 24°C	-	-	-
		da 16°C a 24°C	0,28	-	-
		da 24°C a 16°C	0,08	0,31	-
		da 16°C a 16°C	0,2	0,34	0,17

b.

P		F1	
24°, 12:12	A	da 24°C a 24°C	A
16°C, 10:14	A	da 16°C a 24°C	A
		da 24°C a 16°C	A
		da 16°C a 16°C	A

Tabella 3.7.6 - In tabella sono riportati i valori relativi al valore di distanza calcolato con il test di Kolmogorov-Smirnov per il confronto a coppie tra curve di schiusa delle uova non durature, il confronto è stato effettuato tra generazioni (P, F1) mantenute alle stesse condizioni sperimentali. Entro ogni condizione (a. primaverile 24°C, 12:12:L:B; b. invernale 16°C10:14:L:B), lettere diverse indicano che le curve di schiusa sono significativamente diverse, lettere uguali indicano che le curve di schiusa non sono diverse.

a.

24°, 12:12	P
F1	0,26

b.

16°C, 10:14	P
F1	0,31

24°, 12:12	
P	A
F1	A

16°C, 10:14	
P	A
F1	A

Spunti di DISCUSSIONE

Per questo esperimento è stata utilizzata una linea clonale di *H. barbara* (2a6) della ottenuta dalla popolazione di Vallone della forbice C. Il clone utilizzato è stato selezionato a partire da una nata da uova durature che aveva fatto osservare ripartizione del rischio producendo quote di tutte e 3 le tipologie di uova (vedi Appendice 2, Tab. A2.1, Fig. A2.1). Pur con un potenziale riproduttivo inferiore a quello osservato in *H. incongruens*, anche in *H. barbara* è possibile individuare una strategia di bet hedging in condizioni di massima imprevedibilità: 24 °C 12:12: schiuse ritardate si osservano nella generazione parentale e nella F1, indipendentemente dalle condizioni sperimentate dalla madre. Le condizioni di allevamento della madre influiscono sui tempi di schiusa delle uova non durature (sia quelle precoci che quelle tardive): i picchi di schiusa sono anticipati nelle femmine le cui madri sono state allevate a 16 °C 10:14.

Le femmine parentali e di F1 allevate in condizioni di minima imprevedibilità (16 °C 10:14) tendono a produrre prevalentemente uova non durature a schiusa precoce e poche uova durature. Femmine della stessa popolazione, non acclimatate, e allevate a 16 °C 12:12, condizioni di maggiore imprevedibilità, hanno prodotto una maggiore percentuale di uova durature e avevano età alla morte, tempi di sviluppo e tempi medi di generazione maggiori e tasso intrinseco di crescita minore (Tab. 3.1.5). E' d'altra parte possibile che questa differenza derivi dal fatto che nell'Esperimento 1 sono state utilizzate femmine appartenenti a più linee clonali. Oltre a valori medi differenti, in questo esperimento (Esperimento 7) condotto utilizzando una singola linea si osservano valori di deviazione standard molto inferiori. Un'ipotesi alternativa plausibile è che la linea clonale studiata sia una linea specializzata nella produzione di uova non durature a schiusa precoce o che produca uova durature o non durature a schiusa ritardata a condizioni diverse da quelle che funzionano mediamente sulla popolazione.

Le differenze nei tratti in organismi di F1 che crescono in condizioni diverse rispetto a quelle materne testimoniano l'importanza dell'effetto materno transgenerazionale. Non è tuttavia chiaro se e come l'interazione tra le condizioni in cui sono crescite le madri e quelle in cui crescono le figlie possa consentire agli organismi di percepire la successione stagionale. Non è chiaro se e come la percezione del progredire stagionale possa influire sulla fitness e sulle strategie riproduttive. E' possibile che in ambienti effimeri come le pozze temporanee di Lampedusa anche la successione di più generazioni sia un evento estremamente raro. Se questo è vero, però resta da chiarire perché gli organismi non adottino una strategia che prevede cicli univoltini. Come già ipotizzato in precedenza la linea clonale selezionata e utilizzata in questo esperimento sia una linea specializzata nella produzione di uova non durature a schiusa precoce e che produca uova durature o non durature a schiusa ritardata a condizioni diverse.

Questi risultati rappresentano i primi dati relativi all'autoecologia di *H. barbara* specie per la quale fino, ad ora erano noti dati relativi alla distribuzione geografica (Gauthier & Brehm, 1928; Baltanàs *et al.*, 1990, Baltanàs, 1992, Meisch 2000) e alla morfologia (Alcorlo *et al.*, 1999;). Baltanàs *et al.*, (2003) riportano dati relativi alle variazioni delle dimensioni del carapace al variare dei parametri ambientali come la temperatura, il fotoperiodo e la conducibilità.

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

In questa tesi di dottorato, ricreando l'imprevedibilità dell'idroperiodo delle pozze temporanee di Lampedusa e della Pianura Padana, è stata dimostrata l'esistenza di polimorfismo fenotipico a meno di polimorfismo genetico in organismi del genere *Heterocypris*.

Le condizioni di imprevedibilità scelte inducono l'adozione di una strategia di ripartizione del rischio (diversified bet-hedging) legato alla riproduzione in femmine appartenenti a tre linee evolutive e 5 popolazioni del genere *Heterocypris* provenienti da due latitudini differenti.

L'osservazione di tale strategia in organismi della Pianura Padana appartenenti a 4 linee clonali della specie *H. incongruens* mantenute a condizioni controllate di temperatura e fotoperiodo che non danno nessuna indicazione sulle condizioni future dell'ambiente stesso, rappresenta una rara evidenza dell'esistenza del "diversified bet-hedging". Per definizione, la strategia di diversified bet-hedging (Philippi & Seger, 1989) è riconducibile all'espressione fenotipica variabile di un singolo genotipo non imputabile a polimorfismo genetico. In questo caso un organismo investe in più strategie (fenotipi) contemporaneamente, per ottenere una riduzione della variabilità nel successo riproduttivo totale. Per definizione, la strategia di diversified bet-hedging implica la massimizzazione della media geometrica della fitness.

In particolare in un ambiente imprevedibile una femmina di *Heterocypris* produce uova geneticamente identiche ma fenologicamente diverse: uova durature, non durature a schiusa precoce e non durature a schiusa ritardata. Tanto più simile è la percentuale di diversi tipi di uova tanto maggiore sarà la ripartizione del rischio e come media geometrica del potenziale riproduttivo.

In tutte le generazioni testate, alle condizioni sperimentali di imprevedibilità ambientale, le femmine producono uova geneticamente omogenee con fenologie di schiusa molto diverse: uova durature, uova non durature a schiusa precoce o tardiva. L'osservazione di tale strategia su 4 linee clonali diverse, provenienti da due popolazioni diverse induce a pensare che ciò che si osserva non sia instabilità di sviluppo (*sensu* Waddington, 1942), ossia modificazioni fenotipiche riconducibili a microvariabilità delle condizioni ambientali entro un unico genotipo (Spitze & Sadler, 1996).

I pochi studi qualitativi pubblicati sull'argomento, per la maggior parte descrivono l'esistenza di polimorfismo fenotipico senza mai poter escludere il coinvolgimento di un polimorfismo genetico. In piante desertiche annuali, Philippi (1993), in un test pionieristico, ha trovato che i semi di *Lepidium lasiocarpum* che non germinavano durante il primo anno germinavano gli anni seguenti alle medesime condizioni. Clauss & Venable (2000) mostrarono che il livello di dormienza di più popolazioni di *Plantago insularis* dipende dalle serie storiche di precipitazioni, descrivendo il legame tra strategia di dormienza e imprevedibilità ambientale. Evans e colleghi (2007) hanno

dimostrato che in condizioni ambientali variabili la selezione fluttuante favorisce strategie vitali di ripartizione del rischio basate sulla dormienza piuttosto che sulla non-dormienza in due specie desertiche del genere *Oenothera*, una annuale e una perenne. Utilizzando dati demografici di lungo termine (22 anni di dati su 10 specie vegetali desertiche annuali) Venable (2007) ha trovato una correlazione negativa tra la frazione di semi che germina tardivamente (tratto alla base della strategia di ripartizione del rischio adottato da diverse specie vegetali in ambiente desertico) e la varianza della fitness.

Simons (2009) è riuscito a dimostrare l'esistenza di una strategia di diversified bet-hedging utilizzando organismi geneticamente identici. Studiando la specie vegetale *Lobelia inflata*, l'autore osserva che la variazione nei tempi di germinazione entro semi geneticamente identici (12.28 giorni, $sd=2.27$) (Simons & Johnston, 2006) è simile alla variazione che, in semi non geneticamente controllati e cresciuti in campo, consente di massimizzare la fitness (calcolata come media geometrica dei tassi di sopravvivenza delle plantule germinate in 5 stagioni vegetative successive). Gilbert & Stemberger (1984) descrivono un polimorfismo fenotipico in linee clonali del rotifero *Keratella slacki*: un unico genotipo esprime fenotipi differenti (in termini di lunghezza corporea totale e di numero e dimensione delle spine) in relazione a cheromoni rilasciati nell'ambiente dal predatore *Asplanchna*.

Nel caso di *H. incongruens*, femmine clonali, ripartiscono il rischio legato alla riproduzione esprimendo un polimorfismo fenotipico in condizioni controllate di imprevedibilità ambientale.

Da esperimenti in corso risulta che le uova durature del clone bC3 di *H. incongruens* non si schiudono tutte dopo una prima reidratazione (Rossi *et al.*, 2011, *in press*). Percentuali via via decrescenti si schiudono dopo un secondo e un terzo ciclo di disidratazione e reidratazione (Albini, comunicazione personale). Si tratta di un risultato che, analogamente a quanto riportato da Philippi (1993) per la pianta desertica *Lepidium lasiocarpum*, rappresenta un'ulteriore componente di una strategia vitale di ripartizione del rischio.

Parte integrante della strategia del diversified bet-hedging nel genere *Heterocypris* è rappresentata dalla produzione di uova non durature a schiusa ritardata. Se il vantaggio della diversificazione tra uova durature e uova non durature è ovvia, meno immediato è il ruolo della produzione di uova a schiusa precoce e tardiva. Pur trattandosi di organismi dello stesso clone, il fatto di nascere da schiuse tardive piuttosto che precoci comporta, per esempio, il dover fronteggiare differenti condizioni ambientali. Se gli organismi nati da schiuse precoci potrebbero garantire una rapida colonizzazione in un ambiente che si presenta favorevole, quelli nati da schiuse ritardate potrebbero fare i conti con un ambiente già colonizzato in cui parte delle risorse sono già state sfruttate. I risultati ottenuti con l'esperimento 3.4 mostrano che alcuni tratti del ciclo biologico degli organismi

nati da uova non durature a schiusa precoce sono diversi rispetto a quelli di organismi nati da uova non durature a schiusa tardiva. Le differenze in termini di età alla morte, tempo di sviluppo, tempo medio di generazione, tasso intrinseco di crescita e uova durature prodotte implicano differenze in termini di fitness. Mentre negli organismi originati da schiuse precoci la fitness diminuisce al passare delle generazioni (il tempo di sviluppo aumenta, i tempi medi di generazione alla 1° schiusa e al 50% delle schiuse aumentano, il tasso intrinseco di crescita diminuisce), nelle femmine nate da schiuse ritardate si osserva un miglioramento di alcuni tratti con le generazioni (il tempo di sviluppo diminuisce, il tempo medio di generazione alla 1° schiusa diminuisce e il tasso intrinseco di crescita aumenta). In base a questi risultati, si ipotizza che mentre gli animali nati da schiuse precoci investono tutto il loro potenziale nelle prime generazioni per sfruttare più velocemente possibile l'ambiente e le sue risorse, gli animali nati da schiuse tardive riducono la crescita nelle prime generazioni per minimizzare la competizione intraspecifica in un ambiente già colonizzato.

Questo rappresenta il primo studio che mette in evidenza differenze in termini di fitness tra organismi generati da uova non durature a schiusa precoce e a schiusa tardiva.

Maggiori conoscenze sono disponibili per quanto riguarda il confronto tra uova durature e uova non durature. Rossi (comunicazione personale) ha osservato valori di fitness differenti in organismi clonali nati da uova durature e da uova non durature in *Eucypris virens*. Arbaciauskas (2004b) ha osservato che le dimensioni dei neonati di *Daphnia pulex* sono maggiori in organismi nati da forme durature rispetto ad organismi originati per partenogenesi.

Per valutare se la diversificazione dei tempi di schiusa possa ragionevolmente essere considerata una strategia per ridurre la competizione intraclonale e controllare la densità di popolazione abbiamo condotto alcune indagini preliminari per verificare se elevate condizioni di densità di popolazione inducessero anche un incremento nella produzione di uova durature per ridurre la competizione intraspecifica. I risultati dimostrano che nel genere *Heterocypris*, l'aumento della densità ha un effetto negativo su tratti come la sopravvivenza alla riproduzione, l'età alla morte, il tempo di sviluppo, la dimensione delle femmine adulte, il tempo medio di generazione alla 1° schiusa e il tasso netto di riproduzione (Esperimento 3.6) ma, almeno entro i limiti delle nostre osservazioni, non induce un aumento nella produzione di uova durature. La variazione di tratti legati alla fitness con la densità di popolazione è confermata da numerosi studi in letteratura su altri crostacei d'acqua dolce: Carvalho & Huges (1983) dimostrano che in *D. magna* l'aumento della densità induce la produzione di forme durature.

Il fatto che la densità abbia un effetto negativo sulla fitness degli organismi avvalora l'ipotesi che una strategia come il bet-hedging si sia evoluta, oltre che per ripartire il rischio legato alla riproduzione, al fine di ridurre la competizione intraspecifica ed intraclonale. Soprattutto in

ambienti variabili o effimeri in cui le risorse sono limitate o disponibili in modo non continuo nel tempo, una strategia di tipo diversified bet-hedging evita di raggiungere elevate densità e ottimizza lo sfruttamento delle risorse. I picchi di schiusa tardivi permettono di controllare i livelli di densità della popolazione (McLay, 1978a,b). A tal proposito Tielborger & Petru (2010) in un recentissimo studio rimarcano la necessità di inglobare lo studio della dipendenza da densità negli studi sul bet-hedging.

Dal momento che il polimorfismo osservato avviene a meno della variabilità ambientale e genetica dobbiamo assumere che i fenomeni descritti dipendano dall'effetto materno.

L'effetto materno rappresenta una sorgente di plasticità fenotipica transgenerazionale che predispone la progenie alle condizioni ambientali nelle quali probabilmente dovrà svilupparsi.

La strategia di diversified bet-hedging è comunemente descritta come un fenomeno in cui una madre che produce una progenie fenotipicamente diversificata, ripartisce il rischio connesso con la riproduzione in ambienti eterogenei e riduce la varianza del suo successo riproduttivo. Marshall & Uller (2007) e Crean & Marshall (2009) hanno descritto questa strategia come una forma di effetto materno indicata come “diversified bet-hedging maternal effect”.

In *Campanula americana*, il ciclo annuale o biennale è determinato dalle condizioni di luce in cui è cresciuta la generazione parentale. Quando una madre è in grado di “percepire” le informazioni ambientali che possono segnalare le condizioni ambientali incipienti, l'effetto materno può agire per aumentare la fitness della generazione F1. Modificando il fenotipo della progenie, le madri possono proteggere la progenie da condizioni ambientali avverse che sono state in grado di percepire in anticipo. Questa forma di plasticità aumenta la fitness a lungo termine della madre (Berrigan & Scheiner 2004). Plaistow *et al.* (2007) descrivono la diminuzione della variabilità nelle dimensioni delle uova prodotte all'aumentare dell'età della madre nell'acaro *Sancassania berlesei*. L'entità di tale diminuzione è legata alle condizioni nutrizionali della madre. La riduzione della variabilità nelle dimensioni delle uova è massima (minima diversificazione fenotipica) quando la disponibilità di cibo è mantenuta costante durante tutta la vita della madre (condizioni di massima predicibilità ambientale). Il caso contrario è quello del diversified bet-hedging: in un ambiente in cui non sono presenti segnali che danno indicazioni sullo stato futuro, una madre ripartisce il proprio potenziale riproduttivo su più fenotipi, in modo che almeno uno di questi risulti “adatto” all'ambiente che verrà.

Nel caso dei risultati in *H. incongruens* descritti nell'Esperimento 3.2, le condizioni sperimentali sono mantenute costanti per varie generazioni: il polifenismo e la variazione di diversi tratti (età alla morte, tempo di sviluppo, tempo medio di generazione alla prima, al 50% e al 100% delle schiuse, dimensioni, tasso intrinseco di crescita, numero di uova durature prodotte) dipendono dall'effetto

della generazione. I risultati ottenuti sono riconducibili ad un effetto materno transgenerazionale piuttosto che ad un effetto negativo dell'allevamento in laboratorio sul tasso intrinseco di crescita. In linee clonali del rotifero *Brachionus calyciflorus*, Gilbert (2002) riporta che, a partire da madri nate da uova durature, la percentuale di femmine che produce uova durature aumenta gradualmente fino alla 12° generazione e poi si stabilizza. L'autore sostiene che si tratti di un effetto materno cumulativo che si trasferisce di madre in figlia e che modifica il fenotipo della prole con un effetto 'dose'.. Lansing (1947), già nella prima metà del secolo scorso studiando rotiferi della specie *Philodina citrina*, indicava il calcio come un probabile fattore che, accumulandosi a livello citoplasmatico, fosse responsabile dei processi di senescenza entro ciascun organismo. Lynch (1985) successivamente afferma che gli effetti materni si protraggono per almeno due generazioni. Avendo escluso a priori il polimorfismo genetico come sorgente di variabilità fenotipica, l'effetto generazione è quindi strettamente legato all'effetto materno. Possiamo affermare che l'effetto materno rappresenta un meccanismo di plasticità fenotipica transgenerazionale in cui la condizione sperimentata dalla madre viene tradotta in variabilità fenotipica entro la prole. Questa relazione può essere rappresentata come una norma di reazione.

L'importanza di studiare gli effetti materni transgenerazionali è sottolineata da Hume & Cavers (1981) che utilizzano l'espressione "carry over effect" per descrivere l'effetto di preconditionamento da una generazione all'altra. Tale effetto secondo Sakwinska (2004) è maggiore per quei tratti espressi precocemente durante il ciclo vitale di un organismo (es. tempo di sviluppo) mentre è minore per i tratti tardivi (es. età alla morte). L'autrice dimostra che tratti precoci, come le dimensioni alla nascita in *Daphnia*, sono fortemente influenzati dai tratti materni (es. età della madre), mentre tratti espressi tardivamente nella prole (es. numero di figli) risentono meno dell'effetto materno, sono largamente indipendenti e non sono semplici conseguenze dei tratti espressi precocemente.

Solitamente, per standardizzare un esperimento in laboratorio, si procede con l'acclimatazione anche per alcune generazioni. Questa procedura serve per eliminare, per esempio, l'effetto che può derivare dalle condizioni ambientali sperimentate dalle madri degli organismi da utilizzare. Studi specifici sull'effetto e sulla persistenza dell'"identità materna" (*sensu* Sakwinska 2004) sui tratti di organismi clonali sono relativamente rari (Lynch, 1985; Schwaegerle *et al.*, 2000). Quello che emerge è che l'ambiente induce cambiamenti che si trasmettono di generazione in generazione e il fenotipo di un singolo organismo è influenzato dall'ambiente a cui sono state sottoposte le generazioni parentali. Questa "memoria somatica" e gli effetti dell'identità materna sui tratti della prole ("effetto ambientale intergenerazionale", Schwaegerle *et al.* (2000)), sono fenomeni di eredità di tipo non genetico poco studiati rispetto all'importanza che rivestono da un punto di vista

evolutivo (Schwaegerle *et al.*, 2000). Ciò che esiste in letteratura è rappresentato da un ridotto numero di studi che esplora gli effetti dell'ambiente materno sulle dimensioni dei figli alla nascita, la quantità (Ebert, 1993; McKee & Ebert, 1996; La Montagne & McCauley, 2001) e la qualità delle risorse disponibili per la madre (Brett, 1993), così come l'ambiente sociale materno (Cleuvers *et al.*, 1997).

Proprio a causa della mancanza di studi, i meccanismi che stanno alla base degli effetti materni transgenerazionali non sono ancora completamente chiari e, soprattutto, non è chiaro per quante generazioni questi effetti si possano prolungare (Rohde & Junntila, 2007). Le uniche evidenze descrivono una trasmissione fino alla seconda-terza generazione e, in pochissimi casi, l'effetto è stato analizzato per un numero superiore di generazioni. I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi (Esperimento 3.3) rappresentano uno dei rarissimi esempi di studio su un numero relativamente elevato di generazioni successive (8) di metazoi geneticamente omogenei. Ciò che abbiamo osservato è riconducibile ad un effetto materno transgenerazionale in cui ciascuna generazione influenza la successiva mediante il trasferimento di un' 'informazione' che passa di madre in figlia (Crean & Marshall, 2009).

Se il microambiente rimane costante di generazione in generazione, l'effetto materno potrà contribuire ad un adattamento fenotipico rapido e reversibile (acclimatazione). Nel caso di *H. incongruens*, la selezione di una strategia di ripartizione del rischio, (esperimento 3.3) si osserva fino alla F5. Dopo 6 generazioni si osserva un cambio di strategia, il tutto riconducibile ad un processo di acclimatazione transgenerazionale. Gli organismi clonali, dopo 6 generazioni in condizioni costanti di temperatura e fotoperiodo (24°C e fotoperiodo 12:12:L:B) sembrano acquisire una "nuova informazione" sulle condizioni di allevamento che da indicatori di imprevedibilità ambientale, dopo 6 generazioni di acclimatazione, potrebbero essere percepite come indicatori di ambiente stabile e favorevole. L'effetto materno legato alla nascita in risaia (dalla generazione P alla generazione F5) è sostituito da un nuovo effetto legato all'allevamento in laboratorio. Gli organismi si acclimatano, le condizioni di temperatura e fotoperiodo che le prime 5 generazioni percepivano come indicatori di imprevedibilità ambientale, a partire dalla generazione F6 vengono percepite come favorevoli e stabili nel tempo e le femmine clonali smettono di produrre tre diverse tipologie di uova e producono prevalentemente uova non durature a schiusa precoce.

Che si tratti di un fenomeno di acclimatazione sembra confermato dal fatto che è almeno parzialmente reversibile: le linee clonali che dopo 8 generazioni di acclimatazione a condizioni percepite come condizioni che non danno indicazione sul futuro idroperiodo, producono prevalentemente uova non durature, mantengono la capacità di rispondere (producendo uova durature) se spostate a condizioni predittive del disseccamento.

Badyaev & Uller (2009) ribadiscono l'importanza dello studio degli effetti materni al fine di una profonda comprensione dei processi evolutivi.

Non tutti gli effetti materni rappresentano comunque un beneficio e/o hanno un valore adattativo per la progenie. E' noto che i benefici possono dipendere dal contesto e che quelli osservati in uno stadio della vita o in un singolo tratto possono manifestarsi a scapito di un altro stadio o di un altro tratto (Mousseau & Fox, 1998a; Plaiston & Benton, 2009). Nonostante ciò, esistono sostanziali evidenze che gli effetti materni possono accelerare una risposta evolutiva legata alla selezione del fenotipo della progenie (Marshall & Uller, 2007). L'effetto materno avrà conseguenze dal punto di vista evolutivo solo se è in grado di modificare i fenotipi all'interno di una popolazione. Come già visto ciò può avvenire attraverso effetti materni di tipo transgenerazionale che determinano un aumento della fitness della progenie (Bernardo, 1996). Resta il fatto che le variazioni geografiche dell'effetto materno sono ancora relativamente poco documentate (Rasanen & Kruuk, 2007).

Un'ulteriore evidenza degli effetti materni transgenerazionali è stata ottenuta su femmine clonali della specie *H. barbara*. I risultati dello studio di traslocazione (Esperimento 3.7) dimostrano che esistono differenze nei tratti in organismi di F1 che crescono in condizioni diverse rispetto a quelle materne. Ciò rafforza l'ipotesi secondo cui l'effetto materno rappresenta una sorgente di plasticità fenotipica transgenerazionale che predispone la progenie alle condizioni ambientali nelle quali probabilmente dovrà svilupparsi.

Se accettiamo questa interpretazione dei risultati descritti, possiamo ipotizzare che acclimatazione ed evoluzione rapida (*sensu* Hairston *et al.*, 2005) possano coincidere e che si possa ipotizzare una convergenza tra tempi ecologici e tempi evolutivi (Hairston *et al.*, 2005; Hendry & Kinnison, 1999). Nuove evidenze sulla plasticità fenotipica transgenerazionale potrebbero fare luce sull'impatto dell'effetto materno sul potenziale di evoluzione rapida, su scala ecologica, delle popolazioni (Hairston *et al.*, 2005; Gilbert, 2003; Rasanen & Kruuk, 2007). Questo potenziale ha implicazioni significative nel campo della biologia evoluzionistica e rappresenta una nuova dimensione per l'ecologia (Shimada *et al.*, 2010).

E' evidente il ruolo degli effetti materni alla base delle strategie vitali e dei processi di memoria transgenerazionale. E' importante segnalare che da esperimenti in corso non inclusi in questa tesi, emerge che le uova di *Heterocypris* sono comunque in grado di percepire ed esprimere fenotipi diversi (uova durature, uova non durature a schiusa precoce, uova non durature a schiusa ritardata) anche in funzione delle condizioni a cui sono sottoposte, indipendentemente dalla condizione in cui è stata allevata la madre. Ciò pone le basi per ulteriori importanti sviluppi e conferma che le risposte fenotipiche che queste uova fanno osservare sono reversibili, proprio come lo sono i processi di acclimatazione ed evoluzione.

I risultati ottenuti in questa tesi di dottorato aprono diverse e inattese prospettive, come:

- 1) l'effetto materno non viene eliminato da 2 generazioni di acclimatazione e sembra variare di generazione in generazione. In effetti non sono molti i lavori che analizzano le norme di reazione in generazioni successive. Nel caso di *H. incongruens* sembra che l'effetto materno si protragga per almeno 5 generazioni, pur variando dal punto di vista quantitativo.
- 2) l'effetto della "decisione materna" si vede anche confrontando i tratti vitali di generazioni successive nate da uova precoci o tardive.
- 3) dopo 6 generazioni di acclimatazione in laboratorio gli organismi cambiano strategia attraverso un processo di acclimatazione transgenerazionale..

L'uso di organismi clonali è ideale per distinguere il ruolo del genotipo da quello di altri fenomeni sulla determinazione del fenotipo. In linee clonali apomittiche si assume l'assenza di variabilità genetica entro generazione e quindi la variabilità fenotipica intra ed intergenerazionale osservata, per esempio, nella fenologia di schiusa delle uova, è da ricondurre a componenti non genetiche. Tra queste recenti studi mettono in evidenza le cosiddette componenti di eredità epigenetica, ossia quelle modificazioni nelle funzioni geniche che sono trasmissibili a meno di modifiche nella sequenza del DNA (Wu & Morris 2001; Bird 2002). La metilazione del DNA è probabilmente il meccanismo più studiato e documentato.

CONCLUSIONI

L'osservazione di una strategia di ripartizione del rischio di tipo 'diversified bet-hedging' 'su linee partenogenetiche appartenenti a specie differenti (*H. incongruens*, *H. barbara*) e popolazioni di diversa provenienza (pozze temporanee di Lampedusa, risaie del nord-Italia) è una delle rarissime evidenze empiriche di diversified bet-hedging documentate ad oggi. La strategia è del tipo 'genuine diversified bet-hedging' (*sensu* Seger & Brokman, 1987) in quanto osservata su organismi geneticamente identici e appartenenti a ben 4 linee clonali provenienti dalle risaie del nord Italia. Gli organismi clonali utilizzati rappresentano il materiale biologico fondamentale per lo studio del diversified bet-hedging ed essenziale per discriminare tra la componente genetica e le altre forme di determinazione fenotipica.

La teoria vuole che la strategia di diversified bet-hedging sia la strategia ottimale in condizioni di imprevedibilità ambientale; a conferma di ciò è stata documentata in tre differenti linee evolutive del genere *Heterocypris*. Si è inoltre dimostrato che nella specie *H. incongruens* gli effetti materni alla base del 'diversified bet-hedging' (*sensu* Crean & Marshall, 2009) hanno una durata maggiore di due generazioni (si ipotizza una durata di 6 generazioni nelle condizioni controllate utilizzate) e si trasferiscono probabilmente mediante un effetto cumulativo e attraverso meccanismi di eredità epigenetica.

Dopo 6 generazioni è stato osservato un fenomeno di acclimatazione (o adattamento rapido) in due cloni della specie *H. incongruens*.

Altre strategie adottate in ambiente imprevedibile come la produzione di uova non durature a schiusa precoce o tardiva sono tese a ridurre la competizione intragenerazionale diminuendo le densità della popolazione. Si dimostra che all'aumentare di quest'ultima si hanno conseguenze negative per la fitness della specie *H. incongruens*: elevate densità aumentano i tempi di sviluppo e di generazione alla 1° schiusa, anche se non inducono la produzione di uova durature.

APPENDICE

APPENDICE 1

Tabella A1.1 – Numero di uova prodotte relativo alle diverse tipologie ('early'= uova non durature a schiusa precoce; 'delayed'= uova non durature a schiusa ritardata, 'resting'= uova durature) da femmine di *H. incongruens* delle popolazioni di risaia del Nord Italia per le generazioni P, F1, F2. E' indicato anche il numero di femmine riprodotte, il numero totale di uova prodotte (tot) e il valore dell'indice di equiripartizione (E).

<i>Budrione - bc3</i>						
Generazione	N° femm. Ripr.	early	delayed	ud	tot	E
P	1	21	0	0	21	0,33
1	6	41	0	0	41	0,33
2	5	117	8	2	127	0,39

<i>Budrione - cc1</i>						
Generazione	N° femm. Ripr.	early	delayed	ud	tot	E
P	1	26	0	0	26	0,33
1	4	13	0	0	13	0,33
2	4	158	1	8	167	0,37

<i>Bigliana - b1</i>						
Generazione	N° femm. Ripr.	early	delayed	ud	tot	E
P	1	5	0	10	15	0,60
1	2	4	0	0	4	0,33
2	4	21	0	27	48	0,66

<i>Bigliana - b5</i>						
Generazione	N° femm. Ripr.	early	delayed	ud	tot	E
P	1	11	0	22	33	0,84
1	6	158	3	4	165	0,60
2	23	695	22	32	749	0,36

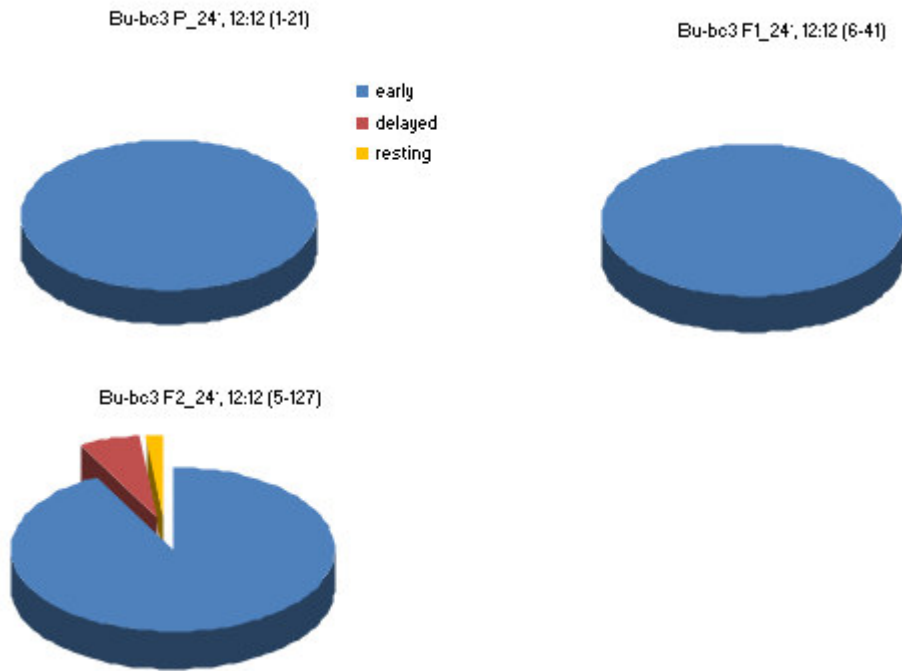


Figura A1.1 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione di Budrione (nord Italia) per le generazioni P, F1, F2. E’ indicato: il clone, la generazione, le condizioni sperimentali di temperatura e fotoperiodo, il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova prodotte per generazione.

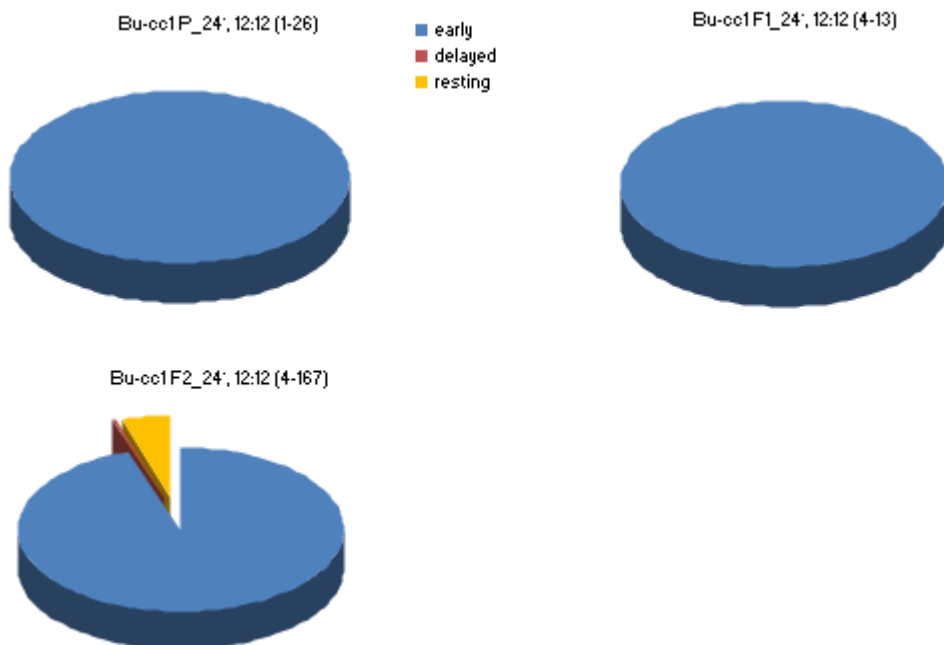


Figura 1A.2 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione di Budrione (nord Italia) per le generazioni P, F1, F2. E’ indicato: il clone, la generazione, le condizioni sperimentali di temperatura e fotoperiodo, il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova prodotte per generazione.

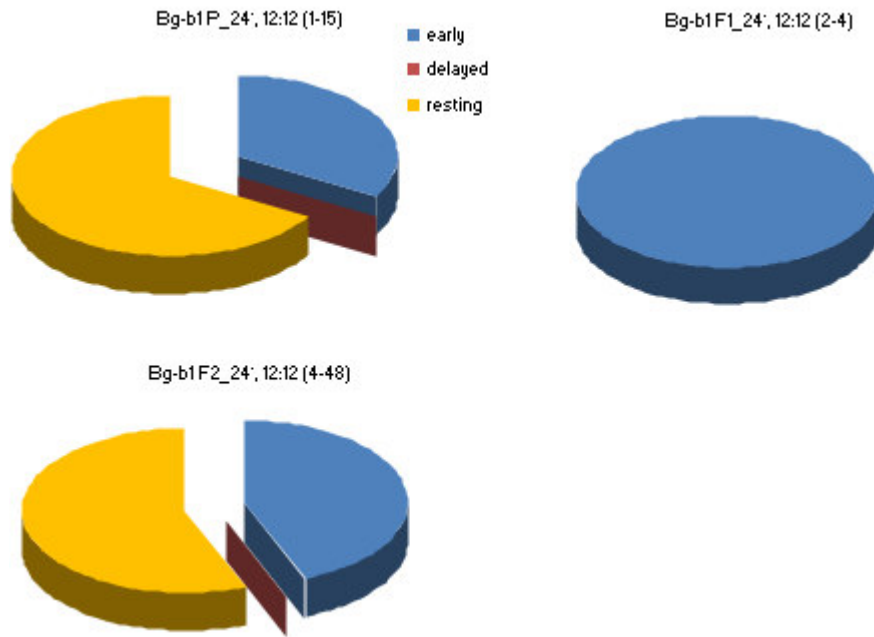


Figura A1.3 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione de La Bigliana (nord Italia) per le generazioni P, F1, F2. E’ indicato: il clone, la generazione, le condizioni sperimentali di temperatura e fotoperiodo, il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova prodotte per generazione.

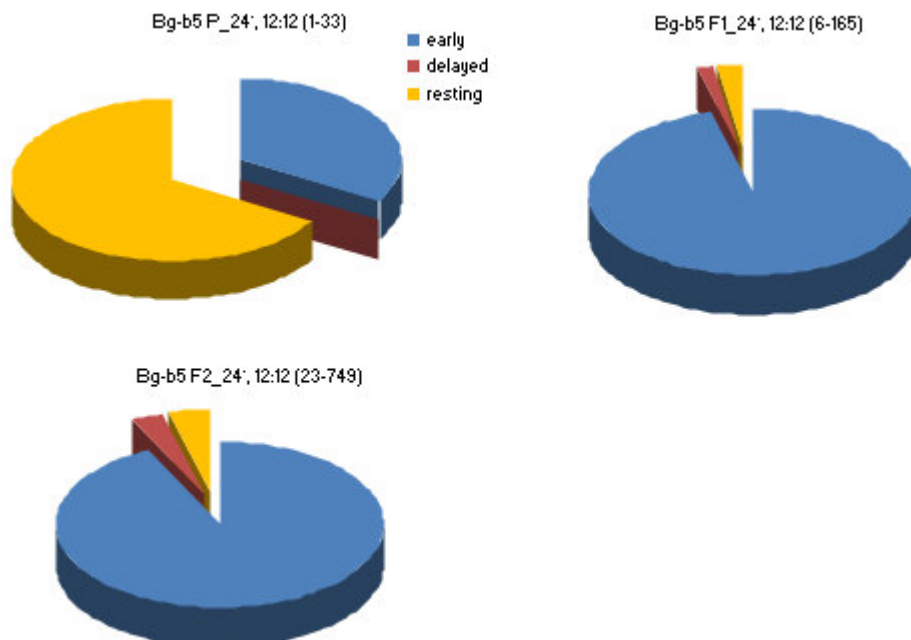


Figura A1.4 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. incongruens* della popolazione de La Bigliana (nord Italia) per le generazioni P, F1, F2. E’ indicato: il clone, la generazione, le condizioni sperimentali di temperatura e fotoperiodo, il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova prodotte per generazione.

APPENDICE 2

Se andiamo ad osservare la variabilità dei tratti vitali all'aumentare delle generazioni e quindi al diminuire del numero di cloni (vedere Appendice 3. Tab. A3.1) notiamo che mentre per le popolazioni del Nord-Italia non si registrano andamenti decrescenti evidenti (ad eccezione dei tempi di sviluppo e del tasso intrinseco di crescita per la popolazione di Bigliana (Tab. 3.1b)), per quelle di Lampedusa sono numerosi i tratti per i quali si notano trend decrescenti (7/13 per Cavallo Bianco, 5/13 per Forbice P, 10/13 per forbice C). Nel conteggio i valori della generazione parentale non sono stati considerati in quanto gli organismi potevano ancora risentire dell'essersi originati da uova durature. I risultati ottenuti per Lampedusa rappresentano un risultato atteso, in quanto al diminuire del numero delle linee clonali mi attendo un'omogeneizzazione del tratto e una conseguente riduzione della variabilità legata ad esso. (Tab. 3.1c.d.e). La mancata osservazione dello stesso trend e la registrazione di valori molto più bassi di deviazione standard negli organismi di risaia è imputabile al fatto che in questo caso tutti gli organismi appartengono a linee clonali di tipo W.

Tabella A2.1 – Numero di uova prodotte relativo alle diverse tipologie ('early'= uova non durature a schiusa precoce; 'delayed'= uova non durature a schiusa ritardata, 'resting'= uova durature) da femmine di *H. incongruens* delle popolazioni di risaia del Nord Italia per le generazioni P, F1, F2. E' indicato anche il numero di femmine riprodotte, il numero totale di uova prodotte (tot) e il valore dell'indice di equiripartizione (E).

Lampedusa - 2a6 (16 °C, 12:12)						
Generazione	N° femm. Riprodotte	early	delayed	ud	tot	E
P	1	11	17	19	47	0,96
1	6	83	14	14	111	0,56
2	7	190	25	2	217	0,43
3	14	174	118	3	295	0,66

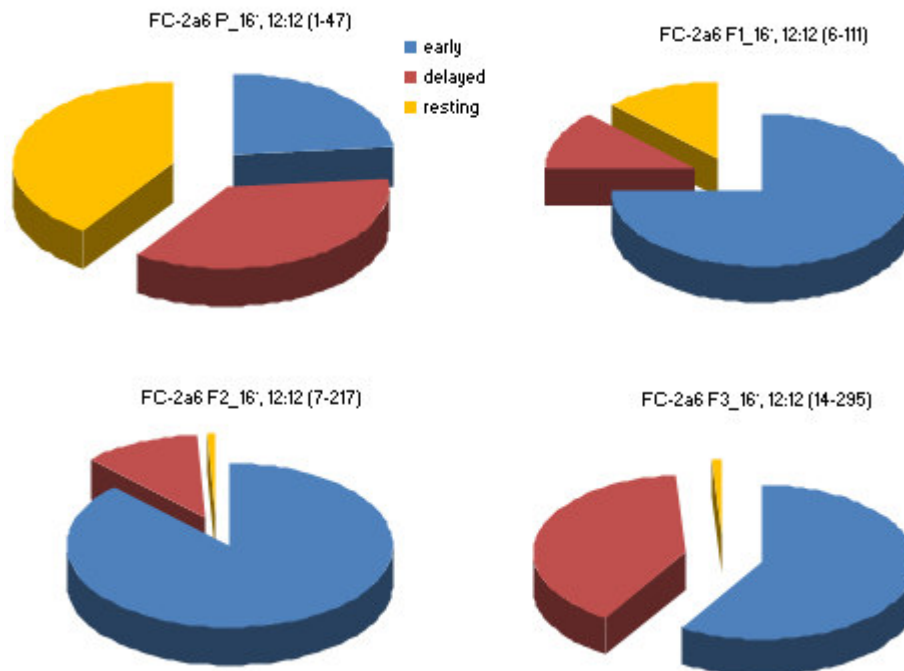


Figura A2.1 – Proporzion delle diverse tipologie di uova prodotte (‘early’= uova non durature a schiusa precoce; ‘delayed’= uova non durature a schiusa ritardata, ‘resting’= uova durature) da femmine di *H. barbara* della popolazione di Forbice C (Lampedusa) per le generazioni P, F1, F2. E’ indicato: il clone, la generazione, le condizioni sperimentali di temperatura e fotoperiodo, il numero di femmine riprodotte e il numero totale di uova prodotte per generazione.

APPENDICE 3

Tabella A3.1 – Valori di variabilità (deviazione standard) relativa a ciascun tratto misurato per generazione entro popolazione. In tabella sono inoltre indicati: numero di femmine isolate (N), numero di femmine che hanno prodotto uova (R), numero di femmine che hanno dato origine a piccoli, il rapporto percentuale tra il numero di femmine isolate e il numero di femmine che ha prodotto uova (R/N%) e il numero di cloni.

a.

	Budrione					
	P	1°	2°	3°	4°	5°
Femmine isolate (N)	58	39	42	47	69	47
Femmine con uova (R)	52	16	10	38	59	34
Femmine con piccoli	48	15	10	35	51	32
R/N (%)	0,9	0,4	0,2	0,8	0,9	0,7
N° cloni	58	10	7	3	2	2
Età alla morte 1 (E1)	2,86	14,19	13,39	10,61	13,72	15,44
Età alla morte 2 (E2)	2,73	16,10	13,67	8,29	11,65	12,27
Età alla riproduzione	2,65	7,28	3,95	5,12	4,08	5,46
Tempo generazione1	21,71	15,47	17,82	13,42	27,33	37,67
Tempo generazione50	25,60	17,94	21,57	60,48	37,67	40,17
Tempo generazione100	39,46	19,54	26,46	60,48	52,77	41,73
Lunghezza	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09
Larghezza	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06
Piccoli	6,81	3,70	27,65	20,89	24,65	11,83
Uova durature	1,73	0,25	2,16	1,82	7,42	5,21
Uova totali	6,78	3,62	28,71	21,23	26,45	13,45
Tasso intr. di crescita (r)	0,062	0,058	0,051	0,063	0,069	0,057
Indice di equiripartizione (E)	0,003	0,000	0,011	0,003	0,005	0,031

b.

	Bigliana					
	P	1°	2°	3°	4°	5°
Femmine isolate (N)	16	57	48	48	48	45
Femmine con uova (R)	12	23	32	35	46	35
Femmine con piccoli	12	21	29	34	45	33
R/N (%)	0,8	0,4	0,7	0,7	1,0	0,8
N° cloni	16	12	6	3	3	2
Età alla morte 1 (E1)	7,88	14,58	17,70	15,59	10,42	16,39
Età alla morte 2 (E2)	8,38	11,96	14,81	10,18	9,81	14,79
Età alla riproduzione	3,93	6,79	6,26	5,16	4,02	4,98
Tempo generazione1	4,15	20,11	12,59	13,37	24,13	19,48
Tempo generazione50	5,91	18,20	18,59	17,81	30,29	34,48
Tempo generazione100	6,41	23,70	29,70	47,63	41,74	54,74
Lunghezza	0,15	0,05	0,14	0,08	0,08	0,10
Larghezza	0,09	0,04	0,07	0,07	0,06	0,07
Piccoli	3,24	16,85	27,00	29,89	11,68	20,28
Uova durature	0,85	3,45	3,64	4,44	7,26	7,68
Uova totali	2,99	18,32	27,56	30,87	14,72	21,47
Tasso intr. di crescita (r)	0,031	0,113	0,073	0,073	0,074	0,051
Indice di equiripartizione (E)	0,002	0,023	0,004	0,004	0,013	0,006

continua

continua

c.

	Cavallo bianco			
	P	1°	2°	3°
Femmine isolate (N)	48	48	37	18
Femmine con uova (R)	46	16	15	11
Femmine con piccoli	39	16	12	8
R/N (%)	1	0	0	1
N° cloni	48	13	2	1
Età alla morte 1 (E1)	22,88	19,47	15,15	8,41
Età alla morte 2 (E2)	20,08	10,91	11,87	7,82
Età alla riproduzione	8,09	8,92	5,14	6,34
Tempo generazione1	56,97	63,59	47,58	22,14
Tempo generazione50	63,68	58,19	55,54	21,33
Tempo generazione100	63,91	64,58	59,73	61,05
Lunghezza	0,10	0,04	0,07	0,05
Larghezza	0,06	0,03	0,05	0,06
Piccoli	9,18	12,43	12,44	4,22
Uova durature	14,46	3,96	7,98	16,81
Uova totali	17,40	12,18	12,66	17,13
Tasso intr. di crescita (r)	0,03	0,025	0,022	0,017
Indice di equiripartizione (E)	0,04	0,180	0,120	0,130

d.

	Forbice P			
	P	1°	2°	3°
Femmine isolate (N)	48	47	42	48
Femmine con uova (R)	34	22	30	42
Femmine con piccoli	27	16	30	33
R/N (%)	0,7	0,5	0,7	0,9
N° cloni	48	16	8	4
Età alla morte 1 (E1)	19,21	41,39	37,37	31,31
Età alla morte 2 (E2)	13,39	24,38	18,11	16,34
Età alla riproduzione	12,78	9,61	10,07	7,57
Tempo generazione1	12,44	13,98	48,60	51,37
Tempo generazione50	11,59	26,80	73,64	63,07
Tempo generazione100	69,28	62,56	58,67	52,39
Lunghezza	0,06	0,09	0,07	0,31
Larghezza	0,04	0,06	0,07	0,08
Piccoli	7,99	3,85	14,94	8,71
Uova durature	7,89	20,02	7,85	3,61
Uova totali	13,17	21,99	18,75	9,19
Tasso intr. di crescita (r)	0,009	0,012	0,025	0,025
Indice di equiripartizione (E)	0,030	0,010	0,040	0,020

continua

continua
e.

	Forbice C			
	P	1°	2°	3°
Femmine isolate (N)	32	48	48	48
Femmine con uova (R)	20	44	44	31
Femmine con piccoli	15	44	44	31
R/N (%)	0,6	0,9	0,9	0,6
N° cloni	32	5	4	3
Età alla morte 1 (E1)	28,87	21,42	22,49	46,79
Età alla morte 2 (E2)	20,22	29,53	24,96	16,69
Età alla riproduzione	17,34	11,86	10,43	9,32
Tempo generazione1	52,08	39,53	29,16	24,35
Tempo generazione50	48,33	46,75	31,31	27,63
Tempo generazione100	53,56	62,61	52,47	38,50
Lunghezza	0,15	0,43	0,42	0,09
Larghezza	0,10	0,25	0,25	0,06
Piccoli	14,78	6,53	15,24	21,76
Uova durature	16,28	5,53	1,91	0,34
Uova totali	22,97	8,83	15,04	21,68
Tasso intr. di crescita (r)	0,017	0,025	0,020	0,018
Indice di equiripartizione (E)	0,060	0,020	0,000	0,010

BIBLIOGRAFIA

- Alcorlo, P., Baltanàs A. & Arqueros L., 1999. Intra-clonal shape variability in the non-marine ostracod *Heterocypris barbara* (Crustacea, Ostracoda) Geosound (Yerbilimleri), 35:1-11.
- Alekseev V. & Lampert W., 2001. Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. Nature 414: 899-901.
- Alleman M. & Doctor J., 2000. Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. Plant molecular biology 43: 147–161.
- Angell R.W. & Hancock J.W., 1989. Response of eggs of *Heterocypris incongruens* (Ostracoda) to experimental stress. Journal of Crustacean Biology 9: 381-386.
- Anway M.D., Cupp, A. S., Uzumcu M., Skinner M. K., 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. Science 308-5727: 1466–1469.
- Arbaciauskas E.S., 2004a. Life history characteristics and fitness in descendents of parthenogenetic and exhippio females of *Daphnia magna*. Hydrobiologia 526 211-218.
- Arbaciauskas E.S., 2004b. Seasonal phenotypes of *Daphnia*: post-diapause and directly developing offspring. Journal of Limnology. 63:7-15.
- Badyaev A. V. & Uller T., 2009. Parental effects in ecology and evolution: mechanisms, processes and implications. Philophical Transactions of the Royal Society. 364: 1169-1177.
- Baltanàs A., 1992. A contribution to the knowledge of the cypridid ostracode fauna (Crustacea, Ostracoda, Cyprididae) on the Iberian peninsula, and a comparison with adjacent areas. Archiv fuer Hydrobiologia, 3 (suppl.): 419-432.
- Baltanàs A., Alcorlo P., Danielopol D.L., 2002. Morphological disparity in populations with and without sexual reproduction: a case study in *Eucypris virens* (Crustacea: Ostracoda). Biological Journal of the Linnean Society 75: 9-19.
- Baltanas A., Montes C., Martino P., 1990. Distribution patterns of ostracods in Iberian saline lakes. Influence of ecological factors. Hydrobiologia 197: 207-220.
- Battish S. K., 1981. Freshwater Ostracoda of the subfamily Cyprinotinea from Punjab India with the description of eight new species. Journal Natural History 15:645-669.
- Barzotti R, Pelliccia F. & Rocchi A., 2006. DNA methylation, histone H3 methylation, and histone H4 acetylation in the genome of a crustacean. Genome 49(1):87–90.
- Beaumont H. J. E., Gallie J., Kost C., Ferguson G.C. & Rainey P.B., 2009. Experimental evolution of bet-hedging. Nature. 462: 90-93.
- Bellavere C., Benassi G., Calzolari M., Meisch C., McKenzie K.G., Rossi V., 2002. *Heterocypris* (Crustacea: Ostracoda) from the Isole Pelagie (Sicily, Italy): the coexistence of different morphotypes. Italian Journal of Zoology 69: 53-57.

- Benzie J.A.H., 1984. Small scale diurnal migration by *Heterocypris incongruens* (Ramdhor 1808) (Ostracoda: Cyprididae) in a temporary pool Ghana west Africa. *Journal of Crustacean Biology* 4: 63-65.
- Bernardo J., 1996. Maternal effects in animal ecology. *American zoology*. 36 (2): 83-105.
- Barracough T.G. & Nee S., 2001. Phylogenetics and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 391-399.
- Berrigan, D. & Scheiner., S. M., 2004. Modeling the evolution of phenotypic plasticity. – In: DeWitt, T. J. & Scheiner, S. M. (eds), *Phenotypic plasticity: functional and conceptual approaches*. Oxford Univ. Press, 82–97.
- Bird A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* 16(1): 6–21.
- Bodergat A.M., 1983. Les ostracodes, témoins de leur environnement : approche chimique et écologie en milieu lagunaire et océanique. *Documents des laboratoires de géologie de Lyon* 88: 246.
- Bradshaw, W.E. & Holzapfel, C.M., 2001. Phenotypic evolution and the genetic architecture underlying photoperiodic time measurement. *Journal of insect physiology*. 47:809-820.
- Bull, J.J., 1987. Evolution of phenotype variance. *Evolution* 41: 303-315.
- Burstin J. & Charcosette A., 1997. Relationship between phenotypic and marker distances: theoretical and experimental investigations. *Heredity* 79: 477-483.
- Butlin R.K., Schön I., Griffiths H.I., 1998. Introduction to reproductive modes. Sex and parthenogenesis: evolutionary ecology of reproductive modes in non-marine ostracods. (ed Martens K.), 1-24. Lseiden: Backhuys.
- Butlin R.K. & Menozzi P., 2000. Open question in evolutionary ecology: do ostracods have the answers? *Hydrobiologia* 419: 1-14.
- Calzolari M., 2000. Segnalazione di popolazioni bisessuate di *Heterocypris incongruens* (Crustacea: Ostracoda) sulle Isole Pelagie. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche. Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Parma.
- Carbonel P., Colin J.P., Danielopol D.L., Löffler H., Neustrueva I., 1998. Paleoecology of limnic ostracodes: a review of some major topics. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 62: 413-461.
- Carvalho G.R. & Hughes R.N., 1983. The effect of food availability, female culture-density and photoperiod on ephippia production in *Daphnia magna* Straus (Crustacea : Cladocera). *Freshwater biology*, 13: 37-46.
- Champagne F.A., 2008. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care, *Frontiers in Neuroendocrinology*. 29: 386-397.

- Chaplin J.A., Havel J.E., Hebert P.D.N., 1994. Sex end ostracods. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 435-439.
- Chen W.Y., Wang D.H., Yen R. C., Luo J., Gu W. & Baylin, S. B., 2005. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123: 437-448.
- Chinnusamy V, Zhu J.K. 2009. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Science in China series C: life sciences*. 52:331-343.
- Cleuvers M., Goser B., Ratte H.T., 1997. Life-strategy shift by intraspecific interaction in *Daphnia magna*: change in reproduction from quantity to quality. *Oecologia* 110:337–345.
- Cooper W.S., Kaplan R.H., 1982. Adaptive coin-flipping: a decision theoretic examination of natural selection for random individual variation. *Journal of Theoretical Biology* 94: 135–151.
- Crean A. J. & Marshall D. J., 2009. Coping with environmental uncertainty: dynamic bet-hedging as a maternal effect. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364: 1087-1096.
- Crow, J.F., 1997. The high spontaneous mutation rate, Is it a health risk? *Proceedings. of natural academy of science. USA*. 94: 8380–8386.
- Danforth B.N., 1999. Emergence dynamics and bet-hedging in a desert bee *Perdita portalis*. *Proceedings Royal Society London* 266: 1985–1994.
- De Meester, L. Declerk L. S, Stoks G. S., Louette G, Van De Meutter F., De Bie T., Michels E. & Brendonck L., 2005. Ponds and pools as model systems in conservation biology, ecology and evolutionary biology. *Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems* 15: 715-725.
- Denlinger D.L., 2002. Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology*. 47: 93–122.
- DeWitt T.J. & Langerhans R.B., 2004. Integrated solutions to environmental heterogeneity: theory of multimoment reaction norms. 98-111 in T.J. DeWitt and S.M. Scheiner, eds. *Phenotypic Plasticity. Functional and Conceptual Approaches*. New York, Oxford University Press.
- Donohue K., Dorn L., Griffith C., Kim E., Aguilera A., Polisetty C. R. & Schmitt J. 2005b. The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. *Evolution* 59:758–770.
- Dyer A.R., 2004. Dormancy-inducing factors in *Aegilops triuncialis* suggest multiple germination strategies. *Plant Ecology* 172: 211-218.
- Drake A.J. & Liu L., 2010 Intergenerational transmission of programmed effects: public health consequences. *Trends in endocrinology and metabolism*. 21: 206–213.
- Ebert D., 1993. The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna*: The influence of genetic, environmental and maternal effects. *Archive Hydrobiologia [Suppl]* 90:453–473.
- Ellner S. P. & Hairston N. G., 1994. Role of overlapping generations in maintaining genetic variation in a fluctuating environment. *American Naturalist*, 143: 403-417.

- Evans M.E.K., & Dennehy J.J., 2005. Germ banking: bet-hedging and variable release from egg and seed dormancy. *Quarterly Review of Biology* 80: 431–451.
- Evans M.E.K., Ferriere R., Kane M.J. & Venable D.L., 2007. Bet hedging via seed banking in desert evening primroses (*Oenothera*, Onagraceae): demographic evidence from natural populations. *American Naturalist* 169: 184–194.
- Finston T.L., 2000. Effect of a temporally heterogeneous environment on size and shape of the giant ostracods *Mytilocypris* (Ostracoda : Cyprididae) from Australian salt lakes. *Marine and Freshwater Research* 55: 499-507.
- Galloway, L.F., 2005. Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New phytologist*. 166: 93–99.
- Galloway, L.F., & Etterson J.R., 2007. Inbreeding depression in an autotetraploid herb: a three cohort field study. *New phytologist*. 173: 383-392.
- Ganning B., 1971. On the ecology of *Heterocypris salinus*, *H. incongruens* and *Cypridopsis aculeata* (Crustacea, Ostracoda) from Baltic brackish-water rockpools. *Marine Biology* 8, 271-279.
- Gauthier H., Brehm V., 1928. Ostracodes et Cladoceres de l'Algerie e de la Tunisie. *Bulletin Society Historical. Nature. Africa. Nord.*, 19: 114-121.
- Gauthier H., 1938. *Cyprinotus incongruens* (Ramdor, 1808) ssp. *Attemuata* nov. *Bull. Soc. Sci. Nat. Marocco*, 19:36-61.
- Ghetti P.F. & McKenzie K. 1981. Ostracodi (Crustacea, Ostracoda). *C.N.R AQ/1/108*. 11:63-64.
- Gilbert J. J. & Stemberger R. S., 1984. *Asplanchna*-induced polymorphism in the rotifer *Keratella slacki*. *Limnology & Oceanography*, 29(6): 1309:1316.
- Gilbert J.J., (2002). Endogenous regulation of environmentally induced sexuality in a rotifer; a multigenerational parental effect induced by fertilisation. *Freshwater Biology*, 47: 633–1641.
- Gingerich, P. D., 2003. Land-to-sea transition of early whales: evolution of Eocene Archaeoceti (Cetacea) in relation to skeletal proportions and locomotion of living semiaquatic mammals. *Paleobiology*, 29: 429-454.
- Hairston Jr N. G., Ellner S. P., Geber M. A., Yoshida T. & Fox J. A., 2005. Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecology letters*. 8: 114-1127.
- Haldane J.B.S., 1937. The effect of variation on fitness. *American Naturalist*. 71: 337–349.
- Havel J. E. & Barrie L. T., 1995. Life history characteristics of the freshwater ostracod *Cyprinotus incongruens* and their application to toxicity testing. *Ecotoxicology*, 4: 206-218.
- Henderson I. R. & Jacobsen S. E., 2007. Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447: 418-424.
- Hendry A. P. & Kinnison M. T., 1999. Perspective: the pace of modern life: measuring rates of contemporary microevolution. *Evolution* 53 (6): 1637-1653.

- Hopper K. R., 1999. Risk spreading and bet-hedging on insect population biology. *Annual Review of Entomology*. 44: 535-560
- Horne D.J., Baltanàs A., Paris G., 1998. geographical distribution of reproductive modes in living non-marine Ostracod. In Martens K. (ed). *Sex and parthenogenesis: evolutionary ecology of reproductive modes in non-marine ostracods*. Backhuys, Leiden.
- Huey R. B & Barrigan, D. (2001). Temperature demography and ectotherm fitness. *American naturalist*. 158: 204-210.
- Hume, L., & Cavers P. B., 1981. A methodological problem in genecology. Seeds versus clones as source material for uniform gardens. *Canadian Journal of Botany* 59:763–768.
- Hunter, M. D. & McNeil J. N., 2000. Geographic and parental influences on diapause by a polyphagous insect herbivore *Agricolture. for. entomology*. 2:49-55.
- Jablonka E., Raz G., 2009. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The quarterly review of biology*. 82(4): 131-176.
- Jennings H. C. & Lynch R. S., 1928. Age, mortality, fertility, and individual diversities on the rotifer *Proales sordida* Gosse. Effect of age of the parent on characteristics of the offspring. *Journal of Experimental. Zoology*. 50: 345-407.
- Johannes, F., Porcher, E., Teixeira, F. K., Saliba-Colombani, V., Simon, M., Agier, N., Bulski, A., Albuissou, J., Heredia, F., Audigier, P., Bouchez, D., Dillmann, C., Guerche, P., Hospital, F. & Colot, V., 2009. Assessing the Impact of Transgenerational Epigenetic Variation on Complex Traits *PLOS Genetics* 5, e1000530.
- Judson O.P., Normark B.B., 1996. Ancient asexual scandals. *Trend in ecology and evolution* 11: 41-46.
- Kalisz S. & M. Purugganan., 2004. Perspective: Ecological and population epigenetics and the role of methylation in plants. *Trends in Ecology & Evolution* 19:309-314.
- Kaplan R.H. & Cooper W.S., 1984. The evolution of developmental plasticity in reproductive characteristics: an application of the adaptive coin-flipping principle. *American Naturalist* 123: 393–411.
- Kiefer F., 1936. Über die Krebstiere, insbesondere die Ruderfusskrebse des Eichener Sees. *Beiträge zur naturkundlichen Forschung in SW-Deutschland* 1:157-162.
- Kornicker L.S., Shon I.G. 1971. Viability of Ostracoda eggs degested by fish and effect of digestive fluids on Ostracoda shells ecological and paleological implication. *Bull. Centre Rech. Pau SNPA*, 125-135.
- Külköylüoğlu O. & Dügel M., 2004. Ecology and spatiotemporal patterns of Ostracoda (Crustacea) from Lake Golcuk (Bolu, Turkey). *Archive für Hydrobiologic* 160: 67-83.
- LaMontagne J.M. & E. McCauley, 2001. Maternal effects in *Daphnia*: What mothers are telling their children and do they listen? *Ecology Letters* 4: 64 –71.

- Lansing A. 1947. A transmissible, cumulative and reversible factor in aging. *Journal of Gerontology*. 2 : 228-239.
- Lansing. A. I., 1954. A nongenetic factor in the longevity of rotifers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 57: 455-464.
- Latifa G.A., 1987. Effect of temperature on the development of embryonic and postembryonic stages of *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808) (Ostracoda). *Crustaceana* 52: 95-100.
- Latzel V., Klimešová J., Hájek T., Gómez S., Šmilauer P., 2010. Maternal effects alter progeny's response to disturbance and nutrients in two *Plantago* species. *Oikos* 000: 001–011.
- Lopes I., Baird D. J. & Ribeiro R., 2006. Genetic adaptation to metal stress by natural populations of *Daphnia longispina*. *Ecotoxicology and environmental safety*. 63: 275-285.
- Lyko F., Ramsahoye B.H. & Jaenisch R., 2000. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 408(6812):538-40.
- Lynch. M., 1985. Spontaneous mutations for life-history characters in an obligate parthenogen. *Evolution*. 39: 804-818.
- Malmqvist B., Meisch C., Nilsson A.N., 1997. Distribution patterns of freshwater Ostracoda (Crustacea) in the Canary islands with regards to habitat use and biogeography. *Hydrobiologia* 347:159-170.
- Majoran S., Agrenius S., Kucera M., 2000. The effect of temperature on shell size and growth rate in *Krithe praetexta praetexta* (Sars). *Hydrobiologia* 419:141-148.
- Mandrioli, M., 2007. - A new synthesis in epigenetics: towards an unified function of DNA methylation from invertebrates to vertebrates. *Cellular and Molecular Life Science*. 64: 2522-2524.
- Mathias D., Jacky L., Bradshaw W E. & Holzapfel, C. M., 2005. Quantitative trait loci associated with photoperiodic response and stage of diapause in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Genetics*, 176: 391-402.
- Martens K., Schwartz S., Meisch C., Blaustein L., 2002. Non marine Ostracoda (Crustacea) of Mount Carmel (Israel), with taxonomic notes on the Eucypridinae and circum-Mediterranean *Heterocypris*. *Israel Journal of Zoology* 48:53-70.
- Martorella A., 2004. Primi dati sulla dinamica di popolazione di *Heterocypris barbara* (Crustacea: Ostracoda) di Lampedusa (Isole Pelagie). Tesi di laurea in Biologia Ecologica. Dipartimento di scienze ambientali. Università degli Studi di Parma.
- Mark I. McCormick. (2009). Indirect effects of heterospecific interactions on progeny size through maternal stress. *Oikos*. 5, 118:744-752. *Canadian Journal of Zoology* 56: 1744-1758.
- McLay C.L. 1978b. The population biology of *Cyprinotus carolinensis* and *Herpetocypris reptans* (Crustacea: Ostracoda). *Canadian Journal of Zoology* 56: 1170-1179.

- McKenzie K. G., 1971a. Paleozoogeography of freshwater Ostracoda. In: H. J. Oertel (ed), Pau-SNPA, Pau. 5: 207-237.
- McKenzie K.G., 1971b. Entomostraca of Albadra, with special reference to the genus *Heterocypris* (Crustacea, Ostracoda). Philosophical transactions of the royal society of London 260: 257-297.
- McKey D., Elias M., Pujol B., Duputié A., 2010. The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New phytologist* 318–332.
- Marshall D. J. & Uller T, 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos* 116, 1957–1963.
- McCormick M. I., (2009). Indirect effects of heterospecific interactions on progeny size through maternal stress. *Oikos* 5 118:744-752.
- McKee D, Ebert D (1996) The interactive effects of temperature, food level and maternal phenotype of offspring size in *Daphnia magna*. *Oecologia* 107:189–196
- McLay C. L., 1977. The population biology of *Cyprinotus carolinensis* and *Herpetocypris reptans* (Crustacea, Ostracoda). *Canadian journal of zoology*, 56: 1170-1179.
- Meisch C., 2000. Freshwater Ostracoda of western and central Europe. *Süsswasserfauna von Mitteleuropa* 8/3, 522 pp [Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg].
- Meisch C., Forro L., 1997. Checklist of recent Ostracoda (Crustacea) from Hungary. *Miscellanea Zoologica Hungaria*. 11: 33-48.
- Menu F. & Desouhant E., 2002. Bet-hedging for variability in life cycle duration: bigger and later-emerging chestnut weevils have increased probability of a prolonged diapause, *Oecologia*. 132: 167-174.
- Mezquita F., Roca J.R., Wansard G., 1999. Moulting, survival and calcification: the effects of temperature and water chemistry on an ostracod crustacean (*Herpetocypris intermedia*) under experimental conditions. *Archiv für Hydrobiologie* 146: 219-238.
- Molinier J, Ries G, Zipfel C. & Hohn B, 2006. Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* 442: 1046–1049.
- Mousseau, T. A. & Fox, C. W. 1998a The adaptive significance of maternal effects. *Trends in ecology & evolution*. 13: 403-407.
- Mousseau, T. A. & Fox, C. W. (eds) 1998b *Maternal effects as adaptations*, Oxford, UK: Oxford University Press.
- Mousseau, T. A. & Dingle, H. 1991 Maternal effects in insect life histories. *Annual. Review of Entomology*. 36: 511–534.
- Mura, G. & Zarattini, P. 1999. Influence of parental rearing conditions on cyst production and hatching of *Chirocephalus ruffoi*, an endemic fairy shrimp from Italy (Anostraca). *Crustaceana* 72: 449-465.

- Muysen B. & Janssen C., 2004. Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environmental pollution*. 130-3:309-316.
- Oertli B., Cereghino R., Hull A & Miracle R., 2009. Pond conservation: from science to practice. *Hydrobiologia*. 634: 1-9.
- Olofsson H., Ripa J. & Jonzèn N., 2009. Bet-hedging as an evolutionary game: the trade-off between egg size and number. *Proceedings of. Royal. Society* 500: 1-7.
- Otero M. et al., 1998. Effect of genotype and photoperiod on diapause strategies in *Eucypris virens* (Jurine, 1820) (Crustacea: Ostracoda). *Archive of Hydrobiology. Special Issues Advances in Limnology*. 52: 229-236.
- Pfau J., 1982. Experimentelle Untersuchungen zur Biologie und Autoökologie von *Heterocypris incongruens* (Ramdohr). Thesis University Goettingen.
- Philippi T., 1993. Bet-hedging germination of desert annuals: beyond the first year. *American Naturalist* 142: 474 –487.
- Philippi, T. & Seger J. 1989. Hedging one's evolutionary bets, revisited. *TREE* 4: 41–44.
- Pigliucci M., 2001. Characters and environments. In Wagner, *The Character Concept in Evolutionary Biology*, 363—388.
- Plaistow S.J. & Benton T.G., 2009. The influence of context-dependent maternal effects on population dynamics: an experimental test. *Philosophical transactions of the royal society*. 364: 1049-1058.
- Plainstow S. J., St Clair J. J. H., Grant J. & Benton T. G., 2007. How to put all your eggs in one basket: empirical patterns of offspring provisioning throughout a mother's lifetime. *American naturalist*. 170: 520-529.
- Puerper I., Wuerding-Maciel N.L., 1974. Occurrence of *Heterocypris incongruens* (Ramdohr), 1808. Ostracoda in Rio Grande do Sul Brazil. Discussion on the allied genera: Cyprinotus, *Hemicypris*, *Homocypris* and *Eucypris*. *Pesquisas (Porto Alegre)*, 3:69-91.
- Räsänen, K^o. & Kruuk, L.E.B. 2007. Maternal effects and evolution at ecological time scales. *Functional Ecology*. 21, 408-421.
- Regev, A., Lamb, M.J. & Jablonka, E., 1998. The role of DNA methylation in invertebrates: developmental regulation or genome defense? *Molecular biology and evolution*. 15, 880-891.
- Rion S. & Kawecki T. J., 2007. Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. *Journal of evolutionary biology*. 20:1655-1664.
- Rohde A. & Junntila O., 2007. Remembrances of an embryo: long-term effects on phenology traits in spruce. *New phytologist*. 177-1:2-5.
- Rossi V. & Menozzi P. 1990. The clonal ecology of *Heterocypris incongruens* (Ostracoda). *Oikos* 57: 388-398

- Rossi V. & Menozzi P. 1993. The clonal ecology of *Heterocypris incongruens* (Ostracoda): life-history traits and photoperiod. *Funct. Ecol.* 7: 177-182
- Rossi V., Gandolfi A. & Menozzi P., 1996. Egg diapause and clonal structure in parthenogenetic populations of *Heterocypris incongruens* (Ostracoda). *Hydrobiologia* 320: 45-54
- Rossi, V., Schön, I., Butlin, R.K., Menozzi, P., 1998. Clonal genetic diversity. In: *Sex and Parthenogenesis: Evolutionary Ecology of Reproductive Modes in Non-Marine Ostracods* (K. Martens, ed.), Backhuys: Leiden. 257-274.
- Rossi V., Bartoli M., Bellavere C., Salvador E. & Menozzi P., 2004 *Heterocypris* (Crustacea: Ostracoda) from the Isole Pelagie (Sicily, Italy): hatching phenology of resting eggs. *Ital. J. Zool.* 71: 223-231
- Rossi V., Benassi G., Leonardi S., Piotti A. & Menozzi P., 2006. Clonal diversity of *Heterocypris incongruens* (Crustacea: Ostracoda) in Northern Italian ricefields. *Archive Hydrobiologia.* 166:225-240.
- Rossi V., Gandolfi A., Baraldi F., Bellavere C. & Menozzi P., 2007. Phylogenetic relationships of coexisting *Heterocypris* (Crustacea, Ostracoda) lineages with different reproductive modes from Lampedusa Island (Italy). *Molecular phylogenetics and evolution*, 44 (3): 1273-1283.
- Rozzi M.C., Rossi V., Benassi G., Menozzi P., 1991. Effetto della temperatura e del fotoperiodo sull'attivazione di uova durature di cloni elettroforetici di *Heterocypris incongruens* (Ostracoda) S.It.E. Atti, 12:591:594.
- Rousseaux S., Vanoverbeke J., Aerts J. & Declerck S. A., 2010. Effects of medium renewal and handling stress on life history traits in *Daphnia*. 643:63–69.
- Salvador E., 2002. Fenologia di Schiusa di uova di *Heterocypris* (Crustacea: Ostracoda) provenienti da pozze temporanee di Lampedusa. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche. Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Parma.
- Sakwińska, O., 2004. Persistent maternal identity effects on life history traits in *Daphnia*, *Oecologia* 138: 379–386.
- Schön I., Gandolfi A., Di Masso E., Rossi V., Griffiths H.I., Martens K., Butlin R.K., 2000. Long-term persistence of asexuality through mixed reproduction in *Eucypris virens*. *Heredity* 84: 161-169.
- Schwaegerle K. E., McIntyre H., Swingley C., 2000. Quantitative genetics and the persistence of environmental effects in clonally propagated organisms. *Evolution* 54:452–461.
- Seger, J. & Brockmann, H. J., 1987. What is bet-hedging? In: Harvey, P. H. & Partridge, L. (eds). *Oxford surveys in evolutionary biology* (Vol 4). Oxford University Press, 182–211.
- Seidl M.D., Paul R.J., Pirow R., 2005.. Effects of hypoxia acclimation on morpho-physiological traits over three generations of *Daphnia magna*. *Journal of experimental biology.* 208: 2165–2175.

- Severino A., 2004. Citogenetica di *Heterocypris* (Crustacea, Ostracoda) della regione Circum-mediterranea. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche. Dipartimento di Biologia Animale, Università di Modena e Reggio Emilia.
- Schroder & Gilbert, 2009. Maternal age and spine development in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: increase of spine length with birth orders. *Freshwater biology*. 54 : 1054–1065.
- Simons A. M., 2009. Fluctuating natural selection accounts for the evolution of diversification bet-hedging. *Proceedings of Royal Society. B*. 276: 1987–1992.
- Simons A. M. & Johnston M. O., 2006. Suboptimal timing of reproduction in *Lobelia inflata* may be a conservative bet-hedging strategy. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 233–243.
- Skrøppa T, Kohmann K, Johnsen Ø, Steffenrem A & Edvarsen M., 2007. Field performance and early test results of offspring from two Norway spruce seed orchards containing clones transferred to warmer climates. *Canadian journal of forest research* 37: 515–522.
- Suomalainen E., Saura A., Lokki J., 1987. Cytology and evolution in parthenogenesis. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Spitze K. & Sadler T.D., 1996. Evolution of a generalist genotype: Multivariate analysis of the adaptiveness of phenotypic plasticity. *American naturalist* 148:108-S123.
- Stearns S. C. 1992. The evolution of life histories. Oxford University Press. 248 p.
- Stearns S. C., 2000. Daniel Bernoulli (1738): evolution and economics under risk. *Journal of Bioscience*. 25: 221–228.
- Stross R.G., 1996. Significance of photoperiodism and diapause control in the multicycle crustacean *Daphnia pulex* Leydig. *Hydrobiologia* 320: 107–117.
- Sywula T. & Lorenc R., 1981. Esterase polymorphism as a marker of inter-population differentiation in *Cyprinotus incongruens* (Ostracoda). *Bulletin of the Polish Academy of Science* 78:317-322.
- Szyf M., 2007. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicology. Science*. 100:7–23
- Tammaru T., Ruohomäki K. & Saloniemi I., 1999. Within-season variability of pupal period in the autumnal moth: a bet-hedging strategy? *Ecology*. 80: 1666–1677.
- Tauber, M.J., Tauber, C.A. & Masaki, S. 1986. Seasonal Adaptations of Insects. Oxford University Press, Oxford.
- Tondelli B., 2001. Variabilità genetica, morfologica ed ecologica del genere *Heterocypris* (Crustacea: Ostracoda) sulle isole di Lampedusa e Linosa. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche. Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Parma.
- Turgeon J. & Herbert P.D.N., 1994. Evolutionary interactions between sexual and all-female taxa *Cyprinotus* (Ostracoda: Cyprididae). *Evolution* 48: 1855-1856.

- Vandegehuchte M. B, De Coninck D., Vandenbrouck T., De Coen W. M. & Janssen C. R., 2010. Gene transcription profiles, global DNA methylation and potential transgenerational epigenetic effects related to Zn exposure history in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 158-10, 3323-3329
- Van Harten D. 1983. Resource competition as a possible cause of sex ratio benthic Ostracodes. In: Maddocks. *Applications of Ostracoda*. University Houston Geoscience: 568-580.
- Vanoverbeke J. & De Meester L., 2009. Within season short-term hatching delays suggest risk-spreading behaviour in population of the freshwater cladoceran *Daphnia*. *Ecoscience*, 16 4: 441-451.
- Vanschoenwinkel B., De Vries C., Seaman M. & Brendonck L., 2007. The role of metacommunity processes in shaping invertebrate rock pool communities along a dispersal gradient. *Oikos*. 116: 1255-1266.
- Venable D.L., 2007. Bet-hedging in a guild of desert annuals. *Ecology* 88-5: 1086-1090.
- Wickstrom, C.E. & Castenholtz, R.W. (1985). Dynamics of cyanobacterial and ostracod interactions in an Oregon hot spring. *Ecology*, 63:1024-1041.
- Wohlgemuth R., 1911. Beobachtungen und Untersuchungen über die Biologie der Süßwassostracoden; ihr Vorkommen in Sachsen und Böhmen, ihre Lebensweise und ihre Fortpflanzung. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie (Biologisches Supplement 2)*: 1-72 Süßwassostracoden. *Biol. Suppl. z. VI. Bd. Die Vermehrungsweise der Art *Cyprinotus incongruens* Ramd.* (pp. 57-72).
- Wu C.T. & Morris J. R., 2001. Genes, genetics, and epigenetics: A correspondence. *Science* 10-293:1103 – 1105.

