



Studio preliminare sugli effetti della luce e del buio sull'attività e sulla morfometria delle larve di Salamandra pezzata (*Salamandra salamandra*): differenza fra larve di grotta e di sorgente

Laura TAGLIAFERRO¹, Marco MANGIACOTTI², Raoul MANENTI³

¹ Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Piazza della Scienza 3, 20133 Milano, Italia.

² Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente, Università di Pavia, Via Taramelli 24, 27100 Pavia, Italia.

³ Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano, Italia.

Riassunto *Salamandra salamandra* mostra una notevole plasticità nella scelta dei siti di riproduzione potendo colonizzare anche siti ipogei. Con il presente studio si vuole valutare come tale plasticità ecologica venga guidata dalle variabili ambientali, con particolare riferimento alla biomassa di predatori e alle condizioni luminose (notte/giorno). Inoltre, attraverso un esperimento di *cross-environment*, si è quantificata la plasticità fenotipica nella morfologia del capo e nella posizione degli organi di senso cefalici di larve di diversa provenienza (ipogea/epigea) se sottoposte a condizioni di normale luminosità circadiana o totale oscurità. Sono stati campionati 18 siti epigei sia di notte che di giorno, verificando il tasso di larve attive e raccogliendo una serie di variabili ambientali. I dati sono stati confrontati con quelli già presenti per 33 siti, di cui 15 ipogei e 18 epigei. Per la parte di morfologia geometrica, sono state prelevate 4 larve da 5 siti epigei e 4 larve da 5 siti ipogei. Le larve di ciascun sito sono state equamente divise in due gruppi, uno allevato in condizioni di fotoperiodo naturale mentre l'altro gruppo in totale oscurità. All'inizio e alla fine del trattamento, durato 51 giorni, per ciascuna larva è stata scattata una foto dorsale del capo, sulla quale sono stati individuati 5 landmarks (punti omologhi univocamente distinguibili). I risultati mostrano che le larve di *S. salamandra* sono più attive in grotta e di notte. L'attività è influenzata negativamente dalla luminosità del sito e dalla biomassa dei predatori. Dall'analisi morfometrica è emerso che la morfometria del capo non sarebbe significativamente influenzata dal trattamento luce/buio, bensì dal sito di provenienza. Ciò potrebbe indicare l'esistenza di adattamenti locali per le popolazioni che depongono in grotta, ma servirebbero studi di carattere genetico per confermare quanto osservato.

Abstract *Salamandra salamandra* shows a high plasticity in choosing the breeding sites, being able to use also underground environments. This study aims at evaluating how environmental plasticity could be influenced by environmental variables, notably predators biomass and light conditions (daytime/nighttime). Additionally, by a cross-environment experiment, the phenotypic plasticity in the head morphology and in the position of sensory organs is compared between larvae from different origin (hypogeous or epigean) subjected to dark or light conditions during growth. 18 epigean sites were surveyed during daylight and nighttime and the total number of active larvae together with some environmental data were recorded. These data were compared to those from 33 further sites, 15 hypogean and 18 epigean, collected during previous studies. For morphological analysis, four larvae from five hypogeous and five epigeous sites were collected. Larvae from the same site were equally divided in two groups: one grew in natural photoperiod while the second in total darkness. At the beginning and at the end of the treatment period, lasting 51 days, a dorsal photography of the head of each larvae was taken and the position of 5 landmarks (homologous points univocally distinguishable) was recorded in order to define the head shape and the sensory organs position. Results show that *S. salamandra* larvae are more active in caves and during nighttime. Activity is negatively influenced by brightness and by predatory biomass. Geometric morphometric analysis shows that head shape isn't influenced by the treatment (light/darkness) but just by the origin of larvae. This result suggests that local adaptation could be present in populations using underground environments as breeding sites, but genetic studies are necessary to verify this hypothesis.

Keywords Plasticity, fire salamander, ecology, morphometry.

Le femmine di salamandra pezzata sono solite deporre larve sia in sorgenti epigee che ipogee, nonostante questi ambienti spesso presentino caratteristiche opposte per quanto riguarda quantità di luce e potenziali prede/predatori. La scelta del corso d'acqua in cui deporre le larve può vertere su pozze stagnanti, lavatoi, abbeveratoi, pozze temporanee, corpi d'acqua con elevata corrente, bottini, gallerie drenanti, pozze sotterranee (Joly, 1986; Bressi & Dolce, 1999; Di Cerbo & Razzetti, 2004; Manenti *et al.*, 2009; 2011). Lo stadio larvale, a seconda delle condizioni di trofia e temperatura, dura dai 2 ai 6 mesi in ambiente epigeo mentre in ambiente sotterraneo si può spingere fino a 8-9 mesi (Nöllert & Nöllert, 1992; Manenti *et al.*, 2011). Oltre al periodo più lungo, in ambiente ipogeo è stata riscontrata anche l'acquisizione di una taglia maggiore da parte delle larve al momento della metamorfosi (Manenti *et al.*, 2011). Le larve di *S. salamandra* sono carnivore (Gasteropodi, Artropodi, Molluschi, Aracnidi ad esempio) (Bressi & Dolce, 1996; Costa *et al.*, 2014), e a loro volta possono essere predate o dalle conspecifiche (cannibalismo, si verifica soprattutto in presenza di scarsità di nutrienti o elevato numero di conspecifici),

dalle trote, dalle larve di alcuni insetti acquatici come Odonati del genere *Cordulegaster* (Manenti *et al.*, 2013) e dai gamberi di fiume (*Austropotamobius* e *Procambarus*) (Ficetola *et al.*, 2012). La tecnica di foraggiamento è tipicamente del “sit-and-wait” in ambiente epigeo, mentre in ambiente ipogeo si ha uno shift verso una caccia attiva della preda che si accompagna a una maggior capacità delle larve nate in ambiente ipogeo di predare in condizioni di oscurità totale (Manenti *et al.*, 2013). In condizioni di luce anche le larve ipogee cacciano secondo la modalità sit-and-wait, mostrando così una plasticità comportamentale che si aggiunge alla capacità di adattamento all’ambiente.

In questo studio, tramite un approccio di campo, si è valutato quali variabili ambientali influenzano l’attività e l’utilizzo dello spazio da parte delle larve di salamandra in ambienti acquatici diversi (pozze sotterranee/epigee) e in diverse condizioni di luminosità (notte/giorno); parallelamente in laboratorio si è valutato se la quantità di luce e l’origine delle larve, ipogea o epigea, potessero, durante lo sviluppo larvale, influire sulla morfologia del capo e sulla posizione di occhi e narici.

Per quanto riguarda la parte di campo, nel mese di giugno 2015 sono stati effettuati dei campionamenti in 18 corpi d’acqua distribuiti nelle province di Como e Lecco, ciascuno visitato sia in condizioni di luce sia di buio. Sono stati raccolti dati circa l’area del corpo d’acqua e la luminosità ambientale. Le larve visualizzate ad occhio nudo sono state considerate come larve attive, mentre è stata utilizzata la tecnica del removal sampling tramite passaggi ripetuti per stimare il numero di larve di salamandra pezzata presente nel corpo d’acqua. Con i dati così raccolti è stato possibile stimare la densità totale delle larve presenti in ciascun sito applicando, in ambiente R, la formula proposta da Chao & Chang (1999). Successivamente, attraverso pipe-sampling sono state stimate la densità delle prede e dei predatori per ciascun sito analizzato, sia di giorno che di notte. In seguito al campionamento del macrobenthos, gli organismi sono stati pesati in modo da poter stimare sia la biomassa delle prede, che indica la biodisponibilità di cibo per le larve, che dei predatori, indice della pressione predatoria esistente. Per le analisi sono stati utilizzati anche dati precedentemente raccolti in 15 pozze di grotta e 36 sorgenti epigee o pozze epigee, di giorno e di notte, tra le province di Como e Lecco. I dati raccolti sono stati analizzati utilizzando dei modelli misti generalizzati (GLMMs).

La seconda parte dello studio è stata condotta su larve allevate in un laboratorio allestito, grazie alla collaborazione con l’Ente Parco Lago Segrino, presso la sede di Eupilio (CO). Il prelievo, autorizzato dalla regione Lombardia, di larve appena nate è stato effettuato in 5 siti epigei e 5 ipogei localizzati nelle province di Como, Lecco e Monza e Brianza. Per ciascun sito sono state prelevate 4 larve. Ciascuna larva è stata allevata singolarmente in contenitori di plastica forati che a loro volta erano contenuti in vasche più grandi, con un aeratore, per 51 giorni. Due vasche erano mantenute in condizioni di fotoperiodo naturale, mentre le altre due in condizioni di totale oscurità. Delle 10 larve presenti in ciascuna vasca la metà provenivano da una risorgiva, mentre la seconda metà da pozze di grotta. La divisione delle larve è stata casuale ma alla fine per ciascun sito di provenienza due larve sono state allevate in condizioni di luce e due in condizioni di buio, in questo modo si è ottenuto un tipico schema di cross-environment in cui sono stati incrociati provenienza e

trattamento. I dati per le analisi di morfometria sono stati raccolti attraverso l'utilizzo di fotografie standardizzate del capo delle larve, eseguite al momento della cattura e dopo 51 giorni di allevamento nelle diverse condizioni sperimentali; si è cercato inoltre di evitare le distorsioni date dall'obiettivo della macchina fotografica e dalle vaschette di plastica ponendo le larve in vaschette piccole, con poca acqua e con spigoli che non fossero arrotondati. Inoltre tutte le foto sono state effettuate centrando il capo delle larve con l'obiettivo e con la macchina fotografica perpendicolare rispetto ad esso. Le foto così raccolte sono state processate con il programma TPSdig (Rohlf, 2004), che consente, attraverso il posizionamento di landmarks (LM), di ottenere facilmente i dati necessari per le analisi statistiche. I landmarks posizionati sono: attaccatura delle branchie, narici, apice anteriore e apice posteriore degli occhi, apice del muso. Dalle stesse foto sono stati ottenuti anche i dati riguardanti la taglia dell'animale, sia la lunghezza totale sia la lunghezza dall'apice del muso alla cloaca (SVL). Le configurazioni di LM ottenute sono state analizzate con R (R core team, 2015). L'analisi comporta primariamente l'eliminazione delle differenze non legate alla forma in modo che le variabili rimanenti definiscano le *shape variables*. A questo punto è possibile definire le traiettorie fenotipiche (Adams & Otàrola-Castillo, 2013) associate al cambiamento pre-post trattamento per ciascuna larva, le quali sono vettori nel morfospazio caratterizzati da una lunghezza (size) e da una direzione (angle) rispetto a vettori di riferimento: la prima esprime l'entità della variazione fenotipica subita, mentre l'angle rappresenta la direzione del cambiamento (Collyer & Adams, 2007; Adams & Collyer, 2009). Il confronto fra le traiettorie è stato effettuato utilizzando una MANOVA non parametrica (Anderson, 2001; Adams & Collyer, 2009).

Dai dati raccolti sul campo è risultato che la maggior densità delle larve di salamandra pezzata si ha di notte ($4,02$ larve/m²) e che le variabili ambientali che influenzano l'attività larvale sono la luce e la biomassa dei predatori, entrambe con effetto negativo ($E = -0,30$ e $E = -0,27$ rispettivamente, $P < 0,01$). I predatori rinvenuti sono gamberi di fiume, *Austropotamobius italicus*, larve di odonati del genere *Cordulegaster* e *Aeshma*. Verificando l'effetto che la variabile "buio" ha direttamente sull'attività, si è visto che il fattore limitante è la presenza dei predatori ($E = -0,16$, $P < 0,03$), indipendentemente dalla tipologia del sito considerato.

I risultati ottenuti sulle traiettorie fenotipiche indicano che la provenienza ha un effetto significativo sulla componente angle e che il trattamento, viceversa, non risulta significativo. Le traiettorie inoltre non differiscono quantitativamente, quindi la modificazione è la stessa indipendentemente dal trattamento. Da un confronto su griglia di deformazione si nota come l'area occhi-narici si differenzi: nelle larve di provenienza epigea la zona posteriore si contrae leggermente mentre la distanza occhio-narice si riduce; nelle larve di provenienza ipogea, invece, c'è una riduzione della dimensione dell'occhio ed un avanzamento relativo delle narici, con conseguente aumento della distanza occhio-narice.

Con questo studio si è accresciuta la conoscenza dell'ecologia delle larve di *S. salamandra*, che modulano la propria attività in funzione della quantità di luce presente nell'ambiente. Gli ambienti ipogei risultano quindi particolarmente favorevoli per la crescita, tenuto conto anche che in questi ambienti spesso mancano gli abituali predatori delle

larve. Le differenti condizioni degli ambienti ipogei rispetto a quelli epigei sottopongono le larve di salamandra pezzata a pressioni selettive differenti che però, come dimostra questo studio, non sono associabili a variazioni fenotipiche significative, come avviene ad esempio nei pesci *Astyanax fasciatus* o in molti altri animali che si trovano sia in ambiente epigeo che ipogeo (Rasquin, 1947). In questo caso, quindi, non si può parlare di plasticità fenotipica associata alle condizioni luminose di crescita. Una delle possibili spiegazioni può essere ricondotta al rapporto costi/benefici dell'essere plastici che in questo caso può essere sbilanciato a favore dei costi (Via *et al.*, 1995; DeWitt *et al.*, 1998). Per quanto riguarda le popolazioni che depongono in grotta si può però parlare di adattamenti locali, ma sono necessarie ulteriori analisi, anche genetiche, per confermare questa ipotesi e corroborare i dati morfologici.

Bibliografia

- Adams, D.C., Collyer, M.L. (2009): A general framework for the analysis of phenotypic trajectories in evolutionary studies. *Evolution* **63** (5):1143-1154.
- Adams, D.C., Otárola-Castillo, E. (2013): Geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution* **4**: 393-399.
- Bressi, N., Dolce, S. (1999): Osservazioni di Anfibi e Rettili in grotta. *Rivista Idrobiologica* **38** (1/2/3).
- Chao, A. Chang, S.H. (1999): An estimating function approach to the inference of catch-effort models. *Environmental and Ecological Statistics* **6**: 313-344.
- Collyer, M.L., Adams, D.C. (2007): Analysis of two-state multivariate phenotypic change in ecological studies. *Ecology* **88** (3): 683-692.
- Costa, A., Salvidio, S., Romano, A. Baroni, D. (2014): *Larval diet of Salamandra salamandra* (L. 1758): preliminary results on prey selection and feeding strategy. In: Doria, G., Poggi, R., Salvidio, S., Tavano, M. (eds), Atti X Congresso Nazionale della *Societas Herpetologica Italica* (Genova, 15-18 ottobre 2014). Ianieri Edizioni, Pescara.
- Di Cerbo, A., Razzetti, E. (2004): *Salamandra salamandra*. In: Bernini, F., Bonini, L., Ferri, V., Gentili, A., Razzetti, E., Scali, S. (eds), Atlante degli Anfibi e dei Rettili della Lombardia. Pianura, monografie **5**: 64-66.
- Ficetola, G.F., Siesa, M.E., Padoa-Schioppa, E., De Bernardi, F. (2012): Wetland features, amphibian communities and distribution of the alien crayfish, *Procambarus clarkii*. *Alytes* **29** (1-4): 75-87.
- Joly, J. (1968): Données ecologique sur la salamander tachetée, *Salamandra salamandra* L.. *Annales Des Sciences Naturelles* **10**: 301-366.
- Manenti, R., Ficetola, G.F., De Bernardi, F. (2009): Water, stream morphology and landscape: complex habitat determinants for the fire salamandre *Salamandra salamandra*. *Amphibia-Reptilia*, **7**: 15-30.
- Manenti, R., Ficetola, G.F., Mariani, A., De Bernardi, F. (2011): Caves as breeding sites for *Salamandra salamandra*: habitat selection, larval development and conservation issues. *North-western journal of Zoology* **7** (2): 304-309.
- Manenti, R., Siesa, M.E., Ficetola, G.F. (2013): Odonata occurrence in caves: active or accidentals? A new case study. *Journal of Cave and Karst Studies* **75**: 205-209.
- Nöllert, A., Nöllert, C. (1992): Die Amphibien Europas. Frankh- Kosemos Verlag-GmbH & Co. KG, Stuttgart.

- R core team: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rasquin, P. (1947): Progressive pigmentary regression in fishes associated with cave environments. *Zoologica* **32**:53-42.
- Rohlf, F.J. (2004): tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.”. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.