



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale in

**BIOLOGIA MARINA**

**CARATTERIZZAZIONE DEGLI SCLERITI DI *PARAMURICEA***

***CLAVATA* DAL MAR ADRIATICO ORIENTALE**

**CHARACTERIZATION OF SCLERITES IN *PARAMURICEA***

***CLAVATA* FROM THE EASTERN ADRIATIC SEA**

Tesi di laurea di

**GAIA ROSSETTI**

Relatore

Chiar.mo Prof.

**CRISTINA DI CAMILLO**

Correlatori

**FEDERICA COSTANTINI**

**MAJA KRŽELJ**

Sessione straordinaria

Anno Accademico 2019/2020

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	1
1.2 Morfologia dei polipi .....	3
1.3 Gorgonie del Mediterraneo .....	3
<b>2. <i>PARAMURICEA CLAVATA</i></b> .....	5
2.1 Habitat .....	5
2.2 Morfologia delle colonie .....	6
2.3 Riproduzione .....	6
2.4 Alimentazione .....	9
2.5 Respirazione .....	12
2.6 Crescita .....	14
<b>3. SCHELETRO DELLE GORGONIE</b> .....	18
3.1 Scheletro di <i>P. clavata</i> .....	21
<b>4. PREDAZIONE DELLE GORGONIE</b> .....	22
<b>5. SCOPO DELLA TESI</b> .....	27
<b>6. MATERIALI E METODI</b> .....	29
6.1 Campionamento .....	29

6.2 Indagini molecolari .....	30
6.3 Analisi morfologica dei frammenti e determinazione quali-quantitativa degli elementi scheletrici.....	31
<b>7. RISULTATI</b> .....	<b>35</b>
7.1 Indagini molecolari. ....	35
7.2 Analisi morfologica dei frammenti e determinazione quali-quantitativa degli elementi scheletrici.....	35
<b>8. DISCUSSIONE</b> .....	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>53</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Gli Ottocoralli

Gli ottocoralli (Octocorallia), sono una sottoclasse degli Anthozoa (phylum Cnidaria) largamente distribuiti in tutti gli ambienti marini, dalle zone polari a quelle tropicali. Si ritrovano molto abbondanti e diversificati soprattutto sulle scogliere tropicali poco profonde e negli habitat di acque profonde, dove sono spesso dominanti rappresentando importanti componenti strutturali della comunità. Questa sottoclasse comprende circa 3000 specie di coralli molli, ottocoralli e sea pens (Daly et al., 2007). Si distinguono per la presenza di otto mesenteri (setti non calcarei che dividono la cavità gastrovascolare del polipo ed uniscono la faringe alla parete del corpo) e otto tentacoli pinnati, uno per ogni camera mesenterica (Bayer, 1961; Daly et al., 2007), . Tra tutti i gruppi tassonomici appartenenti al phylum degli Cnidari, le relazioni filogenetiche tra gli Octocorallia sono le meno conosciute e le attuali tassonomie sono considerate instabili (McFadden et al., 2006). Il sistema di classificazione più utilizzato durante la metà del XX secolo fu quello di Hickson (1930) che divise la sottoclasse in sei ordini basati principalmente sulla forma di crescita delle colonie (McFadden et al., 2010). Due di questi ordini, Pennatulacea Verrill, 1865 (sea pens) e Helioporacea Bock, 1938

(coralli blu), si distinguono per le sinapomorfie morfologiche e sono state mantenute nella classificazione ordinale attuale (Daly et al., 2007). Successivamente, nel 1981, Bayer riconobbe i restanti quattro ordini di Hickson (Alcyonacea, Gorgonacea, Stolonifera e Telestacea) classificati morfologicamente, con forme transitorie che collegavano ciascuno dei quattro gruppi. Di conseguenza, fuse i quattro ordini in un unico ordine, Alcyonacea Lamouroux 1812, che ora comprende tutti i coralli molli, le gorgonie e le forme stolonifere (McFadden et al., 2010). Questo sistema a 3 ordini (Alcyonacea, Pennatulacea ed Helioporacea) viene attualmente utilizzato dai tassonomi (Fabricius & Alderslade, 2001; Daly et al., 2007) e l'ordine Alcyonacea viene diviso in sei gruppi sub-ordinali riconosciuti per riflettere gradi di costruzione morfologica piuttosto che cladi (Bayer, 1981; Fabricius & Alderslade, 2001; Daly et al., 2007): Alcyoniina, Stolonifera e Protoalcyonaria, i quali includono quelle famiglie che non hanno un asse scheletrico mentre gli altri tre gruppi comprendono famiglie che storicamente erano poste nell'ordine delle Gorgonacea e sono ancora informalmente indicate come gorgonie. I membri di questi gruppi producono un asse scheletrico composto da una combinazione di calcite e gorgonina e vengono attualmente identificati proprio grazie alla composizione dell'asse: in Calcaxonia (sei famiglie), l'asse è solido (o occasionalmente tubolare) e comprende grandi quantità di calcite non scleritica

incorporate all'interno, o inframmezzate con, nodi di gorgonina; in *Holaxonia* (cinque famiglie) l'asse è cavo, incrociato, e composto principalmente da gorgonina che può includere piccole quantità di calcite; in *Scleraxonia* (sette famiglie), l'asse è composto in gran parte da scleriti fusi o non fusi di carbonato di calcio (McFadden et al., 2010).

## **1.2 Morfologia dei polipi**

La morfologia dei polipi, tra le varie famiglie degli ottocoralli, è simile; possiedono una corta cavità gastrovascolare, sono uniti basalmente dal cenenchima (un tessuto composto da mesoglea e scleriti calcarei) e collegati gli uni agli altri grazie ad una rete di canali (Bayer, 1973). La loro distribuzione varia dall'essere sparsi lungo fusti e rami oppure disporsi lungo due bande longitudinali.

## **1.3 Gorgonie del Mediterraneo**

Nel Mediterraneo, dense popolazioni di gorgonie danno origine a foreste di coralli e risultano essere fondamentali negli ecosistemi marini perché agiscono come ecosystem engineers: aumentano la complessità spaziale e migliorano le interazioni interspecifiche (Cerrano et al., 2010; Cerrano et al., 2015; Di Camillo et al., 2013), spesso caratterizzanti Essential Fish Habitats (EFH), ovvero tutti quegli habitat in cui le specie ittiche vivono e si

riproducono, dal mare profondo, alle praterie di fanerogame, alle kelp forest, fino ad arrivare alle zone umide e ai fiumi. Proprio per questo, la perdita di foreste coralline porta a cambiamenti nell'architettura degli habitat e comporta effetti a cascata su altri organismi che compongono le comunità bentoniche di fondo duro.

## **2. PARAMURICEA CLAVATA**

### **2.1 Habitat**

Il genere *Paramuricea* K lliker, 1865   presente nel Mar Mediterraneo con due specie: *Paramuricea clavata* Risso, 1826 e *Paramuricea macrospina* Koch, 1882. In particolare, *P. clavata*   una specie longeva (Coma et al., 1998; Linares et al., 2007) e viene considerata un ecosystem engineer in quanto aumenta la complessit  spaziale e migliora le interazioni interspecifiche (Cerrano et al., 2010; Cerrano et al., 2015; Di Camillo et al., 2013). Secondo lo studio di Di Camillo et al., 2018, la distribuzione degli organismi tipici degli habitat coralligeni, come *P. clavata*,   fortemente legata alla presenza di condizioni ambientali che ne permettono lo sviluppo come tipo di substrato, luce, temperatura ed esposizione alle correnti e risulta quindi essere presente nella parte occidentale del Mar Mediterraneo con distribuzione irregolare (Mokhtar-Jama  et al., 2013). Le popolazioni di *P. clavata*, infatti, crescono in habitat caratterizzati da un range limitato di condizioni di luce (valori di irradianza che variano tra 0,12 e 27,6%), tra i 10 e i 200 metri di profondit  (Mokhtar-Jama  et al., 2011) e sono abbondanti nelle ripide pareti rocciose dove sono esposte a forti correnti anche se possono crescere in superfici da orizzontali a suborizzontali con condizioni di luce scarsa e fondali privi di sedimenti (Weinberg, 1974; Weinberg, 1980; Ballesteros, 2006).

## 2.2 Morfologia delle colonie

Le colonie assumono una forma arborescente, la cui altezza può arrivare fino ai 130 cm (Harmelin & Marinopoulos, 1994); (Ballesteros, 2006) e possono essere monocromatiche (completamente porpora o gialle) o dicromatiche (porpora e gialle). Riguardo alla ramificazione, le colonie presentano rami posti a internodi quasi fissi (1-50 cm) e sono moduli ripetitivi in tutta la colonia (Sánchez et al., 2007). I polipi, sui rami, sono ravvicinati tra loro; possiedono, nel calice, scleriti “Thornscales” e da cinque a otto file di scleriti “Spindles” nel collareto con tubercoli che si trovano principalmente sul lato convesso degli stessi (Pica et al., 2018).

## 2.3 Riproduzione

La riproduzione di *P. clavata* è sessuale mentre quella asessuata è stata descritta come trascurabile in termini quantitativi poiché questa specie presenta una bassa capacità rigenerativa dopo la frammentazione dimostrando, quindi, l'inefficienza di questo meccanismo (Coma, 1994). *P. clavata* è una specie iteropara, dioica, senza apparente dimorfismo sessuale (Coma et al., 1995). Lo sviluppo dello sperma impiega dai 6 ai 7 mesi e risulta essere più veloce rispetto all'oogenesi, che richiede invece dai 13 ai 18 mesi. Quest'ultima, inizia tra febbraio e luglio e culmina con il rilascio degli oociti maturi nel mese di giugno dell'anno successivo. Il rilascio delle uova si verifica quando l'acqua di mare

supera i 16°C (Coma et al., 1995) ed avviene principalmente in due eventi distinti ogni anno, più o meno negli stessi periodi che vanno da 1 a 4 giorni prima o dopo la luna nuova e la luna piena. Tramite uno strato di muco, le uova sono attaccate alle superfici esterne delle colonie femminili (Coma et al., 1995). La fecondazione avviene sulla superficie della colonia, lo sviluppo della blastula è veloce (compreso tra le 10 e le 36 ore) ed anche quello della planula (tra le 36 e le 60 ore). Le larve sono lecitotrofiche e mostrano una marcata fototassi negativa che permette loro di cercare crepacci o altri habitat scuri in cui stabilirsi (Linares et al., 2008). Le planule di *P. clavata* sono in grado di ritardare la metamorfosi per alcuni giorni, questo suggerisce una capacità di dispersione piuttosto elevata dato che la specie abita in zone solitamente sottoposte a correnti piuttosto elevate, proprio per questo possono verificarsi trasporti su lunghe distanze (Linares et al., 2008). Tuttavia, esistono dei meccanismi attraverso i quali la dispersione viene rallentata: (1) la cova delle uova sulla superficie esterna delle colonie femminili, (2) il breve periodo di nuoto delle planule, dopo il quale iniziano a strisciare sul substrato (Coma et al. 1995), (3) la fototassi negativa osservata durante alcuni esperimenti di laboratorio (Linares et al., 2008). Tutti questi motivi favoriscono l'insediamento delle planule vicino alla colonia materna. Nonostante *P. clavata* investa molto nella produzione di gameti, in termini di numero di oociti maturi

prodotti per polipo, nelle prime fasi di sviluppo si assiste ad un basso tasso di sopravvivenza e ciò suggerisce che la specie possa avere una bassa capacità di recupero durante disturbi grandi o frequenti (Coma et al., 2004; Linares et al., 2005). Queste caratteristiche suggeriscono limitazioni nella colonizzazione di nuove aree attraverso la riproduzione sessuale (Linares et al., 2008). I polipi apicali risultano fertili grazie ai tassi di alimentazione tipicamente bassi (Coma et al., 1995; Coma et al., 2001) e ad un conseguente tasso di crescita lento (Coma et al., 1994). La maturità sessuale viene acquisita quando la colonia raggiunge una taglia di circa 20 cm (da 11 a 30 cm) e l'età minima alla prima riproduzione è stata stimata tra i 7 e i 13 anni (Coma et al., 1995) ponendo *P. clavata* tra le specie di ottocoralli più lente a raggiungere la maturità sessuale. Per quanto riguarda lo sforzo riproduttivo, i polipi che crescono sui rami di primo ordine contribuiscono all'85% della produzione dei gameti dell'intera colonia e l'output riproduttivo aumenta esponenzialmente con le dimensioni delle colonie in quanto aumentano la percentuale dei polipi, delle colonie fertili e del numero di gonadi per polipo (Coma et al., 1995). Nello studio di Rossi et al., 2006, l'output riproduttivo delle colonie femminili risulta essere di 0.046 lgC polyp<sup>-1</sup> ( $\pm 0.031$  SD) nel mese di Maggio 1998 e 0.042 lgC polyp<sup>-1</sup> ( $\pm 0.026$  SD) nel mese di Maggio 1999; quello delle colonie maschili risulta di 0.212 lgC polyp<sup>-1</sup> ( $\pm 0.142$  SD) nel mese di Maggio 1998 e 0.147 lgC polyp<sup>-1</sup> ( $\pm 0.061$

SD) nel mese di Maggio 1999. Il successo riproduttivo dipende anche dalle dimensioni delle colonie maschili (dimensioni come modello della produzione gonadica che aumentano con la taglia della colonia (Coma et al., 1995) quindi dalla loro altezza e dalla loro distanza con le femmine in cova (Mokhtar-Jamäi et al., 2013): maggiore è la lontananza, minore sarà il successo riproduttivo.

## **2.4 Alimentazione**

*P. clavata* è un suspension feeder passivo, la sua dieta è ampia ed eterogenea e consiste di nanoeucarioti (3,8  $\mu\text{m}$ ), copepodi (700  $\mu\text{m}$ ), e diverse prede come ciliati, dinoflagellati, diatomee, zooplancton (naupli, uova di copepodi, altre uova di invertebrati, copepodi calanoidi) e sostanze organiche detritiche sospese (Coma et al., 1994; Ribes et al., 1999) Secondo lo studio di Coma et al. (1994), i tassi di cattura dipendono dalla densità del plancton presente nell'ambiente ed infatti, durante il periodo annuale di studio, i periodi di massima cattura coincidono con i periodi di concentrazione massima del plancton, ovvero maggio e novembre. Si è registrata solamente una diminuzione dei tassi di cattura nel mese di gennaio poiché, in questo periodo, il plancton è rappresentato principalmente da copepodi calanoidi, i quali riescono a sfuggire facilmente ai tentacoli dei polipi. Coma et al., 1994, studiando una popolazione di *P. clavata* alle isole Medas per un anno, hanno osservato che la maggior parte delle prede catturate sono stati nauplii, uova di

copepodi, uova di invertebrati e larve, tutti caratterizzati da una piccola taglia (100 - 200  $\mu\text{m}$ ) e bassa mortalità. Hanno inoltre osservato una preferenza, da parte dei polipi, nella cattura di prede con scarsa motilità, come uova di copepodi, nauplii e uova di invertebrati, quando questi ultimi erano abbondanti nel plancton. Inoltre, hanno osservato una significativa selezione positiva per le larve di bivalvi e le planule durante i loro picchi di abbondanza nel plancton. In generale, comunque, durante l'arco di un anno, il plancton è composto principalmente da copepodi calanoidi suggerendo che ci siano altre fonti di cibo, come la materia organica amorfa (Lasker, 1981), il muco prodotto dai coralli (Coffroth, 1984) e la materia organica disciolta (Murdock, 1978). I fattori principali che regolano l'alimentazione dei suspension feeders passivi sono rappresentati dalla concentrazione delle prede e la portata dell'acqua (Leversee, 1976; Patterson, 1991). Anche l'espansione e la contrazione dei tentacoli, secondo lo studio di Coma et al. 1994, sono fattori importanti, infatti d'estate la percentuale delle colonie con i polipi espansi è molto più bassa rispetto al resto dell'anno e ciò coincide con il periodo di stratificazione della colonna d'acqua e la minore attività idrodinamica (Pascual & Flos, 1984). Ciò è dovuto al fatto che la contrazione dei polipi abbassa i bilanci energetici delle colonie quando la concentrazione delle prede è bassa, consentendo alle colonie di sopravvivere diminuendo le spese respiratorie di quasi la metà rispetto allo

stato espanso (Sebens, 1987). Le differenze nei tassi di cattura si verificano anche nei polipi della stessa colonia, i polipi apicali infatti sono più efficienti. Lo studio di Coma et al., 1994, mostra come questa differenza sia significativa nella percentuale dei polipi e nel numero di prede catturate per polipo nella stessa colonia: il numero delle prede catturate diminuisce all'aumentare dell'ordine dei rami. I rami periferici primari mostrano un tasso di cattura del 50% più elevato rispetto ai polipi localizzati nei rami di ordini superiori. Secondo Coffroth (1984), ciò è dovuto al fatto che i polipi apicali hanno maggiore probabilità di entrare in contatto con il plancton rispetto ai polipi situati nei rami interni. Inoltre, la velocità e la dinamica dei flussi d'acqua che circolano attraverso una popolazione di una gorgonia, influenzano la probabilità di cattura delle prede da parte di altre colonie (Leversee, 1976). Infatti, come è stato dimostrato per altri suspension feeders, le colonie di una singola popolazione interagiscono influenzando la direzione e la velocità dei flussi d'acqua che raggiungono le colonie vicine (Patterson, 1984); (Okamura, 1985); (McFadden, 1986). La rottura delle colonie che si trovano vicino al flusso d'acqua, permette ai polipi apicali e periferici di trovarsi in una posizione più favorevole alla cattura delle prede; questo evento potrebbe esercitare un effetto di ombreggiatura che influenza negativamente la cattura da parte dei polipi che si trovano sui rami interni (Coma et al., 1994). Prendendo in

considerazione tutti i fattori che regolano i tassi di cattura da parte delle prede, il numero annuale di prede catturate è stato stimato essere tra  $75$  e  $165 \times 10^6$  prede  $\text{m}^{-2} \text{yr}^{-1}$ , il tasso medio di cattura delle prede per polipo è stato stimato essere compreso tra  $1,1$  e  $8$  prede  $\text{polyp}^{-1} \text{d}^{-1}$  cioè l'equivalente di  $0,09$  e  $0,64 \mu\text{g}$  C  $\text{polyp}^{-1} \text{d}^{-1}$  (Coma et al., 1994). Questi risultati sono stati calcolati seguendo l'equazione  $N = \sum_{t=0}^D C - [(C \times t)/D]$  o  $C = N[\sum_{t=0}^D (1 - \frac{t}{D})]^{-1}$ . Per l'ingestione di carbonio di origine detritica, invece, si è registrato un marcato andamento stagionale: l'inverno e la primavera sono state le stagioni con i più alti tassi di ingestione (Ribes et al., 1999).

## 2.5 Respirazione

In generale, *P. clavata* presenta una spiccata stagionalità in tutte le attività (Coma et al., 1998; Coma et al., 2000), infatti anche il tasso di respirazione varia da due a tre volte in tutto l'anno, anche se questo non cambia significativamente da un giorno all'altro ma nell'arco di alcuni mesi (Coma et al., 2002). Secondo lo studio di Coma et al., 2002, i tassi di respirazione non variano significativamente con il variare della temperatura. Ci sono due principali fattori che spiegano la variazione annuale dei tassi di respirazione: 1) l'elevata richiesta respiratoria durante la primavera (quando ancora la temperatura non ha raggiunto il suo massimo), 2) i bassi tassi di respirazione

durante l'estate. Gli alti tassi di respirazione primaverili sembrano essere correlati al pattern di produzione secondaria; durante questo periodo, infatti, crescita (Coma et al., 1998) e sviluppo gonadico (Coma et al., 1995) sono più alti sovrapponendosi al periodo di maggiore assorbimento di cibo (Ribes et al., 1999). I bassi tassi di respirazione durante l'estate, invece, sono correlati a tre fattori principali: 1) bassa sintesi di nuovo tessuto (Coma et al., 1998); 2) espansione-contrazione dei polipi; 3) consumo di ossigeno scarsamente dipendente dalla temperatura. Per quanto riguarda la contrazione dei polipi, Coma (2001), nel suo studio, ha dimostrato come l'espansione dei polipi di *P. clavata* raggiunga l'80% durante tutto l'anno, ad eccezione del mese di agosto, dove raggiunge il 20%. La contrazione dei polipi, maggiore durante il periodo estivo, provoca una diminuzione del 50% nella frequenza respiratoria delle colonie (intervallo in linea con i valori misurati per altre specie di cnidari, es: (Sebens, 1987) (Fabricius & Klumpp, 1995) che sembra essere correlata ad una diminuzione del rapporto superficie/volume con conseguente riduzione della diffusione dell'ossigeno attraverso il tessuto epidermico. La contrazione dei polipi durante il periodo estivo, il basso tasso di sintesi di nuovi tessuti e il basso  $Q_{10}$  ( $Q_{10} = [R_{T2} / R_{T1}] [10 / (T_2 - T_1)]$ , dove  $R_{T1}$  e  $R_{T2}$  sono i tassi di respirazione  $\text{mg O}_2 \text{ mass}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $T_1$  e  $T_2$  sono le temperature, spiegano i bassi tassi di respirazione osservati durante il periodo di massima temperatura. Questi

bassi tassi di respirazione supportano l'ipotesi che i limiti energetici (Coma et al., 1998; 2000) siano alla base della dormienza estiva di alcuni taxa di suspension feeders del Mediterraneo (Coma et al., 2002).

## 2.6 Crescita

Il tasso di crescita lordo dei rami primari delle colonie con un'altezza inferiore ai 20 cm, risulta di  $0,8 \text{ cm year}^{-1}$  mentre per le colonie di altezza maggiore di 20 cm risulta di  $0,5 \text{ cm year}^{-1}$  (Coma et al., 1998); in media, quindi, le colonie crescono in altezza di  $1,8 \text{ cm year}^{-1}$  (Coma et al., 1998). Il tasso di crescita, però, difficilmente è uguale per ogni colonia poiché dipende dalle sue dimensioni e dalla velocità delle correnti (Mistri & Ceccherelli, 1994; Coma et al., 1998);. Infatti, *P. clavata* mostra una crescita stagionale con picchi più alti durante il periodo primaverile, raggiungendo i  $0,4 \text{ cm/anno}$ , e ciò è coerente con la fluttuazione stagionale della disponibilità di cibo (Coma et al., 1998). A differenza dei tassi di sopravvivenza, la crescita della popolazione è poco influenzata dal tasso di reclutamento, come invece è stato riscontrato per altre specie di gorgonie (Gotelli, 1991; Lasker, 1981). La sopravvivenza delle grandi colonie è, infatti, un fattore chiave per la persistenza della popolazione perché in parte determina quanto tempo una popolazione può sopravvivere senza reclutamento (Linares et al., 2007). La dimensione della colonia aumenta con l'incrementare della velocità delle correnti (Velimirov, 1976), intensificando

quindi l'apporto di prede (Sebens, 1984) ed è correlata anche all'aumento della respirazione (Sebens, 1987). La crescita della colonia può essere influenzata non solo dalle condizioni ambientali ma anche da fattori esogeni come l'inquinamento e la sedimentazione (Dodge & Lang, 1983; Tomascik & Sander, 1985; Riegl, 1995). L'effetto principale che questi agenti hanno nei confronti dei coralli è la necrosi dei tessuti vivi che porta ad esporre lo scheletro sottostante. Le lesioni tissutali possono essere rigenerate oppure possono essere colonizzate, più o meno velocemente, da organismi come idroidi, policheti serpulidi, briozoi e, principalmente, alghe (Naim, 1993). Nel momento in cui le lesioni vengono rigenerate, apparentemente risulta esserci una riallocazione delle risorse con riduzione dell'investimento energetico nella crescita (Guzman et al., 1994). Colonie di grandi dimensioni potrebbero avere più energia disponibile e in questo caso la rigenerazione dipende dalla quantità di tessuto al confine con la lesione mentre colonie di piccole dimensioni potrebbero avere troppa poca energia disponibile per la rigenerazione a causa del poco tessuto circondante la lesione. Mistri e Cecchelli, 1994, hanno condotto uno studio su una popolazione di *P. clavata* presso Scilla (Reggio Calabria), a seguito della comparsa della mucillaggine (aggregati amorfi e flocculenti) per valutarne gli effetti. Questi aggregati hanno ricoperto i rami sporgenti delle colonie causando necrosi dei tessuti e, a seguito della scomparsa della mucillaggine, questi ultimi

sarebbero stati più soggetti a fouling. Hanno quindi studiato la crescita della popolazione valutando parametri come lo sviluppo lineare totale di tutti i rami (TBL, total branch length), la porzione della colonia con ancora il cenencima (LTL, living tissues length) e lo sviluppo lineare dei rami nudi (INJ, injured part length). Hanno così osservato che la completa mortalità si è verificata soprattutto nelle colonie di piccole dimensioni (0 – 1000 mm come TBL) mentre solo poche colonie comprese nella classe di grandi dimensioni (> 1000 mm come TBL) sono morte durante i sei mesi successivi al fenomeno della mucillaggine. Probabilmente, secondo Mistri e Cecchelli (1994), il danno nelle piccole colonie ha lasciato troppo poco cenenchima da fornire abbastanza energia per la rigenerazione. La rigenerazione, in *P. clavata*, dipende principalmente dalla dimensione della lesione. Se la lesione coinvolge una parte sufficientemente grande del cenenchima, il recupero potrebbe non essere abbastanza rapido per evitare il fenomeno del fouling. Infatti, Mistri e Cecchelli (1994) hanno osservato che le gorgonie con lesioni in più del 50-60% del loro TBL, sembravano apparentemente non capaci di sopportare la competizione con la crescita degli organismi come alghe, idroidi e briozoi. La rigenerazione dei tessuti, in questo caso, è probabilmente inibita da questi organismi causando la morte completa della colonia in pochi mesi. Le colonie con lesioni in meno del 20% del loro TBL, sono state capaci di rigenerarsi in fretta. Infatti, le

colonie leggermente danneggiate possiedono energia da allocare nella rigenerazione dei tessuti. Le colonie, invece, con lesioni dal 20% al 50% del loro TBL, non sono prevedibili in quanto, nel loro studio, alcune hanno rigenerato i tessuti nonostante le lesioni fossero estese mentre altre hanno mostrato una ulteriore degenerazione. La crescita di *P. clavata* è influenzata anche, e principalmente, dal luogo della lesione all'interno della colonia. Se le lesioni interessano la parte centrale, la colonia mostra una minore capacità di rigenerazione con conseguente fouling da parte di organismi epibiontici mentre se le lesioni interessano i rami terminali, la maggior parte delle volte la colonia rigenera i tessuti. La popolazione di *P. clavata* studiata da Mistri e Cecchelli (1994) mostra come la capacità di rigenerazione diminuisca dalle punte alla base della colonia lungo i rami: la regione basale e centrale risultano quindi essere più vulnerabili rispetto ai rami terminali. La parte distale della colonia, infatti, rappresenta il punto di crescita e potrebbe quindi esistere una relazione tra la rigenerazione dei tessuti e i principali siti di crescita (Meesters & Bak, 1995). Nella popolazione di *P. clavata* presa in esame dai due studiosi, le lesioni provocate dai predatori non si verificano in maniera casuale ma sono localizzate in particolar modo nei rami terminali e nelle punte. Infatti per qualsiasi predatore è importante non ridurre troppo la popolazione delle proprie prede per riuscire a sopravvivere e ciò comporta, quindi, il consumo di quelle

parti dotate di una maggiore velocità di rigenerazione (Mistri e Cecchelli, 1994).

### **3. SCHELETRO DELLE GORGONIE**

La struttura di supporto principale delle colonie di gorgonie è rappresentata dal core o asse centrale composto da gorgonina, il quale contiene un collagene modificato (Goldberg, 1976) che può essere mineralizzato (Lowenstam, 1964); (Leversee, 1969). La sua rigidità dipende dalla direzione delle correnti marine e dalla loro intensità (Jeyasuria & Lewis, 1987; Yoshioka & Yoshioka, 1989), e poiché quest'ultime cambiano rapidamente in risposta ai movimenti delle onde, le proprietà meccaniche delle gorgonie devono essere adattate all'ambiente in cui vivono (Koehl, 1982); (Vogel, 1988). Queste proprietà meccaniche vengono modificate dal cortex (Muzik & Wainwright, 1977); (Esford & Lewis, 1990) che circonda l'asse centrale e contiene, in una serie di cavità, i polipi e i canali gastrovascolari. I polipi si nutrono in maniera più efficiente ad un optimum di velocità ambientale (Leversee, 1984) e la velocità con cui gli organismi vengono catturati viene proprio mantenuta all'interno di questo intervallo grazie alle proprietà meccaniche dell'asse centrale e del cenenchima (Vogel, 1981).

Il cenenchima è composto da due parti: mesoglea e scleriti calcarei. La mesoglea è una sostanza composta da una serie di fibrille discontinue, orientate

casualmente, simili al collagene in una matrice polimerica idratata (Chapman, 1953); (Gosline, 1971a); (Koehl, 1977); (Wainwright & al., 1982). Essa è in grado di distendersi fino a tre volte la sua lunghezza di partenza se sottoposta a piccole sollecitazioni mostrando il completo recupero elastico (Gosline, 1971b). È un fenomeno dipendente dal tempo in cui l'estensione rapida del materiale causa una maggiore rigidità rispetto ad una lenta estensione (Alexander, 1983). Questa rigidità si traduce in resistenza contro il movimento ad alta velocità dell'acqua che potrebbe scorticare le colonie contro il substrato (Lewis & Von Wallis, 1991).

Altro fattore molto importante che contribuisce alle proprietà meccaniche delle colonie degli ottocoralli, è rappresentato dagli scleriti, delle strutture di carbonato di calcio che circondano una matrice organica costituita principalmente da glicoproteine, diffusa in tutta l'epidermide delle gorgonie, mesoglea e scheletro assiale (Kingsley & Watabe, 1984; Van Alstyne et al., 1992; Harvell & Suchanek, 1987). Queste strutture si trovano densamente impacchettate nella mesoglea, hanno una ridotta flessibilità individuale ed interagiscono con qualsiasi flessione o torsione influenzando i meccanismi dell'intera colonia (Lewis & Von Wallis, 1991). Infatti forniscono sostegno strutturale alle gorgonie riducendo l'elasticità e la rigidità dello scheletro assiale contro il movimento dell'acqua (Koehl, 1982; Lewis & Von Wallis, 1991).

In una serie di test biomeccanici eseguiti su tessuti reali e artificiali di *Briareum asbestinum* Pallas, 1766 contenenti diverse dimensioni e diverse densità di scleriti, Koehl (1982) ha scoperto che maggiori densità e dimensioni più piccole di scleriti conferiscono maggiore rigidità. Ciò può essere dovuto al fatto che elevate densità di scleriti di piccole dimensioni forniscono una più ampia area di superficie per l'attacco dei tessuti lasciando spazi più piccoli costituiti esclusivamente da matrice molle deformabile. Lo stesso Koehl (Koehl, 1996) ha infatti scoperto che la forza e la durezza dei tessuti delle colonie aumentano con l'aumentare della densità degli scleriti. (West, 1998), studiando *B. asbestinum*, ha notato che le colonie che crescono in siti poco profondi ma caratterizzati da un forte moto ondoso, producono scleriti di piccole dimensioni ad alta densità per acquisire un grado di durezza e rigidità tali da resistere ad una eccessiva deformazione e lacerazione. La loro forma e dimensione potrebbero variare a seconda di fattori biotici e abiotici come l'intensità della luce, il movimento dell'acqua, la profondità e il tasso di predazione. Per questo motivo si parla di plasticità fenotipica, o espressione fenotipica differenziale di un genotipo, in condizioni ambientali variabili. West, 1998, simulando danni da parte di predatori in *B. asbestinum*, ha dimostrato come siano evidenti i cambiamenti morfologici degli scleriti: le colonie in ambienti naturali possiedono scleriti più lunghi nelle punte dei rami rispetto quelli presenti nella

regione basale, al contrario, la lunghezza degli scleriti diminuisce nelle punte rigenerate ed aumenta nelle cicatrici situate nei rami medi. Inoltre, la lunghezza degli scleriti aumenta anche nella parte opposta della colonia rispetto alla cicatrice dimostrando come ci sia una risposta a livello regionale che riguarda l'intero materiale circondante una cicatrice. A seconda, quindi, dell'importanza relativa del supporto e della deterrenza dai predatori in un particolare ambiente, la composizione degli scleriti può essere limitata a dimensioni e densità che sono subottimali per un ruolo o anche per entrambi (West, 1998).

Gli scleriti presentano una elevata variabilità nella forma e nelle dimensioni e per questo vengono utilizzati nella classificazione tassonomica degli ottocoralli (e.g., Bayer, 1981; Fabricius & Alderslade, 2001; Tentori & Ofwegen, 2011).

### **3.1 Scheletro di *P. clavata***

*P. clavata* presenta uno scheletro leggermente ellittico se visto in sezione, con l'asse centrale lungo parallelo al piano dell'organismo (Mistri, 1994). Gli assi sono ortotropici e presentano ramificazioni laterali e diffuse; partendo da uno schema di ramificazione più semplice, le colonie sembrano aumentare la complessità con l'età (Mistri, 1994). L'asse centrale è composto di gorgonina (proteina) che conferisce resistenza strutturale e flessibilità nei confronti delle correnti (Goldberg, 1976).

Per quanto riguarda gli scleriti, a seconda della zona che viene presa in considerazione, in *P. clavata* si possono distinguere (Pica et al., 2018):

- Nell'antostele si trovano le "Thornscales", il cui range dimensionale è 490  $\mu\text{m}$  – 800  $\mu\text{m}$  (media 587.4  $\mu\text{m}$   $\pm$  81.0  $\mu\text{m}$  SD)
- Nel cenenchima si trovano le "Spindles"; il cui range dimensionale è 334.7  $\mu\text{m}$  – 610.4  $\mu\text{m}$  (media 456.4  $\mu\text{m}$   $\pm$  64.4  $\mu\text{m}$  SD);
- Nel lato aborale dei tentacoli si trovano le "Hockey-stick spindle", il cui range dimensionale è 354.5  $\mu\text{m}$  – 800  $\mu\text{m}$  (media 556.2  $\mu\text{m}$   $\pm$  119.4 SD);
- Nel collaretto si trovano gli "Spindles", il cui range dimensionale è 210  $\mu\text{m}$  – 690  $\mu\text{m}$  (media 456.4  $\mu\text{m}$   $\pm$  99.4 SD);
- Nei tentacoli si trovano i "Rods", il cui range dimensionale è 150  $\mu\text{m}$  – 200  $\mu\text{m}$  (media 168.5  $\mu\text{m}$   $\pm$  14.6 SD).

Grazie al numero di strati di scleriti presenti nel collaretto, si può distinguere la specie *P. clavata* (5-8 strati) da *P. macrospina* (2-4).

#### **4. PREDAZIONE DELLE GORGONIE**

Gli scleriti, oltre a svolgere il ruolo di sostegno scheletrico contro il moto ondoso, hanno anche il compito di difesa strutturale nei confronti dei predatori. Entrambi questi ruoli risultano quindi essenziali nella sopravvivenza delle colonie. Se la forma scheletrica che funziona meglio per il supporto è opposta

a quella che funziona meglio per la difesa, allora le caratteristiche scheletriche delle colonie in una data posizione dovrebbero riflettere un equilibrio tra le pressioni di selezione opposte. Pertanto, la variazione fenotipica in relazione alle pressioni ambientali è garantita o tramite la differenziazione genetica tra le sottopopolazioni o attraverso l'evoluzione della plasticità fenotipica (West, 1998). Infatti, nel suo studio condotto con *B. asbestinum*, gli scleriti aumentano di lunghezza nella regione centrale dei rami, regione di cui tipicamente si ciba il gasteropode *Cyphoma gibbosum* Linnaeus, 1758 (fam. Ovulidae) (Harvell & Suchanek, 1987; Gerhart, 1990). Maggiori lunghezze mostrano una significativa diminuzione dei tassi di alimentazione di questo ovulide (West et al., 1993); (West, 1996). Individui di *C. gibbosum* a cui viene data la scelta di alimentarsi tra colonie di *B. asbestinum* che differiscono nella lunghezza degli scleriti del 22%, preferiscono spendere più tempo in quelle aventi scleriti più corti (West 1996). Secondo Vrolijk & Targett, (1992), questo comportamento è improbabile che sia dovuto esclusivamente alla chimica in quanto il mollusco presenta degli enzimi detossificanti, inoltre se posta in presenza di alimenti artificiali privi di scleriti appare indifferente. Tramite analisi alimentari artificiali che impiegavano scleriti isolati in assenza di fattori chimici, si è dimostrato che questo predatore è significativamente scoraggiato da scleriti lunghi (West et al., 1993); (West, 1996). Quindi, anche se le colonie di acque

profonde contengono valori nutrizionali più alti per morso, grazie alle loro basse frazioni di carbonato di calcio, le lumache preferiscono le colonie di acque poco profonde con alta densità di piccole scleriti. Questo conferma che il fattore determinante più importante riguardo il comportamento alimentare, per *C. gibbosum*, è rappresentato dalla lunghezza degli scleriti piuttosto che dalla frazione volumetrica (West, 1998). Sono stati infatti trovati frammenti di scleriti nelle feci di *C. gibbosum* (Birkeland & Gregory, 1975) che testimoniano l'ingestione degli scleriti da parte di questo ovulide. È quindi possibile che gli scleriti più grandi possano interferire con l'ingestione e l'egestione dovendo quindi essere rotti in frammenti più piccoli prima del consumo (West, 1998). Grazie allo studio di Harvell e Suchanek (1987) condotto su *C. gibbosum* e su diverse specie di gorgonie, *Muricea* spp. Lamouroux, 1821 ed *Eunicea* spp. Lamouroux, 1816, si evidenzia come la zona di attacco da parte dell'ovulide sia abbastanza ampia sulla maggior parte dei taxa, suggerendo che non ci siano siti preferiti localizzati all'interno delle colonie. I tempi di residenza di *C. gibbosum* sembrano essere determinati dalla qualità delle prede e dall'estensione dei danni alle colonie. Harvell e Suchanek hanno notato come *C. gibbosum* trascorra molto meno tempo su taxa abbondanti di spicole come *Muricea* spp. ed *Eunicea* spp. che su taxa da cui possono estrarre più tessuto. L'estensione dei danni alle colonie varia tra i diversi taxa e la profondità

dell'attacco sembra essere determinata dalle dimensioni degli scleriti e dalle differenze morfologiche delle colonie: tessuti che incorporano grandi scleriti o un'alta percentuale di composizione di scleriti possono fungere da barriera nei confronti di predatori come *C. gibbosum*. Per questo motivo, taxa con piccoli scleriti o con una bassa composizione di scleriti possono regolarmente subire attacchi causando un'inibizione del recupero.

Recentemente, è stato studiato il ruolo degli scleriti come barriere chimiche contro i batteri. Toledo-hernández et al., 2016, ha dimostrato che gli scleriti trattati con acetone e posti in mezzi di coltura, sono meno efficaci nel ritardare la colonizzazione da parte di funghi rispetto ai scleriti non trattati con solventi. Nello studio condotto da Toledo-Hernández et al., 2017, è stata esaminata la frazione organica semi-volatile (SVOCs) associata agli scleriti della gorgonia *Gorgonia ventalina* Linnaeus, 1758 sia in colonie sane che in quelle malate, per cercare di capire il loro possibile ruolo come risposta allo stress o in difesa di un'infezione. Sono stati identificati complessivamente 70 SVOCs associati agli scleriti ma la maggior parte di essi non erano mai stati segnalati in letteratura in precedenza impedendo quindi di capire il loro ruolo biologico. Si sono però identificati radicali liberi 'scavenger' che, grazie all'analisi ossidativa condotta, mostrano un'attività antiossidante. Nelle gorgonie, la produzione di antiossidanti avviene durante risposte immunitarie come

fagocitosi, attività enzimatica della perossidasi, melanizzazione (Olano & Bigger, 2000; Mydlarz & Harvell, 2007). Queste risposte immunitarie inducono la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed altri radicali liberi, provocando stress ossidativo nei coralli. Di conseguenza, per contrastare questo stress ossidativo, le gorgonie hanno sviluppato sistemi regolatori come la produzione di scavengers antiossidanti non enzimatici che neutralizzano i ROS ed altri radicali liberi (Toledo-Hernández et al., 2017). Nonostante questo studio, ben poco è ancora conosciuto e dunque sono necessari ulteriori studi e ricerche.

## 5. SCOPO DELLA TESI

Come già sottolineato, *Paramuricea clavata* è una gorgonia presente nel mar Mediterraneo ed è considerata un ecosystem engineer. La sua distribuzione è condizionata da fattori quali luce, fondali privi di sedimenti e pareti rocciose da orizzontali e suborizzontali esposte a forti correnti (Weinberg, 1974, 1980; Ballesteros, 2006). Proprio per questo ultimo fattore, *P. clavata* possiede delle proprietà meccaniche che permette alle colonie di non essere strappate dal substrato.

Il primo obiettivo di questa tesi è dunque fornire una stima quali-quantitativa della componente scheletrica di *P. clavata*, considerando sia gli scleriti che l'asse centrale. Queste informazioni, unitamente alla determinazione della densità dei polipi, aggiungono un tassello alla conoscenza di una delle specie più rappresentative delle 'Animal Forests' nei sistemi mesofotici temperati (Cerrano et al., 2019). Inoltre, i dati sulla concentrazione e sulla taglia degli elementi scheletri calcarei in gorgonie in buona salute potrebbe costituire un benchmark per effettuare confronti con gorgonie in situazioni di stress, come le anomalie termiche.

Per testare l'ipotesi che i set di scleriti di campioni di *Paramuricea clavata* prelevati in siti diversi e a vari range batimentrici differiscano per morfologia, abbondanza e taglia, sono stati raccolti frammenti di gorgonie in alcuni siti

all'interno del Golfo di Komiza (Vis, Croazia), tra i -25 m e gli -80 m di profondità.

Dopo aver accertato che tutti i frammenti raccolti appartenessero a *P. clavata* tramite indagini morfologiche e molecolari, la componente scheletrica è stata caratterizzata mediante indagini al microscopio ottico ed elettronico a scansione (SEM). I risultati ottenuti sono stati confrontati con i dati disponibili in letteratura ed è emersa una tipologia di scleriti mai descritta in precedenza.

## 6. MATERIALI E METODI

### 6.1 Campionamento

Tra il 17 febbraio 2019 e il 10 marzo 2019, sono stati raccolti, tramite immersioni tecniche con rebreather, 96 campioni di *Paramuricea clavata* in tre siti di immersione presso l'isola di Vis (Croazia). Per ogni località, sono stati prelevati 6 frammenti apicali da 6 gorgonie diverse per ciascuna batimetria, come indicato nella Tabella 1, evitando di danneggiare le porzioni centrali che sostengono la colonia:

**Tabella 1.** Disegno di campionamento

Site	Date	Lat	Lon	Bathymetry (m)	Samples Ethanol95°	Samples Form4%
Gnjilina	17/02/2019	43.005005	16.071657	30	1	5
				35	1	5
				45	1	5
				55	1	5
Brusnik	03/03/2019	43.000867	15.821557	60	1	5
				65	1	5
				70	1	5
				75	1	5
Komiža	10/03/2019	43.008771	16.06301	80	1	5
				25	1	5
				30	1	5
				35	1	5
				40	1	5
				45	1	5
				50	1	5
				55	1	5
				TOT	16	80

I campioni per le indagini molecolari sono stati preservati in alcol 95°, mentre quelli per l'analisi dello scheletro sono stati conservati in formalina al 4%.

## **6.2 Indagini molecolari**

Per ogni frammento delle colonie, sono stati prelevati 3-5 polipi tramite microscopio ed è stato estratto il DNA seguendo la procedura Cetyl Trimethyl Ammoniu Bromide (CTAB) (Hillis and Moritz, 1990). Successivamente sono stati amplificati 1) una porzione del gene omologo mitocondriale mutS (mtMUTs, Pont-Kingdon et al., 1995) seguendo France and Hoover (2001) ed utilizzando i primer MUT4759f e MSH5376r e 2) la regione intergenetica mitocondriale (IGR) tra il gene mitocondriale ND4 e ND5 utilizzando i primer disegnati da Paletta et al. (2019). Per l'amplificazione di entrambe le regioni sono state effettuate PCR contenenti 2.5 µl di buffer di amplificazione (10X), 2.5 µl di ognuno dei due primer (forward e reverse) (10 mM), 2.5 µl di MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl di dNTP mix (10 mM), 0.2 µl di 1 U Taq polymerase, and 2.5 µl of DNA. Il ciclo di PCR prevedeva una denaturazione iniziale a 94 °C per 2 min, seguita da 30 cicli (denaturazione a 94 °C per 30 s, annealing a 60 °C per 15 s e un'estensione a 72 °C per 1 min), e con un'estensione finale a 72 °C per 10 min. I prodotti di PCR sono stati poi purificati con ExoSap-IT Cleanup kit (USB Corp., Cleveland, OH, USA) e inviati alla ditta Macrogen Inc. (Spagna) per il sequenziamento Sanger. Le sequenze MtMutS e le sequenze IGR sono

state analizzate e allineate utilizzando il software MEGA v.5.0.5 (MEGA5: Molecular Evolutionary Genetic Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739).

### **6.3 Analisi morfologica dei frammenti e determinazione qualitativa degli elementi scheletrici**

*Densità dei polipi.* Da ciascun campione fissato in formalina (Tabella 1), è stata prelevata una porzione di 3 cm di lunghezza; in seguito ogni porzione è stata osservata allo stereomicroscopio per determinarne il diametro (escludendo i polipi) e per contare il numero dei polipi. Approssimando la forma dei frammenti ad un cilindro, la densità dei polipi in ciascun campione è stata espressa come numero di polipi per unità di superficie laterale dei frammenti ( $2 \pi r \cdot h$ , con  $h=3$ ). Per ciascuna località sono stati calcolati media e SE dei valori di densità dei polipi.

Infine, il Total Branch Length (TBL, Mistri & Ceccherelli, 1996) ed il valore del diametro medio sono stati utilizzati per calcolare la superficie laterale di una gorgonia considerata isodiametrica e per determinare il numero totale di polipi in una colonia.

*Abbondanza degli scleriti (percentuale in peso/peso secco della gorgonia).*

Dopo aver conteggiato i polipi, ogni frammento è stato prima disidratato in stufa a 60°C per un giorno ed una notte e poi pesato alla bilancia analitica. Allo scopo di calcolare la percentuale in peso della componente proteica dello scheletro, l'asse centrale è stato separato dalla porzione vivente in cui sono immersi gli scleriti ed è stato pesato separatamente.

I frammenti privi di asse centrale sono poi stati posti in provette precedentemente pesate, è stato aggiunto ipoclorito di sodio e tramite bunzen si è portato a bollore per 5 minuti, per permettere il completo scioglimento della componente organica. Dopo di che, ogni provetta è stata lasciata raffreddare per circa un'ora, tempo necessario anche per permettere la sedimentazione degli scleriti. Si è proceduto poi a eliminare l'ipoclorito di sodio dalle provette e si è aggiunto alcol a 70° per effettuare il primo lavaggio. L'operazione è stata eseguita nuovamente per un secondo lavaggio con un intervallo di circa un'ora per permettere nuovamente la sedimentazione degli scleriti. Infine, si è effettuato un ultimo lavaggio con acqua distillata e, successivamente, le provette sono state poste in stufa, a 60°C, fino alla completa evaporazione. Una volta ottenuto il pellet, le provette sono state pesate per poter così sottrarre la tara ed ottenere il peso netto degli elementi scheletrici calcarei. Infine,

l'abbondanza degli scleriti è stata espressa come percentuale del peso secco iniziale del frammento integro di gorgonia e sono stati calcolati i valori medi relativi ai campioni raccolti nei tre siti e alle varie profondità.

Considerando i valori medi dei pesi di asse centrale, tessuto vivente (cenosarco e polipi) e scleriti, è stato possibile stimare la percentuale di ciascuna componente nei rami apicali di *P. clavata*.

*Analisi morfologica e determinazione della distribuzione degli scleriti.* Per individuare e misurare le varie tipologie di scleriti, sono stati preparati tre vetrini utilizzando parte del pellet ottenuto con la tecnica sopra citata. Ad ogni provetta è stato aggiunto 1 mL di alcol a 70° per permettere la risospensione del pellet e, tramite pipetta Pasteur, si sono prelevati 200 µL di campione da mettere in ogni vetrino. Successivamente è stato fatto evaporare l'alcol, è stata aggiunta la colla Eukitt, il coprioggetto e poi i vetrini sono stati lasciati asciugare per 24 ore su piastra. I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico per identificare e misurare gli scleriti. Per ciascuna categoria individuata, sono stati misurati circa 20 scleriti. Per le categorie di scleriti osservate solo di rado, come ad esempio i mini-scleriti, è stato misurato il numero massimo di scleriti individuati.

Dai frammenti restanti, sono stati prelevati 3 polipi per campione in maniera casuale che sono stati esaminati e fotografati allo stereomicroscopio per verificare la distribuzione degli scleriti. Ogni polipo è stato sezionato in tre parti: 1) tentacoli e collare, 2) antocodio e 3) cenosarco. Ogni porzione è stata successivamente sciolta separatamente in acqua ossigenata per ottenere gli scleriti caratteristici di ogni parte.

I dettagli della struttura dei principali tipi di scleriti sono stati osservati tramite microscopia elettronica a scansione. Parte degli scleriti puliti e disidratati sono stati preparati seguendo la procedura illustrata in Pica et al. (2018) ed osservati al microscopio elettronico a scansione Tescan VEGA3 electron microscope (Tescan Analytics, France).

## 7. RISULTATI

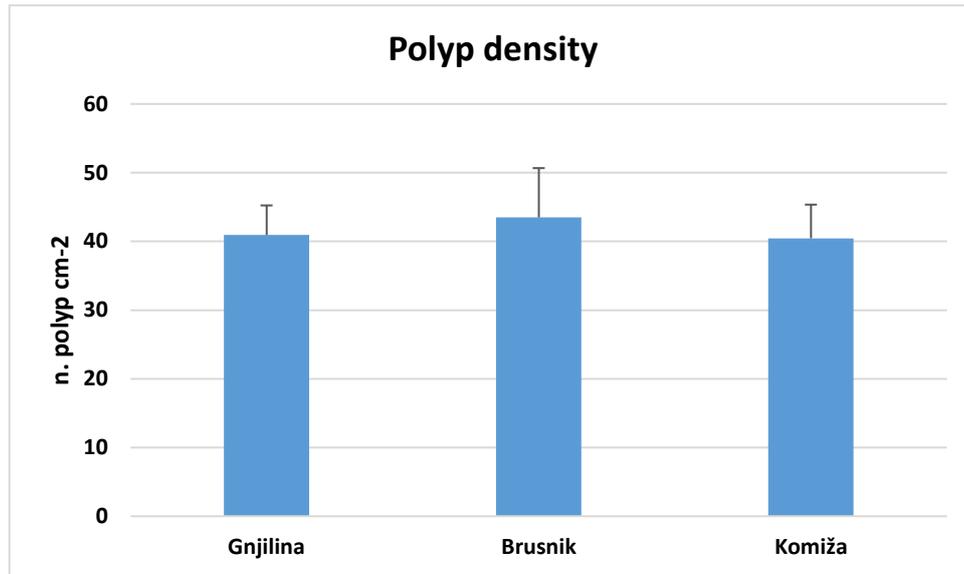
### 7.1 Indagini molecolari.

Per quanto riguarda le analisi molecolari, le sequenze della regione mtMUTS e IGR sono risultate lunghe 609 bp e 275 pb rispettivamente. Tutti gli individui presentano lo stesso aplotipo per la regione mtMUTS che è risultato identico alla sequenza di *P. clavata* presente in GenBank (Numero di accesso - LT576167.1 (Poliseno et al., 2017). Anche la sequenza della regione IGR è risultata identica a quella di *P. clavata* (LT576167.1).

### 7.2 Analisi morfologica dei frammenti e determinazione qualitativa degli elementi scheletrici

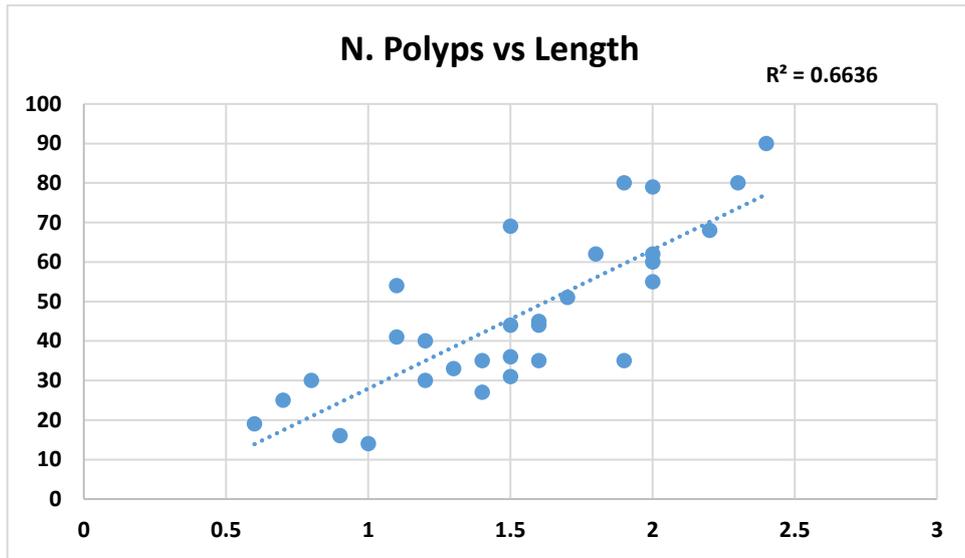
#### *Densità dei polipi.*

I valori medi ( $\pm$ SE) delle densità dei polipi (n. polipi per unità di superficie laterale dei frammenti) nei tre siti considerati (Fig. 1) non discostano molto tra loro (Gnjilina  $40.9 \text{ cm}^{-2} \pm 4.2 \text{ cm}^{-2} \text{ SE}$ ; Brusnik  $43.5 \text{ cm}^{-2} \pm 7.1 \text{ cm}^{-2} \text{ SE}$ ; Komiža  $40.5 \text{ cm}^{-2} \pm 4.9 \text{ cm}^{-2} \text{ SE}$ ) e non ci sono differenze significative tra le loro mediane (Kruskal-Wallis,  $H = 0.09$ ;  $p > 0,05$ ).



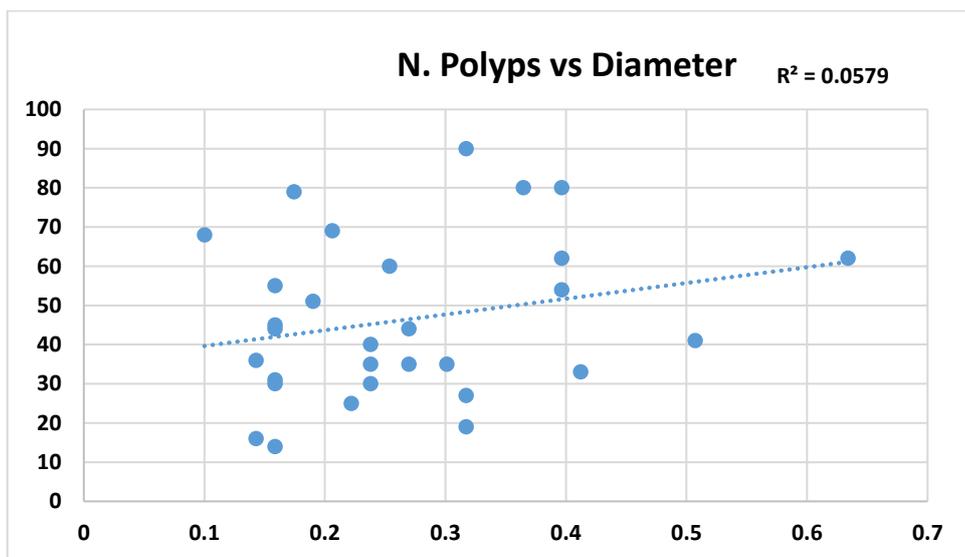
**Fig. 1. Average of polyp densities expressed as number of polyp cm<sup>-2</sup> considering the lateral surface of the examined fragments**

La Fig. 2 rappresenta la correlazione lineare tra la lunghezza del frammento del campione analizzato e il numero di polipi presenti su di esso. Come si può vedere dal grafico, all'aumentare della lunghezza aumenta il numero di polipi, evidenziando una relazione lineare tra i due parametri presi in considerazione ( $r = 0,814616$ ,  $r_{crit} = 0,361$ ).



**Fig. 2. Relazione tra il numero di polipi e la lunghezza del frammento analizzato**

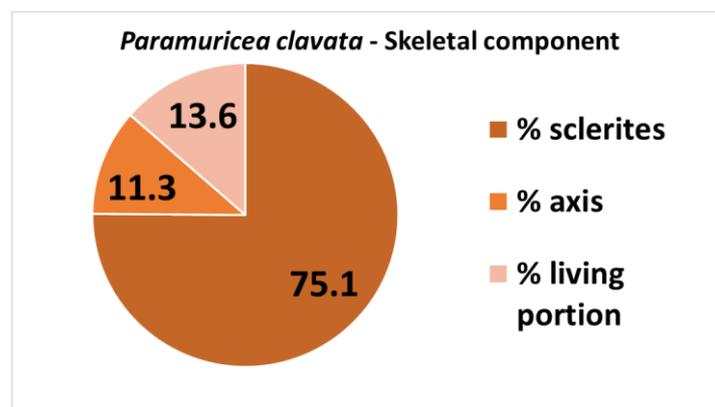
La Fig. 3 rappresenta la correlazione tra il numero di polipi presenti sul frammento analizzato e il diametro del frammento stesso. Come si può vedere, dai campioni analizzati si può dedurre che la relazione tra le due variabili considerate non è di tipo lineare.



**Fig. 3. Relazione tra il numero di polipi e il diametro del frammento analizzato**

La densità media dei polipi calcolata considerando i valori di tutti i campioni analizzati è  $41.6 \text{ cm}^{-2} \pm 3.3 \text{ cm}^{-2} \text{ SE}$ . Considerando che la lunghezza totale dei rami di una gorgonia di grandi dimensioni è di circa 927.57 cm (TBL - Total branch length, Mistri & Ceccherelli, 1996) e che il diametro medio dei frammenti analizzati è  $0.26 \text{ cm} \pm 0.02 \text{ SE}$ , l'area laterale di un'intera colonia isodiametrica sarebbe di circa  $776.41 \text{ cm}^2$  e quindi il numero totale di polipi per colonia sarebbe 32270.

*Abbondanza degli scleriti.* La percentuale in peso degli scleriti sul peso secco delle gorgonie analizzate varia dal 33% ad oltre il 99% e mediamente è del  $75.1\% \pm 2.1 \text{ SE}$ . L'asse centrale rappresenta la componente meno rappresentativa degli apici (mediamente  $11.3\% \pm 1.0 \text{ SE}$  dei frammenti). La percentuale di tessuto vivente (cenenchima e polipi), calcolata per differenza è di circa 13.6% (Fig. 4)



**Fig. 4. Componenti dei frammenti di *Paramuricea. clavata* (percentuali in peso)**

La Fig. 5 mostra le percentuali in peso degli scleriti nei campioni raccolti nei vari siti e alle diverse profondità di campionamento. Non risultano differenze significative né tra i valori relativi alle batimetrie all'interno di uno stesso sito (Kruskal-Wallis,  $H = 1.481$ ;  $p > 0,05$ ), né confrontando i valori inerenti ai tre siti (Gnjilina: Kruskal-Wallis,  $H = 4.439$ ;  $p > 0,05$ ; Brusnik:  $H = 0.3588$ ;  $p > 0,05$ ; Komiža:  $H = 5.89$ ;  $p > 0,05$ ).

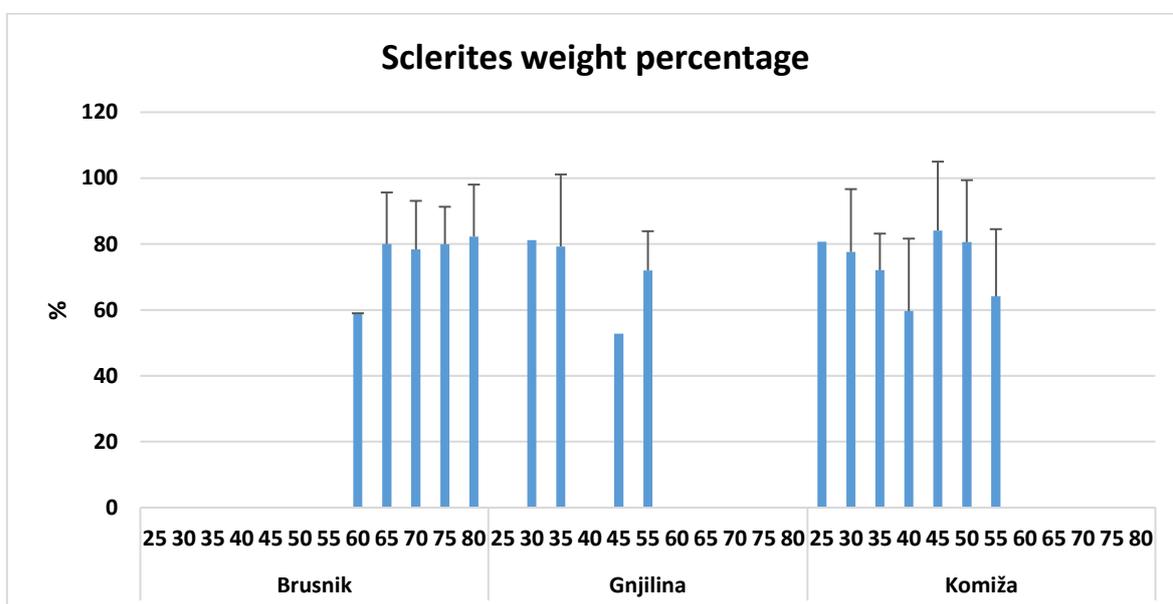
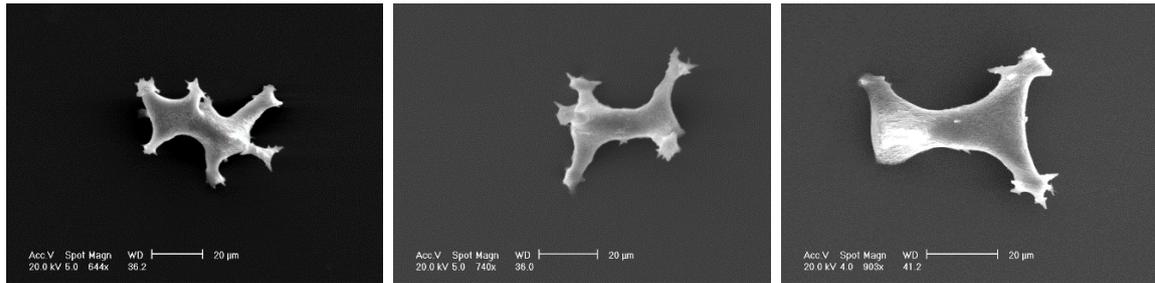


Fig. 5. Percentuali in peso degli scleriti nei campioni nei vari siti

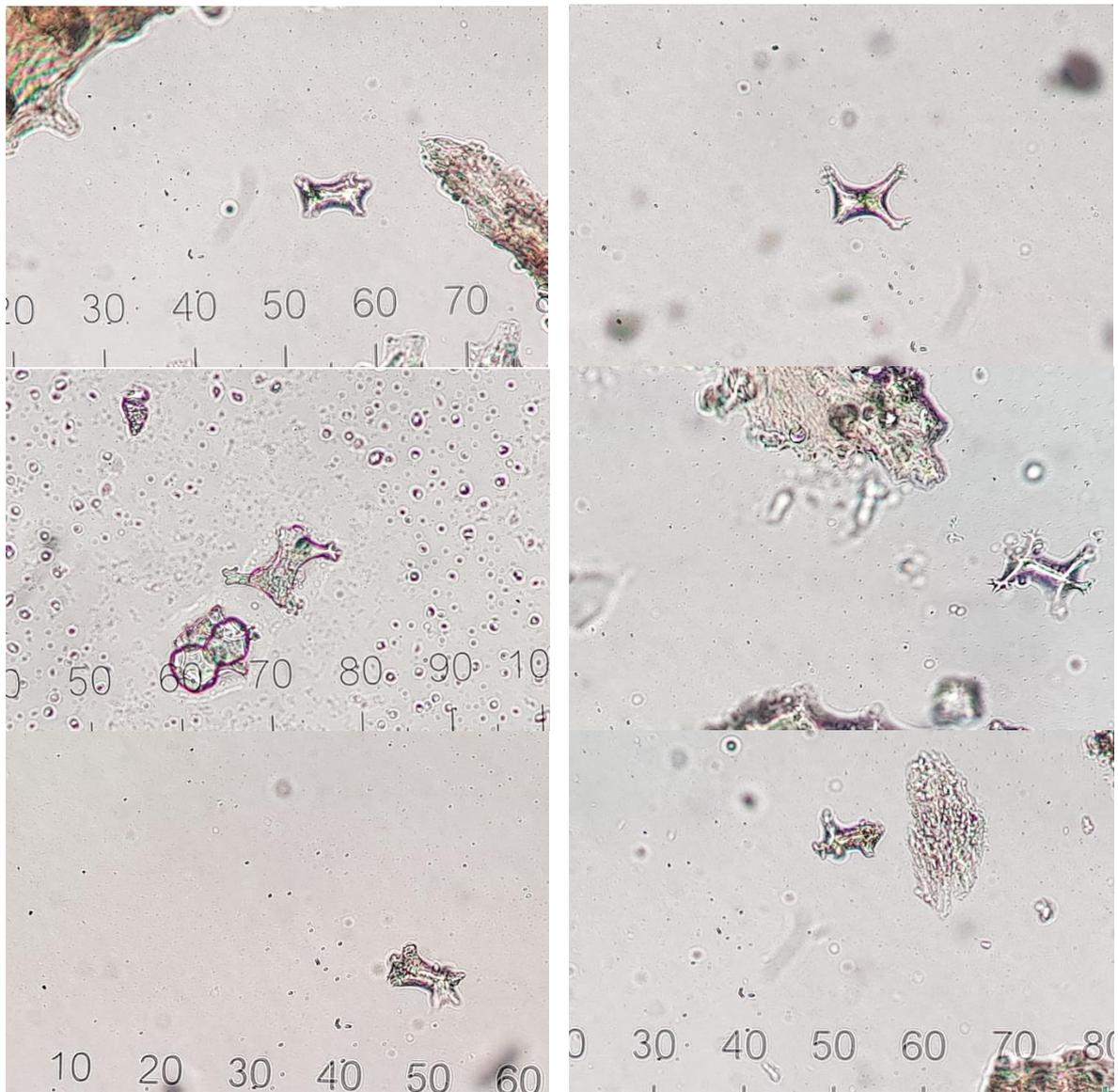
#### *Analisi morfologica e determinazione della distribuzione degli scleriti*

Analizzando gli elementi scheletrici calcarei tramite microscopia ottica ed a scansione, sono stati osservati scleriti mai descritti in precedenza per *P. clavata* che abbiamo chiamato mini-scleriti per via della dimensione molto piccola, dai 30 μm ai 50 μm circa (average = 37,4 μm ± 5,6 SE). I mini-scleriti presentano

un asse centrale relativamente tozzo dalle cui estremità dipartono raggi (2-4) delicati che possono a loro volta presentare estremità stellate. I raggi misurano circa 5-20  $\mu\text{m}$  (average =  $11.7 \mu\text{m} \pm 0.8 \text{ SE}$ ) e possono svilupparsi anche nella parte centrale dei mini-scleriti più lunghi (Fig. 6).



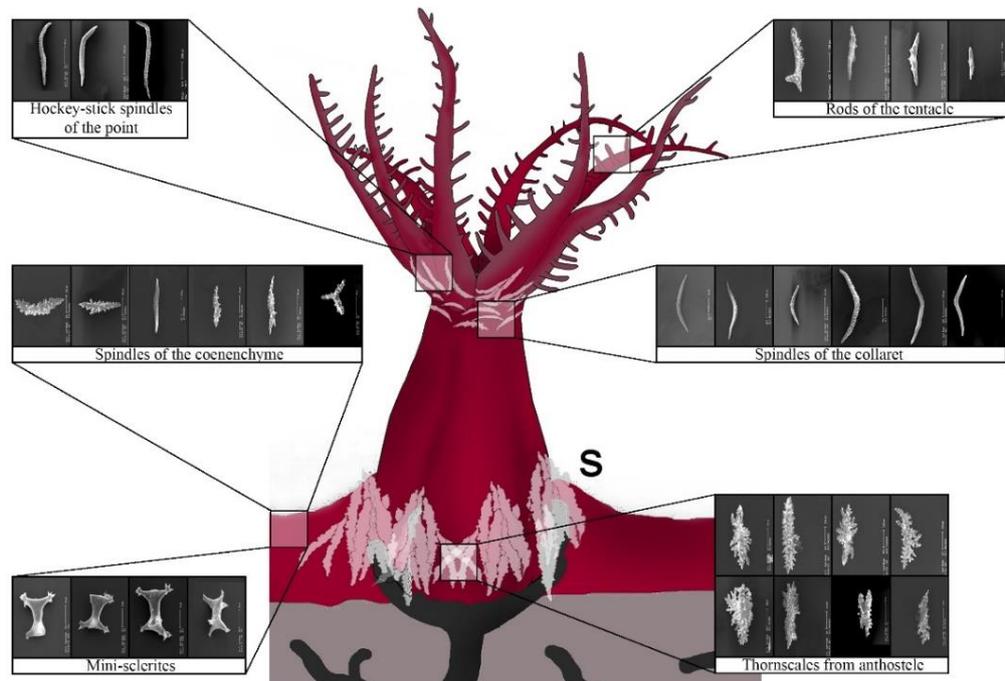
**Fig. 6 Mini-scleriti visti al SEM**



**Fig. 7. Immagini dal microscopio ottico ingrandimento 20X. Partendo dalla foto in alto a sinistra: campione RM-001-60 m; RM-002-65 m; G-005-55 m; RM-003-70 m; VS-002-30 m; VS-004-40 m.**

Per quanto riguarda la distribuzione degli scleriti nei polipi di *P. clavata*, nell'antostele si trovano i Thornscales caratterizzati da grandi dimensioni, da corti tubercoli e numerosi processi digitati principalmente alla base (Fig. 9b e Tabella 2). Nel cenchima, invece, sono presenti gli Spindles la cui

caratteristica è quella di essere prevalentemente tubercolati (Fig. 9c), mentre gli Spindles del collareto presentano tubercoli principalmente nella parte convessa e si organizzano in 5-8 file (Fig. 9d). Nel lato aborale del polipo si trovano gli Hockey-stick ricoperti omogeneamente da piccoli tubercoli (Fig. 9e) mentre nei tentacoli ci sono i Rods caratterizzati da pochi tubercoli e piccole dimensioni (Fig. 9f).



Section of polyp of *Paramuricea clavata* with the set of sclerites found in each body part. All scale bars are 200 micron except for the Rods of the tentacle which is 100 micron and the Mini-sclerites which is 20 micron

Riguardo alle dimensioni degli scleriti, in figura 8 e in tabella 2 si osserva la taglia media di ciascuna tipologia considerando complessivamente tutti i dati raccolti.

### Sclerites - average sizes

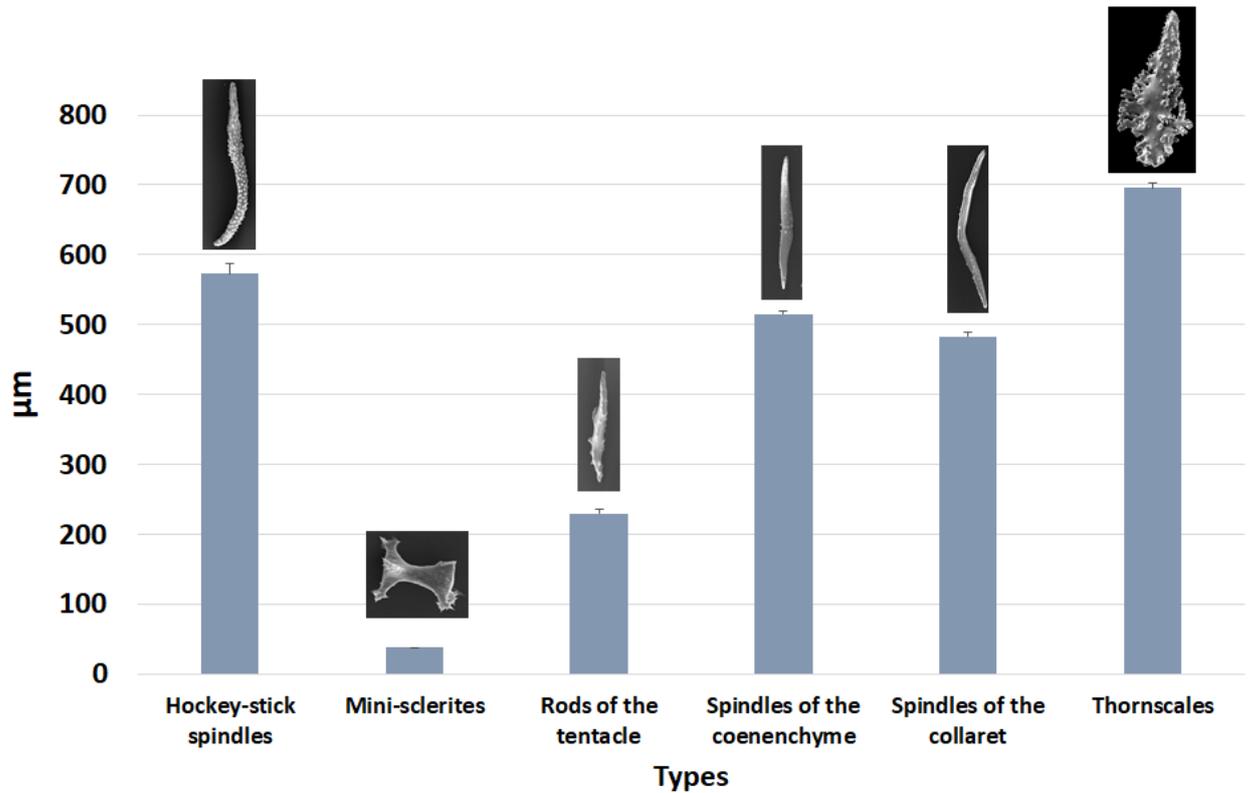


Fig. 8 Dimensioni medie di ogni categoria di scleriti di *Paramuricea clavata*

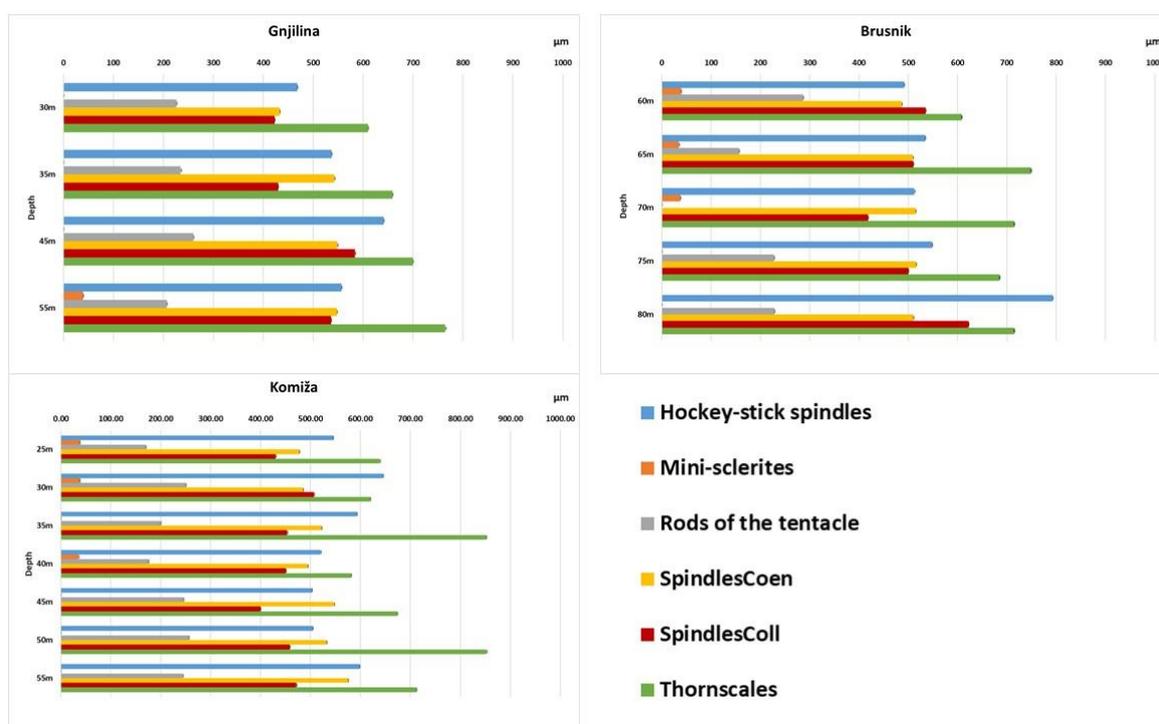
Tabella 2. Distribuzione e dimensioni degli scleriti di *Paramuricea clavata* nei siti considerati

	Polyp area	Min length (µm)	Max length (µm)	Average (µm)	SD (µm)
<b>Hockey-stick spindles</b>	Collaret	370	910	572.7	132.6
<b>Mini-sclerites</b>	Coenenchyme	30	50	37.4	5.7
<b>Rods of the tentacle</b>	Tentacles	110	350	229.8	45.5
<b>Spindles of the coenenchyme</b>	Coenenchyme	250	750	515.0	88.7
<b>Spindles of the collaret</b>	Collaret	250	910	483.0	117.2
<b>Thornscales</b>	Coenenchyme	440	1500	695.8	132.1



**Fig. 9 a) Foto allo stereomicroscopio di polipi di *P. clavata*; immagini al microscopio ingrandimento 20x b) Thornscales; c) Spindles del cenenchima; d) Spindles del collare; e) Hockey-stick del lato aborale dei tentacoli; f) Rods dei tentacoli**

I grafici in figura 10 mostrano le dimensioni medie di ciascuna categoria di scleriti in relazione al sito di campionamento e alla profondità.



**Fig. 10. Dimensioni medie di ciascuna categoria di scleriti in relazione al sito di campionamento e alla profondità**

Si può notare che i mini-scleriti non sono stati trovati in ogni sito ed ad ogni profondità; anche i rods non sono sempre presenti nei campioni esaminati.

Riguardo le dimensioni dei principali scleriti (Thornscales, Spindles del cenenchima e Spindles del collareto, Figura 11), risultano esserci quasi

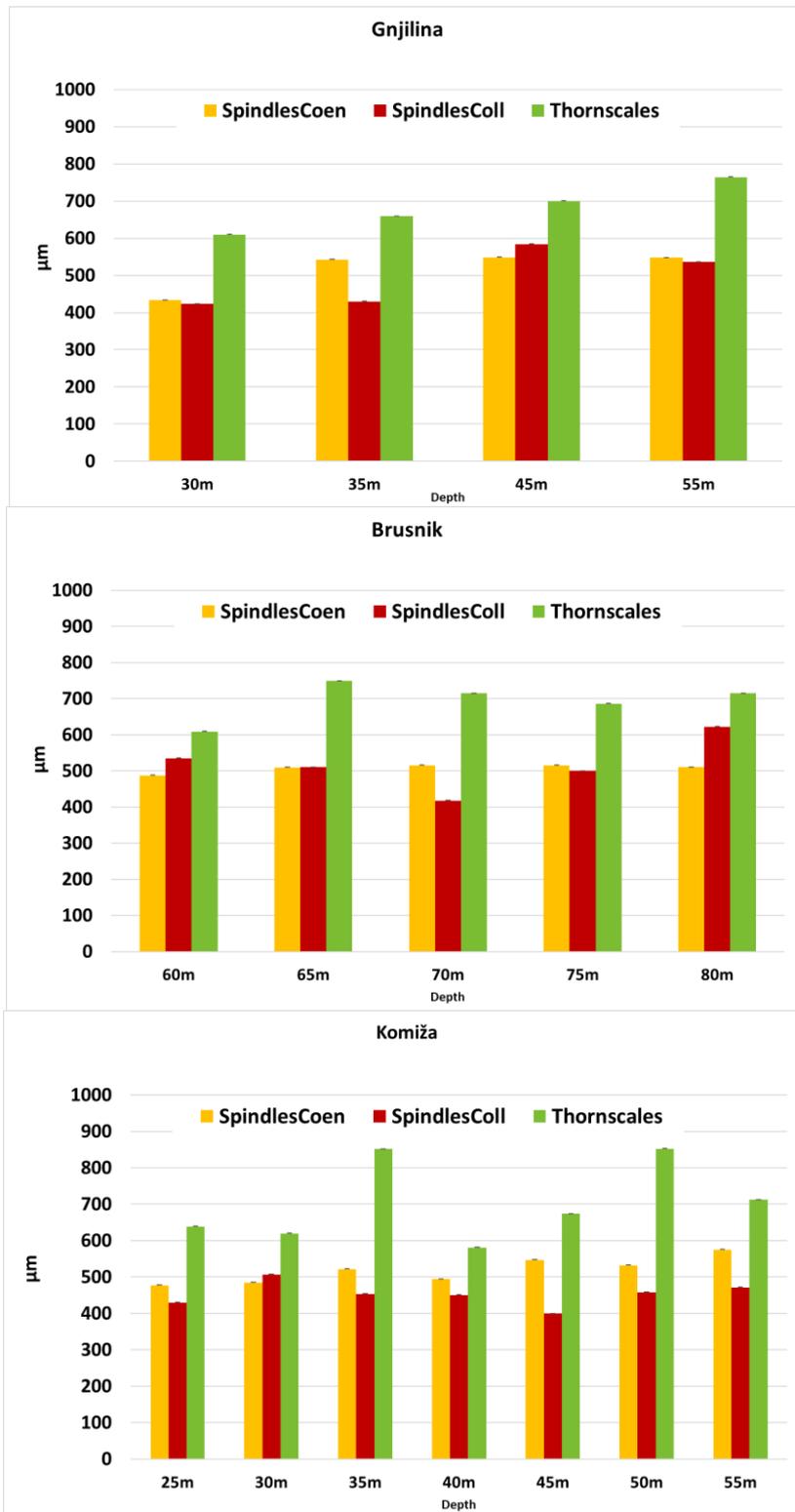


Fig. 11. Dimensioni dei principali scleriti di *Paramuricea clavata* in relazione al sito di campionamento e alla profondità

sempre delle differenze significative tra i vari siti; in particolare i Thornascales sono gli scleriti che in generale presentano maggiore variabilità, più evidente nei campioni raccolti nel sito di Komiža (Tabella 3).

**Tabella 3. Test di Kruskal Wallis**

Kruskal Wallis			
Site	Type	H	p
Gnjilina 30-55 m	Spindles of the coenenchyme	21.97	p<0.05
	Spindles of the collaret	24.52	p<0.05
	Thornscales	18.28	p<0.05
Brusnik 60-80 m	Spindles of the coenenchyme	0.875	p>0.05
	Spindles of the collaret	28.98	p<0.05
	Thornscales	17.66	p<0.05
Komiža 30-55 m	Spindles of the coenenchyme	24.91	p<0.05
	Spindles of the collaret	11.51	p>0.05
	Thornscales	73.25	p<0.05

## 8. DISCUSSIONE

Dalle analisi molecolari effettuate si può affermare che ogni campione raccolto ed analizzato appartiene alla specie *Paramuricea clavata*.

La densità dei polipi, calcolata per ogni frammento apicale di circa 3 cm di lunghezza ognuno, è di  $41,6 \pm 18,2$  SE polyps  $\text{cm}^{-2}$  e risulta essere leggermente più alta rispetto a quella calcolata da Cupido et al., 2012, di  $34,5 (\pm 7,9$  SD) polyps  $\text{cm}^{-2}$ . Questa discrepanza potrebbe essere dovuta alla diversa provenienza delle popolazioni studiate (Mar Ligure, Cupido et al. (2012); Mar Adriatico orientale, presente studio) o alla differente lunghezza dei frammenti apicali (nello studio di Cupido et. al., (2012) sono stati presi in considerazione frammenti apicali aventi lunghezza di 2 cm ( $\pm 0,13$  cm)).

Nei campioni da me esaminati, la densità aumenta, secondo una relazione di tipo lineare, all'aumentare della lunghezza del frammento ed è in accordo con lo studio di Coma et al., 1994, secondo cui la percentuale dei polipi dei rami periferici primari è più elevata per avere maggiore probabilità di cattura delle prede. Nei tre siti analizzati, infatti, la densità media dei polipi non si discosta molto. Invece, la densità dei polipi non presenta una relazione lineare con il diametro del frammento analizzato.

Per quanto riguarda la componente scheletrica, i risultati mostrano come gli scleriti siano l'elemento più abbondante, seguito dal tessuto vivente (cenchima e polipi) e infine dall'asse centrale. Gli scleriti, infatti, sono importanti in quanto interagiscono con qualsiasi flessione o torsione influenzando i meccanismi dell'intera colonia (Lewis & Von Wallis, 1991). Infatti, forniscono sostegno strutturale alle gorgonie riducendo l'elasticità e la rigidità dello scheletro assiale contro il movimento dell'acqua (Koehl, 1982; Lewis & Von Wallis, 1991). I risultati di questa ricerca mostrano che non risultano differenze significative dell'abbondanza degli scleriti né alle diverse batimetrie all'interno di uno stesso sito né confrontando i valori inerenti ai tre siti.

I "mini-sclerites", che non sono mai stati descritti prima, rappresentano meno del 13% degli scleriti misurati e sembrano essere presenti nei frammenti di gorgonia dove i polipi sono maggiormente distanziati tra loro, ma ulteriori analisi dovranno essere svolte per comprendere meglio la funzione di questi piccoli elementi scheletrici. A differenza però dello studio condotto da West (1998), questi scleriti non sono presenti solo in campioni situati in siti poco profondi, ma anche in alcuni campioni situati a profondità più elevate.

Le varie classi di scleriti che sono state riscontrate in questo studio, ad eccezione dei "mini-sclerites", sono quindi coerenti con quelle descritte nello

studio di Pica et al., 2018 così come la loro distribuzione. Confrontando le dimensioni misurate in laboratorio con quelle riportate da Pica et al. 2018, ogni classe di scleriti rientra all'interno del range dimensionale descritto: Thornscales circa 700  $\mu\text{m}$ ; Spindles del cenenchima circa 510  $\mu\text{m}$ ; Hockey-stick circa 580  $\mu\text{m}$ ; Spindles del collaretto circa 490  $\mu\text{m}$  e Rods dei tentacoli circa 220  $\mu\text{m}$ .

Gli scleriti maggiormente riscontrati nei campioni analizzati sono stati Thornscales, Spindles del cenenchima e Spindles del collaretto. Queste categorie risultano essere anche le più variabili in termini di lunghezza. Infatti, gli scleriti Spindles si trovano esternamente all'asse centrale, con il loro asse parallelo a quest'ultimo e la loro probabile funzione è quella di difesa e di supporto dei polipi (Lewis & Von Wallis, 1991; West, 1997). Come descritto nello studio di (Skoufas, 2006), la lunghezza e la larghezza degli Spindles aumentano in base alla loro posizione apicale nelle colonie e la loro compattezza aumenta nei siti più esposti ad elevato idrodinamismo confermando il ruolo di protezione verso la colonia. Infatti, nel momento in cui la velocità delle correnti aumenta, l'adattamento migliore è l'aumento della capacità di flessione della colonia (Skoufas, 2006) e ciò richiede la presenza di Spindles di dimensioni più grandi. Per quanto riguarda i Thornscales, probabilmente la loro funzione è quella di supporto meccanico (Lewis & Von

Wallis, 1991) in quanto la loro rotazione permetterebbe la torsione della colonia. Le loro dimensioni notevolmente grandi a batimetrie profonde, potrebbe essere il risultato di un adattamento nei confronti di correnti unidirezionali che inducono lo sviluppo di colonie più grandi massimizzando la superficie della colonia esposta al flusso (Grinyó et al., 2018) aumentando, così, il tasso di cattura delle prede (Sebens & Johnson, 1991). Grazie all'osservazione al microscopio, infatti, è evidente come, oltre alla lunghezza, anche le dimensioni risultano essere diverse come si evidenzia nella Fig. 12.



**Fig. 12 Immagini al microscopio ottico, ingrandimento 20X: a sinistra il campione VS-001 25 m; a destra il campione VS-004 40 m**



**Immagini al microscopio elettronico, ingrandimento a 10X: a sinistra il campione RM-002 65 m; a destra il campione RM-005 80 m**

I risultati ottenuti sono, quindi, in accordo con le descrizioni riportate in letteratura secondo cui la loro forma e le loro dimensioni potrebbero variare a seconda di fattori biotici e abiotici, molti dei quali ancora da esplorare. Il campione che presentava *Thornascales* con evidenti differenze morfologiche rispetto agli altri, era un frammento raccolto nel sito Gnjilina a 45 m, proveniente da una colonia parzialmente colonizzata dal falso corallo nero, *Savalia savaglia* (Bertoloni, 1819). In risposta alla presenza dello zoantario parassita, *P. clavata* potrebbe produrre scleriti con una morfologia diversa, ma numerosi altri campioni dovrebbero essere studiati per validare questa ipotesi.

In conclusione, questo studio mette in evidenza alcune peculiarità di *Paramuricea clavata* ancora da esplorare. La presenza dei mini-scleriti dovrà essere accertata anche in popolazioni localizzate in aree diverse da quella considerata; inoltre, ulteriori studi permetteranno anche di comprenderne meglio la funzione. I dati sulla concentrazione e sulla taglia degli elementi scheletrici calcarei di questa gorgonia costituiscono una baseline per effettuare confronti con gorgonie presenti in siti diversi o che subiscono stress ambientali, come le anomalie termiche.

## BIBLIOGRAFIA

Ballesteros, E. (2006). Mediterranean coralligenous assemblages: A synthesis of present knowledge. *Oceanography and Marine Biology*, 44, 123–195.

Bayer, F. M. (1961). The shallow-water Octocorallia of the West Indian region. A manual for marine biologists. *Studies of the Fauna Curacao and Other Caribbean Islands*, 12(55), 1–373.

Bayer, F. M. (1973). Colonial Organization in Octocorals. *Animal Colonies*, 69–93.

Bayer, F. M. (1981). Key to the genera of Octocorallia exclusive of Pennatulacea (Coelenterata: Anthozoa), with diagnoses of new taxa. In *Proceedings of the Biological Society of Washington* (Vol. 94, pp. 902–947).

Cerrano, C., Bastari, A., Calcinai, B., Di Camillo, C., Pica, D., Puce, S., Valisano, L., & Torsani, F. (2019). Temperate mesophotic ecosystems: gaps and perspectives of an emerging conservation challenge for the Mediterranean Sea. *European Zoological Journal*, 86(1), 370–388.  
<https://doi.org/10.1080/24750263.2019.1677790>

Cerrano, C., Danovaro, R., Gambi, C., Pusceddu, A., Riva, A., & Schiaparelli,

S. (2010). Gold coral (*Savalia savaglia*) and gorgonian forests enhance benthic biodiversity and ecosystem functioning in the mesophotic zone. *Biodiversity and Conservation*, *19*(1), 153–167.

<https://doi.org/10.1007/s10531-009-9712-5>

Cerrano, Carlo, Bianchelli, S., Camillo, C. G. Di, Torsani, F., & Pusceddu, A.

(2015). Do colonies of *Lytocarpia myriophyllum*, L. 1758 (Cnidaria, Hydrozoa) affect the biochemical composition and the meiofaunal diversity of surrounding sediments? *Chemistry and Ecology*, *31*(1), 1–21.

<https://doi.org/10.1080/02757540.2014.966699>

Coffroth, M. (1984). Ingestion and incorporation of cora mucus aggregates by a gorgonian soft coral. *Marine Ecology Progress Series*, *17*, 193–199.

<https://doi.org/10.3354/meps017193>

Coma, R., Ribes, M., Zabala, M., & Gili, J. M. (1995). Reproduction and cycle of gonadal development in the Mediterranean gorgonian

*Paramuricea clavata*. *Marine Ecology Progress Series*, *117*(1–3), 173–184. <https://doi.org/10.3354/meps117173>

Coma, R., Ribes, M., Zabala, M., & Gili, J. M. (1998). Growth in a modular colonial marine invertebrate. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *47*(4),

459–470. <https://doi.org/10.1006/ecss.1998.0375>

- Coma, R., Zabala, M., & Gili, J. M. (1995). Sexual reproductive effort in the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *Marine Ecology Progress Series*, *117*(1–3), 185–197. <https://doi.org/10.3354/meps117185>
- Coma, Rafel, Gili, J., Zabala, M., & Riera, T. (1994). *Feeding and prey capture cycles in the aposymbiotic gorgonian Paramuricea clavata*. *115*(3), 257–270.
- Coma, Rafel, Pola, E., Ribes, M., & Zabala, M. (2004). Long-term assessment of temperate octocoral mortality patterns, protected vs. unprotected areas. *Ecological Applications*, *14*(5), 1466–1478. <https://doi.org/10.1890/03-5176>
- Coma, Rafel, Ribes, M., Gili, J. M., & Zabala, M. (1998). An energetic approach to the study of life-history traits of two modular colonial benthic invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, *162*(1), 89–103. <https://doi.org/10.3354/meps162089>
- Coma, Rafel, Ribes, M., Gili, J. M., & Zabala, M. (2000). Seasonality in coastal benthic ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*, *15*(11), 448–453. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01970-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01970-4)
- Coma, Rafel, Ribes, M., Gili, J. M., & Zabala, M. (2002). Seasonality of in situ respiration rate in three temperate benthic suspension feeders.

*Limnology and Oceanography*, 47(1), 324–331.

<https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.1.0324>

Cupido, R., Cocito, S., Manno, V., Ferrando, S., Peirano, A., Iannelli, M.,

Bramanti, L., & Santangelo, G. (2012). Sexual structure of a highly

reproductive, recovering gorgonian population: Quantifying reproductive output. *Marine Ecology Progress Series*, 469, 25–36.

<https://doi.org/10.3354/meps09976>

Daly, M., Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N.,

Fautin, D. G., France, S. C., McFadden, C. S., Opresko, D. M.,

Rodriguez, E., Romano, S. L., & Stake, J. L. (2007). The phylum

Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after

Linnaeus. *Zootaxa*, 182(1668), 127–182.

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.11>

Di Camillo, C. G., Boero, F., Gravili, C., Previati, M., Torsani, F., & Cerrano,

C. (2013). Distribution, ecology and morphology of *Lytocarpia*

*myriophyllum* (Cnidaria: Hydrozoa), a Mediterranean Sea habitat former

to protect. *Biodiversity and Conservation*, 22(3), 773–787.

<https://doi.org/10.1007/s10531-013-0449-9>

Di Camillo, C. G., Ponti, M., Bavestrello, G., Krzelj, M., & Cerrano, C.

- (2018). Building a baseline for habitat-forming corals by a multi-source approach, including Web Ecological Knowledge. *Biodiversity and Conservation*, 27(5), 1257–1276. <https://doi.org/10.1007/s10531-017-1492-8>
- Dodge, R. E., & Lang, J. C. (1983). Environmental correlates of hermatypic coral (*Montastrea annularis*) growth on the East Flower Gardens Bank, northwest Gulf of Mexico. *Limnology and Oceanography*, 28(2), 228–240. <https://doi.org/10.4319/lo.1983.28.2.0228>
- Erik H. Meesters, & Rolf P. M. Bak. (1995). Age-related deterioration of a physiological function in the branching coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology Progress Series*, 121, 203–209. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.512-515.1226>
- Fabricius, K., & Alderslade, P. (2001). *Soft Corals and Sea Fans: A comprehensive guide to the tropical shallow water genera of the central-west Pacific, the Indian Ocean and the Red Sea*.
- Fabricius, K. E., & Klumpp, D. W. (1995). *Widespread mixotrophy in reef-inhabiting soft corals : the influence of depth , and colony expansion and contraction on photosynthesis*. 125, 195–204.
- Gerhart, D. J. (1990). Fouling and gastropod predation: consequences of

- grazing for tropical octocoral. *Marine Ecology Progress Series*, 62, 103–108.
- Goldberg, W. M. (1976). Comparative study of the chemistry and structure of gorgonian and antipatharian coral skeletons. *Marine Biology*, 35(3), 253–267. <https://doi.org/10.1007/BF00396873>
- Gordon J. Leverage. (1984). Flow and feeding in fan-shaped colonies of the gorgonian coral, *Leptogorgia*. *The Biological Bulletin*, 151, 344–356.
- Gosline, B. Y. J. M. (1971a). Connective Tissue Mechanics of *Metridium Senile* : I. Structural and Compositional Aspects. *Journal of Experimental Biology*, 55(3), 775–795.
- Gosline, B. Y. J. M. (1971b). Connective Tissue Mechanics of *Metridium Senile* : II. Visco-Elastic Properties and Macromolecular Model. *Journal of Experimental Biology*, 55(3), 775–795.
- Gotelli, N. J. (1991). Demographic models for *Leptogorgia virgulata*, a shallow-water gorgonian. *Ecology*, 457–467.
- Grinyó, J., Gori, A., López-González, P. J., Santín, A., Baena, P., & Gili, J. M. (2018). Morphological features of the gorgonian *Paramuricea macrospina* on the continental shelf and shelf edge (Menorca Channel, Western Mediterranean Sea). *Marine Biology Research*, 14(1), 30–40.

<https://doi.org/10.1080/17451000.2017.1375118>

Guzman, H. M., Burns, K. A., & Jackson, J. B. C. (1994). Injury, regeneration and growth of Caribbean reef corals after a major oil spill in Panama.

*Marine Ecology Progress Series*, 105(3), 231–242.

<https://doi.org/10.3354/meps105231>

Harvell, C., & Suchanek, T. (1987). Partial predation on tropical gorgonians by *Cyphoma gibbosum* (Gastropoda). *Marine Ecology Progress Series*,

38(1), 37–44. <https://doi.org/10.3354/meps038037>

Jeyasuria, P., & Lewis, J. C. (1987). Mechanical properties of the axial skeleton in gorgonians. *Coral Reefs*, 5(4), 213–219.

<https://doi.org/10.1007/BF00300967>

Kingsley, R., & Watabe, N. (1984). Synthesis and transport of the organic matrix of the spicules in the gorgonian *Leptogorgia virgulata*

(Lamarck)(Coelenterata: Gorgonacea). *Cell and Tissue Research*, 235, 533–538. <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00226950>

Koehl, B. Y. M. A. R. (1977). Mechanical Diversity of Connective Tissue of the Body Wall of Sea Anemones. *Journal of Experimental Biology*, 69(1), 107–125.

Koehl, B. Y. M. A. R. (1982). Mechanical Design of Spicule-Reinforced

Connective Tissue: Stiffness. *Journal of Experimental Biology*, 98(1), 239–267.

Lasker, H. (1981). Comparison of the Particulate Feeding Abilities of Three Species of Gorgonian Soft Coral. *Marine Ecology Progress Series*, 5(1978), 61–67. <https://doi.org/10.3354/meps005061>

Lewis, J. C., & Von Wallis, E. (1991). *The function of sclerites in Gorgonians (Coelenterata, Octocorallia)*.

Linares, C., Coma, R., Diaz, D., Zabala, M., Hereu, B., & Dantart, L. (2005). Immediate and delayed effects of a mass mortality event on gorgonian population dynamics and benthic community structure in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 305, 127–137. <https://doi.org/10.3354/meps305127>

Linares, C., Coma, R., Mariani, S., Díaz, D., Hereu, B., & Zabala, M. (2008). Early life history of the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*: Implications for population dynamics. *Invertebrate Biology*, 127(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2007.00109.x>

Linares, C., Doak, D. F., Coma, R., Díaz, D., & Zabala, M. (2007). Life history and viability of a long-lived marine invertebrate: The octocoral *Paramuricea clavata*. *Ecology*, 88(4), 918–928.

<https://doi.org/10.1890/05-1931>

McFadden, C. S., France, S. C., Sánchez, J. A., & Alderslade, P. (2006). A molecular phylogenetic analysis of the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on mitochondrial protein-coding sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3), 513–527.

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.06.010>

McFadden, C. S., Sánchez, J. A., & France, S. C. (2010). Molecular phylogenetic insights into the evolution of octocorallia: A review. *Integrative and Comparative Biology*, 50(3), 389–410.

<https://doi.org/10.1093/icb/icq056>

Mistri, M., & Ceccherelli, V. U. (1994). Growth and secondary production of the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *Marine Ecology Progress Series*, 103(3), 291–296. <https://doi.org/10.3354/meps103291>

Mistri, Michele. (1994). Ecological observations on a population of the mediterranean gorgonian *paramuricea clavata* (Risso, 1826). *Bolletino Di Zoologia*, 61(2), 163–166. <https://doi.org/10.1080/11250009409355877>

Mokhtar-Jamaï, K., Pascual, M., Ledoux, J. B., Coma, R., Féral, J. P., Garrabou, J., & Aurelle, D. (2011). From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramuricea clavata*: The interplay

between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Molecular Ecology*, 20(16), 3291–3305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05176.x>

Mokhtar-Jamaï, Kenza, Coma, R., Wang, J., Zuberer, F., Féral, J. P., & Aurelle, D. (2013). Role of evolutionary and ecological factors in the reproductive success and the spatial genetic structure of the temperate gorgonian *Paramuricea clavata*. *Ecology and Evolution*, 3(6), 1765–1779. <https://doi.org/10.1002/ece3.588>

Murdock, G. R. (1978). Digestion, assimilation and transport of food in the gastrovascular cavity of a gorgonian octocoral (Cnidaria; Anthozoa). *Bulletin of Marine Science*, 28(2), 354–362. [http://caslon.stanford.edu:3210/sfxlcl3?url\\_ver=Z39.88-2004&ctx\\_ver=Z39.88-2004&ctx\\_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft\\_val\\_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft.genre=article&rft.issn=0007-4977&rft.coden=BMRSAW&rft.date=1978&rft.volume=28&rft.issue=2&rft.spage=354](http://caslon.stanford.edu:3210/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft.genre=article&rft.issn=0007-4977&rft.coden=BMRSAW&rft.date=1978&rft.volume=28&rft.issue=2&rft.spage=354)

Muzik, K., & Wainwright, S. (1977). Morphology and Habitat of Five Fijian Sea Fans. *Bulletin of Marine Science*, 27(2), 308-337(30).

- Mydlarz, L. D., & Harvell, C. D. (2007). Peroxidase activity and inducibility in the sea fan coral exposed to a fungal pathogen. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *146*, 54–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.005>
- Naim, O. (1993). Seasonal responses of a fringing reef community to eutrophication ( Reunion Island , Western Indian Ocean ). *Marine Ecology Progress Series*, *99*, 137–151.
- Olano, C. T., & Bigger, C. H. (2000). Phagocytic Activities of the Gorgonian Coral *Swiftia exserta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 176–184.  
<https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4974>
- Patterson, M. R. (1991). Passive suspension feeding by an octocoral in plankton patches: empirical test of a mathematical model. *Biological Bulletin*, *180*(1), 81–92. <https://doi.org/10.2307/1542431>
- Pica, D., Calcinai, B., Poliseno, A., Trainito, E., & Cerrano, C. (2018). Distribution and phenotypic variability of the Mediterranean gorgonian *Paramuricea macrospina* (Cnidaria: Octocorallia). *European Zoological Journal*, *85*(1), 393–409.  
<https://doi.org/10.1080/24750263.2018.1529202>
- Poliseno, A., Altuna, A., Cerrano, C., Wörheide, G., & Vargas, S. (2017).

Historical biogeography and mitogenomics of two endemic

Mediterranean gorgonians (Holaxonia, Plexauridae). *Organisms Diversity and Evolution*, 17(2), 365–373. [https://doi.org/10.1007/s13127-017-0322-](https://doi.org/10.1007/s13127-017-0322-x)

x

Ribes, M., Coma, R., & Gili, J. M. (1999). Heterogeneous feeding in benthic suspension feeders: The natural diet and grazing rate of the temperate gorgonian *Paramuricea clavata* (Cnidaria: Octocorallia) over a year cycle. *Marine Ecology Progress Series*, 183, 125–137. <https://doi.org/10.3354/meps183125>

Riegl, B. (1995). Effects of sand deposition on scleractinian and alcyonacean corals. *Marine Biology*, 121(3), 517–526. <https://doi.org/10.1007/BF00349461>

Rossi, S., Gili, J. M., Coma, R., Linares, C., Gori, A., & Vert, N. (2006). Temporal variation in protein, carbohydrate, and lipid concentrations in *Paramuricea clavata* (Anthozoa, Octocorallia): Evidence for summer-autumn feeding constraints. *Marine Biology*, 149(3), 643–651. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0229-5>

Sánchez, J. A., Aguilar, C., Dorado, D., & Manrique, N. (2007). Phenotypic plasticity and morphological integration in a marine modular invertebrate.

*BMC Evolutionary Biology*, 7(May 2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-122>

Sebens, K. P. (1984). Water flow and coral colony size: Interhabitat comparisons of the octocoral *Alcyonium siderium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(17), 5473–5477.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.81.17.5473>

Sebens, K P, & Johnsoni, A. S. (1991). Effects of water movement on prey capture and distribution of reef corals. *Hydrobiologia*, 216–217(1), 247–248. <https://doi.org/10.1007/bf00026470>

Sebens, Kenneth Peter. (1987). The ecology of indeterminate animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 371–407.

Skoufas, G. (2006). Comparative biometry of *Eunicella singularis* (Gorgonian) sclerites at East Mediterranean Sea (North Aegean Sea, Greece). *Marine Biology*, 149(6), 1365–1370.  
<https://doi.org/10.1007/s00227-006-0314-4>

Tentori, E., & Ofwegen, L. P. Van. (2011). Patterns of Distribution of Calcite Crystals in Soft Corals Sclerites. *Journal of Morphology*, 628(March), 614–628. <https://doi.org/10.1002/jmor.10942>

Toledo-Hernández, C., Ruiz-Díaz, C. P., Díaz-Vázquez, L. M., Santiago-

- Cárdenas, V., Rosario-Berrios, D. N., García-Almedina, D. M., & Roberson, L. M. (2017). Comparison of chemical compounds associated with sclerites from healthy and diseased sea fan corals (*Gorgonia ventalina*). *PeerJ*, 2017(8). <https://doi.org/10.7717/peerj.3677>
- Toledo-hernández, C., Ruiz-diaz, C. P., Ramírez-camejo, L., Paniagua, R., Sabat, A. M., Roberson, L., & Bayman, P. (2016). The role of sclerites in the defense against pathogens of the sea fan *Gorgonia ventalina* (Octocorallia). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 483, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.06.002>
- Tomascik, T., & Sander, F. (1985). Effects of eutrophication on reef-building corals - II. Structure of scleractinian coral communities on fringing reefs, Barbados, West Indies. *Marine Biology*, 94(1), 53–75. <https://doi.org/10.1007/BF00392900>
- Van Alstyne, K. L., Wylie, C. R., Paul, V. J., & Meyer, K. (1992). Antipredator defenses in tropical Pacific soft corals (Coelenterata: Alcyonacea). I. Sclerites as defenses against generalist carnivorous fishes. *Biological Bulletin*, 182(2), 231–240. <https://doi.org/10.2307/1542116>
- Velimirov, B. (1976). Variations in growth forms of *Eunicella cavolin* Koch (Octocorallia) related to intensity of water movement. *Journal of*

*Experimental Marine Biology and Ecology*, 21(2), 109–117.

[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(76\)90032-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(76)90032-0)

Vrolijk, N. H., & Targett, N. M. (1992). Biotransformation enzymes in *Cyphoma gibbosum* (Gastropoda : Ovulidae ): implications for detoxification of gorgonian allelochemicals. *Marine Ecology Progress Series*, 88, 237–246.

Weinberg, S. (1974). *Écologie communs substrat Banyuls-sur-Mer*.

Weinberg, S. (1980). Autecology of shallow-water Octocorallia from Mediterranean rocky substrata, II. Marseille, Côte d'Azur and Corsica. *Bijdragen Tot de Dierkunde*, 50(1), 73–86.

West, J M, Harvell, C. D., & Walls, A. (1993). Morphological plasticity in a gorgonian coral (*Briareum asbestinum*) over a depth cline. *Marine Ecology Progress Series*, 94, 61–69.

West, Jordan M. (1997). Plasticity in the sclerites of a gorgonian coral: Tests of water motion, light level, and damage cues. *Biological Bulletin*, 192(2), 279–289. <https://doi.org/10.2307/1542721>

West, Jordan M. (1998). The dual role of sclerites in a gorgonian coral: Conflicting functions of support and defence. *Evolutionary Ecology*, 12, 803–821. <https://doi.org/10.1023/A>

Yoshioka, P. M., & Yoshioka, B. B. (1989). Effects of wave energy, topographic relief and sediment transport on the distribution of shallow-water gorgonians of Puerto Rico. *Coral Reefs*, 8(3), 145–152.  
<https://doi.org/10.1007/BF00338270>