

STUDIO SULLA RITMICITÀ ENDOGENA NELL'ATTIVITÀ MOTORIA DI *NIPHARGUS POIANOI SALERNIANUS*

ENDOGENEOUS RHYTHMS IN LOCOMOTOR ACTIVITY OF *NIPHARGUS POIANOI SALERNIANUS*

Luisa Auletta^{(1)*}, Salvatore Inguscio⁽²⁾, Vittorio Pasquali⁽³⁾

Riassunto

Nel presente lavoro, svolto nelle Grotte di Pertosa-Auletta in provincia di Salerno, abbiamo esaminato la presenza di ritmi circadiani nel crostaceo anfipode *Niphargus poianoi salernianus* (KARAMAN, 2015), mediante apparati dotati di tecnologia con *sensori a infrarossi*. Sono stati usati un totale di 10 apparati collegati a un computer, dotato di un software progettato per registrare i movimenti di ogni individuo. Sono state eseguite due registrazioni, ognuna di 15 giorni in condizioni di buio costante (DD), insieme con un'ulteriore registrazione della durata di 3 giorni in condizioni di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Successivamente è stata eseguita un'analisi qualitativa e quantitativa dell'attività locomotoria, con la rappresentazione grafica dei movimenti. L'analisi ha mostrato un periodo medio di 23,9 ore in DD e di 23,2 in LD.

Lo spettro medio ha rilevato come unica ritmicità significativa un periodo di 16 ore e mostra la presenza di periodi appartenenti al range circadiano, ma al di sotto della soglia di significatività. In condizioni di luce/buio gli esemplari non hanno rivelato ritmicità significative.

Non escludiamo comunque che *Niphargus poianoi salernianus* non possenga un ritmo endogeno, poiché è probabile che utilizzi segnali non fotici per la sincronizzazione dei processi metabolici interni.

Termini chiave: *Anfipode, cronobiologia, ritmo Circadiano, sensori a infrarossi.*

Abstract

The hold has a very rich fauna with many endemic species.

In this article we describe a chronobiological study on the motor activity of the amphipod *Niphargus poianoi salernianus* (KARAMAN, 2015) carried out in the Pertosa-Auletta caves (Salerno, Southern Italy) has aimed at unveiling the existence of circadian rhythms.

We used ten infrared- based detection devices whose output was fed to a software package designed to record motor activity.

We surveyed *Niphargus* activity for 15 days, twice a day, in continuous darkness (DD) and once a day in light/dark conditions (LD) over three days.

Analysis of recorded data showed a mean duration of 23.9 h under DD and 23.2 under LD.

The average spectrum obtained for all subjects studied showed ultradian rhythmicity of ca. 16 hours, circadian rhythms under the threshold of relevance; in light/dark conditions *Niphargus* revealed no significant rhythmicity.

We cannot rule out, however, that *Niphargus poianoi salernianus* has an endogenous rhythm since it might use other environmental parameters to synchronize metabolic pathways.

Keywords: *Amphipod, chronobiology, Circadian rhythms, infrared beam.*

(1) Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Biologia. Gruppo Speleologico Natura Esplora

(2) Laboratorio Ipogeo Salentino di Biospeleologia "Sandro Ruffo". Gruppo Speleologico Natura Esplora

(3) Università degli Studi di Roma La Sapienza, Dipartimento di Psicologia. Circolo Speleologico Romano

(*) Autore di riferimento: e-mail auletta@unina2.it

Introduzione

La cronobiologia si occupa dello studio dei fenomeni ciclici che si osservano negli organismi. Dall'attività locomotoria di un animale si possono desumere le caratteristiche del suo ritmo biologico e quanto questo risulti essere influenzato dai fattori ambientali (SAUNDERS et al., 2002).

È interessante osservare l'attività locomotoria di quelle specie che, nel corso dell'evoluzione, si sono specializzate a vivere in ambienti dove le fluttuazioni di temperatura e umidità sono minime o nulle e dove la radiazione luminosa è totalmente assente (SAUNDERS et al., 2002).

Molti sono stati gli studi effettuati su organismi direttamente associati alle cavità ipogee, sia troglodili sia troglobi (SAUNDERS et al., 2002). Mentre per i troglodili la ritmicità circadiana è risultata evidente, considerando il fatto che essi tendono a popolare zone prossime agli ingressi delle cavità, non è così per le specie cavernicole (SAUNDERS et al., 2002).

Sono stati riscontrati prevalentemente due modelli generali di attività per i troglobi. Il primo comprende organismi che non presentano una periodicità molto chiara come ad esempio *Speonomus diecki*, *Duvalius jureceki*, *Geotrechus orpheus* (SAUNDERS et al., 2002). Il secondo invece annovera organismi adattati alla vita cavernicola come alcuni ordini d'insetti, anfibi e pesci che, in condizioni sperimentali, hanno dimostrato di possedere ritmi circadiani, considerati come un residuo endogeno dei loro antenati epigei (FRIEDRICH, 2013). Da ciò possiamo dedurre che con molta probabilità gli organismi ipogei sono soggetti a una degenerazione dei ritmi circadiani (SAUNDERS et al., 2002).

Gli studi cronobiologici prevedono l'utilizzo di sistemi automatizzati taxon-specifici per la registrazione dell'attività locomotoria, poiché gli individui devono essere monitorati per periodi abbastanza lunghi e per 24 ore al giorno (PASQUALI & RENZI, 2005). I sistemi automatizzati saranno diversi in base alla specie presa in considerazione (PASQUALI & RENZI, 2005).

In questo lavoro abbiamo analizzato il ritmo biologico di *Niphargus poianoi salernianus* (KARAMAN, 2015), (*N. p. salernianus*), un crostaceo anfipode troglobio rinvenuto nel tratto non turistico delle grotte di Pertosa-Auletta.

La specie

N. p. salernianus (KARAMAN, 2015) è una sottospecie di crostacei Malacostraci appartenente all'ordine degli Anfipodi. Le specie classificate in quest'ordine sono circa 6000, sia marine che di acqua dolce e in piccola parte anche semiterrestri (STOCH, 2008).

La specie presenta delle affinità con *Niphargus poianoi poianoi* (KARAMAN, 1988), rinvenuta in Emilia Romagna, ma al tempo stesso è stata considerata una sottospecie a sé stante perché presenta delle differenze corporee tra gli individui esaminati, tra cui: una lunghezza minore delle placche coxali 1 e 4, delle appendici più piccole presenti sui pereopodi 5 e 7 e gnatopodi leggermente più grandi (Karaman, 2015).

Gli individui di *N. p. salernianus* (Fig. 1), presentano dimensioni corporee pari a circa 8-9 mm, sufficienti per essere rilevati dai sensori a infrarossi.

Materiali e Metodi

Abbiamo prelevato, mediante retino con maglia di 2 mm per lato, 25 individui di *N. p. salernianus* all'interno del ramo speleologico delle Grotte di Pertosa-Auletta (Cp 1), in provincia di Salerno (Campania) il giorno 22 febbraio 2016. Gli individui sono stati posti all'interno di una tanica di plastica con capacità di 5 litri, riempita con 3 litri d'acqua e precedentemente rivestita con carta stagnola per consentire il trasporto dei crostacei al buio completo. Inoltre, sono stati campionati altri 7 litri d'acqua dalla vasca, nel caso fosse stato necessario aggiungere o sostituire quella presente negli apparati.

Nel ramo ove è stato effettuato il campionamento sono presenti diverse vasche, costituite da un fondale piuttosto fangoso con accumuli di guano su cui i crostacei pascolano.

La vasca presa in considerazione per il campionamento degli individui è situata nella parte terminale del ramo (Fig. 2), con una profondità che varia in base agli eventi pluviometrici e all'attività della diga antistante l'ingresso della grotta.



Fig. 1 - *Nipbargus poianoi salernianus* (KARAMAN, 2015). Foto L. Auletta e M. Rampini.

Fig. 1 - *Nipbargus poianoi salernianus* (KARAMAN, 2015). Photo L. Auletta e M. Rampini.

Fig. 2 - Vasca situata nel tratto terminale del ramo mediano delle Grotte di Pertosa-Auletta (Salerno, Italia) dove sono stati prelevati gli esemplari di *Nipbargus poianoi salernianus* (KARAMAN, 2015). Foto L. Auletta.

Fig. 2 - Basin located at the end of the branch in the Pertosa-Auletta caves (Salerno, Italy), where we collected *Nipbargus poianoi salernianus* (KARAMAN, 2015). Photo L. Auletta.



Analisi dei ritmi di attività

I soggetti campionati sono stati trasportati il giorno seguente alla cattura presso l'Università degli studi La Sapienza di Roma e posizionati al buio in una camera a $T = 13^{\circ}\text{C}$.

Per effettuare lo studio cronobiologico su *N. p. salernianus* è stato utilizzato un sistema progettato per acquisire dati su 17 canali totali, di cui 15 sono sensori di movimento IR, mentre i restanti 2 sono sensori sia di luce ambientale che di temperatura. Il sistema di monitoraggio è costituito da acquari sui quali sono montati i sensori di luce e temperatura insieme con le componenti elettroniche, il circuito di condizionamento del segnale è una casella dotata di connettore interfacciato con il programma Raspberry-Pi attraverso l'utilizzo di un cavo piatto (PASQUALI et al., 2016), (Fig. 3).

Le componenti di otticoelettronica (OPTEK Inc., Carrollton, TXX Stati Uniti) sono: (a) $\text{O}3$ mm GaAlAs di plastica che emette diodi OP298B, λ 890 nm, φ 25° , con potere di produzione massimo di 4.8 mW/cm^2 ; (b) $\text{O}3$ mm NPN con dispositivi fotosensibili a semiconduttori OP598B con ampio angolo di ricezione, λ 860 nm e φ 25° . Questo tipo di dispositivo funziona con un raggio più stretto, necessario per rilevare l'attività di piccoli invertebrati (PASQUALI et al., 2016). Il computer è costituito da quattro porte USB (che servono per connettere mouse e tastiera), un cavo alimentatore UPS e una porta per la connessione del cavo VGA con adattatore per HDMI per il monitor del pc.

I soggetti studiati sono stati posizionati individualmente in un acquario con 450 ml di acqua a $T = 13^{\circ}\text{C}$.

Il programma utilizzato per la registrazione dei dati scritto in *codice python* (PASQUALI et al.,

2016) è stato impostato per rilevare i movimenti degli individui ogni minuto per una lunghezza impostabile dall'utente.

Gli individui sono rimasti all'interno degli acquari per 15 giorni in condizioni di buio costante (DD) e successivamente, per tre giorni con 12 ore di luce e 12 ore di buio (LD 12:12).

L'esperimento è stato effettuato in DD su due gruppi di 10 individui (gruppi "Niph S1" e "Niph S2"). La registrazione dati per Niph S1 è iniziata il 23 febbraio 2016 e si è conclusa l'8 marzo 2016, mentre la registrazione per Niph S2 è iniziata il 23 marzo 2016 e si è conclusa il 6 aprile 2016.

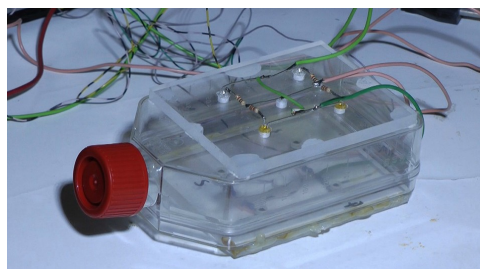


Fig. 3 - Rilevatore di movimento di *Niphargus poianoi salernianus* basato su tecnologia a infrarossi. Foto F. Marmo.

Fig. 3 - Infrared beams used to record locomotor activity of *Niphargus poianoi salernianus*. Photo F. Marmo.

L'attività è stata registrata ogni minuto per tutta la durata dell'esperimento (15 giorni) per un totale di 21600 eventi nel corso della sessione. Successivamente si è proceduto a raggruppare i dati in categorie di 10 minuti. Dalla successiva analisi visiva dei dati sono state scartate quelle registrazioni provenienti da apparati non sufficientemente sensibili a rilevare l'animale, a causa delle ridotte dimensioni dello stesso o per sensibilità insufficiente dei sensori.

Le serie temporali ritenute idonee all'analisi sono state prima rappresentate graficamente tramite il programma PLOT, con cui sono stati costruiti gli attogrammi doubleplot.

Successivamente, sono stati utilizzati diversi programmi per l'elaborazione, tra cui WINTAU e DFT.

WINTAU ha permesso di testare la presenza di periodi significativi in ogni individuo nel range temporale da 20 a 26 ore tramite l'algoritmo di SOKOLOVE & BUSHELL, (1978). I dati sono stati trattati con STATISTICA 6.0 al fine di procedere a uno smoothing, all'eliminazione del trend lineare e alla standardizzazione delle serie temporali.

DFT ha permesso di eseguire un'analisi spettrale al fine di identificare tutte le periodicità presenti nelle registrazioni (PASQUALI, 2014). Infine è stato generato un file con tutti i file spettro degli individui, i quali sono stati poi mediati per ottenere una sola rappresentazione.

Le stesse procedure sono state applicate anche per l'esperimento LD 12:12 condotto tra l'8 e il 10 aprile 2016.

Inoltre, è stata calcolata anche la media dei movimenti degli individui in LD. In particolare, sono stati separati i periodi di luce da quelli di buio nei tre giorni di registrazione. Successivamente, sono stati sommati i movimenti di ogni individuo nelle 36 ore totali sia di luce che di buio. In ultimo, è stata calcolata la media totale basata sui movimenti degli individui.

Risultati

I dati risultati utili ai fini delle analisi si riferiscono a 11 individui provenienti sia da Niph S1 che da Niph S2 per la condizione DD, e 7 individui ai fini del confronto DD vs LD.

In condizioni di buio costante solo 6 animali hanno avuto un periodo significativo di attività nel range 20-28 ore, con un periodo medio di $23,9 \pm 1,9$ ore. In condizioni di luce/buio solo 2 animali hanno mostrato un periodo significativo, con periodo medio di $23,2 \pm 1,8$ ore.

Lo spettro medio calcolato su tutti gli animali ha mostrato un'unica ritmicità significativa di ca. 16 ore. Lo spettro illustra la presenza di periodi appartenenti al range circadiano, ma al di sotto della soglia di significatività, come anche altre *ritmicità ultradiane*.

È stato inoltre eseguito un confronto fra la ritmicità espressa in DD e quella espressa in LD su 7 animali della sessione Niph S2. Il confronto è stato eseguito sui 3 giorni di registrazione. In condizioni di LD, abbiamo periodi significativi solo in due individui. L'analisi spettrale in DD e LD evidenzia una *ritmicità ultradiana* in buio costante con un periodo di ca. 16 ore, mentre in condizioni di luce/buio non sono visibili periodicità significative (Fig. 4).

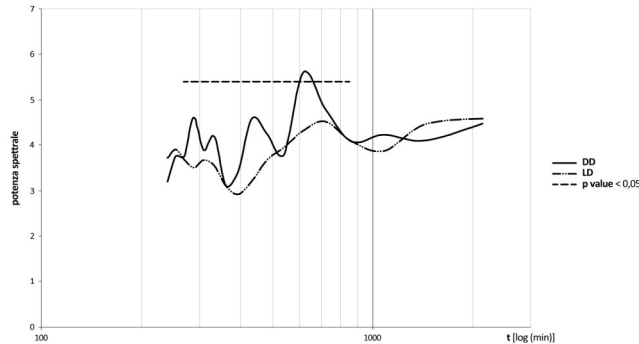


Fig. 4 - Spettri medi dei movimenti degli individui di *N. p. salernianus* in condizioni di buio costante (n=11) e condizioni di 12 ore di luce e 12 ore di buio (n=7).

Fig. 4 - Mean spectra of *N. p. salernianus* under dark conditions (n=11) & light/dark conditions (n=7).

Discussione

Nell'ambito degli studi cronobiologici, molte sono state le analisi e gli esperimenti effettuati su diverse specie di organismi troglobi, i quali hanno portato a risultati diversi, dimostrando l'assenza di pattern univoci (KOILRAJ et al., 2000; PASQUALI et al., 2007; LAMPRECHT & WEBER, 1979; CAVALLARI et al., 2011).

Alcune specie, nonostante la presenza di adattamenti specializzati per l'ambiente cavernicolo, hanno dimostrato di possedere dei ritmi circadiani. Ad esempio, *Astyanax mexicanus* non possiede ritmi circadiani di locomozione autonomamente sostenuti, ma i cicli LD inducono in questa specie una periodicità nella locomozione (LAMPRECHT & WEBER, 1979).

Il diplopode *Glyptulus cavernicolus*, perfettamente adattato all'ambiente ipogeo, in LD possiede un ritmo circadiano sincronizzato dai cicli di luce/buio (KOILRAJ et al., 2000). Anche nel caso del crostaceo stigobionte *Speleomysis bottazzii* è stato rilevato un ritmo circadiano endogeno nell'attività locomotoria (PASQUALI et al., 2007). Altre specie mostrano anche una certa sensibilità alla luce, come *Dualius balazuci* e *Dualius delphinensis*, le quali in LD hanno mostrato una maggiore attività nel periodo di luce, data però principalmente dal tentativo degli individui di nascondersi da essa (LAMPRECHT & WEBER, 1979).

Questi risultati suggeriscono che, nonostante le specie troglolie si siano adattate a un habitat i cui parametri ambientali rimangono pressoché costanti, conservano ugualmente i ritmi circadiani, e questo sia per la sincronizzazione interna dei loro processi fisiologici, sia perché probabilmente i ritmi endogeni sono soggetti a processi di regressione molto più lenti (SORIANO-MORALES et al., 2013).

Altri studi effettuati su specie troglolie, hanno rivelato risultati differenti. Ad esempio la specie *Phreatichthys andruzzii*, un ciprinide troglolio endemico delle cavità ipogee della Somalia rimasto isolato per milioni di anni, non possiede ritmicità nell'attività locomotoria, anche in cicli di luce/buio (CAVALLARI et al., 2011).

Per quanto concerne i crostacei appartenenti al genere *Niphargus*, LAMPRECHT & WEBER, (1979) li hanno inseriti in una categoria di organismi che non possiedono ritmi circadiani autosostenuti, ma durante il ciclo luce/buio la loro attività risulta subire un'influenza, data una maggiore attività durante la fase di buio. Questa periodicità in condizioni di buio costante

si blocca.

Gli studi effettuati in questa sede riguardanti la specie *N. p. salernianus*, invece, hanno rivelato che gli individui presentano un'attività locomotoria costituita da una *ritmicità ultradiana* in buio costante, con un periodo significativo di circa 16 ore. In condizioni di luce/buio (LD 12:12) la specie non ha rivelato ritmicità significative.

Dal calcolo della media dei movimenti in base alla presenza o meno della luce, si è visto un numero di registrazioni lievemente maggiore durante le ore in cui questa era presente. Si potrebbe perciò ipotizzare che *N. p. salernianus* sia dotato di un ritmo circadiano e che la sua attività locomotoria sia condizionata dalla luce.

In realtà, considerando anche l'assenza di ritmicità significative nelle analisi spettrali, è più plausibile che gli individui abbiano manifestato fototassia, come in *D. balazuci* e *D. delphinensis* (LAMPRECHT & WEBER, 1979), che tendono ad allontanarsi dalla fonte luminosa sgradevole, poiché provoca un disturbo.

La mancanza di ritmicità significative nell'attività locomotoria di *N. p. salernianus*, con molta probabilità, riflette la perdita progressiva di un meccanismo che non fornisce alcun vantaggio selettivo per una specie adattata a condizioni di oscurità e temperatura costanti.

È comunque probabile che la specie utilizzi altri segnali per la sincronizzazione dei processi metabolici interni, come ad esempio piccole variazioni di temperatura nell'ambiente circostante (SANDERS et al., 2002).

Ringraziamenti

Ringraziamo Francescantonio D'Orilia, Presidente della Fondazione MiDA e dell'Associazione Grotte Turistiche Italiane, per aver consentito di realizzare questo studio nel tratto speleologico delle Grotte di Pertosa-Auletta.

Ringraziamo inoltre Vittorio Pasquali che ha cortesemente messo a disposizione gli apparati di sua invenzione, e Mauro Rampini per aver messo a disposizione il suo microscopio.

L'Associazione Avanguardie a.p.s Li.sa. Bios. ha fornito infine assistenza nel riconoscimento della specie.

Bibliografia

- CAVALLARI N., FRIGATO E., VALLONE D., FRÖHLICH N., LOPEZ-OLMEDA J. F., FOÀ A., BERTI R., SÀNCHEZ-VÀZQUEZ F. J., BERTOLUCCI C., FOULKES N. S., 2011, *A Blind Circadian Clock in Cavefish Reveals that Opsins Mediate Peripheral Clock Photoreception*. PLoS Biology, vol. 9, issue 9.
- FRIEDRICH M., 2013, *Biological Clocks and Visual Systems in Cave-Adapted Animals at the Dawn of Speleogenomics*. Integrative and Comparative Biology Integrative and Comparative Biology, vol 53, num 1, pp. 50–67.
- KARAMAN G. S., 2015, *On two species of the subgenus Niphargus (Orniphargus) S. Kar. 1950 (Fam. Niphargidae) from Montenegro and Italy (Contribution to the knowledge of the amphipoda 280)*. Agriculture & Forestry, vol. 61, issue 2, pp.19-39.
- KOILRAJ J A, SHARMA K V, MARIMUTHU G, CHANDRASHEKARAN M K., 2000, *Presence of circadian rhythms in the locomotor activity of a cave-dwelling millipede Glyphiulus cavernicolus sulu (Cambalidae, Spirostreptida)*. Chronobiology International, vol. 17:6, pp. 757-765.
- LAMPRECHT G., WEBER F., 1979, *The regressive evolution of the circadian system controlling locomotion in cavernicolous animals: Miscellaneous Papers*. L. H. Wageningen, pp. 18:69-82.
- PASQUALI V. & RENZI P., 2005, *On the use of microwave radar devices in chronobiology studies: An Application with Periplaneta americana*. Università di Roma “La Sapienza”, Roma.
- PASQUALI V., GUALTIERI R., D'ALESSANDRO G., GRANBERG M., HAZLERIGG D., CAGNETTI M., LECCESE F., 2016, *Monitoring and Analyzing of Circadian and Ultradian*

- Locomotor Activity Based on Raspberry-Pi*. Electronics, vol. 5(3), pp. 58.
- PASQUALI V., RENZI P., BELMONTE G., PESCE G.L., 2007, *An infra-red beam device for the study of the motor activity rhythms in groundwater mysidacea*. Università La Sapienza, Roma.
- PASQUALI V., SBORDONI V., 2014, *High variability in the expression of circadian rhythms in a cave beetle population*, Biological Rhythm Research, vol. 45, pp. 925-939.
- SAUNDERS D.S., STEEL C.G.H., VAFOPOULOU X., LEWIS R.D., 2002, *Insect Clocks*. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- SOKOLOVE PG, BUSHELL WN, 1978, *The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms*. Journal of theoretical biology, Elsevier.
- SORIANO-MORALES S., CABALLERO-HERNANDEZ O., DÁVILA-MONTES M., MORALES-MALACARA J. B., MIRANDA-ANAYA M., 2013, *Circadian locomotor activity and entrainment by light cycles in cave spiders (Dipluridae and Ctenidae) at the cave Los Riscos*. Qro. México. Biological Rhythm Research, vol. 44, pp. 949-955.
- STOCH F., 2008, *Gli abitatori delle grotte – Biospeleologia del Friuli*. Graphiclinea di Tavagnacco, Udine, pp. 5-15.