



Università
Ca' Foscari
Venezia

Dottorato di ricerca
in Scienze e Tecnologie
Scuola di dottorato in Scienze Ambientali
Ciclo XXIV
(A.A. 2010 - 2011)

**Studio della biologia, morfologia ed ecologia di tre popolazioni di testuggine palustre siciliana *Emys trinacris* (Fritz *et al.*, 2005).
Valutazione della presenza di lantanidi e caratterizzazione genetica**

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI AFFERENZA: BIO/13
Tesi di dottorato di Stefania D'Angelo, matricola 955670

Coordinatore del Dottorato
Prof. Bruno Pavoni

Tutori del dottorando
Prof. Patrizia Torricelli
Dott. Mario Lo Valvo
Dott.ssa Angela Cuttitta

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	4
1.1. Scopo della tesi: approccio multidisciplinare adottato	4
1.2. Introduzione	5
2-INQUADRAMENTO TASSONOMICO E DISTRIBUZIONE.....	8
2.1. Filogenesi.....	8
2.2. Status tassonomico.....	9
2.3. Descrizione della specie.....	10
2.4. Distribuzione Geografica	10
3-AREE DI STUDIO.....	12
4-BIOLOGIA E MORFOMETRIA.....	17
4.1. Introduzione	17
4.2. Materiali e Metodi.....	17
4.2.1. Colorazione e pattern	23
4.2.2. Biologia riproduttiva.....	28
4.2.3. Dati ambientali.....	30
4.3. Risultati	32
4.4. Discussione	43
5 -PROCESSI BIOGEOCHIMICI	46
5.1. Introduzione	46
5.2. Caratteristiche geochimiche dei lantanidi.....	49
5.3. Materiali e Metodi.....	52
5.4. Risultati	54
5.5. Discussione	58
6- STRUTTURA GENETICA DI POPOLAZIONE.....	61
6.1 Introduzione	61
6.1.1 Pattern di diversità molecolare nella Testuggine palustre europea.....	63
6.1.2 Obiettivi	65
6.2 Materiali e metodi	65

6.2.1 Campionamento	65
6.2.2 Estrazione ed amplificazione del DNA.....	65
6.2.3 Analisi molecolari	66
6.3. Risultati	67
6.4. Discussione	69
6.4.1 Struttura genetica popolazionale delle popolazioni siciliane.....	69
7 - CONCLUSIONI.....	70
8 - BIBLIOGRAFIA.....	71
Ringraziamenti:.....	86

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

1.1. Scopo della tesi: approccio multidisciplinare adottato

La testuggine palustre europea, *Emys orbicularis* con le sue numerose sottospecie, è largamente distribuita in Europa.

In Sicilia, la congenerica *trinacris*, è presente ancora in numerose aree umide, con popolazioni che assumono talvolta caratteri morfometrici fra loro differenti, (Fritz *et al.*, 2006) tanto da suggerire un'indagine atta a stabilire le cause di tale variabilità.

Questo studio, con approccio multidisciplinare, ha quindi preso le mosse dall'esame dei caratteri morfometrici della specie oggetto d'indagine in tre siti distinti (Cap. 1), in cui già in passato si era riscontrata una certa variabilità morfometrica (Fritz *et al.*, 2006). Si è quindi passati alla ricerca di motivazioni che ne giustificassero la variabilità osservata e lo si è cercato di fare sia con un approccio genetico (Cap. 3), che ricorrendo allo studio della chimica dell'ecosistema (Cap. 2). Per condurre quest'ultima parte dello studio si è deciso di utilizzare i lantanidi, elementi chimici che sono, da un lato riconducibili alle caratteristiche della pressione antropica delle zone investigate e dall'altro capaci di essere accumulati all'interno dei tessuti degli organismi studiati.

Le pratiche agricole sono quelle che identificano maggiormente la pressione antropica sugli ecosistemi in questa parte della Sicilia. I lantanidi, la cui presenza deriva dall'uso intensivo di ammendanti e fertilizzanti per l'agricoltura, hanno la capacità di essere metabolizzabili dalle specie viventi tracciando i processi metabolici attraverso modificazioni della propria distribuzione nei fluidi biologici e nei tessuti degli organismi rispetto alla composizione della sorgente dalla quale provengono (acqua ambientale).

1.2. Introduzione

Nel sud Italia, il 70–90% delle zone umide sono andate distrutte nell'ultimo secolo (Fattizzo, 2004). Per questi motivi la testuggine palustre europea è stata inserita nella lista rossa globale (IUCN 2006), nella lista rossa dei vertebrati italiani (Bulgarini *et al.*, 1998), nella Direttiva EU (92/43/EEC) sulla conservazione degli Habitat naturali e della fauna selvatica e nell'appendice II (Strictly Protected Fauna Species) della Convenzione di Berna (1979). In Sicilia è protetta dalla Legge Regionale 33/97.

Oggi nell'isola è presente la testuggine palustre siciliana, *Emys trinacris* (Fritz *et al.*, 2005; 2006), unica tartaruga autoctona di acqua dolce. Di recente scoperta, questa specie era stata considerata come una delle tante forme sottospecifiche della testuggine palustre europea (*Emys orbicularis*). Solo dal 1998 si è iniziato a notare che, effettivamente, gli esemplari siciliani mostravano caratteristiche particolari che li differenziavano da tutte le altre testuggini palustri. Recenti studi effettuati sulle caratteristiche morfologiche, morfometriche e biomolecolari (Fritz, 1998; 2004; 2005a; 2005b; 2006) hanno permesso di ipotizzare e successivamente affermare che la popolazione siciliana di testuggine palustre è differente da tutte le altre, tanto da poterla descrivere come specie “buona” (Fig.1).



Figura 1- testuggine palustre siciliana *Emys trinacris*

La nuova posizione tassonomica della popolazione di testuggine palustre siciliana ha, come conseguenza, l'esclusione della stessa da tutte le leggi e convenzioni nazionali ed internazionali che, non aggiornate, proteggono solamente la testuggine palustre europea. Fa eccezione la Legge Regionale 33/97 che, tutelando in maniera generica le tartarughe, protegge anche la testuggine palustre siciliana, non considerando però la sua nuova posizione tassonomica. Nonostante la sua valenza, questa specie è ancora poco conosciuta; i pochi studi finora effettuati si riferiscono ad alcuni aspetti della popolazione presente nella riserva dei "Gorghi tondi e Lago Preola" di Mazara del Vallo ed alla popolazione presente nella riserva naturale orientata di "Torre Salsa" Siculiana (AG) (D'Angelo, 2003; D'Angelo *et al.*, 2004; Fritz *et al.*, 2004, 2005a, 2005b)

Da qui la necessità di raccogliere quante più informazioni possibili sulla sua biologia, ecologia e genetica, che consentano di estendere anche a questa, le forme di tutela legislativa che attualmente proteggono la congenerica testuggine palustre europea e di capire quali siano effettivamente i fattori di minaccia che mettono a repentaglio l'esistenza della popolazione siciliana.

L'obiettivo di questa tesi è stato pertanto quello di effettuare indagini su tre popolazioni, due delle quali presenti all'interno di aree protette e la terza in un'area a vocazione agricola. Queste tre popolazioni pertanto, possono essere considerate rappresentative, sia per la loro localizzazione, sia per i diversi fattori ecologici che le contraddistinguono.

In particolare la tesi ha riguardato:

- morfologia, analisi dei pattern cromatici e analisi biometrica;
- struttura della popolazione;
- processi biogeochimici;
- genetica delle popolazioni.

Palesi differenze morfologiche fra le popolazioni di testuggine sono state osservate e se ne è cercata motivazione in considerazioni di natura genetica (differenze specifiche) ovvero legate a stress ambientale. L'approccio è risultato vincente, mettendo in luce un'identità specifica a cui era però accoppiata una significativa differenza in termini di esposizione al chimismo dell'ambiente.

Gli studi genetici, effettuati in strettissima collaborazione con il "padre" delle testuggini palustri di tutta Europa, il Prof. Uwe Fritz, ancora una volta hanno confermato

quanto precedentemente affermato (Fritz *et al.*, 2005, 2006), ovvero, che esiste una chiara peculiarità genetica della popolazione siciliana del genere *Emys*, tanto da descriverla come specie nuova *trinacris*, ma anche di escludere la presenza della specie “*orbicularis*” che, poteva coesistere in particolare nella parte continentale della Sicilia, proprio per eventuali fluttuazioni genetiche con il resto della penisola (Bonfiglio *et al.*, 1997).

L’analisi tossicologica ha avuto come spunto un dato biometrico particolare, ascrivibile ad una delle tre popolazioni studiate, quella che vive nella riserva “Lago Preola e Gorgi Tondi” a Mazara del Vallo, la cui dimensione media degli individui è minore delle altre sin qui studiate precedentemente (Fritz *et al.*, 2006).

Nei capitoli che seguono verranno trattate singolarmente le analisi morfologiche e morfometriche, l’analisi della presenza e l’effetto dei lantanidi nei tessuti delle testuggini per caratterizzare la specie oggetto di studio ed in ultimo le analisi genetiche. In conclusione saranno trattate le possibili connessioni tra i risultati riscontrati.

2-INQUADRAMENTO TASSONOMICO E DISTRIBUZIONE

2.1. Filogenesi

Conoscere la filogenesi (ovvero lo studio della storia evolutiva di una specie) delle tartarughe è indispensabile per tentare di comprenderne il successo biologico che queste hanno avuto nel corso di milioni di anni (Fig. 2). E' importante prima di tutto capire come mai alla fine del mesozoico, le testuggini non si estinsero a dispetto di tantissimi ordini di rettili; le tartarughe sembrano aver superato indenni quell'evento, pur avendo conservato caratteristiche anatomiche e biologiche primordiali. In effetti, l'ordine dei Cheloni, è uno dei più antichi tra i rettili: le prime forme fossili risalgono al Permiano ovvero a 280 milioni di anni fa. Dall'ordine dei **Cotilosauri** si andarono differenziando le varie linee evolutive di rettili, compresa quella che porterà alle tartarughe. Di abitudini primitive terrestri, queste si evolsero in una moltitudine di forme sia acquatiche sia palustri: tutte sono raggruppate nel sottordine **Amphichelydia**, estinto in tempi recenti (nel Pleistocene), ma dal quale si originarono gli odierni **Criptodiri** ovvero quelle specie che ripiegano il collo ad S secondo un piano verticale tenendo il capo rivolto sempre in avanti e **Pleurodiri**, più primitivi, che ripiegano il collo ad S secondo un piano orizzontale portando il capo su un lato.

Molto di questo successo pare sia dovuto all'acquisizione del caratteristico guscio, presente fin dai primordi della loro evoluzione, anche se in parte modificato nelle famiglie attuali. Con questa protezione essi potevano resistere agli attacchi degli innumerevoli predatori. In più, la mancanza di specializzazione nella dieta, permise loro di espandersi in tutti gli ambienti disponibili adattandosi ai diversi climi; con ciò la maggior parte delle famiglie ebbe la possibilità di superare le drammatiche conseguenze climatiche e ambientali derivate dal frazionamento degli attuali continenti. I primi cheloni erano sicuramente terrestri, poi prevalsero le forme palustri e quelle semiacquatiche.

Quella degli Emididae è una delle famiglie di maggior successo evolutivo tra tutti i cheloni.

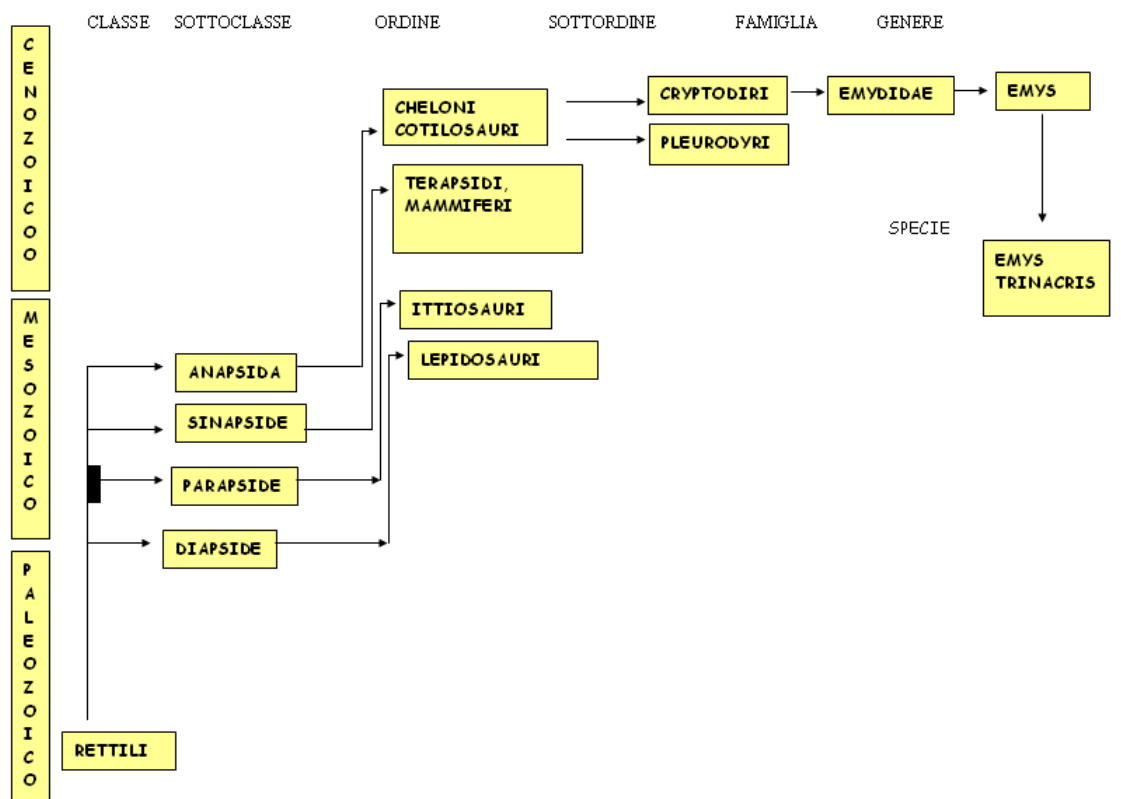


Figura 2- Linea evolutiva della testuggine *Emys trinacris*

2.2. Status tassonomico

Gli Emididi costituiscono la famiglia più numerosa tra le 246 specie dell'ordine dei Cheloni (Iverson, 1991). In Italia la testuggine palustre siciliana è l'unico *emidide* esistente assieme alla testuggine palustre europea e presenta un areale limitato al solo territorio siciliano.

La testuggine palustre siciliana può essere sistematicamente inquadrata così:

Classe	Rettili
Ordine	Testudinati
Sottordine	Criptodiri
Famiglia	Emididi
Genere	<i>Emys</i>
Specie	<i>E. trinacris</i>

Le caratteristiche che distinguono il genere *Emys* sono taglia, proporzioni del guscio, pattern e colorazione del piastrone, del carapace, colorazione delle parti molli e colorazione

dell'iride nei maschi. Mentre in passato la distinzione delle varie sottospecie si basava solo su differenze morfometriche, oggi queste sono supportate e confortate da studi genetici.

2.3. Descrizione della specie

Gli esemplari appartenenti alla specie *Emys trinacris* presentano arti abbastanza corti, caratterizzati da cinque dita e da una palmatura interdigitale molto più sviluppata in quelli posteriori.

Il capo è ovoidale e presenta poche e larghe squame, di colore scuro e più o meno punteggiate di giallo, che terminano nella zona occipitale e continuano nel collo con un'epidermide nuda sino all'attacco dello scudo dermico; questo è privo d'increspature o rilievi, ed è ben sviluppato, in modo che l'animale possa ritirare completamente il capo, la coda e gli arti. La colorazione è prevalentemente verde scura, con un disegno raggiato o puntinato con le varianti dettagliatamente descritte in seguito.

2.4. Distribuzione Geografica

Nonostante la scarsità di dati a riguardo, la testuggine palustre siciliana sembra essere ancora presente in varie zone umide dell'isola, anche se come riscontro, abbiamo soltanto dati riferibili a sporadici ritrovamenti di esemplari o a presenze storiche che non trovano però conferma in studi e rilievi troppo recenti (Atlante della Biodiversità della Sicilia, 2008).

Sembra, a nostro avviso, che per sfuggire allo sfruttamento agricolo e alla distruzione degli habitat che storicamente colonizzava, la testuggine palustre siciliana si sia rifugiata nelle fiumare che ancora sopravvivono tra i campi coltivati, nei piccoli laghetti di campagna, negli invasi artificiali, nelle cave allagate, ma sempre in condizioni di estrema precarietà, considerata anche la qualità delle acque di questi invasi.

La testuggine palustre siciliana non è presente nelle isole minori, ha una distribuzione tipica delle specie endemiche e come tale è enormemente minacciata (Fig. 3).

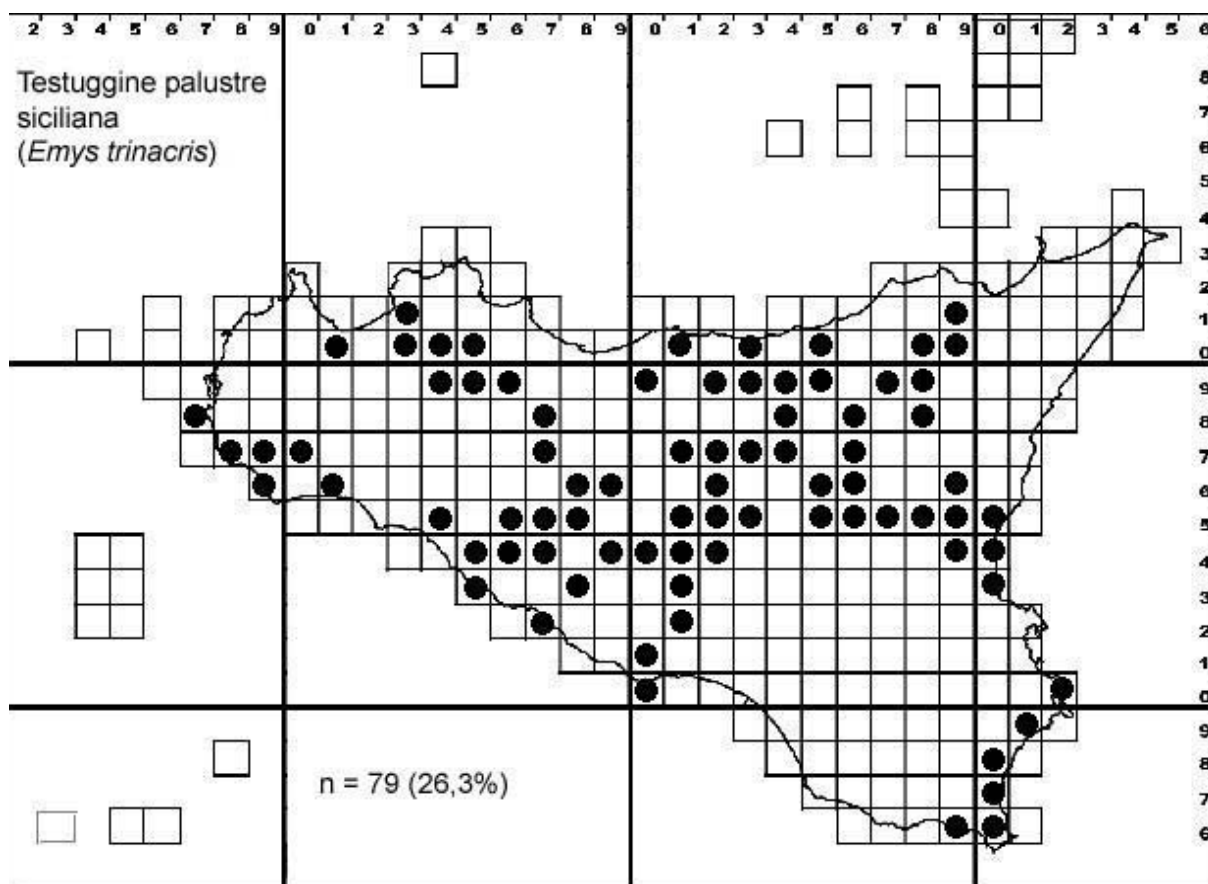


Figura 3 - Attuali conoscenze sulla distribuzione della specie in Sicilia.

Atlante della Biodiversità in Sicilia

3-AREE DI STUDIO

Le tre popolazioni oggetto di studio vivono in siti diversi tra loro sia per ubicazione sia per caratteristiche proprie dello stesso.



Figura 4 – Cartina della Sicilia con evidenziati i siti di campionamento

La prima popolazione colonizza le tranquille e ferme acque di un piccolo laghetto di origine carsica, dalle acque salmastre, che rientra in un sistema di 5 bacini lacustri protetti dal vincolo di riserva naturale integrale della Regione Siciliana. Situato nel territorio di Mazara del Vallo, il “Gorgo basso”, ha una profondità di circa dieci metri per due ettari di superficie (Fig. 5). Il laghetto è circondato da una fitta fascia di vegetazione tipica delle zone umide e da un bosco maturo misto di querce. Il lago, insieme agli altri bacini, dal 1999 è protetto dal vincolo di Riserva Naturale Integrale, apposto dalla Regione Sicilia. La riserva naturale “Lago Preola e Gorgi tondi” è gestita in convenzione dal WWF Italia che, nel corso di questi 13 anni di gestione, ha notevolmente contribuito ad abbassare il grado di antropizzazione dell’area, per es. con l’acquisizione di terreni coltivati limitrofi ai laghi. Purtroppo, una delle conseguenze di questa azione si è tradotta in un impoverimento delle aree pervie che venivano utilizzate, seppur in contrasto con l’attività agricola, per la deposizione delle uova. L’Ente Gestore, perfettamente a conoscenza di questo problema ha intrapreso tutte le azioni necessarie ad assicurare che una grossa porzione di terreni limitrofi agli specchi lacustri siano siti idonei alla riproduzione. Di contro l’abbattimento drastico dell’utilizzo di fitofarmaci per l’attività agricola e di diserbanti dovrebbe nel tempo favorire il miglioramento della qualità delle acque.



Figura 5– Gorgo basso (Mazara del Vallo)

Il secondo sito si trova nelle campagne di “Gallitello” frazione del territorio agreste del Comune di Calatafimi-Segesta in provincia di Trapani (Figg. 6 e 7). E’ un piccolo invaso artificiale di proprietà privata, di acqua dolce, pieno quasi tutto l’anno, anche se con forti oscillazioni di livello, dovute al prelievo idrico a scopo irriguo durante il periodo estivo. Il laghetto, nel corso del tempo si è naturalizzato grazie alla crescita, lungo le sue sponde, di vegetazione ripariale. La vicinanza con l’autostrada Palermo-Mazara e l’essere incastonato in un territorio fortemente antropizzato e sfruttato sotto il profilo agricolo, caratterizza diversamente dalla prima, questo secondo sito. Nelle immediate vicinanze dell’invaso artificiale, insistono coltivazioni intensive di angurie, con relativa pacciamatura del terreno ed uso massiccio di prodotti per l’agricoltura. Nel corso di questi anni di studio, si è assistito ad un continuo cambiamento delle condizioni generali dell’invaso. All’inizio del nostro studio appariva con un elevato livello di acqua e una ottima fascia di vegetazione riparia, tanto da accogliere nidificazioni di alcune specie abbastanza comuni di uccelli, ma negli anni si è assistito ad un continuo abbassamento del livello di acqua. Nell’ultimo anno in particolare, la destinazione dell’area immediatamente vicina al lago a svincolo autostradale, ha previsto lavori di spianamento della vegetazione su un lato dell’invaso, livellamento dello stesso e scarico di materiali sulle sponde per permettere la sosta e la manovra di mezzi pesanti.

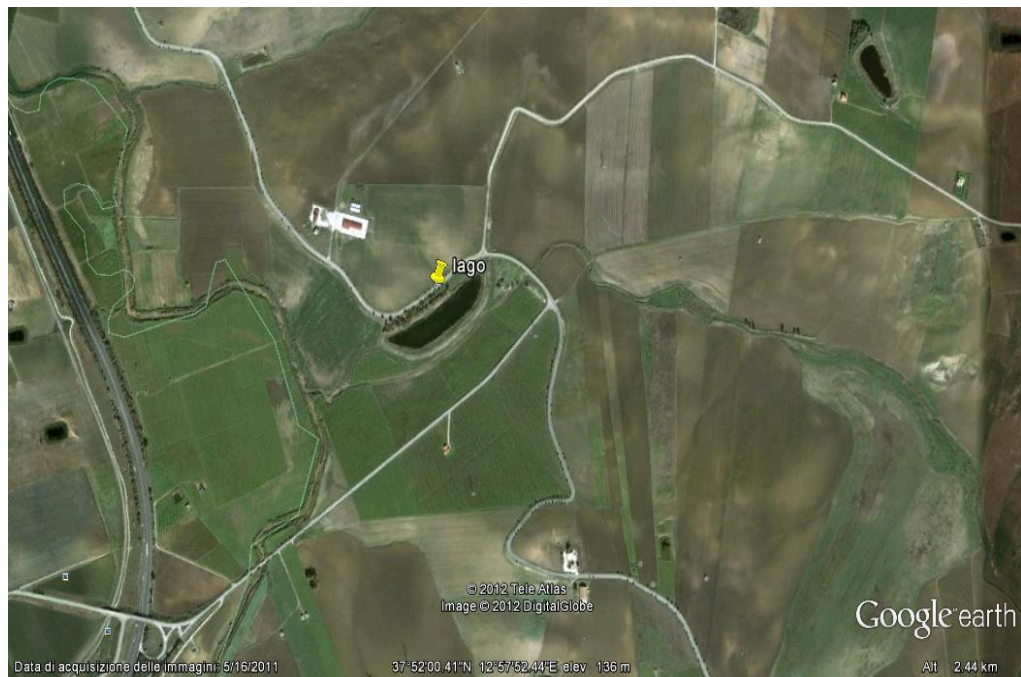


Figura 6 – Laghetto di Gallitello



Figura 7 – Laghetto di Gallitello

La terza popolazione studiata, colonizza un torrente di acqua salmastra sito in Sicilia orientale, nel territorio di Siculiana in provincia di Agrigento (Fig. 8). Il torrente, a carattere stagionale, nel suo tratto finale, prima di giungere al mare, attraversa l'area protetta regionale di "Torre Salsa" nel comune di Siculiana. Nonostante la presenza del vincolo a protezione del sito, il torrente è fortemente inquinato dagli scarichi urbani del vicino comune di Montallegro. Quasi tutti gli esemplari catturati mostrano importanti lesioni ai tessuti molli e cheratinosi (ranfoteca e unghie) e un'alta mortalità (Fig. 9); molti degli esemplari catturati che manifestavano segni di sofferenza sono morti di lì a poco. La scelta di questa popolazione, già indagata per alcuni aspetti in passato, nasce proprio dall'esigenza di trovare la causa del malessere diffuso della popolazione, seppur ad oggi tra quelle studiate, la meglio strutturata per dimensione ed età.



Figura 8 – Siculiana-foce



Figura 9 – Lesioni del piastrone

4-BIOLOGIA E MORFOMETRIA

4.1. Introduzione

Nonostante da alcuni anni l'attenzione del mondo scientifico su questa specie sia finalmente aumentato, sono ancora poche le informazioni disponibili e purtroppo ancora troppo limitate ad alcune aree in particolare. La conoscenza della biologia e dell'ecologia della specie è alla base della conservazione della stessa. I dati di cui oggi si dispone, relativi a precedenti studi sulle popolazioni di Siculiana e Mazara, mostrano evidenti differenze tra le popolazioni studiate, soprattutto a livello morfometrico (Fritz *et al.* 2006b). Da studi precedenti, oltre al presente, la popolazione di Siculiana è risultata significativamente più grande rispetto a quella di Mazara. Il confronto con la terza popolazione, quella di Gallitello (Calatafimi-Segesta) ci ha dato ulteriori importanti informazioni sulle reali dimensioni medie della specie in Sicilia.

4.2. Materiali e Metodi

La cattura delle Testuggini, per il carattere elusivo della specie e per la sua innata diffidenza, presuppone una costanza ed uno sforzo non indifferente, anche a causa dei lunghi periodi in cui spesso si verifica una totale assenza di catture. A Mazara e Gallitello, queste ultime, sono state effettuate con l'ausilio di nasse artigianali (a doppia e a singola entrata) caricate ogni due giorni con esche tipo fegato, mangime per gatti, pesce etc, piazzate e mimetizzate lungo le sponde dei laghi (Fig. 10). Lungo il torrente Salso, a Siculiana (AG), considerato il basso livello dell'acqua durante la maggior parte dell'anno, si è adottata la tecnica della cattura a mano, attività che presuppone il percorrere il fiume non senza difficoltà, ma soprattutto velocità e abilità nello scorgere e bloccare le testuggini (Fig. 11). Le trappole, poste in numero diverso nelle diverse località scelte all'interno delle aree di studio, sono state controllate in media settimanalmente. Sono state inoltre rimosse, data l'assenza di attività delle testuggini, tra Dicembre e Febbraio per essere poi ricollocate nuovamente da Marzo a Novembre di ciascun anno.



Figura 10 - Nasse artigianali



Figura 11 – Campionamento nel fiume

Su ogni testuggine catturata, per singola popolazione, sono state realizzate piccole incisioni a combinazione sulle piastre marginali (Stubbs *et al.*, 1984; Cagle, 1939; Servan *et*

al., 1986), che consentono di identificare univocamente ogni singolo individuo, anche a lungo termine (Fig. 12).



Figura 12- Incisioni di riconoscimento

Per ogni individuo catturato, quando possibile, è stato determinato il sesso sulla base delle caratteristiche morfologiche (Lanza, 1983) e/o sulla base di caratteri biometrici come riportato in Zuffi e Gariboldi (1995a). Gli stessi autori ritengono che, individui con una lunghezza del carapace inferiore a 9,9 cm non siano sessualmente determinabili, che siano da considerare maschi gli individui con piastrone concavo e con valore di lunghezza della coda superiore a metà del valore della lunghezza del carapace (Fig. 13A); femmine, gli esemplari con piastrone piatto e con valore di lunghezza della coda inferiore o uguale alla metà del valore della lunghezza del carapace (Fig. 13B).



Figura 13 – Esempari adulti di *Emys trinacris*: A) Femmina; B) Maschio

Su ogni individuo sono stati rilevati 26 parametri biometrici (Tab. 1; Fig. 14)

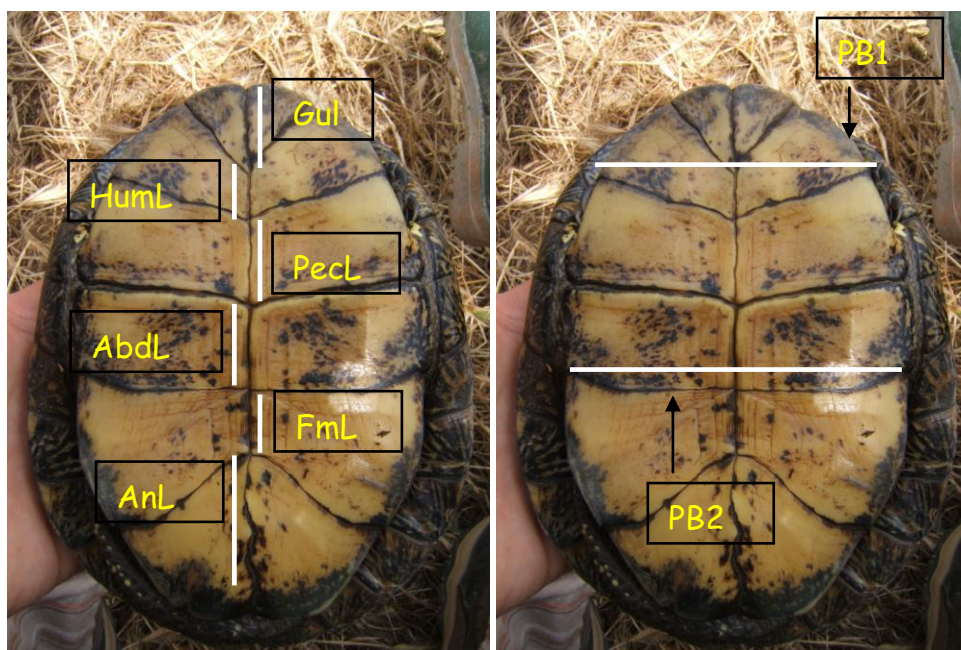


Figura 14 - Misure rilevate sul piastrone

Per la caratterizzazione morfometrica, su ogni individuo, sono stati rilevati 26 parametri biometrici (Tab.1). Per le misurazioni è stato utilizzato un calibro digitale con precisione al decimo di millimetro (Fig.15) ed una bilancia con lettura al grammo (Fig.16).

Tabella 1 - Parametri biometrici misurati utilizzati per la caratterizzazione morfometrica

Lungh. minima carapace (mm)	Distanza minima tra scudo nucale e sopracaudale
CL Lunghezza massima carapace (mm)	Distanza massima tra 1° placca marginale e 12° placca marginale
CB Larghezza carapace (mm)	Distanza tra i bordi laterali del carapace passando dal settimo o ottavo marginale fino al lato opposto
SCB N° Placca largh. (mm)	N° della placca marginale nella quale viene effettuata la misura della larghezza massima del carapace
Divergenza caudale posteriore (mm)	Distanza tra margini esterni delle placche caudali del carapace

SH Altezza carapace (mm)	Distanza tra punto di massima altezza del carapace e il corrispondente punto sul piastrone lungo una linea retta immaginaria
SPH N° placca alt. (mm)	N° placca dorsale dello scudo nel quale viene misurata altezza massima
Lunghezza minima piastrone	Distanza minima tra concavità anteriori delle piastre gulari e caudali del piastrone
Lunghezza massima piastrone	Distanza massima tra le gulari e le caudali
Larghezza piastrone (mm)	Larghezza del piastrone, calcolata lungo la sutura che separa gli scudi pettorali e addominali
Gul (mm)	1° sutura piastrone
HumL (mm)	2° sutura piastrone
PecL (mm)	3° sutura piastrone
AbdL (mm)	4° sutura piastrone
FemL (mm)	5° sutura piastrone
AnL (mm)	6° sutura piastrone
PB1 (mm)	Lunghezza sutura compresa tra piastre interomeroale e piastre interpettorali
PB2 (mm)	Lunghezza sutura compresa tra piastre interaddominali e piastre interfemorale
NuL (mm)	Lunghezza placca nucale
NuB (mm)	Larghezza placca nucale
BW Largh. Ponte (mm)	Ampiezza della sutura laterale tra piastrone e carapace
TL Lunghezza coda (mm)	Distanza tra la base della coda e la punta della stessa
DTC (mm)	Distanza tra la cloaca e l'apice della coda
Circonferenza minima (mm)	Circonferenza secondo l'asse minore mediano del carapace
Circonferenza massima (mm)	Circonferenza secondo l'asse maggiore del carapace
Peso (gr)	Peso in grammi



Figura 15 – Rilevamento larghezza piastrone



Figura 16 - Rilevamento del peso

Per stimare l'età degli individui adulti catturati non è stato possibile utilizzare il metodo della conta degli anelli di crescita che dovrebbero essere presenti sugli scudi pettorali ed addominali del piastrone (Graham, 1979; Zugg, 1991) e sul carapace, in quanto non leggibili e non affidabili.

E' stato realizzato con *microsoft Access* un archivio fotografico con immagini del piastrone e del carapace e le misure di tutti gli individui catturati (Fig.17); sono stati registrati, insieme ad ulteriori dati identificativi propri dell'individuo: amputazioni, escoriazioni, cicatrici. La catalogazione dei piastroni e del carapace di tutti gli individui catturati, ci ha permesso di caratterizzarne il modello in tre tipologie principali sia per carapace che per piastrone.

Scheda Emys trinacris

Rilevatori: giov stef
 Data: domenica 8 maggio 2006
 Sesso: M
 Età: Adulto
 Tacche Dx: 42 Tacche Sx: 412
 Descrizione: verde- distal

Lungh car. min: 144,36 Lungh piastrone: 65,87 NuL: 6,1
 CL: 145,63 GuL: 22,01 NuB: 3,8
 Lungh Carapax: HumL: 8,9 Lungh ponte: 32,2
 CB: 108,00 Pecl: 20,6 Div caud sup: 33,02
 SCB: 9 AbAl: 16,6 Lungh coda: 80,6
 Alt. carapace: 44,79 FemL: 13,6 Cloaca/apice: 61,1
 SPH: 3 AnL: 32,3 Base Coda: Carapace:
 Lungh piastr. min: 122 PB1: 63,6 Circonf min: 26 Peso: 459
 Lungh piastr. max: 127,77 PB2: 75,8 Circonf max: 35 Colore: giallo

Sottomaschera Codice2

ID Emys	Data	Ora	Modalità	Postazione	Peso	Lungh min car	Lung max car	Lagh carap	n placca	Diver cau	altezza	num plac
18	08-apr-05		Cattura	Siciliana Fiu	497	142,6		108,6		29,6	52,1	
*												

Figura 17 – Scheda tecnica morfologica e morfometrica di *Emys trinacris*

I dati raccolti sono stati utilizzati per il calcolo di parametri di statistica descrittiva, mentre per analizzare la differenza biometrica tra i sessi è stata utilizzata la statistica univariata (t-test) (Statistica 8). L'analisi è stata effettuata su 114 individui dei 180 catturati a causa del fatto che, in alcuni di loro, per la mancanza di porzioni di guscio, non erano rilevabili tutte le variabili prese in considerazione.

4.2.1. Colorazione e pattern

Colorazione carapace

Le Testuggini palustri siciliane studiate, presentano 3 tipologie principali di colorazione del carapace:

A- colorazione primaria marrone tendente al nocciola. Questa morfologia, chiamata *maculosa* (Fritz, 1992), è spesso frequente in numerose sottospecie di *Emys orbicularis* del sud, tra le quali *Emys galloitalica* (Fritz, 1995; Fritz *et al.*, 2005) (Fig.18 A).

B- colorazione primaria scura. Talvolta su questo colore di base può essere presente un pattern radiato di puntini gialli e righe, chiamata morfotipo *orbicularis* (Fig18 B).

C- colorazione intermedia tra la prima e la seconda (Fig.18 C).

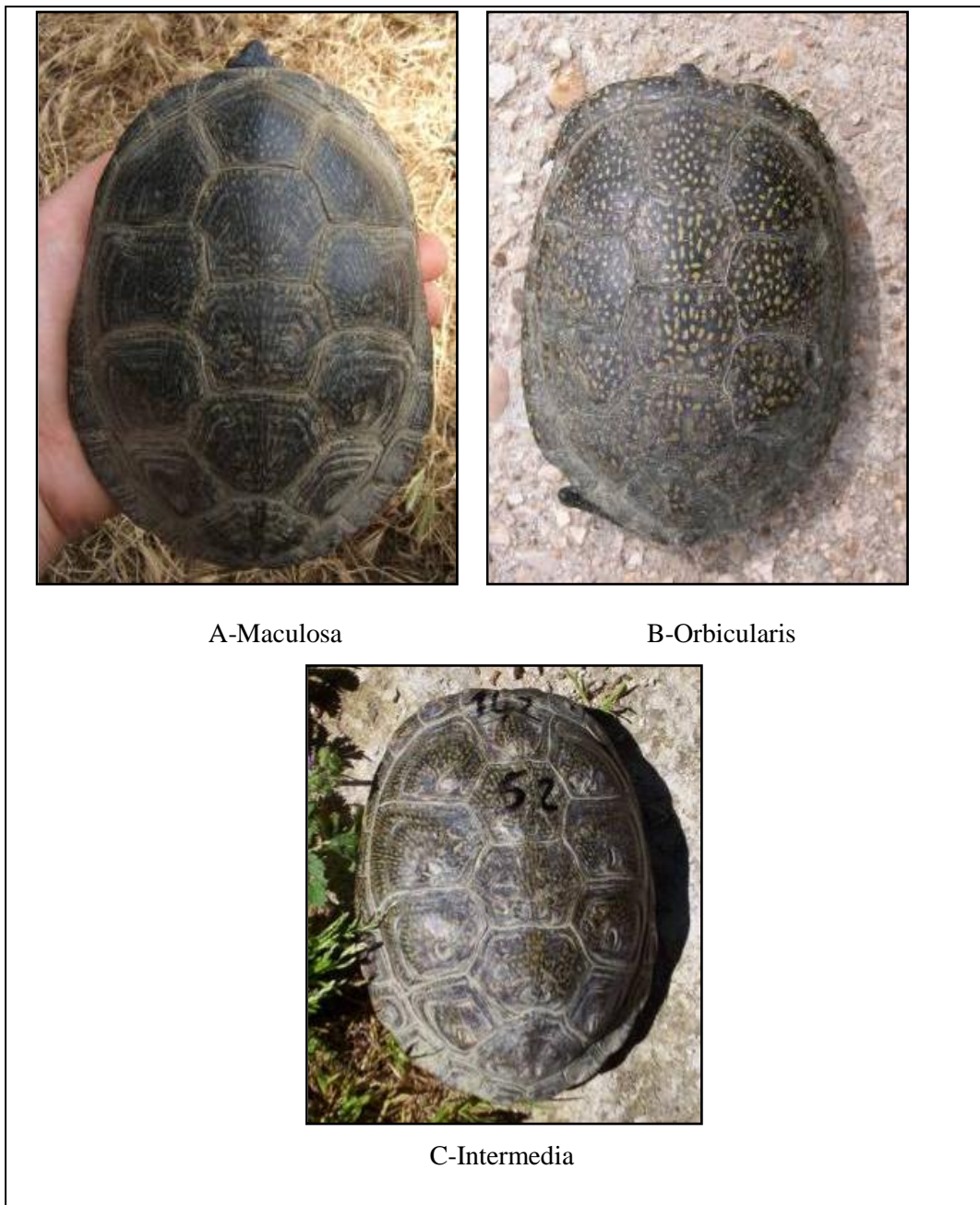


Figure 18 A, B, C - Colorazioni del carapace testuggine palustre siciliana

Colorazione del piastrone

Possiamo evidenziare la presenza di tre tipologie di colorazione del piastrone:

A- piastrone totalmente giallo (Fig. 19 A).

B- piastrone giallo con due piccole aree scure poste sui margini esterni (Distal bloches) (Fig 19 B).

C- colorazione irregolare scura per più di 1/3 del piastrone (Fig.19 C).

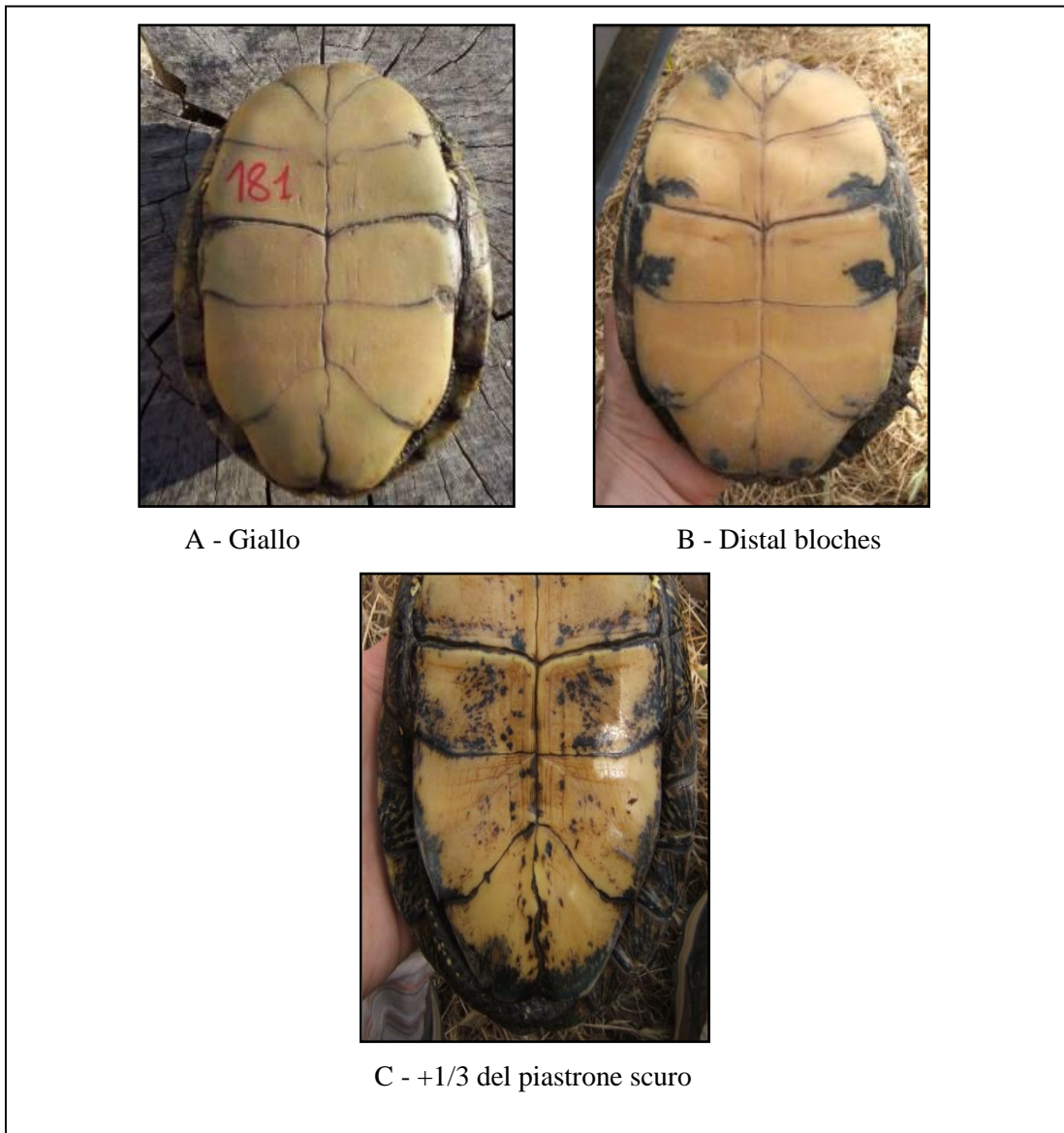


Figure - 19 A B C, colorazione del piastrone

Pattern dei neonati

I neonati di Testuggine palustre siciliana hanno tutti un carapace con colorazione uniformemente tendente al marrone/verde talvolta con chiazze nere molto piccole (Figg. 20 - 21). La punta degli scudi marginali è leggermente più chiara.



Figura 20 – Giovani esemplari catturati e marcati con smalto colorato



Figura 21 - Giovani esemplari

La colorazione del piastrone invece, mostra marcate differenze rispetto ai neonati di testuggine palustre europea e permette la determinazione immediata della specie (Fritz *et al.*, 2006). In alcuni piccoli il piastrone è completamente giallo. Quando una macchia scura è presente, questa è piccola e limitata alla parte centrale o alla parte più caudale.



Figura 22 - Piastroni di neonato di *E. trinacris* e di *E.o. hellenica* (Fritz *et al.*, 2006)

Colorazione dell'iride

Dall'analisi delle colorazioni dell'iride risulta che, nelle popolazioni oggetto di studio, sono presenti due colorazioni predominanti: giallo ed arancione. Le frequenze relative nella colorazione dell'iride mostrano come il giallo sia la colorazione più frequente con valori percentuali differenti tra i sessi. Nei maschi invece la colorazione arancio è spesso tendente al rosso (reddish). Questo dato è una segnalazione rara per il bacino a sud ovest del mediterraneo (Fig. 23). In zone più occidentali del mediterraneo, l'iride rossa era già stata rilevata ma il dato venne interpretato inizialmente come ibrido (Fritz, 2003). Inoltre si può notare che la pupilla di molte testuggini palustri siciliane mostra al centro una stella scura a 5 punte (Fig. 24), un pattern molto raro nelle tartarughe palustri.

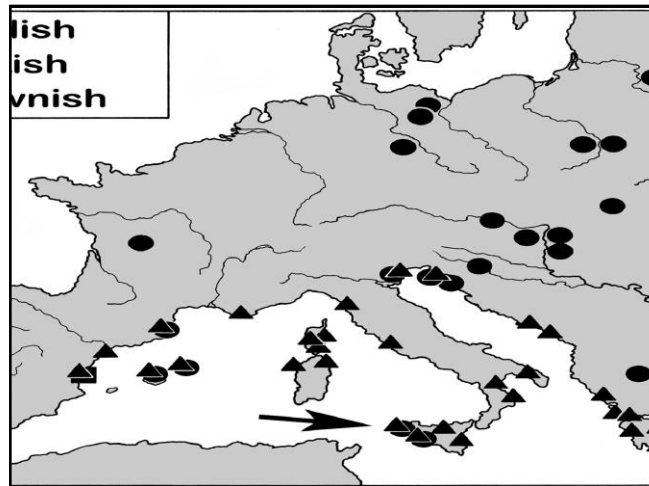


Figura 23- Distribuzione della differente colorazione dell'iride in Europa



Figura 24 - Iride reddish

4.2.2. Biologia riproduttiva

Per quanto riguarda la biologia riproduttiva, non erano note ad oggi date precise di deposizione per questa specie. Durante questa attività di ricerca è stato possibile verificarne alcune e precisamente il 15, 21, 30 giugno 2011 nel sito di Mazara. I 3 nidi erano situati ai margini di una vecchia carreggiata asfaltata, in prossimità di un bosco di *Quercus calliprinos* esposto a sud ovest, visibili solo perché predati (Figg. 25, 26) e distanti circa 50 m dal lago.



Figura 25 – Nido lungo la carreggiata



Figura 26 – Nido predato

4.2.3. Dati ambientali

Per quanto riguarda i dati ambientali, non sono stati rinvenuti dati pubblicati sui siti di campionamento ad esclusione di quelli di seguito riportati.

In particolare le precipitazioni totali annue per gli anni 2010, 2011 e 2012 (Tab. 2) e le temperature medie annuali per i medesimi anni (Tab. 3).

STAZIONE	ANNO	TOT. Annue
Mazara (TP)	2010	638 mm
Mazara (TP)	2011	561 mm
Mazara (TP)	2012	467 mm
Calatafimi (TP)	2010	674 mm
Calatafimi (TP)	2011	678 mm
Calatafimi (TP)	2012	687 mm
Mandrascava (AG)	2010	567 mm
Mandrascava (AG)	2011	560 mm
Mandrascava (AG)	2012	492 mm

Tabella 2 Precipitazioni totali annue mm Dati SIAS Sicilia

STAZIONE	ANNO	PRIMAVERA	ESTATE
Mazara (TP)	2010	18,3 °C	23,6°C
Mazara (TP)	2011	18,3°C	24°C
Mazara (TP)	2012	18,6°C	25°C
Calatafimi (TP)	2010	17,6°C	23,6°C
Calatafimi (TP)	2011	18,3°C	24°C
Calatafimi (TP)	2012	19°C	25,3°C
Mandrascava (AG)	2010	19,5°C	23,6°C
Mandrascava (AG)	2011	18,3°C	24°C
Mandrascava (AG)	2012	18,6°C	25,3°C

Tabella 3 Temperature medie stagionali Dati SIAS Sicilia

Per quanto riguarda la presenza di nitrati nelle aree di campionamento, è utile l'esistenza della carta della vulnerabilità da nitrati dell' Ass. Reg.Le Agricoltura.

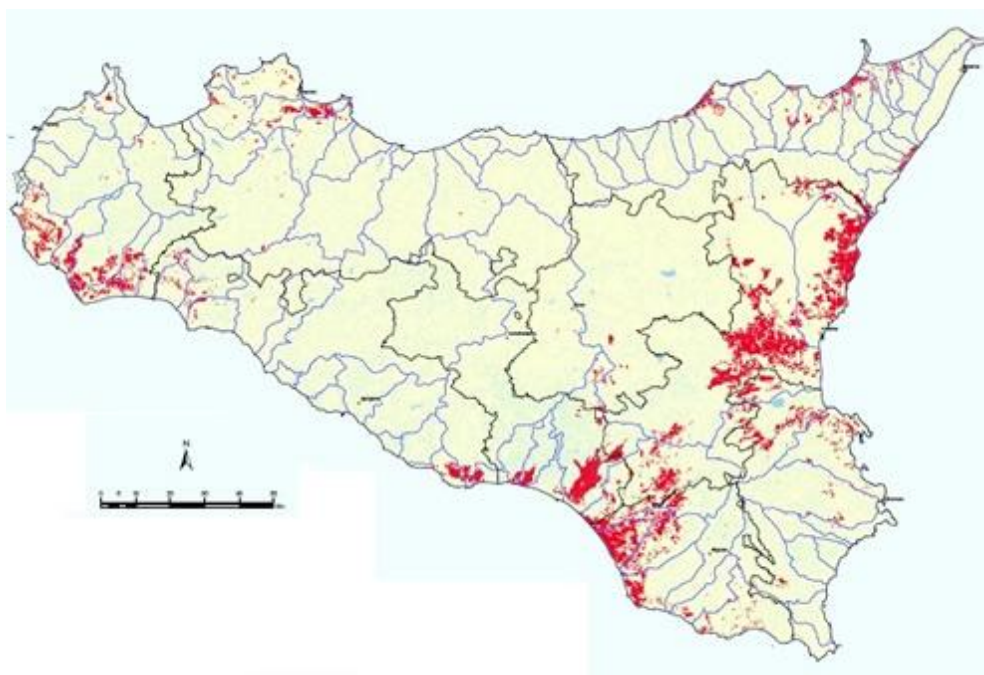


Fig. 27. Carta Regionale zone vulnerabili da nitrati di origine agricola Fonte Arta Sicilia Ass. Reg.le politiche agricole

Relativamente al solo sito dei Gorgi Tondi, abbiamo ottenuto dei dati ambientali grazie a studi condotti dall'Ente Gestore nell'anno 2012 (Tab. 4)

Valore medio mesi estivi	
TEMP acqua(°C)	25,3
SAL (mg/l)	2,13
DO %	80,02
DO mg/l	6,37
pH	8,25

Tabella 4 - Parametri chimico-fisici Gorgo Basso rilevati con sonda CTD

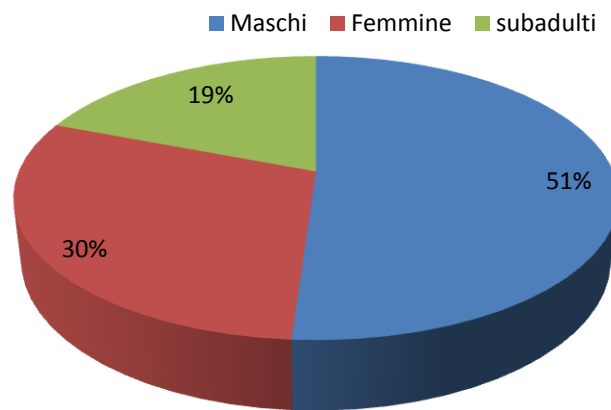
4.3. Risultati

Durante i periodi di cattura le trappole sono state controllate 32 volte a Gallitello, 45 volte a Mazara e 30 volte a Siculiana. Su 112 controlli effettuati soltanto in 86 di questi sono state registrate catture. Le catture sono state effettuate tra marzo 2010 e agosto 2012. I mesi migliori per le catture sono quelli di marzo aprile maggio. In totale sono stati catturati e marcati 97 ♂♂, 47 ♀♀ e 36 indeterminati. La Tabella 5 riporta le catture totali e i risultati del rapporto fra subadulti e giovani rispetto agli adulti.

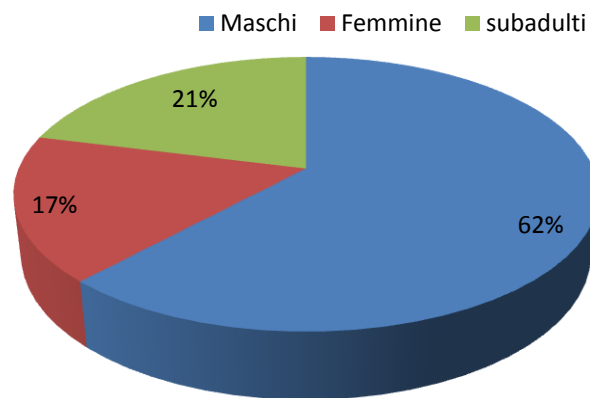
Sito	Tot catture	Maschi	Femmine	Indeterminati
Mazara	76	47	13	16
Siculiana	57	26	20	11
Gallitello	47	24	14	9

Tabella 5 - Rapporto fra adulti e giovani

Struttura popolazione Gallitello



Struttura popolazione Mazara



Struttura popolazione Siculiana

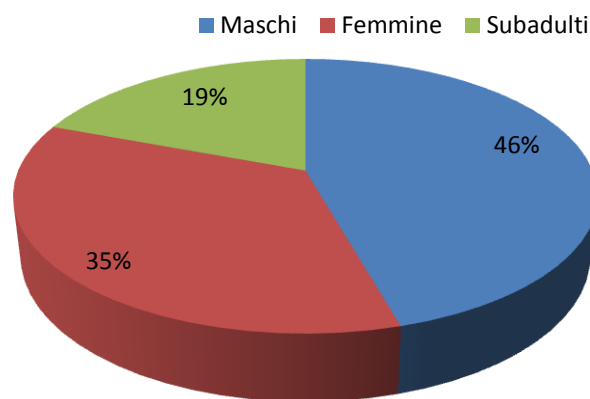


Figura 28 – Struttura di popolazione nelle diverse zone di campionamento

La *sex-ratio* per l'intero periodo di studio e per le tre popolazioni è sempre risultata in favore dei maschi (Tab. 6).

	M	F	subad-juv	subad-juv/ad	sex ratio	
Siculiana	26	20	11	19,30%	1,3 : 1	in favore dei M
Mazara	47	13	16	21,05%	3,6 : 1	in favore dei M
Gallitello	24	14	9	19,15%	1,7 : 1	in favore dei M

Tabella 6 - Sex ratio

L'analisi biometrica è stata svolta su 114 individui adulti delle tre popolazioni. Le Tabelle 6,7,8 riportano i valori medi ottenuti per le diverse variabili indagate per ogni popolazione esaminata.

	Femmine (n=12)		Maschi (n=46)		t-value	p
	Mean	Std.Dev.	Mean	Std.Dev.		
Lungh car. min	130,0	12,0	117,4	7,8	4,42	0,000
CL	131,5	12,1	118,7	7,9	4,42	0,000
Largh Carapax	102,1	7,9	93,7	6,3	3,89	0,000
Div caud sup	29,2	2,9	29,3	2,5	-0,16	0,876
Alt. carapace	51,8	5,6	43,7	4,8	5,09	0,000
Lungh piastr. min	121,4	10,4	100,7	15,3	4,43	0,000
Lungh piastr. max	124,9	10,7	106,0	8,0	6,81	0,000
Largh piastrone	74,1	7,2	63,7	5,4	5,54	0,000
GuL	26,8	16,0	19,4	2,7	3,05	0,003
HumL	10,8	3,0	8,4	2,4	2,91	0,005
PecL	19,4	2,2	14,9	1,9	7,12	0,000
AbdL	18,7	2,4	15,5	1,8	5,13	0,000
FemL	13,2	2,1	13,5	2,4	-0,30	0,765
AnL	35,4	3,3	27,7	3,1	7,54	0,000
PB1	64,9	4,8	55,7	4,7	6,06	0,000
PB2	76,6	7,0	65,0	5,4	6,18	0,000
NuL	6,6	1,4	5,9	1,3	1,75	0,086
NuB	3,1	0,8	2,6	1,0	1,69	0,096
Largh ponte	36,4	3,9	28,3	3,0	7,73	0,000
Lungh. coda	75,3	6,5	78,5	7,7	-1,31	0,195
Cloaca/apice	60,0	6,0	53,9	6,1	3,08	0,003
Circonf min	26,2	2,2	23,3	1,4	5,58	0,000
Circonf max	31,8	2,9	28,5	1,9	4,86	0,000

	Femmine (n=12)		Maschi (n=46)		t-value	p
	Mean	Std.Dev.	Mean	Std.Dev.		
Peso	387,5	88,7	271,7	54,8	5,68	0,000

Tabella 7 - Dati biometrici del campione di *Emys trinacris* di Mazara e valori di significatività statistica (t-test) nel confronto tra i sessi

	Femmine (n=6)		Maschi (n=19)		t-value	P
	Mean	Std.Dev.	Mean	Std.Dev.		
Lungh carapace	141,3	8,1	127,2	12,4	2,60	0,016
CL	143,0	7,9	128,6	12,6	2,62	0,015
Largh Carapax	96,6	42,0	99,9	10,1	-0,33	0,746
altezza carapace	55,3	6,8	45,1	2,7	5,50	0,000
Lungh piastrone min	133,3	4,3	112,0	11,3	4,45	0,000
Lungh piastrone max	136,9	4,5	115,9	11,4	4,37	0,000
Largh piastrone	87,0	3,1	71,5	7,3	5,00	0,000
GuL	24,8	1,3	21,1	2,7	3,25	0,004
H um L	9,0	1,3	9,8	2,7	-0,70	0,489
Pec L	23,5	1,8	17,4	2,7	5,12	0,000
Abd L	19,6	2,5	16,0	2,2	3,34	0,003
FemL	16,1	2,6	14,6	4,6	0,78	0,444
An L	37,1	2,2	32,7	9,1	1,16	0,259
PB1	73,0	3,6	61,3	6,5	4,14	0,000
PB2	86,2	3,6	71,2	6,7	5,22	0,000
NuL	8,4	1,2	7,1	1,6	1,90	0,071
NuB	3,5	1,1	3,3	1,0	0,46	0,652
Largh ponte	39,0	2,7	30,2	3,2	6,13	0,000
Ltcoda	74,4	7,4	77,7	11,8	-0,65	0,521
Cloaca/apice	58,9	7,2	51,1	8,2	2,09	0,048
circonf min	28,4	1,6	24,7	2,3	3,73	0,001
circonf max	35,3	1,9	30,9	2,9	3,20	0,004
Peso	556,3	124,8	348,2	93,1	4,41	0,000

Tabella 8 - Dati biometrici del campione di *Emys trinacris* di Gallitello e valori di significatività statistica (t-test) nel confronto tra i sessi.

	Femmine (n=9)		Maschi (n=22)		t-value	P
	Mean	Std.Dev.	Mean	Std.Dev.		
Lungh car. min	132,4	19,0	131,2	7,3	0,27	0,786
CL	134,2	18,3	132,3	6,9	0,42	0,675

	Femmine (n=9)		Maschi (n=22)		t-value	P
	Mean	Std.Dev.	Mean	Std.Dev.		
Largh Carapax	102,2	9,1	101,6	5,6	0,21	0,838
Div caud sup	30,8	4,4	31,4	3,2	-0,47	0,644
Alt. carapace	53,8	10,3	47,8	4,4	2,30	0,029
Lungh piastr. min	125,6	17,4	111,2	22,9	1,70	0,100
Lungh piastr. max	129,5	17,1	118,6	5,3	2,73	0,011
Largh piastrone	76,6	10,5	73,2	6,0	1,16	0,256
GuL	25,4	3,7	21,5	1,4	4,38	0,000
HumL	10,6	2,3	9,7	1,8	1,16	0,255
PecL	20,2	3,1	17,1	2,5	2,94	0,006
AbdL	20,2	3,3	16,5	2,4	3,51	0,001
FemL	15,4	3,0	14,6	3,4	0,64	0,528
AnL	36,3	4,6	30,6	3,2	3,99	0,000
PB1	68,4	8,4	60,9	4,5	3,21	0,003
PB2	79,1	10,1	70,4	5,6	3,06	0,005
NuL	7,8	1,0	7,1	1,3	1,38	0,178
NuB	4,7	1,3	3,4	0,9	3,23	0,003
Largh ponte	35,5	6,0	29,5	2,4	4,01	0,000
Lungh. coda	75,7	10,1	78,0	13,0	-0,47	0,642
Cloaca/apice	59,8	6,0	54,1	7,6	2,00	0,054
Circonf min	26,6	3,0	24,8	2,1	1,83	0,078
Circonf max	32,7	4,9	31,1	2,8	1,13	0,269
Peso	435,1	155,6	332,4	71,2	2,55	0,016

Per quanto concerne l'analisi biometrica, il t-test ha mostrato differenze statisticamente significative nei valori medi tra i due sessi per 19 delle variabili considerate ($p < 0,05$) e i maschi risultano significativamente più piccoli rispetto alle femmine.

Ancora una volta la dimensione media della popolazione di Mazara del Vallo, se confrontata con le altre due, mostra valori minori.

La Tabella 9 riporta i valori di significatività (p) nel confronto tra sessi nelle tre differenti località esaminate.

	Siculiana	Mazara	Gallitello
Lungh car. min	<u>0,016</u>	<u>0,000</u>	0,786
CL	<u>0,015</u>	<u>0,000</u>	0,675
Largh Carapax	0,746	<u>0,000</u>	0,838
Div caud sup	0,727	0,876	0,644
Alt. carapace	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,029</u>
Lungh piastr. min	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,100
Lungh piastr. max	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,011</u>
Largh piastrone	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,256
GuL	<u>0,004</u>	<u>0,003</u>	<u>0,000</u>
HumL	0,489	<u>0,005</u>	0,255
PecL	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,006</u>
AbdL	<u>0,003</u>	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>
FemL	0,444	0,765	0,528
AnL	0,259	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
PB1	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,003</u>
PB2	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,005</u>
NuL	0,071	0,086	0,178
NuB	0,652	0,096	<u>0,003</u>
Largh ponte	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
Lungh. coda	0,521	0,195	0,642
Cloaca/apice	<u>0,048</u>	<u>0,003</u>	0,054
Circonf min	<u>0,001</u>	<u>0,000</u>	0,078
Circonf max	<u>0,004</u>	<u>0,000</u>	0,269
Peso	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,016</u>

Tabella 9 – Valori di significatività nel confronto fra i sessi in tre popolazioni di *Emys trinacris*

L'analisi dei valori di significatività mostra che in 9 variabili sono risultate differenze statisticamente significative per tutte e tre le popolazioni e che tra queste variabili solamente la larghezza del ponte possiede valori di significatività (p) non superiori a 0,000 in tutte e tre

le popolazioni, dimostrando di essere probabilmente fra le più importanti caratteristiche di discriminazione sessuale.

La colorazione più frequente dell'iride è gialla nelle tre popolazioni, con una buona percentuale di arancio/marrone (brownish).

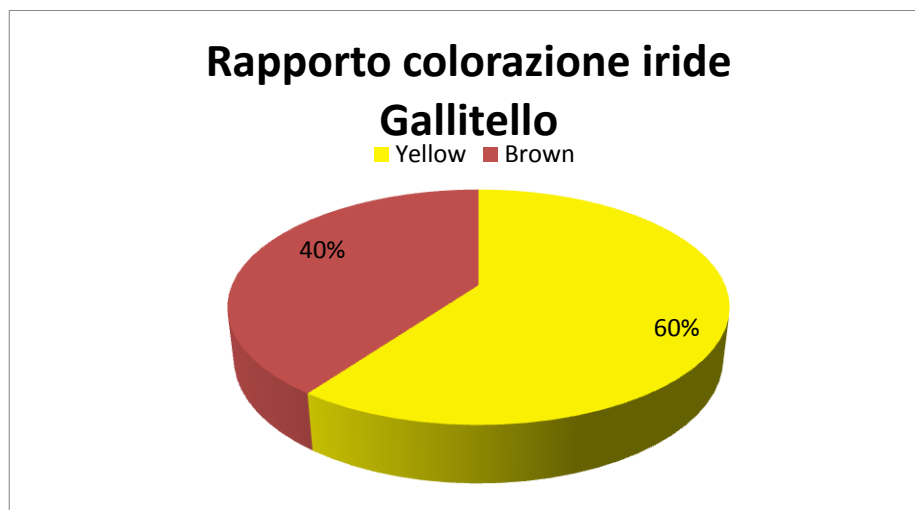


Figura 29 – Rapporto tra individui con l'iride yellow e brown a Gallitello

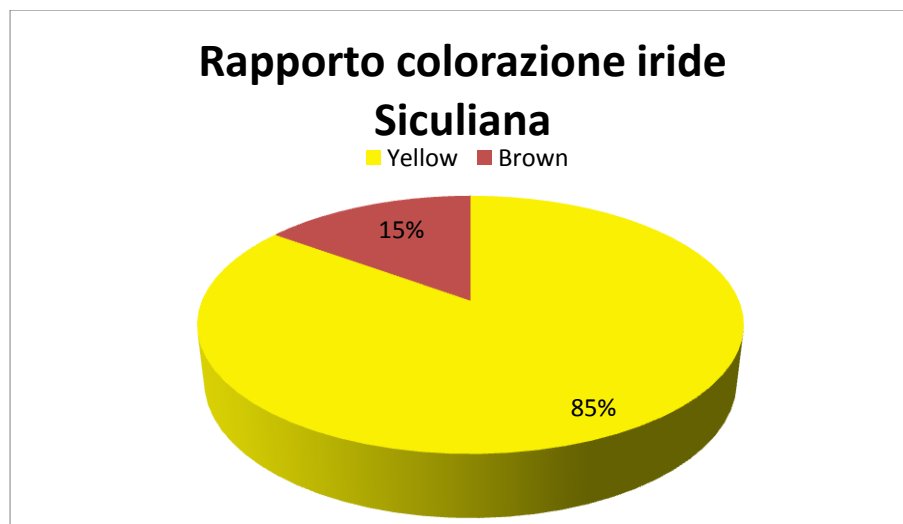


Figura 30 – Rapporto tra individui con l'iride yellow e brown a Siculiana

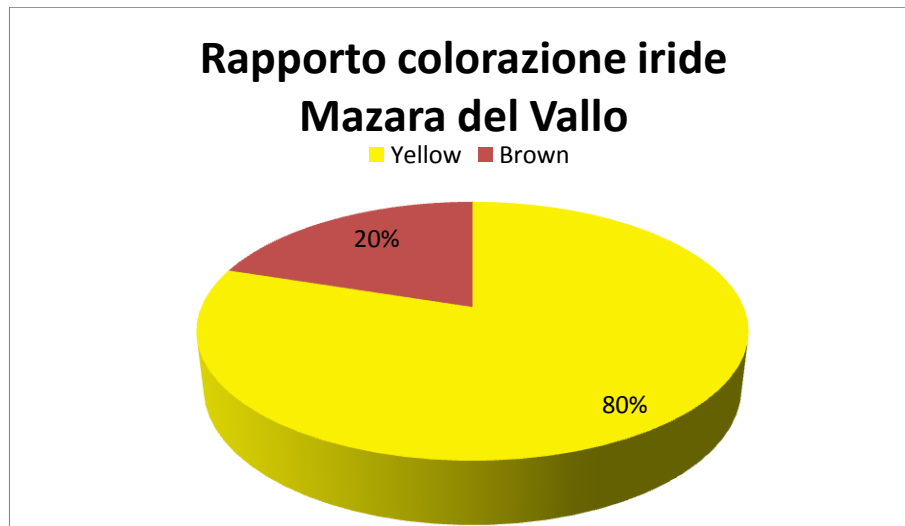


Figura 31 - Rapporto tra individui con l'iride yellow e brown a Mazara del Vallo

Le dimensioni delle covate che si sono potute osservare, variano da un minimo di 3 a Mazara ad un massimo di 9 uova (Gallitello) (Fig. 32).



Figura 32- Neonati

E' stato possibile misurare le dimensioni, ad oggi non note, di 22 uova, i cui valori sono riportati nella Tabella 10.

	Lungh	Largh	Peso
Media	31,2	19,0	7,5
d.s.	1,7	0,8	0,7
min	28,4	17,9	7
max	35,0	20,3	9

Tabella 10 – Dimensioni medie in millimetri, di uova (n=22) di *Emys trinacris*

Il peso medio delle uova di testuggine siciliane è di 7,5 gr, contro i 8,5 della *E. orbicularis* (Ottonello *et al.*, 2010).



Figura 33 - Uova di *Emys trinacris*



Figura 34 - Schiusa

Nelle tre popolazioni sono state riscontrate le tre colorazioni del carapace

<i>maculosa</i>	<i>orbicularis</i>	<i>Intermedia</i>
Gallitello 60%	Gallitello 10%	Gallitello 30%
Siculiana 20%	Siculiana 10%	Siculiana 70%
Mazara 10%	Mazara 70%	Mazara 20%

<i>giallo</i>	<i>distal bloches</i>	<i>scuro per + 1/3</i>
Gallitello 60%	Gallitello 30%	Gallitello 10%
Siculiana 70%	Siculiana 20%	Siculiana 10%
Mazara 40%	Mazara 20%	Mazara 40%

Tabella 11 - Colorazioni del carapace

4.4. Discussione

Per quanto concerne l'analisi biometrica, i maschi, così come avviene in altre popolazioni di testuggine palustre (Fritz, 1989), risultano significativamente più piccoli rispetto alle femmine.

La dimensione media della popolazione di Mazara del Vallo, se confrontata con le altre due, mostra valori minori. Considerando fattori ambientali come temperatura, piovosità e altitudine, non si registrano, come evidenziato, differenze sostanziali tra i tre siti campionati. D'altra parte, le testuggini, per il fatto di essere animali pecilotermi ed a sangue freddo, a crescita lenta, il cui stimolo ad alimentarsi è concentrato principalmente in alcuni periodi, quelli in cui appunto sono attivi, non dovrebbero essere particolarmente influenzati da questi fattori nel loro tasso di accrescimento.

Il risultato del valore del rapporto tra sessi, legato alle catture, indica che in tutti i siti campionati, esiste un forte sbilanciamento verso il sesso maschile. Questo dato si discosta notevolmente da quelli riportati per altre località dell'Italia e della Francia continentale da altri autori, che calcolano, per la congenera *orbicularis*, una sex ratio di 1:2 a favore delle femmine (Rovero *et al.*, 1996; Mazzotti, 1995) o di 1:1 (Lebboroni, 1989). Sex ratio sbilanciate a favore delle femmine sono riportate anche per altre testuggini palustri (Gibbons, 1968,1989; Bury, 1979; Vogt, 1980).

La sex-ratio, in una popolazione è un importantissimo fattore ecologico, direttamente collegato a caratteristiche quali la competizione intrasessuale o la produzione di uova annue, che influenzano la dinamica di popolazione (Girondot and Pieau, 1993).

Secondo il postulato di Fisher (1929), nel mondo animale la sex-ratio primaria ottimale dovrebbe essere di 1:1, ma numerosi studi sulle testuggini, acquatiche e terrestri, hanno messo in evidenza l'esistenza di sex-ratio sbilanciate (Forbes, 1940; Carr, 1952; Auffenberg and Iverson, 1979; Risley, 1933; Cagle, 1952; Tinkle, 1958; Moll and Legler, 1971; Voght, 1980).

Bury, in Harless e Morlock (1979), interpreta questi sbilanciamenti come derivanti da errori durante il campionamento. Girondot e Pieau (1993), affermano, d'accordo con Gibbons (1990), che esistono altri 4 fattori che, in maniera differente, possono influenzare la sex ratio in popolazioni adulte.

Questi fattori sono:

- la sex ratio primaria,
- la differente età alla maturità sessuale per maschi e femmine,
- la differente capacità di movimento tra maschi e femmine,
- la differente mortalità tra sessi.

A proposito della differente mortalità tra sessi, secondo Servan *et al.* (1989), la difficoltà nell'aver dati consiste non solo nella longevità di molte specie di tartarughe, ma anche nella mancanza di metodi sicuri nella determinazione dell'età negli adulti. Si devono ad Iverson (1991) i dati sulla sopravvivenza annuale nelle tartarughe, ma non si hanno notizie circa il differente tasso di sopravvivenza tra sessi. La media di sopravvivenza annuale è alta tra gli adulti (Girondot *et al.*, 1993) e aumenta con l'età degli animali.

Secondo Servan *et al.* (1986), gli errori di campionamento possono essere esclusi in studi a lungo termine, mentre la differenza nella migrazione tra sessi può essere considerata come un errore di campionamento.

Secondo Gibbons (1990), il fattore che influenza maggiormente la sex ratio è la differente età alla maturità sessuale e la differenza nella sopravvivenza annua è da attribuire alla diversità nel comportamento riproduttivo tra i due sessi. Diversa la conclusione a cui arrivano Girondot e Pieau (1993), dopo l'analisi dei cinque fattori considerati, ovvero che, la sex ratio, per individui con una alta sopravvivenza annuale può essere molto sensibile ad una piccola differenza nella sopravvivenza tra maschi e femmine, ma molto meno dipendente dalla differenza di età alla maturità sessuale o ad una sex ratio primaria sbilanciata.

Di altro avviso Servan *et al.* (1987) che, analizzando i 4 fattori arrivano alla conclusione che solo uno sbilanciamento della sex ratio primaria (alla nascita) può essere responsabile dello sbilanciamento della secondaria (effettiva).

Un aspetto interessante da approfondire, è l'influenza che pare avere la temperatura sullo sviluppo delle gonadi dell'embrione, con possibilità d'inversione del sesso (Bull, 1980; Raynaud and Pieau, 1985; Janzen and Paukstis, 1991; Pieau, 1974 a; 1974 b).

In particolare, uova esposte durante il periodo sensibile a temperature inferiori o superiori all'intervallo tra 27.5° C e 29.5°C determinano rispettivamente fenotipi maschili e femminili (Pieau, 1974 b; Servan *et al.*, 1989). A causa di ciò esistono sex ratio primarie sbilanciate per particolari nidi o regioni (Mrosovsky and Provanha, 1992). Nella fase di sviluppo sul terreno, la temperatura spesso subisce fluttuazioni.

Se durante il periodo sensibile per la differenziazione sessuale, la temperatura, pur subendo oscillazioni, rimane attorno ai 28,5 gradi, la sex ratio per i giovani è sbilanciata a favore dei maschi (Pieau, 1974 a; 1982). Al contrario, se la temperatura supera i 28,5 gradi, si sviluppano maschi, femmine ed intersessi. Nel primo caso l'influenza della temperatura sulla differenziazione sessuale è predominante sulla determinazione genotipica, mentre nel secondo caso le condizioni termiche permettono la fenotipica espressione del sesso in conformità con la *Genotypic Sex Determination* (GSD). Servan *et al.*, 1989).

Per quanto riguarda le popolazioni fin qui studiate in considerazione dell'altitudine e della latitudine, le temperature medie non sembrano influire sulla determinazione sessuale durante lo sviluppo embrionale, come pure il GSD. Se si esclude inoltre un'immotivata differente mortalità tra i due sessi e l'errore di campionamento legato ad un basso sforzo di cattura, si ipotizza che la causa dell'inusuale sbilanciamento della sex ratio della popolazione studiata, possa essere imputabile a fenomeni di maggiore migrazione e mobilità relativi al sesso maschile nella specie *trinacris*. L'ipotesi trova conforto in alcuni studi di radiotelemetria effettuati su due popolazioni siciliane, Siculiana e Corleone (PA) (Lo Valvo *et al.*, 2008).

Per ciò che riguarda la biologia riproduttiva, nulla si conosceva relativamente ad *Emys trinacris* e d'altra parte, le uniche informazioni relative ad *Emys orbicularis*, provengono da studi iniziati negli anni 80, riferiti alla taglia delle uova ed al loro sviluppo sotto il profilo descrittivo (Lanza, 1983) o sperimentale (Servan *et al.*, 1986). In particolare Rovero e Chelazzi (1996) hanno illustrato modelli di movimenti in femmine riproduttive e post riproduttive.

Ad ogni modo si sa ancora troppo poco sulle caratteristiche adattative ed evolutive della biologia riproduttiva degli Emididi del vecchio mondo (Iverson *et al.*, 1993). Relativamente agli studi effettuati sulla biologia riproduttiva in questa famiglia nel nuovo mondo, vi sono diverse interpretazioni tra la correlazione esistente tra *body size* e *clutch size* o *clutch mass*, data come positiva negli studi di Gibbons, 1968, 1968a, 1970, 1990). Inoltre confrontando un gran numero di specie di Emididi è emerso che esiste una correlazione negativa tra le caratteristiche riproduttive (*egg mass*, *clutch mass*, *body mass*) e la latitudine (Iverson *et al.*, 1993).

5 -PROCESSI BIOGEOCHIMICI

5.1. Introduzione

La capacità degli elementi chimici minori ed in tracce di sostituire i costituenti maggiori in una grande quantità di processi naturali, costituisce una delle cause della pericolosità che alcuni di essi possono assumere per l'ambiente e le specie in esso presenti quando possono alterare il naturale andamento dei processi biologici sostituendosi ai *nutrienti*. Tali processi, alla stregua dei fenomeni geochimici, sono molto spesso caratterizzati da equilibri di fase in cui gli elementi coinvolti subiscono forme di frazionamento nelle regioni di interfaccia. Le modalità con cui tali frazionamenti hanno luogo, ben difficilmente possono essere indagate analizzando il comportamento di elementi diversi dai lantanidi che hanno tutti la stessa configurazione elettronica esterna, essendo l'orbitale *4f* più interno all'atomo rispetto a quelli *6s* e *5d*. Al contrario, gli altri elementi della tavola periodica hanno differenti configurazioni elettroniche esterne e un certo grado di similarità fra loro avviene solo per gli elementi appartenenti agli stessi "Gruppi" della tavola. Fra essi vanno annoverate talune coppie di elementi aventi la medesima carica ionica quali le coppie Zr-Hf, Nb-Ta e Mo-W. Tale caratteristica ha reso i lantanidi, come più avanti spiegato, il migliore strumento di indagine geochimica dei processi di interfaccia. Inoltre, i lantanidi, possono vicariare il Ca^{2+} in numerosi processi biologici (Panagiotopoulos *et al.*, 2010), tanto da essere stati spesso utilizzati come traccianti del comportamento di questo grazie a talune loro proprietà fisiche. Ciononostante, è stata prestata un'attenzione limitata all'accumulo dei lantanidi nei fluidi e nei tessuti degli organismi viventi, nonostante il loro accumulo nell'ambiente venga comunemente considerato un buon tracciante dei processi di contaminazione (Censi *et al.*, 2011). In particolare, è stato dimostrato che anomalie di Gadolinio (Gd) riscontrate in fiumi, acque costiere e acque sotterranee, siano spesso il risultato di un uso estensivo dello stesso come agente di contrasto in indagini diagnostiche (Bau and Dulski, 1996; Elbaz-Poulichet *et al.*, 2002; Censi *et al.*, 2010; Kulaksiz and Bau, 2011), mentre, lievi contaminazioni da lantanidi nei sedimenti e nel particolato atmosferico, sono state spiegate con l'uso di carbonati e zeoliti arricchiti in La impiegate come i convertitori catalitici nei processi di raffinazione dei petroli (Olmez *et al.*, 1991; Kulkarni *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2008). Nonostante il Gd si accumuli all'interno dello scheletro umano (Darrah *et al.*, 2009), l'impatto dei lantanidi sull'ambiente ed il potenziale rischio per la salute delle specie che vi abitano sono stati finora tenuti in scarsa considerazione dalla letteratura scientifica, probabilmente anche a causa delle

basse concentrazioni raggiunte nei tessuti viventi ed alle difficoltà analitiche connesse alla loro determinazione ai livelli di ng l^{-1} .

Nel quadro quindi di uno studio di carattere ambientale sulla testuggine siciliana, in cui questa rivestisse anche il ruolo di specie sentinella dello stato dell'ambiente, è parso adeguato il ricorso a uno studio biogeochimico dei lantanidi che coinvolgesse tale specie. Tale scelta ha avuto il duplice scopo di utilizzare i lantanidi come indicatori dello stato dell'ambiente e dei meccanismi che hanno luogo all'interfaccia fra l'ambiente e le specie che in esso vivono, prendendo come esempio la testuggine siciliana. Da un punto di vista ecologico la testuggine siciliana presenta il considerevole pregio di essere un soggetto longevo ed endemico di un ecosistema potenzialmente incontaminato, sensibile alla qualità della salute ambientale (Ley-Quiñónez *et al.*, 2011) e capace di accumulare elementi in traccia dando luogo a fenomeni di biomagnificazione (Cardellicchio *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2000; Storelli and Marcotrigiano, 2003; Garcia-Fernandez *et al.*, 2008) in virtù dei quali essa è in grado di svolgere il ruolo di specie sentinella dello stato dell'ambiente (Andreani *et al.*, 2008). D'altro canto i lantanidi, essendo elementi che possono provenire sia da sorgenti litogeniche, che da pratiche antropogeniche, rappresentano metalli in tracce adeguati ad essere riconosciuti come traccianti dello stato di un ecosistema. In più, per le loro caratteristiche durante i processi di interfaccia e la similitudine con il comportamento di Ca^{2+} (Yang and Sachs, 1989) essi si prestano ad tracciare i processi biogeochimici oltre la semplice esposizione alla contaminazione ambientale. Il vantaggio offerto dall'uso dei lantanidi durante uno studio in cui l'approccio biogeochimico risultasse adeguato non risiede nel loro esclusivo significato di traccianti dell'inquinamento (perché ve ne sono di altri, spesso di più semplice determinazione) ma nella capacità che i lantanidi hanno, differentemente da altri elementi, di subire processi di reciproco frazionamento durante molte reazioni che coinvolgono la presenza di un'interfaccia. D'altro canto l'area in cui lo studio ha avuto luogo ha, nelle pratiche agricole, una delle poche occasioni di produrre esiti di antropizzazione attraverso l'uso di fosfati come fertilizzanti di suoli carbonatici che ne sono naturalmente poco provvisti. Proprio in questo specifico caso i lantanidi, meglio di altri elementi in tracce, possono svolgere il ruolo di traccianti dell'impronta antropica data la loro elevata vocazione ad essere concentrati nei fosfati.

L'ecosistema campione indagato durante questo studio, può essere immaginato come un insieme di differenti domini:

- Il mezzo acquoso su cui verte la quasi totalità della biodiversità presente nell'ecosistema;

- L'organismo predatore la cui catena trofica si sviluppa all'interno dell'ecosistema ed è quindi influenzata dalla chimica di questo, con i suoi liquidi biologici, la cui composizione risente dell'esposizione dell'organismo all'ambiente attraverso la catena trofica e a sua volta influenza quella dei tessuti molli e mineralizzati dell'organismo stesso a seguito dei processi fisiologici.

Ciascuno di questi domini è separato da altrettante interfacce e durante le reazioni che avvengono attraverso tali interfacce i lantanidi subiscono forme di frazionamento dovuti alla competizione fra complessamento in fase disciolta (acqua prima e sangue poi) e superficiale (componenti la catena trofica e tessuti mineralizzati) che si realizza. L'entità di tali frazionamenti sono fra gli oggetti del presente studio. Certamente la scelta operata in relazione allo strumento geochimico proposto si è dimostrata vincente, avendo permesso di mettere in risalto la presenza di sovra esposizioni a lantanidi la cui influenza sul grado di crescita degli individui studiati sembra differente da quella evidenziata dove la sovraesposizione manca.

Un pregio accessorio dello studio condotto è anche legato alla pressoché totale assenza di dati ambientali sulle aree prese in considerazione. Ciò vale tanto per la scarsa attività posta in essere dalle agenzie preposte all'analisi ed alla tutela dell'ambiente, quanto per la quasi totale assenza di pubblicazioni scientifiche inerenti lo stato chimico dell'ambiente nelle zone in questione. Unica eccezione a tale quadro è uno studio geochimico di base sulla composizione dei costituenti maggiori nelle acque freatiche della piana di Mazara, in prossimità ed all'interno della riserva dei Gorghi toni, allo scopo di stabilire evidenze di intrusione marina nella falda idrica (Cusimano *et al.*, 2006). Sporadici studi su temperatura, pH, O₂ disciolto, fluorescenza, salinità sono stati condotti a cura dell'Ente gestore la riserva dei Gorghi Tondi, mentre una puntuale indagine sui sedimenti è stata condotta da ARPA-Sicilia durante l'anno 2005 e 2006. Relativamente alla riserva di Siculiana-Torre Salsa non è noto alcun dato analitico circa il contenuto di qualsivoglia componente chimico in alcuna forma disciolta, solida o gassosa. Ciò lascia tanto più perplessi dal momento che, le aree oggetto di studio rappresentano un ponte naturale nella migrazione di numerose specie di uccelli dall'Africa all'Europa e viceversa. Ricadendo all'interno di due aree protette regionali, tali aree giocano un ruolo chiave nella conservazione della biodiversità di un ampio *range* di flora e fauna, incluse specie endemiche tipiche del Bacino Mediterraneo. Questi habitat sono circondati da aree in cui sono sviluppate numerose attività, soprattutto agricole, i cui effetti possono influenzare la composizione degli ecosistemi acquatici, anche se ricadenti all'interno delle aree protette.

5.2. Caratteristiche geochemiche dei lantanidi

I lantanidi sono un gruppo di 14 elementi dal $_{58}\text{Ce}$ al $_{71}\text{Lu}$ accomunati dal progressivo riempimento dell'orbitale $4f$. Sia durante i processi magmatici che portano alla cristallizzazione dei minerali costituenti le rocce, sia durante i processi che avvengono in contatto con il mezzo acquoso, tali elementi hanno in comune lo stesso stato di ossidazione $3+$. Tale caratteristica è comune anche al $_{57}\text{La}$ e, secondariamente a $_{39}\text{Y}$, elementi facenti parte delle serie di transizione, tanto da permettere la loro associazione ai lantanidi a formare il gruppo degli Elementi delle Terre Rare (REE). La configurazione elettronica esterna degli elementi compresi fra il $_{57}\text{La}$ e il $_{71}\text{Lu}$ è sempre la stessa (fatto estremamente raro in natura) essendo dovuta agli elettroni presenti nell'orbitale $6s$ e $5d$, mentre l'orbitale $4f$ rimane più interno alla struttura atomica. Ciò rende il comportamento dei lantanidi formalmente identico nel mezzo acquoso, dove la reattività degli elementi è largamente caratterizzata dalla loro configurazione elettronica. D'altro canto la progressiva diminuzione delle dimensioni ioniche lungo la serie dei lantanidi, induce una differente capacità di questi ultimi di venire coinvolti nei processi di cristallizzazione di fasi mineralogiche, poiché durante tali processi, sono la dimensione e la carica degli ioni il fattore che invece determinano il comportamento degli elementi chimici (Shannon, 1976). Ecco quindi che non uno, ma l'intera serie di elementi ha la capacità di comportarsi in maniera omogenea in ogni mezzo in cui sono inseriti, ma profondamente differente a seconda che siano coinvolti in reazioni che hanno luogo all'interno dei solidi o nei liquidi. D'altro canto il grado di occupazione dell'orbitale $4f$ comporta l'insorgenza di differenze non trascurabili nel comportamento dei vari elementi della serie quando esistano condizioni in cui il complessamento in fase disciolta è in competizione con quello "superficiale" in cui i lantanidi vengono ad essere coordinati dai gruppi funzionali esistenti sulle superfici dei solidi. Quest'ultima caratteristica, rende i lantanidi probabilmente il migliore strumento per lo studio dei processi che si esplicano nelle regioni di interfaccia, dove complessamento su superficie ed in fase disciolta sono concorrenti. Ciò è stato stabilito attraverso una serie di studi geochemici condotti a far data dalla fine degli anni '80 soprattutto per l'interfaccia di elezione della Geochimica, quella acqua-roccia (Michard and Albarede, 1986; Michard, 1989; Bau and Dulski, 1996; Moller and Giese, 1997; Moller *et al.*, 2003) Successivamente si è visto che, un'analogia dicotomia di comportamento era evidente nei processi in cui, la materia organica era in contatto con l'acqua e ciò causava preferenziale adsorbimento di determinati gruppi di elementi delle REE una volta in contatto con gruppi funzionali organici, come quelli presenti negli umati e nei

fulvati (Takahashi *et al.*, 2002). Successivi studi condotti sugli equilibri presenti fra membrane e superfici cellulari e liquidi di coltura hanno successivamente messo in evidenza che tali interfacce erano anch'esse in grado di frazionare preferibilmente determinati gruppi di lantanidi, con particolare attenzione agli elementi più pesanti della serie, dal Ho in poi (Takahashi *et al.*, 2005). Ciò ha permesso di identificare nell'arricchimento in lantanidi pesanti (HREE) un effetto tipico della presenza di sostanza organica nelle acque e nei sedimenti (Haley *et al.*, 2004) e a riconoscere in talune forme di arricchimento dei lantanidi la conseguenza della presenza di colonie batteriche in determinati ambienti naturali (Takahashi *et al.*, 2007).

La capacità dei lantanidi di subire frazionamenti all'interfaccia solido-liquido in ambiente biologico è stata anche testata in occasione della formazione di biomineralizzazioni, durante la cristallizzazione di fosfati biogenici di differente natura. Il processo più interessante da questo punto di vista è certamente quello che porta alla formazione delle strutture endo- ed eso-scheletriche degli organismi poiché sono quelle suscettibili di conservazione durante il trascorrere delle ere geologiche e quindi è auspicabile che, si possano ricavare informazioni sulle condizioni chimico-fisiche degli ambienti in cui esse si sono formate. Tali studi hanno quindi riguardato i carbonati di gusci di specie, come foraminiferi e molluschi, che li secernono durante la vita condotta a contatto con i fluidi ambientali di varia natura. Ma sono stati presto estesi ai fosfati costituenti le ossa di organismi superiori. I risultati di tali studi sono stati confrontati con quelli riguardanti il comportamento dei lantanidi durante la cristallizzazione di fosfati inorganici in occasione di processi magmatici (Reynard *et al.*, 1999) allo scopo di indagare anche qui se il frazionamento osservato lungo la serie dei lantanidi fosse rappresentativo della composizione dell'ambiente in cui tali fosfati si erano formati o fosse invece il risultato di eventi successivi alla formazione del fosfato biogenico (Lecuyer *et al.*, 2004). In particolare si è notato che, durante la cristallizzazione di apatite gli elementi delle REE intermedie, fra Sm e Dy, vengono preferenzialmente concentrati nella struttura del fosfato neformato per motivi legati alla similarità di dimensioni ioniche rispetto al Ca^{2+} (Fig. 35).

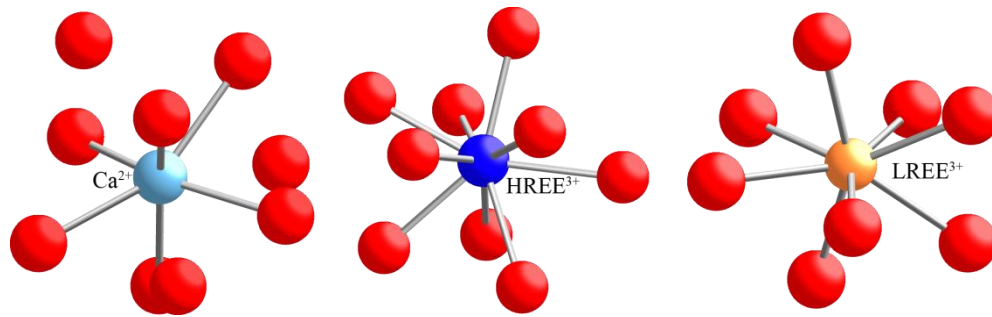


Figura 35 - Intorno di coordinazione di Ca^{2+} nella struttura cristallina dell'apatite messo a confronto con quello caratteristico delle REE leggere (LREE) e delle REE intermedie e pesanti (HREE). Come si nota queste ultime hanno lo stesso numero di coordinazione del Ca^{2+} (IX) a conferma della maggiore similarità cristallografica rispetto alle LREE (VIII).

D'altro canto studi più recenti hanno avanzato il dubbio che, il frazionamento dei lantanidi intermedi e la loro accumulazione all'interno delle strutture cristalline dei fosfati degli scheletri fossili, siano il risultato di un processo diagenetico piuttosto che una memoria composizionale dell'ecosistema in cui gli individui responsabili della cristallizzazione di tali fosfati erano vissuti. Ciò a causa del processo di fossilizzazione che implica che l'idrossiapatite metastabile al di fuori delle condizioni imposte dall'attività biologica subisca una totale ricristallizzazione a fluoro-apatite stabile in ambiente inorganico a seguito del decadimento del collagene *post-mortem* (Trueman and Tuross, 2002; Pasteris and Ding, 2009). Quindi, l'accumulazione di REE intermedie e pesanti dovrebbe essere un fatto legato alla diagenesi, piuttosto che al chimismo dell'ecosistema originario.

Per cercare di dare una risposta in un senso o nell'altro, si è quindi pensato di indagare la distribuzione dei lantanidi nelle popolazioni di testuggine siciliana. Inoltre, come tutti gli equilibri presenti in natura, anche l'incorporazione di elementi in tracce nelle strutture cristalline dei tessuti biomineralizzati è un processo la cui entità e decorso dipendono dalla temperatura alla quale hanno luogo. Nel caso di organismi a sangue freddo, quali quelli studiati in questa ricerca, il processo di incorporazione degli elementi in tracce a sostituire il Ca^{2+} nelle strutture cristalline della bio-apatite, non viene influenzato dalla temperatura imposta dal metabolismo dell'individuo coinvolto e dovrebbe rispecchiare maggiormente quella dell'ecosistema di vita dell'individuo. In ultimo, non sono a noi noti studi inerenti la distribuzione degli elementi delle REE nei tessuti molli, fluidi biologici e scheletri di organismi quali quelli qui indagati.

5.3. Materiali e Metodi

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena coccigeale degli individui studiati (circa 1 g in peso) utilizzando una siringa in polipropilene e sono stati conservati in un tubo per la raccolta del sangue alla temperatura di 2°C, senza alcuna aggiunta di sostanze chimiche e successive manipolazioni. Dopo essere stati pesati, i campioni di sangue sono stati interamente digeriti in fiale TFM con una soluzione di 3 ml di HNO₃ al 70% (Baker Ultrex II), 1 ml di acqua ad elevato grado di purezza ($\rho \geq 18.2 \text{ M}\Omega$) e 2 ml di soluzione di H₂O₂ (Baker Ultrex II). I campioni di tessuto sono stati analizzati in triplice replica. Sono stati raccolti anche campioni di esoscheletro dal suo margine posteriore, precedentemente pulito con una spugnetta da lavaggio in plastica, acqua ad elevato grado di purezza e propanolo.

0.5 g di frammenti di carapace, sono stati digeriti in un reattore pressurizzato all'interno di un forno a microonde. Ciò è stato possibile utilizzando 7 ml di HNO₃ al 70 % (Baker Ultrex II), 1 ml di acqua ad alto grado di purezza ($\rho \geq 18.2 \text{ M}\Omega$) e 2 ml di H₂O₂ (Baker Ultrex II). Dopo la digestione le soluzioni sono state ancora diluite fino ad un volume finale di 15 ml per la determinazione chimica degli analiti.

I campioni d'acqua del torrente e del lago, sono stati prelevati tramite bottiglie Niskin. Il contenuto in Lantanidi è stato determinato previa preconcentrazione delle fasi disciolte e la loro separazione dalla matrice, al fine di accentuare la sensibilità dello strumento ed evitare le interferenze analitiche indotte dalla matrice stessa. Il metodo consiste nella co-precipitazione dei lantanidi su Fe(OH)₃, solido precipitato a seguito dell'aggiunta di Fe al campione precedentemente filtrato e condizionato. Dopo l'aggiunta il pH è stato corretto sino a 8.0 tramite una soluzione concentrata di NH₄OH. L'omogenizzazione della soluzione e la precipitazione di idrossido di ferro sono state ottenute mescolando il campione per 2 ore e facendo maturare il precipitato per 2 giorni. In seguito, i campioni sono stati filtrati e l'idrossido di ferro filtrato è stato lavato con acqua e disciolto in una soluzione di HCl 6 M. Prima di effettuare le analisi, la soluzione del campione è stata diluita 6 volte in acqua ultrapura. La replicabilità analitica è stata valutata misurando i bianchi procedurali (PB) ottenuti dagli stessi composti chimici utilizzati durante la manipolazione del campione. La deviazione standard calcolata sull'analisi dei lantanidi nei PB è stata utilizzata per valutare il valore critico (L_C), il *detection limit* (L_D) ed il limite di quantificazione (L_Q) per gli elementi in tracce studiati, secondo le espressioni (1) in accordo alle procedure EPA (2005):

$$L_C = 2.33 * \sigma_{PBs} \qquad L_D = 4.65 * \sigma_{PBs} \qquad L_Q = 10 * \sigma_{PBs} \quad (1)$$

I valori ottenuti indicano che gli effetti delle procedure di manipolazione dei campioni sono trascurabili rispetto al contenuto in metalli in tracce dei materiali analizzati, testimoniando dell'accuratezza del metodo (Tab. 11). La precisione dello stesso è stata invece testata attraverso l'analisi di una soluzione fisiologica (PS) a cui sono stati aggiunti lantanidi nella misura di 10 ng l⁻¹ ciascuno. Tale soluzione è stata sottoposta alla medesima metodica utilizzata per lo studio dei campioni di sangue in modo da valutarne il grado di precisione, data l'assenza di materiali standard di riferimento con valori certificati per tutti gli elementi studiati. I risultati sono stati riportati in Tab. 11. La determinazione analitica dei lantanidi è stata condotta, per calibrazione esterna, su rette costruite su sette punti con concentrazioni variabili tra 1.8 e 1000 ng l⁻¹. Le analisi sono state condotte utilizzando un Q-ICP-MS *Agilent Technologies 7500 Series*, utilizzando Tallio come standard interno. Le analisi della concentrazione dei lantanidi nei differenti materiali esaminati sono riportate in Tab. 12.

Tabella 11

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1		PB-1	PB-2	PB-3	PB-4	PB-5	L _c	L _d	L _Q	PS-1	PS-2	PS-3	PS-4	PS-5	Media	s ±
2		ng l ⁻¹														
3	¹³⁹ La	0.22	0.18	0.34	0.10	0.16	0.05	0.09	0.29	9.89	9.66	9.55	10.18	9.80	9.82	0.24
4	¹⁴⁰ Ce	0.30	0.47	0.35	0.32	0.46	0.05	0.10	0.32	8.98	9.64	9.01	9.55	9.64	9.36	0.34
5	¹⁴¹ Pr	0.28	0.42	0.35	0.32	0.51	0.09	0.18	0.54	9.35	9.67	9.09	9.87	9.73	9.54	0.32
6	¹⁴⁰ Nd	0.09	0.05	0.12	0.06	0.08	0.02	0.04	0.12	9.74	9.29	9.62	9.46	9.43	9.51	0.17
7	¹⁴⁷ Sm	0.10	0.08	0.17	0.06	0.09	0.03	0.06	0.19	9.81	9.43	9.46	9.83	9.29	9.56	0.24
8	¹⁵¹ Eu	0.10	0.13	0.22	0.14	0.14	0.02	0.04	0.11	10.03	10.17	10.02	9.25	9.08	9.71	0.50
9	¹⁵⁷ Gd	0.18	0.16	0.33	0.21	0.22	0.04	0.08	0.24	10.53	9.42	10.16	9.97	9.18	9.85	0.55
10	¹⁵⁹ Tb	0.29	0.55	0.49	0.39	0.60	0.03	0.06	0.19	11.05	9.68	9.51	9.93	9.49	9.93	0.65
11	¹⁶³ Dy	0.35	0.57	0.40	0.33	0.58	0.09	0.18	0.56	9.19	10.13	9.52	9.36	9.73	9.59	0.37
12	¹⁶⁵ Ho	0.34	0.50	0.43	0.39	0.51	0.02	0.04	0.14	9.65	9.90	11.72	9.37	9.60	10.05	0.95
13	¹⁶⁶ Er	0.32	0.52	0.45	0.33	0.51	0.07	0.15	0.46	9.28	11.60	11.03	11.09	10.18	10.63	0.91
14	¹⁶⁹ Tm	0.29	0.60	0.46	0.36	0.64	0.07	0.14	0.44	8.91	9.42	10.07	9.43	11.03	9.77	0.82
15	¹⁷² Yb	0.30	0.58	0.53	0.37	0.51	0.03	0.07	0.21	9.39	9.55	11.40	9.27	10.47	10.02	0.91
16	¹⁷⁵ Lu	0.38	0.56	0.54	0.36	0.61	0.08	0.17	0.52	10.21	10.58	11.08	9.81	10.08	10.35	0.49

Tabella 12

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1		peso	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	$\Sigma[Ln]$
2		(g)	ng l ⁻¹														
3		Sangue															
4	MAZ-1	214	126.78	175.63	14.68	53.61	8.64	1.93	8.84	1.83	6.52	1.77	2.83	0.69	2.92	0.54	407.22
5	MAZ-2	394	76.04	147.73	17.33	80.98	19.52	3.30	16.96	1.81	11.53	1.56	3.35	0.54	2.81	0.40	383.85
6	MAZ-3	343	697.21	1337.34	141.02	501.21	86.05	16.75	81.58	9.77	56.49	9.82	28.82	3.25	25.66	2.51	2997.49
7	MAZ-4	311	171.49	236.63	27.78	106.12	21.91	6.16	19.34	2.62	13.03	2.26	5.38	0.77	5.30	0.64	619.43
8	MAZ-5	382	92.33	79.59	8.29	29.73	5.15	1.24	5.16	1.23	4.14	0.91	2.10	0.36	2.39	0.47	233.09
9	MAZ-6	216	806.53	1377.85	156.76	556.15	94.82	21.40	88.53	11.53	52.30	9.62	22.80	3.40	18.87	2.35	3222.92
10	MAZ-7	312	220.33	503.18	50.33	188.25	36.12	6.50	34.58	4.74	19.07	3.81	7.87	1.13	6.68	1.07	1083.67
11																	
12	SC-1	388	39.92	91.00	7.99	21.95	6.05	1.74	12.71	1.68	7.62	1.58	3.53	0.43	2.04	0.19	198.44
13	SC-2	225	44.98	83.35	17.55	38.31	7.80	1.63	10.60	2.64	5.82	1.87	5.96	1.14	5.60	0.86	228.12
14	SC-3	474	32.53	51.91	9.97	34.91	5.94	1.23	5.99	0.98	6.03	0.90	2.03	0.32	1.96	0.35	155.05
15	SC-4	65	21.00	46.32	4.03	13.67	2.40	0.81	2.79	0.92	4.19	0.79	1.66	0.20	1.24	0.12	100.14
16	SC-5	481	95.51	98.94	9.34	32.45	6.79	0.90	6.34	1.41	8.64	1.57	3.48	0.38	2.53	0.32	268.57
17	SC-6	672	58.15	165.39	10.20	39.33	8.45	4.91	8.61	1.63	6.36	1.36	3.06	0.46	3.40	0.33	311.65
18	SC-7	325	28.70	63.12	5.70	12.59	2.00	1.12	2.46	0.32	1.27	0.26	0.54	0.06	0.33	0.04	118.51
19	SC-8	290	27.71	61.00	3.45	14.65	2.40	0.61	3.10	0.79	3.56	0.60	0.99	0.13	0.68	0.09	119.76
20	SC-9	358	55.29	105.65	6.37	26.45	4.66	0.92	5.54	0.91	4.71	0.91	1.62	0.22	1.36	0.18	214.79
21																	
22		Esoscheletro															
23	MAZ-1		19.95	32.12	7.39	33.26	13.96	6.95	36.94	3.94	16.82	3.97	5.02	0.98	2.95	0.45	184.69
24	MAZ-2		12.58	16.72	3.19	15.95	5.95	2.05	20.09	2.64	12.46	2.16	4.33	0.67	3.58	0.36	102.73
25	MAZ-3		37.42	63.98	10.62	45.36	10.17	4.30	21.46	3.83	15.78	2.56	4.87	0.77	4.78	0.67	226.56
26	MAZ-4		26.35	40.39	6.15	13.72	6.23	8.01	36.91	4.23	18.73	3.97	5.47	0.45	1.85	0.24	172.70
27	MAZ-5		14.76	25.07	4.70	11.07	4.65	4.97	21.95	4.62	10.91	2.00	4.03	0.30	0.78	0.15	109.96
28	MAZ-6		60.49	113.75	15.22	48.18	11.40	8.57	40.94	4.16	29.05	4.12	7.95	0.56	2.51	0.27	347.18
29																	
30	SC-1		48.46	79.90	9.48	27.63	8.70	3.29	29.00	3.75	6.43	0.82	1.95	0.20	0.98	0.19	220.80
31	SC-2		41.59	84.26	10.92	33.82	9.73	3.85	23.56	3.69	7.48	0.87	1.45	0.19	0.78	0.12	222.32
32	SC-3		43.93	75.93	20.37	85.11	15.07	3.08	14.45	1.83	9.46	1.42	1.57	0.15	0.85	0.15	273.37
33	SC-6		38.33	71.73	10.63	29.23	9.66	3.98	29.96	4.95	7.10	0.97	2.20	0.17	1.00	0.10	210.02
34	SC-9		23.99	45.98	7.20	32.98	10.04	2.77	17.97	3.06	10.52	1.14	2.02	0.11	0.77	0.10	158.65
35																	
36		acqua															
37	MAZ		6.51	19.98	2.10	8.93	2.12	0.55	2.25	0.33	1.61	0.30	0.78	0.07	0.41	0.06	
38	SC		3.22	4.38	0.30	1.03	0.21	0.05	0.20	0.03	0.17	0.03	0.06	0.01	0.04	0.01	

5.4. Risultati

La concentrazione complessiva dei lantanidi nei campioni di sangue varia da 100.1 a 3222.9 ng l⁻¹. Tutti i campioni raccolti nel sito di Siculiana mostrano concentrazioni più basse di lantanidi, fino a circa 400 ng l⁻¹, mentre i campioni di sangue dal sito Gorgo basso a Mazara del Vallo mostrano i valori più elevati. Al contrario la concentrazione in lantanidi dell'esoscheletro ricade in un *range* di valori più ristretto, da 102.7 a 347.2 µg l⁻¹. Nei campioni del sito SC è stata osservata una co-variazione positiva tra le concentrazioni dei lantanidi nel sangue ed il peso degli individui di testuggine. Questa covarianza scompare nei campioni con le più alte concentrazioni in lantanidi, come ad esempio negli esemplari campionati nel sito Gorghetti tondi, Mazara. Le caratteristiche osservate in questi ultimi, apparentemente suggeriscono che, le maggiori concentrazioni di lantanidi si ritrovino negli individui col minor peso (Fig. 36).

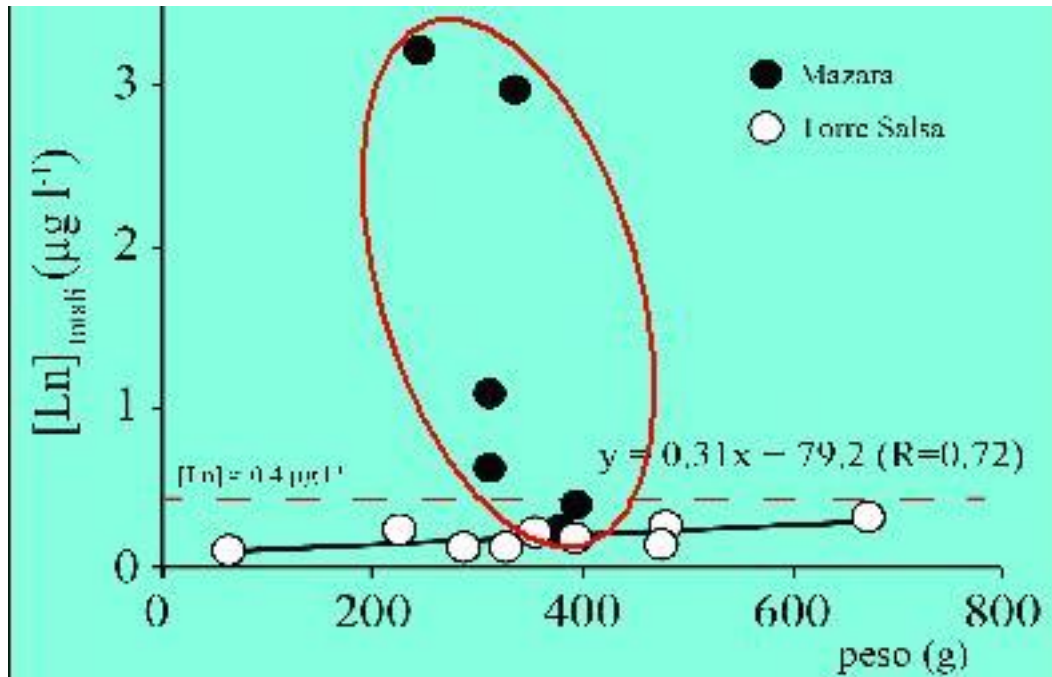


Figura 36 - Concentrazione dei lantanidi negli individui di testuggine esaminati in relazione al peso corporeo

Queste evidenze suggeriscono che la specie *Emys trinacris* possa accumulare i lantanidi dall'ambiente in cui vive e l'ampiezza di questo processo di accumulo possa influire sull'accrescimento degli animali, probabilmente fino a causarne la morte. In particolare la contaminazione ambientale può ridurre e potenzialmente arrestare del tutto la crescita dell'animale ad uno stadio giovanile, il che spiegherebbe perchè gli individui meno sviluppati mostrino le più elevate concentrazioni di lantanidi nel sangue. Le concentrazioni dei lantanidi nel sangue e nell'esoscheletro dei campioni, normalizzate agli *Shale* secondo la composizione dei *Post Archean Australian Shale* (PAAS) riportata da Taylor and McLennan (1995), mostrano un arricchimento nel contenuto di lantanidi leggeri (da La a Nd) ed intermedi (da Sm a Dy) negli esoscheletri e nel sangue dei campioni a più elevate concentrazioni prelevati nel sito Mazara. Al contrario l'arricchimento da lantanidi intermedi è presente nei campioni di sangue meno concentrati, prelevati dalla stessa area (Figg. 37, 38).

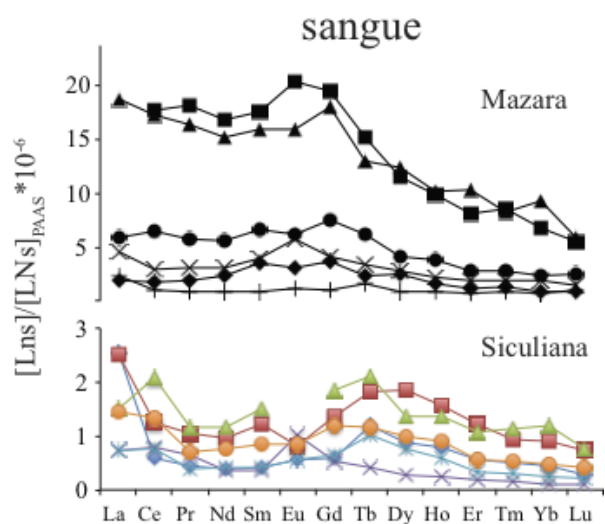


Figura 37 - Concentrazione dei lantanidi, normalizzata al PAAS, nel sangue degli individui esaminati.

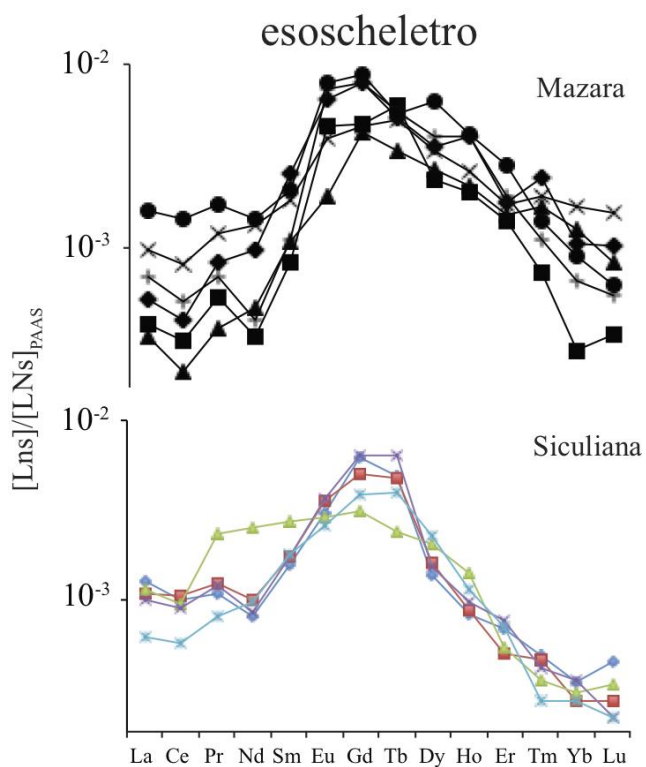


Figura 38 - Concentrazione dei lantanidi, normalizzata al PAAS, nell'esoscheletro degli individui esaminati.

Queste osservazioni fanno supporre che i lantanidi intermedi siano concentrati preferenzialmente nel sangue quando l'*Emys trinacris* passa la sua vita in ambienti meno contaminati, probabilmente come conseguenza della fisiologia di questi animali. Anomalie

positive di Gd e qualche volta di Eu sono spesso osservate in campioni di sangue similmente alle distribuzioni dei lantanidi osservate nei fluidi biologici e nei tessuti (Fujimori *et al.*, 1999). Tale *uptake* preferenziale dei lantanidi intermedi è stato anche osservato nei campioni di esoscheletro esaminati similmente a quanto spesso di verifica in numerosi fosfati biogenici (Figg. 37,38).

Allo scopo di stabilire se la presenza dei lantanidi dei tessuti e nei fluidi analizzati avesse una relazione con quella presente nell'ambiente di vita degli individui studiati, le concentrazioni dei lantanidi nei campioni biologici sono state normalizzate anche rispetto alla composizione delle acque ambientali. Ciò ha messo in luce un differente andamento dei lantanidi nei due siti esaminati, particolarmente per ciò che riguarda la loro distribuzione del sangue.

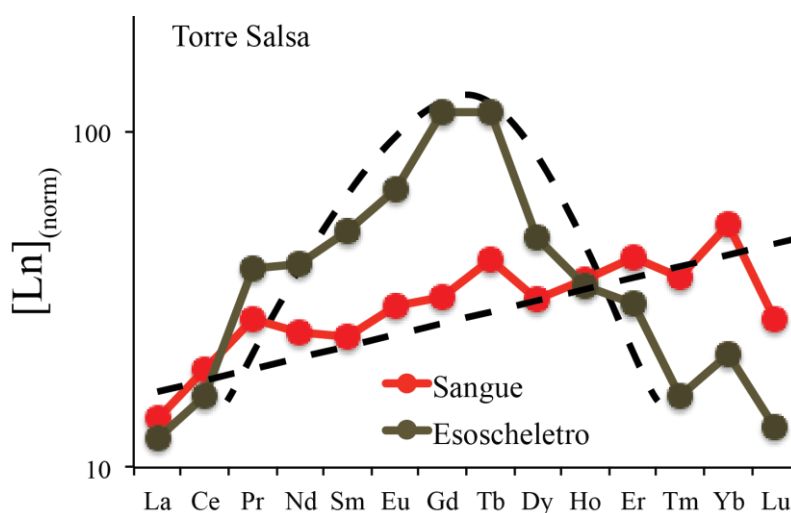


Figura 39 - Andamento medio dei valori di concentrazione dei lantanidi nel sangue e nell'esoscheletro degli individui raccolti nel sito di Torre Salsa, normalizzati alla composizione dell'acqua ambientale.

Nel sito di Torre Salsa l'andamento dei lantanidi (normalizzati all'acqua ambientale) è monotono crescente mentre nell'esoscheletro vengono di preferenza incorporati i lantanidi intermedi con un massimo per Gd e Tb (Fig. 39). Nel sito di Mazara il sangue degli individui esaminati tende a contenere preferibilmente lantanidi leggeri, sino a samario (Sm) e lantanidi pesanti, da tulio in poi. I restanti elementi della serie, da europio (Eu) a erbio (Er) risultano impoveriti rispetto agli altri.

Vagamente simmetrico è invece l'andamento medio riscontrato nell'esoscheletro dove si arricchiscono i lantanidi intermedi da Eu sino a olmio (Ho) mentre tanto quelli leggeri che quelli più pesanti mostrano concentrazioni normalizzate più basse (Fig. 40).

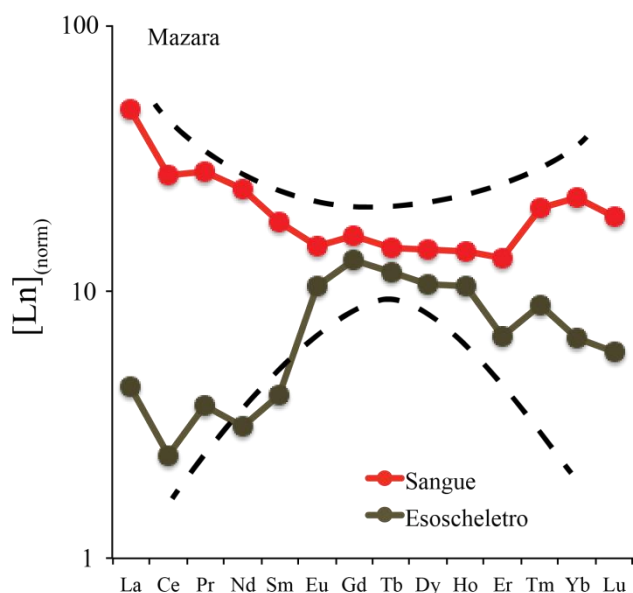


Figura 40 - Andamento medio dei valori di concentrazione dei lantanidi nel sangue e nell'esoscheletro degli individui raccolti nel sito di Mazara, normalizzati alla composizione dell'acqua ambientale.

Tali andamenti, al pari di quanto mostrato in Fig. 36, suggeriscono che il comportamento biogeochimico dei lantanidi sia influenzato dal grado di contaminazione ambientale che, come sopra accennato, è maggiore nel sito di Mazara rispetto al sito di Torre Salsa.

5.5. Discussione

La relazione apparentemente inversa esistente tra i contenuti in lantanidi studiato nel sangue degli individui di testuggine ed il loro peso è probabilmente indotta dalla sensibilità che il *taxon* investigato ha nei confronti della composizione e dei vincoli dell'ambiente. Quindi il grado di contaminazione dello stesso ha implicazioni sia morfologiche che geochimiche, dato che gli esemplari campionati nelle aree con il più elevato contenuto in lantanidi in ambiente acquoso mostrano i valori più bassi in peso, mentre il comportamento dei lantanidi normalizzati alla composizione dell'ambiente acquoso, è caratterizzato dall'impoverimento in lantanidi intermedi rispetto al contenuto normalizzato in lantanidi leggeri e pesanti. Questo implica che, un'elevata concentrazione di lantanidi nel sangue di testuggine (superiori a circa 400 ng l⁻¹) può rappresentare un danno ambientale, rappresentato in individui viventi di *Emys trinacris* meno sviluppati nel sito di Mazara rispetto a quelli campionati in altre aree, come osservato in precedenza ma senza una spiegazione del fenomeno (Fritz *et al.*, 2006; D'Angelo *et al.*, 2008). Al contrario, nel sito di Siculiana meno

contaminato, dove il contenuto in lantanidi nel sangue è minore rispetto ai suddetti valori soglia, esso è positivamente correlato al peso degli individui. In questi campioni la concentrazione normalizzata dei lantanidi cresce lungo la serie, in analogia a quanto osservato nei fosfati autigenici non affetti da modificazioni diagenetiche (Lecuyer *et al.*, 2004). Tale andamento è differente da quello riscontrato in fosfati fossili in cui è stato riscontrato un arricchimento in lantanidi intermedi, dal Sm al disprosio (Dy), che sono stati spiegati con processi di scambio diagenetico con fluidi circolanti (Herwartz *et al.* 2011) e potrebbe essere legato alla mancanza di una funzione fisiologica dei lantanidi negli organismi viventi, sebbene si sia visto che essi possiedono un'elevata capacità di sostituire Ca^{2+} nella struttura dei fosfati ed in molti processi biologici, spiegando il motivo delle distribuzioni osservate per questi elementi negli scheletri non contaminati degli organismi studiati in letteratura. Tale comportamento è seguito anche dai patterns normalizzati dei lantanidi riscontrati negli individui di *Emys trinacris* caratterizzati da più bassi tenori in questi elementi. Al contrario distribuzioni dei lantanidi aventi forme “a campana” con massimi in corrispondenza dei lantanidi intermedi, dal Sm a Dy, sono stati osservati in fosfati fossili diagenizzati e negli individui di *Emys trinacris*, a prescindere dal grado di contaminazione ambientale.

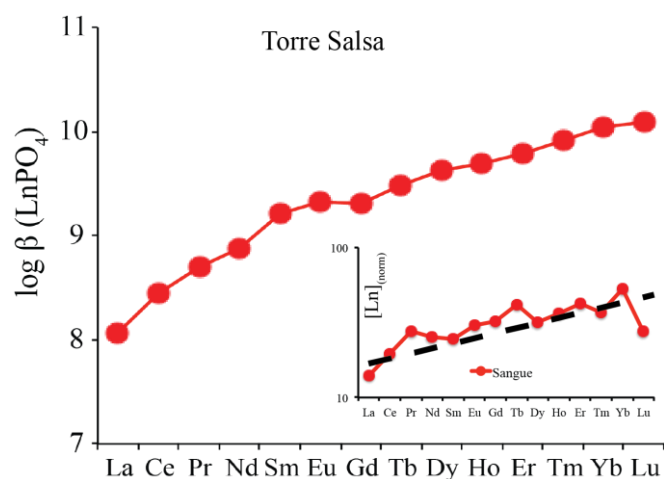


Figura 41 - Andamento delle costanti di stabilità dei fosfato-complessi dei lantanidi paragonate alla successione delle concentrazioni normalizzate di questi elementi nel sangue degli individui provenienti da Torre Salsa (vedi Fig. 39).

Ciò che invece sembra cambiare con il grado di contaminazione ambientale è il comportamento biogeochimico dei lantanidi presenti nel sangue degli individui studiati. A Torre Salsa dove, come si è visto, il contenuto di lantanidi nell'acqua è inferiore alla successione delle concentrazioni normalizzate alla composizione dell'acqua è molto simile a

quella delle costanti di complessamento degli stessi elementi da parte dei gruppi PO_4^{3-} a formare complessi LnPO_4 (Fig. 41). Al contrario, il comportamento dei lantanidi contenuti nel sangue degli individui raccolti presso il sito di Mazara, è simile al grado di frazionamento indotto nella fase disciolta dalla co-precipitazione di Ln-fosfati come evidenziato durante esperimenti di laboratorio (Byrne *et al.*, 1996), dove il grado di frazionamento dei lantanidi nelle soluzioni di cristallizzazione è funzione della durata del processo (Fig. 42).

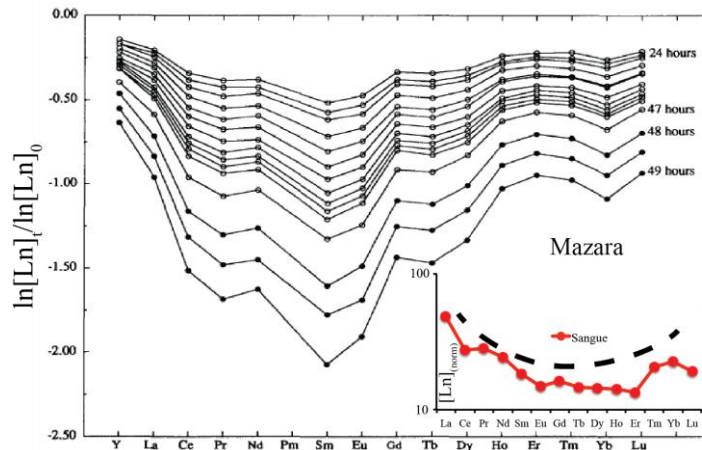


Figura 42 - Andamento del grado di frazionamento dei lantanidi durante la co-precipitazione di Ln-fosfati in funzione del tempo (da Byrne *et al.*, 1996) paragonato all'andamento del contenuto dei lantanidi nel sangue cristallizzazione costanti di stabilità dei fosfato-complessi dei lantanidi paragonate alla successione della concentrazione media di questi elementi nel sangue degli individui provenienti da Mazara (vedi Fig. 40)

Tale similitudine suggerisce che l'aumento delle concentrazioni dei lantanidi nel sangue, connesso alla maggiore esposizione ambientale, abbia come effetto un immediato frazionamento di questi elementi nel sangue da cui vengono asportati grazie alla cristallizzazione di fosfato a formare strati di esoscheletro. In questo caso il comportamento biogeochimico dei lantanidi, chiaramente influenzato dal grado di contaminazione ambientale, sarebbero una sorta di risposta dell'organismo che tenta di minimizzare gli effetti di tale contaminazione.

6- STRUTTURA GENETICA DI POPOLAZIONE

6.1 Introduzione

Le popolazioni di testuggine del sud Italia e della Sicilia furono inizialmente considerate (Fritz, 1995) con caratteristiche morfologiche intermedie tra le sottospecie *Emys orbicularis galloitalica* ed *E. orbicularis hellenica* e classificate in questa prima fase come appartenenti ad un *taxon* che venne definito come proprio del “sud Italia” (Fig. 43). Successivamente, lo stesso Fritz (1998) riportò per le stesse aree due linee evolutive, la prima appartenente alla forma *E. o. galloitalica* mentre la seconda caratterizzata, secondo l’autore, da una certa somiglianza con *E. o. hellenica* (Fritz, 1995a, 1996). Studi genetici riguardanti la distribuzione degli aplotipi furono condotti in Germania, Italia e Belgio (Lenk *et al.*, 1996). Mentre in taluni casi questi confermarono le distinzioni fatte su base morfologica, in altri, ed è il caso della Sicilia, misero in evidenza una marcata distanza genetica tra le popolazioni del sud Italia e quelle del resto della penisola. L’aplotipo “III”, isolato da nove individui di Testuggine palustre provenienti dalla Sicilia, precisamente dai Monti Nebrodi (Mistretta, ME), non mostrava nessuna relazione con le popolazioni vicine geograficamente e si rivelava essere esclusivo della Sicilia. Con gli studi di Lenk *et al.* (1998), la popolazione siciliana venne definitivamente considerata come appartenente ad un *taxon* ben differenziato e caratteristico del “sud Italia” (Fig. 43) e la stretta somiglianza morfologica con *E. o. hellenica* sostenuta da Fritz (1995a, 1996) era invece, secondo Lenk *et al.* (1998), da attribuire a caratteri ancestrali della specie o anche a pressioni di tipo ambientale, che potrebbero aver portato le due sottospecie verso un fenotipo comune.

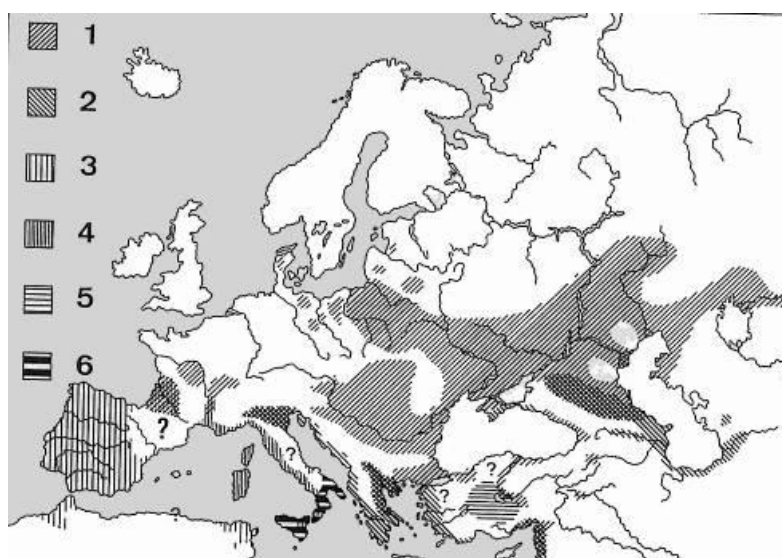


Figura 43 - Suddivisione dei taxon di *Emys* secondo Lenk *et al.* (1998); il n. 6 rappresenta il taxon del sud Italia.

Si dovrà aspettare Fritz *et al.*, (2005a) per sancire definitivamente la distinzione tra il taxon della Sicilia e le popolazioni peninsulari, su base genetica, con analisi del DNA mitocondriale (mtDNA) di 15 adulti della specie. (Fig 44). Più recentemente lo stesso autore (Fritz *et al.* 2006) conferma la distanza genetica tra le popolazioni siciliane e quelle continentali, sulla base di un numero più elevato di campioni (oltre 300 individui), riportando, inoltre, una precisa descrizione morfologica della specie.

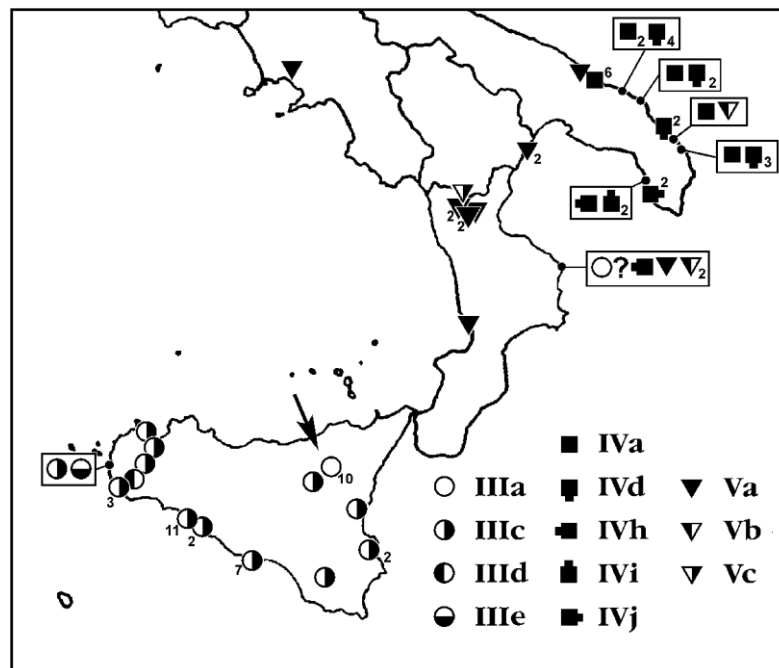


Figura 44 - Distribuzione degli aplotipi del mtDNA in Sicilia e nel Sud Italia; modificato da Fritz *et al.*, 2005a). La linea III è caratteristica per *E. trinacris*; la linea IV e V per le sottospecie di *E. orbicularis* dell'Italia continentale. La freccia indica la probabilità che un esemplare introdotto di *E.o.galloitalica* (aplotipo Va) catturato insieme a 10 *E. trinacris* (aplotipo IIIa; Lenk *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 2005a).

6.1.1 Pattern di diversità molecolare nella Testuggine palustre europea

Un crescente *corpus* di evidenze morfologiche e genetiche mostra come le popolazioni della Testuggine palustre europea (*Emys* sp.) possano essere ricondotte a dieci “linee evolutive” ben caratterizzate e organizzate secondo una profonda strutturazione filogeografica (e.g., Lenk *et al.* 1998, 1999; Fritz, 2003; Fritz *et al.*, 2004, 2005a,b, 2007, 2009a); sei di queste linee sono presenti in Europa (Fig. 45).

Sulla base del mtDNA, le popolazioni siciliane sono le più divergenti all'interno del genere e costituiscono il “*sister group*” di tutte le altre popolazioni di *Emys* sp.; questo ha portato alcuni autori (e.g. Pedall *et al.*, 2010) a considerare le popolazioni siciliane come la linea evolutiva basale dell'intero genere *Emys*. E' evidente che, le popolazioni siciliane sono ben caratterizzate e differenti dal resto delle popolazioni della testuggine palustre europea, così da essere descritta come nuova specie: *Emys trinacris* (Fritz *et al.*, 2005); tutte le altre popolazioni paleartiche del genere *Emys* sembrano invece afferire alla specie politipica *E. orbicularis*.

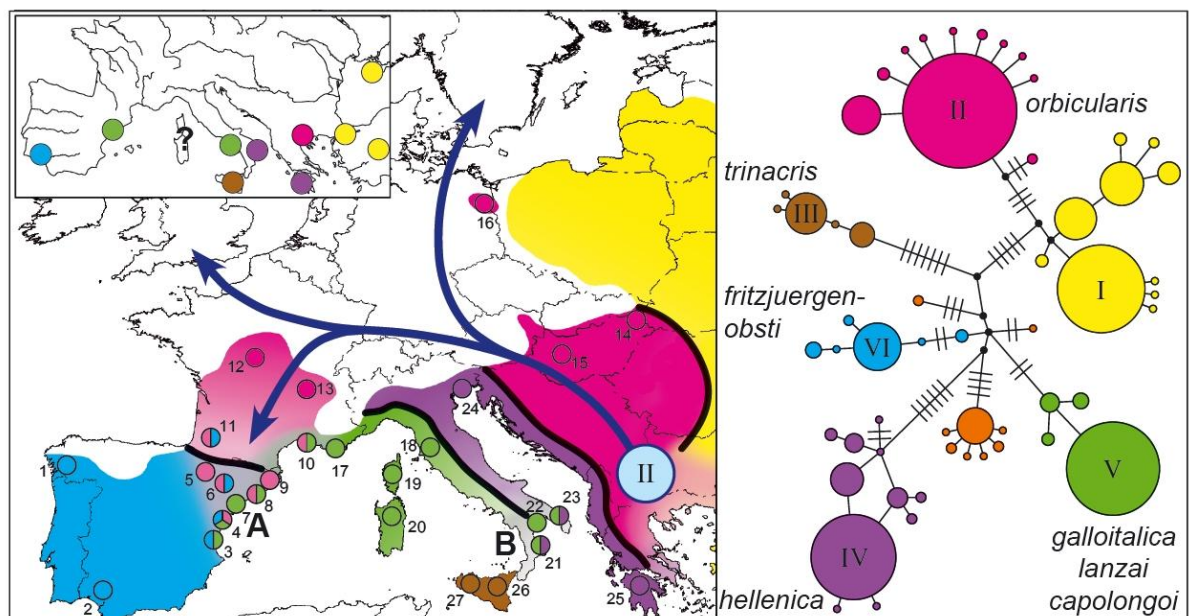


Figura 45 - Distribuzione e network aplotipico su base mitocondriale delle linee evolutive della Testuggine palustre (*Emys* spp.) riscontrate in Europa (da Pedall *et al.*, 2010, modificato).

In Pedall *et al.*, 2010, l'analisi della diversità e della distribuzione di diversità genetica, basata su un marcatore mitocondriale ed otto loci microsatellitari polimorfici, conferma che la testuggine palustre europea consiste di un certo numero di linee evolutive ben caratterizzate e tendenzialmente allopatriche, nell'ambito delle quali le popolazioni siciliane si mostrano come le maggiormente differenziate. Malgrado la stretta prossimità geografica delle popolazioni siciliane a quelle dell'Italia meridionale, non è stata riscontrata l'esistenza di alcun flusso genico tra queste, dando conferma dello status tassonomico di "*bona species*" per *Emys trinacris*. In buon accordo con il "*southern richness vs. northern purità paradigm*" (Schmitt, 2007), la funzione dell'Italia meridionale e della Sicilia come aree di rifugio durante le glaciazioni Plio-Pleistoceniche, con la conseguente sopravvivenza *in situ* di una elevata diversità genetica, è così confermata anche per le testuggini palustri, in buon accordo con quanto osservato in numerosi altri *taxa* di vertebrati: anfibi dei generi *Bufo*, *Hyla*, *Rana* e *Pelophylax* (Stöck *et al.* 2008; Canestrelli & Nascetti 2008, Canestrelli *et al.* 2008), rettili dei generi *Lacerta* e *Podarcis* (Bhôme *et al.* 2007) ed altri ancora.

Le popolazioni siciliane della Testuggine palustre si sono mostrate chiaramente distinte dalle altre, non mostrando aree di simpatria delle linee individuate su base mitocondriale né una condivisione allelica che suggerisca l'esistenza di un flusso genico attuale tra le popolazioni siciliane e quelle dell'Italia meridionale.

L'utilizzo di marker mitocondriali e nucleari dal diverso tasso evolutivo ha consentito di indagare i rapporti tra le popolazioni studiate su differenti e complementari scale temporali. I dati di mtDNA consentono infatti di ricostruire la storia evolutiva dei *taxa* oggetto di studio ma non posseggono la risoluzione sufficiente per effettuare inferenze sulla esistenza ed intensità del flusso genico attuale tra popolazioni, né di consentire una identificazione a livello individuale della identità e relazioni di parentela degli esemplari indagati; a questo fine risultano invece idonei i marker microsatellitari, ereditati per via biparentale e caratterizzati da un tasso di mutazioni molto elevato. A differenza del DNA mitocondriale, utile al fine di ricostruire la filogeografia storica dei *taxa* oggetto delle indagini, i microsatelliti sono infatti caratterizzati da un elevato livello di polimorfismo, legato a sua volta a tassi di mutazione più elevati rispetto a quanto si osserva in altre regioni del genoma; i microsatelliti si mostrano quindi come marcatori ideali per studiare la connettività inter-popolazionale ed il flusso genico attuale tra popolazioni.

6.1.2 Obiettivi

Nostro intento nell'ambito di questa ricerca è stato di valutare la struttura genetica di *Emys trinacris* nel territorio siciliano, ipotizzando la presenza di eventuali subpopolazioni. Per fare ciò si sono impiegati come marker molecolari i microsatelliti riconosciuti come validi strumenti per l'identificazione delle variabilità genetica intrapopolazionale

6.2 Materiali e metodi

6.2.1 Campionamento

Sono stati prelevati i campioni di sangue da 53 esemplari provenienti da 11 località differenti, oltre ai nostri tre siti di campionamento. Le testuggini sono state catturate mediante l'utilizzo di nasse e il campione di sangue è stato prelevato con un siringa dalla vena coccigea di ogni singolo esemplare. Gli animali sono poi stati immediatamente liberati nel loro sito di provenienza.

I campioni di sangue sono stati conservati in EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) (0,1 M Tris, pH 7,4, 10% EDTA, 1% NaF, 0,1 thymol) e processati immediatamente, o conservati in etanolo e mantenuti a -20° C fino al momento del processamento (cf. Wink, 1998).

6.2.2 Estrazione ed amplificazione del DNA

Tutte le analisi sono state effettuate nel Laboratorio di Biologia Molecolare del Senckenberg Naturhistorischer Sammlungen Dresden – Museum fuer Tierkunde, dall'equipe del Prof. Uwe Fritz.

Il DNA genomico è stato estratto dai campioni di sangue dopo un incubazione a 37°C in un buffer di lisi (10 mM Tris, pH 7,5, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 1% SDS) con 1 mg di proteasi K (Merck, Darmstadt), seguita da una estrazione standard con fenolo/cloroformio (Sambrook *et al.* 1989). Il DNA è stato poi precipitato dal supernatante con 0.8 volumi di isopropanolo freddo, centrifugato, lavato, asciugato e sospeso nuovamente in un buffer TE.

Sono stati amplificati quattro loci di microsatelliti isolati per *Emys orbicularis* da Pedall *et al.* (2009) seguendo le stesse condizioni di amplificazione e *genotyping*.

6.2.3 Analisi molecolari

La struttura di popolazione è stata investigata in via preliminare tramite analisi Bayesiana; in tal modo si è valutato se i criteri soggettivi di assegnazione individuale di entità predefinite sono coerenti con informazioni di carattere genetico che riflettono la storia filogeografica di una specie animale, e quindi di studiare la struttura delle metapopolazioni di testuggine palustre siciliana. Un approccio di questo tipo è importante perché le attribuzioni *a priori* sulla provenienza degli individui di una popolazione o di un determinato gruppo in base a caratteristiche geografiche, ecologiche o morfologiche non possono non corrispondere con quelle derivanti dalle informazioni genetiche e quindi con la storia evolutiva di una specie. Per fare questo abbiamo utilizzato un modello basato su analisi di *cluster* implementato utilizzando STRUCTURE, un programma realizzato da Pritchard *et al.* (2000). Questo software permette di identificare il numero di *cluster* genetici in cui si raggruppano gli individui in base ai loro genotipi indipendentemente dalla loro origine geografica. In particolare il software identifica il numero più probabile di *clusters* genetici in base ad un valore di probabilità. Questo metodo considera un insieme di genotipi individuali che si assume abbia avuto origine da un numero sconosciuto di popolazioni “K”, o *clusters*, e assegna probabilisticamente gli individui alle popolazioni sulla base dei loro genotipi, o congiuntamente a due o più popolazioni se i loro genotipi indicano eventi di ibridizzazione. Questo metodo consente di stabilire se il corredo genetico di ogni singolo individuo è tratto da più di una delle “K” popolazioni senza assumere a priori il numero di popolazioni in cui è suddiviso il campione in esame.

Il metodo stima il numero più appropriato (K) di popolazioni necessarie per interpretare la diversità dei genotipi osservati. Questa è la probabilità a posteriori di K, o la probabilità di osservare X genotipi dato un certo numero di popolazioni K, $P(X | K)$. Il programma assegna gli individui sulla base del loro genotipo e fornisce la proporzione del genoma di tartaruga originato da una certa popolazione (*cluster*). Il numero di popolazioni con la massima probabilità a posteriori viene identificato e la composizione proporzionale del genoma di ogni tartaruga viene utilizzata per determinare la somiglianze o differenze tra luoghi di campionamento. Il programma implementa una procedura bayesiana mediante una Catena di Markov Monte Carlo (MCMC) ed è stato inizialmente eseguito senza porre informazioni a priori sul numero di popolazioni, usando un burning di 25.000 iterazioni per un numero possibile di popolazioni da $K = 1$ a $K = 15$ usando 75.000 ripetizioni MCMC. Abbiamo impostato 10 ripetizioni indipendenti per ogni K per verificare che il valore del logaritmo

della probabilità dei dati, $\text{LnP}(D)$, fosse coerente nelle 10 ripetizioni. Ripetizioni indipendenti hanno prodotto valori di $\text{LnP}(D)$ coerenti.

6.3. Risultati

L'analisi consiste di due fasi, allo scopo di stabilire 1) il numero di popolazioni più appropriato per interpretare data la probabilità a posteriori di K o la probabilità di osservare X genotipi data una certa K), e 2) le modalità di raggruppamento dei genotipi individui nelle diverse popolazioni o clusters una volta identificato il valore di K con la probabilità a posteriori più alta. L'analisi di struttura di popolazione ha rilevato un valore massimo di $\text{LnP}(D)$ per $K = 1$ per cui risulta evidente che il campione di *Emys* è costituito da una sola popolazione.

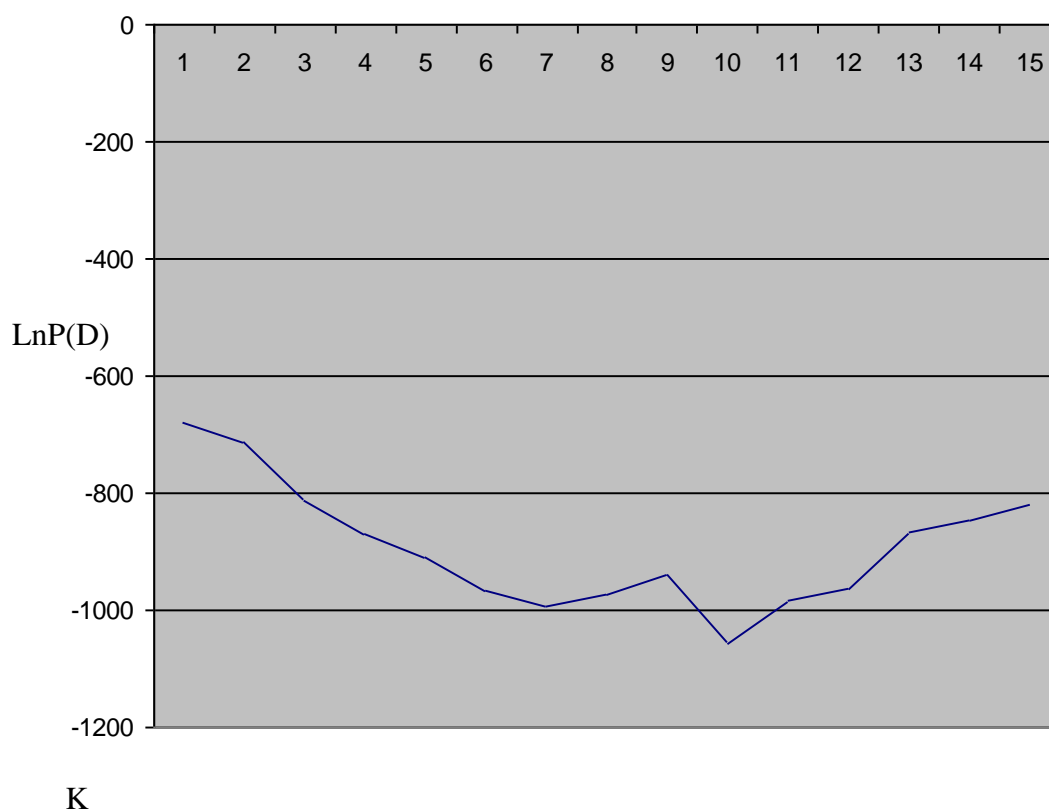


Figura 46 - Logaritmo naturale della probabilità dei dati, $\text{LnP}(D)$, per un numero probabile di popolazioni (K) compreso tra 1 e 15.

Abbiamo poi utilizzato $K = 1$ come informazione a priori sul numero di popolazioni per calcolare la probabilità a posteriori di assegnazione dei singoli individui. Ogni tartaruga aveva il 100% del genoma assegnato al singolo *cluster* individuato dall'analisi, sostenendo

l'assenza di una forte struttura di popolazione in Sicilia (Figura 46a).

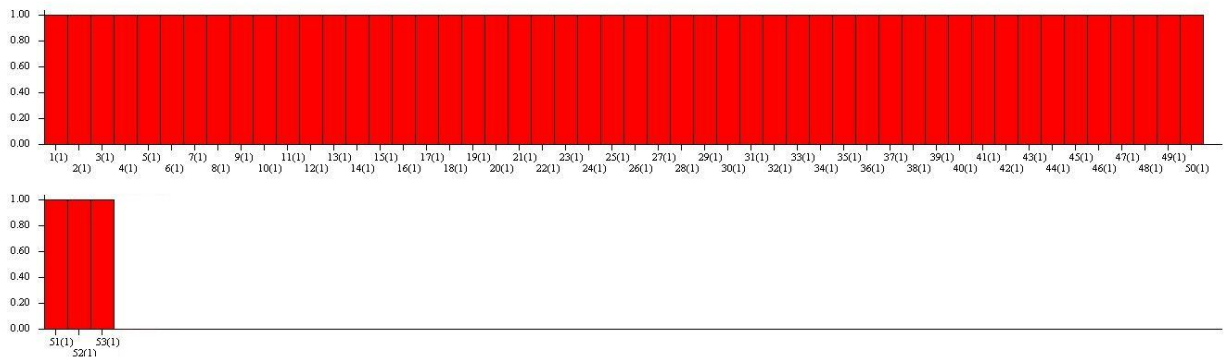


Figura 46a. Proporzione del genoma di ognuna delle 53 testuggini analizzate appartenente alla popolazione (cluster) con la più alta probabilità a posteriori di spiegare i genotipi multilocus.

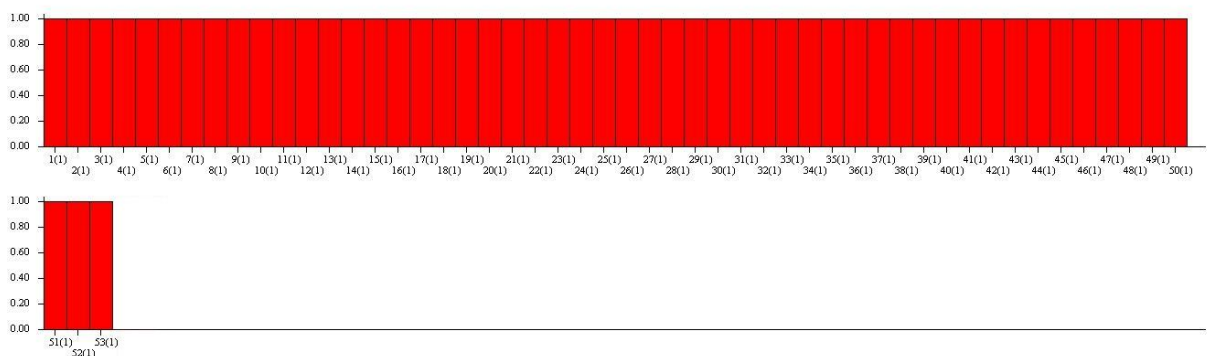


Figura 46b. Proporzione del genoma di ognuna delle 53 testuggini analizzate di appartenenza alla popolazione (cluster) con la più alta probabilità a posteriori di spiegare i genotipi.

Informazioni a priori circa le aree geografiche di campionamento sono state incorporate in un'ulteriore analisi utilizzando le stesse impostazioni di cui sopra, con una probabilità a priori di un individuo di essere un migrante $v = 0,025$, un tasso di migrazione relativamente basso. In questo caso il modello considera la possibilità di avere individui ibridi e determina la proporzione q del genoma di ogni singolo individuo di provenire o meno da una singola popolazione. I risultati sono identici a quelli che si trovano senza informazione preventiva sui siti di campionamento (Figura 46b) e confermano lo scenario secondo il quale le testuggini palustri siciliane appartengano ad una singola popolazione anziché provenire da demi differenti.

6.4. Discussione

6.4.1 Struttura genetica popolazionale delle popolazioni siciliane

Seppur preliminare, il valore di $K=1$ potrebbe rispecchiare la reale struttura genetica di popolazione di *Emys trinacris* considerando che la specie, nonostante soggetta ad isolamento geografico causato dalla totale distruzione e frammentazione dell'habitat in cui vive, mostra un'elevata tendenza allo spostamento specialmente nei maschi e nei sub adulti fenomeno legato sia alla colonizzazione di nuove aree sia alla ricerca della femmina. D'altra parte l'esperato isolamento geografico attuale di alcune popolazioni potrebbe essere correlato ad un isolamento genetico non evidenziato nei risultati riportati a causa dell'esiguo numero di campioni finora analizzati, o essere frutto di una frammentazione ambientale molto recente, che non ha ancora lasciato tracce leggibili con i marcatori utilizzati. A tal proposito riteniamo utile fare riferimento anche a risultati preliminari di questo studio, che ritroviamo nell'ambito di un lavoro finalizzato ad individuare le aree di "contatto secondario" tra le linee evolutive europee delle testuggini del genere *Emys* (Pedall *et al.*, 2010). In figura 47, con colorazione marrone, si evidenziano tra gli altri, proporzioni di genoma di testuggini siciliane provenienti da un laghetto naturale situato a circa 1400 m slm sui monti Nebrodi, in provincia di Messina. Durante questi anni, si decise di campionare *una tantum* la popolazione di questo laghetto, proprio perché, per la sua particolare localizzazione e altitudine, rappresentava la possibilità concreta di un isolamento geografico e delle sue conseguenze. I risultati, evidenti in figura 47 in marrone, sono in accordo con il nostro preliminare risultato, ovvero anche il confronto con una popolazione estremamente isolata geograficamente (quella dei Nebrodi) conferma l'omogeneità dei genotipi osservati.

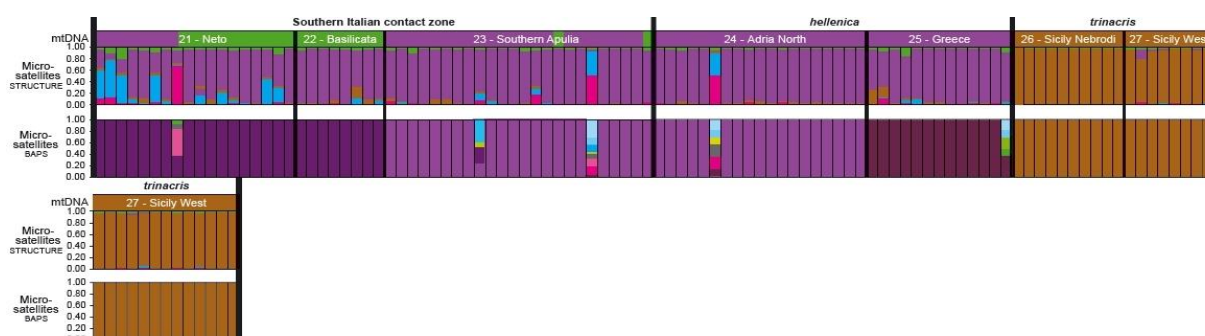


Figura 47 - Esiti delle analisi a livello individuale del mtDNA e dei barplots micro satellitari ricavati dalle analisi effettuate con STRUCTURE. I colori rispecchiano quelli della figura 45 (Pedall *et al.*, 2010).

7 - CONCLUSIONI

Quando ci siamo avventurati nel deserto di informazioni che riguardano la specie *Emys trinacris*, recente endemismo siciliano e per questo ancora poco conosciuto, non immaginavamo che i tasselli del nostro lavoro, inizialmente apparentemente scollegati tra di loro, si sarebbero incastrati invece così saldamente.

L'analisi morfologica, da cui siamo partiti, ancora una volta ha messo in evidenza tutto lo spettro di variabilità che troviamo nella congenerica *orbicularis*. In questo senso, mentre due popolazioni studiate sono risultate sovrapponibili per pattern e dimensioni medie, la terza, Mazara, si discosta completamente dalle altre due. La scelta dei tre siti, ha avuto origine anche dal fatto che sembrava rappresentassero tre situazioni diverse per ubicazione e per caratteristiche. Due aree protette con diversi problemi di pressione antropica e diverse modalità di gestione ed un laghetto artificiale inserito in un puzzle di terreni variamente coltivati.

Il valore di *sex ratio* emerso, evidentemente sbilanciato verso il sesso maschile, appare a nostro avviso dipendente dalla maggiore ampiezza di *home range* dei maschi della specie e che possa essere quindi una *sex ratio* legata alla cattura.

A completare il quadro, l'incastro perfetto tra il dato matematico della minore taglia degli individui appartenenti alla popolazione di Mazara del Vallo e il risultato dell'effetto dell'accumulo di lantanidi nello scheletro di questi animali che, non solo ne inibirebbe la crescita ma potrebbe anche portare alla morte gli stessi.

Per quanto riguarda la struttura genetica della popolazione Siciliana, l'applicazione del programma STRUCTURE, ci ha permesso, seppur in maniera molto preliminare, considerato purtroppo l'esiguo numero di campioni esaminati, di sostenere ad oggi che, le *Emys* siciliane considerate in questo studio, rappresentino un'unica popolazione, ovvero che ogni singola testuggine esaminata ha il 100% del genoma, assegnato ad un singolo *cluster*, individuato dall'analisi e ciò sostiene l'assenza di una forte struttura di popolazione in Sicilia.

Probabilmente da uno studio basato su un numero di campioni maggiore, che peraltro abbiamo già collezionato e che sono in fase di analisi, si potranno avere informazioni statisticamente rappresentative.

8 - BIBLIOGRAFIA

Anan, Y., Kunito, T., Watanabe, I., Sakai, H., & Tanabe, S., (2001). Trace element accumulation in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) and green turtles (*Chelonia mydas*) from yaeyama islands, japan. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(12), 2802-2814.

Andreani, G., Santoro, M., Cottignoli, S., Fabbri, M., Carpenè, E., & Isani, G., (2008). Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Science of the Total Environment*, 390(1), 287-294.

Ardizzoni, C., Fritz, U., (1998). Some morphological data on pond turtles *Emys orbicularis* of Sicily.: In Fritz U. *et al.* Proceedings of the EMYS Symposium. Dresden 96, *Mertensiella* 10, 287-288.

Austin, J.J., Arnold, E.N., Bour, R. (2003): Was there a second adaptive radiation of giant tortoises in the Indian Ocean? Using mitochondrial DNA to investigate speciation and biogeography of *Aldabrachelys*. *Molecular Ecology* 12: 1415-1424.

Auffenberg W., Iverson J.B., 1979. Demographi of terrestrial turtles. In:Turtles: perspective and research. Edited by M. Harless and H. Morlock. John Wiley and sons, New York and Chichester. Pp. 541-369.

Autori vari, 2008. Atlante della Biodiversità della Sicilia: vertebrati terrestri. Studi e Ricerche, 6, Arpa Sicilia, Palermo. ISBN 978-88-95813-02-8.

Bau, M. and Dulski, P., (1996) Controls of the fractionation of isovalent trace elements in magmatic and aqueous systems: Evidence from Y/Ho, Zr/Hf, and lanthanide tetrad effects. *Contrib. Mineral. Petrol.* 123, 323–333.

Begon, M., (1979). Investigating Animal abundance. Arnold ed., London, 97pp.

Bosc, E., Bricaud, A., & Antoine D., (2004). Seasonal and interannual variability in algal biomass and primary production in the mediterranean sea, as derived from 4 years of Sea WiFS observations. *Global Biogeochemical Cycles*, 18(1), GB1005 1-17.

Bohme M, Fritz U, Kotenko T, Dz'ukic' G, Ljubisavljevic' K, Tzankov N, Berendonk TU (2007). Phylogeography and cryptic variation within the *Lacerta viridis* complex. *Zool Scr* 36:119–131.

Bonfiglio, L., Insacco, G., Marra, A. C. & Masini, F., (1997). Large and small mammals, amphibians and reptiles from a new late Pleistocene fissure filling deposit of the

- Hyblean Plateau (South Eastern Sicily). *Bollettino della Società Paleontologica Italiana*, 36, 97–122.
- Boyer, D.R., (1965). Ecology of the basking habit in turtles. *Ecology*; 46, 99-118.
- Burbrink, F.T., Lawson, R., Slowinski, J.B. (2000): Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution* 54: 2107-2118.
- Bright, C. A., Cruse, A. M., Lyons, T. W., MacLeod, K. G., Glascock, M. D., & Ethington, R. L. (2009). Seawater rare-earth element patterns preserved in apatite of pennsylvanian conodonts. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 73(6), 1609-1624.
- Brown, R.P., Pestano, J. (1998): Phylogeography of skinks (Chalcides) in the Canary Islands inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 7: 1183-1191.
- Brullo S., Furnari F., (1976). Le associazioni vegetali degli ambienti palustri costieri della Sicilia. *Not. Fitosoc.*, 11: 1-43.
- Bulgarini F., Calvario E., Fraticelli F., Petretti F., Sarrocco S. (Eds.), (1998) - Libro Rosso degli Animali d'Italia – Vertebrati. WWF Italia, Roma.
- Bull J.J., 1980. Sex determination in reptiles. *Quart. Rev. Biol.* 55:3-21.
- Bury, R.B., (1979). Population ecology of freshwater turtles. In: *Turtles: perspective and research*. Edited by M. Harless and H. Morlock. John Wiley and sons, New York and Chichester. pp.571-602.
- Byrne, R. H., Liu, X., & Schijf, J., (1996). The influence of phosphate coprecipitation on rare earth distributions in natural waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(17), 3341-3346.
- Canestrelli D, Nascetti G (2008). Phylogeography of the pool frog Rana (*Pelophylax*) lessonae in the Italian peninsula and Sicily: multiple refugia, glacial expansions and nuclear-mitochondrial discordance. *J Biogeogr* 35:1923–1936.
- Canestrelli D, Zangari F, Nascetti G (2006). Genetic evidence for two distinct species within the Italian endemic Salamandrina terdigitata (Bonnaterre, 1789). *Herpetol J* 16:221–227.
- Cagle, F.R., (1939). A system of marking turtles for future identification. *Copeia*, 1939, 2: 170-173.

- Cagle, F.R., (1944). Home Range, homing behavior and migration in turtles. Misc. Pul. Mus. Zool.Univ:Mich., 61: 1-34.
- Cagle, F.R., (1952). A Louisiana terrapin population (*Malachemys*) Copeia, pp. 74-76.
- Carr A.F., 1952. Handbook of turtles. Comstock, Ithaca, N.Y.
- Cardellicchio, N., Giandomenico, S., Ragone, P., & Di Leo, A., (2000). Tissue distribution of metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the apulian coasts, southern italy. Marine Environmental Research, 49(1), 55-66.
- Caurant, F., Bustamante, P., Bordes, M., & Miramand, P., (1999). Bioaccumulation of cadmium, copper and zinc in some tissues of three species of marine turtles stranded along the French atlantic coasts. Marine Pollution Bulletin, 38(12), 1085-1091.
- Carranza, S., Arnold, E.N. (2003): History of West Mediterranean newts, *Pleurodeles* (Amphibia, Salamandridae) inferred from old and recent DNA sequences. Systematics and Biodiversity 1: 327-337.
- Censi, P., Zuddas, P., Randazzo, L. A., Saiano, F., Mazzola, S., Aricò, P., (2010). Influence of dissolved organic matter on rare earth elements and yttrium distributions in coastal waters. Chemistry and Ecology, 26(2), 123-135.
- Censi, P., Tamburo, E., Speziale, S., Zuddas, P., Randazzo, L. A., Punturo, R., (2011). Yttrium and lanthanides in human lung fluids, probing the exposure to atmospheric fallout. Journal of Hazardous Materials, 186(2-3), 1103-1110.
- CONVENZIONE DI BERNA DEL 19 SETTEMBRE 1979 . RATIFICATA DALL'ITALIA CON LEGGE N. 503 DEL 1983.
- Cusimano, G., Hauser S., Vassallo M. (2006). Hydrogeochemistry of a wetland area of southwestern Sicily (Italy) – [European Water Management Online 2006, 1-15]
- D'Angelo, S., tesi di Laurea- Università degli Studi di Palermo, anno accademico 2002- 2003.
- D'Angelo S., Lo Valvo, M. e M. A. L. Zuffi. (2004). Analisi biometrica di una popolazione di Testuggine palustre europea nella riserva naturale “Gorghi tondi e Lago Preola” (Sicilia sud occidentale). V Congresso della Societas Herpetologica Italica, Calci (PI).
- D'Angelo, S., Galia, F., Lo Valvo, M.,(2004) Caratterizzazione biometrica di due popolazioni di Sicilian pound turtle (*Emys trinacris*) della Sicilia sud occidentale.
- D'Angelo, S., Galia, F., Lo Valvo, M., (2004) Analisi biometrica di due popolazioni di Testuggine palustre europea (*Emys orbicularis* Linnaeus, 1758) della Sicilia sud-

- occidentale. 65° Congresso dell'Unione Zoologica Italiana. Taormina-Giardini Naxos (ME), 21-25 settembre 2004. Pagg. 93-94.
- D'Angelo, S., Regina, G., Galia, F., Lo Valvo, M., (2006) Estimation of sicilian pond turtle Population in the natural riserve "Torre Salsa" (South- western Sicily). Atti VI congresso nazionale SHI , 27 settembre - 1 ottobre 2006, Roma. Pag: 121.
- D'Angelo, S., Galia, F., Lo Valvo, M. (2008) - Biometric characterization of two Sicilian pond turtle (*Emys trinacris*) populations of south-western Sicily. Revista Espagnola Herpetologica, 22, 15-22.
- Darrah, T. H., Prutsman-Pfeiffer, J. J., Poreda, R. J., Ellen Campbell, M., Hauschka, P. V., & Hannigan, R.E. (2009). Incorporation of excess gadolinium into human bone from medical contrast agents. Metallomics, 1(6), 479-488.
- Digby, P.G.N., Kempton, R.A., (1987). Multivariate analysis of ecological communities. Chapman and Hall, London.
- Direttiva Habitat 92/43, Recepita dall'Italia con D.P.R. n.35 del 1997, successivamente modificato dal D.P.R. n.120/2003.
- Ecuyer, C., Grandjean, P., Barrat, J. -, Nolvak, J., Emig, C., Paris, F., *et al.* (1998). $\delta^{18}O$ and REE contents of phosphatic brachiopods: A comparison between modern and lower paleozoic populations. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 62(14), 2429-2436.
- Elbaz-Poulichet, F., Seidel, J., Othoniel, C. (2002). Occurrence of an anthropogenic gadolinium anomaly in river and coastal waters of southern France. Water Research, 36(4), 1102-1105.
- Fattizzo T., 2004. Basic morphological data and notes on natural history and conservation of a population of *Emys orbicularis* (l. 1758) in southern Apulia (Carovigno Salento). Italian Journal of Zoology Supp. 2: 191-193.
- Fisher, R.A., (1929). The genetical theory of natural selection. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.
- Forbes T.R., 1940. A note on reptilian sex ratio. Copeia, 132.
- Fritz, U., (1989). Zur innerartlichen Variabilitat von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 1. Eine neue Unterart der Europaischen Sumpfschildkrote aus Kleinasien *Emys orbicularis luteofusca* subsp. nov.- Salamandra, Bonn, 25(3/4):143-168.
- Fritz, U., (1992). Zur innerartlichen Variabilitat von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 2.

Variabilität in Osteuropa und Redefinition von *Emys orbicularis orbicularis* (Linnaeus 1758) und *E. o. hellenica* (Valenciennes, 1832).- Zool. Abh. Staatl. Mus. Tierkd. Dresden, 47: 131-155;

Fritz, U., 1993a. . Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 3. Zwei neue Unterarten von der Iberischen Halbinsel und aus Nordafrika, *Emys orbicularis fritzjuergenobsti* subsp. nov. Und *E. o. occidentalis* subs. Nov. – Zool. Abh. Staatl. Mus. Tierkd. Dresden, 47(11): 131-155.

Fritz, U., 1993b. . Weitere Mitteilung zur innerartlichen Variabilität, Chorologie und Zoogeographie von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) in Kleinasien.- Herpetozoa , Wien, 6(1/2):37-55

Fritz, U., 1995. Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 5. Taxonomie in Mittel-Westeuropa, auf Korsika, Sardinien, der Apenninen-Halbinsel und Sizilien und Unterartengruppen von *E. Orbicularis* (Reptilia, testudines: Emydidae). Zool. Abh. Mus. Tierk. Dresden 48:185-242.

Fritz, U., Obst F.J., 1995. Morphologische Variabilität in den Intergradationszonen von *Emys orbicularis orbicularis* und *E.o.hellenica*. Salamandra, 31: 157-180.

Fritz, U., 1996. Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). Intraspezifische Hierarchie und Zoogeographie. Zool. Abh. Staatl. Mus. Tierkd. Dresden, 49 (3): 31-37.

Fritz, U., Keller C., Budde M., 1996. Eine neue Unterart der Europäischen Sumpfschildkröte aus Südwestspanien, *Emys orbicularis hispanica* subsp. nov. Salamandra, Rheinbach, 32(3): 129-152

Fritz, U., 1998. Introduction to zoogeography and subspecific differentiation in *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). In: Fritz U., et al. (Eds.), Proceeding of the EMYS Symposium. Dresden 96, Mertensiella 10: 1-27.

Fritz, U., Guicking, D., Lenk, P., Joger, U., Wink, M. (2004): When distribution tells European history: mtDNA haplotypes of *Emys orbicularis* reflect in Germany former division by the Iron Curtain. Biologia 59 (Supplement 14): 19-25.

Fritz, U., D'Angelo, S., Pennisi, M.G., Lo Valvo, M., (2005). What makes a species a cryptic species- the case of *Emys trinacris*.

- Fritz, U., Fattizzo, T., Guicking, D., Tripepi, S., Pennisi, M.G., Lenk, P., Joger, U., Wink, M. (2005a): A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys*. *Zoologica Scripta* 34: 351-371.
- Fritz, U., Cadi, A., Cheylan, M., Coïc, C., Détaint, M., Olivier, A., Rosecchi, E., Guicking, D., Lenk, P., Joger, U., Wink, M. (2005b): Distribution of mtDNA haplotypes (*cyt b*) of *Emys orbicularis* in France and implications for postglacial recolonization. *Amphibia-Reptilia* 26: 231-238 [Erratum: *Amphibia-Reptilia* 27 (2006): 157].
- Fritz, U., D'Angelo, S., Pennisi, M.G., Lo Valvo, M., (2006) Variation of Sicilian pond turtles, *Emys trinacris* What makes a species cryptic.
- Fritz, U., D'Angelo, S., Pennisi, M. G., Lo Valvo, M. (2006). Variation of Sicilian pond turtles, *Emys trinacris* –What makes a species cryptic *Amphibia-Reptilia*. 27, 513-529.
- Fritz, U., Barata, M., Busack, S.D., Fritzsich, G., Castilho, R. (2006a): Impact of mountain chains, sea straits and peripheral populations on genetic and taxonomic structure of a freshwater turtle, *Mauremys leprosa*. *Zoologica Scripta* 35: 97-108.
- Fritz, U., D'Angelo, S., Pennisi, M. G., Lo Valvo, M. (2006b): Variation of Sicilian pond turtles, *Emys trinacris* – What makes a species cryptic? *Amphibia- Reptilia* 27: 513-529.
- Fritz, U., Hundsdörfer, A.K., Šíroký, P., Auer, M., Kami, H., Lehmann, J., Mazanaeva, L.F., Türkozan, O., Wink, M. (2007): Phenotypic plasticity leads to incongruence between morphology-based taxonomy and genetic differentiation in western Palearctic tortoises (*Testudo graeca* complex; Testudines, Testudinidae). *Amphibia- Reptilia* 28: 97-121.
- Fujimori, E., Hayashi, T., Inagaki, K., & Haraguchi, H. (1999). Determination of lanthanum and rare earth elements in bovine whole blood reference material by ICP-MS after coprecipitation preconcentration with heme-iron as coprecipitant. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 363(3), 277-282.
- Gariboldi, A., Zuffi, M.A.L.,(1994). Notes on the population reinforcement project for *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758), in a natural park of northwestern Italy. (Testudines: Emididae). *Herpetozoa*, 7: 83-89.
- García-Fernández, A. J., Gómez-Ramírez, P., Martínez-López, E., Hernández-García, A., María-Mojica, P., Romero, D., et al. (2009). Heavy metals in tissues from loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the southwestern mediterranean (Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 557-563.

- Giannaroli, M., Lanzi A., Fontana, R., (2001). Utilizzo di trappole del tipo “bagno di sole artificiale” per la cattura di testuggini palustri. *Pianura*, 13: 153-155.
- Gibbons, J.W. (1968). Observation on the ecology and population dynamics of the blanding’s turtle *Emidoidea blandingi*. *Can.J. Zool.*, 46:288-290.
- Gibbons, J.W., (1968a). Reproductive potential, activity, and cycles in the painted turtle, *Crysemys picta*. *Ecology*, 49(3):399-409.
- Gibbons, J.W., (1989). Sex ratios and their significance among turtle populations. In: Life history and ecology of the slider turtle. Edited by: J.W. Gibbons. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. In Press.
- Gibbons, J.W.,(1970). Terrestrial activity and population dynamics of aquatic turtles *Amer. Midl.Nat.*, 83(2): 404-414.
- Gibbons, J.W.,(1990).Sex ratio and their significance among turtle populations. Life history and ecology of the slider turtle. J.W.Gibbons ed. Smithsonian Inst. Press, Washington, D.C., USA. pp 171-182.
- Girondot, M., Pieau, C., (1993). Effect of sexual differences of age at maturity and survival on population sex-ratio.
- Graham, T.E., (1979). Life history techniques. Harless M. & Morlock (eds). *Perspectives and Reserch*. New York (Wiley); 73-95.
- Gregory, P.J., (1982). Reptilian hibernation. In *biology of the Reptila*. Vol. 13. Physiology D. Physiological ecology. Academic Press, London. pp 53-153. experiment: Biogeochemical implications. *Marine Chemistry*, 120(1-4), 164-178.
- Guieu, C., Loÿe-Pilot, M., Benyahya, L., & Dufour, A. (2010). Spatial variability of atmospheric fluxes of metals (al, fe, cd, zn and pb) and phosphorus over the whole mediterranean from a one-year monitoring.
- Guicking, D., Lawson, R., Joger, U., Wink, M. (2006): Evolution and phylogeny of the genus *Natrix*. *Biological Journal of the Linnean Society* **87**: 127-143.
- Harris, D.J., Carranza, S., Arnold, E.N., Pinho, C., Ferrand, N. (2002): Complex biogeographical distribution of genetic variation within *Podarcis* wall lizards across the Strait of Gibraltar. *Journa l of Biogeography* **29**: 1257- 1262.
- Harless M., Morlock H., 1979. *Turtles. Perspectives and research*. John Wiley & Sons, New York 1979.

- Haley, B.A., Klinkhammer, G.P., McManus, J. Rare earth elements in pore waters of marine sediments (2004. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68 (6), pp. 1265-1279.
- Hewitt, G.M. (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Herwartz, D., Tütken, T., Münker, C., Jochum, K.P., Stoll, B., Sander, P.M., 2011. Timescales and mechanisms of REE and Hf uptake in fossil bones. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75 (1), 82–105.
- Iverson J.B., 1991. Patterns of survival in turtles (order testudines) *Can. J. Zool.* 69: 385-39
- Kotenko, T., Zinenko, O., Guicking, D., Sauer-Gürth, H., Wink, M., Fritz, U. (2005): First data on the geographic variation of *Emys orbicularis* in Ukraine: mtDNA haplotypes, coloration, and size. In: *Herpetologica Petropolitana. Proceedings of the 12th Ordinary General Meeting of the Societas Herpetologica Europaea*, August 12-16, 2003, St. Petersburg. Ananjeva, N., Tsinenko, O., Eds. *Russian Journal of Herpetology* 12 (Supplement): 43-46.
- Krom, M. D., Herut, B., & Mantoura, R. F. C. (2004). Nutrient budget for the eastern mediterranean: Implications for phosphorus limitation. *Limnology and Oceanography*, 49(5), 1582-1592.
- Kulaksiz, S., & Bau, M. (2011). Rare earth elements in the rhine river, Germany: First case of anthropogenic lanthanum as a dissolved microcontaminant in the hydrosphere. *Environment International*, 37(5), 973-979.
- Kulaksiz, S., and Bau, 2011; Rare earth elements in the Rhine River, Germany: First case of anthropogenic lanthanum as a dissolved microcontaminant in the hydrosphere. *Geoch. Cosmoc. Acta* 75, 82-105).
- Kulkarni, P., Chellam, S., Flanagan, J. B., & Jayanty, R. K. M. (2007). Microwave digestion-ICP-MS for elemental analysis in ambient airborne fine particulate matter: Rare earth elements and validation using a filter borne fine particle certified reference material. *Analytica Chimica Acta*, 599(2), 170-176.
- Kulkarni, P., Chellam, S., & Fraser, M. P. (2006). Lanthanum and lanthanides in atmospheric fine particles and their apportionment to refinery and petrochemical operations in houston, TX. *Atmospheric Environment*, 40(3) 508-520.
- Kulkarni, P., Shankararamanc, C., Fraser, M.P. 2007; Tracking Petroleum Refinery Emission

Events Using Lanthanum and Lanthanides as Elemental Markers for PM2.5), Environ. Sci. Tech. 41, 6748-6754;

Lanza B., 1983. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane. Amphibia-Reptilia, 27. Collana del progetto finalizzato "Promozione della qualità dell'ambiente". C.N.R. AQ/1/205, Rome. 196 pp.

Lécuyer, C., Reynard, B., Grandjean, P. (2004). Rare earth element evolution of Phanerozoic seawater recorded in biogenic apatites Chemical Geology, 204 (1-2), pp. 63-102.

Ley-Quinónez, C., Zavala-Norzagaray, A. A., Espinosa-Carreón, T. L., Peckham, H., Marquez-Herrera, C., Campos-Villegas, L., et al. (2011). Baseline heavy metals and metalloid values in blood of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Baja California Sur, Mexico. Marine Pollution Bulletin, 62(9), 1979-1983.

Lebboroni, M., 1989. Eco-etologia della tartaruga palustre europea *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758) in un'area del Parco naturale della Maremma. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche. Università di Firenze. Facoltà di Scienze Mat. Fis. e Nat.

Lebboroni, M., Chelazzi, G., 1991. Activity patterns of *Emys orbicularis* L. (Chelonia Emydidae) in central Italy, Ethol. Ecol. Evol., 3:257-268.

Lenk, P., Fritz, U., Joger, U., Winks, M., (1999). Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). Molecular Ecology, 8: 1911-1922.

Lenk, P., Joger, U., Fritz, U., Heidrich, P., Wink, M. (1998). Phylogeographic patterns in the mitochondrial cytochrome b gene of the European pond turtle *Emys orbicularis*, first results. In: Fritz U., et al. (eds): Proceeding of the EMYS Symposium Dresden 96. Mertensiella, Rheinbach, 10: 159-175.

Lenk, P., Fritz, U., Joger, U., Wink, M. (1999): Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). Molecular Ecology 8: 1911-1922.

Lo Valvo, M., D'Angelo, S., (2004) Stima della popolazione di testuggine palustre europea presente nella riserva naturale "Lago Preola e Gorgi Tondi" (Sicilia sud Occidentale) Atti V congresso nazionale della SHI.

L.R.6 Maggio 1981. N. 98 e 9 Agosto 1998, N. 14 "Norme per l'Istituzione nella Regione Siciliana di Parchi e Riserve Naturali"

- Lo Valvo, F. e Longo, M. A., (2001) Anfibi e rettili in Sicilia Società Siciliana Scienze Naturali WWF.
- Lo Valvo M., D'Angelo S., Regina G., 2008. Applicazioni di radiotracking in Testuggine palustre siciliana (pp. 328-330). In: Corti C. (ed.), 2008. Herpetologia Sardiniae. Societas Herpetologica Italica/Edizioni Belvedere, Latina, "le scienze " (8): 504 pp.
- Mazzotti S., 1995. Population structure of *Emys orbicularis* in the Bardello (Po Delta, Northern Italy). *Amphibia-Reptilia*, 16: 77-85.
- McAuliffe, J.R., (1978). Seasonal migrational movements of a population of the western painted turtle, *Crysemys picta belli* (Reptilia, Testudines, Emididae), *J. Herpetol.*, 12:143-149.
- Moreno, T., Querol, X., Alastuey, A., & Gibbons, W. (2008). Identification of FCC refinery atmospheric pollution events using lanthanoid and vanadium-bearing aerosols. *Atmospheric Environment*, 42(34), 7851-7861.
- Michard, A., (1989). Rare earth systematics in hydrothermal fluids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 53, 745–750.
- Michard, A. and Albarede, F. (1986). The REE contents of some hydrothermal fluids. *Chem. Geol.* 55, 51–60.
- Moll E.O., Legler J. M., 1971. The life history of a neo tropical slider turtle, *Pseudemys scripta* (Schoepff) in Panama. *Bull. Los Ang. Cty. Mus. Nat. Hist. Sci.* No. 11.
- Moller, P. and Giese, U. (1997). Determination of easily accessible metal fractions in rocks by batch leaching with acid cation-exchange resin. *Chem. Geol.* 137, 41–55.
- Moller, P., Dulski, P., Morteani, G. (2003). Partitioning of rare earth elements, yttrium and some major elements among source rocks, liquid and vapor of Larderello-Travale geothermal field, Tuscany (Central Italy). *Geochim. Cosmochim. Acta*, 67, 171-183.
- Mrosovsky N., Provanca J., 1992. Sex ratio of hachling loggerhead sea turtles: data and estimates from a 5 year study. *Can. J. Zool.* 70: 530-538.
- Odum (1988) edizione italiana a cura di Loreto Rossi Casa editrice Piccin Basi di Ecologia.
- Olmez, I., Sholkovitz, E. R., Hermann, D., & Eganhouse, R. P. (1991). Rare earth elements in sediments off southern california: A new anthropogenic indicator. *Environmental Science and Technology*, 25(2), 310-316.

- Ottonello, D., Jesu R., Genta, P., Ortale, S., Lamagni, L., Salvidio, S. (2010). Il “progetto Emys”: dieci anni di conservazione di *Emys orbicularis* in Liguria. 473 Atti VIII Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica.
- Pasteris, J. D. and Ding, D. Y. (2009). Experimental fluoridation of nanocrystalline apatite. *Am. Mineral.* 94, 53–63.
- Panagiotopoulos, A., Perlepes, S. P., Bakalbassis, E. G., Terzis, A., & Raptopoulou, C. P. (2010). Modelling the use of lanthanides(III) as probes at calcium(II) binding sites in biological systems: Preparation and characterization of neodymium(III) and calcium(II) malonamato(-1) complexes. *Polyhedron*, 29(12), 2465-2472.
- Pedall, I., Fritz, U., Stuckas, H., Valdeo ´n, A., Wink, M., 2010. Abstract J Zool Syst Evol Res doi: 10.1111/j.1439-0469.2010.00572.x
- Pieau, C., 1974 a. Sur la differenciation sexuelle chez des embryons d’ *Emys orbicularis* L. (Chélonien) issus d’œufs incubés dans le sol au cours de l’été 1973. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 99:363-376.
- Pieau, C., (1974) b. Différenciation du sexe en fonction de la température chez les embryons d’*Emys orbicularis* L., effets des hormones sexuelles. *Ann. Embryol. Morphog.* 7:365-394.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Podnar, M., Mayer, W., Tvrtkovi ´c, N. (2005): Phylogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 14: 575-588.
- Poulakakis, N., Lymberakis, P., Valakos, E., Pafilis, P., Zouros, E., Mylonas, M. (2005): Phylogeography of Balkan wall lizard (*Podarcis taurica*) and its relatives inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 14: 2433-2443.
- Raynaud A., Pieau C., 1985. Embryonic development of the genital system. *Biology of the Reptilia*. C.Gans ed. Vol.15(B) pp 149-300. John Wiley and sons. New York, USA.
- Reynard, B., Lécuyer, C., & Grandjean, P. (1999). Crystal-chemical controls on rare-earth element concentrations in fossil biogenic apatites and implications for paleoenvironmental reconstructions. *Chemical Geology*, 155(3-4), 233-241.

- Risley P.L., 1933. Observations on the natural history of the common musk turtle, *Stenoternus odoratus* (Latreille). Pap.Mich. Acad. Sci. Arts. Lett. 17 :685-711.
- Rovero, F., Chelazzi, G., (1996). Nesting migration in a population of European pond turtle *Emys orbicularis* (L.) (Chelonia Emididae) from central Italy, Ethol. Ecol. Evol.,8: 297-304.
- Sakai, H., Saeki, K., Ichihashi, H., Kamezaki, N., Tanabe, S., & Tatsukawa, R. (2000). Growth-related changes in heavy metal accumulation in green turtle (*Chelonia mydas*) from Yaeyama islands, Okinawa, Japan. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 39(3), 378-385.
- Servan, J., (1986). Utilisation d'un nouveau piège pour l'étude des populations de cistudes d'Europe *Emys orbicularis*. Rev. Ecol. (terre Vie), 41: 111-117.
- Servan, J., Baron, J.P., Bels, V., Bour, R., Lancon, M., Renon, G. (1986). Le marquage des tortues d'eau douce: application à la cistude d'Europe *Emys orbicularis*. Reptilia; Chelonii. Bull. Soc. Herp. F., 37: 9-17.
- Servan, J., Zaborski, P., Dorizzi, M., Pieau, C., (1989). Female biased sex-ratio in adult of the turtle *Emys orbicularis* at the northern limit of its distribution in France: a probable consequence of interaction of temperature with genotypic sex determination. Can. J. Zool. 67: 1279-1284.
- Servan, J., (1987). Use of radiotelemetry in an ecological study of *Emys orbicularis* in France, in Proceedings IV Ordinary general meeting SHE (Nijmegen): 357-361.
- Shields, G., & Stille, P. (2001). Diagenetic constraints on the use of cerium anomalies as palaeoseawater redox proxies: An isotopic and REE study of cambrian phosphorites. Chemical Geology, 175(1-2), 29-48.
- Shields, G. A., & Webb, G. E. (2004). Has the REE composition of seawater changed over geological time? Chemical Geology, 204(1-2), 103-107.
- Storelli, M., & Marcotrigiano, G. O. (2003). Heavy metal residues in tissues of marine turtles. Marine Pollution Bulletin, 46(4), 397-400.
- Stubbs D., Hailey A., Pulford E., Tyler W., 1984. Population ecology of European tortoises: review of field techniques. Amphibia-Reptilia, 5: 57-68.
- Surget-Groba, Y., Heulin, B., Guillaume, C.-P., Thorpe, R.S., Kupriyanova, L., Vogrin, N., Maslak, R., Mazzotti, S., Venczel, M., Ghira, I., Odierna, G., Leontyeva, O., Monney,

- J.C., Smith, N. (2001): Intraspecific phylogeography of *Lacerta vivipara* and the evolution of viviparity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18:449-459.
- Taylor, S. R., & McLennan, S. M. (1995). The geochemical evolution of the continental crust. *Reviews of Geophysics*, 33(2), 241-265.
- Taylor, D. M., & Leggett, R. W. (2003). A generic biokinetic model for predicting the behaviour of the lanthanide elements in the human body. *Radiation Protection Dosimetry*, 105(1-4), 193-198.
- Tinkle D.W., 1958. The systematics and ecology of the *Sternotherus carinatus* complex
Wermuth, H. & Mertens, R., (1961). Schildkroten, Krokodile, Bruckenechsen. –Jena (Fischer), XXVI : 442.
- White, G. C., Garrot, R.A., (1990). Analysis of wildlife radio-tracking data. Academic Press. Inc., San Diego.
- White, G.C., Garrot, R.A., (1986). Effects of biotelemetry triangulation error on detecting habitat selection. *J. Wildl. Mgmt.*, 50:509-513.
- (Testudinata, Chelydridae). *Tulane Stud. Zool.* 6:1-56.
- Janzen F.J., and Paukstis G.L., 1991. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution and experimental design. *Quart. Rev. Biol.* 66: 149-179
- Yang, X.C., Sachs, F., 1989. Block of stretch-activated ion channels in xenopus oocytes by gadolinium and calcium-ions. *Science* 243, 1068–1071.
- Voght R.C., 1980. Natural history of the map turtle *Graptemys pseudogeografica* and *Graptemys ouachitensis* in Wisconsin. *Tulane Stud. Zool. Bot.* 22: 17-48.
- Vogt, R.C. e Bull J.J., (1982). Temperature controlled sex-determination in turtles: ecological and behavioral aspects. *Herpetologica*, 38(1): 156-164.
- Stock M, Sicilia A, Belfiore N. M, Buckley D, Lo Brutto S, Lo Valvo, M. Arculeo, M. (2008). Post-Messinian evolutionary relationships across the Sicilian channel: mitochondrial and nuclear markers link a new green toad from Sicily to African relatives. *BMC Evol Biol* 8:56.
- Shannon, R.D., 1976. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr.* B25, 925-946.
- Schmitt, T., (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Front Zool* 4:11.

- Takahashi, Y., Châtellier, X., Hattori, K.H., Kato, K., Fortin, D. (2005). Adsorption of rare earth elements onto bacterial cell walls and its implication for REE sorption onto natural microbial mats *Chemical Geology*, 219 (1-4), pp. 53-67.
- Takahashi, Y., Hirata, T., Shimizu, H., Ozaki, T., Fortin, D. (2007). A rare earth element signature of bacteria in natural waters? *Chemical Geology*, 244, 569-583.
- Takahashi, Y., Kimura, T., Minai, Y. (2002). Direct observation of Cm(III)-fulvate species on fulvic acid-montmorillonite hybrid by laser-induced fluorescence spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66 (1), pp. 1-12.
- Trueman. C. N. and Tuross. N. (2002). Trace elements in recent and fossil bone apatite. In *Phosphates: Geochemical, Geobiological and Materials Importance* (eds. M.J. Kohn, J. Rakovan and J.M. Hughes). *Mineral. Soc Am. Rev. Mineral. Geochem.* 48, pp. 489–521.
- Trueman. C. N., Palmer. M. R., Field. J., Privat. K., Ludgate. N., Chavagnac. V., Eberth. D. A., Cifelli. R. and Rogers. R. R. (2008a). Comparing rates of recrystallisation and the potential for preservation of biomolecules from the distribution of trace elements in fossil bones. *C. R. Palevol* 7, 145–158.
- Zuffi, M.A.L., (1995). *Emys orbicularis* in Italia. In: *Red data Book on Mediterranean Chelonians* (D. Ballasina Ed.) Edagricole coprod. European Union. Rana International Foundation: 161-168.
- Zuffi, M.A.L., Ballasina, D.L.PH., (1998). Contribution to the knowledge of regional polymorphism of *Emys orbicularis* in Italy, and notes on the husbandry activities at the CARAPAX Centre. In: Fritz U. et al.(eds.): *Proceeding of the EMYS Symposium. Dresden 96. Mertensiella, Rheinbach*, 10: 279-286.
- Zuffi, M.A.L., Gariboldi, A., (1995). Sexual dimorphism of the European Pond Terrapin *Emys orbicularis* (L.,1758), from Italy. Llorente et al. (Eds). *Scientia Herpetologica* :124-129.
- Zuffi, M.A.L., Gariboldi, A., (1995). Geographical patterns of Italian *Emys orbicularis* : a biometrical analysis. In: Llorente G.A., Montori A., Santos X., Carretero M.A.Eds. *Scientia Herpetologica. Barcelona*, pp. 120-123..
- Zuffi, M.A.L., Odetti, F., Meozzi, P.,(1996). L'uso di tecniche manuali e radiografiche per lo studio della biologia riproduttiva di *Emys orbicularis*. 1° Congresso della Societas herpetologica Italica (S.H.I.), *Riassunti*:38-39.

- Zuffi, M.A.L., Odetti, F.,(1998). Double egg-deposition in the European pond turtle, *Emys orbicularis*, from central Italy. Ital. J. Zool., 65:187-189.
- Zuffi, M.A.L.,(2000). Conservation biology of the European pond turtle *Emys orbicularis* (L.), in Italy. Stapfia 69, zugleich Kataloge des oo.
- Zugg, G.R., 1991. Age determination in turtles. New York. SSAR Herpetological Circular, 20: 28.

Ringraziamenti:

moltissimi gli amici che mi hanno aiutato in questi, difficili, anni.

Salvo Mazzola, Paolo Censi, Angela Cuttitta, Mario Lo Valvo, Vincenzo Maccarrone, Gianpiero Pace, Giovanna Regina, Rosolino Filippi, Teresa Maggio, Federico Marrone, Claudio Ciofi, Uwe Fritz, Salvo Pasta, Marianna Musco, Loredana Randazzo. Ed ancora i Proff. Torricelli, Pavoni, Manente, Malavasi per la grande umanità e disponibilità.

Grazie ancora a Nicola Miotello.

A tutti, la mia grande riconoscenza.