

UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Facoltà di Scienze MM.FF.NN.

Dipartimento di Ecologia

Tesi di Dottorato in Biologia Vegetale

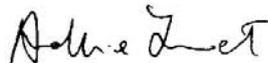
Settore Scientifico Disciplinare BIO 01

XVIII Ciclo (2003-2006)

“Confronto fra marcatori molecolari (ISSR ed SSR) e pattern di distribuzione della variabilità genetica in Posidonia oceanica (L.) Delile”

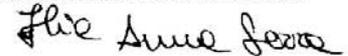
Docente Tutor

Prof. ssa A.M. Innocenti



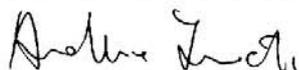
Candidata

Dott.ssa Ilia Anna Serra



Coordinatore
del Dottorato in Biologia Vegetale

Prof. ssa A.M. Innocenti



Novembre 2006

INDICE

CAPITOLO 1- INTRODUZIONE GENERALE	3
1.1-Angiosperme marine: definizione e tassonomia	4
1.2-Seagrasses nel Mediterraneo	5
1.2.1-<i>Posidonia oceanica</i>	6
1.3-Studio della variabilità genetica	9
1.4-Marcatori molecolari	10
1.4.1-Microsatelliti	11
1.4.2-SSR	12
1.4.3-ISSR	12
1.5-Area di studio	14
CAPITOLO 2-ANALISI DELLA DIVERSITÀ GENETICA IN <i>P. OCEANICA</i>: COMPARAZIONE DEI MARCATORI MOLECOLARI ISSR-SSR	20
2.1-Introduzione	20
2.2-Materiali e Metodi	22
2.3-Risultati	25
2.4-Discussione	33

CAPITOLO 3-PATTERN DI DISTRIBUZIONE DELLA DIVERSITÀ GENETICA DI <i>P.OCEANICA</i> NEL MEDITERRANEO	35
3.1-Introduzione	35
3.2-Materiali e Metodi	37
3.3-Risultati	39
3.3.1-Polimorfismo dei loci microsatelliti	39
3.3.2- Variabilità genetica delle popolazioni	40
3.3.3-Pattern di struttura genetica delle popolazioni e flusso genico	42
3.4-Discussioni	50
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	53
BIBLIOGRAFIA	56
PUBBLICAZIONE ORIGINALE	69

CAPITOLO 1- INTRODUZIONE GENERALE

Le fanerogame marine sono un gruppo di piante a fiore (Phylum: Angiospermae) che dominano con successo le acque costiere superficiali di tutti i continenti, eccetto l'Antartide (den Hartog, 1970).

Il nome "seagrasses" (dall'inglese sea: mare e grass: erba), con cui sono indicate nella letteratura scientifica, è dovuto alla loro morfologia che ricorda quella delle piante erbacee terrestri.

Anche se vivono totalmente sommerse, le seagrasses possiedono la tipica organizzazione in radici, fusto (o rizoma) e foglie delle piante superiori terrestri, si riproducono sessualmente mediante la formazione di fiori e frutti, e, generalmente, mostrano anche un'estesa crescita clonale.

La maggior parte delle specie, inoltre, forma ampie praterie monospecifiche, la cui densità può arrivare a 19000 ciuffi per m² (Procaccini et al. 2003).

L'influenza positiva di questo gruppo di piante nella produttività degli ecosistemi costieri ne ha fatto uno dei maggiori oggetti di studio dei biologi marini.

Le praterie a fanerogame marine, infatti, costituiscono l'habitat di un'ampia varietà di specie animali e vegetali, producono un'elevata quantità di sostanza organica e di ossigeno, stabilizzano il sedimento, proteggono la costa dai fenomeni erosivi e migliorano la qualità delle acque marine costiere riducendo la quantità di nutrienti, di phytoplankton e di particolati inorganici in soluzione (Terrados e Borum 2004).

Il valore ecologico ed economico di questi ecosistemi sono tra i più alti del mondo, anche se paragonati a quelli terrestri (Costanza et al. 1997).

Virnstein e Morris (1996), ad esempio, basandosi solo sugli introiti dovuti alla pesca, hanno stimato che 80000 acri (32,376 ettari) di seagrasses in una località della Florida (Indian River Lagoon), valgono approssimativamente un miliardo di dollari l'anno.

Le praterie di *Posidonia oceanica* (L.) Delile, rappresentano la comunità di piante dominante ed endemica del bacino Mediterraneo (Molenaar et al. 2000). Ricoprono circa il 25% del fondo marino (Pasqualini et al. 1998) dove esercitano un ruolo comparabile o superiore a quello delle altre fanerogame marine delle zone temperate e tropicali (Procaccini et al. 2003).

Grazie all'esistenza di cartografie marine risalenti all'inizio del XIX secolo, è stato possibile seguire i cambiamenti nella distribuzione delle praterie di *Posidonia oceanica* in un ampio arco temporale. È stata stimata una riduzione delle praterie del 5% dall'inizio del secolo fino al 1975 e una marcata regressione del 44% nell'arco dei soli dodici anni successivi, con una completa scomparsa dei posidonieti tra i 20 ed i 10 m di profondità, avvenuta in concomitanza di un'alta urbanizzazione delle zone costiere corrispondenti (Pergent-Martini e Pergent, 1996).

L'allarmante rarefazione progressiva delle praterie di *P. oceanica*, dovuta prevalentemente a disturbi di origine antropica, ha fatto sì che la conservazione delle praterie sia diventata un'alta priorità nazionale ed internazionale. I posidonieti, infatti, sono stati inseriti nell'Allegato A della Direttiva Habitat (92/43) dell'Unione Europea, che comprende i tipi di habitat naturali di interesse comunitario, la cui protezione richiede la designazione di zone speciali di conservazione.

La conoscenza dei processi che sono alla base della formazione e del mantenimento delle praterie è indispensabile per formulare piani adeguati per la gestione di tale importante risorsa. In questo contesto diventa di cruciale importanza la conoscenza della loro struttura genetica, per valutare la potenzialità di risposta alle modificazioni dell'ambiente naturale in cui esse vivono.

Bassi livelli di variabilità genetica, infatti, possono ridurre il potenziale della specie o delle popolazioni di sopravvivere a cambiamenti ambientali (Lande e Shannon 1996, Féral 2002). È molto importante, inoltre, valutare il livello di flusso genico tra popolazioni disgiunte in quanto la

frammentazione dell'habitat può portare ad un conseguente isolamento genetico che ne influenza negativamente la fitness (Lineart, 2004).

La correlazione positiva tra variabilità genetica e performance di crescita in seguito a trapianto, osservata sia in *P. oceanica* che in altre fanerogame marine (Procaccini Piazzì 2001, Williams 2001) sembra essere in accordo con gli studi teorici secondo i quali la capacità degli organismi di adattarsi rapidamente a differenti condizioni ambientali dipende dal loro polimorfismo genetico.

Per aumentare la conoscenza del sistema, supportare una gestione razionale delle coste e programmare eventuali interventi di salvaguardia e di ripristino, dunque, sono necessarie informazioni genetiche. Occorre capire, innanzi tutto, quali siano i migliori marcatori da usare nello studio di piante clonali quali le fanerogame marine e valutare, quindi, il pattern di distribuzione ed il livello complessivo di variabilità genetica della specie.

1.1 Angiosperme marine: definizione e tassonomia

Tra le piante superiori, i cui antenati lasciarono il mare circa 400 milioni di anni fa, alcune Angiosperme (circa il 2% delle 350000 specie esistenti) ricolonizzarono le acque dolci e l'ambiente marino e divennero acquatiche, probabilmente in seguito ad eventi indipendenti (Cook, 1990)

Si ritiene che le seagrasses si siano originate all'inizio della storia delle Angiosperme; i primi reperti fossili, infatti, risalgono al Cretaceo dell'Era Mesozoica (intorno a 120 milioni di anni fa), ma più frequenti sono quelli dell'Eocene dell'Era Cenozoica (circa 30 milioni di anni fa) (Arata e Diviacco, 1989).

La loro precisa storia evolutiva, comunque, è ancora poco chiara. Potrebbero essersi evolute da piante terrestri tolleranti ad alti livelli di salinità (den Hartog 1970) o da piante d'acqua dolce a impollinazione idrofila (Arber 1920, Cox e Humphries 1993), tuttavia l'ipotesi polifiletica sembra la più probabile (Les et al. 1993).

Le seagrasses rappresentano, infatti, un gruppo ecologico, non tassonomico. Ciò implica che le varie famiglie non sono necessariamente strettamente correlate fra loro (den Hartog e Kuo 2006). L'ambiente marino, infatti, ha determinato l'insorgere di fenomeni di convergenza evolutiva di caratteri morfologici e fisiologici che hanno reso difficile l'esatto inquadramento sistematico, che non è ancora perfettamente chiaro ed ha subito molte variazioni nel corso degli anni.

Le angiosperme marine vennero originariamente definite (Arber 1920) in base alla loro capacità di rispondere a quattro caratteristiche fondamentali:

1. tolleranza al mezzo salino
2. crescita vegetativa in condizioni di completa immersione
3. resistenza, per mezzo dell'apparato radicale, alla forza del moto ondoso
4. impollinazione idrofila

Tuttavia, soddisfano questi requisiti anche alcuni taxa di piante acquatiche che normalmente non vivono in mare, ma in ambienti caratterizzati da livelli instabili di salinità ("eurisaline" *sensu* den Hartog 1981) o in acqua dolce, mentre le fanerogame marine *sensu-strictu* sono specie marine stenoaline (den Hartog 2006).

In ogni caso, tutte le angiosperme marine fanno parte del superordine Alismatiflorae (Monocotyledonae) conosciute anche come Helobiae (Tomlinson 1982). Secondo den Hartog e Kuo (2006) le specie dovrebbero essere incluse in quattro famiglie: tre costituite esclusivamente da

seagrasses (Zosteraceae, Cymodoceaceae e Posidoniaceae) ed una (Hydrocharitaceae) con tre generi appartenenti alle seagrasses ed altri 14 costituiti da piante che vivono in acqua dolce. In passato Zosteraceae, Cymodoceaceae e Posidoniaceae erano considerate sottofamiglie della famiglia Potamogetonaceae, ma studi successivi ne hanno dimostrato l'estrema eterogeneità e sono state elevate quindi al rango di famiglie.

Il gruppo di monocotiledoni acquatiche "eurisaline", inoltre, è composto da altre tre famiglie: le Ruppiaceae (con il genere *Ruppia*), le Zannichelliaceae (con i generi *Zannichellia*, *Lepilaena*, *Althenia* e *Pseudoalthenia*), classificate formalmente anche come sottofamiglie delle Potamogetonaceae, e le Potamogetonaceae *sensu stricto* (con il subgen. *Potamogeton*). *Ruppia* aff. *tuberosa* (Ruppiaceae), e *Lepidena marina* (Zannichelliaceae) vivono esclusivamente in mare e sono stenoaline.

Se includere o meno queste ultime due specie (Kuo e den Hartog, 2000), o le due famiglie a cui appartengono, nel gruppo delle seagrasses è ancora fonte di dibattito.

Secondo studi filogenetici, ad esempio, le seagrasses dovrebbero essere suddivise in sei famiglie (Zosteraceae, Cymodoceaceae, Posidoniaceae, Hydrocharitaceae, Ruppiaceae e Zannichelliaceae) con le Ruppiaceae strettamente "imparentate" alle Posidoniaceae e alle Cymodoceaceae. Le analisi molecolari confermano anche la distinzione delle Zosteraceae e la lontana relazione delle Hydrocharitaceae marine da tutte le altre seagrasses (Les et al. 1997). Gli studi molecolari, condotti utilizzando la sequenza rbcL e l'introne trnL, indicano, quindi, che le angiosperme marine si sono evolute in almeno tre eventi indipendenti (Les et al. 1997, Procaccini et al. 1999) (Fig. 1). Linee monofiletiche sarebbero rappresentate da (i) Zosteraceae, (ii) Hydrocharitaceae e (iii) Cymodoceaceae "complex", comprendente Posidoniaceae, Cymodoceaceae e Ruppiaceae.

1.2. Seagrasses nel Mediterraneo

Nel Mediterraneo sono presenti solo cinque specie di seagrasses, che formano una fascia quasi continua lungo le coste dell'intero bacino:

-*Cymodocea nodosa* (UCRIA) Ascherson, presente anche lungo le coste Nord Atlantiche Africane e del Portogallo

-*Zostera marina* (L.) e *Zostera noltii* (Hornemann), entrambe con un'ampia distribuzione nelle zone temperate

-*Halophila stipulacea* (Forskali) Ascherson, comune lungo le coste orientali dell'Africa, nel Mar Rosso e nel Golfo Persico e presente anche nel Madagascar e lungo le coste occidentali dell'India.

-*Posidonia oceanica* (L.) Delile, presente solo nel Mediterraneo.

La presenza del genere *Ruppia*, invece, è molto poco documentata (Procaccini et al. 2003).

Le Seagrasses più comuni sono l'endemica *Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa* e, limitata alla zona intertidale o ad acque poco profonde, *Zostera noltii*.

Cymodocea nodosa, specie dioica, generalmente si accresce su substrati sabbiosi in acque poco profonde, ma eccezionalmente può trovarsi anche alla profondità di 30-40 m. Classicamente è considerata una specie "pioniera" che, determinando una progressiva umificazione del substrato, consente l'impianto delle praterie di *P. oceanica*, le quali rappresentano lo stadio di climax dell'ecosistema (Molinier e Picard 1952). Quando si verifica una regressione delle praterie di *P. oceanica*, inoltre, *C. nodosa* spesso colonizza le aree rimaste scoperte, generalmente caratterizzate da matte morte. In questo stadio è possibile osservare praterie miste.

Zostera noltii, specie monoica, cresce su substrati sabbiosi o fangosi ed è presente dalla zona intertidale fino a pochi metri di profondità. Può formare praterie miste con *Cymodocea nodosa*.

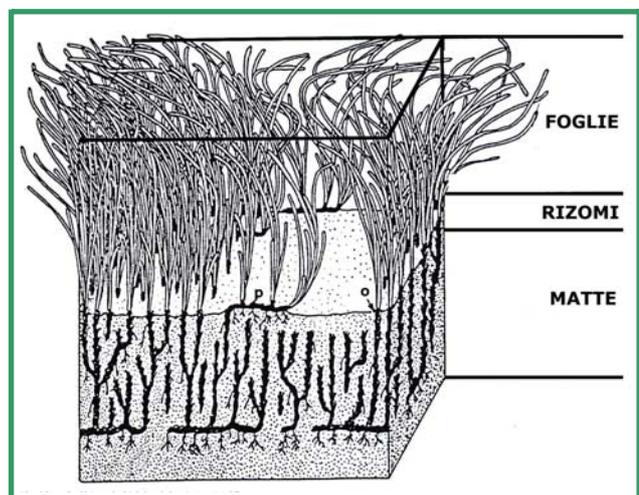
Le altre due specie, *Zostera marina* (specie monoica) e *Halophila stipulacea* (dioica), sono molto meno abbondanti nel Mediterraneo, entrambe si accrescono su substrati fangosi o sabbiosi. *Zostera marina* forma praterie perenni nelle zone intertidali o a pochi metri di profondità e può vivere anche nelle lagune. *Halophila stipulacea* è distribuita dalla zona intertidale fino ai 25 m. Sulla base di studi molecolari, si ritiene che questa specie si sia introdotta nel Mediterraneo dal Mar Rosso recentemente, in seguito all'apertura del Canale di Suez nel 1869 (Ruggiero e Procaccini 2004). *Posidonia oceanica* è l'unica fanerogama presente solo nel Mediterraneo. Le altre otto specie appartenenti al genere *Posidonia*, invece, hanno il loro areale di distribuzione lungo le coste temperate dell'Australia. Si parla, perciò, di distribuzione bipolare. Lo sviluppo di una cospicua radice primaria nell'embrione è la caratteristica morfologica che principalmente distingue *P. oceanica* dalle altre specie appartenenti allo stesso genere, nelle quali è del tutto assente (den Hartog e Kuo 2006).

1.2.1 *Posidonia oceanica*

P. oceanica, specie endemica del Mediterraneo, forma praterie continue dalla superficie fino ad una profondità massima di 50 m (Bouderesque et al. 2006), su differenti tipi di substrato (roccioso e sabbioso). Non è, però, presente negli estuari dei fiumi dove è forte l'apporto di sedimenti fini e di acqua dolce (Procaccini et al. 2003).

E' una pianta perenne che può vivere per diversi secoli (Boudresque et al. 1980), è fotofila, ha una elevata produzione primaria condizionata dalla penetrazione della luce e sopporta, inoltre, un idrodinamismo limitato.

Come tutte le fanerogame anche *P. oceanica* è organizzata in radici, fusto (o rizoma) e foglie. I rizomi sono fusti modificati che presentano la caratteristica di accrescersi sia in senso orizzontale (rizoma plagiotropo o tracciante) che verticale (rizoma ortotropo). I rizomi plagiotropi hanno la funzione di ancorare la pianta al substrato, grazie alla presenza di radici sul lato inferiore, e di consentire la colonizzazione di nuove aree. I rizomi ortotropi invece, crescendo in altezza, contrastano il progressivo insabbiamento dovuto alla continua sedimentazione e permettono in tal modo di sfruttare al massimo lo spazio e la luce disponibili. Lo sviluppo in verticale determina un progressivo innalzamento dal fondo, che dà origine ad una tipica formazione chiamata con il termine francese "matte". La matte è costituita dall'intreccio di più strati di rizomi e radici di vecchie piante e dal sedimento intrappolato tra questi elementi; solo la sommità di questa formazione è ricoperta da piante vive (Fig 1.1).



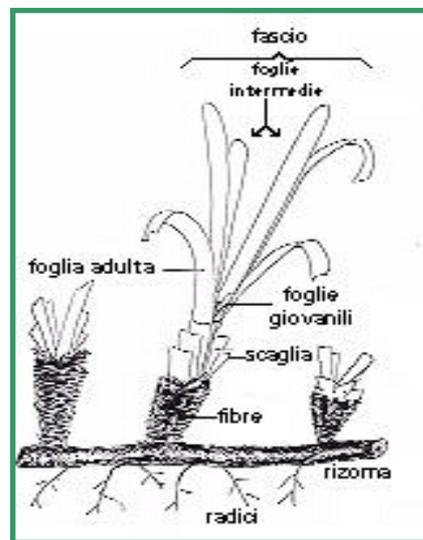
Le foglie nascono dai rizomi ortotropi, sono nastriformi, con apici arrotondati, di colore verde intenso, hanno una larghezza media di un centimetro e possono raggiungere un metro e mezzo di lunghezza; sono differenziate in un lembo fotosintetizzante ed in una base, presente solo nelle foglie più vecchie. Il limite tra base e lembo è rappresentato da una linea concava detta "ligula" in corrispondenza della quale le foglie ormai deteriorate si staccano.

Le foglie sono disposte in fasci, ognuno dei quali ne contiene da 4 ad 8 (Boudouresque e Meinesz, 1982, Payanotidis e Giraud 1981) organizzate in modo simile ad un ventaglio: le più vecchie, di maggiore lunghezza, sono esterne, mentre le più giovani, di taglia inferiore, si trovano all'interno del fascio stesso (Fig 1.2). Particolare è l'accrescimento delle foglie che si originano da un meristema basale anziché apicale; tale adattamento permette la crescita della lamina foliare anche quando l'apice, che ne diviene la parte più vecchia, va incontro per primo a fenomeni degenerativi.

Il ciclo annuale della pianta comporta un periodo di crescita fogliare che va dall'autunno alla primavera, con colonizzazione delle foglie da parte di una comunità epifita molto specializzata; in autunno, con le prime tempeste, le foglie cadono e vengono accumulate in riva in forma di banchi che possono raggiungere vari metri di spessore (Provini et al. 1998).

Il ritmo di crescita di *P. oceanica* è lento: l'allungamento dei rizomi ortotropi raggiunge 1 cm all'anno (Picard 1953, Caye 1982) e quello dei rizomi plagiotropi è di 3,5-7,5 cm all'anno (Caye 1982, Meinesz e Levèvre 1984); dai rizomi plagiotropi, inoltre, ogni anno possono originarsi da uno a sei rizomi ad andamento sia orizzontale che verticale. La riproduzione vegetativa può anche avvenire per dispersione dei frammenti dei rizomi stessi.

P. oceanica presenta anche un ciclo sessuato, con formazione di fiori ermafroditi (raggruppati da 4 a 10 in un'infiorescenza verde) e produzione di frutti galleggianti (detti "olive di mare"). Le fioriture si hanno, in genere, nei mesi di settembre-ottobre, mentre i frutti sono maturi in marzo-aprile (Provini et al. 1998). Non avvengono, tuttavia, con regolarità e possono essere limitate a determinate località. Recenti studi, inoltre, hanno contraddetto la teoria secondo la quale la frequenza delle fioriture sia maggiore nei più caldi mari meridionali rispetto a quelli settentrionali (Molinier e Picard 1953, Sermound 1993). Sembrerebbe, infatti, che per innescare il processo di fioritura siano più importanti le variazioni di temperatura (ΔT), piuttosto che il loro valore assoluto (Diaz-Almela et al. 2006).



P. oceanica riveste un ruolo d'importanza fondamentale per l'ecosistema marino.

I posidonieti, infatti, producono grandi quantità di ossigeno (circa 14 litri al giorno per metro quadrato, al netto dell'O₂ utilizzato dalla pianta stessa per la respirazione; Bay 1978, Boudouresque et al. 2006) ed un'elevata quantità di sostanza organica (circa 20 t /ha/anno; Boudouresque e Meinesz 1982).

Le foglie cadute svolgono un ruolo molto importante nell'arricchimento dei litorali con sostanza organica; rotte dapprima dai movimenti dell'acqua, vengono attaccate da organismi detritivori, quali Isopodi e Anfipodi, mentre *in situ* le piante vengono mangiate da Echinodermi, Pesci, Isopodi e Policheti.

Le praterie sono ambienti di straordinaria importanza anche per la ricchezza della flora e della fauna ad esse associate. Il posidonieto si presenta, infatti, come una struttura biologica complessa che favorisce lo sviluppo di specie associate animali e vegetali.

Le foglie e i rizomi ospitano, ad esempio, numerose specie epibionti ed epifite, spesso esclusive. Sono rappresentate soprattutto da Alghe, da Idrozoi e Briozoi. Ospiti tipici della prateria sono, inoltre, diverse specie di spugne, granchi (*Maia verrucosa*, *Pagurus sp.*) e pesci. Tra questi ultimi caratteristici sono le castagnole (*Chromis chromis*), i saraghi (*Diplodus sp.*), le donzelle (*Coris julis*), moltissimi labridi, i cavallucci di mare (*Hippocampus spp.*) e i pesci ago (*Signatus spp.*). Inoltre molte specie ittiche d'ambiente pelagico, alcune delle quali sono di interesse commerciale, si spostano nei pressi delle praterie di Posidonia per esigenze riproduttive (in questo modo si ha, quindi, una sorta di "allevamento" naturale deputato al rifornimento delle risorse ittiche). Associata ai posidonieti spesso si nota la nacchera (*Pinna nobilis*) uno dei più grossi bivalvi viventi, che può superare il metro di lunghezza. Inoltre una meiofauna particolarmente abbondante (Copepodi, Nematodi, Policheti e altri organismi interstiziali) vive nel sedimento intrappolato dai rizomi.

In generale, è stato stimato che più di 400 specie vegetali e più di mille specie animali popolano le praterie di *Posidonia oceanica* (Boudouresque et al. 2006).

Si intuisce, quindi, come i posidonieti possano contribuire alla biodiversità del mondo sottomarino e alla conservazione dei suoi processi ecologici.

Le praterie sommerse proteggono le aree costiere dall'erosione, essendo in grado di smorzare l'impatto del moto ondoso sulla costa. I rizomi, che possono crescere sia verticalmente che orizzontalmente, esplicano un'azione consolidatrice del sedimento (gli spazi tra i rizomi vengono colmati da sedimento grossolano). Inoltre anche le terrazze sottomarine, formate da rizomi morti, sono molto importanti nella riduzione dell'idrodinamismo.

E' stato calcolato che la distruzione di un metro di "matte" ad una distanza di circa 100 m dalla riva provocherebbe l'arretramento della costa di almeno 20 m (Jeudy de Grissac 1984, Jeudy de Grissac e Boudouresque 1985). Ciò dà la misura dell'enorme importanza che assume la presenza delle praterie di *P. oceanica* come stabilizzatrici della nostre coste.

Attualmente si riscontra un fenomeno di riduzione delle praterie, le cui cause sono molteplici.

Ad esempio, dragaggi operati nei porti commerciali e turistici per mantenerne l'agibilità implicano lo scarico nelle acque prospicienti di sedimenti che, anche quando non contaminati da sostanze tossiche, alterano la granulometria dei fondali o ne seppelliscono le comunità. Lo stesso effetto è provocato da discariche d'inerti, che sono riversati direttamente in mare o utilizzati per la realizzazione di terrapieni sulla costa. Ulteriore fonte di degrado sono le sbrigative pratiche di ripascimento degli arenili realizzate con materiali terrigeni (Guidetti 2000).

Tutte queste attività portano al seppellimento delle praterie con la loro scomparsa immediata oppure ad un processo di infangamento dei fondali: l'aumento della torbidità determina quindi la risalita del limite inferiore di sopravvivenza.

Anche la pesca a strascico contribuisce alla riduzione di queste praterie (Ardizzone 1982; Ardizzone 1985; Ardizzone e Belluscio 1996; Ardizzone e Migliuolo 1982). La tecnica dello strascico produce, infatti, un effetto d'aratura dei fondali; la particolare situazione geomorfologica, che presenta una piattaforma continentale molto ridotta e quindi uno stretto corridoio di fondali costieri, concentra inoltre lo sforzo di pesca su una superficie molto esigua: le ripetute sollecitazioni meccaniche diventano perciò un fattore destabilizzante per la vegetazione sommersa.

Una delle principali cause dell'estirpazione meccanica di foglie, di rizomi o loro parti, inoltre, è dovuta all'utilizzo degli apparati di ancoraggio delle imbarcazioni da diporto (Francour et al. 1999). Tra le cause che provocano la regressione delle praterie, bisogna anche ricordare i cambiamenti chimico-fisici dell'acqua (Perez e Picard, 1975) e la costruzione di infrastrutture (ad esempio dighe) che alterano le correnti litorali e gli apporti sedimentari.

Una recente minaccia, infine, è dovuta alla presenza di specie alloctone come *Caulerpa taxifolia*, estremamente competitive nei confronti degli altri organismi vegetali e che si teme possano contribuire alla scomparsa di specie indigene, tra cui *P. oceanica* (Raffetto et al. 2001).

1.3 Studio della variabilità genetica

Possiamo pensare alla popolazione faunistica e vegetazionale di un territorio come ad una sorta di grande "organismo" che si modifica in virtù degli stimoli naturali ed artificiali a cui è sottoposto: è in perpetua trasformazione e risponde alle alterazioni ricercando di continuo una situazione d'equilibrio. I fattori che determinano i cambiamenti possono agire su tempi brevi (alterazioni antropiche), lunghi (modificazioni climatiche), lunghissimi (eventi geologici); risultano, comunque, sempre in azione.

In questa continua evoluzione s'inserisce il rischio d'estinzione delle specie più deboli dell'ecosistema e quindi di un impoverimento della biodiversità.

Un criterio fondamentale per individuare specie o popolazioni potenzialmente a rischio d'estinzione è la valutazione del livello di variabilità genetica (Bouzat JL, 2000).

Infatti, la capacità delle specie di rispondere ai cambiamenti ambientali, sia naturali che dovuti a disturbi di origine antropica, dipende dal livello di diversità e dal tipo di diversità disponibile. Le differenze genetiche tra individui all'interno della stessa specie pone le basi per l'aumento della diversità tra le specie ed, in ultima analisi, per la diversità tra gli ecosistemi (Féral 2002, Reush 2006). La diversità genetica infra-specifica, inoltre, determina il potenziale evolutivo ed ecologico della specie (Féral 2002).

I livelli di diversità genetica di una specie o di una popolazione sono dovuti ad un equilibrio tra opposti processi di guadagno e perdita di variabilità.

La variabilità può aumentare grazie a fenomeni di mutazione, alla riproduzione sessuale e alla migrazione (dispersione), oppure può diminuire a causa della selezione naturale che opera attraverso il successo riproduttivo differenziale dei genotipi, e della deriva genetica che altera i livelli di variabilità in modo casuale e che è rilevante soprattutto nelle piccole popolazioni (Amos e Harwood 1998).

La variabilità genetica può essere analizzata a vari livelli gerarchici, da quello individuale (valutando, ad esempio, il livello di eterozigosi), a quello intra-popolazione (considerando, ad es, il valore di diversità clonale) ed inter-popolazioni (tramite stime di flusso genico e valutando i rapporti biogeografici e fiogeografici tra popolazioni), fino ad arrivare a considerare specie o taxa superiori (attraverso studi filogenetici e tassonomici).

In ambiente marino, inoltre, la diversità genetica è distribuita su scale spaziali diverse, che vanno da pochi millimetri a migliaia di chilometri (Procaccini e Maltagliati 2003). L'apparente uniformità dell'ambiente marino, infatti, potrebbe far pensare che gli organismi, sia pelagici (che vivono liberi

nella colonna d'acqua) che bentonici (che vivono attaccati al substrato), possano distribuirsi in areali ininterrotti, limitati solo dalle loro caratteristiche di tolleranza fisiologica e dalla capacità di dispersione della specie. In realtà, invece, si ha una grande difformità delle masse d'acqua rispetto alle condizioni locali di salinità, temperatura, idrodinamismo, disponibilità di luce e nutrienti, che determinano la necessità per ciascuna popolazione di sviluppare adattamenti specifici e ne limitano il flusso genico.

Nelle popolazioni di fanerogame marine, infine, la disposizione spaziale dei genotipi all'interno di una prateria può non essere casuale a causa dell'accrescimento vegetativo: "genet" (individui genetici che derivano dalla fecondazione dello zigote) e "ramet" (individui morfologici che si originano per riproduzione vegetativa) formano "macchie" a livello diverso di variabilità (Migliaccio et al. 2005) e sono fenotipicamente indistinguibili tra di loro.

Per riuscire ad identificarli è necessario utilizzare marcatori molecolari particolarmente risolutivi.

1.4 Marcatori molecolari

I marcatori molecolari sono costituiti da porzioni di genoma molto piccole che dovrebbero essere rappresentative, però, della variabilità presente nell'intero genoma dell'organismo studiato.

Non tutte le "sezioni" del genoma sono ugualmente adatte ad essere usate come marker molecolari. Un importante presupposto è che le sequenze alternative, alleli, siano realmente identificabili.

Gli alleli differiscono gli uni dagli altri in base alla loro sequenza; tuttavia per poter utilizzare un marcatore molecolare non è sempre necessario conoscere la sequenza di ogni allele per ogni locus. La maggior parte degli organismi eucariotici, infatti, sono diploidi e perciò possono essere presenti al massimo due alleli per locus. Utilizzando marcatori codominanti (che permettono la distinzione tra omozigoti ed eterozigoti) quando si hanno due copie identiche del locus l'individuo considerato è omozigote, quando le copie differiscono è eterozigote.

Nel caso dei marcatori dominanti, con i quali non è possibile effettuare questa distinzione, per semplicità si considera ciascuna banda come un marcatore separato e dominante anche se alcune di esse possono rappresentare varianti dello stesso *locus*.

La selezione e la caratterizzazione di un'ampia varietà di marcatori molecolari hanno costituito la parte centrale dello sviluppo di una nuova disciplina, l'ecologia molecolare, che può essere definita come l'applicazione di marker molecolari all'ecologia e all'evoluzione, comprendendo studi sulle relazioni tra individui, popolazioni e specie (Carvalho 1998).

Le varianti proteiche o allozimi (enzimi che differiscono nella mobilità elettroforetica a causa di differenze alleliche di un singolo gene) sono stati tra i primi marcatori ad essere ampiamente utilizzati in ecologia molecolare. Tuttavia, in molti casi l'analisi della struttura genetica di popolazioni naturali, tra cui le *seagrasses*, basate su questo metodo hanno rivelato una bassa variabilità genetica, non consentendo una precisa stima del flusso genico e della dimensione effettiva delle popolazioni (De Heij e Nienhuis 1992, Williams e Davis 1996, Williams e Orth 1998). I principali svantaggi della tecnica sono dovuti al fatto che la maggior parte delle proteine sono espresse in uno oppure in un limitato tipo di tessuti, in determinati stadi e, infine, non possono rilevare mutazioni genomiche silenti.

L'identificazione della variabilità negli organismi, sia animali che vegetali, è risultata essere molto più efficace con l'utilizzo di marcatori a DNA.

Questi ultimi possono essere raggruppati, sinteticamente, in quattro categorie:

1. Polimorfismi della Lunghezza dei Frammenti di Restrizione (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism)

2. Polimorfismi basati su tecniche di amplificazione del DNA (PCR) quali RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Single Sequence Repeats), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).
3. Polimorfismi di combinazione come AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), combinazione tra RFLP e RAPD.
4. Sequenza diretta del DNA o SNP (Single Nuclear Polymorphisms)

Tra le tante tecniche correntemente disponibili, quelle che utilizzano la reazione polimerasica a catena (PCR) sono le più comunemente usate.

Nel lavoro di tesi si è scelto di utilizzare due tecniche basate sui microsatelliti:

SSR (simple sequence repeats) ed ISSR (inter simple sequence repeats).

I primi sono stati frequentemente utilizzati in studi di genetica di popolazione di organismi bentonici (Reush 2001), tra cui *Posidonia oceanica* (Procaccini et al. 2001, Procaccini et al. 2002, Ruggiero et al. 2002, Arnaud-Haond *in press*).

I marcatori ISSR, invece, sono stati usati per la prima volta nello studio di *P. oceanica* nel presente lavoro.

utilizzati con successo in studi di genetica di popolazione di molti organismi tra cui piante clonali (es King et al. 2002),

1.4.1 Microsatelliti

I microsatelliti sono costituiti da corte sequenze (da 1 a 6 paia di basi) ripetute in tandem, presenti nel genoma di un'ampia varietà di organismi eucariotici e procariotici (Li et al. 2002)

In base alla lunghezza delle unità ripetute, i microsatelliti vengono distinti in mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, ed hexanucleotidi. Un classico microsatellite è costituito da un singolo tipo di microsatellite ripetuto più di 100 volte. Le ripetizioni possono anche essere interrotte da basi diverse da quelle che costituiscono il microsatellite stesso (microsatelliti imperfetti) oppure da inserzioni (microsatelliti interrotti). In alcuni casi, infine, i microsatelliti possono essere formati da più di un tipo di ripetizione (microsatelliti composti).

La distribuzione dei microsatelliti sembra essere random a livello cromosomico, tuttavia un'analisi più dettagliata indica che non sono distribuiti in maniera del tutto casuale. La loro frequenza, infatti, è molto maggiore rispetto a quella che ci si aspetterebbe in base alla distribuzione random dei nucleotidi nel genoma (Schlotterer ed Harr 2001).

Nonostante la recente scoperta della presenza di microsatelliti in regioni codificanti (dove si trovano prevalentemente ripetizioni di trinucleotidi che non distruggono lo schema di lettura della polimerasi durante il processo di trascrizione) o in particolari regioni dei cromosomi (telomeri e centromeri, Li et al. 2002), i microsatelliti sono presenti soprattutto nelle regioni non codificanti del genoma, mentre sono rari in quelle codificanti proteine. Per esempio, tutti i 101 microsatelliti costituiti da mono- di- e tetra- nucleotidi osservati in 54 specie di piante, sono risultati essere in regioni non codificanti (Wang et al. 1994).

L'abbondanza ed il polimorfismo dei microsatelliti nel genoma sono associati all'alto tasso di mutazione che li caratterizza (10^{-2} - 10^{-6} eventi per locus per generazione). Si ritiene che i meccanismi principali di mutazione siano due: *slippage* (slittamento) del DNA durante la replicazione (a causa della formazione di "loop" o strutture secondarie a forcina nel DNA a singolo filamento) oppure ricombinazione (per crossing over ineguale o conversione genica) (Schlotterer ed Harr 2001, Li et al. 2002).

Per stimare la differenziazione e la distanza genetica tra popolazioni, sono stati proposti diversi modelli teorici di mutazione dei microsatelliti.

Il primo e meglio conosciuto è il modello IAM (infinite allele model, Kimura e Crow 1964), secondo il quale una mutazione coinvolge sempre un certo numero di ripetizioni, e quindi ogni mutazione produce sempre uno stato allelico non presente precedentemente nella popolazione.

In contrasto, secondo il modello SMM (Stepwise Mutation Model, Kimura e Ohta 1978) un singolo evento di mutazione (per acquisto o perdita di una singola ripetizione) può avvenire con lo stessa probabilità. Si assume, quindi, che la taglia dei nuovi alleli dipenda dalla taglia dell'allele mutato; questo meccanismo, tuttavia, implica una sorgente di potenziale omoplasia perché gli alleli possono mutare verso stati allelici già presenti nella popolazione.

Più recentemente Di Rienzo et al. (1994) hanno introdotto il modello TPM (Two Phase Model), secondo il quale un limitato numero di mutazioni coinvolge alcune ripetizioni. Infine, sebbene meno noto, è stato formulato anche il modello KAM (K-allele model) secondo il quale sono possibili K stati allelici e ogni allele ha la probabilità costante di mutare verso uno degli altri K-1 stati allelici (Crow e Kimura 1970).

1.4.2 SSR

I marcatori SSR (simple sequence repeats) rappresentano un importante strumento negli studi di ecologia molecolare e di genetica di popolazione (es. Procaccini et al 2001, Olsen et al 2004, Arnaud-Haond *in press*).

Questa tecnica, infatti, permette di rilevare i polimorfismi dei microsatelliti amplificandoli attraverso la PCR con primer specifici, complementari alle regioni conservate fiancheggianti i microsatelliti stessi. Si ha, dunque, l'amplificazione di *loci* determinati e si possono distinguere i genotipi eterozigoti da quelli omozigoti (alleli codominanti che si differenziano per il numero di unità ripetute).

I marcatori SSR, detti anche semplicemente microsatelliti, sono altamente polimorfici, ereditati secondo le leggi mendeliane e, generalmente, specie specifici.

La tecnica per isolarli è piuttosto laboriosa e costosa: generalmente occorre preparare librerie genomiche e fare uno screening per la presenza di sequenze microsatellite, ad esempio (GA)_n, (GT)_n, (CAC)_n, ecc. Trovati i cloni positivi (che contengono cioè il microsatellite) questi vengono sequenziati per confermare la presenza del microsatellite e per disegnare primer PCR basati sulle sequenze che lo fiancheggiano.

Tuttavia, una volta che tali primer siano stati isolati e la loro sequenza sia stata pubblicata, è possibile usarli per analizzare altre popolazioni della stessa specie ed il metodo diventa veloce e poco costoso.

Nel presente studio sono stati utilizzati i primer disegnati da Procaccini e Waycott (1998) e quelli isolati da Alberto et al. (2003).

1.4.3 ISSR

La metodologia ISSR (Zietkiewicz et al. 1994) è stata sviluppata per evitare il passaggio del sequenziamento del microsatellite e delle zone fiancheggianti per la costruzione del primer.

In questo caso, la reazione PCR (per la quale si utilizza un solo primer invece che due del protocollo standard) amplifica la sequenza tra due microsatelliti inversamente orientati e posti ad una distanza amplificabile (generalmente 100-3000 bp) (Fig. 1).

Come primer, infatti, sono usate sequenze ripetute di due o tre nucleotidi con o senza una sequenza ancorata all'estremità 3' o 5'. La presenza di sequenze ancorate elimina significativamente artefatti dovuti a scivolamento dei filamenti durante l'appaiamento del primer, garantendo quindi una maggiore specificità dei *loci* genomici bersaglio (Zietkiewicz et al. 1994).

I marcatori ISSR sono interpretati come diallelici, con alleli designati dalla "presenza" o "assenza" di bande.

Il maggiore limite di questa tecnica è rappresentato dal fatto che i polimorfismi ISSR sono visualizzati come marcatori dominanti e quindi, come nel caso della tecnica RAPD, la presenza di una banda può sia indicare un omozigote dominante che un eterozigote, così che non è possibile distinguere i diversi genotipi e ricavare stime di eterozigosità.

Inoltre l'assenza della banda può essere dovuta alla perdita del sito di annealing del primer ed anche ad inserzioni o delezioni del frammento tra i due siti d'appaiamento del primer.

Di conseguenza l'assenza di una banda in due individui può non essere dovuta alla stessa mutazione ancestrale (Culley and Wolfe 2001). Come già detto, per semplicità si considera ciascuna banda come un marcatore separato e dominante anche se alcune di esse possono rappresentare varianti dello stesso *locus* (Zietkiewics et al. 1994).

Fig. 1.3. Esempio di ISSR-PCR: amplificazione di sequenze genomiche fiancheggiate da due microsatelliti (CA)_n inversamente orientati, mediante l'utilizzo di un solo primer costituito da ripetizioni (CA)_n con sequenza di ancoraggio all'estremità 3' (rosso) o all'estremità 5' (verde).

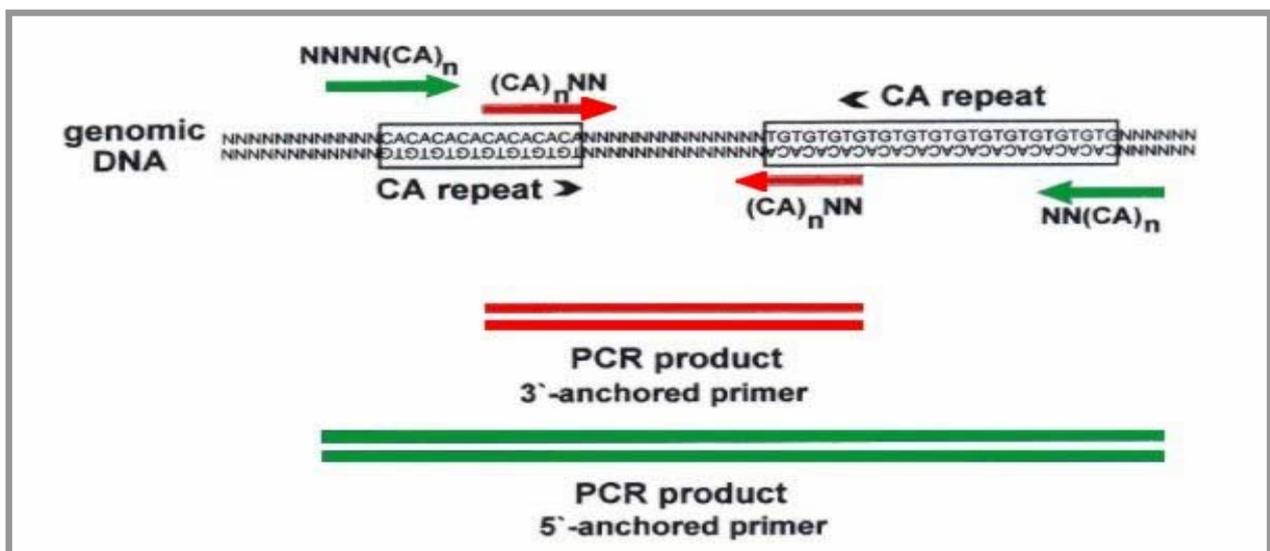
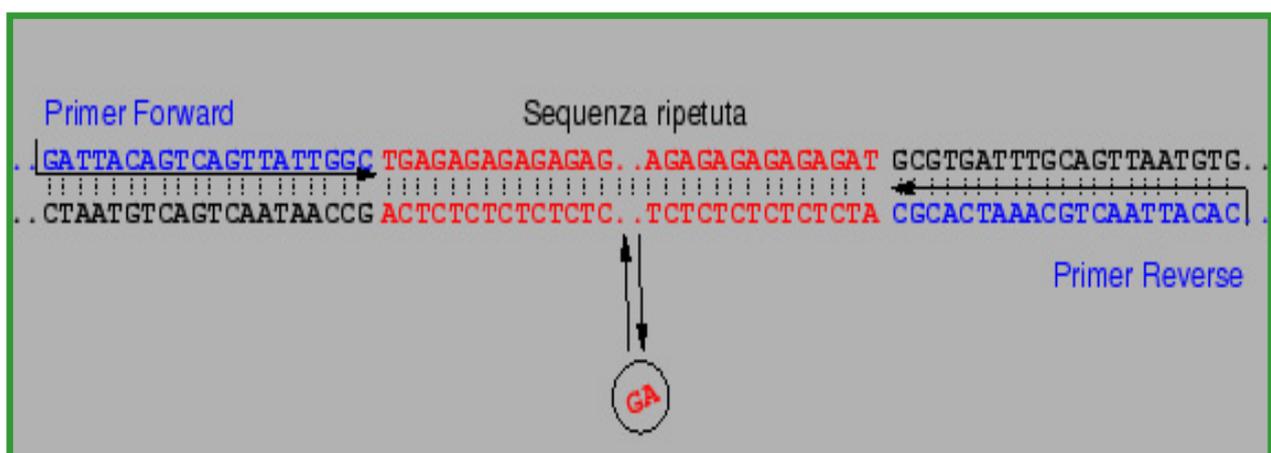


Fig. 1.4. Esempio di SSR-PCR: amplificazione di una regione microsatellite tramite due primer specifici delle regioni che lo fiancheggiano (Forward e Reverse). Gli alleli differiscono nel numero di ripetizioni (es. GA)



1.5 AREA DI STUDIO

Il **mar Mediterraneo** è un mare intercontinentale che si trova tra Europa, Africa ed Asia. La sua superficie approssimativa è di 2,505 milioni di Km² (non considerando in questa cifra il Mar Nero ed il Mar di Marmara), con una profondità media di 1430 m ed una massima, presso le coste sud occidentali del Peloponneso, di 5121 m.

Il Mediterraneo è collegato ad ovest all'Oceano Atlantico, attraverso lo Stretto di Gibilterra. Ad Est raggiunge il Mar di Marmara ed il Mar Nero, tramite i Dardanelli ed il Bosforo. Il Mar di Marmara è spesso considerato parte del Mediterraneo, mentre il Mar Nero viene generalmente distinto. Il Canale di Suez a Sud-est collega, inoltre, il Mediterraneo al Mar Rosso.

Le maree sono molto limitate a causa dello scarso collegamento con l'oceano.

Per quanto riguarda la topografia del fondale il Mediterraneo è diviso in due bacini principali che si possono considerare semichiusi. Il primo è quello del Mediterraneo occidentale, caratterizzato da ampie piane abissali, il secondo, il Mediterraneo orientale, è molto più accidentato e dominato dal sistema della dorsale Mediterranea. Il limite tra bacino occidentale ed orientale è posto lungo la congiungente Capo Bon-Capo Boeo, che attraversa in direzione OSO-ENE il Canale di Sicilia. Un'altra zona di transizione tra i due bacini, seppur molto più limitata, è rappresentata dallo Stretto di Messina.

Le popolazioni di *Posidonia oceanica* analizzate appartengono, complessivamente, sia alle zone di transizione (Canale di Sicilia e Stretto di Messina), che al versante occidentale (dal Bacino Algero Provenzale a quello Tirrenico) e orientale (dal Mar di Levante all'Adriatico) del Mediterraneo (Tab. 2.1 e Fig 3.5).

Il bacino occidentale

Il bacino occidentale si estende dallo Stretto di Gibilterra fino alle coste occidentali della penisola italiana. Comprende il Mare di Alboran, il bacino Algero-Provenzale o balearico e il bacino Tirrenico.

Mare di Alboran

È la parte più occidentale del mar Mediterraneo, delimitato a occidente dallo stretto di Gibilterra e ad oriente dalla linea che congiunge Cabo de Gata in Spagna con Capo Fegalo in Algeria. Occupa una superficie di circa 54.000 km² e la profondità massima è di 1500 m nella parte occidentale e 1200 m in quella orientale. La piattaforma continentale si estende per una larghezza compresa fra i 2 e 10 km lungo la costa spagnola e per un massimo di 18 km lungo la costa nordafricana.

Bacino algero-provenzale

È compreso tra le coste occidentali della Corsica e della Sardegna, quelle orientali e nord-orientali della Spagna e della Francia e quella settentrionale del Marocco e dell'Algeria. Comprende, quindi, un'area più o meno triangolare, che si estende dal Mar Ligure fino al Mare di Alboran. Ha una superficie di circa 240.000 km² e una profondità massima di circa 2800 m.

Bacino tirrenico

Il bacino tirrenico è la parte più profonda del Mediterraneo Occidentale, raggiunge infatti i 3800 m di profondità. Il fondale è caratterizzato dalla presenza di numerose dorsali e di rilievi di tipo vulcanico che in alcuni casi si elevano fino a -500 m. Poche e di modeste dimensioni sono le piane abissali fra le quali si trovano la piana di Corsica, la piana di Orosei, la piana di Olbia, la piana abissale tirrenica e il rialzo pliniano. Il bacino è praticamente chiuso, è messo in comunicazione con i bacini adiacenti da pochi stretti passaggi. A nord un canale profondo circa 3/400 m lo mette in comunicazione con il Mar Ligure, lo stretto di Bonifacio (profondo non oltre i 50 m) lo mette in comunicazione con il bacino algerino, così come il profondo canale, caratterizzato dalla presenza della fossa algero-tirrenica, mette in comunicazione i due bacini a sud della Sardegna. Il Canale di

Sicilia, inoltre, lo mette in comunicazione con il Mediterraneo Orientale. Il Mar Tirreno e il Mar Ionio (bacino orientale), comunicano, infine, attraverso lo Stretto di Messina.

Zone di transizione

Canale di Sicilia

Il Canale di Sicilia è limitato ad Ovest dai fondali poco profondi del banco Skerki e ad Est dalla scarpata sottomarina siciliano-maltese. La sua ampiezza, tra Capo Bon (Marsala) e Capo Boeo (Tunisi), è di circa 150 Km. Oltre allo Skerki sono presenti anche altre secche (dette anche banchi per via della loro estensione): il banco Silv, con lo scoglio Keit, affiorante a 30 cm sott'acqua, e, più a Sud, i Talbot, l'Avventura ed il Graham, quest'ultimo con 8 cm d'acqua. Il Canale di Sicilia presenta una bassa profondità media (350 m), anche se nella sua zona centrale, in alcune depressioni, supera abbondantemente i 1000 m, raggiungendo 1317 m nel Bacino di Pantelleria e 1721 m nel bacino di Malta.

Stretto di Messina

Lo Stretto di Messina è un braccio di mare che separa la Sicilia dalla penisola italiana e mette in comunicazione il Tirreno con lo Ionio. È delimitato a Nord dal Capo Peloro e dalla Rupe di Scilla, e a Sud dal Capo di Ali e Dal Capo Pellarò; è largo a Nord 3 Km, mentre a Sud raggiunge una larghezza di 16 Km; si presenta, quindi, a forma di imbuto che si estende, nel senso della lunghezza, per 33 km. Il fondo marino digrada piuttosto gradualmente verso il Tirreno raggiungendo i 1000 metri soltanto nelle vicinanze delle isole Eolie, mentre è decisamente più ripido nello Ionio dove supera presto gli 800 metri per arrivare ai 2000 metri al largo di Acireale. Lo Stretto fu originato da un processo di rottura iniziato circa 5 milioni di anni fa dovuto ad un abbassamento in opposizione all'innalzamento dell'arco appenninico calabro. Il mantenimento dello Stretto, che nel corso dei millenni si sarebbe inevitabilmente chiuso, è dovuto alle forti correnti che lo caratterizzano.

Il bacino orientale

Fanno parte del Mediterraneo orientale il Mare Adriatico, il Mar Ionio, il Mar Egeo ed il Mar di Levante.

Mar Adriatico

Il Mare Adriatico ha una superficie di circa 135.000 km² e una profondità massima di 1230 m. Da un punto di vista morfologico può essere diviso in tre aree: la parte settentrionale completamente dominata dal delta del Po è un lento declivio nel quale la profondità non supera i 75 m, la parte centrale, tra Ancona ed il Gargano è caratterizzata dalla presenza di una depressione detta "fossa del medio Adriatico" (266 m) mentre la zona meridionale ha una piattaforma continentale che si restringe in corrispondenza della Puglia fino a circa 20 km, fra la Puglia ed Albania si trova la piana adriatica con una profondità media di circa 1000 m e la massima di 1200 m. Da qui la profondità risale a circa 800 m in corrispondenza del Canale d'Otranto che separa l'Adriatico dalla Ionio.

Mar Ionio

Il Mar Ionio si estende su una superficie di circa 616.000 km² dalle coste della Libia e della Tunisia fino alla Grecia e all'Italia meridionale. Raggiunge la massima profondità (5.093 m) nella Fossa ellenica. Nello Ionio si trova la piana abissale più estesa del Mediterraneo.

Mar Egeo

Ha una superficie di circa 80.000 km² e oltre 200 isole. Lo collega allo Ionio il Golfo di Corinto (56 m) e numerosi canali profondi fra i 300 m e gli 800 m fra le isole di Rodi e Creta. Raggiunge la massima profondità (2.500 m) in corrispondenza della fossa di Creta che si estende dal Golfo di Argolide a Rodi.

Mar di Levante

Il Mar di Levante è la parte più orientale del Mediterraneo, ha una superficie di circa 320.000 km² ed è delimitato a ovest dalla linea che congiunge Capo Ra's al Hilal, in Libia con l'isola di Gavdos presso Creta. La piattaforma continentale è molto estesa sia presso il delta del Nilo sia nel golfo di Iskenderun. La massima profondità è di 4384 m in corrispondenza della fossa di Plinio. A sud delle dell'Anatolia è presente l'isola di Cipro.

Caretti idrologici ed idrodinamici

La scarsa comunicazione del Mediterraneo sia con l'Oceano Atlantico che con l'Oceano Indiano, nonché la forte evaporazione, fanno sì che le sue acque siano molto salate (la salinità media si aggira intorno a 38,5 ‰ e può raggiungere il 39 ‰ nel Mar di Levante). La differenza di densità tra le acque del Mediterraneo e dell'Atlantico è particolarmente importante; quelle del Mediterraneo infatti, essendo più salate, sono anche più dense, con il risultato che il livello medio delle acque del Mediterraneo è più basso di quello dell'Atlantico. Questo fa sì che le acque dell'Atlantico vengano richiamate nel Mediterraneo, generando forti correnti superficiali tutto l'anno (Fig 3.1).

Correnti generali del Mediterraneo

Le correnti superficiali

Le correnti superficiali mediterranee si originano tutte dall'afflusso di acqua atlantica e seguono in prevalenza degli andamenti di tipo ciclonico, cioè antiorario. L'acqua atlantica, più fredda ma meno salata (motivo per cui rimane in superficie) entra nel Mediterraneo dopo aver lambito le coste del Marocco.

Una volta varcato lo stretto di Gibilterra viene spinta a sud dalla forza di Coriolis e segue prevalentemente la costa nord-africana dando origine alla corrente algerina, mentre una parte della massa d'acqua, scontrandosi con la corrente anticiclonica del Mare di Alboran, si biforca verso Nord in direzione delle isole Baleari.

La corrente algerina, nel prosieguo del suo corso, si biforca nuovamente: una parte prosegue verso il Canale di Sicilia, un'altra invece risale verso la Corsica e, unendosi alla parte che fin dall'inizio si era diretta verso le Baleari, dà origine alla corrente ligure-provenzale catalana che scorre verso ovest lambendo le coste liguri, francesi e catalane, attraversando il Golfo del Leone.

I bassi fondali del Canale di Sicilia fanno sì che la corrente algerina si biforchi nuovamente, una parte risale infatti verso il Tirreno, dando origine ad una corrente ciclonica che si riunisce con la corrente ligure-provenzale catalana.

La parte di corrente algerina che riesce a valicare il canale di Sicilia attraversa dapprima un'area prospiciente le coste della Tunisia e della Libia, caratterizzata da correnti anticloniche (il Golfo della Sirte), e poi forma la corrente africana che scorre lungo il Mare di Levante, dando origine alla corrente dell'Asia Minore che lambisce la costa Turca fino a Rodi.

Nell'Adriatico, nello Ionio e nell'Egeo vi sono altre correnti minori di tipo ciclonico.

Oltre alle citate correnti costiere vi è la corrente centro mediterranea che scorre sopra la dorsale mediterranea in direzione di Creta e Cipro.



Fig. 3.1: Mar Mediterraneo e correnti marine generali che lo caratterizzano.

La corrente intermedia

Lo strato d'acqua compreso fra i 200 e i 600 metri è interessato da un movimento in senso opposto a quello delle correnti di superficie che si origina dal Mar di Levante (Corrente Levantina Intermedia), il tratto di Mediterraneo con i più elevati valori di salinità (si raggiunge qui il 39,1 per mille di salinità). D'inverno, con il calo della temperatura si ha un aumento della densità dello strato superficiale che "comprime" lo strato d'acqua inferiore dando origine alla corrente intermedia.

Questa corrente è divisa in un ramo principale che percorre l'intero Mediterraneo e due rami secondari che attraversano l'uno il Golfo della Sirte e l'altro, più cospicuo, lo Ionio fino a entrare nell'Adriatico dove incontra le fredde acque invernali per poi uscire nuovamente dallo stretto di Otranto. Questa corrente mitiga in particolare modo il clima delle coste dalmate in inverno.

Il ramo principale si dirige invece verso il canale di Sicilia dove, a causa dei fondali bassi e della portata della corrente di superficie, deve dividersi in due stretti passaggi laterali situati a quote diverse. L'acqua proveniente dal ramo più settentrionale si dirige verso il Tirreno dove fa un lungo giro antiorario e in gran parte esce per ricongiungersi col ramo secondario e risalire verso la Sardegna, per poi seguire la costa francese e spagnola e uscire dallo Stretto di Gibilterra. Questo tipo di circolazione rende il Mediterraneo uno tra i mari meno ricchi di sostanze nutritive, in quanto all'afflusso di acqua superficiale di origine atlantica, vi è un corrispettivo deflusso di acqua profonda, più ricca di fosfati e nitrati, che così vengono allontanati dal Mediterraneo andando a fertilizzare l'Atlantico.

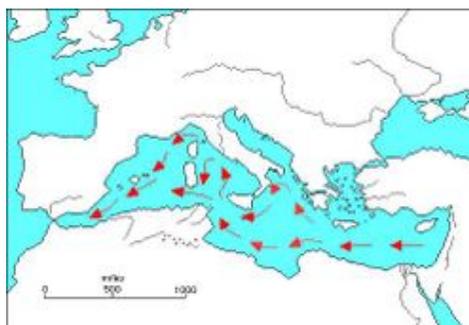


Fig. 3.2: Flusso generale della corrente intermedia

La circolazione profonda

Le correnti di profondità interessano due aree del Mediterraneo, il bacino ligure provenzale e lo Ionio. In entrambi i casi le correnti si originano nella stagione invernale in seguito ad un rapido raffreddamento delle acque provocato dal vento. Nel primo caso il Mistral raffredda rapidamente le acque al centro del Golfo del Leone. In seguito all'aumento di densità l'acqua si dirige verso il fondo, sino ai 2000 metri di profondità, contribuendo al lento ricambio delle acque profonde.

Nel bacino orientale è la Bora che, abbassando la temperatura delle acque nel Mare Adriatico, origina una corrente diretta verso sud che si inabissa oltre il canale di Otranto e contribuisce al ricambio delle acque profonde dello Ionio.

A questo andamento generale si sovrappongono numerose e varie situazioni particolari, quali, ad esempio, quelle che si verificano nelle Stretto di Messina e nel Canale di Sicilia.

Correnti locali

Stretto di Messina

La presenza delle forti correnti che caratterizzano lo Stretto di Messina è dovuta a diversi fattori, tra cui le differenze della temperatura e della salinità tra le acque del Mar Tirreno e quelle dello Ionio e la differenza di batimetria tra i due fondali. La corrente principale detta '*montante*', che va da sud verso nord, è lenta, profonda e prolungata nel tempo, mentre la corrente '*scendente*', da nord a sud, è superficiale, violenta e turbolenta con velocità che superano i 12-14 Km/h. Tali correnti si alternano ogni sei ore circa, in dipendenza dalle fasi lunari. Ogni corrente raggiunge il proprio massimo dopo 4 ore e poi diminuisce fino a mezz'ora prima che si stabilisca la corrente opposta. Questo periodo di mezz'ora è chiamato "ferma". Ogni corrente nel suo movimento lungo il litorale forma la propria controcorrente. Le controcorrenti sono chiamate "bastardi" e vengono sfruttati dalle imbarcazioni per la navigazione. Nel punto in cui le due correnti si incontrano si generano gorgi e vortici detti "garofani", dei quali i principali sono quello chiamato Cariddi, che si forma con il montante davanti alla spiaggia del Faro, e lo Scilla, che si forma sulla costa calabrese da Alta Fiumara a Punto Pizzo. Cariddi è accompagnato talvolta da un rimescolarsi delle acque così violente da mettere in pericolo le piccole imbarcazioni.

Canale di Sicilia

Il Canale di Sicilia è interessato dall'ingresso di Acqua Atlantica, compensato dall'uscita di Acqua Levantina Intermedia. L'Acqua Atlantica si colloca intorno ai 35-40 m di profondità, con differenti valori di salinità all'ingresso del Canale e intorno all'Isola di Malta. Nei periodi estivi il flusso è generalmente del tipo ciclonico a mendri a volte abbastanza esteso, altre volte molto stretto e di solito situato al limite delle acque rimescolate più salate della piattaforma siciliana.

Le Acque Levantine presentano un nucleo a 250-450 m di profondità a causa della topografia del fondo e della profondità delle soglie per l'uscita dal Canale. Anche in questo caso, come per l'Acqua Atlantica, la salinità cambia tra la zona di Malta e l'uscita del Canale di Sicilia. Inoltre l'Acqua Levantina non si muove secondo una dinamica univoca e presenta un flusso più attivo intorno a Pantelleria, dove la topografia del fondo la obbliga a tracimare dalla soglia posta a 430 m per dirigersi verso la valle delle Egadi.

Schema della tesi

Nel lavoro di tesi sarà testata, mediante l'analisi di popolazioni campionate lungo la costa della Calabria, l'utilità dei marcatori ISSR nel fornire informazioni alternative e/o complementari rispetto ai dati già esistenti e saranno valutati i possibili vantaggi dell'utilizzo congiunto dei marcatori ISSR ed SSR nello studio della diversità genotipica in piante clonali (capitolo 2).

Sarà approfondito, inoltre, lo studio della variabilità genetica delle popolazioni di *Posidonia oceanica* lungo le coste della Calabria (capitoli 2 e 3), dello Stretto di Messina e dal Canale di Sicilia, che rivestono un ruolo di cruciale dal punto di vista biogeografico (capitolo 3).

Sarà, infine, chiarito il pattern di distribuzione della variabilità genetica di *Posidonia oceanica* a scala di bacino, includendo nell'analisi anche altre popolazioni appartenenti al versante occidentale ed orientale del Mediterraneo (3).

Capitolo 2- Analisi della diversità genetica in *Posidonia oceanica*: comparazione dei marcatori molecolari ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) ed SSR (Simple Sequence Repeats)

2.1 Introduzione

Nello studio della diversità genetica di popolazioni naturali la fase di selezione del marcatore molecolare più adatto rappresenta sempre un momento di cruciale importanza. Non esistono, infatti, marker ideali per ogni applicazione ed utili in tutti gli organismi. La scelta è particolarmente difficile soprattutto quando si devono analizzare piante che possono crescere clonalmente, formando entità separate ed indipendenti, che rendono problematico il riconoscimento degli individui e la determinazione della struttura genetica delle popolazioni.

Sono necessari perciò marker molecolari con alto potere di risoluzione per distinguere gli individui genetici (genet) dagli individui morfologici (ramet) che si originano attraverso la riproduzione vegetativa (Harper 1977).

Tutte le fanerogame marine si riproducono sia sessualmente, attraverso la formazione di semi e frutti, sia vegetativamente per allungamento dei rizomi e produzione di nuovi ciuffi di foglie.

Si ritiene, tuttavia, che la riproduzione vegetativa rappresenti la principale forma di accrescimento e di mantenimento delle praterie (Migliaccio et al. 2005).

Posidonia oceanica, fanerogama endemica del Mediterraneo, è una specie ermafrodita, caratterizzata da un basso tasso di elongazione dei rizomi ed un alto potere di dispersione dei frutti e di frammenti vegetativi (Procaccini et al. 2003). La riproduzione sessuale avviene in maniera irregolare e, all'interno delle praterie, possono formarsi cloni molto ampi (Migliaccio et al. 2005).

Al fine di incrementare le conoscenze generali del sistema, le popolazioni di *P. oceanica* sono state oggetto, in passato, di numerosi studi genetici che hanno portato a differenti risultati a seconda del marcatore molecolare utilizzato.

I primi studi basati sugli allozimi (Capiomont et al., 1996) e sulla tecnica RAPD (Procaccini et al. 1996; Procaccini e Mazzella 1996) indicavano, infatti, una quasi completa clonalità delle praterie ed una estrema differenziazione genetica tra le popolazioni.

In seguito sono stati applicati nuovi primer RAPD (Jover et al. 2003) e tri- ed eptanucleotidi microsatelliti (Procaccini e Waycott 1998, Procaccini et al., 2001; Procaccini et al., 2002), con i quali è stato evidenziato un livello di diversità clonale più alto, contraddicendo i risultati precedentemente ottenuti. Ciò non è sorprendente nel caso degli allozimi (enzimi che differiscono nella mobilità elettroforetica a causa di differenze alleliche di un singolo gene) tenuto conto che non possono rilevare le mutazioni silenti, nelle regioni codificanti e non codificanti del genoma, e quindi possono sottostimare la reale diversità genetica. Per quanto riguarda le tecniche di DNA fingerprinting, invece, la bassa variabilità trovata potrebbe essere dipesa dalla presenza di bande deboli, co-migranti e quindi indistinguibili, oppure dalla loro scarsa ripetibilità nei profili elettroforetici replicati.

Recentemente sono stati fatti significativi progressi nello studio della genetica di popolazione di *Posidonia oceanica*, grazie alla selezione di nuovi microsatelliti caratterizzati da ripetizioni di dinucleotidi (Alberto et al. 2003) che hanno permesso di rilevare, almeno in alcune località, alti livelli di variabilità genetica (Arnaud-Haond 2005, Arnaud-Haond 2006 in press, Cap. 3 presente tesi).

Nel presente lavoro di tesi ci siamo proposti di comparare i primer disegnati da Procaccini e Waycott (1998), quelli isolati da Alberto et al. (2003) ed i marcatori ISSR (Zietkiewiz et al. 1994).

I primi studi con i marcatori ISSR, effettuati prevalentemente per specie coltivate e di interesse agronomico (ad es., Fang and Roose 1997, Parson et al. 1997), hanno evidenziato la loro natura ipervariabile. La maggior parte degli studi riguardanti la variabilità in popolazioni naturali è, invece, più recente (es. Wolfe et al. 1998, Culley et al. 2001; Scialpi et al 2002; Xia et al. 2005), ed ha permesso di verificarne un alto livello di variabilità sia intra-popolazione che inter-popolazione, mostrando la loro potenzialità nell'analisi di pattern biogeografici tra popolazioni. La metodologia, inoltre, è stata recentemente applicata con successo anche nello studio della genetica di popolazione di piante clonali (King et al. 2002 Wang et al. 2004).

Gli ISSR sono stati usati per la prima volta nello studio di *Posidonia oceanica* nel presente lavoro, con lo scopo di verificarne l'utilità nel fornire informazioni alternative e/o complementari rispetto ai dati già esistenti, considerando i possibili vantaggi di questo tipo di tecnica: si ha un maggiore potere di discriminazione negli studi di variazione inter- ed intraspecifica rispetto agli RFLP (Benharrat et al., 2000; 2002), tra i marcatori dominanti si ha produzione di bande più riproducibili rispetto alla metodologia RAPD ed è meno costosa della metodologia AFLP (...). Rispetto alla tecnica SSR, infine, ha il vantaggio di analizzare loci multipli (ossia una porzione maggiore del genoma) in una singola reazione. Inoltre è più semplice, meno costosa e più adatta ai laboratori di ecologia dotati solo di strumentazione di base per lo studio della biologia molecolare.

Lo studio è stato effettuato mediante l'analisi di popolazioni di *Posidonia oceanica* campionate lungo le coste della Calabria (Sud-Tirreno e Ionio), una regione per la quale non si avevano dati pregressi riguardanti la variabilità genetica di tale fanerogama marina.

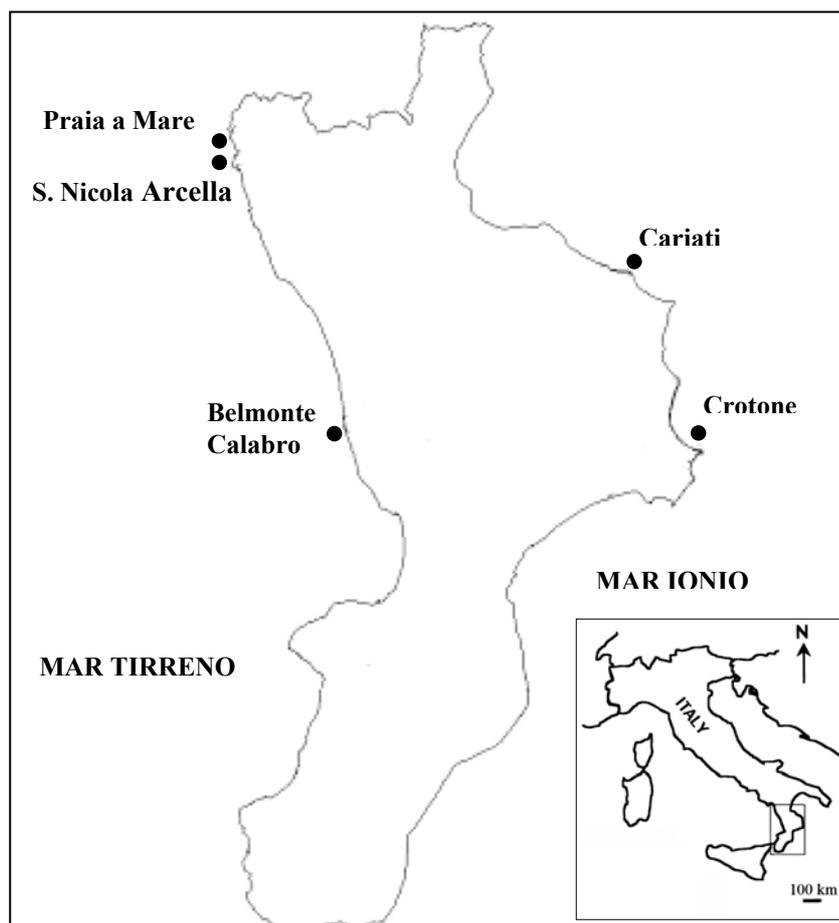


Fig 2.1: Mappa della Calabria e siti di campionamento delle popolazioni di *Posidonia oceanica* analizzate: Praia a Mare (lat 39°54' N, long 15°45' E), San Nicola Arcella (lat 39°51' N, long 15°46' E) e Belmonte Calabro (lat 39°08' N, long 16°03' E) nel Mar Tirreno; Crotona (lat 39°03' N, long 17°08'E) e Cariati (lat 39°30' N, long 16°57' E) nel Mar Ionio.

2.2 MATERIALI E METODI

Campionamento

I prelievi di *Posidonia oceanica* sono stati effettuati in cinque popolazioni lungo le coste della Calabria: tre nel Mar Tirreno (Praia a Mare, San Nicola Arcella e Belmonte Calabro) e due nel Mar Ionio (Crotone e Cariatì) (Fig. 2.1).

Sono stati campionati circa 25 individui (ramet) per popolazione ad una reciproca distanza di 8-10 m lungo transetti lineari, per minimizzare il rischio di prelevare campioni all'interno dello stesso "patch" clonale. I campioni sono stati poi trasportati in laboratorio, puliti con un rasoio affilato e conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione.

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto in accordo con Doyle e Doyle (1987) e modificato come segue: per ogni campione sono stati pestati circa 0.5 g di foglie in un mortaio con N₂ liquido. Al tessuto ridotto in polvere è stato aggiunto 1 ml di tampone di estrazione 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA (200 mM Tris-HCl a pH 7.5; 2% di CTAB sciolto a caldo; 2% di β-mercaptoetanolo).

I campioni sono stati poi incubati con il tampone di estrazione per 30 minuti a 60°C e successivamente lasciati raffreddare per 5 minuti a temperatura ambiente.

Per far precipitare le proteine sono stati aggiunti 800 µl di una miscela contenente 49 parti di cloroformio e una parte di alcol isoamilico, mescolando delicatamente per 5 minuti.

Dopo aver centrifugato per 10 minuti a 6500 rpm, è stata ottenuta la separazione di tre fasi ben distinte: in quella superiore, che viene prelevata e trasferita in una nuova eppendorf, è presente il DNA.

A questo punto sono stati aggiunti 0.8 volumi di isopropanolo: il DNA è insolubile in alcool e perciò si aggrega e diventa visibile. Centrifugando ulteriormente per 15 minuti a 13000 rpm si è formato il pellet di DNA che è stato lavato prima con la soluzione A (76% di etanolo, 0.2 M Na Acetato) per almeno 15 minuti, poi con la soluzione B (76% di etanolo, 10 mM NH₄ Acetato) per 2 minuti.

Il DNA è stato poi asciugato (per fare evaporare completamente l'alcool) e risospeso in 100 µl di T.E. (10 mM Tris-HCl a pH 8, 1 mM EDTA a pH 8).

Infine è stato aggiunto 1 µl di RNAsi (0.1 µg/µl) incubando per 1 h a 37°C.

Analisi ISSR

Per l'analisi ISSR sono stati testati dodici primer ancorati all'estremità 3' (MWG-Biothec, Ebersberg, Germany), otto dei quali hanno prodotto bande chiare e riproducibili e quindi sono stati selezionati per l'analisi di cinque popolazioni di *Posidonia oceanica* (Praia a Mare, Belmonte Calabro, San Nicola Arcella, Crotone e Cariatì) (Tab. 2.1).

Circa 37 ng di DNA sono stati amplificati in 25 µl per ogni reazione PCR alle seguenti condizioni: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 Unità di Taq polimerasi (BioGeM), 5 pmol/ul di ogni primer. Le reazioni PCR sono state effettuate secondo le seguenti condizioni: 3 minuti a 94°C per la denaturazione iniziale, 35 cicli di 60 secondi a 94°C

(denaturazione), 60 secondi a 44°C (annealing) e 90 secondi a 72°C (estensione). L'estensione finale è stata effettuata per 5 minuti a 72°C.

La verifica dell'amplificazione è stata effettuata mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1.2% in TBE 0.5X, a 70 V/cm per circa 1 h.

Per ottenere una migliore separazione delle bande è stata effettuata una corsa definitiva in gel d'agarosio al 2.5% a 70 V/cm per circa 5 h.

Per stimare la lunghezza dei frammenti di DNA è stato utilizzato un Ladder 100 pb.

Al termine dell'elettroforesi il pattern di amplificazione è stato visualizzato al transilluminatore UV e fotografato con una macchina fotografica Polaroid DS-34.

La corrispondenza fra le bande è stata verificata manualmente.

Una volta ottenuti i profili di amplificazione per ciascun primer, le PCR sono state ripetute amplificando insieme i campioni di tutte popolazioni, in modo da minimizzare l'errore sperimentale. Solo le bande presenti in entrambe le amplificazioni sono state prese in considerazione per l'analisi finale.

<i>Nome</i>	<i>Sequenza</i>
ISSR1	5'- CTCTCTCTCTCTCTCYC-3'
ISSR2*	5'- CTCTCTCTCTCTCTCTRG-3'
ISSR3*	5'- GTGTGTGTGTGTGTYR-3'
ISSR4	5'- GTGTGTGTGTGTGTAY-3'
ISSR5*	5'- CACACACACACARY-3'
ISSR6*	5'- CACACACACACACAYC-3'
ISSR7*	5'- AGAGAGAGAGAGAGY-3'
ISSR8*	5'- GAGAGAGAGAGAGARG-3'
ISSR9	5'- ATATATATATATATATGG-3'
ISSR10*	5'- CTCCTCCTCCTCRC-3'
ISSR11*	5'- GAGGAGGAGGAGRC-3'
ISSR12	5'- TATATATATATATATACC-3'

Tab. 2.1: Sequenza dei 12 primer testati per l'analisi ISSR in *P. oceanica*. I primer utilizzati nell'analisi sono marcati con l'asterisco.

Analisi SSR

Per le analisi SSR sono state usate tredici regioni microsatelliti, dodici nucleari ed una cloroplastica. Per semplicità, nei successivi paragrafi i sei loci isolati da Procaccini e Waycott (1998), caratterizzati da una dominanza di ripetizioni di trinucleotidi, verranno indicati come TSSR, mentre quelli isolati da Alberto et al. (2003), con una dominanza di ripetizioni di dinucleotidi, come DSSR.

Circa 15 ng di DNA sono stati amplificati in 10 μ l per ogni reazione PCR alle seguenti condizioni: 20 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 U Taq polymerase (BioGeM), 5 pmol/ μ l di ogni primer. È stato utilizzato un programma di amplificazione costituito da una fase iniziale di denaturazione a 94°C per 3 minuti, seguito da 35 cicli di 30 secondi a 94°C, 30 secondi di annealing (58-52 °C) e 40 secondi a 72°C. L'estensione finale è stata effettuata per 10 minuti a 72°C. Solo il locus Po-5 è stato amplificato usando la strategia Touch Down: un ciclo di 3 minuti a 94°C, seguito da 24 cicli di 30 sec a 94°C, 30 sec a 64°C (on un decremento di 0.5°C/ciclo) e 30 sec a 72°C.

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi in gel di Agarosio all'1.5%, in TBE 1X.

La "detection" degli alleli è stata effettuata usando un sequenziatore automatico (CEQ 2000XL DNA Analysis system, Beckman Coulter) e gli elettroferogrammi sono stati analizzati con Beckman CEQ 2000 ver. 3.0 software.

Analisi dei dati

Per comparare l'efficienza dei tre set di marker (ISSR, T-SSR e D-SSR) sono stati stimati i seguenti parametri come descritto da Tessier et al. (1999) e Belaj et al. (2003):

- i) Numero di bande polimorfiche
- ii) Numero di bande monomorfiche
- iii) Numero di pattern per ogni tipo di marker
- iv) Probabilità di confusione

$$C_j = \sum_{i=1}^I p_i [(N p_i - 1) / (N - 1)]$$

dove p_i è la frequenza dell' i -esimo pattern; N rappresenta la dimensione del campione, I è il numero totale di pattern generati nel saggio j -esimo.

- v) Potere discriminante

$$D_j = 1 - C_j$$

- vi) Limite di D_j per N che tende ad infinito:

$$D_L = \lim (D_j) = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2$$

È stata calcolata, inoltre, la diversità clonale G/N (dove G indica il numero di genotipi identificati ed N il numero di individui analizzati, Pleasant e Wendel 1989) in ogni popolazione e per ogni marker. Al fine di trovare la combinazione migliore di marcatori per determinare la diversità clonale all'interno delle popolazioni, sono stati calcolati i valori di G/N ottenuti aggiungendo sequenzialmente un marker alla volta, partendo da quello con maggiore potere di discriminazione D . Infine, sono state comparate le curve che descrivono la dipendenza del rapporto G/N ed il numero di marcatori utilizzati.

Nei tre data set considerati separatamente, invece, è stata effettuata l'Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA), utilizzando il software GenAlex (Peakall e Smouse 2006). Tale analisi ha permesso una ripartizione gerarchica della variazione genetica, dove Φ_{RT} rappresenta la

correlazione degli individui della stessa regione geografica relativa a quella degli individui dell'intero data set, Φ_{PR} indica la correlazione tra individui all'interno delle popolazioni relativa a quella degli individui all'interno della stessa regione geografica e Φ_{PT} rappresenta la correlazione tra individui all'interno delle popolazioni relativa a quella degli individui dell'intero data set. La significatività è stata testata attraverso permutazioni random (9999 permutazioni). Φ_{PT} è un analogo statistico della F_{ST} di Wright (1951) che, nell'analisi dei marcatori codominanti, sopprime la partizione della variazione all'interno degli individui, considerando solo la varianza genotipica. In questo modo è possibile comparare i pattern di varianza molecolare tra dati codominanti (come gli SSR) e dominanti (come i marcatori ISSR) (Peakall et al 1995, Maguire et al 2002).

Utilizzando il software GenAlex (Peakall e Smouse 2006) è stata effettuata, inoltre, un'analisi PCA (Principal Coordinates Analysis), attraverso l'utilizzo delle distanze genetiche a coppie tra gli individui. Le distanze sono calcolate seguendo Huff et al. (1993) per i marcatori ISSR e Peakall et al. (1995) per gli SSR.

Infine, utilizzando il software Popgene (Yeh et al. 1997) sono state calcolate le distanze genetiche di Nei (1987), che sono state utilizzate anche per costruire dendrogrammi UPGMA.

2.3 RISULTATI

Solo otto dei dodici primer ISSR testati hanno dato pattern elettroforetici utili e tra questi solo cinque sono risultati essere polimorfici.

Invece, per quanto riguarda i marcatori SSR, le taglie degli alleli sono rientrate nel range atteso in base ai dati pubblicati (Procaccini et al. 2001, Arnaud-Haond et al. 2005, Migliaccio et al. 2005, Arnaud-Haond et al. *in press*).

Al fine di valutare il polimorfismo relativo tra le differenti classi di marker utilizzate, le bande ottenute con gli ISSR sono state comparate con gli alleli ottenuti con gli SSR (MV, tabella 2.2).

Il numero totale di varianti molecolari (MV) è variato da 7 per gli ISSR a 21 per i marcatori T-SSR (Tab. 2.2). Tutte le varianti molecolari sono risultate essere polimorfiche sia per i marker D-SSR che per quelli T-SSR, mentre solo il 13,3% delle bande ISSR sono risultate essere polimorfiche. Considerando solo i primer ISSR polimorfici la percentuale di varianti molecolari polimorfiche sale al 20,4% (Tab. 2.2).

Per quanto riguarda il valore medio della capacità di discriminazione, negativamente correlata alla probabilità di confusione, è stato trovato il valore più alto per i dinucleotidi (0.625), intermedio per i trinucleotidi (0.484) e più basso per gli ISSR polimorfici (0.466) (Tab.2.2).

In media i dinucleotidi (DSSR) hanno mostrato, quindi, un potere di risoluzione maggiore sia rispetto ai trinucleotidi (TSSR), confermando i dati in letteratura (Arnaud-Haond, 2005), sia agli ISSR.

Considerando, però, i primer singolarmente si è potuto notare che sono abbastanza risolutivi anche i trinucleotidi *Poc-35* e *Poc-45* (ordine di $D = 3$ e 5), che il primer ISSR 10 è più risolutivo dei dinucleotidi *Po5-10* e *Po5* e, infine, che uno dei primer meno risolutivi è il dinucleotide *Po4-3* (Tab.2.2).

Inoltre, dall'uso combinato di marcatori selezionati nei tre data set in base al loro potere discriminante (D) per il calcolo del rapporto G/N , si è trovato che si raggiunge la saturazione del valore di diversità clonale dopo l'aggiunta di 5 loci SSR (*Po5-40*, *Po-15*, *Poc-35*, *Po5-49* e *Poc-45*) nel caso della popolazione di Cariatì, dopo 9 (*Po5-40*, *Po-15*, *Poc-35*, *Po5-49*, *Poc-45*, *Po5*, *Po5-10*, *Poc-42* e *Poc-5*) nell'altra popolazione ionica (Crotone), ma nelle popolazioni più polimorfiche la saturazione si ha solo dopo l'aggiunta di due primer ISSR (ISS2 ed ISSR10) (Fig. 2.2). Complessivamente, comunque, sono necessari solo 11 marcatori (cinque D-SSR, quattro T-SSR e

due ISSR) sui 21 testati, per raggiungere il valore di saturazione di diversità clonale anche nelle popolazioni più polimorfiche (Fig. 2.2).

Nella comparazione della capacità dei diversi set di marcatori di rilevare la variabilità genetica in *Posidonia oceanica*, è sembrato opportuno considerare anche le popolazioni singolarmente, visto che sono state rilevate differenze significative tra il versante ionico e quello tirrenico della Calabria. Le popolazioni tirreniche sono risultate essere più polimorfiche di quelle ioniche, sia considerando il numero di varianti polimorfiche (MV) che il rapporto G/N.

Il numero di bande polimorfiche per gli ISSR, ad esempio, varia da 1 nelle popolazioni ioniche a 9 nella popolazione di Praia, dove è stato trovato anche un più alto numero di alleli.

Inoltre, considerando il valore di diversità clonale, quello ottenuto con i marcatori ISSR (Tab.2.3) è veramente molto alto nella popolazione di Praia a Mare, è abbastanza alto anche nelle altre due popolazioni tirreniche (San Nicola Arcella e Belmonte Calabro), mentre è molto basso nelle popolazioni ioniche (Crotona e Cariati). La differenza tra versante tirrenico e ionico è stata messa in rilievo anche utilizzando i marcatori SSR, seppure in maniera molto meno evidente (Tab.2.3).

Infine, considerando la media dei valori trovati nelle singole popolazioni, il valore maggiore del rapporto G/N è stato rilevato dai dinucleotidi (0.55). Tale valore sale a 0.75, però, considerando l'intero data set (ISSR+SSR) (Tab. 2.3).

Le diverse classi di marcatori molecolari hanno mostrato una diversa abilità nel differenziare le popolazioni e quantificare il flusso genico. Tutte le categorie di marker valutate e tutti gli indici calcolati, tuttavia, hanno rilevato un limitato flusso genico tra le due regioni (Tirreno e Ionio), come evidenziato dal basso valore di N_m e dall'alto valore di Φ_{PT} (ultima colonna della tabella 2.4).

La distinzione maggiore tra regioni è stata trovata con gli SSR ($\Phi_{PT} = 0.596$), un po' più bassa con i marcatori ISSR ($\Phi_{PT} = 0.584$) (Tab 2.4).

La maggiore differenza tra marcatori, tuttavia, si è trovata nell'analisi delle popolazioni ioniche, nelle quali, considerando i marcatori ISSR si è riscontrata una bassa distanza genetica di Nei ed un alto flusso genico, mentre con gli SSR si è trovata una maggiore differenziazione tra popolazioni (Tab 2.4).

Queste relazioni sono chiare anche nel grafico PCA (Fig 2.3), dove le due popolazioni ioniche (Crotona e Cariati) sono maggiormente differenziate le une dalle altre e rispetto alle popolazioni tirreniche con l'utilizzo dei dati SSR, piuttosto che con gli ISSR.

Considerando le popolazioni tirreniche, inoltre, in entrambi i casi si ha una parziale sovrapposizione degli individui della popolazione di Praia a Mare con quelli delle popolazioni di Belmonte Calabro e di San Nicola Arcella che, comunque, formano dei gruppi maggiormente confinati con l'utilizzo degli SSR.

In tutti i casi (ISSR, T-SSR, D-SSR e Tot-SSR), tuttavia, i dendrogrammi UPGMA basati sulle distanze genetiche di Nei (1987) hanno mostrato una topologia identica per quanto riguarda le relazioni tra le popolazioni. Inoltre, le popolazioni geograficamente più vicine (Praia a Mare e San Nicola Arcella) sono state raggruppate sempre nello stesso cluster (Fig. 2.4).

Infine, per quanto riguarda l'analisi della varianza molecolare (AMOVA), con tutti i set di marcatori è stata riscontrata la maggiore percentuale di varianza tra individui appartenenti alla stessa popolazione (Tab. 2.5). La minore percentuale di varianza tra popolazioni appartenenti alla stessa regione è stata osservata considerando i marcatori ISSR, presumibilmente a causa della scarsa differenziazione tra le popolazioni ioniche.

Inoltre, i più alti valori dei componenti della varianza a tutti i livelli considerati (tra regioni, tra popolazioni all'interno della stessa regione e negli individui appartenenti alla stessa popolazione) sono stati ottenuti considerando un set di dati comprendente sia T-SSR che D-SSR (Tot-SSR).

Tab. 2.2: Polimorfismo dei marker ISSR ed SSR (T-SSR e D-SSR). Le Varianti molecolari (MV) sono rappresentate dalle bande nei marcatori ISSR e da alleli negli SSR. C = Probabilità di confusione; D = Potere discriminante; D_L = Limite del potere discriminante; D class = ordine dei valori di D (dal più alto al più basso).

Marker	# MV	MV polimorfiche	N. di pattern	C	D	D_L	D class
ISSR							
ISSR2	7	2	3	0.423	0.577	0.575	9
ISSR3	8	2	3	0.549	0.451	0.447	12
ISSR5	16	2	4	0.507	0.493	0.489	11
ISSR6	9	0	1	-	-	-	-
ISSR7	12	0	1	-	-	-	-
ISSR8	8	1	2	0.807	0.193	0.192	16
ISSR10	10	3	6	0.384	0.616	0.616	6
ISSR11	5	0	1	-	-	-	-
			Valore medio	0.534	0.466	0.464	
T-SSR¹							
<i>Poc-trn</i>	2	2	2	0.983	0.017	0.017	18
<i>Poc-42</i>	2	2	3	0.438	0.562	0.558	10
<i>Poc-5</i>	3	3	4	0.566	0.434	0.441	13
<i>Poc-45</i>	6	6	10	0.311	0.689	0.683	5
<i>Poc-35</i>	5	5	11	0.145	0.855	0.848	3
<i>Poc-26</i>	3	3	3	0.656	0.344	0.341	15
			Valore medio	0.516	0.484	0.481	
D-SSR²							
Po5-39	3	3	4	0.635	0.365	0.362	14
Po5-10	4	4	7	0.389	0.611	0.674	8
Po5	4	4	7	0.373	0.627	0.697	7
Po-15	8	8	18	0.093	0.907	0.903	2
Po5-40	15	15	24	0.076	0.924	0.918	1
Po5-49	7	7	12	0.167	0.831	0.853	4
Po4-3	3	3	3	0.889	0.111	0.110	17
			Valore medio	0.375	0.625	0.645	

¹ Procaccini & Waycott 1998; ² Alberto et al. 2003

Tab. 2.3 G/N (primo numero) e Varianti Molecolari (MV) polimorfiche (secondo numero) per popolazione e gruppi di popolazioni. Le Varianti Molecolari sono rappresentate da bande negli ISSR ed alleli nei SSR. Ty = Mar Tirreno; Io = Mar Ionio; T-SSR e D-SSR, vedi Tabella 1; Tot-SSR = D-SSR+T-SSR. All markers = ISSR+Tot-SSR.

Popolazioni/ Area geografica	ISSR	D-SSR	T-SSR	Tot-SSR	ISSR+SSR
Praia (Ty)	0.91 - 9	0.50 - 26	0.50 - 14	0.68 - 40	0.95 - 49
San Nicola (Ty)	0.67 - 7	0.62 - 23	0.42 - 15	0.71 - 38	0.96 - 45
Belmonte (Ty)	0.64 - 8	0.52 - 25	0.44 - 15	0.72 - 40	0.92 - 48
Crotone (Io)	0.08 - 1	0.48 - 19	0.40 - 12	0.60 - 31	0.60 - 32
Cariati (Io)	0.08 - 1	0.36 - 15	0.28 - 11	0.47 - 26	0.47 - 27
Mar Tirreno	0.70 - 10	0.55 - 36	0.45 - 17	0.70 - 53	0.94 - 63
Mar Ionio	0.06 - 2	0.42 - 23	0.34 - 14	0.54 - 37	0.52 - 39
Tot	0.44 - 10	0.50 - 44	0.40 - 21	0.64 - 65	0.75 - 75

Table 2.4: Valori delle distanze genetiche (Dist) e del flusso genico (Nm) all'interno e tra i gruppi di popolazioni. Dist = distanza genetica di Nei's (1978); $Nm = 0.25 (1 - \Phi_{pt}) / \Phi_{pt}$. Tutti i valori di Φ_p sono risultati essere altamente significativi (*P = 0.022 nelle popolazioni ioniche con l'utilizzo dei marker ISSR, P < 0.001 in tutti gli altri casi).

		Tirreno	Ionio	Tirr. Vs Ion.
ISSR	Dist	0.021	0.004	0.037
	Φ_{pt}	0.253	0.131*	0.584
	Nm	0.739	1.658	0.177
D-SSR	Dist	0.257	0.204	0.524
	Φ_{pt}	0.369	0.498	0.589
	Nm	0.428	0.252	0.174
T-SSR	Dist	0.116	0.200	0.318
	Φ_{pt}	0.354	0.532	0.582
	Nm	0.455	0.219	0.179
Tot-SSR	Dist	0.179	0.203	0.407
	Φ_{pt}	0.366	0.514	0.596
	Nm	0.434	0.236	0.169

Table 2.5: Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA).

	d.f.	Sum of square	Variance component	Variance (%)	Stat	Value	P-value
ISSR data							
Among Regions	1	60.243	0.844	37	Φ_{rt}	0.374	***
Among Pops./Regions	3	31.640	0.396	18	Φ_{pr}	0.280	***
Indiv./Within Pops.	116	117.935	1.017	45	Φ_{pt}	0.549	***
T-SSR data							
Among Regions	1	97.002	1.124	29	Φ_{rt}	0.290	***
Among Pops./Regions	3	91.697	1.205	31	Φ_{pr}	0.439	***
Indiv./Within Pops.	116	178.677	1.540	40	Φ_{pt}	0.602	***
D-SSR data							
Among Regions	1	151.756	1.813	30	Φ_{rt}	0.301	***
Among Pops./Regions	3	134.054	1.753	29	Φ_{pr}	0.416	***
Indiv./Within Pops.	116	285.028	2.457	41	Φ_{pt}	0.592	***
Tot-SSR							
Among Regions	1	248.759	2.937	30	Φ_{rt}	0.296	***
Among Pops./Regions	3	225.751	2.958	30	Φ_{pr}	0.425	***
Indiv./Within Pops.	116	463.705	3.997	40	Φ_{pt}	0.596	***

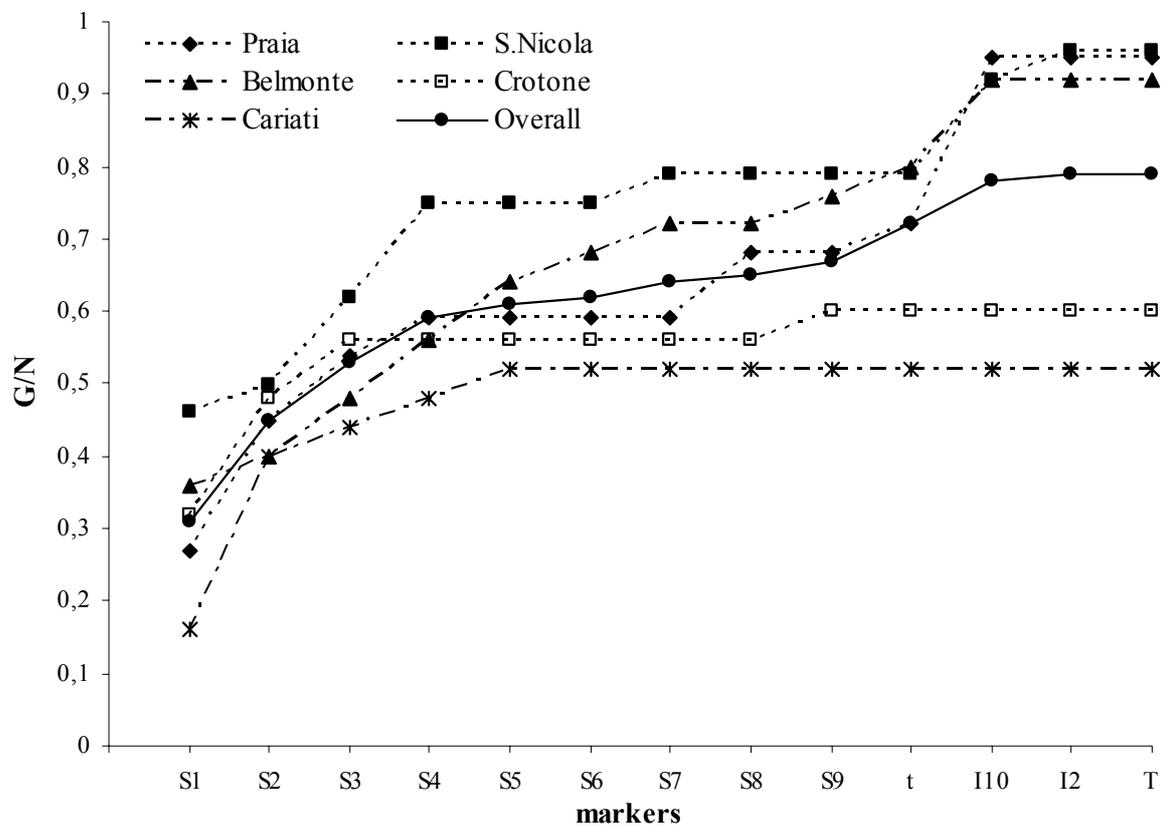


Fig. 2.2: Valori di diversità clonale (G/N) per popolazione e complessivo (overall), ottenuti aggiungendo sequenzialmente i 9 *loci* SSR ed i 2 primer ISSR con maggiore potere di discriminazione (D-class) (Tab. 2.2). S1 = Po5-40; S2 = Po5-40 + Po-15; S3 = Po5-40 + Po-15 + *Poc*-35; etc...; t = total SSR loci; I10 = S9 + ISSR10; I2 = S9 + ISSR10 + ISSR2; T = SSR + ISSR

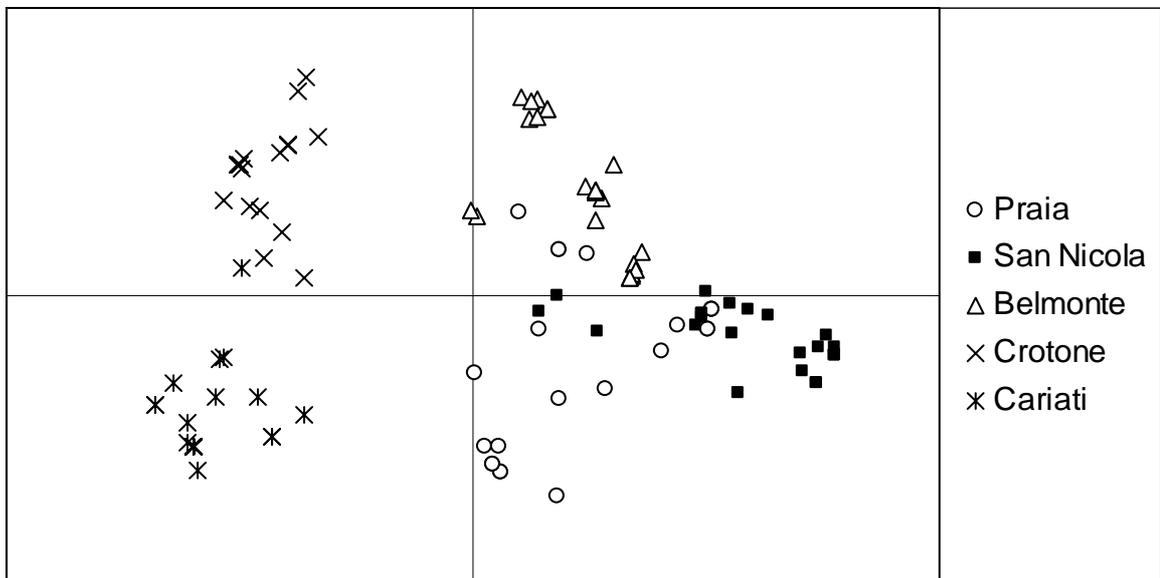
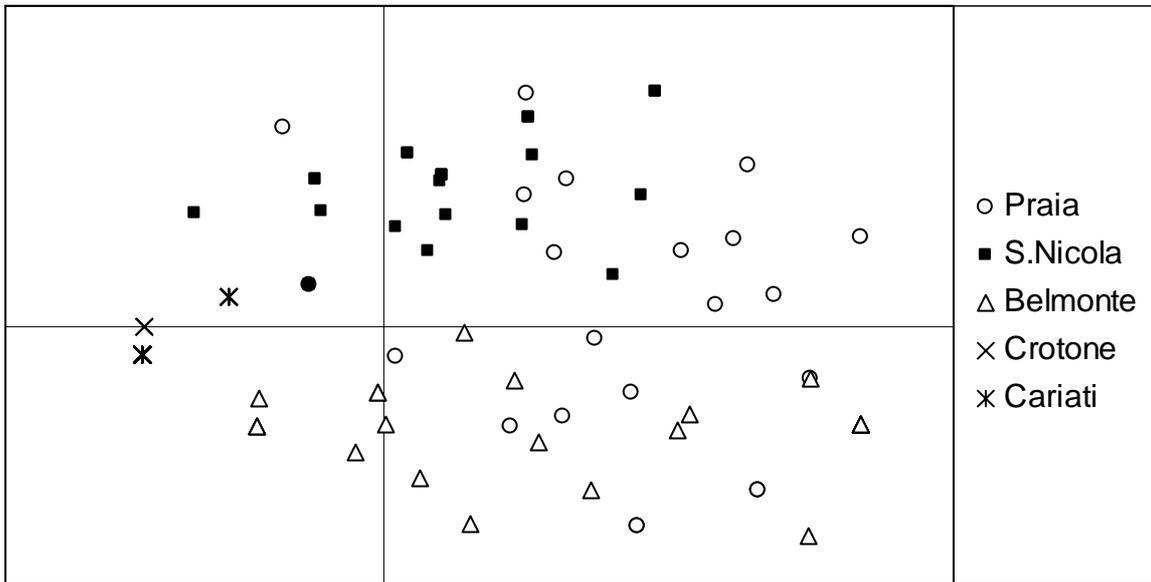
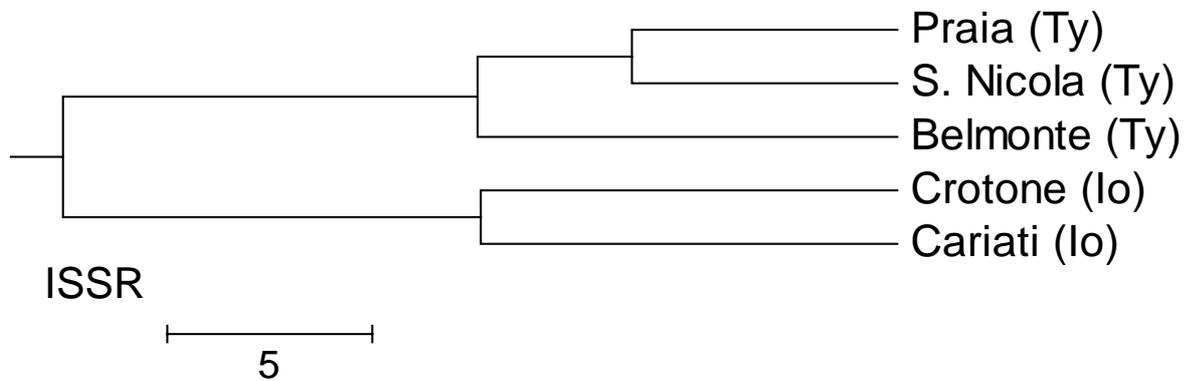
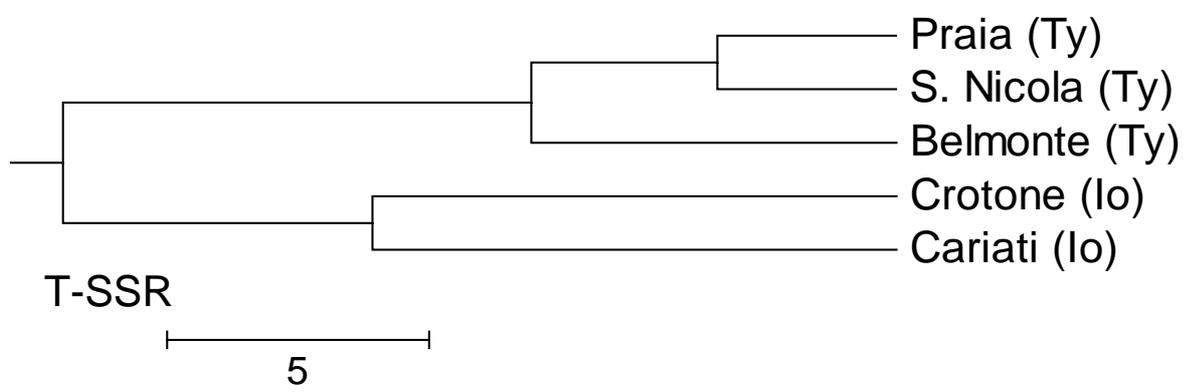
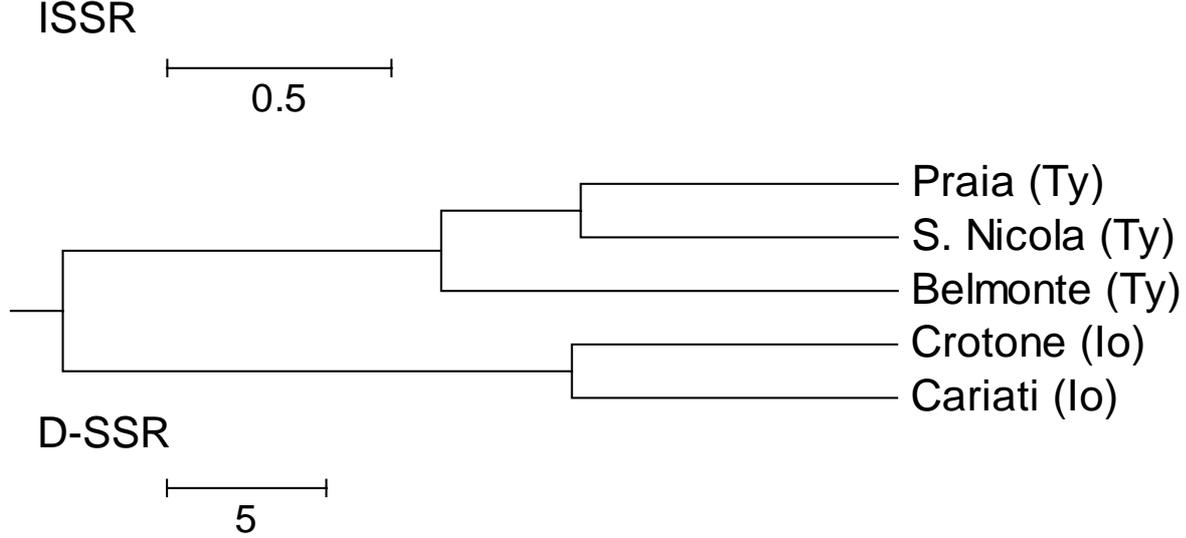
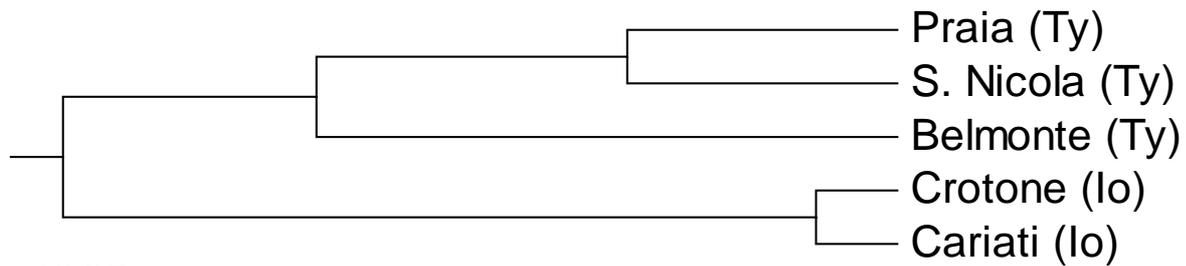


Fig. 2.3: PCA plot basati sulle matrici di distanza tra gli individui per i marcatori ISSR (a) ed SSR (b)

Fig 3.4: Dendrogrammi UPGMA ottenuti dalle matrici delle distanze genetiche tra popolazioni (Nei, 1978).



DISCUSSIONE

Lo scopo dell'analisi di confronto effettuata è stato quello di comparare l'efficienza di due differenti classi di marcatori molecolari (ISSR ed SSR) nell'analisi della diversità genetica di *Posidonia oceanica*, una fanerogama marina clonale.

I risultati ottenuti suggeriscono che i marcatori SSR sono i più adatti per successivi studi di genetica di popolazione di *P. oceanica*, tuttavia entrambe le categorie di marcatori (ISSR ed SSR) hanno rilevato un limitato flusso genico tra le popolazioni del versante orientale ed occidentale della Calabria ed una maggiore variabilità genetica nelle popolazioni tirreniche rispetto a quelle ioniche.

Per effettuare l'analisi sono stati utilizzati otto primer ISSR e due set (complessivamente 13 loci) di marcatori microsatelliti (Preocaccini e Waycott 1998 e Alberto et al 2003).

Non tutti i marcatori ISSR inizialmente testati sono stati utilizzati per l'analisi finale. Due (ISSR1 ed ISSR4), costituiti da ripetizioni (CT) e (GT), hanno infatti prodotto un pattern con molte bande non facilmente distinguibili. Simili pattern sono generalmente attribuiti ad un'alta frequenza dei microsatelliti corrispondenti nel genoma (Joshi et al. 2000), tuttavia sono stati ottenuti dei buoni risultati utilizzando primer con le stesse ripetizioni e differenti sequenze di ancoraggio (ISSR2 ed ISSR3) (Tab. 2.1). Altri due primer basati su ripetizioni di (AT)_n (ISSR9 ed ISSR12), inoltre, non hanno dato alcun prodotto di amplificazione.

E' da notare che lo stesso risultato, assenza di prodotto PCR utilizzando primer con ripetizioni di (AT), è stato ottenuto anche in altre specie di piante (Wang et al. 1998, Joshi et al 2000, Kochieva et al. 2002, Cekic et al. 2001). Una possibile ragione dell'assenza dell'amplificazione potrebbe essere la self-complementarietà delle ripetizioni di (AT), che potrebbero auto-appaiarsi formando dimeri e strutture a forcina (Wang et al. 1998, Cekic et al. 2001).

I risultati ottenuti sono in linea con quelli di Arnaud-Haond et al. (2005), che comparando i marcatori SSR, hanno evidenziato un maggiore polimorfismo utilizzando i marker D-SSR rispetto a T-SSR, allozimi e RAPD.

Le analisi effettuate nel presente lavoro, pur confermando il precedente studio, hanno rilevato una minore differenza tra D-SSR e T-SSR, mentre il polimorfismo degli ISSR è risultato essere paragonabile a quello dei marcatori RAPD, in termini di numero medio di bande polimorfiche per primer (Tab. 2.2, Tab. 1 in Arnaud-Haond et al. 2005).

Inoltre è stato dimostrato che l'efficienza delle differenti classi di marker non è omogenea, considerando il potere di discriminazione (D) e la probabilità di confusione (C) di ogni singolo primer.

L'analisi del potere di discriminazione ha anche mostrato che l'efficienza di un dato primer può non dipendere solo dal numero di pattern che genera poiché in alcuni casi si è trovato un potere discriminante molto differente anche per primer che hanno prodotto lo stesso numero di pattern (ad es. primer ISSR2 o Poc-42 e po4-3). Tale risultato può essere spiegato con la differenza di frequenza dei pattern generati da questi primer (si ha il massimo valore di potere discriminante quando i pattern sono isofrequenti) (Tessier et al. 1999).

L'uso combinato di marcatori selezionati in base al loro potere discriminante nei tre set di dati ha inoltre permesso di rilevare una maggiore diversità clonale nelle praterie più polimorfiche rispetto a quella ottenuta considerando i singoli set di marker (T-SSR, D-SSR, Tot-SSR ed ISSR), con il rapporto G/N che ha raggiunto il suo valore massimo con una combinazione di 11 marcatori (cinque D-SSR, quattro T-SSR e due ISSR) sui 21 utilizzati in totale.

Il maggiore valore di diversità clonale trovato con la combinazione di marcatori SSR-ISSR potrebbe dipendere dalla natura della variazione genetica rilevata dai set di marker considerati singolarmente. Gli SSR, infatti, mettono in evidenza i polimorfismi in predeterminate sequenze

microsatelliti, mentre l'appaiamento dei primer ISSR avviene in maniera random su più siti all'interno dell'intero genoma.

Comparando la capacità dei diversi set di marcatori nel rilevare la variabilità genetica nelle singole popolazioni di *Posidonia oceanica*, è stato sempre evidenziato un polimorfismo più elevato nelle popolazioni tirreniche rispetto a quelle ioniche. Inoltre, pur con un differente livello di risoluzione, tutte le categorie di marker valutate hanno rilevato un limitato flusso genico tra le due regioni (Tirreno e Ionio). Anche gli alberi UPGMA, basati sulla distanza genetica di Nei, hanno sempre raggruppato i genotipi in due cluster principali, in accordo con la loro origine geografica: il primo con le popolazioni tirreniche, il secondo con quelle ioniche. È di particolare rilievo che i risultati ottenuti utilizzando set di marcatori diversi, indicano in maniera conforme che la Calabria costituisce un'importante barriera biogeografica nel Mediterraneo.

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA) (calcolata tra individui appartenenti alla stessa popolazione, tra popolazioni appartenenti alla stessa regione e tra regioni) ha mostrato una partizione simile nei tre livelli considerati, evidenziando la percentuale maggiore di varianza tra individui appartenenti alla stessa popolazione, ma con una significativa varianza presente anche tra popolazioni e tra regioni, indipendentemente dal livello di polimorfismo intrinseco dei diversi set di marcatori.

In conclusione, lo studio comparativo tra marcatori ISSR ed SSR nell'analisi della variabilità genetica di *Posidonia oceanica*, ha mostrato che i microsatelliti (T-SSR e D-SSR) sono più polimorfici rispetto agli ISSR. Tuttavia, l'uso combinato di marcatori ISSR-SSR, selezionati in base al loro potere discriminante (Tessier et al. 1999), ha permesso di rilevare una maggiore diversità clonale nelle praterie più polimorfiche, con un valore di saturazione del rapporto G/N raggiunto con un numero ridotto di marcatori. Con tutti i set di marker analizzati separatamente, inoltre, è stato trovato un livello di polimorfismo maggiore nelle popolazioni tirreniche rispetto a quelle ioniche. Entrambe le categorie di marcatori (ISSR ed SSR), infine, hanno indicato che la Calabria costituisce un'importante barriera biogeografica tra il versante orientale e quello occidentale del Mediterraneo.

Dato il maggiore polimorfismo degli SSR e considerati i vantaggi di utilizzare marcatori codominanti, i microsatelliti sono risultati essere i marker più adatti per proseguire gli studi di genetica di popolazione di *Posidonia oceanica*. I marcatori ISSR, comunque, hanno dato risultati comparabili a quelli ottenuti con gli SSR e perciò sono potenzialmente utili nello studio biogeografico delle fanerogame marine, considerando anche che la tecnica ISSR ha il vantaggio di essere più semplice, poco costosa e più adatta ai laboratori di ecologia dotati solo di strumentazione di base per lo studio della biologia molecolare.

L'uso combinato di selezionati marcatori ISSR-SSR potrebbe rappresentare, inoltre, un conveniente approccio per distinguere gli individui genetici (genet) da quelli morfologici (ramet) nelle piante clonali.

CAPITOLO 3-PATTERN DI DISTRIBUZIONE DELLA DIVERSITÀ GENETICA DI *POSIDONIA OCEANICA* NEL MEDITERRANEO

3.1.1 INTRODUZIONE

L'influenza positiva delle seagrasses nella produttività degli ecosistemi costieri ne ha fatto uno dei principali oggetti di studio dei biologi marini nel mondo.

Negli ultimi decenni si è assistito ad una progressiva rarefazione delle praterie di fanerogame marine, dovuta prevalentemente a disturbi di origine antropica.

La conoscenza dei processi che sono alla base della formazione e del mantenimento delle praterie, permetterà la formulazione di piani adeguati per la gestione di tale importante risorsa. In questo contesto diventa di cruciale importanza la conoscenza della loro struttura genetica, per valutarne la potenzialità di riposta alle modificazioni dell'ambiente in cui vivono.

Bassi livelli di variabilità genetica, infatti, possono ridurre il potenziale di sopravvivenza della specie o delle popolazioni in seguito a cambiamenti ambientali (Lande e Shannon, 1996).

Tutte le fanerogame marine si riproducono sia sessualmente, attraverso la formazione di semi e frutti, sia vegetativamente per allungamento dei rizomi e produzione di nuovi ciuffi di foglie.

Generalmente, tuttavia, si ritiene che la riproduzione sessuale non sia predominante, limitata dalla dispersione idrofila del polline, da fenomeni di auto-impollinazione e dal basso tasso di sopravvivenza dei semi e delle giovani piantine (Coyer et al. 2005). E' noto, infine, che la crescita vegetativa è estensiva, con la formazione di cloni molto ampi (Migliaccio et al. 2005).

Queste considerazioni indurrebbero ad ipotizzare che le praterie di seagrasses siano geneticamente molto strutturate e caratterizzate da una bassa diversità clonale.

Gli studi effettuati su *Posidonia oceanica* con l'utilizzo dei primi marcatori RAPD e con gli isoenzimi sembravano confermare tale ipotesi. Con l'utilizzo dei marcatori microsatelliti TSSR (Procaccini e Waycott 1998) e, soprattutto, con lo sviluppo dei microsatelliti DSSR (Arnaud-Haond 2005) si è potuto verificare, però, che il basso livello di variabilità precedentemente trovato nelle praterie di *P. oceanica* era dovuto, in parte, all'utilizzo di marcatori molecolari poco sensibili (Arnaud-Haond 2005, Serra et al. *in press*, Cap.3 presente tesi).

Il livello complessivo della variabilità genetica di *Posidonia oceanica*, tuttavia, non è ancora chiaro, ed il pattern di distribuzione della diversità genetica della specie nel Mediterraneo non è completo.

Recenti studi, infatti, indicano che le popolazioni di *P. oceanica* formano, nel Mediterraneo, tre cladi distinti: due principali, che comprendono rispettivamente le popolazioni occidentali ed orientali del bacino, ed il terzo formato dalle popolazioni del Canale di Sicilia (Arnaud-Haond et al, 2006 *in press*). In tale analisi, tuttavia, non sono incluse popolazioni provenienti dalle coste della Calabria, nonostante la particolare posizione di questa regione, le cui coste tirreniche appartenengono al bacino occidentale e quelle ioniche al bacino orientale del Mediterraneo.

E' sembrato opportuno, quindi, analizzare la struttura genetica in quest'area e approfondire lo studio nei tratti a ridosso delle zone di transizione fra i due grandi bacini, rappresentati dallo Stretto

di Messina (per il quale non si hanno dati pregressi) e dal Canale di Sicilia, che rivestono un ruolo cruciale dal punto di vista biogeografico.

Infine, per chiarire il pattern della distribuzione della diversità genetica in *Posidonia oceanica* a livello di bacino, sono state incluse nell'analisi anche altre popolazioni del Mediterraneo orientale ed occidentale.

3.2-MATERIALI E METODI

Siti di campionamento, estrazione del DNA

I prelievi di *Posidonia oceanica* sono stati effettuati nello Stretto di Messina (popolazioni 9-10 in Tab.3.1).

Gli individui sono stati campionati ad una reciproca distanza di 8-10 m, per minimizzare il rischio di prelevare campioni all'interno dello stesso "patch" clonale.

Successivamente sono stati trasportati in laboratorio, puliti con un rasoio affilato per rimuovere gli epifiti ed essiccati in gel di silice, nel quale sono stati conservati sino al momento dell'estrazione.

Il DNA è stato estratto seguendo il protocollo Doyle e Doyle modificato (Serra et al *in press*) già descritto nel secondo capitolo della presente tesi.

Il lavoro riguardante le popolazioni dello Stagnone di Marsala ed i banchi di Sicilia Talbot e Skerki è stato effettuato in collaborazione con il Centro Interdipartimentale per lo Studio dell'Ecologia degli Ambienti Costieri (C.I.S.A.C.) dell' Università di Palermo (che ha curato i campionamenti) e con il laboratorio di Ecologia del Benthos della Stazione Zoologica "A. Dohrn", Ischia (Na) (nel quale i campioni sono stati genotipati).

Sono state incluse nello studio, inoltre, le popolazioni calabresi (già utilizzate per effettuare il confronto tra marcatori, Cap. 2) ed altre popolazioni del Canale di Sicilia e dei versanti orientale ed occidentale del bacino del Mediterraneo, i cui dati sono stati forniti Gabriele Procaccini e già oggetto di uno studio filogeografico di *Posidonia oceanica* (Arnaud-Haond et al. 2006, *in press*).

Tab. 3.1 Siti di campionamento e Coordinate geografiche delle popolazioni analizzate

	Località	Label	Coordinate	
1	Camogli	Cam	44°20' N	9°09' E
2	Civitavecchia	Civ	42°07' N	11°45' E
3	Tavolara	Tav	40°53' N	9°41' E
4	Ventotene	Ven	40°47' N	13°25' E
5	Pioppi	Pio	40°10' N	15°04' E
6	Praia a Mare	Pra	39°54' N	15°45' E
7	S.Nicola	Sni	39°51' N	15°46' E
8	Belmonte C.	Bel	39°08' N	16°03' E
9	Reggio C.	Reg	38°10' N	15°38' E
10	Messina	Mes	38°14' N	15°35' E
11	Milazzo	Mil	38°13' N	15°13' E
12	Stagnone di Marsala	Sma	37°50' N	12°27' E
13	Skerki	Ske	37°51' N	10°54' E
14	Talbot	Tal	37°29' N	12°40' E
15	Pantelleria	Pan	36°45' N	11°58' E
16	Tunisi	Tun	36°46' N	10°19' E
17	Ergla	Erg	35°53' N	10°36' E
18	Malta1	Mt1	35°51' N	14°33' E
19	Malta2	Mt2	35°59' N	14°20' E
20	Marzamemi	Mrz	36°43' N	15°05' E
21	Crotone	Cro	39°03' N	17°08' E
22	Cariati	Car	39°30' N	16°57' E
23	Otranto	Otr	40°10' N	18°28' E
24	Koper	Kop	45°33' N	13°42' E
25	Agios Nicolaos	Agn	37°42' N	23°55' E
26	Paphos	Pap	34°43' N	32°26' E

Analisi microsatelliti

Per le analisi SSR sono state usate tredici regioni microsatelliti, dodici nucleari ed una cloroplastica: sei loci (TSSR) isolati da Procaccini e Waycott (1998) e sette (DSSR) isolati da Alberto et al. (2003).

Le reazioni PCR sono state effettuate in un volume tot di 10 ul, con le stesse modalità descritte per l'analisi SSR nel secondo capitolo della presente tesi.

La "detection" degli alleli è stata effettuata usando un sequenziatore automatico (CEQ 2000XL DNA Analysis system, Beckman Coulter) e gli elettroferogrammi sono stati analizzati con Beckman CEQ 2000 ver. 3.0 software Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA).

Analisi dei dati

In ogni popolazione è stato calcolato il livello di diversità clonale, dato dal rapporto tra i genotipi identificati ed il numero dei campioni analizzati (G/N, Pleasant e Wendel, 1989). In numero dei genotipi è stato calcolato utilizzando il software Gimlet (Valière 2002). Tutte le successive analisi sono state condotte dopo aver rimosso i genotipi replicati.

In ogni popolazione sono stati stimati il numero di alleli, il numero medio di alleli/locus, il numero di alleli privati, le frequenze alleliche e la percentuale di loci polimorfici, utilizzando il programma GenAlex (Peakall & Smouse 2006). La stima dell'eterozigosità attesa, "non-biased" (indipendente dalla taglia del campione Nei, 1987) ed osservata è stata ottenuta utilizzando, invece, il software Genetix (Belkhir *et al.* 1996-2002). Con lo stesso software è stato calcolato, inoltre, l'estimatore f di Fis, in accordo con Weir e Cockerham (1984).

Lo stesso estimatore e la diversità genetica totale (Ht, Nei 1987) sono stati calcolati con il software Fstat v 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

E' stato determinato, inoltre, l'estimatore θ di Fst, in accordo con Weir e Cockerham (1984), sia complessivo per tutte le popolazioni sia per ogni locus, tramite il software Fstat v 2.9.3.2.

La stima di θ è stata effettuata anche per "sub-set" di dati corrispondenti alle popolazioni del Mediterraneo occidentale, orientale e del Canale di Sicilia (Tab. 3.6, fig. 3.5), in modo da verificare il livello di flusso genico all'interno del bacino.

Per determinare la direzionalità del flusso genico è stato, inoltre, effettuato un Test di Assegnazione del genotipo condotto mediante il software GeneClass (Corunet et al. 1999). Tale test è utile per rilevare eventi di possibile migrazione (dispersione) e per determinarne la direzione. Tutti gli individui (genet) sono assegnati alla popolazione per la quale è più alta la probabilità di appartenenza (Peatkau et al. 1995, Cornuet al. 1999).

La struttura delle popolazioni è stata stimata anche tramite l'analisi della varianza molecolare (AMOVA), utilizzando GenAlEx 6 (Peakall & Smouse 2006). Le popolazioni sono state suddivise in differenti regioni, considerando raggruppamenti alternativi, per testare a quale livello si ha il maggior grado di differenziazione tra bacino orientale ed occidentale del Mediterraneo. La significatività è stata testata attraverso l'utilizzo di permutazioni random (999 permutazioni).

Per avere una rappresentazione grafica del rapporto tra popolazioni, è stata effettuata l'analisi PCA, basata sulla matrice delle distanze genetiche tra le popolazioni (Φ_{PT}), utilizzando GenAlEx 6. Per esplorare il pattern genetico tra gli individui è stata inoltre effettuata l'Analisi della Corrispondenza usando il software Genetix (Belkhir *et al.* 1996-2002), che si basa sulle frequenze alleliche dei campioni.

3.3-RISULTATI

3.3.1 POLIMORFISMO DEI LOCI MICROSATELLITI

Analizzando 13 loci microsatelliti nelle 26 popolazioni, sono stati trovati 124 alleli (totali), con il numero massimo (68) nella popolazione di Tunisi (n medio di alleli x locus=5,23) ed il numero minimo (16) a Koper (n medio di alleli/locus=1,23).

Nella tabella 3.2 è riportata la diversità allelica dei loci utilizzati. I più polimorfici sono risultati essere i loci Po5-40, Po15 e Po5-49 (valori di Ht pari a 0.929, 0.850 e 0.837, rispettivamente), mentre quelli meno polimorfici Poc-26, Poc-trn e Poc-5 (valori di Ht di 0.052, 0.225, 0.506, rispettivamente).

Tutti i loci hanno evidenziato un alto livello di disgiunzione genetica tra popolazioni, con il valore più alto di θ (0.506) dato dal locus Poc-5.

Complessivamente, il set di microsatelliti trinucleotidi mostra un minore polimorfismo ed un maggiore valore di θ , in accordo con l'assunzione che loci meno polimorfici diano generalmene valori di differenziazione genetica più alti (Hedrick 1999).

Tutti i loci, tranne Po5-10, Poc-35 e Poc-5, mostano un eccesso di eterozigotità ($f < 0$).

Tab. 3.1 : Taglia degli alleli (bp), diversità genetica totale (Ht, Nei 1987) ed estimatori di Fst (θ) ed Fis (f) di Weir &

Locus	Range alleli (bp)	N° alleli	Ht	θ	f
Po15	125-181	22	0,850	0,167	-0,139
Po5	154-200	17	0,651	0,364	-0,186
Po5-40	184-258	30	0,929	0,149	-0,110
Po5-49	196-250	17	0,837	0,206	-0,158
Po5-10	159-171	7	0,649	0,294	0,020
Po4-3	166-172	4	0,363	0,218	-0,020
Po5-39	176-182	4	0,417	0,181	-0,153
Poc-trn	296-316	3	0,225	0,356	***
Poc-35	194-206	5	0,686	0,364	0,209
Poc-45	116-143	6	0,508	0,306	-0,045
Poc-42	210-216	2	0,500	0,358	-0,003
Poc-26	295-316	4	0,052	0,196	-0,258
Poc-5	164-173	3	0,349	0,506	0,159
Tot	116-316	124	0,540	0,264	-0,068

Cockerham (1984).

3.3.2 VARIABILITÀ GENETICA DELLE POPOLAZIONI

I valori di diversità clonale variano molto a seconda delle popolazioni considerate. Il valore massimo si è riscontrato nella popolazione dello Stagnone di Marsala ($G/N=1$) ed il valore più basso a Koper ($G/N=0.02$). Praterie clonali sono state trovate anche a Reggio Calabria ($G/N=0.14$) ed a Messina ($G/N=0.13$).

Il numero medio di alleli per locus più alto è stato trovato nella popolazione di Tunisi, seguito da quello di Marzamemi e di due popolazioni del Canale di Sicilia: Malta 1 e Pantelleria.

La percentuale massima di loci polimorfici è variata dal 100% nelle popolazioni di Marzamemi e dello Stagnone di Marsala al 23,08% della prateria di Koper. Nell'unico genotipo trovato in questa popolazione, infatti, gli alleli sono fissati in 10 loci su 13.

La percentuale di alleli privati è risultata essere molto bassa (0,19%), con il più alto numero di alleli privati (7) a Tunisi (Tab.2).

L'eterozigosità osservata varia da 0.21 per la popolazione di Cariatì a 0.65 per Messina.

La maggior parte delle popolazioni (17) mostra un eccesso di eterozigosità.

Tab. 3.2: Numero di campioni (N), numero di genotipi (G), diversità genotipica (G/N), numero di alleli, numero medio di alleli per locus e numero di alleli privati calcolati in ogni popolazione.

Pop	N	G	G/N	%P	N alleli	N° alleli/ locus	Alleli privati
CAM	40	37	0,92	84,62	40	3,08	0
CIV	40	32	0,80	84,62	40	3,08	0
TAV	40	22	0,55	84,62	37	2,85	0
VEN	39	36	0,92	84,62	48	3,69	1
PIO	28	27	0,96	84,62	52	4,00	1
PRA	22	15	0,68	92,31	40	3,08	0
SNIC	24	17	0,71	84,62	38	2,92	0
BEL	25	18	0,72	76,92	39	3,00	0
REG	29	4	0,14	84,62	27	2,08	0
MES	39	5	0,13	61,54	27	2,08	0
MIL	40	22	0,55	84,62	42	3,23	0
SMA	14	14	1	100,00	33	2,54	0
SKE	21	6	0,38	76,92	23	1,77	0
TAL	23	15	0,61	69,23	25	1,92	0
PAN	38	36	0,95	92,31	60	4,61	0
TUN	40	38	0,95	76,92	68	5,23	7
ERG	25	12	0,48	69,23	31	2,38	2
MT1	40	32	0,80	92,31	57	4,38	1
MT2	40	22	0,55	76,92	39	3,00	0
MRZ	40	36	0,90	100,00	61	4,69	4
CRO	25	14	0,56	61,54	31	2,38	1
CAR	36	15	0,42	61,54	25	1,92	0
OTR	29	24	0,83	69,23	41	3,15	1
KOP	40	1	0,02	23,08	16	1,23	0
AGN	40	32	0,55	92,31	46	3,54	2
PAP	38	28	0,74	76,92	40	3,08	3

Tab. 3.3: Eterozigotità attesa (Hexp) eterozigotità osservata (Hobs) e coefficiente di inbreeding (f), in accordo con Weir & Cockerham (1984), calcolati in ogni popolazione ad esclusione di Koper (nella quale è presente un solo genotipo) e dopo la rimozione dei genotipi replicati.

Pop	Hexp	Hobs	f
CAM	0,430	0,389	0.096
CIV	0,456	0,474	-0.041
TAV	0,442	0,486	-0.102
VEN	0,476	0,506	-0.065
PIO	0,495	0,481	0.027
PRA	0,433	0,424	0.022
SNIC	0,393	0,425	-0.084
BEL	0,433	0,500	-0.160
REG	0,381	0,501	-0.345
MES	0,367	0,654	-0.844
MIL	0,439	0,511	-0.168
SMA	0,423	0,476	-0.130
SKE	0,349	0,542	-0.618
TAL	0,282	0,406	-0.462
PAN	0,536	0,565	-0.053
TUN	0,486	0,546	-0.125
ERG	0,309	0,285	0.080
MT1	0,437	0,456	-0.046
MT2	0,338	0,381	-0.129
MRZ	0,512	0,484	0.056
CRO	0,373	0,359	0.038
CAR	0,244	0,212	0.136
OTR	0,208	0,292	-0.097
AGN	0,404	0,323	0.201
PAP	0,323	0,354	-0.167

3.3.3 PATTERN DI STRUTTURA GENETICA DELLE POPOLAZIONI E FLUSSO GENICO

Il valore complessivo di θ per le 26 popolazioni è risultato essere pari a 0.267 (\pm 0.031), che indica una marcata distinzione tra le popolazioni. Confrontando a coppie tutte le popolazioni, la minore differenziazione si è trovata tra Camogli e Tavolara ($\theta=0.081$) e quella maggiore tra Koper e Talbot ($\theta=0.599$).

L'analisi della varianza molecolare, ottenuta raggruppando in modo differenziale le popolazioni analizzate, ha mostrato la maggiore varianza tra regioni (24%) quando le popolazioni vengono suddivise in due gruppi: il primo composto dalle popolazioni occidentali e del Canale di Sicilia, il secondo da quelle orientali. La varianza tra regioni diminuisce di due punti percentuali se si considerano le popolazioni di Marzamemi, Malta 1 e 2 separatamente (gruppo 3) e scende al 19% raggruppandole insieme alle popolazioni orientali. La varianza tra regioni è, infine, molto bassa (8%) nel caso in cui tutte le popolazioni del Canale di Sicilia (gruppi 3 e 4) vengano raggruppate insieme a quelle orientali (Tab 3.4).

Considerando, infine, la suddivisione in regioni che massimizza la varianza tra regioni (1-3)(4), si osserva il 24% della varianza tra le popolazioni occidentali e quelle orientali del Mediterraneo, il 37% tra popolazioni appartenenti alla stessa regione ed il 39% tra individui appartenenti allo stesso sito di campionamento (Tab. 3.5)

Il grafico PCA illustra chiaramente la separazione tra popolazioni occidentali (Regioni 1 e 2) ed orientali (Regione 4), con le popolazioni orientali del Canale di Sicilia (Regione 3) in posizione intermedia, ma più vicine alle popolazioni occidentali (Fig 1).

Lo stesso pattern tra le regioni si osserva anche con l'Analisi della Corrispondenza (Fig. 2). Questo tipo di analisi permette di ottenere un grafico tridimensionale in cui sono rappresentati tutti i campioni delle 26 popolazioni analizzate e di osservare più chiaramente la distribuzione delle popolazioni occidentali. Le popolazioni della Calabria e della Sicilia (in blu) appaiono, infatti, abbastanza separate dalle altre popolazioni occidentali (in giallo). Gli individui delle popolazioni della parte occidentale del Canale di Sicilia (in bianco), invece, sono maggiormente dispersi ma occupano prevalentemente le stesse posizioni degli individui delle popolazioni dell'Italia sud-occidentale.

In entrambi i casi, comunque, sono presenti tre gruppi principali: quello formato dalle popolazioni occidentali insieme alle popolazioni del Canale di Sicilia occidentale (1+2), quello delle popolazioni orientali (4), mentre Marzamemi, Malta 1 e Malta 2 (3) si trovano sempre in posizione centrale (Fig. 3.1 e 3.2).

Tab. 3.4: Risultati dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA), ottenuti raggruppando le popolazioni in differenti regioni. Tutti i valori sono risultati essere altamente significativi (**= P < 0,001).

La maggiore percentuale di varianza tra regioni è stata ottenuta considerando due regioni: la prima che raggruppa le popolazioni occidentali e del Canale di Sicilia (1-3) e la seconda quelle orientali (4). Le regioni ed i gruppi di popolazioni che le compongono sono indicate più in dettaglio nella figura 3.3.

Regioni	Φ_{PT}	Φ_{PR}	Φ_{RT}	% varianza tra regioni	P
(1) (2-4)	0,555	0,516	0,080	8%	**
(1-2)(3-4)	0,583	0,481	0,190	19%	**
(1-3) (4)	0,605	0,481	0,240	24%	**
(1,2) (3) (4)	0,581	0,460	0,220	22%	**
(1) (2,3) (4)	0,560	0,479	0,160	16%	**
(1)(2)(3)(4)	0,558	0,466	0,173	17%	**

Tab. 3.5: Dettagli dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA) ottenuta raggruppando le popolazioni in due regioni (come indicato in grassetto nella tab. 3.4); Φ_{PT} rappresenta la correlazione tra individui all'interno delle popolazioni relativa a quella degli individui dell'intero data set, Φ_{PR} indica la correlazione tra individui all'interno delle popolazioni relativa a quella degli individui all'interno della stessa regione geografica, Φ_{RT} rappresenta la correlazione degli individui della stessa regione geografica relativa a quella degli individui dell'intero data set. (**= P < 0,001).

	df	SS	MS	Est. Var.	%	Stat	Value	P
Among Regions	1	932,267	932,267	2,518	24%	Φ_{RT}	0,240	**
Among Pops./Regions	24	3108,104	129,504	3,834	37%	Φ_{PR}	0,481	**
Indiv./Within Pops.	829	3427,033	4,134	4,134	39%	Φ_{PT}	0,605	**

Fig. 3.1 Grafico PCA dei due assi principali, basato sulla matrice delle distanze genetiche tra popolazioni

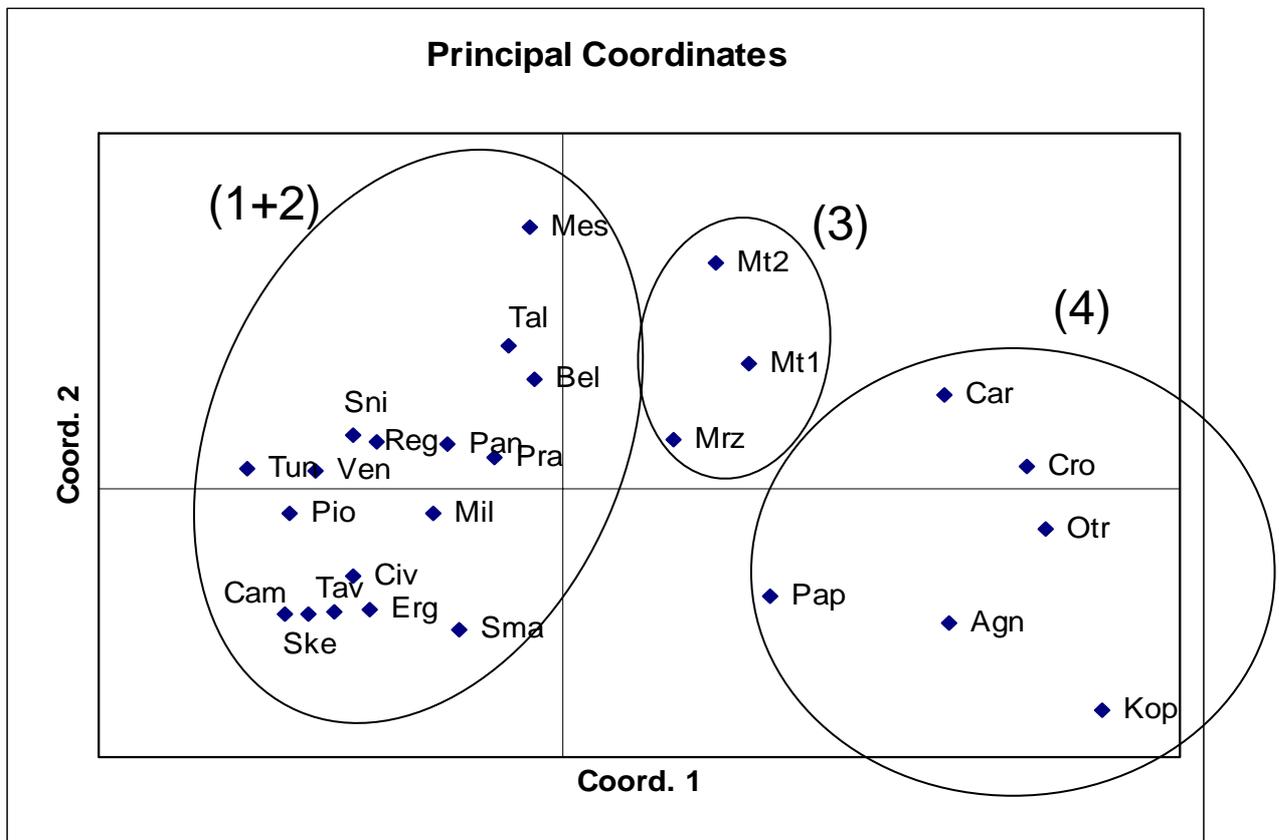
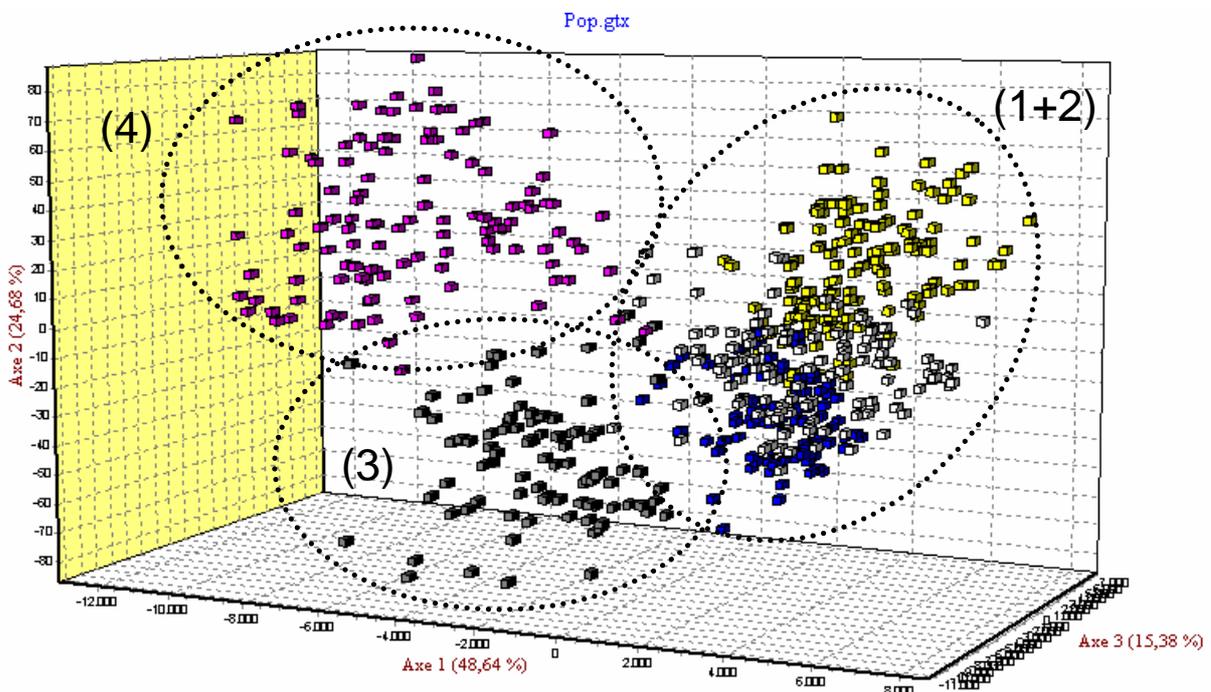
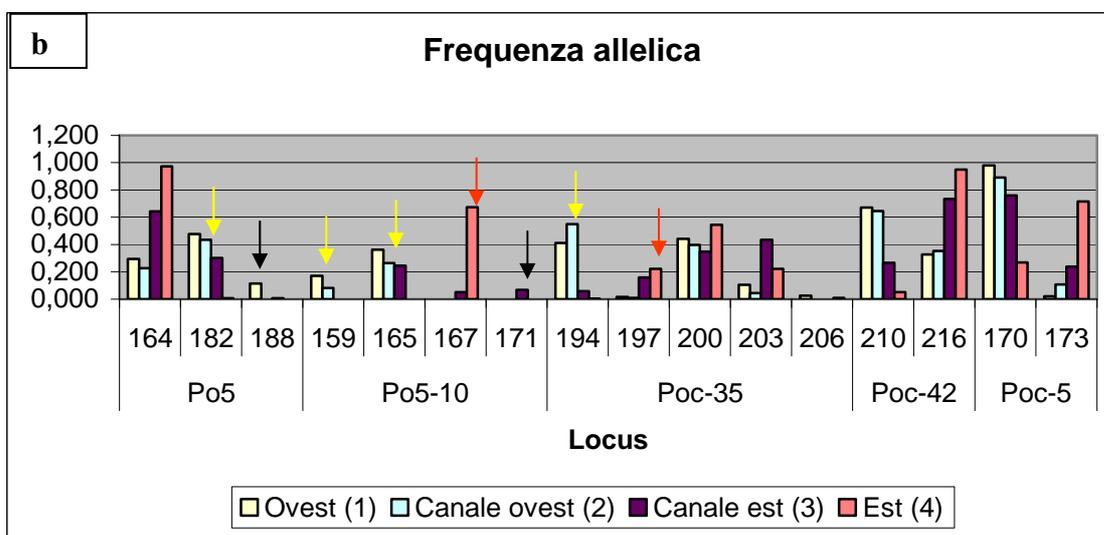
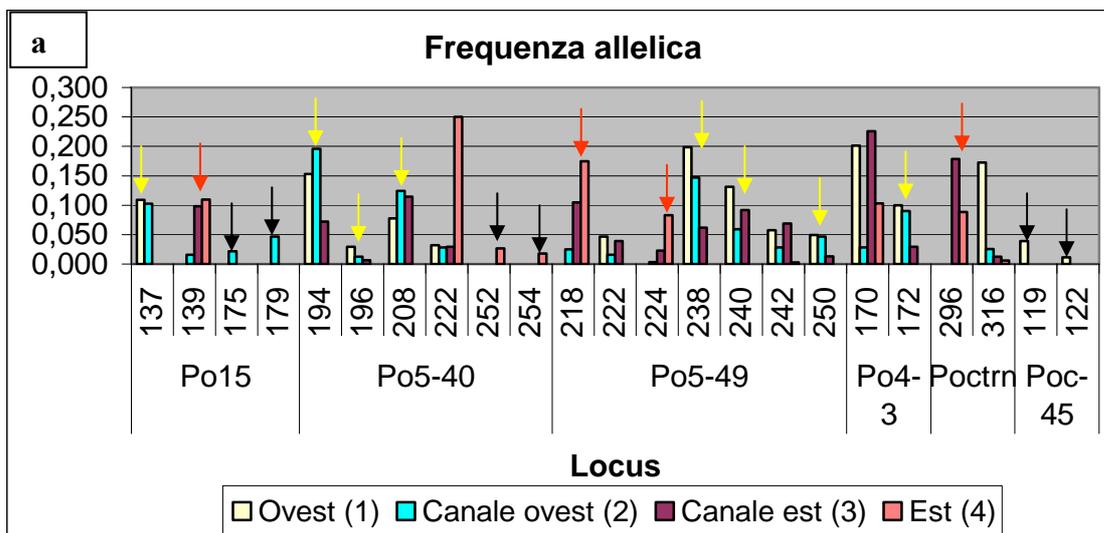


Fig. 3.2 Analisi della Corrispondenza ottenuta in base alla matrice delle frequenze alleliche dei campioni. Gli individui delle popolazioni della Calabria e della Sicilia sono indicati in blu, quelli delle altre popolazioni occidentali in giallo e quelli delle popolazioni della parte occidentale del Canale di Sicilia in bianco (1+2). Inoltre, gli individui delle popolazioni di Marzamemi, Malta 1 e 2 sono in grigio (3) ed, infine, quelli del versante orientale in fuxia (4).



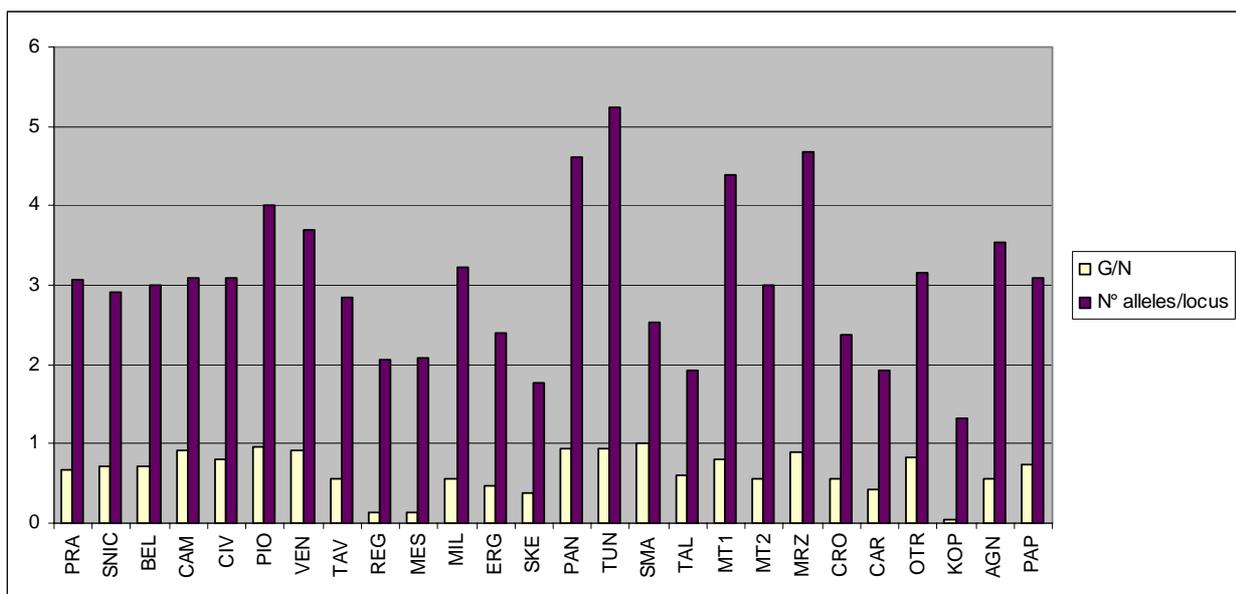
Osservando gli istogrammi ottenuti dalle frequenze alleliche (Fig. 3.3 a/b) appare chiaro come le popolazioni del Canale di Sicilia si trovino in una posizione intermedia (zona di transizione). Nella maggior parte dei casi, infatti, si trovano alleli condivisi solo dalle popolazioni del Canale di Sicilia e dalle popolazioni occidentali (indicati con le frecce gialle in Fig. 3a/b) e altre volte alleli condivisi tra le popolazioni orientali e quelle del Canale di Sicilia (prevalentemente Marzamemi, Malta 1 e 2, ossia le popolazioni del gruppo 3) ma assenti nelle popolazioni occidentali (indicati con le frecce arancioni in Fig 3.3 a/b). Infine, quando gli alleli sono presenti in tutti i gruppi, generalmente si hanno frequenze molto diverse tra regioni (es., loci Poc-42 e Poc-5; Fig 3.3b), con differenze massime tra le regioni 1 e 4 (popolazioni occidentali ed orientali del bacino del Mediterraneo). Nella fig. 3 sono inoltre indicati alcuni alleli privati (frecce nere), presenti in ognuno dei quattro gruppi ma che, comunque, mostrano una bassa frequenza.

Fig. 3.3: Frequenze alleliche di undici loci microsatelliti nelle popolazioni del bacino occidentale (1), orientale (4) e del Canale di Sicilia (2 e 3). Non sono state raffigurate, invece, le frequenze alleliche dei loci Poc-26 e Po39-10, i cui alleli sono uniformemente distribuiti all'interno di ogni gruppo.



Nelle popolazioni del Canale di Sicilia, inoltre, si è trovata la maggiore ricchezza allelica (numero medio di alleli per locus pari a 3,21 e 4,02 nelle popolazioni del gruppo 2 e 3, rispettivamente) ed il maggiore valore medio di diversità clonale (complessivamente pari a 0,74). Le popolazioni orientali (4), invece, sono caratterizzate dai valori più bassi di ricchezza allelica (numero medio di alleli per locus di 2,55) e di diversità clonale (valore medio di $G/N= 0.52$). Tali parametri, tuttavia, non sono omogenei all'interno delle popolazioni appartenenti ad un determinato gruppo, e ciò è evidente soprattutto per quanto riguarda il rapporto G/N , che varia molto a seconda della popolazione considerate, senza rispecchiare un riconoscibile pattern all'interno delle regioni. E' da notare, invece, il livello di diversità clonale molto basso nelle popolazioni dello stretto di Messina (Messina e Reggio Calabria) e che la prateria di Koper (Mar Adriatico) è completamente clonale (Tab. 3.2, Fig. 3.6).

Fig. 3.4: Stima del livello di diversità clonale G/N (dove G è il numero di genotipi ed N è il numero di campioni analizzati) e della ricchezza allelica (numero medio di alleli per locus) nelle singole popolazioni.



All'interno dei singoli gruppi le popolazioni meno differenziate (minore valore di θ) sono risultate essere quelle appartenenti al gruppo 3 (Marzamemi, Malta 1 e 2), come era prevedibile, visto che questo gruppo è formato da sole tre popolazioni, geograficamente poco distanti (Tab. 3.6). Le più differenziate invece, quelle appartenenti al bacino orientale (gruppo 4). E', infine, interessante notare che il flusso genico è risultato essere maggiore tra le popolazioni occidentali e quelle del Canale di Sicilia occidentale (1+2), piuttosto che tra le popolazioni orientali ed occidentali del Canale di Sicilia stesso (2+3). E' risultato essere molto ridotto, infine, il flusso genico che si ha considerando insieme le popolazioni del gruppo 3 (Mrz, Mt1/2) e quelle orientali (3+4) ($Nm^{\theta} = 0.652$) (Tab. 3.6).

Questo tipo di pattern è stato confermato anche utilizzando un metodo Bayesano che permette di assegnare la direzionalità al flusso genico, considerando le 26 popolazioni separatamente. Come si può osservare in fig. 3, quasi tutti gli scambi avvengono tra le popolazioni sud-occidentali e quelle

della parte occidentale del Canale di Sicilia. Un migrante di Belmonte, inoltre, arriva nella popolazione di Marzamemi, superando lo Stretto di Messina.

Tab. 3.6: Differenziazione genetica (θ , Weir & Cockerham , 1984) e stima del flusso genico correlato [$F_{st}(\theta)=1/(1+4 Nm)$, Wright 1943] all'interno dei gruppi di popolazioni , definiti come in fig. 3.5

Regioni	θ (Sd. Err.)	Nm^θ
1	0.197 (± 0.018)	1.019
2	0.207 (± 0.020)	0.957
3	0.181 (± 0.020)	1.131
4	0.291 (± 0.041)	0.609
1+2	0.197 (± 0.016)	1.019
2+3	0.232 (± 0.036)	0.827
3+4	0.276 (± 0.043)	0.656

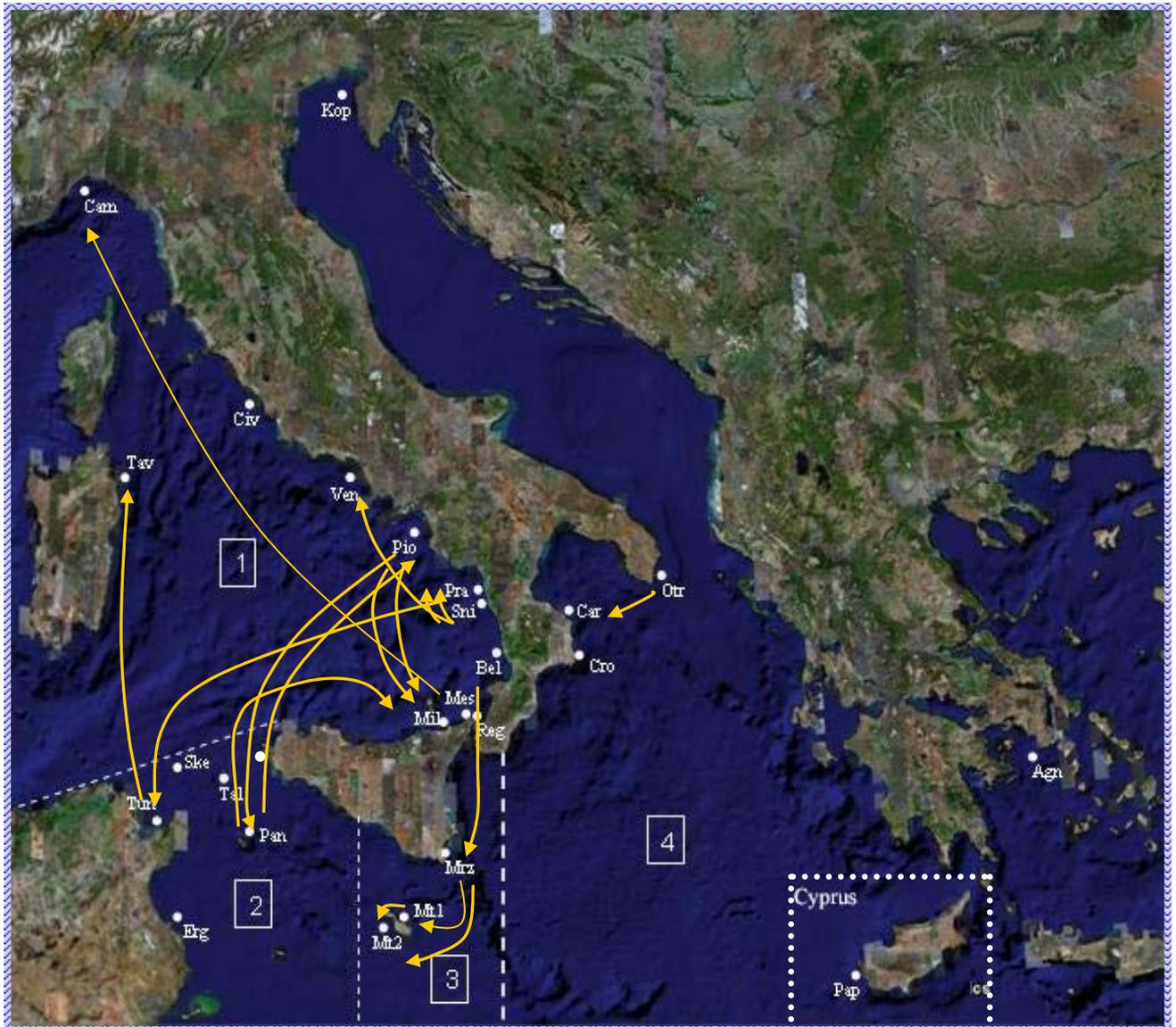


Fig. 3.5: Siti di campionamento di *Posidonia oceanica* analizzate. Le linee tratteggiate delimitano le regioni (1-4) utilizzate per testare il grado di differenziazione tra i gruppi di popolazioni (Tab. 3.4). I pattern di migrazione sono stati ottenuti con GenClass utilizzando un metodo Bayesano per il test di assegnazione del genotipo. Ogni freccia rappresenta un singolo migrante.

Legenda delle località di campionamento: **gruppo 1:** Camogli (Cam), Civitavecchia (Civ), Tavolara (Tav), Ventotene (Ven), Pioppi (Pio), Praia a Mare (Pra), San Nicola Arcella (Sni), Belmonte (Bel), Reggio Calabria (Reg), Messina (Mes), Milazzo (Mil); **gruppo 2:** Skerki (Ske), Talbot (Tal), Pantelleria (Pan), Tunisi (Tun), Ergla (Erg); **gruppo 3:** Malta 1 (Mt1), Malta 2 (Mt2) Marzamemi (Mrz); **gruppo 4:** Cariati (Car), Crotona (Cro), Otranto (Otr), Koper (Kop), Paphos (Pap).

I valori di diversità clonale, eterozigosi e differenziazione genetica trovati nelle popolazioni di *Posidonia oceanica* sono stati confrontati con quelli di altre fanerogame marine (tab. 3.7). Pur tenendo conto dei limiti dovuti al considerare popolazioni provenienti da località diverse e senza valutare le differenze presenti all'interno delle singole specie a seconda dell'area geografica considerata, dal confronto emerge che la diversità clonale è molto variabile in tutte le fanerogame marine e che il valore medio di differenziazione tra popolazioni è paragonabile. Il livello di eterozigosi, invece, è molto più alto in *Posidonia oceanica*.

Tab. 3.7: Comparazione, tra *Posidonia oceanica* ed altre fanerogame marine, della diversità clonale (G/N) e dell'eterozigosità attesa (He) ed osservata (Ho) all'interno delle popolazioni e del livello medio di differenziazione tra popolazioni (θ).

In tutte le seagrasses considerate è stato analizzato il polimorfismo di loci microsatelliti nucleari e l'analisi degli indici riportati (tranne il rapporto G/N) sono stati tutti effettuati utilizzando lo stesso software di elaborazione (Genetix 4.02 program, <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm>).

Solo una popolazione di *Z. noltii* ed una di *Z. marina*, tuttavia, sono state campionate nel Mediterraneo, mentre sono tutte mediterranee le popolazioni di *Cymodocea nodosa* studiate da Ruggiero (2004).

Seagrasses	n° pop	G/N	Avg G/N	He	Ho	Ho>He	θ	Referenze
<i>Posidonia oceanica</i>	26	0.05-1	0.65	0.21-0.53	0.21-0.65	68%	0.267	Presente Tesi
<i>Cymodocea nodosa</i>	17	0.05-1	0.59	0.30-0.65	0.28-0.65	47%	0.241	Ruggiero, 2004
<i>Zostera noltii</i>	32	0.02-1	0.72	0.37-0.65	0.33-0.66	32%	-	Coyer et al. 2004
<i>Zostera marina</i>	49	0.03-1	0.67	0.15-0.68	0.17-0.65	28%	0.385	Olsen et al. 2004

3.4-DISCUSSIONE

Una caratteristica comune delle fanerogame marine è la grande variabilità del valore di diversità clonale trovato nelle diverse popolazioni.

Si passa, infatti, da praterie completamente clonali o caratterizzate da pochi genotipi a praterie in cui ogni individuo è genotipicamente diverso dall'altro. Nelle piante terrestri non si trova mai un range così ampio di diversità clonale (Reusch et al. 2000).

La dimensione dei cloni generalmente è indipendente dalla latitudine o dalla ricchezza allelica, mettendo in luce l'importanza dei fattori locali nel determinare la struttura genetica delle popolazioni.

Un moderato disturbo ambientale potrebbe favorire, ad esempio, un aumento della diversità genotipica, creando una limitata discontinuità nelle praterie che favorisca il reclutamento di nuove giovani piantine e facendo diminuire la superiorità genotipica di individui molto ben adattati alle precedenti condizioni ambientali. Esperimenti manipolativi in situ su *Z. marina* (Reusch 2006) sembrano sostenere questa teoria.

Un forte impatto ambientale, seguito da condizioni di stabilità potrebbe, invece, favorire la crescita clonale (Coyer et al. 2004).

In realtà è molto difficile generalizzare, occorre valutare di volta in volta le situazioni locali in cui si trovano le popolazioni oggetto di studio.

Nel caso delle praterie di *Posidonia oceanica*, ad esempio, il valore di diversità clonale sembra essere più basso nelle popolazioni orientali (valore medio di $G/N=0.525$), rispetto a quello trovato nelle popolazioni occidentali ($G/N=0.644$) e del Canale di Sicilia ($G/N=0.736$).

Tuttavia, anche se la popolazione con il valore più basso di diversità clonale è risultata essere quella campionata a Koper (Mar Adriatico), valori molto bassi sono stati trovati anche nelle popolazioni dello Stretto di Messina (Rec e Mes).

Il risultato ottenuto nella popolazione di Koper ha confermato quello precedentemente trovato nella stessa popolazione con l'utilizzo del set di TSSR da Ruggiero et al. (2002).

Ruggiero et al. (2002) hanno ipotizzato un evento di ricolonizzazione post-glaciale in questa regione, iniziato da pochi individui rimasti successivamente isolati che si sarebbero poi riprodotti prevalentemente in maniera vegetativa.

La bassa diversità clonale trovata nelle popolazioni di Reggio Calabria e Messina, invece, potrebbe essere dovuta alle forti correnti marine che caratterizzano lo Stretto di Messina, che potrebbero aver favorito l'accrescimento clonale delle praterie dato che presumibilmente è difficile il reclutamento di semi e di giovani piantine. E' interessante notare che anche la popolazione di *Cymodocea nodosa* campionata a Messina (Ruggiero, 2004) è risultata essere clonale.

Il livello complessivo di differenziazione genetica tra popolazioni (θ) trovato nelle praterie di *Posidonia oceanica*, è paragonabile a quello rilevato nelle altre fanerogame marine (tab. 3.7), mentre risulta essere superiore la percentuale di popolazioni in cui si trova un eccesso di eterozigosi.

Quest'ultimo risultato non è di facile interpretazione. I fattori che si ritiene influenzino la struttura genetica delle popolazioni delle fanerogame marine sono, infatti, il sistema riproduttivo (specie monoiche/dioiche), il potere di dispersione (tramite polline, semi, frutti oppure trasporto di frammenti vegetativi) e l'accrescimento clonale (per elongazione del rizoma, pattern di crescita e persistenza clonale).

Posidonia oceanica è una pianta con infiorescenze ermafrodite caratterizzata da fioriture e fruttificazioni sporadiche e dalla più alta persistenza clonale.

Cymodocea nodosa, invece, è una specie dioica, mentre *Zostera marina* e *Zostera noltii* sono monoiche. Sia *C. nodosa* che le specie appartenenti al genere *Zostera*, inoltre, si riproducono sessualmente in maniera regolare.

In *P. oceanica*, tuttavia, la maggior parte delle popolazioni mostra un eccesso di eterozigosi.

Anche se *P. oceanica* è una specie ermafrodita, infatti, potrebbero essere presenti delle barriere (o)che limitino l'autofecondazione. In uno studio effettuato per valutare la possibilità di autogamia in *P. oceanica* è stato osservato, per esempio, uno sfasamento di circa 10 giorni tra la maturazione dei fiori femminili ed il rilascio del polline e, ricoprendo le infiorescenze con un involucro trasparente di plastica per evitare la fecondazione eterologa, si è verificato che pur essendo l'autofecondazione possibile, il suo tasso è molto basso. Solo il 10.8% delle infiorescenze ricoperte ha prodotto, infatti, frutti, mentre tutte le infiorescenze scoperte hanno prodotto da uno a quattro frutti (Sandmeier et al. 1999).

Bisogna considerare, inoltre, che l'eccesso di eterozigosi potrebbe non essere dovuto esclusivamente alla modalità riproduttiva, in quanto spesso caratterizza gli organismi clonali (Ivey e Richards 2001, Vasseur 2001) e pattern diversi di variazione genetica possono riscontrarsi anche tra specie con lo stesso meccanismo riproduttivo (Jump et al 2003). Ciò indica che l'eccesso di eterozigosi è influenzato non solo dal sistema riproduttivo, ma anche da altri fattori quali la superiore fitness degli individui eterozigoti combinati alla riproduzione clonale (Jump et al 2003).

Anche nel caso specifico delle fanerogame marine sembra l'eterozigosità favorisca, su larga scala temporale, la fitness dei cloni (Hammerli e Reush 2003, Reush 2006).

Le analisi condotte utilizzando l'intero data set ha evidenziato l'esistenza, nel Mediterraneo, di due gruppi principali: il primo formato dalle popolazioni occidentali, popolazioni dello Stretto di Messina e del Canale di Sicilia (1-3) ed il secondo dalle popolazioni orientali (4). (Fig. 5).

Le popolazioni del Canale di Sicilia, che formalmente appartengono al bacino orientale, formano infatti un unico gruppo con le popolazioni occidentali, al contrario di quanto sembrava emergere da un precedente lavoro di biogeografia di *Posidonia oceanica* (Harnaud-Aond et al., 2006, *in press*) condotto nella stessa area e con gli stessi marcatori, ma con un numero inferiore di popolazioni nel Canale di Sicilia e senza l'analisi delle popolazioni calabresi.

Osservando il grafico PCA (Fig 1), comunque, si può vedere che un sottogruppo (gruppo 3) delle popolazioni del Canale di Sicilia (Malta 1 e 2) e la popolazione di Marzamemi (Ionio) si trovano in una posizione centrale tra i due gruppi principali, pur essendo più simili alle popolazioni occidentali rispetto a quelle orientali (come indicato dall'Analisi della Varianza Molecolare, tab 4).

La posizione intermedia delle popolazioni di Marzamemi, Malta 1 e Malta 2, si può osservare anche dagli istogrammi ottenuti con le frequenze alleliche (Fig. 3a/b). Si può notare, infatti, la presenza di alcuni alleli condivisi solo da tali popolazioni e da quelle dell'Est e, molto spesso, alleli presenti nelle popolazioni occidentali e del Canale di Sicilia ma non nelle popolazioni orientali. Bisogna notare, inoltre, la posizione cruciale delle popolazioni dell'Arcipelago maltese e del versante sud-orientale della Sicilia, che sono in contatto non solo con le altre popolazioni del Canale di Sicilia, ma anche, attraverso lo Stretto di Messina, con le popolazioni occidentali. Secondo il test di assegnazione dei genotipi condotto con GeneClass, infatti, si ha la presenza di un genotipo proveniente da Belmonte nella popolazione di Marzamemi.

Infine, quando gli alleli sono presenti in tutti i gruppi, generalmente si hanno frequenze molto diverse tra regioni, con differenze massime tra le regioni 1 e 4 (popolazioni occidentali ed orientali del bacino del Mediterraneo).

Le differenze tra popolazioni occidentali ed orientali del Mediterraneo riscontrate potrebbero essere dovute non solo al presente regime idrografico, ma anche a quello passato. Durante l'era

glaciale del Pleistocene, infatti, il ridotto livello del mare e la riduzione in ampiezza del Canale di Sicilia ha implicato un riduzione negli scambi tra il bacino occidentale ed orientale del Mediterraneo (Thiede, 1978).

Per quanto riguarda il regime odierno, invece, si ha la presenza di una costante corrente in direzione Est-Sudest che attraversa il Canale di Sicilia, la cui intensità diminuisce dirigendosi verso oriente, mentre il bacino orientale è caratterizzato da correnti molto deboli (Pinardi e Masetti, 2000).

La barriera creatasi durante la glaciazione del Pleistocene, il basso livello di scambi delle popolazioni più orientali con quelle occidentali e le deboli correnti che caratterizzano il bacino orientale, sono in accordo sia con le differenze trovate tra bacino occidentale ed orientale del Mediterraneo, sia con la forte struttura genetica delle popolazioni orientali (Arnaud-Haond et al. 2006, *in press*).

Il motivi, invece, della minore disgiunzione genetica tra le popolazioni occidentali del Canale di Sicilia e quelle del Mediterraneo occidentale e della marcata strutturazione delle popolazioni all'interno del Canale stesso, tra le quali il flusso genico risulta essere abbastanza ridotto (Tab. 3.6), potrebbero essere ricercati, invece, nelle complesse caratteristiche fisiche ed idrologiche di questa regione.

In ogni caso, i risultati ottenuti in quest'area analizzando le popolazioni di *Posidonia oceanica* sono in quasi totale accordo con la suddivisione dei mari proposta da C. N. Bianchi et al. (2005), effettuata in base alla distribuzione geografica di alcuni gruppi della fauna litorale, ad informazioni sulla fitogeografia marina e all'identificazione di barriere biogeografiche di tipo fisico (soglie), fisiologiche (isoterme di superficie) ed idrologiche (*iet e gyre*).

Secondo tale suddivisione, infatti, appartenerebbero allo stesso settore biogeografico tutte le coste della Campania, le coste tirreniche della Basilicata, della Calabria e della Sicilia, nonché gran parte delle coste siciliane meridionali ed il Canale di Sicilia occidentale (escluse le coste africane), afferenti alla sezione meridionale del settore centroccidentale del Mediterraneo. Una regione biogeografica separata sarebbe, invece, formata dall'estremità sud-orientale della Sicilia (in cui si trova Marzamemi) dall'arcipelago maltese e dalle isole Pelagie, afferenti al settore sudorientale del Mediterraneo. I confini tra le due aree sono considerati "fluttuanti", come caratteristico nelle zone di transizione, in funzione delle variazioni climatiche.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

La scelta del marcatore da utilizzare per lo studio della diversità genetica in popolazioni naturali è particolarmente difficile e rappresenta un momento cruciale soprattutto quando si devono analizzare piante che possono crescere clonalmente, formando entità separate ed indipendenti, che rendono problematico il riconoscimento degli individui e la determinazione della struttura genetica delle popolazioni.

Posidonia oceanica (L.) Delile è una fanerogama marina clonale, che può riprodursi sia sessualmente mediante la produzione di semi, sia asessualmente tramite propagazione vegetativa del rizoma. Si ritiene, però, che la propagazione clonale sia la sua principale forma di accrescimento per il mantenimento e l'espansione delle praterie, con la formazione di cloni che possono estendersi per più di 100 metri (Migliaccio et al. 2005).

L'utilizzo congiunto della tecnica ISSR (inter simple sequence repeats) e dei marcatori SSR (simple sequence repeats), noti in letteratura come i maggiormente polimorfici nello studio della diversità genetica di *Posidonia oceanica* (Arnaud-Haond, 2005), ha permesso di mettere in relazione i risultati ottenuti con quelli già noti di altre popolazioni del Mediterraneo e di testare il potere di risoluzione dei nuovi marcatori sviluppati.

La comparazione tra ISSR ed SSR (T-SSR, Procaccini e Waycott 1998 e D-SSR, Alberto et al, 2003) è stata effettuata analizzando la diversità genetica in popolazioni di *Posidonia oceanica* campionate nelle coste tirreniche e ioniche della Calabria. Analizzando in maniera indipendente i risultati ottenuti con i tre set di marcatori (ISSR, T-SSR e D-SSR), le popolazioni tirreniche sono risultate essere sempre più polimorfiche rispetto a quelle ioniche. Inoltre, gli alberi UPGMA basati sulla distanza genetica di Nei hanno sempre raggruppato i genotipi in due cluster principali, in accordo con la loro origine geografica: il primo con popolazioni tirreniche, il secondo con quelle ioniche, indicando che la Calabria costituisce un'importante barriera biogeografica tra il bacino occidentale e quello orientale del Mediterraneo.

I marcatori ISSR ed SSR hanno mostrato, però, un differente livello di variabilità. In generale i microsatelliti dinucleotidi (DSSR) sono risultati essere più polimorfici, sia rispetto ai microsatelliti trinucleotidi (TSSR) che agli ISSR. Tuttavia, l'uso combinato di marcatori ISSR-SSR, selezionati in base al loro potere discriminante (Tessier et al. 1999), ha permesso di rilevare una maggiore diversità clonale nelle praterie più polimorfiche, con un valore di saturazione del rapporto G/N raggiunto con soli 11 marcatori (sui 21 testati).

I marcatori ISSR, quindi, pur essendo meno sensibili rispetto agli altri due set di marker (TSSR e DSSR), hanno dato risultati comparabili a quelli ottenuti con i microsatelliti e perciò sono potenzialmente utili nello studio biogeografico delle fanerogame marine. Inoltre, l'uso combinato di selezionati marcatori ISSR ed SSR potrebbe rappresentare un utile approccio per identificare i genotipi in piante clonali.

L'utilizzo di marcatori poco polimorfici e non molto adatti allo studio di piante clonali aveva portato a considerare *Posidonia oceanica* come una specie estremamente poco variabile e con alto tasso di inbreeding (ad es. Procaccini et al. 1996, Sandmeier et al. 1999).

L'uso congiunto dei marcatori microsatelliti DSSR e TSSR a scala di bacino (con l'analisi di 26 popolazioni di *Posidonia oceanica*), invece, ha permesso di rilevare, almeno in alcune località, livelli di variabilità veramente alti.

Al contrario di quanto si riteneva, infine, si è trovato che la maggior parte delle popolazioni del Mediterraneo analizzate mostrano un eccesso di eterozigosi.

L'uniformità genetica e gli alti livelli di individui omozigoti trovati nei precedenti studi di genetica di popolazione di *Posidonia oceanica*, venivano correlati ad un possibile sviluppo apomittico di semi, ad un basso livello di riproduzione sessuale e, infine, ad un alto tasso di inbreeding dovuto sia a geitonogamia che ad autoimpollinazione (Procaccini et al 2001). Di conseguenza si riteneva che la riproduzione sessuale fosse poco importante e sporadica, mentre la riproduzione vegetativa veniva considerata come la forma quasi esclusiva di riproduzione e accrescimento delle praterie.

Recenti studi hanno confermato che le praterie di *Posidonia oceanica* sono formate da "patch" clonali di diversa dimensione (con singoli cloni che possono estendersi anche per oltre 100 m) (Migliaccio et al., 2005) ed è noto che le fioriture delle praterie sono sporadiche. Occorre considerare, inoltre, che negli organismi clonali l'eccesso di eterozigosi può essere influenzato non solo dal sistema riproduttivo, ma anche da altri fattori quali la superiore fitness degli individui eterozigoti combinati alla riproduzione clonale (Jump et al 2003).

Tuttavia, anche se presumibilmente la forma principale di accrescimento e di mantenimento delle praterie è la riproduzione vegetativa, in base ai risultati ottenuti (massima diversità genotipica in alcune località ed eccesso di eterozigosi nella maggior parte delle popolazioni analizzate) emerge che la riproduzione sessuale in *Posidonia oceanica* ha un ruolo molto più importante di quanto si riteneva in passato.

L'uso congiunto di TSSR e DSSR, pur permettendo di rilevare una maggiore variabilità in *P. oceanica*, ha tuttavia confermato il pattern di limitato flusso genico tra popolazioni, già suggerito con l'uso dei soli microsatelliti trinucleotidi (Procaccini et al. 2001, Procaccini et al. 2002, Ruggiero et al. 2002), con la maggiore divergenza trovata tra le popolazioni orientali ed occidentali del Mediterraneo.

Le analisi effettuate hanno evidenziato, infatti, l'esistenza di due gruppi principali nel Mediterraneo: il primo formato dalle popolazioni orientali ed il secondo dalle popolazioni occidentali, dello Stretto di Messina e del Canale di Sicilia.

Le popolazioni del Canale di Sicilia, che formalmente appartengono al bacino orientale, formano quindi un unico gruppo con le popolazioni occidentali, al contrario di quanto sembrava emergere da un precedente lavoro di biogeografia di *Posidonia oceanica* (Harnaud-Aond et al. 2006, *in press*), condotto nella stessa area e con gli stessi marcatori, ma con un numero inferiore di popolazioni nel Canale di Sicilia e senza l'analisi delle popolazioni calabresi e dello Stretto di Messina.

Le due popolazioni più orientali del Canale di Sicilia (Malta 1 e 2) e la popolazione di Marzamemi (Ionio) si trovano, comunque, in una posizione centrale tra i due gruppi principali, pur essendo più simili alle popolazioni occidentali rispetto a quelle orientali.

Il flusso genico all'interno e tra i singoli gruppi, inoltre, è risultato essere abbastanza ridotto, con la maggiore differenziazione trovata all'interno delle popolazioni orientali.

La frammentazione dell'habitat attualmente in atto, quindi, potrebbe incentivare ulteriormente la strutturazione delle popolazioni e contribuire al loro isolamento genetico, rendendo le popolazioni stesse a maggiore rischio di estinzione. E' noto, inoltre, che se l'estinzione è successivamente seguita da un evento stocastico di ricolonizzazione (effetto del fondatore), probabilmente la popolazione risultante sarebbe altamente differenziata a causa della deriva genetica, che ci si aspetta sia forte nel caso di basso flusso genico (Diekmann et al. 2005).

La perdita di diversità genetica potrebbe danneggiare, inoltre, non solo il potenziale evolutivo delle specie, ma avere anche delle immediate conseguenze per le comunità associate e sulla capacità di recupero dell'ecosistema in seguito a perturbazioni ambientali.

Recenti studi (Reush et al. 2005) effettuati per valutare la capacità di “recovery” in seguito a perturbazioni naturali (aumento della temperatura) hanno evidenziato, infatti, che la diversità genotipica favorisce la capacità di recupero successiva all’impatto, probabilmente grazie alla complementarità dei genotipi, piuttosto che per la selezione di genotipi particolarmente resistenti. La diversità genotipica sembra anche avere un effetto a feedback positivo sull’abbondanza della fauna associata.

A dispetto del fatto che le praterie siano in regressione e che si assista alla distruzione o alla frammentazione del loro habitat, in alcune località è presente, comunque, un alto “potenziale genetico” che, oltre ad essere importante per il potenziale evolutivo della specie stessa, potrebbe essere anche molto utile nel caso di interventi di recupero e di trapianto. Trapianto che dovrebbe essere effettuato in aree vicine a quelle in cui siano presenti altre popolazioni di *Posidonia oceanica* (in modo da favorire la connettività tra popolazioni) e con l’utilizzo di individui genotipicamente differenti (per avere maggiore probabilità di trapiantare genotipi che meglio si adattino alle condizioni ambientali locali e garantire la maggiore diversità genetica possibile). Un altro fattore importante da considerare, inoltre, dovrebbe essere il livello di eterozigosità (Williams et al. 2001), visto che probabilmente gli individui eterozigoti hanno una maggiore fitness (Hammerli e Reush 2003) e che in precedenti esperimenti di trapianto si è osservata una performance di crescita e di ramificazione dei rizomi direttamente proporzionale al livello di eterozigosità delle praterie donatrici (Procaccini e Piazzini 2001). Vista la bassa resilienza (*sensu* Harrison, 1979) delle fanerogame marine, tuttavia, rimane di estrema importanza preservare il loro habitat e la qualità delle acque.

BIBLIOGRAFIA

- Alberto F, Correia L, Arnaud S, Billot C, Duarte CM, Serrao E (2003) New microsatellite markers for the endemic Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Mol Ecol Notes* 3:253-255
- Amos W., Harwood J. (1998) Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Phil. Trans. R. Lond.* 353: 177-186
- Arata P, Diviacco A (1989) Importanza delle praterie di *Posidonia oceanica* nel sistema marino costiero e degli interventi per la loro salvaguardia. *Acqua-Aria* 5:555-571.
- Arber A (1920) The life history of the marine Angiosperms. In: Arber A (ed) *Water plants, a study of aquatic angiosperms*, Cambridge, p 123-135
- Ardizzone G. (1982) Osservazioni sulla pesca a strascico entro le tre miglia dalla costa fra Capo Circeo e Terracina (Medio Tirreno). *Naturalista Sicil.*, S. 4, Suppl. 6 (2): 395-401.
- Ardizzone G., Belluscio A. (1996) Le praterie di *Posidonia oceanica* delle coste laziali. In “Il mare del Lazio. Indagini e studi sul Mar Tirreno prospiciente le coste della regione Lazio” Università degli studi di Roma “La Sapienza” pp. 194-217.
- Ardizzone G., Migliuolo A. (1982) Modificazioni di una prateria di *Posidonia oceanica* (L.) Delile del Medio Tirreno sottoposta ad attività di pesca a strascico”. *Naturalista Sicil.*, S. 4, Suppl. 6(3): 509-515.
- Arnaud-Haond S, Alberto F, Teixeira S, Procaccini G, Serrao E, Duarte CM (2005) Assessing genetic diversity in clonal organisms: low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. *J Hered* 96:1-7
- Arnaud-Haond S, Migliaccio M, Diaz-Almela E, Teixeira S, van de Vliet MS, Alberto F, Procaccini G, Duarte CM, Serrao E *in press* Vicariance patterns in the Mediterranean Sea:

East-West cleavage and low dispersal in the endemic seagrass *Posidonia oceanica*. J Biogeography

- Balasaravanan T, Chezian P, Kamalakannan R, Ghosh M, Yasodha R, Varghese M, Gurumurthi K (2005) Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six Eucalyptus species based on inter-simple sequence repeats (ISSR). Tree Physiol 25:1295-1302
- Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo I (2003) Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. Theor Appl Genet 107:736-744
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2002) GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bianchi C N (2005) Proposta di suddivisione dei mari italiani in settori biogeografici disponibile sul sito: www.sibm.unige.it/2005_checklist/principalececklist.htm
- Bouderesque C F, Bernard G, Bonhomme P, Charbonnel E, Diviaco G, Meinesz A, Pergent G, Pergent Martini C, Ruitton S, Tunesi L (2006) Preservation et conservation des herbiers a *Posidonia oceanica*. www.ramoge.org
- Bouderesque C F, Meinesz A (1982) Découverte de l'herbier de Posidonia. Cah. Parc Nation. Port-Cross. 6: 239-249
- Bouderesque C. F., Giraud G., Thommeret J. and Y. Thommery (1980) First attempt at dating by ¹⁴C the under sea beds of dead *Posidonia oceanica* in the bay of Port-man (Port-Cross, Var, France). Trav. Sci. Parc. Nation. Port-Cross. 6: 239-242.
- Bouzat JL (2000) The importance of control populations for the identification and management of genetic diversity. Genetica 110 (2): 109-115.

- Capiomont A, Sandmeier M, Caye G, Meinesz A (1996) Enzyme polymorphism in *Posidonia oceanica*, a seagrass endemic to the Mediterranean. *Aquat Bot* 54:265-277
- Carvalho G (1998) Advances in molecular ecology. In: Press I (ed) *Life Sciences*, Vol 306, Amsterdam
- Caye G. (1982) Etude sur la croissance de la Posidonie, *Posidonia oceanica* (L.) Delile, formation des feuilles et croissance des tiges au cours d'une année. *Téthys*, 10: 229-235.
- Cekic C, Battey NH, Wilkinson MJ (2001) The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor Appl Genet* 103:540-546
- Cook CDK (1990) *Aquatic plant book*. SPB Academic publishing, The Hague, The Netherlands.
- Cornuet J., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M. (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153 (4): 1989-2000.
- Costanza R, d'Arge R, de Groot R, Farber S, Grasso M, al. e (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387:253-260
- Cox PA, Humphries CJ (1993) Hydrophilous pollination and breeding system evolution in seagrasses: a phylogenetic approach to the evolutionary ecology of the Cymodoceaceae. *Bot. J. Linn. Soc.*, 113, 217-226.
- Coyer J.A., Diekmann O.E., Serrao E.A., Procaccini G., Milchakova N., Pearson G. A., Stam W.T., Olsen J.L (2004) Population genetics of *Zostera noltii* (dwarf eelgrass) throughout its biogeographic range. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 281:51-62
- Culley T. M. and Wolfe A. (2001) Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity* 86: 545-556.

- Crow JF, Kimura M (1970) An introduction to population genetics theory. Harper and Row, New York, Evanston and London.
- De Heij H, Nienhuis PH (1992) Intraspecific variation in isozyme patterns of phenotypically separated populations of *Zostera marina* L. in the south-western Netherlands. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.61:1–14.
- den Hartog C (1970). The seagrasses of the world. Verhandlingen Koninklijk Nederlandse Akademie Wetenschappen Afdeling Natuurkunde. 59:1–275
- den Hartog C, Kuo J (2006) Taxonomy and Biogeography of Seagrasses In: Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM (eds) Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation. Springer, The Netherlands, p 1-22
- Diaz-Almela E, Marbà N, Alvarez E Balestri E, Ruiz-Fernàndez M, Duarte C M (2006) Patterns of seagrass (*Posidonia oceanica*) flowering in the Western Mediterranean Marine Biology 148: 723–742
- Diekmann OE, Coyer JA, Ferreira J, Olsen JL, Stam WT, Pearson GA, Serrao EA (2005) Population genetics of *Zostera noltii* along the west Iberian coast: consequences of small population size, habitat discontinuity and near-shore currents. Marine Ecology Progress Series 290:89-96
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 91: 3166-3170.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19:11-15
- Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor.Appl. Genet. 95:408-417

- Féral JP (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268:121-145
- Francour P., Ganteaume A., Poulain M. (1999) Effects of boat anchoring in *Posidonia oceanica* seagrass beds in the Port-Cros National Park (north-western Mediterranean Sea). *Aquatic Conserv.: Mar Freshw Ecosyst.* 9: 391-400.
- Goudet J (2002) FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices (ver. 2.9.3.2). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guidetti P. (2000) Detecting environmental impacts on the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile: the use of reconstructive methods in combinations with 'beyond BACI' designs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 260: 27-29.
- Hammerli A., Reusch T. B. H. (2003). Inbreeding depression influences genet size distribution in a marine angiosperm. *Molecular Ecology* 12: 619-629.
- Harper JL (1977) *Population Biology of Plants*. Academic Press, New York
- Harrison GW (1979) Stability under environmental stress: resistance, resilience, persistence, and variability *American Naturalist*, 113:659-669
- Hedrick PW (1986) Genetic polymorphism in heterogeneous environments: A decade later. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*. 17:536-566
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. *Theor Appl Genet* 86:927-934
- Ivey C. T., Richards J. H. (2001) Genetic diversity of everglades sawgrass, *Cladium jamaicense* (Cyperaceae). *International Journal of Plant Sciences* 162:817-825

- Jeudy de Grissac (1984) Essai d'implantation d'espèces végétales marines: les espèces pionnières, les Posidonies. Int. Workshop on Posidonia. oceanica Beds, Bouderesque C.F., Jeudy de Grissac A., Olivier J. édit., GIS Posidonie publ., Fr., 1:431-436.
- Jeudy de Grissac A., Bouderesque C. F. (1985) Roles des herbiers de phanérogames marines dans les mouvements des sédiments cotiers: les herbiers à *Posidonia oceanica*. Coll. fr.-japon. Océanogr., Marseille, Fr., 1: 143-151
- Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, Ranjekar PK, Brar DS (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. Theor Appl Genet 100:1311-1320
- Jover MA, del Castillo-Agudo L, Garcia-Carrascosa M, Segura J (2003) Random Amplified Polymorphic DNA assessment of diversity in western Mediterranean populations of the seagrass *Posidonia oceanica*. Am J Bot 90:364-369
- Jump AS, Woodward FI, Burke T (2003). *Cirsium* species show disparity in patterns of genetic variation at their range-edge, despite similar patterns of reproduction and isolation. New Phytologist 160:359-370.
- King RA, Gornall RJ, Preston CD, Croft JM (2002) Population differentiation of *Potamogeton pectinatus* in the Baltic Sea with reference to waterfowl dispersal. Mol Ecol 11:1947-1956
- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Kimura M and Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. Proceedings of the National Academy of Sciences
- Kochieva EZ, Ryzhova NN, Khrapalova IA, Pukhalskyi VA (2002) Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in the Genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis. Russ J Genet 38:958-966

- Kuo J, den Hartog C (2000) Seagrasses: A profile of an ecological group. *Biologia Marina Mediterranea* 7 (2):3-17
- Lande R, Shannon S (1996) The role of genetic variation in adaptation and population persistence in changing environment. *Evolution* 50:434-437.
- Les DH, Cleland MA, Waycott M (1997) Phylogenetic studies in Alismatidae, II: Evolution of Marine Angiosperms (Seagrasses) and Hydrophily. *Systematic Botany* 22:443-463
- Les DH, Garvin DK, Wimpee CF (1993) Phylogenetic studies in the Monocot subclass Alismatidae: evidence for a reappraisal of the aquatic order Najadales. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2:304-314
- Li Y-C, Korola. B., Tzion Fahima, Avigdor Beiles, Eviatar Nevo (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11:2453-2465
- Lienert J Fisher M, Schneller J, Diemer M (2002) Isozyme variability of the wetland specialist *Swertia perennis* (Gentianaceae) in relation to habitat size, isolation and plant fitness. *American Journal of Botany* 89(5): 801–811. 2002.
- Maguire TL, Peakall R, Saenger P (2002) Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theor Appl Genet* 104:388-398
- Meinesz A. and Lefèvre J. R. (1984) Régénération d'un herbier de *Posidonia oceanica* quarante années après sa destruction par une bombe dans la rade de Villefranche (Alpes Maritimes, France). In: C. F. Boudouresque, A. Jeudy de Grissac and J. Olivier (Editors), International Workshop *Posidonia oceanica* Bens. Vol. 1, GIS Posidonie publ., Fr., pp.39-44.
- Migliaccio M, De Martino F, Silvestre F, G. P (2005) Meadow-scale genetic structure in *Posidonia oceanica* L. (Delile). *Marine Ecology Progress Series* 304:55-65

- Molenaar H, Barthélémy D, de Reffye P, Meinesz A, Mialet I (2000) Modelling architecture and growth patterns of *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany* 66:85-99
- Molinier R, Picard J (1952) Reserches sur les herbier phanerogames marines du litoral méditerranéen francais. In *QAnn. Ist. Oceanogr. Paris* 27(3):127-324
- Molinier R, Picard J (1953) Etudes biologiques sur les herbiers de phanerogames marines a` l'ouest d'Alger. *Bull Stn Aquicult Pêche Castiglione, Alg* 4:7-34
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Panayotidis P. and Giraud G. (1981) Sur un cycle de renouvellement des feuilles de *Posidonia oceanica* (L.) Delile dans le Golfe de Marseille. *Vie et Milieu* 31(2): 129-136.
- Pasqualini V, Pergent-Martini C, Clabaut P, Pergent G (1998) Mapping of *Posidonia oceanica* using Aerial Photographs and Side Scan Sonar: Application off the Island of Corsica (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 47:359-36
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288-295
- Peakall R, Smouse PE, Huff DR (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Mol Ecol* 4:135-147
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347-354
- Parsons BJ, Newbury HJ, Jackson MT, Ford-Lloyd BV (1997). Contrasting genetic diversity ralationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types,. *Molecular Breeding* 3:115-123.
- Pergent Martini C, Pergent G (1996) Spatiotemporal dynamics of *Posidonia oceanica* beds near a sewage outfall (Mediterranean-France) in: *Seagrass Biology: proceedings of an*

international workshop. Eds John Kuo, Ronald C. Phillips, Diana I. Walker, Hugh Kirkman. Rottnest Island, Western Australia, pp 299-306.

Picard J. (1953) Les Herbiers de Posidonies, important facteur de l'élévation de fonds littoraux. Rev. Géomorphol. Dynam. 2: 83-84.

Pinardi N, Masetti E (2000) Variability of the large scale general circulation of the Mediterranean Sea from observations and modelling: a review. Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology 158:153-174

Procaccini G, Alberte RS, Mazzella L (1996) Genetic structure of the seagrass *Posidonia oceanica* in the Western Mediterranean: ecological implications. Mar Ecol Prog Ser 140:153-160

Procaccini G, Buia MC, Gambi MC, Perez M, Pergent-Martini C, Pergent G, Romero J (2003) Seagrass status and extent along the Mediterranean coasts of Italy, France and Spain. In: Green EP, Short FT (eds) World Atlas of Seagrasses. Univ. of California Press, Berkeley, USA., p 48-58

Procaccini G, Maltagliati F (2003) Approcci metodologici all'analisi della diversità genetica di organismi bentonici. In: Manuale di metodologie di campionamento e studio del bentos marino mediterraneo, Vol 10 (suppl.). Biologia Marina Mediterranea, p 509-548

Procaccini G, Mazzella L (1996) Genetic variability and reproduction in two Mediterranean seagrasses. In: Kuo J, Phillips RC, Walker DI, Kirkman H (eds) Seagrass Biology: proceedings of an international workshop. SCIENCES UWA, Rottnest Island, Western Australia, p 85-92

Procaccini G, Mazzella L, Alberte RS, Les DH (1999) Chloroplast tRNA^{Leu} (UAA) intron sequences provide phylogenetic resolution of seagrass relationships. Aquatic Botany 62:269-283

Procaccini G, Orsini L, Ruggiero MV, Scardi M (2001) Spatial patterns of genetic diversity in *Posidonia oceanica*, an endemic Mediterranean seagrass. Molecular Ecology 10:1413-1421

- Procaccini G, Piazzì L (2001) Genetic polymorphism and transplanting success in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Restoration Ecology* 9:332-338
- Procaccini G, Ruggiero MV, Orsini L (2002) Genetic structure and distribution of microsatellite population genetic diversity in *Posidonia oceanica* in the entire Mediterranean basin. *Bullettin of Marine Science* 71:1291-1297
- Procaccini G, Waycott M (1998) Microsatellite loci identified in the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Journal of Heredity* 89:562-568
- Provini A., Galassi S., Marchetti R. (1998) *Ecologia applicata*. Città Studi Edizioni, Torino, pp. 1012-1013.
- Raffetto G., Funari E., Pagnotta R., Pettine M., Carlini E., Tomei V., Albanese S. (2001) Elementi per la caratterizzazione fisico-chimica, biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.LGS 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota. ANPA, [http://www.sinanet.anpa.it/rete/ctn/Prodotti CTN_AIM/RTAIM-4-2001.pdf](http://www.sinanet.anpa.it/rete/ctn/Prodotti%20CTN_AIM/RTAIM-4-2001.pdf).
- Reusch T. B. H., W. T. Stam, et al. (2000). A microsatellite-based estimation of clonal diversity and population subdivision in *Zostera marina*, a marine flowering plant. *Molecular Ecology* 9: 127-140.
- Reusch TBH, Ehlers A, Hammerli A, Worm B (2005) Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2826-2831
- Reusch T. B. H. (2006). Does disturbance enhance genotypic diversity in clonal organisms? A field test in the marine angiosperm *Zostera marina*. *Molecular Ecology* 15: 277-286.
- Ruggiero M. V. (2004). Spatial Genetic Structure in the clonal marine angiosperm *Cymodocea nodosa*: the influence of dispersal potential, mating system and species interactions. Tesi Dottorato.

- Ruggiero MV, Procaccini G (2004) The rDNA ITS region in the marine angiosperm *Halophila stipulacea* (Hydrocharitaceae): intra-genomic variability and putative pseudogenic sequences. *Journal of Molecular Evolution* 58:115-121
- Ruggiero M. V., Turk R., Procaccini G. (2002). Genetic identity and homozygosity of North Adriatic populations in *Posidonia oceanica*: an ancient Post-Glacial clone? *Conservation Genetics* 3: 71-74.
- Sandmeier M, Caye G, Molenaar H (1999) Seed enzyme polymorphism and autogamy of the seagrass *Posidonia oceanica* from the Western Mediterranean. *Botanica Marina* 42:359-366
- Scialpi A., Intrieri M. C., Buiatti M. (2002) DNA variation molecular marker as tool for environmental impact evaluation. In: *Baseline research for the integrated sustainable management of Mediterranean sensitive coastal ecosystem*. F. Scapini Ed. IAO.
- Semroud R (1993) Donne' es sur des floraisons anciennes de *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile dans la région d'Alger (Algérie). *Posidonia Newslett* 4:31-35
- Short FT (eds) *World Atlas of Seagrasses*. Univ. of California Press, Berkeley, USA., p 48-58
- Terrados J, Borum J (2004) Why are seagrasses important? Goods and services provided by Seagrasses meadows. In: *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*. <http://www.seagrasses.org>
- Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A. (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* (L.) *Theor Appl Genet* 98:171-177
- Thiede J (1978) A Glacial Mediterranean. *Nature* 276:680-683
- Tomlinson PB (1982) Helobiae. In: Metcalfe CR (ed) VII. Helobiae (Alismatidae), Vol VII. Clarendon Press, Oxford, p 1-188, 484-509

- Vasseur L (2001) Allozymic diversity of *Allium Tricoccum* (Ait.) Solander var. *burdickii* Hanes in isolated populations of Nova Scotia (Canada). *Plant Systematics and Evolution* 228:71-79.
- Valière N (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual data. *Molecular Ecology Notes*, 2: 377-379.
- Wang CN, Moller M, Cronk QC (2004) Population genetic structure of *Titanotrichum oldhamii* (Gesneriaceae), a subtropical bulbiferous plant with mixed sexual and asexual reproduction. *Ann Bot (Lond)* 93:201-209
- Wang G, Mahalingam R, Knap HT (1998) (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theor Appl Genet* 96:1086-1096
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1360.
- Williams SL (2001) Reduced genetic diversity in eelgrass transplantations affects both population growth and individual fitness. *Ecological Applications* 11:1472-1488
- Williams SL, Davis CA (1996) Population genetic analysis of transplanted eelgrass (*Zostera marina*) reveal reduced genetic diversity in southern California. *Restoration Ecology*, 4:163-180.
- Williams SL, Orth RJ (1998) Genetic diversity and structure of natural and transplanted eelgrass populations in the Chesapeake and Chincoteague Bays. *Estuaries*, 21:18-128.
- Virnstein RW, Morris LJ (1996) Technical Memorandum 14. Seagrass Preservation and Restoration: A Diagnostic Plan for the Indian River Lagoon St. Johns River Water Management District, Palatka, Florida.
- Wolfe A. D., Xiang Q. Y. and Kephart S. R. (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecol.* 7: 1107-1125.

- Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 88:1-6
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics*, 28:114-138.
- Waycott M, Procaccini G, Les DH, Reusch TBH (2006) Seagrass evolution, ecology and conservation: a genetic perspective In: Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM (eds) *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer, The Netherlands, p 25-50
- Xia T, Shilong C, Shengyun C, Xuejun G (2005). Genetic Variation Within and Among Population of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) Native to the Tibetan Plateau as Detected by ISSR Markers. *Biochemical Genetics* 43:87-101
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TJB, Ye ZH, Miao JX (1997) POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alta
- Zietkiewitz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20:176-183

UBBLICAZIONE ORIGINALE

Ilia Anna Serra, Gabriele Procaccini, Maria Carmela Intrieri, Marianna Migliaccio, Silvia Mazzuca,
Anna Maria Innocenti

**Comparison of ISSR and SSR markers for the analysis of genetic
diversity in *Posidonia oceanica* (L.) Delile**

Marine Ecology Progress Series *in press*

ABSTRACT

Posidonia oceanica is an endemic seagrass species in the Mediterranean Sea. Due to its ecological importance, it has been the object of several genetic studies aimed to increase the general knowledge of the system and to help in defining appropriate management strategies.

The goal of our analysis was to compare the efficiency of two different classes of molecular markers, inter simple sequence repeats (ISSRs) and simple sequence repeats (SSRs) or microsatellites, in population genetic analysis of *P. oceanica*. In order to do that we analyzed meadows along the coasts of the Calabria peninsula (Italy, South Tyrrhenian Sea and Ionian Sea), a putative biogeographic barrier for *P. oceanica*.

SSR and ISSR markers detected different levels of genetic variability within *P. oceanica* populations. Dinucleotide microsatellites were more polymorphic than tri- and heptanucleotide microsatellites and ISSRs. Nevertheless, discriminating power analysis performed for each single locus showed that some trinucleotide microsatellite and ISSR primers were more sensitive than dinucleotides. The use of selected ISSR and SSR markers together allowed the detection of higher polymorphism than either set of marker alone. Tyrrhenian meadows were always more polymorphic than Ionian ones, according to both SSRs and ISSRs. Both markers strongly suggested the Calabria peninsula as an important biogeographic barrier between the Western and the Eastern side of the Mediterranean basin.

INTRODUCTION

Marine flowering plants or seagrasses are distributed worldwide and play an important role in the dynamics and stabilization of the coastline (Procaccini et al. 2003). Seagrasses reproduce sexually, through hydrophilous pollination, and vegetatively by elongation of subterranean rhizomes bearing new leaf shoots (den Hartog 1970). These factors combine to make identification of individuals problematic, requiring the use of high-resolution molecular markers to assign single shoots (ramets) to separate genets (Reusch 2001, Waycott et al. 2006).

A number of markers are currently available which can discriminate among ramets in such instances (Procaccini & Maltagliati 2004). Among these, simple sequence repeats (SSRs; Jarne & Lagoda 1996) or microsatellites have been successful in population genetic studies of benthic organisms in general, due to their high variability and statistical power (Reusch 2001). SSRs are co-dominantly inherited, allowing the heterozygote in diploid genomes to be distinguished. SSRs are highly reproducible, thanks to specific PCR amplifications of short repeated sequences, which produce polymorphic patterns depending on the number of repeated units (Goldstein & Schlotterer 1999). Their initial cost of development is relatively high but, once the loci are selected, the method becomes fast and readily employed (Jarne & Lagoda 1996, Goulão & Oliveira 2001). Limited statistical analysis and poor cross-experimental reproducibility represent some drawbacks of dominant markers, where the homozygous presence of a fragment is not distinguishable from its heterozygote. Among dominant markers inter simple sequence repeats (ISSR) (Zietkiewicz et al. 1994) are more reproducible than random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Williams et al. 1990), and less

expensive to use than amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Vos et al. 1995). ISSR markers use arbitrary primers represented by short repeated sequences. Allelic polymorphisms occur whenever the repeated sequence is missing or insertions/deletions modify the distance between repeats. ISSRs have the advantage to analyze multiple loci in a single reaction and to be more accessible to ecological laboratories that lack sophisticated equipment and/or adequate technical expertise. ISSRs were applied successfully in population genetic studies in a variety of organisms including clonal plants (King et al. 2002; Wang et al. 2004).

Posidonia oceanica (L.) Delile is an endemic Mediterranean seagrass, widely distributed along the Mediterranean coasts where it forms large monospecific beds across a wide bathymetric gradient (Procaccini et al. 2003). *Posidonia oceanica* meadows fulfil important ecological functions, stabilising the substratum, attenuating the wave action, increasing oxygen in nearshore waters and sheltering juveniles of fishes and invertebrates (Procaccini et al. 2003). *Posidonia oceanica* has a monoecious mating system and potentially long-range dispersal by floating fruits and detached vegetative fragments. Sexual reproduction occurs irregularly throughout the whole basin and very large clones, extending over more than 100 meters, can be found within the meadows (Migliaccio et al. 2005). *Posidonia oceanica* meadows, like other seagrass ecosystems, are extremely sensitive to the moderate to high levels of disturbances often associated with highly human impacted coasts (Procaccini et al. 2003).

Due to its ecological importance and to the strong human impact along the coast of the Mediterranean basin, *P. oceanica* has been the object of several genetic studies (Procaccini et al. 2001, Procaccini et al. 2002, Arnaud-Haond et al. 2005, Arnaud-Haond et al. *in press*). Those were aimed to increase general knowledge of the system and to support coastal management and restoration programs. *Posidonia oceanica* meadows exhibit different levels of genetic variability when investigated with different molecular markers. Initial studies using allozymes (Capiomont et al. 1996) and multilocus DNA markers such as randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and M13-DNA fingerprinting (Procaccini et al. 1996) indicated that meadows were almost completely clonal and highly distinct genetically. More recent studies using more RAPD primers (Jover et al. 2003, Micheli et al. 2005) and tri- and heptanucleotide microsatellites (or SSR - Simple Sequence Repeats; Procaccini et al. 2001; Procaccini et al. 2002), contradicted these findings detecting higher levels of variation. This is not surprising for allozymes (i.e. electrophoretically separable morphs of enzymes) if we consider that they cannot take into consideration silent mutations in coding and non-coding regions of DNA, and therefore underestimate the real genetic variation. For multilocus DNA fingerprinting techniques, instead, the reason can rely in the fact that polymorphism can be wiped out from the analysis together with faint or not well represented bands in replicated electrophoretic profiles. Recent and significant advances in population genetics of *P. oceanica* have been made possible by the selection of highly polymorphic dinucleotide microsatellites (Alberto et al. 2003). Data obtained with those markers changed the perception of *P. oceanica* as a species with low genetic variability by detecting, at least in some localities, very high levels of genetic diversity (Arnaud-Haond et al. 2005, Migliaccio et al. 2005, Arnaud-Haond et al. *in press*).

We are aware that advanced and expensive molecular analyses, such as microsatellite genotyping, are not easily performed in ecological laboratory. The aim of this paper was to evaluate the resolution of ISSR markers with respect to their use for studying genetic diversity and gene flow in *Posidonia oceanica* in comparison with other molecular markers, especially SSRs. We used SSR and ISSR markers to analyze genetic diversity among population of *Posidonia oceanica* along the Calabrian coasts (Italy, South Tyrrhenian Sea and Ionian Sea), a region from which no previous genetic data exist of *P. oceanica* meadows.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and DNA extraction

Individual shoots of *Posidonia oceanica* (L.) Delile were randomly sampled by SCUBA diving in five populations along the coast of Calabria, Italy (Fig 1): three in the Tyrrhenian Sea (Praia a Mare, San Nicola Arcella and Belmonte Calabro) and two in the Ionian Sea (Crotone and Cariati).

About 25 individual shoots were collected from each meadow. Shoots were collected every 8-10 m along linear transects, to minimize the risk of sampling within the same clonal patch. Samples were transferred to the laboratory, cleaned of epiphytes with a razor blade and stored at -80°C for DNA extraction.

DNA was purified according to Doyle & Doyle (1987) and modified as following: approximately 100 mg wet weight of leaf tissue were ground to a fine powder in a mortar using liquid nitrogen and then transferred to a 1.5 Eppendorf tube filled with the extraction buffer (2% CTAB, 2% 2-mercaptoethanol, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA, 200 mM Tris-HCl pH 7.5). After incubation at 60°C for 30 min, the homogenate was washed once with 800 μl chloroform-isoamyl alcohol (24:1 v/v), and precipitated with an equal volume of ice-cold isopropanol. The DNA pellet was washed twice, first with 100 μl of buffer A (76% EtOH, 200 mM sodium-acetate) and then with 100 μl of buffer B (76% EtOH, 10 mM ammonium-acetate), air-dried and dissolved in 100 μl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). RNA was removed by incubating at 37°C for 60 min with RNase A (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Total genomic DNA was quantified using a DyNA Quant TM 200 fluorometer (Hoefer, Inc., San Francisco, California, USA) and working solutions (25 ng μl^{-1}) were prepared in sterile water.

ISSR analysis

A total of twelve 3'-anchored primers (MWG-Biothec, Ebersberg, Germany) was tested for ISSR amplifications in *P. oceanica* (Table 1). Eight primers that showed clear and reproducible banding patterns were selected. The eight primers include ten di-nucleotide repeats and two tri-nucleotide repeats. Amplification reactions were carried out in 25 μl volumes containing 37.5 ng of template DNA, 1 unit of Taq-polymerase (Roche), 0.2 mM dNTPs (Roche), 1.5 pmol/ μl^{-1} of primer (MWG-Biothec, Ebersberg, Germany), 10mM Tris-HCl (pH 8.3) and 1.5 mM MgCl_2 , 50mM KCl. PCR reactions were performed under the following conditions: 3 min at 94°C for initial denaturation, 35 cycles of 60 sec at 94°C (denaturation), 60 sec at 44°C (annealing), and 90 sec at 72°C (extension), followed by a final extension of 5 min at 72°C for final extension.

PCR products were separated on 2.5% Agarose 0.5 X TBE gels, ethidium-bromide stained and visualized on a UV light box. Photographs were taken of each gel using a Polaroid camera (DS-34). A 100 base-pair ladder was used to estimate the molecular size of bands.

ISSR reactions were repeated at least three times and bands that were not consistent in all three reactions were discarded. Although a very high number or larger fragments existed, the proximity between bands or their low intensity made scoring very difficult. Highly reproducible bands uniformly comprised 300-1500 bp fragments. Bands within the selected size-range, also were discarded when overlapping or unclear. ISSR bands were scored as absent (0) and present (1), assuming that each band

position corresponded to one “locus” with two “alleles” respectively. The final data sets included both polymorphic and monomorphic fragments.

SSR analysis

Thirteen polymorphic microsatellite regions, twelve nuclear and one chloroplastic, were used to obtain individual multilocus genotypes. We refer to the six loci previously isolated by Procaccini & Waycott (1998), with a dominance of trinucleotide repeats, as T-SSR. The seven loci isolated by Alberto et al. (2003), with a dominance of dinucleotide repeats, are referred to D-SSR (Table 2). Reactions were carried out in a total volume of 10 µl following Migliaccio et al. (2005). PCR amplifications were checked on 1.5% Agarose 1x TAE gels.

SSR allele detection was conducted using an automated sequencer (CEQ 2000XL DNA Analysis system, Beckman Coulter) and electropherograms were analysed using the Beckman CEQ 2000 ver. 3.0 software (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, USA).

Data analysis

To compare the efficiency of ISSR, D-SSR and T-SSR markers, we estimated the following parameters as described in Tessier et al. (1999) (i) number of polymorphic molecular variants (MV are represented by bands for ISSR and alleles for SSR markers); (ii) number of banding patterns for each SSR locus/ISSR primer;

(iii) confusion probability (C_j) of j -th assay unit:

$$C_j = \sum_{i=1}^I p_i [(N p_i - 1)/(N - 1)]$$

where p_i is the frequency of the i -th pattern, N the sample size and I the total number of patterns generated by the j th assay unit;

(iv) discriminating power (D_j) of the j th assay unit :

$$D_j = 1 - C_j$$

(v) limit of D_j as N tends towards infinity:

$$D_L = \lim (D_j) = 1 - \sum_{i=1}^I p_i^2$$

Clonal diversity was calculated in each population (for each marker) as the proportion of distinguishable genets (G/N), where G is the number of genets detected and N is the number of samples (Pleasant & Wendel 1989). In order to find the best possible marker combination to use for assessing intra-population variability we plotted G/N values obtained by adding sequentially one marker at a time starting with the one having the highest D value. Only SSR markers with highest nine D values and ISSR markers with the highest two D values were considered. Curves describing the dependence of G/N on number of markers were compared.

In order to evaluate how efficiently the different markers performed in partitioning molecular variance, an AMOVA analysis was carried out using the software GenAlEx 6 (Peakall & Smouse 2006). Variation was expressed both as the proportion of the total variance and as Φ -statistics, an F -statistic analogue, where Φ_{rt} represents the correlation of individuals from the same geographic region relative to that of individuals from the whole data set, Φ_{pr} represents the correlation between individuals within a population relative to that of individuals from the same geographic region, and Φ_{pt} represents the correlation between individuals within a population relative to that of individuals from the whole data set. Estimates of Φ_{pt} values were also obtained to assess gene flow within and between geographic regions. Significance was tested by random permutation, with the number of permutations set to 9999.

Principal coordinates analysis (PCA) calculated on pairwise genetic distance for both the ISSR and SSR data sets was performed using GenAlEx 6 software (Peakall & Smouse 2006). Distances were calculated as in Huff et al. (1993) for ISSRs and as in Peakall et al. (1995) for SSR data. Nei's (1978) genetic distance was calculated using POPGENE software (Yeh et al. 1997). Dendrograms based on Nei's (1978) genetic distance and the UPGMA trees were also constructed using POPGENE.

RESULTS

Of the twelve primers tested for ISSR analysis, only eight were selected for final scoring and only five of them were polymorphic. The sizes of alleles for SSR loci were within the expected range based on published data (Procaccini et al. 2001, Arnaud-Haond et al. 2005, Migliaccio et al. 2005, Arnaud-Haond et al. *in press*).

In order to evaluate relative polymorphism among the different markers classes utilized, we compared data obtained from SSR alleles with those from ISSR bands. The total number of molecular variants (MVs) varies from 75 for ISSR to 21 for T-SSR (Table 2). All MVs were polymorphic both for D-SSR and for T-SSR data; however, only 13.3% were polymorphic among the ISSR bands. The value slightly increased (20.4%) if only the polymorphic ISSR primers were considered (Table 2).

Discriminating power was lower for polymorphic ISSR (mean $D = 0.466$) than for T-SSRs and D-SSRs, respectively (mean $D = 0.484$ and 0.625 , Table 2). Confusion probability values showed the opposite trend, with higher mean values for ISSRs and lower mean values for SSR (Table 2). With respect to the discriminating power of single ISSR-primers/SSR-loci, the values were not always coherent within the same marker class. For example, T-SSR loci *Poc-35* and *Poc-45* were the third and fifth most powerful loci, respectively; ISSR10 was in sixth; D-SSR loci *Po5-39* and *Po4-3* were in 14th and 17th position, respectively, across all 18 polymorphic markers (Table 2).

Tyrrhenian populations were more polymorphic than Ionian ones, both in terms of number of G/N values and of MVs (Table 3). The number of polymorphic ISSR bands ranged from one in the two Ionian populations to 9 in Praia, where a higher number of SSR alleles was also found (Table 3).

Overall, D-SSR markers detected higher clonal diversity ($G/N = 0.50$, Table 3), with the value increasing to 0.64 for all SSR markers collectively. Clonal diversity values for ISSR markers varied widely among the five populations considered, ranging from 0.91 in Praia to 0.08 in the two Ionian populations. Tyrrhenian populations were more diverse than Ionian ones as indicated by microsatellite markers (Table 3). Interestingly, multilocus genotypes based on combined SSR and ISSR markers resulted in higher values of clonal diversity. Overall G/N values increased from 0.44 (ISSRs) and 0.64 (SSRs) to 0.75 (all markers combined; Table 3).

By comparing curves obtained by plotting G/N values of marker combinations against the nine SSRs and two ISSRs with highest D values (Table 2, Fig. 2) it is evident that G/N values reach saturation after five loci in the two less polymorphic populations (Crotone and Cariati). In the other populations, G/N values increase up to the addition of the last SSR locus and saturate only after the addition of ISSR10 and ISSR2 to the first nine SSR loci (Fig. 2).

The different classes of molecular markers also vary in their ability to distinguish populations and quantify gene flow. All marker categories evaluated and all indices calculated showed limited gene flow between the two geographic regions as evidenced by the low Nm values and high Φ_{pt} values in the last column of Table 4. Higher distinction was achieved by SSR markers (SSR $\Phi_{pt} = 0.596$; ISSR $\Phi_{pt} = 0.584$; Table 4). Very low genetic distance and high gene flow are detected by ISSR markers between the two Ionian populations, as showed by the high Nm value and low Φ_{pt} value in the 'Ionian' column of Table 4, where SSR, instead, show higher resolution. This relationship is also clear in the PCA plots (Fig. 3). Distinction between Tyrrhenian and Ionian regions is also evident in the Tot-SSR plot (Fig. 3b), where the two Ionian populations (Cariati, Crotone) are clearly differentiated from the others. However, for the Tyrrhenian populations, Praia individuals are partially intermixed with those from San Nicola and Belmonte. Population clusters are less confined in the ISSR plot (Fig 3a), where the distinction between the two regions is less obvious.

In all cases the dendrograms based on Nei's genetic distance showed identical clustering relationships among all populations. The position of the three Western populations (Praia, Belmonte, San Nicola) within the cluster is also was identical and consistent with their geographic position. The two closest populations (Praia, S. Nicola) always clustered together. The relative poorer ability of ISSR markers to separate the two Ionian populations (Cariati, Crotone) was indicated by the low extent of genetic distance separating these accessions in the ISSR dendrogram (Fig. 4).

AMOVA analysis showed a higher percent variance among individuals within populations with all marker classes (Table 5). Values of variance among populations within regions were low as determined by ISSR markers (variance = 0.396), due to the Ionian populations. Tot-SSRs showed consistently higher variance between the two regions with respect to ISSR markers (Table 5).

DISCUSSION

The goal of our analysis was to compare the efficiency of two different classes of molecular markers (ISSRs and SSRs) in population genetic analyses of *Posidonia oceanica*, a clonal marine macrophyte. Our results suggest that SSRs are preferential markers to use for assessing meadow clonal diversity. Both ISSRs and SSRs detected limited gene flow between Tyrrhenian and Ionian populations.

In order to perform our analysis, we utilized two sets of microsatellite primers (Procaccini & Waycott 1998, Alberto et al. 2003) and eight ISSR primers. Not all the ISSR markers initially screened were utilized for the final analysis. For two of them (ISSR1 and ISSR4), containing (CT) and (GT) repeats, banding patterns were smeared and not easily scorable. Similar patterns could be attributed to high frequency of corresponding microsatellites in the genome (Joshi et al. 2000), although we obtained good results using primers with the same repeats and different 3'-anchor sites (ISSR2 and ISSR3, respectively). Two other primers, both based on (AT)_n repeats (ISSR9 and ISSR12), did not yield any amplification product. It is worth noting that a similar lack of amplification with (AT)-based primers has been observed in other plant species (e.g. Joshi et al. 2000, Kochieva et al. 2002). One

possibility is that unsuccessful amplifications could be due to self-complementarities of (AT) repeats, which may self-anneal and form dimers and hairpin loops, hindering amplification (Wang et al. 1998, Cekic et al. 2001).

Arnaud-Haond et al. (2005) compared genetic polymorphism using the same two sets of SSR markers utilized here. Their results showed that D-SSR markers were more polymorphic than T-SSRs, allozymes and RAPD markers, in terms of average number of alleles per polymorphic primer/locus. Our data confirm these results, at least with respect to the differences between D-SSRs and T-SSRs, and rank ISSRs close to RAPD markers in terms of the average number of polymorphic bands per primer (Table 2; Table 1 in Arnaud-Haond et al. 2005).

We have demonstrated that the efficacy of different marker classes is not homogeneous in terms of their discriminating power (D) and confusion probability (C). One consideration when interpreting the results of D is that this value depends not only on the number of patterns has generated, but also on their relative frequency (Tessier et al. 1999). The presence of rare bands/alleles can produce low frequency patterns and result in lower D values. In our study, the best marker combinations for identifying genets would include at least five SSR loci (Po5-40, Po-15, *Poc*-35, Po5-49 and *Poc*-45) in the two less polymorphic populations (Crotone and Cariati). Genetic diversity saturate with a combination of nine SSR loci (Po5-40, Po-15, *Poc*-35, Po5-49, *Poc*-45, Po5, Po5-10, *Poc*-42 and *Poc*-5) and two ISSR primers (ISSR10 and ISSR2) in the other populations. Comparable estimates made by Arnaud-Haond et al. (2005) reached different conclusions, suggesting that a set of seven dinucleotides was necessary to saturate genetic diversity independently from population polymorphism. Although it is not surprising that a combination of genetic markers would reveal higher levels of genetic variation than a single set of markers, we conclude that selected ISSR and SSR markers together detect higher levels of polymorphism than either complete set of markers alone. This could be due to the nature of the genetic variation detected by each marker category. SSRs, in fact, detect variation at pre-determinate sequence sites, whereas ISSRs quickly and effectively scan the whole genome.

A large difference in ISSR diversity exists between Tyrrhenian and Ionian populations, where this class of markers detected only three genotypes. The higher variability in the Tyrrhenian populations detected by SSR markers reflects a general trend where West-Mediterranean populations have higher clonal diversity with respect to the Eastern ones (Procaccini et al. 2002).

The three marker sets (ISSRs, T-SSRs and D-SSRs) provide coherent estimates of gene flow, although with different level of resolution. Tyrrhenian and Ionian populations always were distinct, which indicated an important role of the Calabria peninsula as biogeographic barrier. Analysis of molecular variance showed a very similar partitioning among individuals within populations, among populations within regions and between regions. Higher variance always was detected within populations, whereas significant genetic structure was detected between populations and regions regardless of the markers considered. This observation contrasts with trends previously suggested, with more polymorphic markers detecting higher levels of differentiation (Peakall et al. 1995, Maguire et al. 2002). In our analysis, the ability of different marker categories to disclose patterns of gene flow was independent of their intrinsic polymorphism.

In conclusion, in our comparative study of ISSR and SSR markers for *Posidonia oceanica* population genetic analysis, SSR detected higher levels of clonal diversity than ISSR markers. Nevertheless, we showed that the combined use of selected ISSR and SSR markers increases the values of clonal diversity in the most polymorphic populations. Our analysis detected variable levels of polymorphism in the populations analyzed, with Tyrrhenian populations always more polymorphic

than Ionian ones. Both marker types strongly point at the Calabria peninsula as an important biogeographic barrier between the Western and the Eastern side of the Mediterranean basin. Because of their higher polymorphism and statistical power, we suggest that SSR markers should be used for further genetic diversity studies in *Posidonia*, although ISSRs have the advantage of a technique that is simple, cheap and more accessible to ecology laboratories. The combined use of selected SSR and ISSR markers could represent a convenient approach for identifying genets in clonal plants.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr F. S. Rende who provided samples of *Posidonia oceanica* shoots. We thank W. Kooistra for the critical reading of the first version of the manuscript. We also thank Fabrizio Campili and all the staff of the Molecular Biology Service of the Stazione Zoologica for technical support during fragment analyses. The experiments performed in the present paper comply with the current Italian laws.

LITERATURE CITED

- Alberto F, Correia L, Arnaud S, Billot C, Duarte CM, Serrao E (2003) New microsatellite markers for the endemic Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Mol Ecol Notes* 3:253-255
- Arnaud-Haond S, Alberto F, Teixeira S, Procaccini G, Serrao E, Duarte CM (2005) Assessing genetic diversity in clonal organisms: low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. *J Hered* 96:1-7
- Arnaud-Haond S, Migliaccio M, Diaz-Almela E, Teixeira S, van de Vliet MS, Alberto F, Procaccini G, Duarte CM, Serrao E *in press* Vicariance patterns in the Mediterranean Sea: East-West cleavage and low dispersal in the endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *J Biogeography*
- Capiomont A, Sandmeier M, Caye G, Meinesz A (1996) Enzyme polymorphism in *Posidonia oceanica*, a seagrass endemic to the Mediterranean. *Aquat Bot* 54:265-277
- Cekic C, Battey NH, Wilkinson MJ (2001) The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor Appl Genet* 103:540-546
- Den Hartog C (1970) The seagrasses of the world. North Holland Publishing Company, Amsterdam
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15
- Goldstein DB, Schlotterer C (1999) Microsatellites: Evolution and Applications, Vol. Oxford University Press, Oxford
- Goulão L, Oliveira CM (2001) Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122:81-89
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. *Theor Appl Genet* 86:927-934
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites from molecules to population and back. *TREE* 11:424-429
- Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, Ranjekar PK, Brar DS (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor Appl Genet* 100:1311-1320
- Jover MA, del Castillo-Agudo L, Garcia-Carrascosa M, Segura J (2003) Random Amplified Polymorphic DNA assessment of diversity in western Mediterranean populations of the seagrass *Posidonia oceanica*. *Am J Bot* 90:364-369
- King RA, Gornall RJ, Preston CD, Croft JM (2002) Population differentiation of *Potamogeton pectinatus* in the Baltic Sea with reference to waterfowl dispersal. *Mol Ecol* 11:1947-1956
- Kochieva EZ, Ryzhova NN, Khrapalova IA, Pukhalskiy VA (2002) Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in the Genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis. *Russ J Genet* 38:958-966
- Maguire TL, Peakall R, Saenger P (2002) Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theor Appl Genet* 104:388-398
- Micheli C, Paganin P, Peirano A, Caye G, Meinesz A, C.N. B (2005) Genetic variability of *Posidonia oceanica* (L.) Delile in relation to local factors and biogeographic patterns. *Aquat Bot* 82:210-221
- Migliaccio M, De Martino F, Silvestre F, G. P (2005) Meadow-scale genetic structure in *Posidonia oceanica* L. (Delile). *Mar Ecol Prog Ser* 304:55-65
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288-295
- Peakall R, Smouse PE, Huff DR (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Mol Ecol* 4:135-147
- Pleasant JM, Wendel JF (1989) Genetic diversity in a clonal narrow endemic *Erythronium propullans* and in its widespread progenitor *Erythronium albidum*. *Am J Bot* 76:1136-1151

- Procaccini G, Alberte RS, Mazzella L (1996) Genetic structure of the seagrass *Posidonia oceanica* in the Western Mediterranean: ecological implications. *Mar Ecol Prog Ser* 140:153-160
- Procaccini G, Buia MC, Gambi MC, Perez M, Pergent-Martini C, Pergent G, Romero J (2003) Seagrass status and extent along the Mediterranean coasts of Italy, France and Spain. In: Green EP, Short FT (eds) *World Atlas of Seagrasses*. Univ. of California Press, Berkeley, USA., p 48-58
- Procaccini G, Maltagliati F (2004) Methodological approaches to the analysis of genetic diversity in benthic organisms. In: *Methods for sampling and study of Mediterranean marine benthos*, Vol 11 (suppl). *Biologia Marina Mediterranea*, p 481-519
- Procaccini G, Orsini L, Ruggiero MV, Scardi M (2001) Spatial patterns of genetic diversity in *Posidonia oceanica*, an endemic Mediterranean seagrass. *Mol Ecol* 10:1413-1421
- Procaccini G, Ruggiero MV, Orsini L (2002) Genetic structure and distribution of microsatellite population genetic diversity in *Posidonia oceanica* in the entire Mediterranean basin. *Bull Mar Sci* 71:1291-1297
- Procaccini G, Waycott M (1998) Microsatellite loci identified in the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *J Hered* 89:562-568
- Reusch TBH (2001) New markers-old questions: population genetics of seagrasses. *Mar Ecol Prog Series* 211:261-274.
- Tessier C, David J, This P, Boursiquot JM, Charrier A. (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* (L.) *Theor Appl Genet* 98:171-177
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407-4414
- Wang G, Mahalingam R, Knap HT (1998) (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theor Appl Genet* 96:1086-1096
- Wang CN, Moller M, Cronk QC (2004) Population genetic structure of *Titanotrichum oldhamii* (Gesneriaceae), a subtropical bulbiferous plant with mixed sexual and asexual reproduction. *Ann Bot (Lond)* 93:201-209
- Waycott M., Procaccini G, Les DH, Reusch TBH (2006) Seagrass evolution, ecology and conservation: a genetic perspective In: Larkum AWD, Orth RJ, Duarte CM (eds) *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer, The Netherlands, p 25-50
- Williams JGK, Kubelik AR, K.J. L, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18:6531-6535
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TJB, Ye ZH, Miao JX, . (1997) POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alta
- Zietkiewitz E, Rafalski A, Labuda D, (1994). Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20:176-183

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Map of the Calabria peninsula showing the locations of the sampling sites: Praia a Mare (lat 39°54' N, long 15°45' E), San Nicola Arcella (lat 39°51' N, long 15°46' E) and Belmonte Calabro (lat 39°08' N, long 16°03' E) in the Tyrrhenian Sea; Crotone (lat 39°03' N, long 17°08'E) and Cariati (lat 39°30' N, long 16°57' E) in the Ionian Sea.

Figure 2. Values of clonal diversity (G/N) per population and overall, obtained adding sequentially the SSR loci with the first nine scores (D-class) and the ISSR primers with the first two scores in Table 2. $S1 = Po5-40$; $S2 = Po5-40 + Po-15$; $S3 = Po5-40 + Po-15 + Poc-35$; etc...; $t =$ total SSR loci; $I10 = S9 + ISSR10$; $I2 = S9 + ISSR10 + ISSR2$; $T = SSR + ISSR$.

Figure 3. PCA plots of the first two axes based on individual ISSR (a) and SSR (b) distance matrices.

Figure 4. Representation of UPGMA dendrograms obtained from Nei's (1978) distance values among populations.

Table 1. Nucleotide sequences of 12 primers tested for ISSR-PCR in *P. oceanica*. Primers utilized in the analysis are marked with an asterisk.

<i>Name</i>	<i>Sequence</i>
ISSR1	5'- CTCTCTCTCTCTCTCTCYC-3'
ISSR2*	5'- CTCTCTCTCTCTCTCTCTRG-3'
ISSR3*	5'- GTGTGTGTGTGTGTGTYR-3'
ISSR4	5'- GTGTGTGTGTGTGTAY-3'
ISSR5*	5'- CACACACACACARY-3'
ISSR6*	5'- CACACACACACACAYC-3'
ISSR7*	5'- AGAGAGAGAGAGAGGYC-3'
ISSR8*	5'- GAGAGAGAGAGAGARG-3'
ISSR9	5'- ATATATATATATATATATGG-3'
ISSR10*	5'- CTCCTCCTCCTCRC-3'
ISSR11*	5'- GAGGAGGAGGAGRC-3'
ISSR12	5'- TATATATATATATATACC-3'

Table 2. Polymorphism of the ISSR and SSR (T-SSR and D-SSR) markers. Molecular Variants (MVs) are represented by bands in ISSR and alleles in SSR. C = Confusion probability; D = Discriminating power; D_L = Limit of discriminating power; D class = order in the score of D.

Marker	# MVs	# polymorphic MVs	# patterns	C	D	D _L	D class
ISSR							
ISSR2	7	2	3	0.423	0.577	0.575	9
ISSR3	8	2	3	0.549	0.451	0.447	12
ISSR5	16	2	4	0.507	0.493	0.489	11
ISSR6	9	0	1	-	-	-	-
ISSR7	12	0	1	-	-	-	-
ISSR8	8	1	2	0.807	0.193	0.192	16
ISSR10	10	3	6	0.384	0.616	0.616	6
ISSR11	5	0	1	-	-	-	-
			Mean values	0.534	0.466	0.464	
T-SSR¹							
<i>Poc-trn</i>	2	2	2	0.983	0.017	0.017	18
<i>Poc-42</i>	2	2	3	0.438	0.562	0.558	10
<i>Poc-5</i>	3	3	4	0.566	0.434	0.441	13
<i>Poc-45</i>	6	6	10	0.311	0.689	0.683	5
<i>Poc-35</i>	5	5	11	0.145	0.855	0.848	3
<i>Poc-26</i>	3	3	3	0.656	0.344	0.341	15
			Mean values	0.516	0.484	0.481	
D-SSR²							
Po5-39	3	3	4	0.635	0.365	0.362	14
Po5-10	4	4	7	0.389	0.611	0.674	8
Po5	4	4	7	0.373	0.627	0.697	7
Po-15	8	8	18	0.093	0.907	0.903	2
Po5-40	15	15	24	0.076	0.924	0.918	1
Po5-49	7	7	12	0.167	0.831	0.853	4
Po4-3	3	3	3	0.889	0.111	0.110	17
			Mean values	0.375	0.625	0.645	

¹ Procaccini & Waycott 1998; ² Alberto et al. 2003

Table 3. G/N values (first number) and polymorphic Molecular Variants (second number) for populations and population groups. Molecular Variants are represented by bands in ISSR and alleles in SSR. Ty = Tyrrhenian Sea; Io = Ionia Sea; T-SSR and D-SSR, see Table 1; Tot-SSR = total number of microsatellite markers; All markers = ISSR+SSR markers

Populations/ Geographic areas	ISSR	D-SSR	T-SSR	Tot-SSR	All markers
Praia (Ty)	0.91 - 9	0.50 - 26	0.50 - 14	0.68 - 40	0.95 - 49
San Nicola (Ty)	0.67 - 7	0.62 - 23	0.42 - 15	0.71 - 38	0.96 - 45
Belmonte (Ty)	0.64 - 8	0.52 - 25	0.44 - 15	0.72 - 40	0.92 - 48
Crotone (Io)	0.08 - 1	0.48 - 19	0.40 - 12	0.60 - 31	0.60 - 32
Cariati (Io)	0.08 - 1	0.36 - 15	0.28 - 11	0.47 - 26	0.47 - 27
Tyrrhenian Sea	0.70 - 10	0.55 - 36	0.45 - 17	0.70 - 53	0.94 - 63
Ionian Sea	0.06 - 2	0.42 - 23	0.34 - 14	0.54 - 37	0.52 - 39
overall	0.44 - 10	0.50 - 44	0.40 - 21	0.64 - 65	0.75 - 75

Table 4. Measures of genetic distance (dist) and gene flow (Nm) within and between population groups. Dist = Nei's (1978) genetic distance; $Nm = 0.25 (1 - \Phi_{pt}) / \Phi_{pt}$. All Φ_p values were significant (*P = 0.022 for ISSR markers, P < 0.001 in the others cases).

		Tyrrhenian	Ionian	Tyrr. Vs Ion.
ISSR	Dist	0.021	0.004	0.037
	Φ_{pt}	0.253	0.131*	0.584
	Nm	0.739	1.658	0.177
D-SSR	Dist	0.257	0.204	0.524
	Φ_{pt}	0.369	0.498	0.589
	Nm	0.428	0.252	0.174
T-SSR	Dist	0.116	0.200	0.318
	Φ_{pt}	0.354	0.532	0.582
	Nm	0.455	0.219	0.179
Tot-SSR	Dist	0.179	0.203	0.407
	Φ_{pt}	0.366	0.514	0.596
	Nm	0.434	0.236	0.169

Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA).

Source of variations	d.f.	Sum of square	Variance component	Variance (%)	Stat	Value	P-value
ISSR data							
Among Regions	1	60.243	0.844	37	Φ_{rt}	0.374	***
Among Pops./Regions	3	31.640	0.396	18	Φ_{pr}	0.280	***
Indiv./Within Pops.	116	117.935	1.017	45	Φ_{pt}	0.549	***
T-SSR data							
Among Regions	1	97.002	1.124	29	Φ_{rt}	0.290	***
Among Pops./Regions	3	91.697	1.205	31	Φ_{pr}	0.439	***
Indiv./Within Pops.	116	178.677	1.540	40	Φ_{pt}	0.602	***
D-SSR data							
Among Regions	1	151.756	1.813	30	Φ_{rt}	0.301	***
Among Pops./Regions	3	134.054	1.753	29	Φ_{pr}	0.416	***
Indiv./Within Pops.	116	285.028	2.457	41	Φ_{pt}	0.592	***
Tot-SSR							
Among Regions	1	248.759	2.937	30	Φ_{rt}	0.296	***
Among Pops./Regions	3	225.751	2.958	30	Φ_{pr}	0.425	***
Indiv./Within Pops.	116	463.705	3.997	40	Φ_{pt}	0.596	***

***P < 0.001

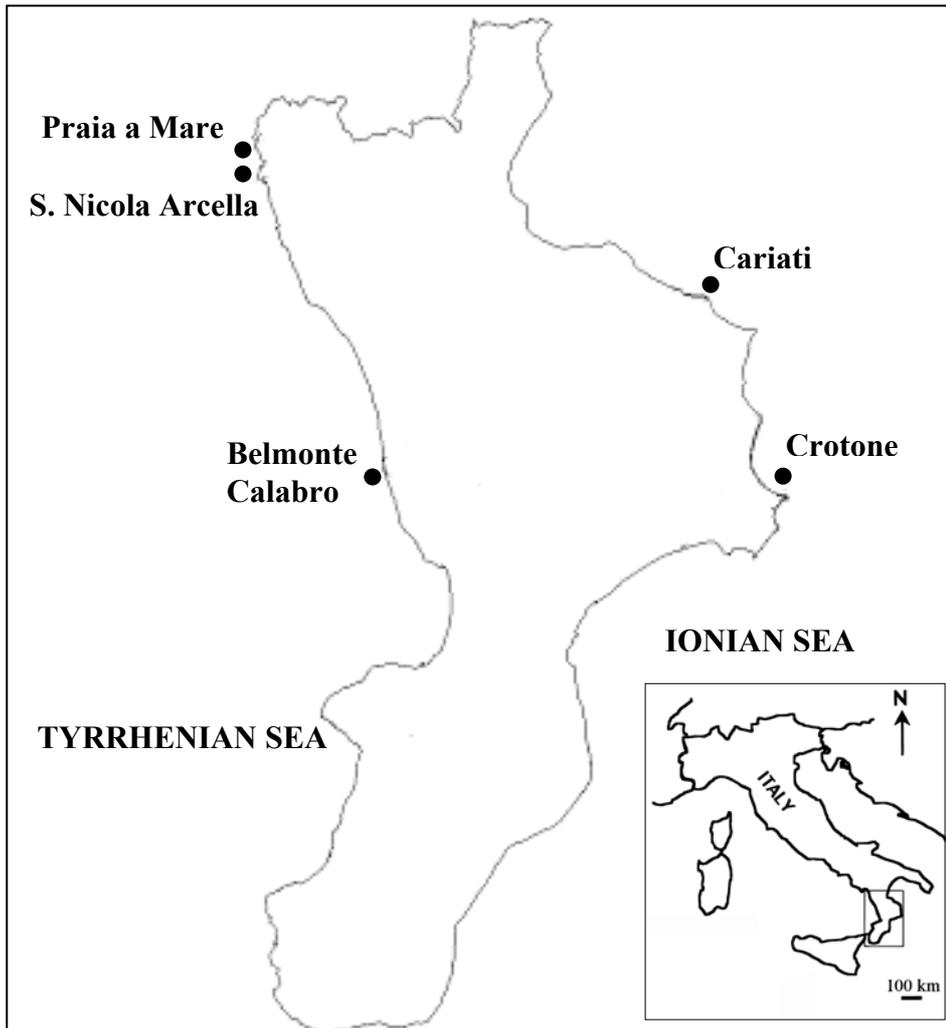


FIGURE 1

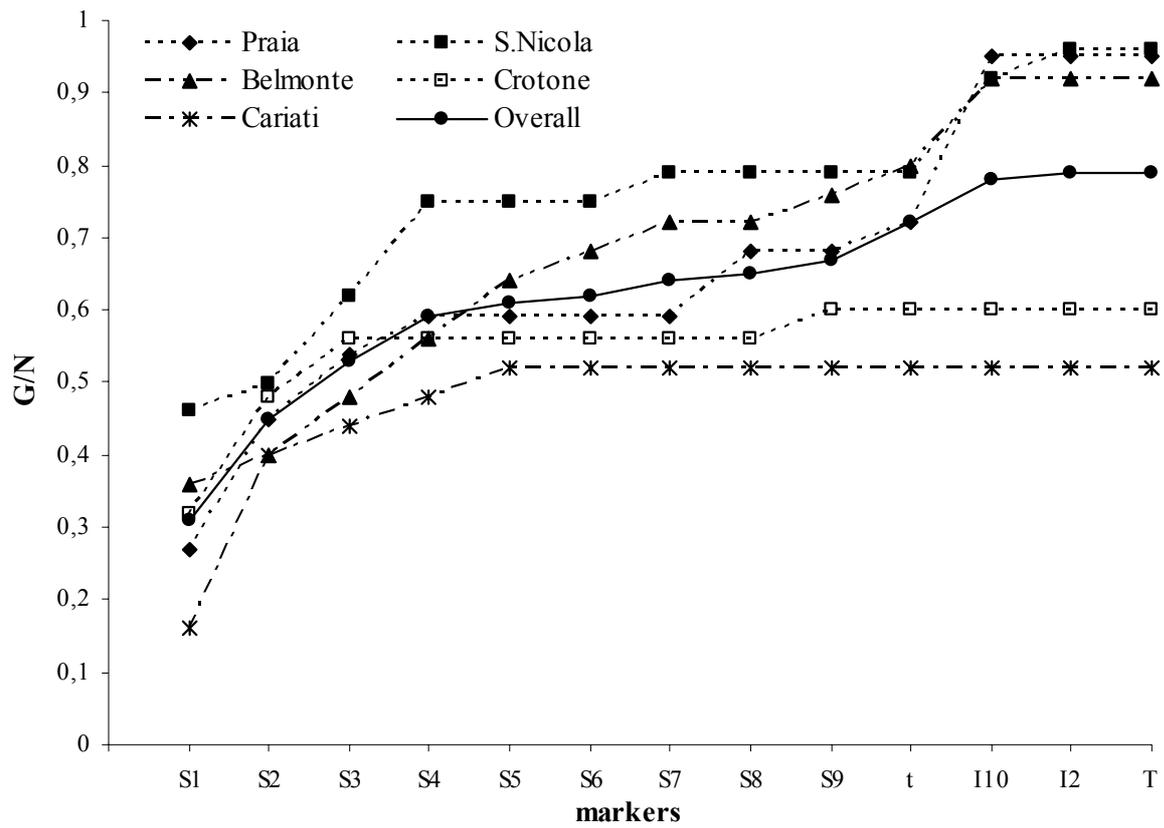


FIGURE 2

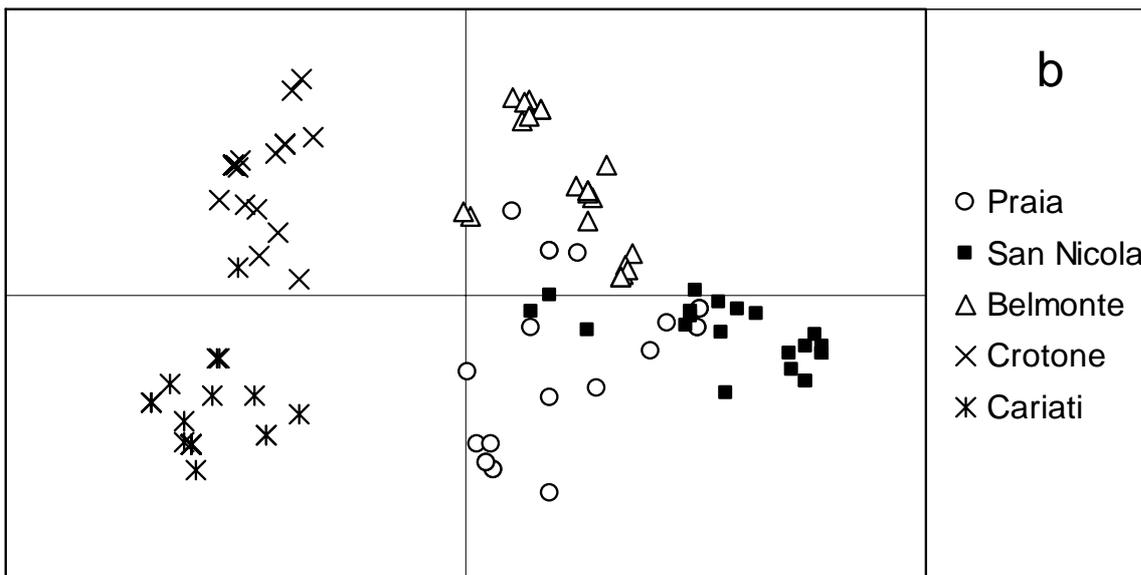
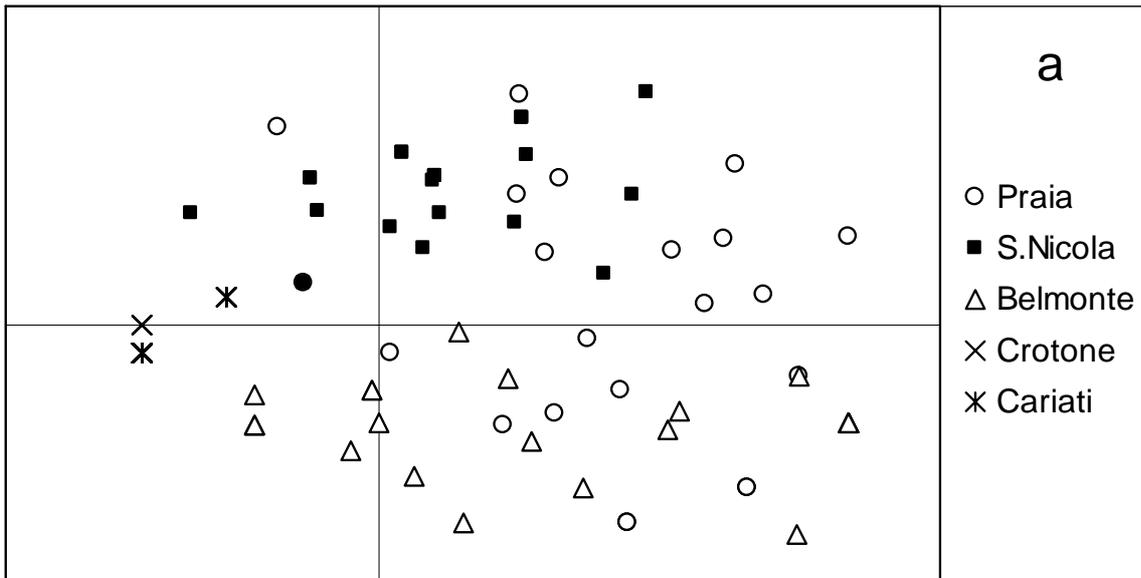
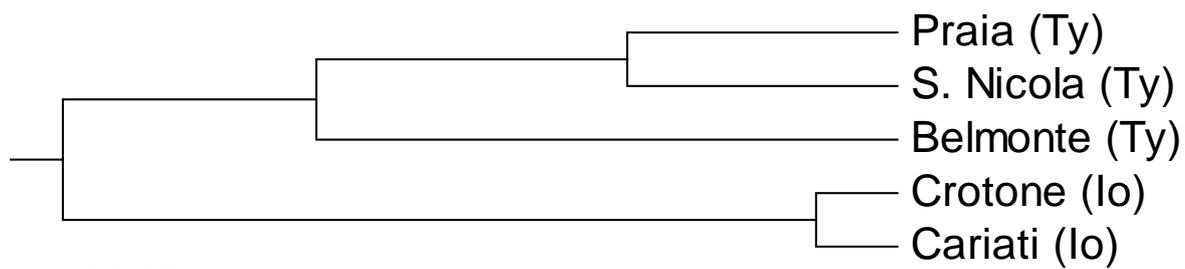
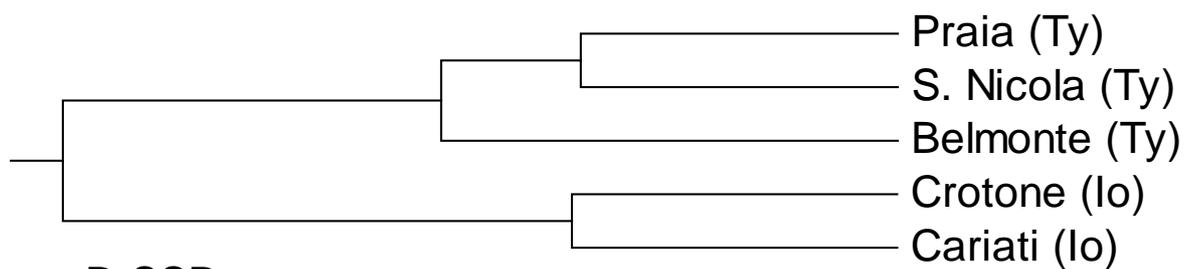


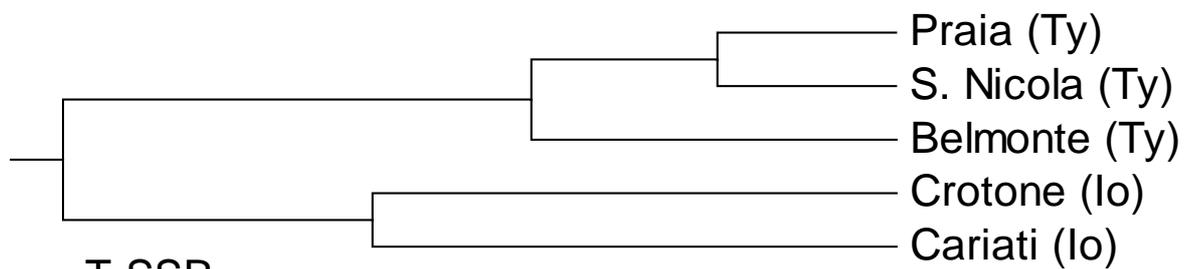
FIGURE 3



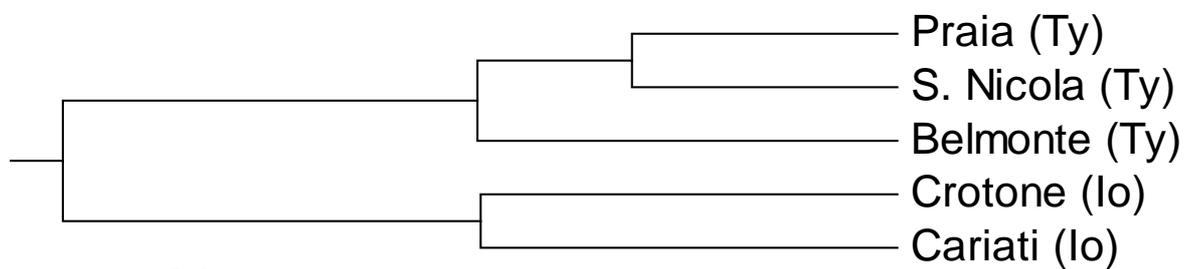
ISSR
 0.5



D-SSR
 5



T-SSR
 5



Tot-SSR
 5

FIGURE 4