



LIFE06 NAT/IT/000050

Misure urgenti di conservazione per la biodiversità della costa centro-mediterranea

CO.Me.B.i.S. Conservation measurer for Biodiversity of Central-Mediterranean Sea



AZIONE D1

“Litorali tra la foce del Torrente Arrone e il Torrente Marta”

SIC IT 6000003

MONITORAGGIO DELLO STATUS DI CONSERVAZIONE DELL’HABITAT PRIORITARIO

“PRATERIE DI POSIDONIA” (*1120)

INDICE

- Premessa	Pag. 3
- Introduzione	Pag. 3
- Area di Studio	Pag. 4
- Attività di Campionamento	Pag. 5
- Materiali e Metodi	Pag. 5
- Risultati	Pag. 7
- Discussioni	Pag. 12
- Bibliografia	Pag. 13

PREMESSA

Nell'ambito del progetto **LIFE 06 NAT/IT/000050**, di cui il Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile (DECOS) dell'Università degli Studi della Tuscia è partner e coordinatore scientifico, è stato monitorato lo stato di salute dell'habitat prioritario "praterie di *Posidonia oceanica*" del SIC "litorali tra la foce del Torrente Arrone e il Torrente Marta"-SIC IT 6000003 (azione D1).

INTRODUZIONE

La *Posidonia oceanica* (L.) Delile, 1813, è una pianta acquatica, endemica del Mar Mediterraneo, appartenente alla famiglia delle Posidoniacee (Angiosperme, Monocotiledoni).

Ha caratteristiche simili alle piante terrestri: radici, un fusto rizomatoso e foglie nastriformi lunghe fino ad un metro, unite in ciuffi di 6-7. Fiorisce in autunno e in primavera produce frutti galleggianti volgarmente chiamati "olive di mare".

La *Posidonia oceanica*, per la sua sensibilità alle variazioni delle condizioni ambientali, è considerata un buon indicatore biologico della qualità delle acque. Questa forma delle praterie sottomarine, caratterizzate da una notevole rilevanza ecologica, costituisce la comunità climax del Mar Mediterraneo ed esercita una notevole azione nella protezione della linea di costa dall'erosione. Attraverso lo studio delle praterie, è possibile ottenere un quadro puntuale dello stato ecologico dell'area costiera. Lo studio delle variazioni spazio-temporali della struttura delle praterie permette di diagnosticarne le tendenze evolutive e di predirne eventuali cambiamenti futuri.

Il posidonieto è un habitat in forte regressione in tutto il bacino del Mediterraneo a causa della pressione antropica che si esercita lungo le coste. La regressione delle praterie è determinata da cause diversificate tra cui l'erosione meccanica dovuta agli attrezzi per la pesca a strascico e il raschiamento provocato dalle ancore delle imbarcazioni da diporto, con effetti distruttivi sul fondale.

In figura 1 è possibile osservare la distribuzione delle praterie di *P. oceanica* del litorale laziale.



Fig.1 Distribuzione delle praterie di *P. oceanica* del litorale laziale

Lo stato di conservazione dei posidonieti dei fondali antistanti la foce del Torrente Marta (ha 1266,49) e dell'area di Tor Paterno (ha 26,79), sui quali transitano durante i mesi estivi circa 2000 imbarcazioni da diporto nautico/mese e circa 100 imbarcazioni di pesca artigianale/mese, non è monitorato in continuo.

Per questo motivo sono state realizzate attività di monitoraggio, con l'obiettivo di valutare lo stato di conservazione dell'habitat prioritario "Prateria di *Posidonia oceanica*" (*1120) per acquisire conoscenze sullo stato e sulle caratteristiche dell'ambiente marino, al fine di valutare e quantificare l'eventuale insorgenza di fenomeni di perturbazione.

AREA DI STUDIO

Le informazioni di seguito riportate sono deducibili dalla scheda Natura 2000 del sito SIC IT 6000003, presente sul sito web del Ministero dell'Ambiente e del Territorio e del Mare (MATTM).

Il fondale dell'area in esame è caratterizzato dalla presenza di un posidonieto che si estende per circa il 50% di copertura del sito (circa 600 ettari). Tale SIC permette, quindi, la conservazione di uno dei banchi settentrionali di posidonia più estesi del Tirreno centrale.

La *Posidonia oceanica* è la specie strutturante uno degli ecosistemi marini a più elevata biodiversità del Mar Mediterraneo, costituendo uno stadio di climax all'interno di una serie successionale che parte dalla colonizzazione di specie algali pioniere, come *Caulerpa prolifera* (Forsskal) Lamouroux, 1873, o di piccole fanerogame come *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ashers, le quali forniscono un substrato ricco di detriti di origine vegetale.

La presenza del posidonieto in questo tratto di costa contribuisce, inoltre, alla difesa del litorale dall'erosione, che è piuttosto significativa nell'area (Planimetria d'insieme del Litorale Laziale, 2003. Realizzata dall' "Osservatorio dei litorali laziali – Centro di monitoraggio). Il posidonieto compreso nel SIC, inoltre, a livello nazionale ha un'importanza notevole per la rete Natura 2000. Infatti, analizzando la distribuzione lungo la costa Tirrenica di tali tipologie di siti ("Dominanza di praterie di posidonia", tipologia indicata ed individuata nel "Manuale per la gestione dei Siti Natura 2000" elaborata nel contesto del Progetto LIFE Natura "Verifica della Rete Natura 2000 in Italia e modelli di gestione" del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio) risulta evidente come il nucleo di posidonieti compresi nella Provincia di Viterbo è l'unico presente per un lungo tratto di costa che va dal confine tosco-ligure, fino alla costa meridionale del Lazio.

ATTIVITÀ DI CAMPIONAMENTO

I campioni analizzati sono stati raccolti nel periodo tra ottobre 2007 e maggio 2009 tramite immersioni subacquee, a profondità comprese tra i 5 e 25 m.

In ogni stazione sono state effettuate misure dirette di densità (almeno 5 conte per stazione) e sono stati raccolti 10 fascicoli fogliari su cui sono state condotte le analisi fenologiche per il calcolo dei seguenti parametri: numero medio di foglie per fascio, lunghezza media delle foglie, Coefficiente A ed indice fogliare (Caye, 1980, Drew, 1971, Panayotidis e Giraud, 1981).

MATERIALI E METODI

I singoli campioni di *P. oceanica* ($n = 20$ fasci fogliari per singola stazione di campionamento) sono stati conservati separatamente, in contenitori muniti di targhette identificative. In laboratorio, le foglie dei suddetti campioni sono state private delle epifite utilizzando una lama di rasoio e poi conservati a -80°C . Successivamente, da una singola foglia per ogni pianta di posidonia, è stato estratto il DNA totale, utilizzato in un secondo momento al fine di ottenere i relativi prodotti di PCR per l'analisi delle sequenze di interesse. Per l'estrazione del DNA totale è stato utilizzato il protocollo di Doyle & Doyle (1987), per il quale sono state apportate piccole modifiche, come suggerito da Serra *et al.*, 2007.

La messa a punto del protocollo d'analisi è preliminare all'attività di saggio, finalizzata a determinare lo stato di salute del posidonieto.

L'analisi genetica successiva all'estrazione del DNA, è stata condotta utilizzando la tecnica ISSR (Inter-simple Sequenze Repeats), che si basa sull'amplificazione di sequenze interne al DNA microsatellite, ripetute e invertite (Zietckiewicz *et al.*, 1994). L'utilizzo di una serie di primers costituiti da pochi nucleotidi, non richiede la conoscenza di sequenze confinanti e ha larga applicazione a livello di tutti gli organismi, senza badare alla disponibilità di informazioni circa la loro sequenza genomica. Gli ISSR si sono dimostrati un marcatore molecolare dall'utilizzo semplice ed affidabile per molti organismi, in particolar modo per le piante, con un'elevata riproducibilità dei risultati e in grado di evidenziare un elevato polimorfismo. Nel corso degli ultimi anni, l'analisi mediante ISSR è stata applicata con successo nella mappatura genica (Ammiraju *et al.*, 2001; Ratnaparkhe *et al.*, 1998), nel "fingerprinting" e/o analisi della diversità genetica (Bornet *et al.*, 2002; Archak *et al.*, 2003).

Affinchè l'analisi mediante ISSR abbia successo, coppie di SSR (orientate in modo invertito) devono trovarsi a breve distanza sullo stesso cromosoma, che in questo modo può essere amplificato tramite PCR; il risultato dell'amplificazione è una banda visibile su gel di agarosio o poliacrilammide. I primers usati nell'analisi ISSR possono essere sviluppati da ogni sequenza SSR (di-, tri-, tetra-nucleotidi).

Successivamente, l'efficienza del marcatore è stata testata mediante l'analisi dell'AMOVA, che permette di calcolare la varianza molecolare. I risultati ottenuti dall'analisi dell' AMOVA sono stati poi verificati utilizzando l'Analisi delle Componenti Principali (PCA), sulla base della distanza genetica ottenuta dal confronto degli ISSR utilizzando il software GenAlEx 6 (Peakall & Smouse, 2006). Infine, la distanza genetica di Nei (1978) è stata calcolata utilizzando il programma POPGENE (Yeh *et al.*, 1997).

Procedura di estrazione del DNA

Il protocollo di estrazione prevede che circa 100 mg di tessuto fogliare vengano preventivamente polverizzati in un mortaio, utilizzando azoto liquido. Il materiale ridotto in polvere viene quindi trasferito in microtubi da 1.5 ml e omogenizzato con 800 µl di tampone di estrazione (2% CTAB, 2% 2-mercaptoetanol, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 200mM Tris-HCl pH7.5). Dopo un'incubazione a 60°C per 30', l'omogeneizzato viene "lavato" una volta con 800 µl di cloroformio isoamyl-alcool e poi precipitato con la stessa quantità di isopropanolo ghiacciato. Il pellet ottenuto viene successivamente "lavato" due volte, prima con 100 µl di buffer A (76% EtOH, 200mM sodio acetato) e poi con 100 µl di buffer B (76% EtOH, 10mM ammonio-acetato), quindi lasciato asciugare 8-10 ore a temperatura ambiente o 15 minuti in termo-block a 70 °C. Una volta asciutto, il pellet viene risospeso in 100 µl di TE-buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8).

Data la possibile interferenza dell'RNA nell'analisi, lo stesso viene rimosso incubando il DNA con RNase a 37°C per 60'. Dal DNA totale così ottenuto, è stato possibile effettuare la reazione di amplificazione (PCR) in un volume finale di 25 µl, contenente 37.5 ng di DNA templat, 1 unità di Taq polimerasi, 0.2mM di dNTPs, 1.5pmol µl⁻¹ di primer, 10mM Tris-HCl (pH 8.3) e 1.5mM di MgCl₂, 50mM di KCl. Il programma di reazione per l'amplificazione del frammento di interesse è costituito da una fase di denaturazione iniziale di 3' a 94°C, seguita da 35 cicli, caratterizzati da 3 steps: 60s a 94°C (denaturazione), 60s a 44°C (annealing) e 90s a 72°C (estensione), seguiti da un'ulteriore fase di 5 min a 72°C (estensione finale). I prodotti di PCR vengono poi controllati su un gel di agarosio al 2.5% in tampone TBE 0.5X, contenente bromuro d'etid, e visualizzati su trans-illuminatore a raggi UV.

RISULTATI

In questo lavoro sono stati utilizzati 6 primers (Serra I. A. *et al.*, 2007) indicati come: ISSR 2 [5'-(CT)₈RG-3'], ISSR 6[5'-(CA)₇YC-3'], ISSR 7[5'-(AG)₇YC-3'], ISSR 8[5'-(GA)₇RG-3'], ISSR 10[5'-(CTC)₄RC-3'], ISSR 11[5'-(GAG)₄RC-3'], quattro dei quali risultano essere polimorfici (vedi Tabella 1).

PRIMER	SEQUENZA	NUMERO DI MVS
ISSR 2	5'-(CT) ₈ RG-3'	7
ISSR 6	5'-(CA) ₇ YC-3'	9
ISSR 7	5'-(AG) ₇ YC-3'	12
ISSR 8	5'-(GA) ₇ RG-3'	8
ISSR 10	5'-(CTC) ₄ RC-3'	10
ISSR 11	5'-(GAG) ₄ RC-3'	5

Tab.1 Sequenza e polimorfismi dei primers utilizzati. **MVS:** Varianti molecolari presenti nelle bande degli alleli ISSR.

Il prodotto ottenuto da ogni primer, per ogni individuo, è costituito da un elevato numero di bande, altamente riproducibili, comprendenti frammenti che spaziano in un range di 300-1500 paia di basi. Le bande di ISSR verranno indicate come assenti (0) e presenti (1), assumendo che ciascuna posizione della banda corrisponda ad un locus con due alleli. Il set di dati finale includerà sia i frammenti polimorfici che monomorfici. In tabella 2 vengono riportati i campioni analizzati con i 6 primers e il relativo polimorfismo.

Attraverso l'utilizzo di questo marcatore (ISSR) il risultato atteso è quello di ottenere una stima coerente del flusso genico, come già dimostrato in precedenti lavori (Serra *et al.*, 2007; Smissen *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2007; Acampora *et al.*, 2007). Tale marcatore è in grado di evidenziare un elevato grado di polimorfismo che permette di rilevare un marcato livello di differenziamento all'interno della "popolazione" di posidonia in esame.

POP.	Lung fogliare	ISSR2	ISSR6	ISSR7	ISSR8	ISSR10	ISSR11
Tar-15/1	60	0	0	0	0	0	0
Tar-15/2	57	0	0	0	0	0	0
Tar-15/3	39	1	0	0	0	0	0
Tar-15/4	59,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/5	59	0	0	0	0	0	0
Tar-15/6	68	0	0	0	0	0	0
Tar-15/7	63,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/8	48	0	0	0	0	0	0
Tar-15/9	40	1	0	0	0	0	0
Tar-15/10	52	1	0	0	1	0	0
Tar-15/11	42	0	0	0	0	0	0
Tar-15/12	37	0	0	0	0	0	0
Tar-15/13	55,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/14	68	1	0	0	1	1	1
Tar-15/15	53	0	0	0	0	0	0
Tar-15/16	78	1	0	0	1	1	0
Tar-15/17	49,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/18	44	0	0	0	0	1	1
Tar-15/19	38	0	0	0	0	0	0
Tar-15/20	60	0	0	0	0	0	0

Tar-15/21	39	0	0	0	0	1	0
Tar-15/22	48	0	0	0	0	0	0
Tar-15/23	47	0	0	0	0	0	0
Tar-15/24	59,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/25	69	0	0	0	0	0	0
Tar-15/26	48	0	0	0	0	0	0
Tar-15/27	54	0	0	0	0	0	0
Tar-15/28	61	0	0	0	0	0	0
Tar-15/29	57	0	0	0	0	0	0
Tar-15/30	47,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/31	69	0	0	0	0	0	0
Tar-15/32	76	0	0	0	0	0	0
Tar-15/33	77,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/34	62	0	0	0	0	0	0
Tar-15/35	45	0	0	0	0	0	0
Tar-15/36	56	0	0	0	0	0	0
Tar-15/37	73,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/38	90	0	0	0	0	0	0
Tar-15/39	70,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/40	55	1	0	0	0	0	1
Tar-15/41	64	1	0	0	0	0	0
Tar-15/42	75	0	0	0	0	0	0
Tar-15/43	80	1	0	0	0	0	0
Tar-15/44	58,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/45	39	0	0	0	0	0	0
Tar-15/46	53	0	0	0	0	0	0
Tar-15/47	54	1	0	0	0	0	0
Tar-15/48	57	0	0	0	0	0	0
Tar-15/49	59	0	0	0	0	0	0
Tar-15/50	63	0	0	0	0	0	0
Tar-15/51	52	1	0	0	0	0	0
Tar-15/52	71	0	0	0	0	0	0
Tar-15/53	66	1	0	0	0	0	0
Tar-15/54	52,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/55	70	1	0	0	0	0	0
Tar-15/56	48	0	0	0	0	0	0
Tar-15/57	45	0	0	0	0	0	0
Tar-15/58	62	0	0	0	0	0	0
Tar-15/59	50	0	0	0	0	0	0
Tar-15/60	40	0	0	0	0	0	0
Tar-15/61	53	0	0	0	0	0	0
Tar-15/62	55	0	0	0	0	0	0
Tar-15/63	69,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/64	48,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/65	48,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/66	50	0	0	0	0	0	0
Tar-15/67	40,5	0	0	0	0	0	0
Tar-15/68	37	0	0	0	0	0	0
Tar-15/69	54	0	0	0	0	0	0
Tar-15/70	76	0	0	0	0	0	0
Tar-15/71	37,5	0	0	0	0	0	0
Tar-22/1	42	0	0	0	0	0	0
Tar-22/2	60	0	0	0	0	0	0
Tar-22/3	60	0	0	0	0	0	0
Tar-22/4	45	0	0	0	0	0	0
Tar-22/5	57	0	0	0	0	0	0
Tar-22/6	41	0	0	0	0	1	0

Tar-22/7	43	0	0	1	0	0	0
Tar-22/8	44	0	0	1	0	0	0
Tar-22/9	56	0	0	0	0	0	0
Tar-22/10	55	0	0	0	0	0	0
Tar-22/11	52	0	0	0	0	0	0
Tar-22/12	59	0	0	0	0	0	0
Tar-22/13	55	0	0	0	0	1	0
Tar-22/14	65	0	0	0	0	0	0
Tar-22/15	42	0	0	0	0	0	0
Tar-22/16	41	0	0	0	0	0	0
Tar-22/17	55	0	0	0	0	0	0
Tar-22/18	62	0	0	0	0	0	0
Tar-22/19	32	0	0	0	0	0	0
Tar-22/20	42	0	0	0	0	1	0
Tar-22/21	35	0	0	0	0	0	0
Tar-22/22	51	0	0	0	0	0	0
Tar-22/23	20	0	0	0	0	0	0
Tar-22/24	29	0	0	0	0	0	0
Tar-22/25	35	0	0	0	0	0	0
Tar-22/26	40	0	0	0	0	0	0
Tar-22/27	48	0	0	0	0	0	0
Tar-22/28	51	0	0	0	0	0	0
Tar-22/29	41	0	0	0	0	0	0
Tar-22/30	48	0	0	0	0	0	0
Tar-22/31	32	0	0	0	0	0	0
Tar-22/32	52	1	0	0	0	0	1
Tar-22/33	40	1	0	0	0	0	0
Tar-22/34	35	0	0	0	0	0	0
Tar-22/35	63	1	0	0	0	0	0
Tar-22/36	32	0	0	0	0	0	0
Tar-22/37	62	0	0	0	0	0	0
Tar-22/38	51	0	0	0	0	0	0
Tar-22/39	42	1	0	0	0	0	0
Tar-22/40	48	0	0	0	0	0	0
Tar-22/41	30	0	0	0	0	0	0
Tar-22/42	65	0	0	0	0	0	0
Tar-22/43	53	1	0	0	0	0	0
Tar-22/44	48	0	0	0	0	0	0

Tab. 2 Materiale analizzato e relativo polimorfismo individuato per ogni campione
T-22: *Posidonia* campionata a 22 metri di profondità
T-15: *Posidonia* campionata a 15 metri di profondità

Pop		N	Na	Ne	I	He	UHe
Tar-15	Mean	71,000	1,333	1,056	0,106	0,050	0,050
	SE	0,000	0,422	0,029	0,045	0,024	0,024
Tar-22	Mean	44,000	1,333	1,044	0,091	0,041	0,041
	SE	0,000	0,422	0,020	0,036	0,017	0,018

Tab 3 Stima delle frequenze alleliche; **Band freq.:** frequenza delle bande;
P e q: frequenze alleliche; **N:** numero di individui; **Na:** numero di alleli; **Ne:** numero effettivo di alleli; **I:** indice informazioni; **He:** eterozigosi attesa; **UHe:** eterozigosi osservata.

Popolazione	Tar-15	Tar-22
No. Bands	4	4
No. Bands Freq. $\geq 5\%$	2	2
No. Private Bands	1	1
No. LComm Bands ($\leq 25\%$)	0	0
No. LComm Bands ($\leq 50\%$)	0	0
Mean He	0,050	0,041
SE of Mean He	0,024	0,017
Mean UHe	0,050	0,041
SE of Mean UHe	0,024	0,018

Tab.4 :tabella riassuntiva della variabilità genetica aal'interno delle popolazioni campionate.

I dati sono stati analizzati con il programma GenAEx 6 (Peakall & Smouse, 2006) per calcolare le frequenze alleliche. Grazie alla capacità degli ISSR di evidenziare elevati livelli di polimorfismo, è stato inoltre possibile stimare la variabilità genetica delle popolazioni. Come si può osservare dalla tabella 3, corrispondente alle frequenze alleliche di ogni popolazione, i valori di eterozigosi sono molto simili (He: 0,050 e 0,041), non mostrando nessuna differenza consistente in funzione della profondità (come invece osservato per la popolazione di Posidonia delle Secche di Tor Paterno).

L'AMOVA (figura 3) mostra solo valori significativi di varianza all'interno delle popolazioni (100%), mentre tra le popolazioni non si evidenzia una variabilità significativa.

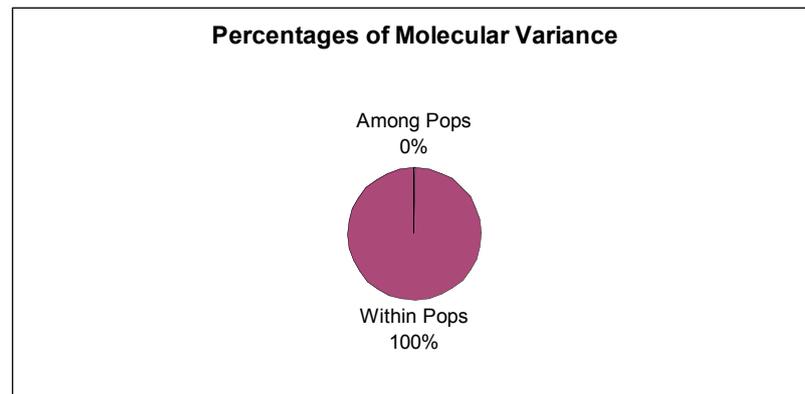


Fig.3 Percentuale di variabilità molecolare tra e nelle popolazioni

I risultati ottenuti con L'AMOVA sono stati verificati dall'Analisi delle Componenti Principali (PCA) che permette di indagare le affinità tra le popolazioni e consente l'individuazione sia dei gruppi principali di popolazioni, sia delle popolazioni intermedie tra questi.

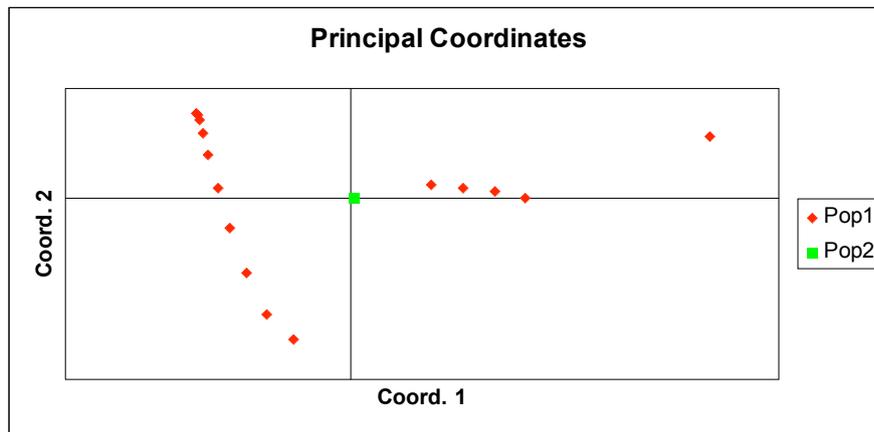


Fig 2 Analisi delle Componenti Principali (PCA).

L'analisi delle componenti principali (figura 2) ha rivelato che le prime due componenti spiegano complessivamente il 91,33% della variazione osservata (81,61% il primo asse, 9,72% il secondo asse e 4,39% il terzo). E' possibile osservare come per la popolazione campionata a 22 metri (in verde) di profondità, non siano evidenti differenze tra i singoli campioni, mentre ad una profondità di 15 metri (in rosso), la prateria risulta essere più variabile, presentando anche "individui" che si discostano più o meno tra loro.

Infine, nella Tabella 5 viene riportata la stima della probabilità della presenza di cloni nelle popolazioni studiate; è possibile osservare come il genotipo omozigote risulta essere il più abbondante.

Possibili cloni	
Genotipo	N° individui
000000	91
000010	5
001000	2
100000	15
100110	2

Tab.5: putativi cloni basati sulla ripetizione genotipica.

DISCUSSIONI

L'attività di monitoraggio genetico svolta nell'ambito dell'azione D1 ha permesso di saggiare lo stress ambientale dell'habitat prioritario "praterie di *Posidonia oceanica*" del SIC "litorali tra la foce del Torrente Arrone e il Torrente Marta"-SIC IT 6000003.

Lo stato di conservazione del posidonieto risulta nel complesso buono, ma soggetto a minacce derivanti dal turismo balneare e dalle infrastrutture che insistono sul tratto di costa non distante dal SIC. Questo spiega i bassi valori di eterozigosi riscontrati. L'eterozigosi attesa (Tabella 4), infatti, varia da un valore di 0,05, osservato nella popolazione a 15 metri di profondità, a uno di 0,04 nella popolazione campionata ad una profondità di 22 metri.

L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) e l'AMOVA evidenziano una omogeneità tra i siti di campionamento che fa ipotizzare la presenza di cloni, poiché non è stato evidenziato un valore di distanza genetica minima, necessario ad identificare i singoli campioni di *P. oceanica* come entità genetiche distinte.

I risultati di questi tre anni di monitoraggio evidenziano che la prateria di posidonia è sicuramente sottoposta ad un forte stress ambientale, dovuto principalmente al degrado del fondale marino. Tra le cause principali si annoverano:

- erosione meccanica dovuta agli attrezzi per la pesca a strascico, con effetti distruttivi del fondale;
- raschiamento provocato dalle ancore delle imbarcazioni da diporto;
- differenti fonti di inquinamento che agiscono sulle praterie alterandole, come la presenza di sostanze chimiche o l'elevata torbidità delle acque nelle aree eutrofiche.

È, quindi, auspicabile adottare misure di protezione, accanto all'attività continua di monitoraggio, in modo tale da minimizzare tali forme di degrado. Le misure indirette che possono contribuire alla protezione delle praterie sono molteplici, poiché possono comprendere tanto le azioni di conservazione, quanto le azioni che mirano a limitare o compensare i deterioramenti dell'ambiente litorale, generati, direttamente o indirettamente, dall'attività antropica.

In questo contesto l'attività di monitoraggio, tramite marcatori molecolari, è indispensabile per quantificare i livelli di variabilità genetica delle praterie di posidonia dato che questa specie si riproduce con modalità asessuata in condizioni "stressanti", impedendo così l'incremento di eterozigosi, possibile solo in condizioni di riproduzione sessuata.

BIBLIOGRAFIA

Acampora A., Ciaffi M., De Pace C., Paolacci A. R. and Tanzarella O., 2007. Pattern of variation for seed size traits and molecular markers in Italian germplasm of *Phaseolus coccineus* L. *Euphytica*, 157: 69-82.

Ammiraju, J.S.S., Dholakia B.B., Santra D.K., Singh H., Lagu M.D., Tamhankar S.A., Dhaliwal H.S., Rao V.S., Gupta V.S. and Ranjekar P.K., 2001. Identification of inter simple sequence repeat markers associated with seed size in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 726–732.

Amzallang G.N., 1999. Plant evolution: toward an adaptive theory. In: Lerner, H. R., ed. Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization. New York: Marcel Dekker.

Archak, S., Gaikward, A.B. Gautam, D. Rao, E.V.V.B. Swamy, K.R.M. and Karihaloo, J.L., 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome*, 46: 362-369.

Bornet B., Goraguer F., Joly G. and Branchard M., 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome*, 45: 481-484.

Doyle J.J. and Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19: 11-20.

Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.

Peakall R. and Smouse P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, 6: 288-295.

Ratnaparkhe M.B., Tekeoglu M. and Muehlbauer F.J., 1998. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 97: 515–519.

Serra I.A., Procaccini G., Intrieri M.C., Migliaccio M., Mazzuca S. and Innocenti A.M., 2007. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Mar. Ecol. Progr. Series*, 338:71-79.

Smissen R., Breitwieser I., Ward J., McLenachan P. and Lockhart, P.J., 2003. Use of ISSR profiles and ITS sequences to study the biogeography alpine cushion in the genus *Raoulia*. *Plant Syst. Evol.*, 239: 79-94.

Vos P., Hogers R., Bleeker R., Reijans M., van de Lee T., Homes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kupier M. and Zabeau M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, 23: 4407–4414.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V., 1990. DNA polymorphism, amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531–6535.

Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T.B.J., Ye Z.H. and Mao J.X., 1997. POPGENE, The User Friendly Software for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.

Yuan-Huo D., Jin-Ming C., Wahiti Gituru R. and Qing-Feng W., 2007. Gene flow in population of the endangered aquatic fern *Ceratopteris pteridoides* in China as revealed by ISSR markers. *Aquat. Bot.*, 87: 69-74.

Zietkiewicz E., Rafalski A. and Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176–183.

(a cura di: Professor Giuseppe Nascetti e Silvia Cecchetti, PhD)
Per contatti: nascetti@unitus.it