



LIFE06 NAT/IT/00050

**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 D.1

PROTOCOLLO DI MONITORAGGIO GENETICO

Di POSIDONIA OCEANICA

per saggiare lo stato di conservazione

dell'habitat prioritario

Prateria di *Posidonia oceanica* (*1120)

**nel Sito d'Importanza Comunitaria "Fondali tra le foci del Torrente
Arrone e del Torrente Marta" (IT 600003)**

Settembre 2008

INTRODUZIONE

Nell'ambito del progetto LIFE 06 NAT/IT/000050 è stata monitorata e descritta la prateria di *Posidonia oceanica* dell'ambiente marino tra le foci del Torrente Arrone e il Torrente Marta (IT 6000003) e delle Secche di Tor Paterno (IT 6000010). Tale attività è realizzata dal Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile (DECOS) dell'Università degli Studi della Tuscia che partecipa in qualità di partner e coordinatore tecnico-scientifico del progetto LIFE "Co.Me.Bi.s.",

In figura 1 vengono riportate le praterie di *Posidonia oceanica* presenti nella costa laziale.

La campagna di rilevamento e campionamento è stata effettuata da ottobre 2007 e maggio 2008 in quattro stazioni di campionamento nel tratto di mare ricadente nel sito d'importanza comunitaria "Litorale tra le foci del Torrente Arrone e il Torrente Marta". Successivamente ai campionamenti sono state svolte le analisi di laboratorio e l'elaborazione dati.



Fig.1 Distribuzione delle praterie di *Posidonia* del litorale laziale

AREA DI STUDIO

Le informazioni qui trattate sono deducibili dalla scheda Natura 2000 del sito IT 6000003, presente sul sito del Ministero dell'Ambiente e del territorio e del Mare (MATTM).

Il fondale è caratterizzato dalla presenza di un esteso posidonieto (Habitat prioritario 1120*) che si estende per circa il 50% di copertura del sito (circa 600 ettari di posidonieto). L'importanza del SIC è importante per la conservazione di uno dei banchi settentrionali di posidonia più estesi del Tirreno centrale. La *Posidonia oceanica* risulta essere la specie strutturante di uno degli ecosistemi marini più biodiversi del Mar Mediterraneo. La prateria di *Posidonia oceanica* costituisce uno stadio climax all'interno di una serie successionale che parte dalla colonizzazione di specie algali pioniere, come *Caulerpa prolifera* (Forsskal) Lamouroux, o di piccole fanerogame come *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ashers, le quali forniscono un substrato ricco di detriti di origine vegetale. Lo stato di conservazione del posidonieto in oggetto risulta nel complesso buono, ma è soggetto a minacce derivanti dal turismo balneare e da progetti di infrastrutturazione della costa in aree non distanti dal SIC. La presenza del posidonieto in questo tratto di costa contribuisce inoltre alla difesa del litorale antistante dall'erosione, che risulta essere piuttosto significativa nell'area in oggetto (Planimetria d'insieme del Litorale Laziale, 2003. Realizzata dall'Osservatorio dei litorali laziali – Centro di monitoraggio). Il posidonieto compreso nel SIC IT6000003, inoltre, a livello nazionale ha un'importanza notevole per la rete Natura 2000. Se, infatti, si analizza 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.

MATERIALE E METODI

I singoli campioni (n = 20 fasci fogliari per singola stazione di campionamento) sono stati messi in singole bustine, munite di apposite targhette per la loro identificazione.

In laboratorio sono stati puliti dalle epifite con una lama di rasoio e congelati a – 80°C per l'estrazione del DNA.

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il protocollo di Doyle & Doyle (1987) effettuando solo delle piccole modifiche, come suggerito da Serra *et al.*, 2007.

Tale messa a punto della procedura d'analisi è preliminare all'attività di saggio finalizzata a comparare lo stato di salute del posidonieto presente nel SIC.

Procedura di estrazione del DNA

In un mortaio, circa 100 mg di tessuto fogliare è polverizzato utilizzando azoto liquido. Il materiale è quindi trasferito in Eppendorf da 1.5 volumi contenente il 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 è lavato una volta con 800 µl di cloroformio isoamyl-alcool e precipitato con un uguale volume di isopropanolo ghiacciato. Il pellet di DNA è sciacquato due volte, prima con 100 µl di buffer A (76% EtOH, 200mM sodio acetato) e poi con il buffer B (76% EtOH, 10mM ammonio-acetato).

Una volta asciutto, il pellet è sciolto in 100 µl di buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8). L'RNA è rimosso incubando il DNA con RNase a 37°C per 60'.

La reazione di amplificazione avviene in un volume finale di 25 µl contenente 37.5 ng di DNA temprato, 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. La reazione di PCR è performata secondo queste condizioni:

- 3' a 94°C (denaturazione iniziale)
 - 60s a 94°C (denaturazione)
 - 60s a 44°C (annealing)
 - 90s a 72°C (estensione)
 - 5 min a 72°C (estensione finale)
- } 35 cicli

I prodotti di PCR sono separati su un gel a 2.5% di agarosio TBE 0.5X, contenente bromuro d'etidio, e visualizzati ai raggi UV.

Successivamente, per valutare l'efficienza del marcatore verrà effettuata l'analisi dell'AMOVA, che permette di calcolare la varianza molecolare, e l'analisi delle coordinate principali (PCA) calcolata sulla distanza genetica degli ISSRs utilizzando il software GenAlEx 6 (Peakall & Smouse, 2006). Infine, la distanza genetica di Nei (1978) sarà calcolata usando il programma POPGENE (Yeh *et al.*, 1997) che permetterà anche di costruire il relativo dendrogramma.

RISULTATI PRELIMINARI

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'], di cui quattro 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 rispettivamente ad un locus con due alleli. Il set di dati finale includerà entrambi i frammenti polimorfici e monomorfici. In tabella 2 vengono riportati i campioni analizzati con i 6 primers e il relativo polimorfismo.

Attraverso l'uso di questo marcatore, ISSR, l'atteso è quello di ottenere una stima coerente del flusso genico, come è già stato dimostrato in diversi lavori (Serra *et al.*, 2007; Smissen *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2007; Acampora *et al.*, 2007). Tale marcatore ha un elevato grado di polimorfismo che permette di rivelare un alto livello di differenziamento all'interno della popolazione in esame.

	Lunghezza in cm	ISSR2	ISSR6	ISSR7	ISSR10	ISSR11	ISSR8
T-20/1	60	0	0	0	0	0	0
T-20/2	57	0	0	0	0	0	0
T-20/3	39	0	0	0	0	0	0
T-20/4	59,5	0	0	0	0	0	0
T-20/5	59	0	0	0	0	0	0
T-20/6	68	0	0	0	0	0	0
T-20/7	63,5	0	0	0	0	0	0
T-20/8	48	0	0	0	0	0	0
T-20/9	40	0	0	0	0	0	0
T-20/10	52	0	0	0	0	0	0
T-20/11	42	0	0	0	0	0	0
T-20/12	37	1	0	0	0	0	1
T-20/13	55,5	0	0	0	0	0	0
T-20/14	68	1	0	0	0	0	0
T-20/15	53	0	0	0	0	0	0
T-20/16	78	0	0	0	0	0	0
T-20/17	49,5	0	0	0	0	0	0
T-20/18	44	1	0	0	0	0	0
T-20/19	38	0	0	0	0	0	0
T-20/20	60	0	0	0	0	0	0
T-20/21	39	0	0	0	0	0	0
T-20/22	48	0	0	0	0	0	0
T-20/23	47	0	0	0	0	0	0
T-20/24	59,5	1	0	0	0	0	0
T-20/25	69	1	0	0	1	0	0
T-20/26	48	0	0	0	0	0	0
T-20/27	54	0	0	0	0	0	0

T-20/28	61	0	0	0	0	0	0
T-20/29	57	1	0	0	1	1	1
T-20/30	47,5	0	0	0	0	0	0
T-20/31	69	1	0	0	1	1	0
T-10/1	76	0	0	0	0	0	0
T-10/2	77,5	0	0	0	0	1	1
T-10/3	62	0	0	0	0	0	0
T-10/4	45	0	0	0	0	0	0
T-10/5	56	0	0	0	0	1	0
T-10/6	73,5	0	0	0	0	0	0
T-10/7	90	0	0	0	0	0	0
T-10/8	70,5	0	0	0	0	0	0
T-10/9	55	0	0	0	0	0	0
T-10/10	64	0	0	0	0	0	0
T-10/11	75	0	0	0	0	0	0
T-10/12	80	0	0	0	0	0	0
T-10/13	58,5	0	0	0	0	0	0
T-10/14	39	0	0	0	0	0	0
T-10/15	53	0	0	0	0	0	0
T-15/1	54	0	0	0	0	0	0
T-15/2	57	0	0	0	0	0	0
T-15/3	59	0	0	0	0	0	0
T-15/4	63	0	0	0	0	0	0
T-15/5	52	0	0	0	0	0	0
T-15/6	71	0	0	0	0	0	0
T-15/7	66	0	0	0	0	0	0
T-15/8	52,5	0	0	0	0	0	0
T-15/9	70	1	0	0	0	0	1
T-15/10	48	1	0	0	0	0	0
T-15/11	45	0	0	0	0	0	0
T-15/12	62	1	0	0	0	0	0
T-15/13	50	0	0	0	0	0	0
T-15/14	40	0	0	0	0	0	0
T-15/15	53	0	0	0	0	0	0
T-15/16	55	1	0	0	0	0	0
T-15/17	69,5	0	0	0	0	0	0
T-15/18	48,5	0	0	0	0	0	0
T-15/19	48,5	0	0	0	0	0	0
T-15/20	50	1	0	0	0	0	0
T-15/21	40,5	0	0	0	0	0	0
T-15/22	37	1	0	0	0	0	0
T-15/23	54	0	0	0	0	0	0
T-15/24	76	1	0	0	0	0	0
T-15/25	37,5	0	0	0	0	0	0
T-15/26	42	0	0	0	0	0	0
T-15/27	60	0	0	0	0	0	0
T-15/28	60	0	0	0	0	0	0
T-15/29	45	0	0	0	0	0	0
T-15/30	57	0	0	0	0	0	0
T-15/31	41	0	0	0	0	0	0
T-15/32	43	0	0	0	0	0	0
T-15/33	44	0	0	0	0	0	0
T-15/34	56	0	0	0	0	0	0
T-15/35	55	0	0	0	0	0	0
T-15/36	52	0	0	0	0	0	0
T-15/37	59	0	0	0	0	0	0
T-15/38	55	0	0	0	0	0	0
T-15/39	65	0	0	0	0	0	0
T-15/40	42	0	0	0	0	0	0

Tab. 2 Materiale analizzato e relativo polimorfismo individuato per ogni campione

T-10: *Posidonia* campionata a 10 metri di profondità

T-20: *Posidonia* campionata a 20 metri di profondità

T-15: *Posidonia* campionata a 15 metri di profondità

<i>Pop</i>		<i>locus 1</i>	<i>locus 2</i>	<i>locus 3</i>	<i>locus 4</i>	<i>locus 5</i>	<i>locus 6</i>
Pop1	Band Freq.	0,161	0,000	0,000	0,097	0,129	0,065
	p	0,084	0,000	0,000	0,050	0,067	0,033
	q	0,916	1,000	1,000	0,950	0,933	0,967
	N	31,000	31,000	31,000	31,000	31,000	31,000
	Na	2,000	0,000	0,000	2,000	2,000	2,000
	Ne	1,182	1,000	1,000	1,104	1,142	1,068
	I	0,289	0,000	0,000	0,197	0,245	0,144
	He	0,154	0,000	0,000	0,094	0,125	0,063
	UHe	0,157	0,000	0,000	0,096	0,127	0,064
	Pop2	Band Freq.	0,175	0,000	0,000	0,000	0,000
p		0,092	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013
q		0,908	1,000	1,000	1,000	1,000	0,987
N		40,000	40,000	40,000	40,000	40,000	40,000
Na		2,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,000
Ne		1,200	1,000	1,000	1,000	1,000	1,025
I		0,306	0,000	0,000	0,000	0,000	0,068
He		0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025
UHe		0,169	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025
Pop3		Band Freq.	0,133	0,000	0,000	0,000	0,000
	p	0,069	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034
	q	0,931	1,000	1,000	1,000	1,000	0,966
	N	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000	15,000
	Na	2,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,000
	Ne	1,148	1,000	1,000	1,000	1,000	1,070
	I	0,251	0,000	0,000	0,000	0,000	0,148
	He	0,129	0,000	0,000	0,000	0,000	0,066
	UHe	0,133	0,000	0,000	0,000	0,000	0,068

Tab 3 Stima delle frequenze alleliche

Band freq.: frequenza delle bande

P e q: frequenze alleliche

N: numero di individui

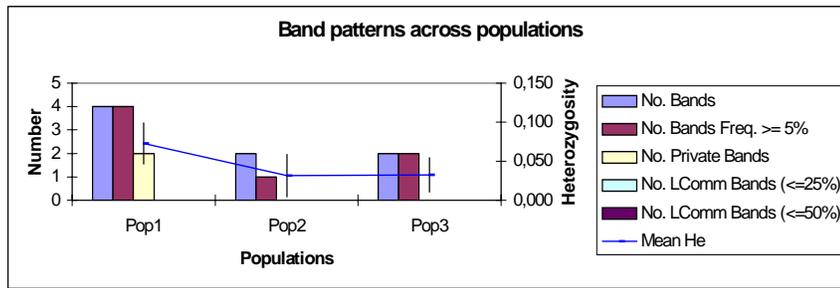
Na: numero di alleli

Ne: numero effettivo di alleli

I: indice informazioni

He: eterozigosi aspettata

UHe: eterozigosi osservata



Popolazione	Pop1	Pop2	Pop3
No. Bande	4	2	2
No. Freq. Bande. >= 5%	4	1	2
No. Bande Private	2	0	0
No. LComm Bands (<=25%)	0	0	0
No. LComm Bands (<=50%)	0	0	0
Mean He	0,073	0,032	0,032
SE of Mean He	0,026	0,027	0,022
Mean UHe	0,074	0,032	0,033
SE of Mean UHe	0,027	0,028	0,023

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

I dati sono stati analizzati con GenAlEx 6 (Peakall & Smouse, 2006) per calcolare le frequenze alleliche, la PCA (analisi delle componenti principali: permette di indagare le relazioni di affinità tra le popolazioni e consente l'individuazione sia dei maggiori gruppi di popolazioni, sia delle popolazioni intermedie tra questi, poiché non porta ad una rappresentazione dicotomica delle relazioni tra le popolazioni, collocandole tutte come rami terminali) e la variabilità genetica delle popolazioni.

Come si può osservare dalla tabella 3, corrispondente alle frequenze alleliche di ogni popolazione, il locus 1, relativo al primer ISSR 2, ha alti valori di eterozigosi in tutte le popolazioni arrivando anche a 0,175. I loci 4 e 5 (ISSR8 e ISSR10) presentano polimorfismo solo nella popolazione 1, mentre i primers ISSR6 e ISSR 7 (loci 2 e 3) sono monomorfi.

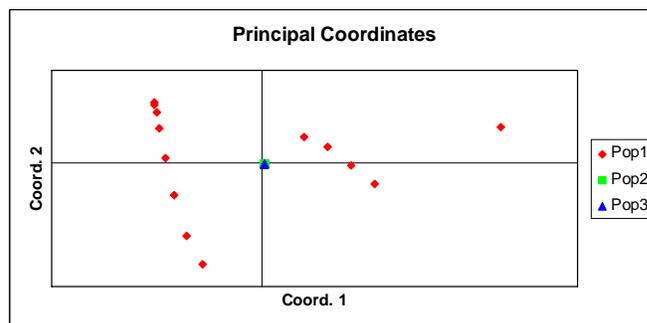


Fig 2 Analisi delle componenti principali (PCA)

L'analisi delle componenti principali (figura 2) ha rivelato che le prime due componenti spiegano cumulativamente il 96,12% della variazione complessivamente osservata (83,12% il primo asse, 7,54% il secondo asse e 5,45% il terzo). Come è possibile

osservare nelle tre popolazioni campionate due (pop 2 e pop3, rispettivamente in verde e in rosso) non presentano differenze tra i singoli campioni, mentre la popolazione 1 (in rosso) risulta essere più variabile presentando anche dei campioni che si discostano dagli altri.

La variabilità genetica delle popolazioni (figura 3), calcolata con un numero di permutazioni pari a 9999, è espressa attraverso la proporzione della varianza totale e con la Φ statistica, un analogo della F-statistica, mentre la Φ_{pt} rappresenta la correlazione tra gli individui all'interno di una popolazione relativa al data set. Il valore di flusso genico (0,003), anche se piccolo e positivo, non risulta essere significativo in quanto P (0,351) è maggiore di 0.001, quindi non sembrerebbe esserci stata nessuna espansione tra le due popolazioni campionate.

	Valore	$P(\text{rand} \geq \text{data})$
Φ_{pt}	0,003	0,351

Tab.5 Valore di Φ_{pt} e relativa probabilità
 $P(\text{rand} \geq \text{data})$: La probabilità per PhiPT
 è basata sulle permutazioni effettuate su tutto il data set.

L'AMOVA (figura 3) mostra solo varianza all'interno delle popolazioni (100%), mentre tra le popolazioni non risulta esserci nessuna variabilità.

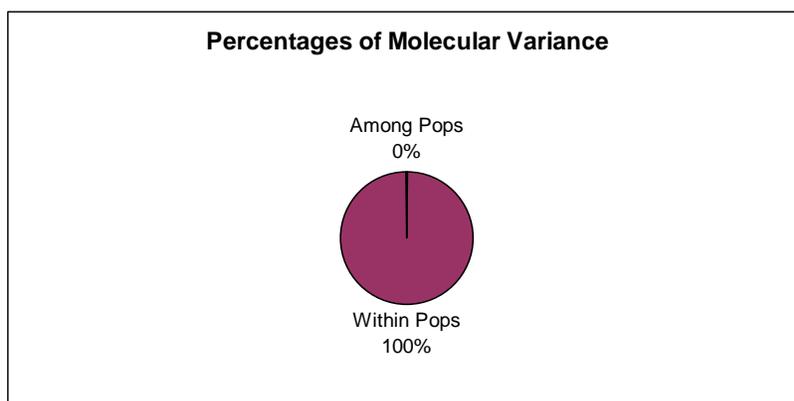


Fig.3 Percentuale di variabilità molecolare tra e nelle popolazioni

DISCUSSIONI

Come detto precedentemente, lo stato di conservazione del posidonieto in oggetto risulta nel complesso buono, ma è soggetto a minacce derivanti dal turismo balneare e da progetti di infrastrutturazione della costa in aree non distanti dal SIC.

Questa breve premessa può in parte spiegare i bassi valori di eterozigosi riscontrati in tale lavoro. Come si deduce dalla tabella 4, l'eterozigosi attesa passa da un

valore di 0,073, osservato nella popolazione 1 (20 metri di profondità) a uno di 0,032 osservato nelle popolazioni 2 e 3 (15 e 10 metri di profondità).

Anche l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) evidenzia il maggior polimorfismo nei campioni posti a profondità maggiore rispetto alle altre due popolazioni che formano, al contrario, un unico gruppo, essendo uguali tra loro.

La prateria di *Posidonia* studiata, tra le foci del Torrente Arrone e il Torrente Marta, risulta essere sottoposta ad un forte stress ambientale, presentando un panorama sottomarino particolarmente accidentato.

BIBLIOGRAFIA

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

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.

Doyle JJ and Doyle JL, 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., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

Serra I. A., Procaccini G., Intrieri M. C., Migliaccio M., Mazzuca S., Innocenti A. M., 2007. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in the seagrass *Posidonia oceanica*. *MEPS* 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 Systematics and Evolution* 239: 79-94.

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

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

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX. 1997. POPGENE, The User Friendly Software for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.

Yuan-Huo Dong, Jin-Ming Chen, Robert Wahiti Gituru and Qing-Feng Wang , 2007. Gene flow in population of the endangered aquatic fern *Ceratopteris pteridoides* in China as revealed by ISSR markers. *Aquatic botany* 87: 69-74.

Zietkiewicz E., A. Rafalski & D. Labuda, 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