



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 D2

“Secche di Tor Paterno”

SIC IT 6000010

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. 14

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 "Secche di Tor Paterno" SIC IT 6000010 (azione D2).

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.

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



Fig.1 Distribuzione delle praterie di *Posidonia* 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 di 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 qui riportate sono deducibili dalla scheda Natura 2000 del sito SIC IT 6000010, presente sul sito del Ministero dell'Ambiente e del territorio e del Mare (MATTM).

Le Secche di Tor Paterno sono costituite da una formazione rocciosa, coperta da organismi animali e vegetali che, scavando o costruendo le loro "tane" nel corso dei secoli, ne hanno modificato l'aspetto. Appare come una vera e propria isola sul fondo del mare, in un ampio "deserto" di sabbia e fango. La profondità massima è di circa 60 metri, mentre la sommità della "montagna" giunge a 18 metri sotto il livello del mare. L'importanza del SIC deriva dall'essere il pool di biodiversità più interessante e cospicuo posto al largo delle coste del fiume Tevere. E' un sito misconosciuto per la presenza della *Mitra zonata*, uno dei gasteropodi carnivori più rari del Mar Mediterraneo (Riedl, 1991). Questa struttura scogliosa sottomarina non emerge dall'acqua, né è normalmente visibile dalla superficie, dato che le acque nella zona sono spesso abbastanza torbide. I materiali trasportati dal fiume costituiscono un'importante base per lo sviluppo della vegetazione marina e sono anche i responsabili della alta "produttività ecologica" della zona. La sommità del banco roccioso, fino a circa 30 metri di profondità è popolata dalla *Posidonia oceanica*. Più in profondità si trovano interessanti colonie di celenterati, stretti parenti del corallo, come la bellissima Gorgonia rossa e gli Alcionari. Sono inoltre frequenti, in gran numero, le specie di pesci sia di fondale, come la murena, il gronco, le triglie e la rana pescatrice, che di acque libere, come la spigola, il cefalo, l'occhiata, il sarago. In superficie, in alcune stagioni, non è difficile avvistare i delfini oltre ad alcune rare specie di uccelli marini come le sule.

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 Sequence 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-mercaptoetanolo, 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 templatato, 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'etidio, 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'], 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 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.

	Lunghezza in cm	ISSR2	ISSR6	ISSR7	ISSR10	ISSR11	ISSR8		Lunghezza in cm	ISSR2	ISSR6	ISSR7	ISSR10	ISSR11	ISSR8
TP-26	60	1	0	1	0	1	0	TP-26	61	0	0	0	0	0	0
TP-26	40	1	1	0	0	1	0	TP-26	52	0	0	0	0	0	0
TP-26	24	0	1	0	0	1	0	TP-26	72	0	0	0	1	1	0
TP-26	44	1	1	0	0	1	0	TP-26	70	0	0	0	0	0	0
TP-26	55	1	0	0	0	0	0	TP-26	79	0	0	0	0	0	0
TP-26	63	0	0	0	0	1	0	TP-26	58	0	0	0	0	1	0
TP-26	60	1	0	0	0	0	1	TP-26	47	0	0	0	0	1	0
TP-26	60	0	0	0	0	1	1	TP-26	60	0	0	0	0	0	0
TP-26	39	0	0	0	1	1	0	TP-26	38	0	0	0	1	0	0
TP-26	52	0	0	1	0	1	1	TP-26	76	0	0	0	0	1	1
TP-26	60	0	0	0	1	0	1	TP-26	63	0	0	0	0	1	0
TP-26	34	0	0	0	0	0	0	TP-26	54	1	0	0	0	1	0
TP-26	27	0	0	0	0	0	0	TP-26	40	0	0	0	0	1	0
TP-26	82	1	0	0	0	0	0	TP-26	34	0	0	0	0	1	0
TP-26	84	0	0	0	0	0	1	TP-26	35	0	0	0	0	0	0
TP-26	76	0	0	0	0	0	0	TP-26	57	0	0	0	0	0	0
TP-26	49	1	1	0	0	0	1	TP-26	53	1	0	0	0	0	1
TP-26	60	1	0	0	0	0	0	TP-26	63	1	0	0	0	0	1
TP-26	38	0	0	0	0	0	1	TP-26	49	1	0	0	0	0	1
TP-26	76	0	0	0	0	0	1	TP-26	67	1	0	0	0	0	1
TP-18	63	0	1	0	1	0	0	TP-18	34	0	0	0	0	0	0
TP-18	54	0	0	0	0	0	1	TP-18	35	0	0	0	0	0	0
TP-18	40	0	0	0	0	0	0	TP-18	60	0	0	0	0	0	0
TP-18	34	0	0	1	0	0	0	TP-18	44	0	0	0	0	0	0
TP-18	35	1	1	1	0	1	1	TP-18	65	0	0	0	0	0	1
TP-18	60	0	0	0	0	0	0	TP-18	49	0	0	0	0	0	0
TP-18	44	0	0	0	1	0	0	TP-18	72	0	0	0	0	0	0
TP-18	65	0	0	0	1	0	0	TP-18	63	0	0	0	0	0	0
TP-18	49	0	0	0	1	0	0	TP-18	35	1	0	0	0	0	0
TP-18	72	0	0	0	0	0	0	TP-18	40	0	0	0	0	0	1
TP-18	63	0	0	0	0	0	0	TP-18	58	0	0	0	0	0	0
TP-18	76	0	0	0	0	0	0	TP-18	42	0	0	0	0	0	0
TP-18	60	0	0	0	0	0	0	TP-18	30	0	0	0	0	0	0
TP-18	32	0	0	0	0	0	0	TP-18	35	0	0	0	0	0	0
TP-18	65	0	0	0	0	0	0	TP-18	48	0	0	0	0	0	0
TP-18	30	0	0	0	0	0	0	TP-18	35	0	0	0	0	0	0
TP-18	58	0	0	0	0	0	0	TP-18	58	0	0	0	0	0	0
TP-18	49	0	0	0	1	0	0	TP-18	42	0	0	0	0	0	0
TP-18	68	0	0	0	0	0	0	TP-18	34	0	0	0	0	0	0
TP-18	69	0	0	0	0	0	0								

Tab 2 Campionamento ottobre 2008 contenente il materiale analizzato e relativo polimorfismo individuato per ogni campione: **T-26:** *Posidonia* campionata a 26,5 metri di profondità; **T-18:** *Posidonia* campionata a 18 metri di profondità.

Tab.3 Campionamento aprile 2009 contenente il materiale analizzato e relativo polimorfismo individuato per ogni campione: **T-26:** *Posidonia* campionata a 26,5 metri di profondità; **T-18:** *Posidonia* campionata a 18 metri di profondità.

Pop		N	Na	Ne	I	He	UHe
1) TP -26 autunno	Media	20,000	1,333	1,208	0,254	0,152	0,156
	SE	0,000	0,422	0,086	0,091	0,058	0,059
2) TP -18 autunno	Media	19,000	0,667	1,028	0,056	0,026	0,026
	SE	0,000	0,422	0,019	0,037	0,018	0,018
3) TP -26 primavera	Media	20,000	2,000	1,343	0,390	0,239	0,245
	SE	0,000	0,000	0,089	0,067	0,051	0,053
4) TP -18 primavera	Media	20,000	2,000	1,122	0,206	0,104	0,106
	SE	0,000	0,000	0,038	0,041	0,027	0,028

Tab 4. Stima delle frequenze alleliche (SE=deviazione standard); **N**: numero di individui; **Na**: numero di alleli; **Ne**: numero effettivo di alleli; **I**: indice informazioni; **He**: eterozigosi attesa; **UHe**: eterozigosi osservata .

I dati sono stati analizzati con il software GenAIEx 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.

In tabella 4 sono riportate le frequenze alleliche per ogni popolazione; i valori di eterozigosi (He) risultano elevati nelle due popolazioni campionate a 26 metri di profondità, mentre sono inferiori per le piante campionate ad una profondità di 18 metri. I valori di deviazione standard (SE) sono relativamente elevati a causa della bassa numerosità del campione saggiato. La variabilità genetica delle popolazioni (Figura 3), calcolata con un numero di permutazioni pari a 9999, è espressa mediante 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 set di dati. Il valore di flusso genico ($Nm=0,076$) risulta significativo in quanto P (0,000) è minore di 0.001; tale valore di flusso genico sembrerebbe indicare un'espansione delle popolazioni campionate.

	Popolazioni			
	1) Tp -26 autunno	2) TP -18 autunno	3) TP -26 primavera	4) TP -18 primavera
No. Bande	4	2	6	6
No. Bande con Freq. $\geq 5\%$	4	2	6	6
No. Bande private	0	0	0	0
No. Bande comuni ($\leq 25\%$)	0	0	0	0
No. Bande comuni ($\leq 50\%$)	0	0	1	1
Eterozigosi attesa	0,152	0,026	0,239	0,104
Deviazione standard	0,058	0,018	0,051	0,027
Eterozigosi osservata	0,156	0,026	0,245	0,106
Deviazione standard	0,059	0,018	0,053	0,028

Tab.4. Variabilità genetica all'interno delle 4 popolazioni campionate.

L'AMOVA (Figura 3) mostra elevati valori percentuali di varianza all'interno delle popolazioni (92%); valori percentuali nettamente inferiori (8%), ma ugualmente significativi si osservano anche tra le popolazioni.

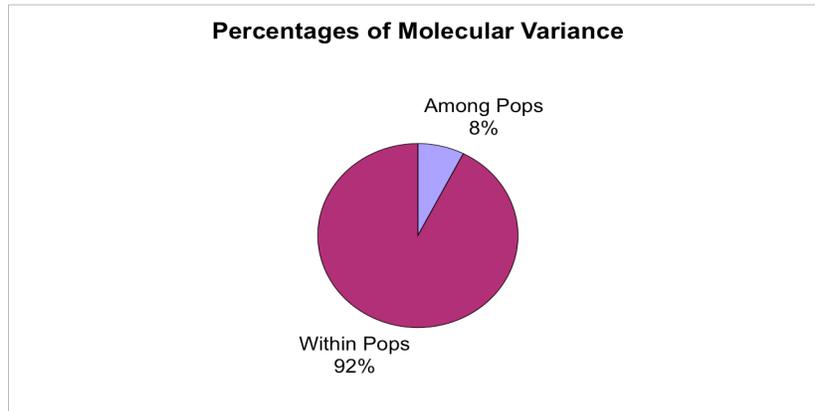


Fig.3 Percentuali di variabilità molecolare tra le popolazioni e all'interno delle popolazioni.

L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) (Figura 2) ha rivelato che le prime due componenti spiegano complessivamente l'86,61% della variazione osservata (59,64% il primo asse, 25,97% il secondo asse). Il grafico della PCA evidenzia come la popolazione 1 (in rosso) risulta molto più variabile, presentando dei campioni che si discostano tra loro, mentre le altre popolazioni sono pressoché omogenee, non mostrando scostamenti consistenti tra i singoli individui.

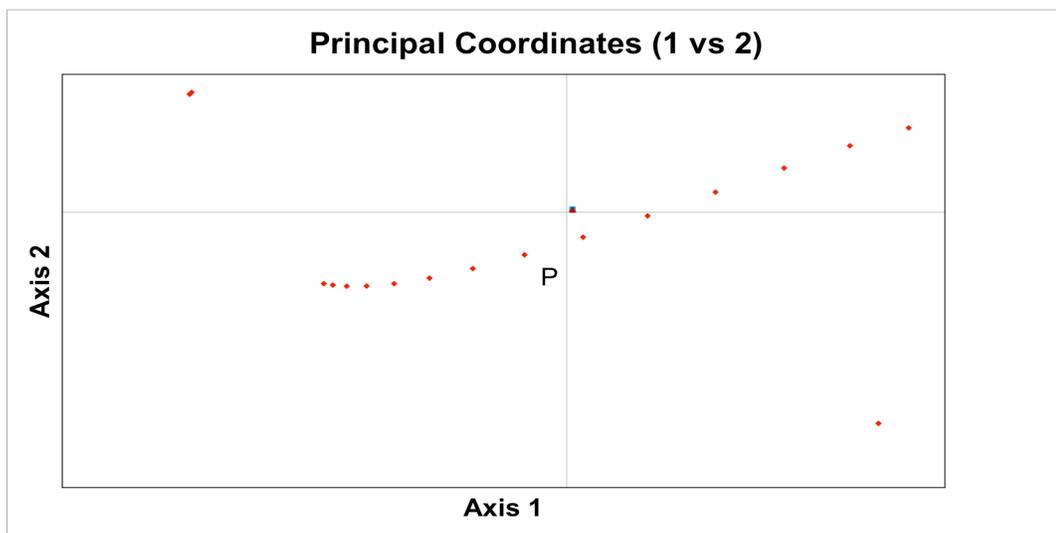


Fig 2 Analisi delle Componenti Principali (PCA)

Infine, in tabella 5, viene riportata la stima della probabilità della presenza di cloni nelle popolazioni studiate; come si può osservare il genotipo omozigote è il più abbondante, nonostante sia comunque evidente una “ricchezza” genotipica.

Possibili cloni	
Genotipo	N° individui
000000	66
000110	2
100000	4
110010	2
001011	1
111011	1
110001	1
010100	1
001000	1

Tab.5: cloni putativi basati sulla ripetizione genotipica.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

L'attività di monitoraggio genetico svolta nell'ambito dell'azione D2 ha permesso di saggiare lo stress ambientale dell'habitat prioritario "praterie di *Posidonia oceanica*" del SIC "Secche di Tor Paterno"-SIC IT 6000010.

I dati analizzati mediante il marcatore molecolare ISSR, evidenziano come il valore di eterozigosi osservata risulta elevato relativamente ai due campioni prelevati a 26 metri di profondità ($U_{He}=0,156$ e $U_{He}=0,245$) (Tabella 4); tali valori sono dovuti al fatto che l'utilizzo degli ISSR ha evidenziato la presenza di numerosi polimorfismi. Allo stesso tempo si osserva un decremento dei valori di eterozigosi osservata al diminuire della profondità di campionamento (-18 m, $U_{He}=0,026$ e $U_{He}=0,106$) (Tabella 4).

La PCA (Analisi delle Componenti Principali) ha permesso di evidenziare che la popolazione 3 (campionata a 26 metri di profondità), indicata in figura 2 in rosso, presenta una maggiore variabilità rispetto alle altre, in quanto si discosta dall'unico gruppo formato dalle altre tre popolazioni.

Dal confronto tra i risultati ottenuti in questo lavoro e dalle caratteristiche fogliari delle piante di posidonia (lunghezza e presenza di epifite), è possibile classificare la prateria, studiata a 18 metri di profondità, come "disturbata" e a bassa densità, in quanto la copertura del fondale è discontinua, con la presenza dei cosiddetti "cuscinetti". I bassi valori di variabilità genetica ed eterozigosi osservata possono essere dovuti a diversi fattori che interagiscono tra loro in maniera sinergica. Tra questi si riscontrano in larga misura cause ambientali quali idrodinamismo, torbidità dovuta alla foce del fiume Tevere e temperatura, ma anche fattori antropici come ancoraggi di imbarcazioni da diporto e pesca a strascico.

La prateria analizzata a 26 metri di profondità non presenta sintomi di disturbo: essa, infatti, presenta una copertura del fondale omogenea e compatta, la lunghezza fogliare della piantine campionate è maggiore rispetto a quella campionata alla profondità di 18 metri e la presenza di epifite è decisamente limitata. Il buono stato di salute di questa prateria, inoltre, è confermato dai risultati ottenuti dall'analisi molecolare, che evidenzia una variabilità genetica elevata e notevolmente superiore alla popolazione a profondità inferiore.

Condizioni di stress possono avere effetti negativi sulla diversità genetica, anche a brevi distanze all'interno di una singola prateria. Questo è dimostrato dalla presenza di popolazioni, come la n° 2 e la n° 4, alterate a causa della dispersione fisica e dell'alterazione della qualità delle acque ed altre che, invece, sono influenzate, in misura minore, da impatti esterni, quali le popolazioni n° 1 e 3. Questi risultati sono simili a quelli osservati nella campagna di rilevamento primaverile (relazione anno 2008), nella quale veniva evidenziato un aumento di variabilità con l'aumento della profondità.

Gli elevati livelli di variabilità genetica rilevati, evidenziano che la prateria analizzata non risente di eccessivi stress, in particolare nelle zone profonde, dove l'impatto antropico, dovuto alle attività turistico-commerciali, non avrebbe un forte effetto.

La *Posidonia oceanica*, infatti, è una specie clonale, si riproduce cioè, con modalità asessuata in condizioni “stressanti”, impedendo l’incremento della variabilità genetica, possibile solo in condizioni di riproduzione sessuata.

I risultati ottenuti in queste campagne di monitoraggio si sono rivelati di grande utilità per ottenere informazioni circa lo stato di salute della prateria di *Posidonia oceanica*.

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.

Riedl R., 1991. Fauna e Flora del Mediterraneo. Dalle alghe ai mammiferi: una guida sistematica alle specie che vivono nel Mar Mediterraneo. *Scienze Naturali. Franco Muzzio Editore, Padova*.

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