



## Gli ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) come strumento molecolare per l'identificazione tassonomica di ciprinodontiformi mediterranei

Tiziana Lai<sup>a</sup>, Marco Casu<sup>a</sup>, Stefano Valdesalici<sup>b</sup>,  
Alberto Castelli<sup>c</sup>, Ferruccio Maltagliati<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Zoologia e Antropologia Biologica, Università di Sassari, Via F. Muroli 25, Sassari, 07100, Italy

<sup>b</sup> A.I.K. Associazione Italiana Killifish, Via Cà Bertacchi 5, Viano (RE), 42030, Italy

<sup>c</sup> Dipartimento di Biologia, Università di Pisa, Via A. Volta 6, Pisa, 56126, Italy

### Riassunto

Il genere *Valencia* (Valenciidae) ha una distribuzione disgiunta con *V. hispanica* presente in habitat dulciacquicoli o leggermente salmastri dalla Catalogna meridionale all'estremità meridionale del Golfo di Valencia e *V. letourneuxi* segnalata nell'Albania meridionale e nella Grecia occidentale. Nel presente lavoro sono stati analizzati e confrontati i profili ISSR dei seguenti esemplari: due pesci di dubbia collocazione tassonomica, provenienti da una popolazione mantenuta in cattività da un allevatore amatoriale danese di pesci da acquario che sosteneva che appartenessero ad una specie di *Valencia*, due individui di *V. hispanica*, cinque di *V. letourneuxi* e cinque dell'altro ciprinodontiforme *Aphanius fasciatus*. Lo scopo del lavoro è stato quello di 1) saggiare l'efficacia degli ISSR nel risolvere problemi di tipo tassonomico e 2) verificare l'ipotesi di appartenenza dei due esemplari di dubbia collocazione tassonomica ad una delle due specie di *Valencia*. Il DNA genomico è stato estratto da porzioni di pinna caudale (circa 5 mg ciascuna) fissate in etanolo assoluto. Sono stati utilizzati nove primer che hanno fornito complessivamente 101 loci. Sulla base della matrice di dissimilarità genetica interindividuale di Rogers & Tanimoto (1960), sono state effettuate l'analisi dei cluster e il multidimensional scaling che, unitamente ad un test di assegnazione, hanno attribuito i due individui di dubbia identità a *V. hispanica*. Gli ISSR si sono rivelati uno strumento efficace per la risoluzione di problemi di tipo tassonomico. © 2004 SIte. All rights reserved

*Parole chiave:* ciprinodontiformi; specie in pericolo; ISSR; marcatori genetici, identificazione di specie; tassonomia molecolare

### 1. Introduzione

Nelle zone costiere della regione mediterranea sono rappresentate due famiglie di ciprinodontiformi indigeni: Cyprinodontidae Wagner, 1828 e

Valenciidae Parenti, 1981. La prima famiglia occupa tutta la regione mediterranea costiera con tre rappresentanti del genere *Aphanius* Nardo, 1827: *A. dispar dispar* (Rüppell, 1829), *A. fasciatus* (Valenciennes in Humboldt & Valenciennes, 1821) e *A. iberus* (Valenciennes in Cuvier & Valenciennes, 1846). La seconda famiglia è endemica della regione

\* Autore per la corrispondenza. Tel.: +39-050-2219006; fax: +39-050-49694; e-mail: [maltagli@discat.unipi.it](mailto:maltagli@discat.unipi.it).

mediterranea, include soltanto il genere bi-specifico *Valencia* Myers, 1928, che era incluso nella famiglia Cyprinodontidae prima della revisione filogenetica e biogeografica dei ciprinodontiformi effettuata da Parenti (1981). Le due specie esistenti di *Valencia*, *V. hispanica* (Valenciennes in Cuvier & Valenciennes, 1846) e *V. letourneuxi* (Sauvage, 1880), hanno una distribuzione molto ristretta con un numero molto limitato di popolazioni naturali. *V. hispanica* è distribuita nella Spagna mediterranea, da Peñíscola, località situata nel nord della provincia di Castellón, fino al confine tra le province di Valencia e Alicante (Moreno-Amich et al., 1999). Secondo vari autori *V. hispanica* era abbondante ed ampiamente distribuita in passato (Lozano Rey, 1919; Vidal Celma, 1962; Gómez Caruana et al., 1986), ma attualmente è limitata soltanto a quattro popolazioni naturali ed a qualche altra popolazione reintrodotta o mantenuta in cattività (Perdices et al., 1996; Caiola et al., 2001). *V. letourneuxi* è distribuita nell'Albania meridionale, nella Grecia nord-occidentale, nel Peloponneso e in alcune isole ioniche (Bianco & Miller, 1989; Barbieri et al., 2000; 2002). Secondo Barbieri et al. (2000), *V. letourneuxi* comprende solamente nove popolazioni naturali, che, con poche eccezioni, hanno ridotta densità di individui.

Le specie di *Aphanius* e di *Valencia* hanno una distribuzione frammentata naturalmente, in quanto le loro popolazioni sono distribuite in biotopi separati e confinati quali stagni, lagune, canali naturali e artificiali. Le specie di entrambi i generi prediligono acque relativamente basse con idrodinamismo molto limitato o assente e fondali ricchi di vegetazione sulla quale depongono le uova e nella quale si cibano e si nascondono dai predatori. Le specie di *Valencia* possono vivere nelle acque salmastre, ma il loro habitat preferenziale è costituito dalle acque dolci (Moreno-Amich et al., 1999; Rodrigo & Colom, 1999; Barbieri et al., 2002), mentre gli ambienti salmastri sono l'habitat preferenziale delle specie di *Aphanius* sopra menzionate (Cavicchioli, 1962; Lotan, 1973; Moreno-Amich et al., 1999).

Ad eccezione di *A. dispar dispar*, tutti i ciprinodontiformi sinora menzionati hanno recentemente assunto grande interesse per la conservazione, a causa del declino o, addirittura, dell'estinzione di diverse popolazioni naturali. Tali fenomeni si sono verificati a causa dell'alterazione o della sottrazione di habitat provocate da varie attività umane. Un'altra causa molto importante è

rappresentata dalle introduzioni di ciprinodontiformi alloctoni avvenute in Europa nei primi decenni del 1900. Un esempio è fornito dall'introduzione di *Gambusia* spp. dall'America del Nord, per il controllo del vettore della malaria, *Anopheles* spp. Pertanto *A. fasciatus*, *V. hispanica* e *V. letourneuxi* sono state incluse negli elenchi della Convenzione di Berna (in cui la specie *V. letourneuxi* è stata considerata sinonimo di *V. hispanica*), della Direttiva Habitat, della Convenzione di Barcellona e nel Libro Rosso IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) dei vertebrati in pericolo. Da notare che le due specie di *Valencia* sono state incluse nella categoria "criticamente in pericolo", data la loro distribuzione molto ristretta, il limitato numero di popolazioni naturali, le densità di popolazione molto basse e l'estinzione documentata di molte popolazioni (Bianco & Miller, 1989; Economidis, 1995; Perdices et al., 1996; Moreno-Amich et al., 1999; Barbieri et al., 2000; 2002). Inoltre la dieta estremamente specializzata di *V. hispanica* (Caiola et al., 2001; Caiola & de Sostoa, 2005), così come si pensa che lo sia quella di *V. letourneuxi*, è una caratteristica che contribuisce marcatamente a conferire vulnerabilità alla specie. La sottrazione di acqua dolce per l'uso in agricoltura è riconosciuta come una delle cause principali del declino delle popolazioni delle due specie di *Valencia* (Barbieri et al., 2000; Caiola et al., 2001). La IUCN ha riportato *Valencia hispanica sensu lato* (cioè *V. hispanica* + *V. letourneuxi*) come una delle 24 specie più in pericolo in Europa (Barbieri et al., 2002). Sebbene il ciprinodontide *A. fasciatus*, per la distribuzione geografica molto ampia e per il maggior grado di adattabilità a diverse condizioni ambientali, possa essere considerato in pericolo minore rispetto alle specie di *Valencia*, il declino e l'estinzione di varie popolazioni di *A. fasciatus* sono stati documentati (Bianco, 1995; Maltagliati, 2002).

Dall'avvento dell'elettroforesi delle proteine, avvenuto alla fine degli anni cinquanta, varie tecniche molecolari, quali l'isoelettrofocalizzazione e l'elettroforesi bidimensionale delle proteine, i profili RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ed il sequenziamento diretto di geni o altre regioni del DNA, sono state utilizzate per risolvere problemi di identificazione di specie, per finalità forensi o sistematiche, dando origine alla cosiddetta



## 2. Materiali e metodi

Sono stati analizzati dodici ciprinodontiformi identificati con certezza mediante i loro caratteri morfologici esterni. Inoltre sono stati analizzati i tessuti della pinna caudale di due ciprinodontiformi mediterranei di dubbia identità tassonomica, inviati da un allevatore dilettante danese di pesci da acquario. I dettagli sugli individui analizzati sono riportati in Tab. 1.

Il DNA genomico è stato estratto da porzioni della pinna caudale, corrispondenti a circa 10 mg ciascuna, conservate in etanolo assoluto a 4 °C, utilizzando il *QIAGEN® DNeasy Tissue kit* (*QIAGEN Inc.*, Valencia, California). Nel presente lavoro sono stati impiegati nove primer forniti dalla Proligo® Primers and Probes, Proligo France SAS (Tab. 2). Le amplificazioni sono state condotte seguendo il seguente protocollo: per ciascuna reazione sono stati utilizzati circa 3 µl di DNA genomico, 2.5 µl tampone di reazione 1x, MgCl<sub>2</sub> 2.5 µl, dNTP 2 µl, primer 1 µl e 0.1 µl di Taq DNA polimerasi, per un volume finale della soluzione pari a 25 µl. Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando il seguente profilo di amplificazione: 94 °C per 3 minuti; 45 cicli da 94 °C per 40 secondi, 55 °C per 45 secondi, 72 °C per 1 minuto e 40 secondi; 72 °C per 5 minuti. I profili elettroforetici ottenuti su gel di agarosio al 2% sono stati analizzati in termini di presenza/assenza di bande; i primer ISSR che hanno determinato tali profili sono elencati nella Tab. 2.

Sulla base della matrice di presenza assenza di bande, è stata ottenuta una matrice triangolare di dissimilarità genetica interindividuale usando l'indice di Rogers & Tanimoto (1960):

$$D_{RT} = 1 - [(a + d)/(a + 2b + 2c + d)],$$

dove *a* e *d* rappresentano rispettivamente la comune presenza e assenza di bande, mentre *b* e *c* sono le bande presenti esclusivamente in uno o nell'altro individuo. Per costruire un dendrogramma, è stata condotta l'analisi dei cluster UPGMA usando il programma PHYILIP 3.6 (Felsenstein, 1993). La robustezza statistica dei nodi del dendrogramma è stata valutata mediante analisi bootstrap con 10.000 pseudorepliche. Alla matrice di dissimilarità genetica è stata inoltre applicata l'analisi multivariata del multidimensional scaling non metrico (nMDS). A questo scopo è stato utilizzato il programma STATISTICA 5.1 (StatSoft, 1997). Infine, sui genotipi dei 14 individui, è stato applicato un test di assegnazione utilizzando il metodo descritto da Paetkau et al. (1995). Il calcolatore che effettua i test di assegnazione è disponibile al seguente sito internet: <http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/Doh.php>. Questo test è in grado di assegnare gli individui da identificare alla rispettiva specie prendendo i genotipi degli individui di tutte le specie e determinando a quale specie ogni individuo ha la maggiore probabilità di appartenere. I valori di probabilità sono stati ottenuti mediante permutazione (10.000 pseudorepliche) dei genotipi entro le specie.

Tabella 2

Sequenze dei primer utilizzati per le analisi ISSR, numero di bande polimorfiche per primer e intervallo dei pesi molecolari approssimati espressi in paia di basi (bp) per i 14 ciprinodontiformi analizzati.

Primer	Sequenza (5'-3')	N° di bande polimorfiche	Intervallo di peso molecolare (bp)
IT1	(CA) <sub>8</sub> GT	9	600-1400
IT2	(CA) <sub>8</sub> AC	12	480-1300
IT3	(GAG) <sub>4</sub> AG	7	400-1200
SAS1	(GTG) <sub>4</sub> GC	10	460-1800
SAS3	(GAG) <sub>4</sub> G	14	440-1500
UBC809	(AG) <sub>8</sub> G	17	290-1450
UBC811	(GA) <sub>8</sub> C	11	700-1500
UBC827	(AC) <sub>8</sub> G	12	380-1150
PT1	(GT) <sub>8</sub> C	9	500-1700

Tabella 3

Matrice delle dissimilarità genetiche di Rogers e Tanimoto (1960) tra i 14 ciprinodontiformi analizzati.

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14
01. <i>V. his.</i> Peñiscola-1	***													
02. <i>V. his.</i> Peñiscola-2	0.020	***												
03. <i>V. let.</i> Pinios-1	0.653	0.644	***											
04. <i>V. let.</i> Pinios-2	0.653	0.644	0.000	***										
05. <i>V. let.</i> Korfu-1	0.671	0.662	0.434	0.434	***									
06. <i>V. let.</i> Korfu-2	0.680	0.671	0.446	0.446	0.058	***								
07. <i>V. let.</i> Igoumenitsa	0.671	0.662	0.458	0.458	0.076	0.020	***							
08. <i>A. fas.</i> Orbetello-1	0.671	0.662	0.730	0.730	0.761	0.783	0.776	***						
09. <i>A. fas.</i> Orbetello-2	0.705	0.697	0.697	0.697	0.730	0.738	0.730	0.274	***					
10. <i>A. fas.</i> Orbetello-3	0.697	0.688	0.753	0.753	0.783	0.776	0.768	0.130	0.259	***				
11. <i>A. fas.</i> Pilo-1	0.653	0.644	0.713	0.713	0.745	0.753	0.745	0.212	0.243	0.130	***			
12. <i>A. fas.</i> Pilo-2	0.653	0.644	0.713	0.713	0.745	0.753	0.745	0.147	0.243	0.094	0.076	***		
13. Da identificare-1	0.147	0.130	0.653	0.653	0.688	0.662	0.653	0.722	0.738	0.713	0.688	0.688	***	
14. Da identificare-2	0.112	0.094	0.635	0.635	0.671	0.680	0.671	0.705	0.738	0.730	0.688	0.688	0.039	***

### 3. Risultati

I nove primer ISSR utilizzati hanno prodotto profili elettroforetici per un totale di 101 "loci" polimorfici con bande corrispondenti a frammenti di DNA delle dimensioni di 290-1800 bp (Tab. 2, Appendice I). Tutti i genotipi osservati erano diversi, con l'eccezione di quelli dei due individui di *V. letourneuxi* di Pinios.

Non considerando i due individui di dubbia identità tassonomica, sono stati rilevati 15 loci (14.9%) totalmente diagnostici (*sensu* Maltagliati et al., 2005) per *V. hispanica*, 7 (6.9%) per *V. letourneuxi* e 17 (16.8%) per *A. fasciatus*. È stato rilevato un locus (1.0%) parzialmente diagnostico (*sensu* Maltagliati et al., 2005) per *V. hispanica*, 18 (17.8%) loci per *V. letourneuxi* e 12 (11.9%) per *A. fasciatus* (Appendice I). È da notare inoltre che, nell'ambito dei cinque individui di *V. letourneuxi* che provengono da tre località differenti, 13 bande sono esclusive degli individui di Korfu+Igoumenitsa e 9 di quelli di Pinios (Appendice I). Ciò suggerisce che gli ISSR possono essere utilizzati come marcatori genetici per discriminare le popolazioni locali di questa specie. Un numero maggiore di individui per

località è comunque necessario per verificare questa affermazione.

Gli indici di dissimilarità genetica di Rogers & Tanimoto (1960) calcolati sulla base dei genotipi individuali vanno complessivamente da  $D_{RT} = 0.000$  a  $D_{RT} = 0.783$  (Tab. 3). Il valore minimo sale a  $D_{RT} = 0.020$  quando non si considera il confronto tra i due genotipi identici. All'interno delle specie note i valori delle dissimilarità interindividuali sono pari a  $D_{RT} = 0.020$  tra i due individui di *V. hispanica*, mentre sono comprese nell'intervallo da  $D_{RT} = 0.000$  a  $D_{RT} = 0.458$  tra i cinque individui di *V. letourneuxi* e da  $D_{RT} = 0.076$  a  $D_{RT} = 0.274$  tra i cinque individui di *A. fasciatus*; tra i due individui incogniti la dissimilarità genetica rilevata è  $D_{RT} = 0.039$  (Tab. 3).

Il dendrogramma UPGMA ottenuto sulla base della matrice delle dissimilarità genetiche ha rivelato una chiara separazione in tre cluster i cui nodi sono sostenuti da valori bootstrap pari a 100 (Fig. 2). Questi cluster corrispondono alle tre specie analizzate. Questa analisi ha inserito gli individui ignoti nel cluster della *V. hispanica* (Fig. 2). Analogamente il multidimensional scaling non metrico ha ordinato gli individui delle tre specie in altrettanti gruppi nettamente separati; inoltre ha posizionato i due individui ignoti nel raggruppamento corrispondente alla *V. hispanica* (Fig. 3). Il test di assegnazione ha attribuito gli individui noti alle

rispettive specie e ha conferma l'appartenenza degli individui ignoti alla specie *V. hispanica* (Tab. 4).

#### 4. Discussione

C'è ormai un generale accordo sul fatto che la tassonomia molecolare non possa sostituire la tassonomia classica. Si ritiene infatti che i marcatori molecolari devono essere impiegati in un ampio contesto tassonomico costruito usando vari tipi di informazioni biologiche ed ecologiche (Lipscomb et al., 2003; Lee, 2004; Ebach & Holdredge, 2005). Comunque esistono casi in cui la tassonomia molecolare rappresenta l'unico mezzo per identificare un organismo. Ad esempio, quando si dispone soltanto di parti o porzioni di tessuto del organismo da identificare, come nel presente lavoro, quando l'organismo da identificare è privo di validi caratteri morfologici (vedi ad esempio Dalebout et al., 1998; Casu & Curini-Galletti, 2004), oppure quando si tratta di identificare particolari stadi del ciclo vitale morfologicamente indistinguibili, quali gameti o larve (vedi ad esempio Coffroth & Mulawka, 1995). In tutti questi casi il primo passo per risolvere con metodi molecolari il problema dell'identità specifica di organismi o tessuti è la scelta di uno o più marcatori che siano in grado di fornire il livello di risoluzione richiesto (Sweijd et al., 2000).

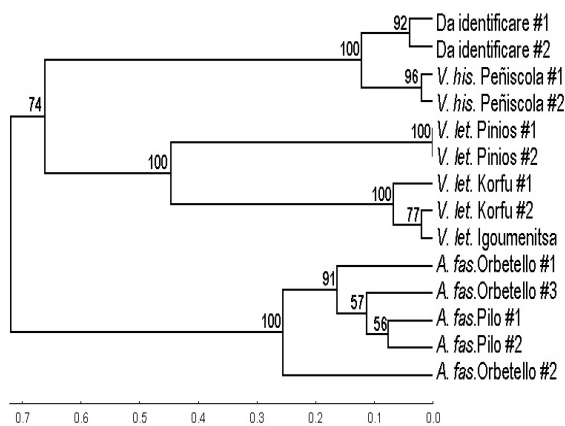


Fig. 2. Dendrogramma di consenso UPGMA (10.000 pseudorepliche bootstrap) delle dissimilarità genetiche interindividuali di Rogers & Tanimoto (1960) basate sui genotipi ISSR dei 14 ciprinodontiformi analizzati.

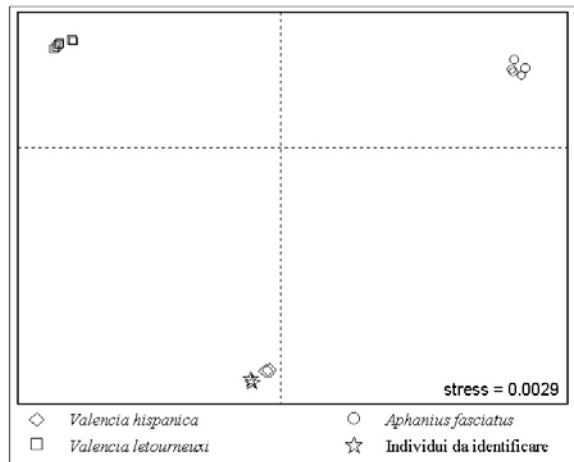


Fig. 3. Ordinamento bidimensionale dei 14 ciprinodontiformi effettuato mediante multidimensional scaling non metrico delle dissimilarità genetiche interindividuali di Rogers & Tanimoto (1960) basate sui genotipi ISSR dei 14 ciprinodontiformi analizzati.

Da ormai qualche anno gli ISSR si sono rivelati marcatori efficaci per risolvere problemi di vario tipo, che vanno dall'ibridazione di specie a vari aspetti di genetica di popolazione (Wolfe & Liston, 1998; Wolfe et al., 1998; Kostia et al., 2000; Abbot, 2001; Luque et al., 2002; Hassan et al., 2003; Cossu et al., 2004; Cossu, 2005; Maltagliati et al., 2005; Casu et al., 2005).

Nel presente lavoro i marcatori ISSR si sono rivelati strumenti efficaci anche nell'identificazione di specie in ciprinodontiformi mediterranei. Sono stati messi in evidenza l'efficacia ed il potere risolutivo degli ISSR nell'assegnare i tessuti due individui ignoti alla specie *V. hispanica*. Le tecniche di ordinamento spaziale (analisi dei cluster e nMDS) e il test di assegnazione applicati ai dati ISSR hanno permesso di convalidare su solide basi statistiche quanto era già rilevabile dalla semplice osservazione dei profili ISSR.

Data la loro economicità e la relativa facilità di analisi, si raccomanda l'impiego dei marcatori ISSR per la risoluzione di problemi di tipo tassonomico quando non si dispone degli interi organismi, ma soltanto di porzioni di tessuto dell'organismo da identificare.

## Ringraziamenti

Desideriamo ringraziare Diego Montanari, Kees Valkenburg, Heiko Kaerst and Jesper Thorup per avere fornito i campioni “fin clips” delle specie di *Valencia* analizzate.

## Bibliografia

- Abbot, P. (2001) Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*, disponibile online a <http://www.insectscience.org/1.8>.
- Barbieri, R., Stoumboudi, M.T. & Economou, A.N. (2002) Threatened fishes of the world: *Valencia letourneuxi* Sauvage, 1880 (Valenciidae). *Environmental Biology of Fishes* **65**, 46.
- Barbieri, R., Daoulas, C., Psarras, T., Stoumboudi, M.T. & Economou, A.N. (2000) The biology and ecology of *Valencia letourneuxi* Sauvage 1880 (VALENCIIDAE). Prospects for conservation. *Mediterranean Marine Science* **1**, 75-90.
- Bianco, P.G. (1995) Mediterranean endemic freshwater fishes of Italy. *Biological Conservation* **72**, 159-170.
- Bianco, P.G. & Miller, R.R. (1989) First record of *Valencia letourneuxi* (Sauvage, 1880) in Peloponnese (Greece) and remarks on the Mediterranean family Valenciidae (Cyprinodontiformes). *Cybium* **13**, 385-387.
- Caiola, N. & de Sostoa, A., 2005. Possible reasons for the decline of two native toothcarps in the Iberian Peninsula: evidence of competition with the introduced Eastern mosquitofish. *Journal of Applied Ichthyology* **21**, 358-363.
- Caiola, N., Vargas, M.J. & De Sostoa, A. (2001) Feeding ecology of the endangered Valencia toothcarp, *Valencia hispanica* (Actinopterygii: Valenciidae). *Hydrobiologia* **448**, 97-105.
- Casu, M. & Curini-Galletti, M. (2004) Sibling species in interstitial flatworms: a case study using *Monocelis lineata* (Proseriata: Monocelididae). *Marine Biology* **145**, 669-679.
- Casu, M., Maltagliati, F., Cossu, P., Lai, T., Curini-Galletti, M., Castelli, A. & Commito, J.A. (2005) Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (U.S.A.), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **325**, 46-54.
- Cavicchioli, G. (1962) Considerazioni bio-ecologiche sopra *Aphanius fasciatus* Valenciennes (Cyprinodontidae). *Bollettino di Zoologia* **29**, 713-719.
- Coffroth, M.A. & Mulawka, J.M., 1995. Identification of marine invertebrate larvae by means of PCR-RAPD species-specific markers. *Limnology and Oceanography* **40**, 181-189.
- Dalebout, M.L., Van Helden, A., Van Waerebeek, K. & Baker, C.S., 1998. Molecular genetic identification of southern hemisphere beaked whales (Cetacea: Ziphiidae). *Molecular Ecology* **7**, 687-694.
- Cossu P. (2005) Analisi della diversità genetica negli invertebrati *Gemma gemma* (Pelecypoda) di ambiente marino ed *Hediste diversicolor* (Polychaeta) di ambiente salmastro. *Tesi dottorale*, Università di Sassari, Sassari.
- Cossu, P., Casu, M., Curini Galletti, M., Lai, T., Maltagliati, F. & Castelli, A. (2004) Analisi della struttura genetica di *Hediste diversicolor* (Polychaeta, Nereididae) nel Mediterraneo occidentale mediante marcatori ISSR. *Ecologia*. Atti del XIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia (Siena, 4-6 ottobre 2004) a cura di Carlo Gaggi, Valentina Nicolardi e Stefania Santoni. [online] URL: <http://www.xivcongresso.societaitalianaecologia.org/articles/Maltagliati-82.pdf>.
- Ebach, M.C. & Holdrege, C., 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature* **434**, 697.
- Economidis, P.S. (1995) Endangered freshwater fishes of Greece. *Biological Conservation* **72**, 201-211.
- Felsenstein, J. (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Gómez Caruana, F., Sánchez Artal, F. & Peiró Gómez, S. (1986) Localización geográfica de los ciprinodóntidos endémicos de España. *Quercus* **22**, 22-23.
- Hassan, M., Harmelin-Vivien, M. & Bonhomme, F. (2003) Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **291**, 219-232.
- Kostia, S., Ruohoen-Letho, M., Vainola, R. & Varvio, S.L. (2000) Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the Arctiodactyla and evolution of the Bov-tA SINE. *Heredity* **84**, 37-45.
- Lee, M.S.Y., 2004. The molecularization of taxonomy. *Invertebrate Systematics* **18**, 1-6.
- Lipscomb, D., Platnick, N. & Wheeler Q., 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 65-66.
- Lotan, R., 1973. Osmo-regulation during adaptation to fresh water in the euryhaline teleost *Aphanius dispar*. *Journal of Comparative Physiology* **87**, 339-349.
- Lozano Rey, L. (1919) Los peces de la fauna ibérica en la colección del Museo, en 1 de enero de 1919. *Trabajos del Museo de Ciencias Naturales, Serie Zoológica* **39**, 1-112.
- Luque, C., Legal, L., Staudter, H., Gers, C. & Wink, M. (2002) ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Heredity* **136**, 251-253.
- Maltagliati, F. (2002) Genetic monitoring of brackish-water populations: the Mediterranean toothcarp *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) as a model. *Marine Ecology Progress Series* **235**, 257-262.
- Maltagliati, F., Casu, M., Lai, T., Iraci Sareri, D., Casu, D., Curini Galletti, M., Cantone & G., Castelli, A. (2005) Taxonomic distinction of *Ophelia barquii* and *O. bicornis* (Annelida, Polychaeta) in the Mediterranean as revealed by ISSR markers and the number of nephridiopores. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **85**, 835-841.
- Moreno-Amich, R., Planelles-Gomis, M., Fernández-Delgado, C. & García-Berthou, E. (1999) Distribución geográfica de los ciprinodóntidos en la península ibérica. *Peces Ciprinodóntidos Ibéricos Fartet y Samaruc*. (ed M. Planelles-Gomis), pp. 33-57. Generalitat Valenciana, Conselleria de Medio Ambiente, Valencia.
- Paetkau, D., Calvert, W., Sterling, I. & Strobeck, C. (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* **4**, 347-354.

- Parenti, L.N. (1981) A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History* **168**, 335-557.
- Perdices, A., Machordom, A. & Doadrio, I. (1996) Allozymic variation and relationships of the endangered cyprinodontid genus *Valencia* and its implications for conservation. *Journal of Fish Biology* **49**, 1112-1127.
- Rodrigo, M.A., Colom, W., 1999. Limnologia de los humedales valencianos susceptibles de albergar samaruc y fartet: (I) físico-química. *Peces Ciprinodóntidos Ibéricos Fartet y Samaruc*. (ed M. Planelles-Gomis), pp. 59-77. Generalitat Valenciana, Conselleria de Medio Ambiente, Valencia.
- Rogers, D.J. & Tanimoto, T.T. (1960) A computer program for classifying plants. *Science* **132**, 1115-1118.
- StatSoft, Inc., 1997. STATISTICA for Windows (ver. 5.1). Computer program manual. StaSoft Inc., Tulsa, OK, USA.
- Sweijd, N.A., Bowie, R.C.K., Evans, B.S. & Lopata, A.L. (2000) Molecular genetics and the management and conservation of marine organisms. *Hydrobiologia*, **420**, 153-164.
- Vidal Celma, A., 1962. Localidades de ciprinodóntidos ibéricos. *Miscellanea Zoologica* **1**, 1-4.
- Wolfe, A.D. & Liston, A. (1998) Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. *Plant molecular systematics II* (eds D.E. Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle), pp. 43-86. Chapman and Hall, New York.
- Wolfe, A.D., Xiang, Q.-Y. & Kephart, S.R. (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence markers. *Molecular Ecology* **7**, 1107-1125.
- Zietckiewicz, E., Rafalsky, A. & Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**, 176-83.

#### Appendice I

Profili ISSR ottenuti con 9 primer nei 14 ciprinodontiformi analizzati. La presenza e l'assenza di bande sono indicate rispettivamente da 1 e 0. Le bande specie-esclusive sono riportate in grassetto.

	SAS1	SAS3	UBC809	UBC811
	<i>abcdefghij</i>	<i>abcdefghijklnm</i>	<i>abcdefghijklnopq</i>	<i>abcdefghijk</i>
V. his. Peniscola #1	0000010010	<b>01011010111</b> 001	10000110000010010	<b>01000100000</b>
V. his. Peniscola #2	0000010010	<b>01011010111</b> 001	10000110000010010	<b>01000100000</b>
V. let. Pinios #1	0000110100	00010101001001	<b>11010001000000000</b>	000000 <b>10101</b>
V. let. Pinios #2	0000110100	00010101001001	<b>11010001000000000</b>	000000 <b>10101</b>
V. let. Korfu #1	0000000010	00010101001001	<b>110010010000101000</b>	<b>101010000010</b>
V. let. Korfu #2	0000010010	00010101001001	<b>010010010000101000</b>	<b>101010000010</b>
V. let. Igoumenitsa	0000010010	00010101001001	<b>010010010000101000</b>	<b>101010000010</b>
A. fas. Orbetello #1	<b>1111101001</b>	<b>10100001000100</b>	<b>10100110011010101</b>	0001000 <b>1000</b>
A. fas. Orbetello #2	<b>1111101001</b>	00100001000100	00011010101010101	0001000 <b>1000</b>
A. fas. Orbetello #3	<b>1111101001</b>	<b>10100001000100</b>	00000110001010101	0001000 <b>1000</b>
A. fas. Pilo #1	<b>1111101001</b>	00100001000100	00000110001010101	0001000 <b>1000</b>
A. fas. Pilo #2	<b>1111101001</b>	00100001000100	00000110001010101	0001000 <b>1000</b>
Da identificare #1	0000010010	01011010111011	00000110000010010	01000100000
Da identificare #2	0000010010	01011010111011	10000110000010010	01000100000

	UBC827	IT1	IT2	IT3	PT1
	<i>abcdefghijkl</i>	<i>abcdefghi</i>	<i>abcdefghijkl</i>	<i>abcdefg</i>	<i>abcdefghi</i>
V. his. Peniscola #1	000100100110	00000100 <b>1</b>	000010000 <b>100</b>	000010 <b>1</b>	001010 <b>111</b>
V. his. Peniscola #2	000100100110	00000100 <b>1</b>	0000 <b>10000100</b>	000010 <b>1</b>	001010 <b>111</b>
V. let. Pinios #1	<b>011010001001</b>	<b>011000100</b>	<b>001100001000</b>	<b>0100100</b>	<b>011001000</b>
V. let. Pinios #2	<b>011010001001</b>	<b>011000100</b>	<b>001100001000</b>	<b>0100100</b>	<b>011001000</b>
V. let. Korfu #1	<b>100001010001</b>	<b>011000100</b>	<b>010100000000</b>	<b>1100010</b>	<b>011001000</b>
V. let. Korfu #2	<b>100001010001</b>	<b>011000100</b>	<b>010100000001</b>	<b>1100010</b>	<b>011001000</b>
V. let. Igoumenitsa	<b>100001010001</b>	<b>001000100</b>	<b>010100000001</b>	<b>1100010</b>	<b>011001000</b>
A. fas. Orbetello #1	001100000110	000 <b>110010</b>	<b>100000000000</b>	<b>0011000</b>	<b>100100010</b>
A. fas. Orbetello #2	001100000110	000 <b>111010</b>	<b>100100100010</b>	<b>0011000</b>	000001000
A. fas. Orbetello #3	001100000110	000 <b>110010</b>	<b>100001010011</b>	<b>0011000</b>	<b>100100010</b>
A. fas. Pilo #1	001100000110	000 <b>100010</b>	00000 <b>1010010</b>	<b>0011000</b>	000111010
A. fas. Pilo #2	001100000110	000 <b>100010</b>	000000 <b>10010</b>	<b>0011000</b>	<b>100100010</b>
Da identificare #1	000100100100	10100100 <b>1</b>	000010001101	000010 <b>1</b>	001010110
Da identificare #2	000100100100	10100100 <b>1</b>	000010001100	000010 <b>1</b>	001010110