

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

*Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina*

**L'influenza di barriere biogeografiche sulla struttura  
genetica di *Chthamalus montagui* (Crustacea, Cirripedia)**

Relatori

Candidata

Prof. Alberto CASTELLI

Gemma MARACCI

Dott. Ferruccio MALTAGLIATI

Dott.ssa Federica Gabriella PANNACCIULLI

**Tesi ENEA n. 1419/2012**

Anno Accademico 2012 – 2013

Il crostaceo cirripede *Chthamalus montagui* Southward, 1976 è una specie ad alta capacità di dispersione larvale presente lungo le coste rocciose dell'Atlantico orientale, del Mediterraneo e del Mar Nero, che predilige ambienti intertidali caratterizzati da un'esposizione moderata al moto ondoso.

Studi precedenti hanno indagato il pattern genetico di questa specie nel suo areale di distribuzione, evidenziando una significativa divergenza genetica tra le popolazioni atlantiche e quelle mediterranee.

L'obiettivo del lavoro di tesi è stato quello di approfondire lo studio della struttura genetica di *C. montagui* in corrispondenza di due delle maggiori barriere biogeografiche presenti nel bacino mediterraneo: il fronte Almeria-Oran (FAO) e lo Stretto dei Dardanelli (SD). Studi precedenti condotti su varie specie appartenenti a diversi gruppi tassonomici hanno, infatti, messo in evidenza divergenza genetica generata dalla presenza di queste barriere.

Il lavoro di tesi ha indagato il pattern genetico della specie in tre località situate ai lati di ciascuna delle due barriere: Agadir (Marocco), Tangeri (Marocco) e Palma de Mallorca (Spagna) per il FAO; Volos (Grecia), Büyükada (Turchia) e Sozopol (Bulgaria) per lo SD. Per ciascuna località sono stati analizzati 30 individui, tramite sei loci microsatellitari.

Sono stati, inoltre, messi a punto due protocolli PCR Multiplex per i sei loci presi in esame, al fine di ridurre i tempi ed i costi delle future analisi effettuate con tali marcatori. Si è deciso, però, di non applicare i suddetti protocolli in questo lavoro, in quanto l'amplificazione è risultata soddisfacente con l'utilizzo di primer non fluorescenti, mentre sono stati riscontrati problemi nell'amplificazione con primer marcati con fluorescenza.

I risultati ottenuti dall'analisi genetica hanno mostrato un generale discostamento delle località dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. È stato riscontrato, inoltre, un elevato numero di alleli nei loci presi in esame, con una grossa presenza di alleli privati. L'eterozigosità osservata risulta relativamente elevata. In generale, le località considerate non differiscono tra di loro per ciò che concerne i parametri di variabilità genetica.

I valori di  $F_{ST}$ , supportati dai risultati ottenuti dall'AMOVA e dall'analisi di assegnazione bayesiana, indicano la presenza di una strutturazione genetica tra le località: risulta evidente una separazione delle località atlantiche (Agadir e Tangeri) dalle restanti località. Ciò è confermato anche dal flusso genico tra località, che risulta

elevato tra le località ai lati dello Stretto dei Dardanelli e Palma de Mallorca, mentre risulta ridotto tra Palma de Mallorca e le località di Agadir e Tangeri.

Sulla base dei risultati ottenuti, il fronte Almeria-Oran è considerato una barriera efficace per la divergenza genetica, mentre lo Stretto dei Dardanelli non risulta esserlo.

---

**INDICE**

<b>Capitolo 1 – Introduzione</b> .....	pag. 1
1.1 Obiettivi .....	pag. 2
1.2 Biodiversità genetica .....	pag. 3
1.3 Microsatelliti .....	pag. 5
1.4 Tecniche molecolari .....	pag. 8
1.4.1 Estrazione del DNA .....	pag. 8
1.4.2 Amplificazione del DNA: Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	pag. 9
1.4.3 Multiplex PCR .....	pag. 15
1.4.4 Elettroforesi .....	pag. 18
1.4.5 Analisi dei frammenti .....	pag. 19
<b>Capitolo 2 – <i>Chthamalus montagui</i></b> .....	pag. 24
2.1 Inquadramento sistematico e morfologia dei Cirripedi .....	pag. 25
2.2 <i>Chthamalus montagui</i> : sistematica, morfologia, ecologia e genetica .....	pag. 26
<b>Capitolo 3 – Materiali e metodi</b> .....	pag. 31
3.1 Area di studio .....	pag. 32
3.1.1 Fronte Almeria-Oran (FAO) .....	pag. 32
3.1.2 Stretto dei Dardanelli (SD) .....	pag. 33
3.1.3 Siti di campionamento .....	pag. 35
3.2 Protocollo di estrazione del DNA .....	pag. 36
3.3 Primer microsatellitari utilizzati e protocollo di amplificazione del DNA ....	pag. 39
3.4 Preparazione campioni per l'analisi dei frammenti .....	pag. 44
3.5 Genotipizzazione dei frammenti analizzati .....	pag. 45
3.6 Trattamento statistico dei dati .....	pag. 47
<b>Capitolo 4 – Risultati</b> .....	pag. 54
4.1 Multiplex PCR .....	pag. 55
4.2 Struttura genetica di <i>Chthamalus montagui</i> nell'area di studio .....	pag. 59
<b>Capitolo 5 – Discussione</b> .....	pag. 69
5.1 Multiplex PCR .....	pag. 70
5.2 Struttura genetica di <i>Chthamalus montagui</i> nell'area di studio .....	pag. 71
<b>Capitolo 6 – Conclusioni</b> .....	pag. 76
<b>Bibliografia</b> .....	pag. 78
<b>Appendici</b> .....	pag. 91
<b>Ringraziamenti</b> .....	pag. 105

**CAPITOLO 1**  
**INTRODUZIONE**

## 1.1 OBIETTIVI

Il lavoro di tesi sul cirripede *Chthamalus montagui* Southward, 1976 è costituito da due parti.

La prima parte prevede la messa a punto di protocolli Multiplex PCR per 6 loci microsatellitari specie-specifici precedentemente disegnati da Pannacciulli *et al.* (2005). Lo sviluppo di protocolli Multiplex PCR è volto al tentativo di ridurre i tempi ed i costi delle analisi genetiche necessarie per gli studi di genetica di popolazione.

La seconda parte del lavoro di tesi si inserisce all'interno di un progetto più ampio, sviluppato in seguito ai risultati ottenuti in due studi di genetica di popolazione su *C. montagui*:

- Pannacciulli *et al.* (1997), in cui i risultati, ottenuti utilizzando la tecnica dell'elettroforesi delle proteine su popolazioni atlantiche e mediterranee di *C. montagui*, evidenziano un grado di differenziazione significativo tra le popolazioni atlantiche e le popolazioni mediterranee;
- il Ph.D. di Fontani (2009) in cui, mediante l'utilizzo di sei loci microsatellitari polimorfici come marcatori molecolari, è stata evidenziata una differenziazione significativa tra popolazioni atlantiche e mediterranee come nel caso di Pannacciulli *et al.* (1997).

Sulla base di questi studi, è stato ideato un progetto svolto in collaborazione con la Bar Ilan University di Tel Aviv (Israele), composto da tre step:

1. un'indagine preliminare del pattern genetico di *C. montagui* in corrispondenza delle maggiori barriere idrografiche (ad esempio, il fronte Almeria-Oran, lo Stretto dei Dardanelli e del Bosforo, il Canale di Sicilia, ecc.) mediante l'impiego di 6 marcatori microsatellitari;
2. a seconda del risultato ottenuto nel primo step, l'eventuale arricchimento del dataset mediante l'analisi di campioni provenienti da differenti aree di importanza biogeografica;
3. a seconda dei risultati dello screening microsatellitare, l'eventuale analisi del gene mitocondriale COI in un subcampione di località/individui (alcune località sono già state analizzate da Shemesh *et al.* 2009). L'approccio multi-marcatore (nucleare e mitocondriale quindi, rispettivamente, marcatore neutrale e non neutrale) potrebbe

fornire una migliore comprensione di ciò che sta succedendo all'interno del range di distribuzione di *C. montagui*.

Il secondo obiettivo del lavoro di tesi è il completamento del primo step del progetto. Nello specifico, è stato indagato il pattern genetico di *C. montagui* in corrispondenza del fronte Almeria-Oran, mediante l'analisi di campioni provenienti dalle località di Agadir e Tangeri (Marocco) e Palma de Mallorca (Isole Baleari, Spagna), e dello Stretto dei Dardanelli, mediante l'analisi di campioni provenienti dalle località di Volos (Grecia), Büyükada (Turchia) e Sozopol (Bulgaria). Per lo studio sono stati impiegati 6 marcatori microsatellitari specie-specifici altamente polimorfici precedentemente caratterizzati da Pannacciulli *et al.* (2005).

## 1.2 DIVERSITÀ GENETICA

La diversità genetica rappresenta il livello basilare della biodiversità ed è descritta dalla variazione genetica tra individui entro una popolazione e dalla divergenza genetica tra le popolazioni (Gray, 1997). La variabilità genetica permette alle popolazioni di rispondere efficacemente alle differenti caratteristiche, ed alle variazioni, degli habitat che occupano (Cognetti *et al.*, 2004); infatti popolazioni con un'alta variabilità genetica hanno più probabilità di avere al loro interno individui in grado di rispondere ai cambiamenti dell'ambiente e, quindi, di trasmettere i loro geni alle generazioni successive (Nevo *et al.*, 1984). La variabilità genetica è “una caratteristica delle popolazioni naturali ed ogni popolazione produce più prole di quella che l'ambiente può sostenere. La conseguenza di questa sovrapproduzione è che gli individui con la fitness più elevata daranno origine ad una prole in grado di competere con successo in quel determinato ambiente. In questo modo la generazione successiva avrà un maggior numero di rappresentanti con quel genotipo e la popolazione si sarà evoluta” (Darwin, 1859).

Sia su scala temporale breve (di poche generazioni) che su scala temporale evolutiva (cioè di molte generazioni), lo stress ambientale, sia di origine naturale, che quello provocato dall'uomo (ad esempio, l'inquinamento), tende a ridurre la diversità genetica (Gray, 1997; Cognetti & Maltagliati, 2000). Oltre allo stress ambientale, la riduzione della diversità genetica può essere causata da fenomeni, quali l'alterazione del flusso genico, l'inbreeding o inincrocio, la depressione da outbreeding

o esincrocio, il fenomeno del collo di bottiglia (una popolazione che abbia subito una forte riduzione demografica perde alleli, con relativa riduzione della variabilità genetica), l'introggressione genica (data dal trasferimento di materiale genetico mediato dagli individui ibridi). Tali fenomeni possono comportare perdite ingenti di diversità genetica dovute alla riduzione delle dimensioni della popolazione o, in ultima analisi, all'estinzione della popolazione stessa (Cognetti & Maltagliati, 2004).

La diversità genetica è indotta, invece, da mutazioni che possono interessare cambiamenti a livello nucleotidico, fino ad arrivare a modificazioni del cariotipo. Le mutazioni, se non deleterie, creano nuovi alleli, che sono scambiati grazie a forze microevolutive quali selezione naturale, flusso genico e deriva genetica (Hartl & Clark, 1989).

La selezione naturale, concetto introdotto da Darwin nel 1859, descrive l'interazione tra la variazione di caratteri individuali e l'ambiente che determina differenze nel tasso di sopravvivenza e riproduzione tra individui diversi di una popolazione, portando al cambiamento evolutivo, se la variazione su cui agisce è ereditaria.

Il flusso genico, invece, è la diffusione di alleli e/o aplotipi tra popolazioni, per migrazione di individui adulti, di larve, o di gameti. Esso tende ad omogeneizzare le frequenze alleliche e/o aplotipiche tra le popolazioni, eliminando il differenziamento genetico locale (Bullini *et al.*, 1998). Nella maggior parte degli invertebrati marini bentonici, come *C. montagui*, la migrazione avviene prevalentemente grazie alle fasi larvali planctoniche o mediante trasporto passivo di individui adulti su oggetti galleggianti (rafting) o sulle chiglie delle imbarcazioni.

La deriva genetica, infine, è responsabile delle variazioni casuali delle frequenze alleliche e/o aplotipiche in una popolazione di dimensioni relativamente ridotte. Il suo impatto è legato quindi al numero di individui presenti nella popolazione: minori sono le dimensioni, maggiore sarà l'effetto della deriva genetica (Hartl & Clark, 1989).

Generalmente le specie marine tendono ad avere una diversità genetica maggiore rispetto alle specie di acqua dolce e terrestri.

Solitamente in ambiente marino la biodiversità è più alta nei sistemi bentonici che in quelli pelagici e tende a diminuire allontanandosi dalla costa, dove gli habitat sono più



eterogenei. Anche la perdita di biodiversità, però, risulta maggiore nelle aree costiere a causa della maggiore pressione antropica a cui gli habitat sono sottoposti (Gray, 1997).

### 1.3 MICROSATELLITI

Nel corso degli ultimi anni sono state sviluppate numerose tecniche che, direttamente o indirettamente, permettono di indagare le differenze genetiche tra individui e consentono, di conseguenza, di individuare le relazioni evolutive ed i rapporti filogenetici esistenti tra gli individui, tra le popolazioni che essi compongono, tra le specie cui appartengono e tra taxa di livello gerarchico superiore. In questo studio, come marcatori molecolari, sono stati utilizzati i microsatelliti.

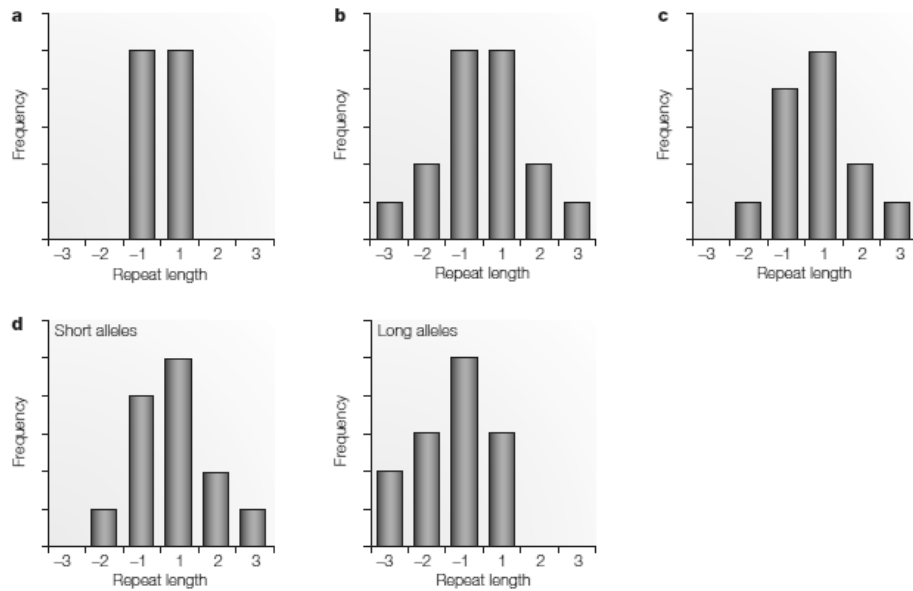
I genomi sono disseminati di ripetizioni semplici. Le ripetizioni in tandem occorrono in forma di iterazioni di unità ripetute, di quasi tutto, dalla singola coppia di basi fino a centinaia di coppie di basi. I microsatelliti sono ripetizioni di sequenze mono-, di-, tri- o tetra-nucleotidiche di DNA, estremamente comuni all'interno dei genomi eucariotici e procariotici, ma sono possibili anche ripetizioni penta- o esa-nucleotidiche (Ellegren, 2004). Ripetizioni di 10-30 paia di basi (bp) sono definite minisatelliti, mentre ripetizioni di un maggior numero di paia di basi sono chiamate satelliti. Il termine "satellite" è stato coniato in seguito all'osservazione, avvenuta negli anni sessanta, di una frazione di DNA che mostrava una densità di galleggiamento differente, rilevabile come un "picco satellite" nella centrifugazione secondo gradiente di densità, che è stata in seguito associata a grandi ripetizioni centromeriche in tandem. Mentre nei procarioti è stato dimostrato che i microsatelliti svolgono diverse funzioni biologiche, negli eucarioti il loro ruolo risulta ancora poco chiaro (Ellegren, 2004).

Fin dalla loro scoperta nei primi anni ottanta, la presenza ubiquitaria che caratterizza i microsatelliti, altrimenti detti *Sequence-Tagged Microsatellite Sites* (STMSs) (Beckmann & Soller, 1990), *Simple Sequence Repeats* (SSRs) (Jacob *et al.*, 1991) o *Short Tandem Repeats* (STRs) (Edwards *et al.*, 1991), ha lasciato sorpresi i genetisti (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980). I microsatelliti sono una tipologia di sequenza del DNA tra le più variabili nel genoma (Weber, 1990). Sono loci polimorfici di DNA e gli alleli di un determinato locus microsatellitare differiscono per il numero di ripetizioni e, di conseguenza, per la loro lunghezza. In linea generale,

l'elevata variabilità nel numero di ripetizioni all'interno di un locus microsatellitare li rende validi marcatori genetici. Il loro polimorfismo è dato, quindi, dalla lunghezza, cioè dal numero di ripetizioni, piuttosto che dalla sequenza primaria.

Dal momento che sono localizzati in zone non codificanti del DNA, si assume che i microsatelliti evolvano in maniera neutrale. Per i marcatori neutrali, il grado di polimorfismo è proporzionale al tasso di mutazione e, considerato l'elevato polimorfismo dei microsatelliti, ne consegue che le mutazioni in tali loci avvengano molto frequentemente (Weber & Wong, 1993). Il tasso e la direzione delle mutazioni sono considerati, quindi, due fattori fondamentali per ciò che concerne la stima della distanza genetica basata su dati microsatellitari.

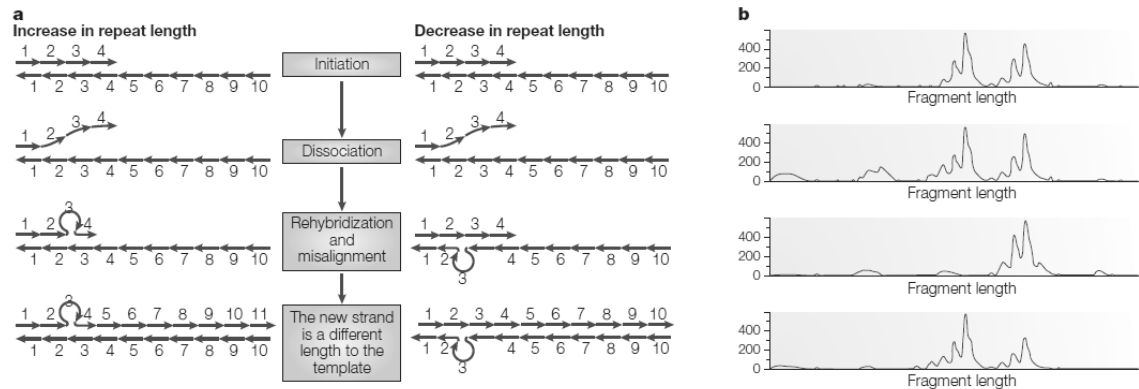
Con l'applicazione di modelli teorici di evoluzione dei microsatelliti ai dati empirici di frequenza allelica, i genetisti di popolazione si pongono l'obiettivo di determinare, per esempio, da quanto tempo due popolazioni si sono separate oppure di quantificare il flusso genico tra di esse. In linea generale, i microsatelliti seguono il modello molecolare definito *Stepwise Mutation Model* (SMM) da Ohta & Kimura (1973) (Fig. 1.1). Il SMM prevede che una mutazione alteri la lunghezza di una serie ripetitiva attraverso l'aggiunta o la rimozione di un'unità ripetitiva ad un tasso fisso (un percorso simmetrico casuale avanti-indietro indipendente dalla lunghezza della ripetizione) (Shriver *et al.*, 1993; Valdes *et al.*, 1993; Kimmel & Chakraborty, 1996; Kimmel *et al.*, 1996). Tuttavia, risulta evidente come un SMM semplice non porti a distribuzioni di lunghezza dei microsatelliti stazionarie (Di Rienzo *et al.*, 1994). Pertanto, sono stati introdotti, per mezzo di estensioni del SMM, un limite superiore alla dimensione degli alleli (Nauta & Weissing, 1996; Feldman *et al.*, 1997; Pollock *et al.*, 1998; Stefanini & Feldman, 2000) o, in alternativa, una tendenza mutazionale in cui gli alleli più grandi sono preferiti rispetto a quelli di taglia minore (Garza *et al.*, 1995; Zhivotovsky, 1999; Calabrese & Durrett, 2003).



**Fig. 1.1.** Modelli di mutazione dei microsatelliti. Tasso e direzione degli eventi mutazionali secondo diverse versioni del modello SMM. Le mutazioni sono indicate dalla variazione del numero di ripetizioni (per esempio, +1 corrisponde all’inserimento di una singola unità di ripetizione). **a)** modello semplice che prevede variazioni di un solo step; **b)** modello che prevede variazioni *multi-step*; **c)** modello con tendenza direzionale rivolta all’aumento delle ripetizioni; **d)** modello lunghezza-dipendente in cui gli alleli più corti tendono ad aumentare la loro taglia, mentre gli alleli più lunghi mostrano un andamento opposto.

Un altro modello sostiene che, a livello di genoma, una distribuzione dei microsatelliti secondo la lunghezza delle ripetizioni che si trova in equilibrio risulta dal bilanciamento di due forze opposte, le mutazioni che provocano il cambiamento di lunghezza del frammento e le mutazioni puntiformi (Bell & Jurka, 1997; Kruglyak *et al.*, 1998). Il cambiamento della lunghezza del frammento è dovuto a mutazioni provocate dallo slittamento, avanti o indietro, della DNA Polimerasi (Fig. 1.2), lungo una sequenza ripetuta, durante la replicazione. Successivamente all’inizio della replicazione, infatti, i filamenti possono dissociarsi e riallinearsi fuori registro: se il riallineamento introduce un *loop* sul filamento di nuova sintesi, il risultato finale sarà un incremento della lunghezza del frammento ripetuto mentre, se il *loop* si forma sul filamento template, si avrà una diminuzione della lunghezza del frammento ripetuto. La frequenza con cui esse avvengono aumenta con il crescere del numero di ripetizioni presenti, favorendo, quindi, alleli con alti valori di ripetizioni. Lo slittamento nella replicazione avviene anche durante l’amplificazione dei microsatelliti *in vitro* e, in questo caso, principalmente sotto forma di riduzione del numero di ripetizioni. Questi eventi sono riconosciuti come picchi minori, denominati *stutter bands*, che differiscono dal prodotto principale di una lunghezza multipla dell’unità di ripetizione (Fig. 1.2). Le mutazioni puntiformi, invece, rompono lunghe serie di ripetizioni in unità più piccole.

Questo modello è ben accolto in quanto è in grado di spiegare le differenze di distribuzione dei microsatelliti tra le specie e il motivo per cui i microsatelliti non si espandono in serie enormi di ripetizioni.



**Fig. 1.2.** Slittamento nella replicazione. **a)** il riallineamento fuori registro dei due filamenti porta alla sintesi di frammenti con diversa lunghezza rispetto al template, maggiore se il *loop* avviene sul filamento di nuova sintesi, minore se il *loop* avviene sul filamento template. **b)** slittamento nella replicazione *in vitro* con conseguente insorgenza di *stutter bands*.

## 1.4 TECNICHE MOLECOLARI

L'incremento dell'uso dei marcatori molecolari è stato possibile grazie al contemporaneo sviluppo delle tecniche di estrazione, amplificazione e sequenziamento del DNA e delle tecniche elettroforetiche che permettono di visualizzare il DNA estratto ed i prodotti delle amplificazioni.

### 1.4.1 ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA può essere effettuata utilizzando protocolli sperimentali diversi, che possono prevedere l'impiego di ultracentrifugazione, di colonne di separazione o basarsi su metodi chimici (Procaccini & Maltagliati, 2003).

Qualunque sia la tecnica utilizzata, il processo di estrazione del DNA si basa su quattro fasi fondamentali: lisi cellulare, precipitazione delle sostanze indesiderate residue, precipitazione del DNA e sua reidratazione e conservazione a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La lisi cellulare prevede l'utilizzo di un detergente anionico che, solubilizzando le membrane cellulari e denaturando le proteine, permette di avere una soluzione contenente DNA genomico e mitocondriale, lipidi, proteine ed alcune impurità. Il buffer

di lisi deve, quindi, contenere un enzima proteolitico, un sale, un agente chelante per cationi bivalenti ed un tampone. Inoltre, la lisi cellulare è favorita da alte temperature, in quanto esse provocano la denaturazione delle proteine.

La fase successiva determina la precipitazione delle sostanze indesiderate residue della fase precedente (proteine, lipidi ed impurità), poiché sfrutta le diverse solubilità delle molecole in differenti ambienti ionici o in differenti solventi. La precipitazione delle sostanze indesiderate consente l'asportazione del surnatante residuo contenente il DNA.

Il DNA viene quindi separato dal resto della soluzione grazie all'aggiunta di etanolo assoluto: i cationi monovalenti di quest'ultimo, schermando la carica negativa dei gruppi fosfato del DNA, neutralizzano la forza repulsiva che impedisce alle molecole di DNA di aggregarsi tra loro e, di conseguenza, di precipitare. Tale fenomeno è favorito da basse temperature. Mediante ultracentrifugazione il DNA si deposita sul fondo della provetta sotto forma di pellet che, sottoposto a lavaggi con etanolo al 70%, viene liberato da eventuali impurità, come residui di sale o di proteine. Terminati i cicli di lavaggio, il DNA viene poi risospeso in una soluzione tampone e conservato a -20°C.

#### **1.4.2 AMPLIFICAZIONE DEL DNA: *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)**

La *Polymerase Chain Reaction* (PCR o Reazione a Catena della Polimerasi) è un processo di amplificazione selettiva in vitro di una sequenza di DNA target. Si compone di una serie di reazioni a catena che permettono di ottenere un numero altissimo di copie di determinati frammenti di DNA. Le prime PCR sono state messe a punto agli inizi degli anni Settanta, ma sono diventate uno strumento utile per studi legati alla genetica solo grazie al perfezionamento delle tecniche di purificazione del DNA e, soprattutto, all'uso di polimerasi termostabili, la cui funzione enzimatica non è influenzata in maniera negativa dall'alta temperatura. La *Polymerase Chain Reaction* attualmente utilizzata è stata messa a punto da Kary Mullis nel 1987.

L'uso di polimerasi termostabili, che non risentono cioè della temperatura elevata, ha fortemente incrementato le potenzialità delle reazioni di PCR, poiché ha permesso di utilizzare temperature di appaiamento e di estensione più elevate e di aumentare, di

conseguenza, la specificità e la resa della reazione stessa. La polimerasi termostabile più utilizzata è la *Taq* Polimerasi (*Taq*), un enzima isolato dal batterio termofilo *Thermus aquaticus* che è attivo già a temperatura ambiente (Hillis *et al.*, 1996).

La PCR usa, per copiare una specifica sequenza bersaglio, un procedimento basato su una serie di cicli d'innalzamento ed abbassamento della temperatura: scaldando il doppio filamento, le forze ioniche che tengono uniti i filamenti complementari perdono intensità ed i due filamenti si separano, mentre diminuendo la temperatura, i due filamenti possono appaiarsi nuovamente. Per dare inizio alla sintesi del DNA ad un preciso punto del DNA templato è necessario che uno specifico oligonucleotide (una corta sequenza genetica a singolo filamento, che prende il nome di primer) si leghi “a monte”, cioè dalla parte dell'estremità 5', del frammento che si vuole replicare. Per fare ciò, sono necessari l'innalzamento ed il successivo abbassamento della temperatura perché, man mano che la temperatura scende, le forze di Brown diminuiscono e si formano legami ionici sempre più forti tra il DNA templato ed il primer. Le forze di Brown, inoltre, agiscono maggiormente su frammenti piccoli, di conseguenza i primer hanno maggiore motilità rispetto al filamento di DNA templato ed hanno, quindi, più probabilità di attaccarsi nei siti corretti. La sintesi di DNA inizia grazie all'estensione del primer in direzione 3' ad opera dell'enzima *Taq* Polimerasi.

I primer devono avere una lunghezza compresa tra 13 e 30 bp. Un primer troppo corto, infatti, tenderebbe a legarsi in moltissimi siti del DNA templato, dando un amplificato aspecifico, mentre un primer molto lungo, che permetterebbe di usare una temperatura di appaiamento maggiore, quindi maggiore specificità di reazione, rischia di essere troppo specifico e di non permettere l'amplificazione di un numero di frammenti sufficiente. Di conseguenza, solitamente, vengono usati primer di 18-24 bp.

Teoricamente, i primer possono avere qualsiasi sequenza, anche se il primer ideale ha una sequenza con circa lo stesso numero di basi di ciascun nucleotide e non presenta ripetizioni né similarità interne per evitare la formazione di primer dimer. Primer ricchi di guanine (G) e citosine (C) possono resistere a temperature di appaiamento maggiori, ma sono anche soggetti a un maggior tasso di auto-appaiamento (Hillis *et al.*, 1996). La formazione di dimeri avviene quando un primer viene esteso usando l'altro primer come templato ed è, quindi, dipendente dalla sequenza e dalla concentrazione del primer, dalla concentrazione della *Taq* Polimerasi e dal numero di cicli utilizzati durante la PCR. La quantità di primer-dimer formati è inversamente proporzionale alla quantità di

amplificato prodotto, perché vengono sottratti alla reazione e, inoltre, utilizzano parte della *Taq* Polimerasi (Arnhein & Erlich, 1992).

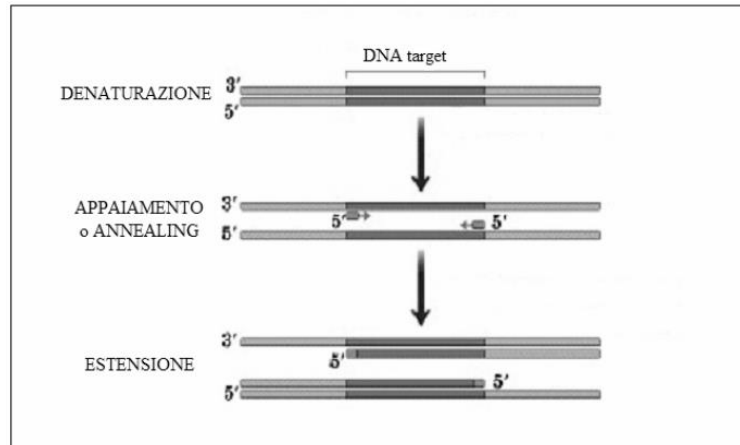
Il ciclo della PCR comprende tre fasi principali: denaturazione, appaiamento (o *annealing*) ed estensione (Fig. 1.3) (Hillis *et al.*, 1996). Queste fasi sono ripetute più volte per ottenere una quantità di amplificato tale da poter essere usata per le indagini genetiche (Arnhein & Erlich, 1992).

Durante la fase di denaturazione, il calore inibisce le attività enzimatiche e permette che i due filamenti che compongono la doppia elica di DNA si separino. È necessario che i due filamenti del DNA templatato siano separati per consentire ai primer di appaiarsi al singolo filamento. In questa fase, una temperatura troppo bassa causerebbe un'incompleta denaturazione del doppio filamento, mentre una temperatura eccessivamente alta rischierebbe di ridurre l'attività della *Taq* Polimerasi. La denaturazione avviene, quindi, ad una temperatura solitamente compresa tra 92 e 94°C.

Nella successiva fase di appaiamento, la temperatura viene abbassata lentamente per permettere al primer di legarsi al filamento di DNA templatato. In questo stadio, diversi fattori possono influire negativamente sul corretto appaiamento del primer al filamento, come la concentrazione del primer stesso, la disponibilità di siti di attacco sul filamento e la presenza di porzioni di DNA che inducano errori di appaiamento. Anche un'eccessiva degradazione del DNA templatato può influire negativamente sulla riuscita dell'amplificazione, perché in questa fase piccoli frammenti del templatato possono appaiarsi tra di loro. Il DNA genomico, inoltre, ha spesso porzioni microsatellitari, che tendono a riappaiarsi molto velocemente, e porzioni complementari, che generano la formazione delle "forcine" in cui il DNA compreso nella porzione che forma l'anello risulta indisponibile all'amplificazione poiché il primer non riesce a legarsi a quel tratto di DNA. La temperatura di appaiamento ( $T_{ann}$ ) è un'altra condizione critica per una corretta amplificazione perché, se troppo alta, non permette al primer di legarsi, mentre se troppo bassa, genera un'amplificazione aspecifica che non fornisce informazioni utili. Solitamente, si usa una temperatura di appaiamento che sia il più possibile vicina alla temperatura di denaturazione ( $T_m$ ) del primer e che si aggira intorno ai 50-56°C.

L'ultima fase del ciclo, la fase di estensione, prevede una temperatura di circa 72°C, che è la temperatura alla quale la *Taq* Polimerasi lavora con la massima efficienza. Anche se la maggior parte dei primer ha una temperatura di denaturazione nettamente

inferiore a 72°C, l'estensione è resa possibile dal fatto che la temperatura aumenta lentamente e questo permette ad alcune basi di legarsi al primer aumentandone la stabilità (Hillis *et al.*, 1996).



**Fig. 1.3.** Il ciclo della PCR comprende tre fasi principali: denaturazione, appaiamento (o *annealing*) ed estensione.

La  $T_m$  (temperatura di *melting* o di denaturazione del primer) è la temperatura a cui la metà dei potenziali siti di legame del DNA template è appaiata con il primer. La  $T_m$  dipende direttamente dal numero di basi che compongono il primer, e precisamente:

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

dove  $T_m$  = Temperatura di melting,  $G$  = numero di guanine,  $C$  = numero di citosine,  $A$  = numero di adenine e  $T$  = numero di timine. Un primer lungo o ricco di citosine (C) e guanine (G) ha una  $T_m$  alta perché ha molti tripli legami idrogeno.

Se la temperatura di appaiamento è maggiore della temperatura di denaturazione, solo pochi primer riescono a legarsi al DNA, mentre se la temperatura di appaiamento è minore della temperatura di melting, i primer si legano facilmente ai siti di attacco ma si legano anche a sequenze non perfettamente complementari (Hillis *et al.*, 1996).

Oltre alla temperatura a cui vengono condotte le diverse fasi della PCR, per la riuscita della reazione di amplificazione sono importanti anche la durata di ogni singola fase ed il numero di volte che i cicli vengono ripetuti. Ad esempio, un ciclo di denaturazione troppo corto causerebbe un'incompleta separazione del doppio filamento, mentre un tempo di appaiamento troppo lungo permetterebbe al primer di legarsi anche a sequenze non perfettamente complementari compromettendo la specificità dell'amplificazione. Anche la durata della fase di estensione è importante perché, in



condizioni ideali, la *Taq* Polimerasi sintetizza molto velocemente, circa 1000 bp in un minuto: questo permette di utilizzare un tempo di estensione breve (Hillis *et al.*, 1996) che non compromette il funzionamento della *Taq* Polimerasi che, a lungo andare, viene lentamente degradata dal calore (Arnheim & Erlich, 1992).

Per effettuare una reazione di PCR sono necessari, oltre al DNA templato, alla *Taq* Polimerasi ed ai primer, dNTPs (deossinucleotidi trifosfato) in eccesso, una soluzione tampone appropriata ed un cofattore, solitamente  $MgCl_2$  (cloruro di magnesio). Il cloruro di magnesio, insensibile al calore, agisce come cofattore della *Taq* Polimerasi e del primer, ma interagisce anche con il gruppo fosfato dei dNTPs, legandosi ad essi e diventando meno disponibile; per questo motivo deve essere presente in quantità superiore a quella dei dNTPs. Nella PCR possono essere aggiunti anche alcuni additivi, al fine di stabilizzare la *Taq* Polimerasi, come il BSA (*Bovin Serum Albumin*) o, se vogliamo maggiore precisione durante la fase di appaiamento, alcuni detergenti. In generale, una discreta quantità di questi additivi può facilitare alcune reazioni ma, allo stesso tempo, aumentare la probabilità di errori, ed un eccesso di queste sostanze può addirittura far fallire la reazione. Solo i primer ed i dNTPs sono consumati durante la reazione di PCR e, per questo motivo, devono essere aggiunti in forte eccesso (Hillis *et al.*, 1996).

Nell'ambito di una PCR, di solito, viene inserito un controllo negativo, cioè una reazione che contiene tutti i reagenti necessari eccetto il DNA templato, utile a verificare la presenza di eventuale contaminazione di uno o più reagenti. Si inserisce anche un controllo positivo, cioè una reazione di PCR fatta con il DNA di un organismo che ha dato buoni risultati in una reazione di PCR precedente, che consente di verificare la buona riuscita della PCR; infatti, se il controllo positivo è amplificato, la reazione di polimerizzazione ha avuto successo e, di conseguenza, l'eventuale fallimento delle amplificazioni degli altri organismi nell'ambito della stessa PCR è da imputarsi al DNA degli organismi stessi (Hillis *et al.*, 1996).

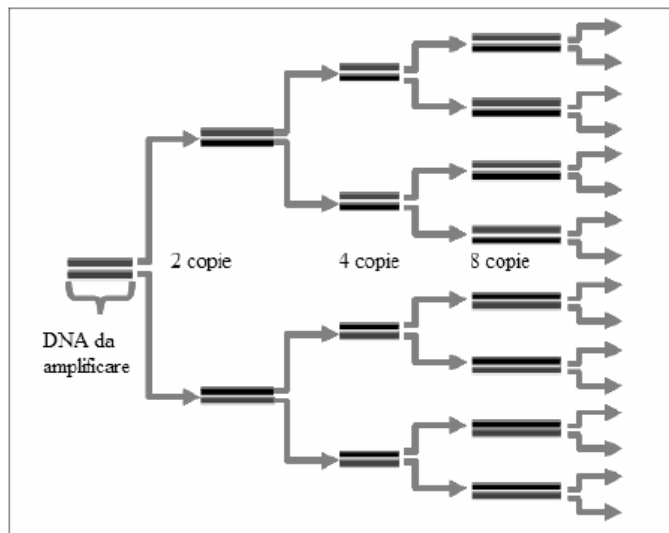
L'utilizzo della *Polymerase Chain Reaction* presenta numerosi vantaggi, quali la rapidità e la facilità di esecuzione, la specificità, l'alta sensibilità, la velocità e la robustezza, che permettono di avere una buona amplificazione anche con poco templato o con DNA di bassa qualità e possibilità di amplificare DNA senza necessariamente conoscere la sequenza del templato (Arnheim & Erlich, 1992; Hillis *et al.*, 1996). Tra gli svantaggi, però, troviamo la mancanza di attività di correzione 3'-5' esonucleasica

da parte della *Taq* Polimerasi. Inoltre, la PCR è soggetta, ed estremamente sensibile, alla contaminazione esterna proprio per le sue caratteristiche di sensibilità e robustezza (Hillis *et al.*, 1996).

Una reazione di PCR permette di ottenere un numero molto elevato di copie del DNA template (Hillis *et al.*, 1996). Ad esempio, conducendo una reazione di amplificazione di soli due cicli con un primer di circa 20 bp, contenente almeno 10 bp di C e G, denaturazione a 92-96°C per 30-60", appaiamento a 55-60°C per 30" ed estensione a 72°C per 1', si possono amplificare un numero elevatissimo di frammenti target di 500 bp (Arnhein & Erlich, 1992). La reazione, infatti, segue un andamento esponenziale, con una resa teorica pari a:

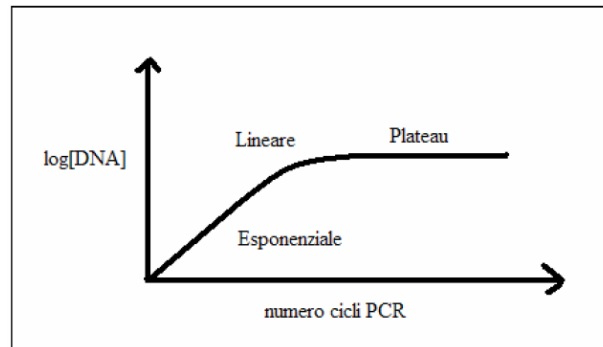
$$P = 2^n$$

dove  $P$  = quantità di amplificato prodotto ed  $n$  = numero di cicli di amplificazione (Hillis *et al.*, 1996), perché il prodotto di ogni amplificazione funge da template per l'amplificazione successiva e ad ogni ciclo la quantità di DNA disponibile per essere duplicato aumenta (Arnhein & Erlich, 1992) (Fig. 1.4).



**Fig. 1.4.** Resa teorica della PCR: la PCR procede, teoricamente, in maniera esponenziale perché il prodotto di ogni amplificazione funge da template per l'amplificazione successiva.

La reazione di amplificazione, d'altronde, non può procedere per un numero di cicli indefinito, in quanto il processo è limitato dalla quantità di primer e dNTPs disponibili, che vengono consumati durante la reazione dalla *Taq* Polimerasi e da fenomeni di riappaiamento dei filamenti in conseguenza dei quali quel particolare frammento non è più disponibile per la replicazione (Fig. 1.5) (Hillis *et al.*, 1996).



**Fig. 1.5.** La reazione di amplificazione non può procedere per un numero di cicli indefinito perché è limitata dalla quantità di primer e di dNTPs disponibili, consumati durante la reazione dalla *Taq* Polimerasi e da fenomeni di riappaiamento dei filamenti, che escludono il frammento dalla replicazione.

### 1.4.3 MULTIPLEX PCR

La *Multiplex Polymerase Chain Reaction* (Multiplex PCR) è una variante della PCR in cui due o più sequenze target del DNA possono essere amplificate contemporaneamente utilizzando nella stessa reazione più di una coppia di primer. Il vantaggio più evidente ed importante derivante dall'utilizzo della Multiplex PCR è dato dal notevole risparmio in termini di tempo e costi in laboratorio. Già dalla sua prima descrizione alla fine degli anni ottanta (Chamberlain *et al.*, 1988), questo metodo è stato applicato con successo in molti campi di studio del DNA, tra cui l'analisi delle delezioni geniche (Chamberlain *et al.*, 1988), l'analisi di mutazioni e polimorfismi (Rithidech *et al.*, 1997; Shuber *et al.*, 1993) e l'analisi quantitativa (Zimmermann *et al.*, 1996).

L'ottimizzazione di una Multiplex PCR può comportare alcune problematiche, come ad esempio bassa sensibilità e specificità di reazione e/o un'amplificazione preferenziale di determinati target specifici. La copresenza di più coppie di primer nella medesima reazione aumenta la probabilità di ottenere prodotti di amplificazione spuri, in larga parte dovuti alla formazione di primer dimer, per questo motivo la concentrazione dei primer risulta essere uno dei fattori più importanti da ottimizzare. Generalmente, i primer devono avere una concentrazione  $10^7$  volte maggiore del DNA template, anche se in molti casi, la concentrazione di ogni singolo primer, indipendentemente dalla concentrazione del template, non può essere elevata al di sopra di  $0.5 \mu\text{M}$ , per evitare la formazione di primer dimer (Markoulatos *et al.*, 2002).

L'obiettivo finale del processo di ottimizzazione della Multiplex PCR è, quindi, quello di minimizzare le interazioni non specifiche. Si può andare ad agire, ad esempio, sui parametri di progettazione dei primer (omologia dei primer con la loro sequenza target, lunghezza, contenuto di C e G e concentrazione) (Brownie *et al.*, 1997), oppure utilizzare il metodo *Hot Start PCR*, per ridurre la formazione di primer dimer dovuta ad un appaiamento dei primer a bassa temperatura (4-25°C), prima dell'inizio della reazione. Idealmente, tutte le coppie di primer in una Multiplex PCR dovrebbero consentire un'efficienza di amplificazione analoga per i rispettivi target e questo può essere ottenuto utilizzando primer con temperatura di appaiamento ottimale simile.

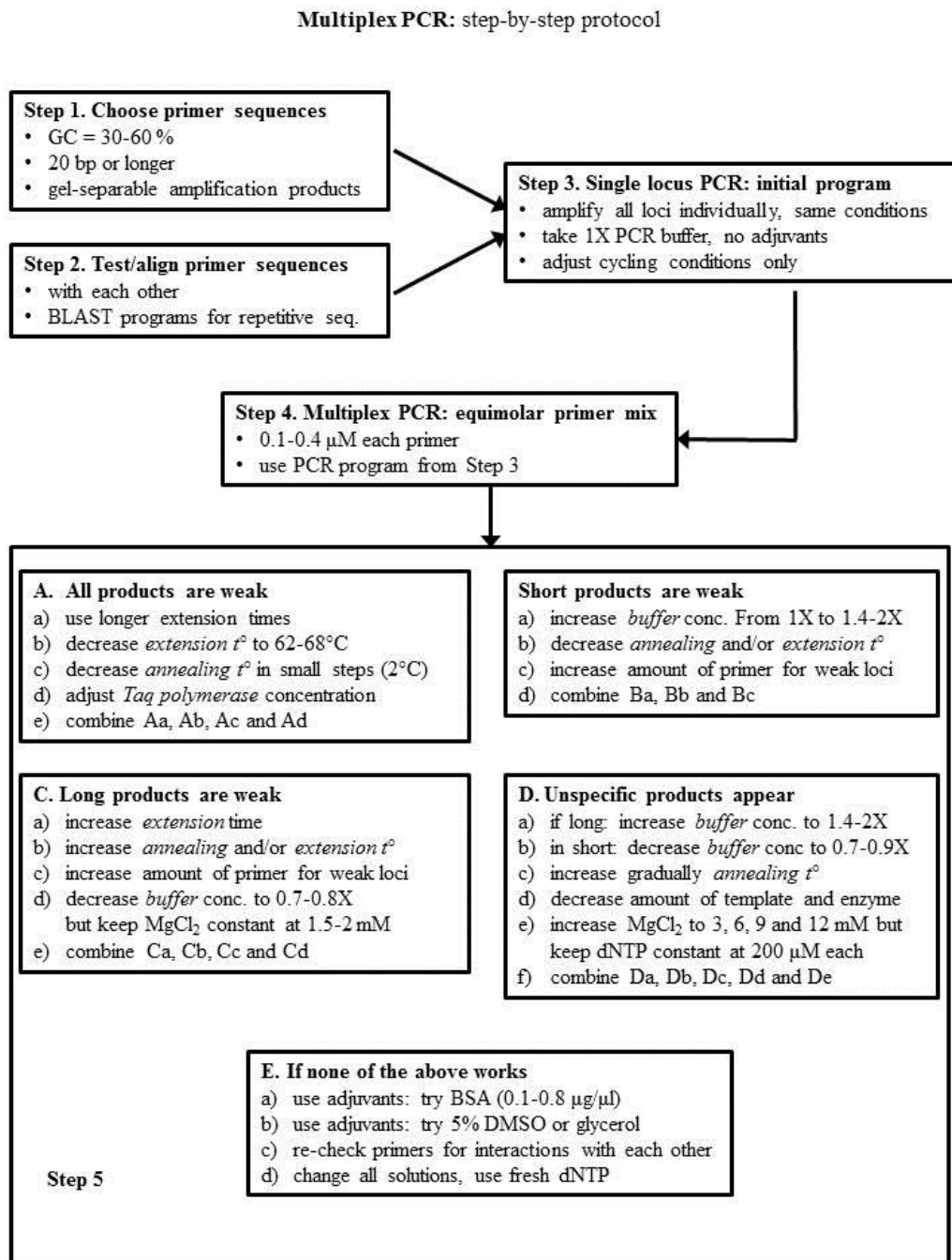
L'amplificazione preferenziale di una sequenza target rispetto ad un'altra è un fenomeno molto conosciuto nelle Multiplex PCR (Mutter & Boyton, 1995). Sono state identificate due classi principali di processi che inducono propensione per questo fenomeno: *PCR drift* e *PCR selection* (Wagner *et al.*, 1994). Si assume che vi sia *PCR drift* quando si ha fluttuazione nelle interazioni dei reagenti di PCR, in particolare nei cicli iniziali, dovuta ad una concentrazione molto bassa del template (Mutter & Boyton, 1995). Viene definita, invece, *PCR selection* il meccanismo che favorisce l'amplificazione di determinati template a causa *i*) di determinate proprietà del target, *ii*) delle sequenze fiancheggianti il target, o *iii*) dell'intero genoma. Queste proprietà includono il diverso contenuto di C e G nelle inter-regioni, che porta ad un'accessibilità preferenziale dei target all'interno dei genomi causata da strutture secondarie ed al numero di copie del gene all'interno del genoma.

Uno dei parametri più importanti nella reazione di PCR è la temperatura di *annealing* ( $T_A$ ). Amplificando i medesimi loci sia individualmente, sia mediante il loro co-inserimento in una Multiplex PCR, è stato visto che essi richiedono una  $T_{ann}$  di 56-60°C se amplificati singolarmente, mentre necessitano di una  $T_{ann}$  più bassa di 4-6°C se coamplificati in una Multiplex PCR (Markoulatos *et al.*, 2002).

Nella miscela di reazione, ciascun primer è solitamente presente ad una concentrazione di 0.4-0.5  $\mu$ M, anche se l'esatto quantitativo di primer viene stabilito empiricamente. Per un DNA con un numero basso di copie o molto complesso, la concentrazione ideale risulta essere 0.3-0.5  $\mu$ M, mentre per un DNA con un numero alto di copie o una bassa complessità, la concentrazione dovrebbe essere 0.04-0.4  $\mu$ M (Markoulatos *et al.*, 2002).

La concentrazione di  $MgCl_2$  è mantenuta costante (2 mM), mentre la concentrazione di dNTPs che fornisce i migliori risultati risulta essere tra 200 e 400  $\mu M$  per ciascun nucleotide. Valori più elevati portano ad una rapida inibizione dell'amplificazione, mentre valori più bassi (100  $\mu M$ /dNTP) danno una quantità di prodotto molto più bassa.

Basandosi sulle problematiche associate alla Multiplex PCR, Henegariu *et al.* (1997) hanno messo a punto un protocollo di ottimizzazione composto di vari step (Fig. 1.6), che contiene soluzioni pratiche a molti dei problemi incontrati.



**Fig. 1.6.** Protocollo step-by-step per l'ottimizzazione di multiplex PCR.

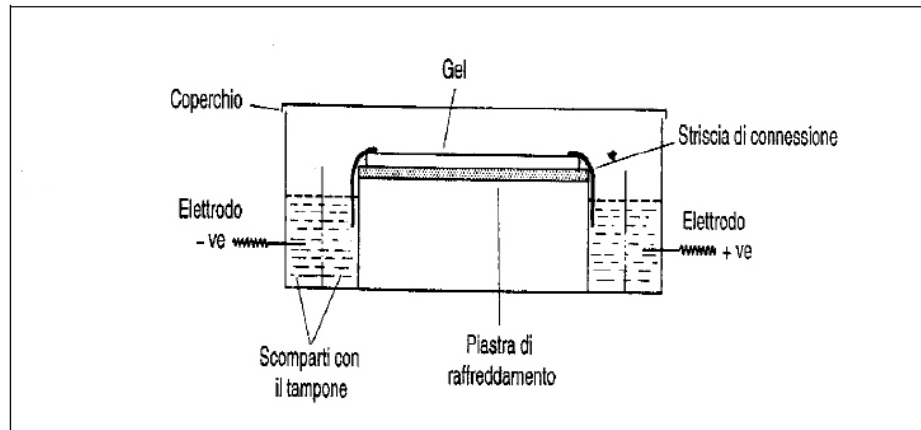
#### 1.4.4 ELETTROFORESI

L'elettroforesi è la tecnica che viene utilizzata più comunemente per separare macromolecole elettricamente cariche, quali ad esempio proteine ed acidi nucleici. L'elettroforesi sfrutta il principio secondo il quale molecole cariche, sottoposte ad un campo elettrico, tendono a migrare verso l'anodo o verso il catodo a seconda che esse abbiano rispettivamente carica positiva o negativa.

L'apparecchiatura usata per l'elettroforesi è costituita da una cella elettroforetica e da un alimentatore di corrente, che fornisce la differenza di potenziale (*d.d.p.*) necessaria alla formazione di un flusso di corrente continua che attraversa la cella stessa. Un incremento della *d.d.p.* accelera la corsa elettroforetica ma, contemporaneamente, genera un aumento di calore con conseguente diminuzione della definizione del bandeggio nel profilo elettroforetico, provocata da un aumento della velocità di diffusione dei campioni e degli ioni del tampone, e possibile denaturazione dei campioni. La *d.d.p.* applicata causa piccoli gradienti di temperatura, e quindi la formazione di correnti convettive, portando, talvolta, al mescolamento dei campioni separati. È perciò necessario tenere conto di questi fattori per definire il voltaggio da applicare alla corsa elettroforetica.

L'elettroforesi zonale è la tecnica maggiormente utilizzata, ed è condotta su supporto solido poroso, solitamente un gel, contenente un intercalante del DNA che lo rende visibile al transilluminatore; il gel viene immerso in una soluzione elettrolitica e sottoposto ad un campo elettrico. La direzione di migrazione dipende, come detto in precedenza, dalla carica della molecola, mentre la distanza percorsa dipende dalla densità del gel e dalla dimensione delle molecole stesse: più il gel è denso, più le molecole vengono separate finemente e, più le molecole sono piccole, maggiore è la loro migrazione. Uno dei vantaggi di questa tecnica è rappresentato dalla riduzione delle correnti convettive dovuta alla presenza di una matrice gelatinosa. Il gel di agarosio è efficace nella separazione di molecole di DNA con dimensioni maggiori di 100 bp. L'agarosio è un polisaccaride lineare ed è uno dei costituenti dell'agar, una miscela di polisaccaridi isolata da alcune specie di *Rhodophyta*.

L'elettroforesi viene effettuata, solitamente, su gel orizzontale (Fig. 1.7). Il gel è versato allo stato liquido direttamente nella vaschetta posta all'interno della cella elettroforetica, contenente la soluzione tampone, dove avverrà la corsa in orizzontale.



**Fig. 1.7.** Cella elettroforetica per elettroforesi su gel orizzontale.

Per visualizzare l'esito della corsa, può essere usata la tecnica dell'autoradiografia, che impiega marcatori radioattivi che impressionano una lastra fotografica, oppure al gel può essere aggiunto un intercalante del DNA, come ad esempio il Bromuro di Etidio o la molecola "SYBR Green", che, stimolato da luce ultravioletta, emette fluorescenza e permette di visualizzare il profilo elettroforetico nel gel.

I problemi che si possono incontrare in una corsa elettroforetica sono principalmente legati all'innalzamento della temperatura, dovuto al passaggio della corrente, ed al fenomeno dell'elettroendosmosi. Una temperatura troppo alta determina, infatti, la formazione di un pattern di bandeggio meno definito, una possibile denaturazione dei campioni in esame ed infine può creare delle correnti convettive. L'elettroendosmosi è un fenomeno legato alla presenza di gruppi carichi sulla superficie del mezzo di supporto (per l'agarosio si tratta di gruppi fosfato) che tendono a migrare verso uno dei due poli, trascinando la soluzione e determinando la formazione di un flusso elettroosmotico che può interferire con la separazione elettroforetica.

### 1.4.5 ANALISI DEI FRAMMENTI

L'analisi dei frammenti è un termine generico utilizzato per descrivere esperimenti di analisi con marcatori genetici che si basano sulla rilevazione delle variazioni di lunghezza di una specifica sequenza di DNA. L'analisi mediante marcatore è una tecnica genetica comune in cui la sequenza di un gene non è analizzata direttamente, ma la presenza di un particolare allele, o della versione mutante dell'allele del gene, è deducibile dalla presenza/assenza di una sequenza di DNA associata. Come già detto in

precedenza, un marcatore molecolare è una sequenza genetica polimorfica contenuta all'interno, o nei pressi, di un allele d'interesse, come ad esempio microsatelliti o RFLP.

L'analisi dei frammenti presenta dei vantaggi, rispetto all'analisi diretta della sequenza del gene, in quanto richiede la conoscenza della posizione del gene in esame, ma non necessariamente la sua sequenza. Si tratta, inoltre, di un'analisi molto più veloce ed economica e questo assume un'importanza notevole negli studi di filogeografia e genetica di popolazione, dove il numero di individui da analizzare è spesso molto elevato.

La determinazione dell'esatta lunghezza dei frammenti amplificati nelle reazioni di PCR è effettuata mediante elettroforesi capillare. L'elettroforesi capillare (CE), conosciuta anche come Elettroforesi Capillare ad Alta Performance (HPCE), è un processo che trae origine nei primi anni Ottanta, quando alcuni centri di ricerca negli USA e in Europa puntarono all'ottimizzazione della tecnica elettroforetica tradizionale su gel, attraverso l'applicazione di tecnologie strumentali evolute. È a partire dai primi anni Novanta, tuttavia, che la CE ha iniziato ad essere introdotta in alcuni settori applicativi della chimica analitica e da allora ha interessato una moltitudine di ricercatori afferenti ad aree diverse, dalla chimica alla biochimica, dalla farmacologia alle biotecnologie, alla genetica.

Nata con l'intenzione di ottimizzare la separazione di proteine, sin dalle sue prime applicazioni, la CE è stata impiegata per l'analisi di farmaci, assumendo importanza gradualmente crescente nell'ambito della ricerca farmaceutica, soprattutto nel campo dei farmaci biotecnologici.

Ad oggi, è lo standard analitico nel sequenziamento degli acidi nucleici ma, in realtà, grazie alla sua versatilità, può essere applicata ad un ampio spettro di sostanze, da ioni inorganici a biopolimeri di notevoli dimensioni quali proteine, DNA e persino particelle virali. Inoltre, è possibile eseguire separazioni basate su meccanismi chimico-fisici differenti (ad esempio il meccanismo elettroforetico e il cromatografico) servendosi dello stesso hardware strumentale. La CE, oltre alla grande versatilità di applicazioni, è caratterizzata da un'elevata efficienza separativa (oltre un milione di piatti teorici), un'alta sensibilità in termini di massa e, con specifiche procedure, anche di concentrazione; richiede quantità di campione da caricare estremamente basse (nL), presenta tempi di analisi piuttosto brevi (in genere meno di 30') ed un consumo minimo



di solventi e di altro materiale di consumo (come i capillari), oltre all'opportunità di accoppiamento con diversi sistemi di rivelazione, compresa la spettrometria di massa.

Nell'elettroforesi capillare, così come nel processo elettroforetico classico, i frammenti ionici vengono separati sulla base delle loro dimensioni, grazie all'instaurarsi di una *d.d.p.*. Questa *d.d.p.* è applicata tra le due estremità di un capillare del diametro di poche decine di micrometri riempito di soluzione elettrolitica.

La velocità di migrazione elettroforetica è direttamente proporzionale alla carica elettrica dello ione e al gradiente di potenziale, ma inversamente proporzionale al raggio  $r$  della molecola.

Un elettroferografo capillare è composto da un sistema di iniezione, da un capillare di silice di lunghezza e diametro variabili, da una sorgente di potenziale elettrico e da un "rivelatore". La separazione avviene all'interno del capillare successivamente alla fase di iniezione. I capillari maggiormente impiegati nella pratica moderna sono in silice fusa, rivestiti esternamente da un polimero opaco in grado di conferire resistenza e flessibilità al capillare, eccetto che in corrispondenza della finestra di rilevazione al fine di permettere una corretta rilevazione degli analiti. Per quanto riguarda le caratteristiche interne dei capillari, questi si possono suddividere in "non rivestiti", cioè che espongono la superficie interna di silice al buffer e ai soluti, e "rivestiti", che presentano internamente un sottile strato di polimeri (adsorbiti o legati chimicamente), che proteggono la silice dalle interazioni con i soluti, cambiandone le caratteristiche superficiali. I capillari possono, inoltre, essere riempiti con gel, in modo da simulare l'elettroforesi su gel, o con particelle contenenti una fase stazionaria, riproducendo così un sistema cromatografico.

Le tecniche d'iniezione prevalentemente utilizzate in una CE sono due: l'iniezione idrodinamica e quella elettrocinetica. La prima è condotta applicando una pressione positiva all'estremità di iniezione del capillare, o in alternativa una pressione negativa all'estremità opposta, mentre l'iniezione elettrocinetica si esegue applicando una differenza di potenziale tra la fiala contenente il campione e quella all'estremità opposta del capillare, realizzando così una specie di mini-elettroforesi. La principale differenza tra queste due modalità di iniezione consiste, essenzialmente, nel fatto che nell'iniezione idrodinamica, che è guidata dalla pressione, ciò che viene iniettato è rappresentativo della composizione del campione, mentre nell'iniezione elettrocinetica,

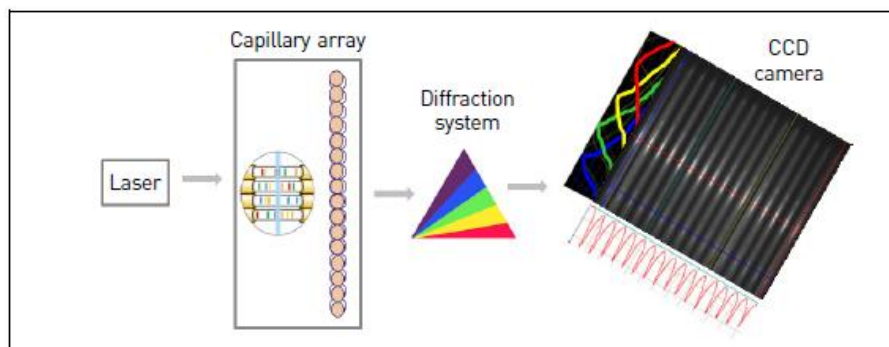
che è guidata dal potenziale, le sostanze presenti nel campione entrano nel capillare in base alla loro mobilità elettroforetica.

L'elettroforesi capillare è stata accoppiata, con successo, a diverse modalità di rivelazione, tra le quali la più comunemente impiegata risulta essere la rivelazione UV. Essa sfrutta la capacità dei vari composti di assorbire la radiazione luminosa e, proprio per questo motivo, si ha l'assenza del rivestimento opaco in corrispondenza della finestra di rivelazione. Nel caso di analiti trasparenti alla radiazione luminosa, è possibile eseguire una rivelazione di tipo indiretto mediante l'aggiunta di un cromoforo al tampone di corsa. Risultano rilevabili, così, molti piccoli ioni inorganici.

Per poter determinare, mediante elettroforesi capillare, la lunghezza esatta dei frammenti amplificati in seguito ad una reazione di PCR, quest'ultima deve essere eseguita attraverso l'uso di primer marcati con fluorescenza. Generalmente, nelle analisi di loci microsatellitari, si preferisce marcare il primer *forward* alla sua estremità 5'. Rispetto all'analisi di una sequenza di DNA, l'analisi dei frammenti ha il compito di analizzare un numero inferiore di frammenti di DNA, quindi può essere utilizzato un capillare più corto, e di conseguenza è necessario meno tempo per l'analisi. Per rilevare l'esatta lunghezza dei frammenti durante una corsa elettroforetica capillare, è necessario far correre, contemporaneamente al campione, uno standard di riferimento (o *Size Standard Ladder*) marcato con un fluorocromo differente rispetto a quelli utilizzati per marcare i loci nella reazione di PCR.

Riassumendo, durante una corsa elettroforetica capillare i prodotti amplificati nella reazione di PCR (ed anche altre molecole cariche negativamente, come i sali, i primer e i dNTP residui della PCR) sono spinti all'interno del capillare in seguito ad un'iniezione elettrocinetica e la carica ad alto voltaggio applicata ai campioni induce i frammenti carichi negativamente a muoversi all'interno del capillare, dove vengono separati per dimensione in base alla loro carica totale. Poco prima di raggiungere l'elettrodo positivo, i frammenti di DNA, marcati con fluorocromi e separati per dimensione, attraversano la traiettoria di un raggio laser, che provoca l'emissione di un segnale ad una lunghezza d'onda diversa in base al fluorocromo eccitato. I segnali sono separati da un sistema di diffrazione ed una camera DAC (*Dispositivo ad Accoppiamento di Carica*) rileva la fluorescenza (Fig. 1.8). Poiché differenti fluorocromi emettono il segnale a diverse lunghezze d'onda, è possibile rilevare e distinguere più fluorocromi, e di conseguenza più loci marcati con un fluorocromo ciascuno, nella medesima corsa

elettroforetica capillare. Il segnale sotto forma di fluorescenza è convertito in un dato digitale che viene salvato in un file con estensione compatibile con un software di analisi.



**Fig. 1.8.** Poco prima di raggiungere l'elettrodo positivo, i frammenti di DNA marcati con fluorocromi, carichi negativamente e separati per dimensione in base alla loro carica totale, attraversano la traiettoria di un raggio laser, che provoca l'emissione di un segnale ad una lunghezza d'onda diversa in base al fluorocromo eccitato. I segnali sono separati da un sistema di diffrazione ed una camera DAC rileva la fluorescenza.

**CAPITOLO 2**  
***CHTHAMALUS MONTAGUI***

## 2.1 INQUADRAMENTO SISTEMATICO E MORFOLOGIA DEI CROSTACEI CIRRIPIEDI

I cirripedi, inizialmente classificati come molluschi per la presenza della conchiglia, furono riconosciuti come appartenenti all'ordine Crustacea solo nel 1830, quando, in seguito all'identificazione degli stadi larvali, la loro forma aberrante rispetto agli altri membri del subphylum è stata attribuita ad un adattamento alla vita sessile piuttosto che all'appartenenza ad un'altra divisione.

I cirripedi sono ascrivibili al phylum Arthropoda per caratteristiche quali la respirazione acquatica, la presenza di antenne sul secondo e terzo segmento e di mandibole sul quarto, nonché di uno stadio larvale naupliare (Stubbings, 1975).

La classificazione dei cirripedi fu stabilita da Darwin (1851; 1854) ed è stata poi revisionata da Pilsbry (1916) e, per i balanoforni, da Newman & Ross (1976).

La classificazione corrente dei cirripedi è, dunque, così organizzata:

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Classe Cirripedia

Ordini    Ascothoracica

          Acrothoracica

          Thoracica

          Rhizocephala

I cirripedi sono un gruppo di crostacei esclusivamente marini con dimensioni solitamente comprese tra 5 e 50 mm. Il nome della classe è dovuto alla presenza dei caratteristici cirri, appendici bifide multiarticolate. I sei cirri sono costituiti da un peduncolo basale che porta, generalmente, due rami allungati e multiarticolati con fini setole ed esplicano, con il loro movimento, un ruolo importante nell'alimentazione, nella cattura del cibo e nella respirazione (Relini, 1980; Riedl, 2005).

Il corpo dei cirripedi, allo stadio adulto, può avere diversi aspetti a seconda che gli animali siano sessili, peduncolati o meno, oppure parassiti di altri organismi (Relini, 1980). I cirripedi peduncolati hanno il corpo diversificato in un lungo peduncolo, usato per l'ancoraggio al substrato, ed in un capitolo rappresentato dal resto del corpo (Barnes, 1972). Le forme prive di peduncolo sono caratterizzate dalla presenza di una muraglia formata da placche calcaree e dotata di un'apertura apicale (Riedl, 2005). Il corpo dei cirripedi parassiti ha, invece, una struttura sacciforme priva di appendici che si allontana molto dalla forma tipica di quelli a vita libera (Riedl, 2005).

Il ciclo vitale dei cirripedi si articola in più fasi larvali planctoniche ed in uno stadio adulto sessile o parassita di decapodi (Relini, 1980; Riedl, 2005). Lo stadio adulto viene raggiunto, attraverso una serie di metamorfosi, a partire da diversi stadi naupliari e da uno stadio cipridiforme. La larva nauplius è caratterizzata da due processi spiniformi frontolaterali ed uno caudale, mentre la larva cypris è provvista di un carapace bivalve simile a quello degli ostracodi. Una volta raggiunto lo stadio cipridiforme, l'animale si fissa al substrato (o all'ospite) mediante particolari ghiandole secernenti, le ghiandole del cemento, localizzate nella porzione preorale della regione cefalica. A questo punto l'animale subisce una serie di metamorfosi che lo portano ad assumere le caratteristiche finali (Relini, 1980). Il carapace larvale, che racchiude tutto il corpo, persiste nella forma adulta formando il mantello (Barnes, 1972).


I cirripedi sono organismi dominanti degli ambienti della zona eulitorale con moderata o elevata esposizione al moto ondoso (Stephenson & Stephenson, 1972). Sebbene la gran parte delle specie viva sommersa, vi sono specie colonizzatrici della zona intertidale che possono tollerare una temporanea esposizione all'aria durante la bassa marea, o che possono vivere nella zona degli spruzzi su spiagge battute dalle onde (Relini, 1980).

## **2.2 CHTHAMALUS MONTAGUI: SISTEMATICA, MORFOLOGIA, ECOLOGIA E GENETICA**

*Chthamalus montagui*, inizialmente considerato variante di *Chthamalus stellatus* (Poli, 1791), è stato in seguito identificato come specie valida da Southward (1976). La separazione tassonomica tra le due specie è stata confermata, inoltre, da studi genetici mediante marcatori alloenzimatici (Dando *et al.*, 1979), che hanno mostrato una

differente mobilità elettroforetica per otto enzimi, quattro dei quali hanno condotto a differenziare le due specie. Recentemente, Perez-Losada *et al.* (2008) hanno combinato i dati delle sequenze di tre geni nucleari con alcuni caratteri morfologici di specie differenti, rappresentanti la quasi totalità delle famiglie appartenenti all'ordine Thoracica, al fine di valutare tempi e modalità di evoluzione dei cirripedi ed hanno confermato che *Chthamalus stellatus* e *Chthamalus montagui* sono due specie distinte, sebbene filogeneticamente vicine tra loro.

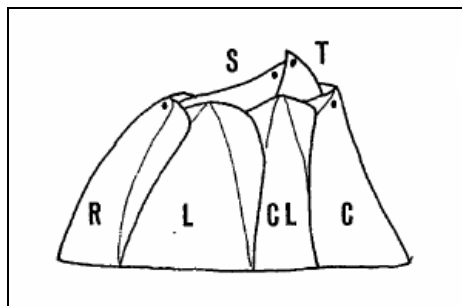
La classificazione attualmente accettata di *C. montagui* lo vede appartenente all'ordine Thoracica, sottordine Balanomorpha (Fig. 2.1).

<b>Phylum</b>	Arthropoda	
<b>Subphylum</b>	Crustacea	
<b>Classe</b>	Maxillopoda	
<b>Sottoclasse</b>	Cirripedia	
<b>Ordine</b>	Thoracica	
<b>Sottordine</b>	Balanomorpha	
<b>Famiglia</b>	Chthamalidae	
<b>Specie</b>	<i>Chthamalus montagui</i> Southward, 1976	

**Fig. 2.1** Classificazione corrente ed immagine di *Chthamalus montagui* (foto Southward AJ, <http://www.marlin.ac.uk/speciesfullreview.php?speciesID=2981>).

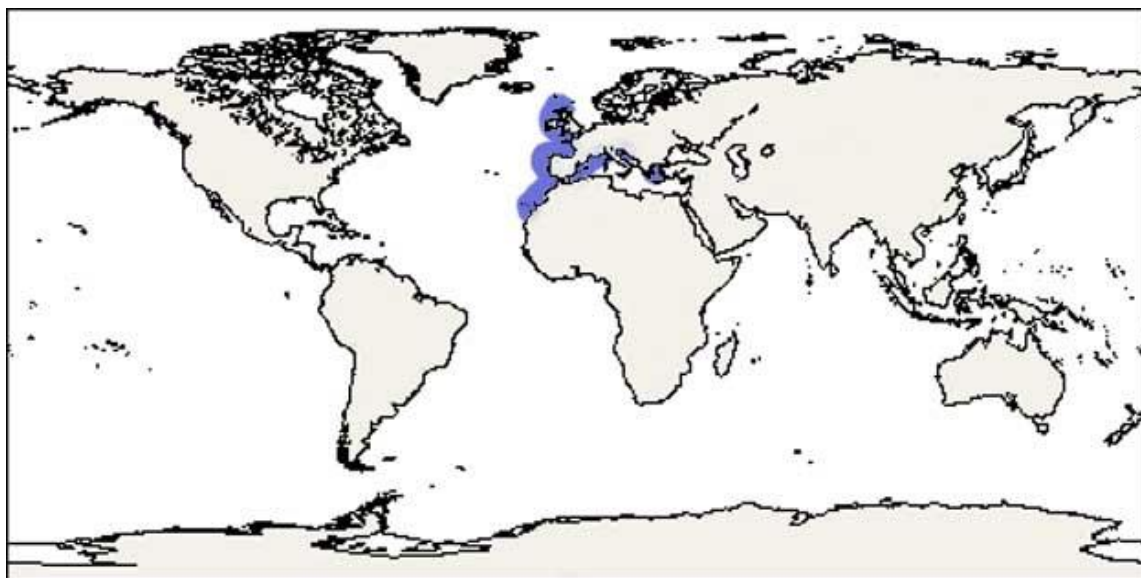
Nella sua forma adulta, *C. montagui* è protetto esternamente da un involucro rigido costituito da tre parti principali: la base, la muraglia e l'apparato opercolare. La base, parte inferiore del guscio che permette l'adesione al substrato, è membranosa ed è collegata alla muraglia per mezzo di un'articolazione. La muraglia è conica, di colore marrone o grigio, composta di sei piastre calcaree lievemente zigurate, ma, negli individui che vivono a stretto contatto nei livelli più alti di marea, può assumere una forma allungata o colonnare. La superficie è quasi sempre intaccata, spesso punteggiata, ed i punti di sutura sono spesso nascosti o ridotti. L'apparato opercolare, che chiude superiormente il guscio, è costituito da quattro placche mobili (scutum, tergum, rostro e carena); l'apertura opercolare è quasi sempre a forma di aquilone o subquadrangolare e l'articolazione tra terga e scuta attraversa la linea centrale a meno di un terzo della distanza dal rostro e risulta concava verso la piastra rostrale (Fig. 2.2). Lo scutum è più lungo che largo e all'apice forma, di solito, un angolo minore di 90°, mentre il tergum è corto e largo. Il tessuto all'interno dell'apertura opercolare è di colore blu con macchie marroni e nere (Southward, 1976). Il diametro massimo della conchiglia di un individuo

adulto è circa 14 mm, in relazione all'habitat, alla disponibilità di cibo ed all'altezza rispetto al livello del mare (Riley, 2002).



**Fig. 2.2.** Schema delle piastre della conchiglia di uno ctamalo: scutum (S), tergum (T), carena (C), rostro (R), placche laterali (L) e placche careno-laterali (CL) (Relini, 1980).

*Chthamalus montagui* è abbondantemente presente sulle coste rocciose della costa atlantica della Bretagna, in Irlanda, in Francia, in Spagna, nel Nord Africa, lungo le coste del Mediterraneo occidentale ed orientale e nel Mar Nero, mentre risulta raro o assente nelle isole *offshore* (Crisp *et al.*, 1981). I limiti settentrionale e meridionale della distribuzione di *C. montagui* sono rispettivamente nel Nord della Scozia a sud di Aberdeen (Riley, 2002) e nel Nord Africa in Mauritania (Crisp *et al.*, 1981) (Fig. 2.3).



**Fig. 2.3.** Distribuzione geografica conosciuta di *Chthamalus montagui*.

Per quanto riguarda la distribuzione orizzontale e verticale sulla costa, i cirripedi sono i maggiori colonizzatori delle coste moderatamente esposte e, generalmente, la loro distribuzione è influenzata superiormente da fattori fisici e inferiormente da fattori biologici (Connell, 1961, 1978; Pannacciulli & Relini, 2000). Le brevi immersioni, ed i conseguenti problemi di essiccazione e scarso apporto di cibo, sono fattori limitanti



solamente nella parte superiore della distribuzione. La distribuzione verticale ed orizzontale di *C. montagui* è stata ampiamente studiata (Southward, 1976; Crisp *et al.*, 1981; Burrows *et al.*, 1992; Pannacciulli & Relini, 2000) e i risultati hanno mostrato una tendenza alla colonizzazione di siti riparati, estuari e baie, soprattutto nella parte più alta della zona occupata dai cirripedi (livello medio di alta marea primaverile e livello medio di alta marea di quadratura) (Pannacciulli & Relini, 2000).

I principali fattori che influenzano la distribuzione degli adulti sulla costa sembrano essere la dispersione larvale (che ha una durata di circa 23 giorni; Burrows *et al.*, 1992; Burrows, 1988, in Kendall & Bedford, 1987), lo sviluppo e l'insediamento. È stato dimostrato, infatti, come la selezione attiva del substrato da parte della larva cypris durante l'insediamento determini la distribuzione orizzontale e verticale degli adulti (Jenkins, 2005). Assumono grande importanza anche fattori quali mortalità post-insediamento (Delany *et al.*, 2003) e caratteri morfologici (Foster, 1971). Le piastre opercolari di *C. montagui*, ad esempio, gli conferiscono una migliore resistenza allo stress da essiccazione che permette la colonizzazione delle zone più alte. Gli individui adulti sono ermafroditi e, generalmente, si riproducono attraverso fecondazione incrociata; tuttavia, in casi di isolamento, essi sono capaci di autofecondazione (Barnes & Barnes, 1958; Barnes, 1989). Inoltre, è stato suggerito che i giovani di *C. montagui* necessitino di una certa esposizione all'aria per consolidare ed indurire le piastre calcaree (Burrows, 1988). Ciò è stato confermato, in seguito, in uno studio effettuato da Power *et al.* (2001), dal quale emerge che *C. montagui* evita le zone umide durante l'insediamento e/o presenta alti tassi di mortalità post-insediamento in queste aree.

Le caratteristiche larvali e di sviluppo degli individui non consentono alla specie di disperdersi mediante il fenomeno del biofouling.

La struttura genetica di *C. montagui* è stata indagata inizialmente da Dando *et al.* (1979), che, confrontando le popolazioni di *C. montagui* provenienti dall'Adriatico e dall'Inghilterra sud-orientale, hanno riscontrato una netta distinzione tra di esse. Successivamente, mediante uno studio condotto sul locus che codifica per la fosfoglucomutasi (*PGM*) è stato rilevato un brusco cambiamento delle frequenze alleliche in corrispondenza della costa sud-orientale della Spagna (Dando & Southward, 1981). La differenziazione tra le due popolazioni è stata spiegata dalla presenza di correnti costiere antagoniste che, allontanandosi dalle lunghe spiagge sabbiose, creano una discontinuità spaziale tra le due popolazioni dovuta all'assenza di un substrato

adatto. Sulla base delle differenze in frequenza allelica riscontrate nei loci *PGM* e *PGK* (fosfoglicerochinasi), le forme atlantica e mediterranea di *C. montagui* sono state identificate come specie sorelle (Dando & Southward, 1981; Pannacciulli *et al.*, 1997). Shemesh *et al.* (2009) hanno utilizzato la regione *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*), il fattore di allungamento 1 (*EF-1*) e la subunità I della Citocromo Ossidasi (*COI*) per testare questi risultati. Le sequenze *ITS* hanno mostrato che le popolazioni del Mar Nero e del Mediterraneo sono isolate da quella dell'Atlantico; le sequenze *COI* ed *EF-1* sono state più variabili e informative ed hanno indicato una divergenza genetica tra le popolazioni di *C. montagui* di Atlantico, Mediterraneo e Mar Nero. La datazione molecolare ha mostrato una correlazione tra il pattern di differenziazione di *C. montagui* ed i maggiori cambiamenti geologici avvenuti nel Mediterraneo durante la fine del Messiniano o del Pliocene. Questi Autori concordano sul fatto che la paleostoria abbia formato le divergenze tra le popolazioni di *C. montagui* e che esse siano mantenute tali dalle condizioni idrografiche attuali. Dando & Southward (1981) hanno attribuito le differenze genetiche tra Atlantico orientale ed i diversi bacini del Mediterraneo agli eventi storici che hanno plasmato questi ultimi. Pannacciulli *et al.* (1997) pongono l'accento sul ruolo delle condizioni oceanografiche attuali nel mantenimento delle differenze genetiche tra le popolazione atlantiche e mediterranee. Il fronte Almeria-Oran può essere implicato nella differenziazione osservata, in quanto potrebbe agire da barriera alla potenziale dispersione larvale. Pannacciulli *et al.* (1997) hanno spiegato la presenza di affinità genetica tra le popolazioni del Mar Nero e del Mediterraneo, nonostante la bassa salinità del Mar Nero e la presenza del Bosforo come barriera idrografica, attraverso il possibile scambio di larve tra i due bacini durante l'autunno, quando le acque del Mediterraneo fluiscono nel Mar Nero. Lo svantaggio che emerge da tutti questi studi, però, è la mancanza di informazioni provenienti dal Mediterraneo sud-orientale, in larga parte dovuta all'assenza della specie.

Le caratteristiche biologiche ed ecologiche di *C. montagui*, come ad esempio lo stile di vita sessile, l'ampio potenziale per la dispersione e la distribuzione della specie nel bacino di studio, lo rendono un candidato ideale per uno studio biogeografico condotto mediante marcatori genetici molecolari.

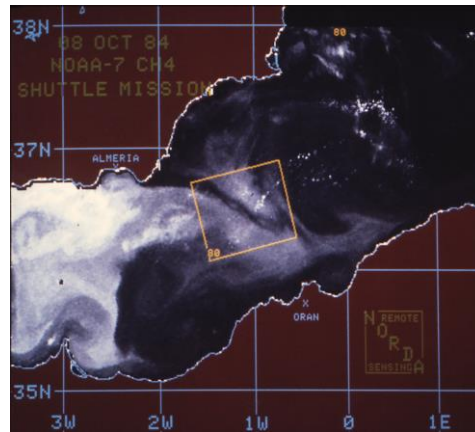
**CAPITOLO 3**  
**MATERIALI E METODI**

### 3.1 AREA DI STUDIO

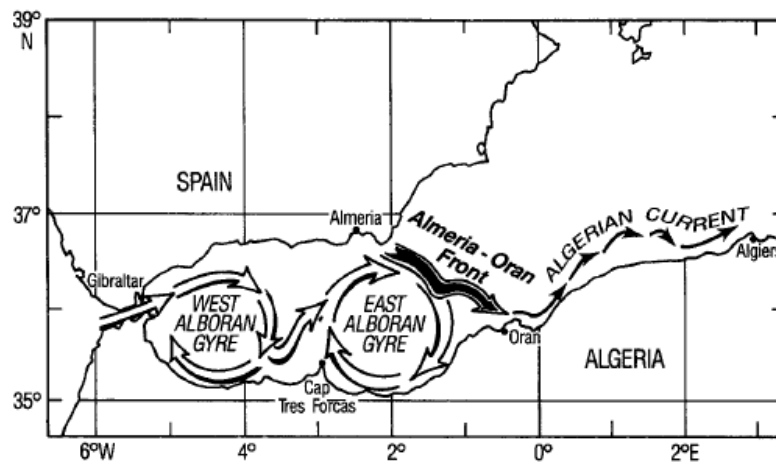
Di seguito viene riportata una breve descrizione dell'area di studio e dei relativi siti di campionamento.

#### 3.1.1 FRONTE ALMERIA-ORAN (FAO)

Il fronte Almeria-Oran (FAO) è stato largamente studiato nel corso degli anni, tramite studi incentrati su diversi aspetti. Tra questi, Kao *et al.* (1977) hanno studiato la circolazione associata ai movimenti turbolenti superficiali, Wang (1984) ha condotto uno studio sulla reciproca intrusione di una corrente gravitazionale e, nel 1986, all'interno del *Western Mediterranean Circulation Experiment* (WMCE; La Violette, 1987), Tintoré *et al.* (1988) hanno condotto uno studio sul campo per investigare la struttura del FAO, descrivendo il fronte tramite immagini satellitari e fotografie scattate dallo *space shuttle* (Fig. 3.1), e l'individuazione delle caratteristiche fisiche principali, tramite l'integrazione di dati fisici, chimici e biologici. In conformità a tali studi, il FAO è definito come un fronte stazionario che tende ad un equilibrio quasi-geostrofico. È un fronte di densità termoalina, limitato ai primi 300 m di profondità, con andamento baroclinico nei primi 50-75 m, che si genera dalla convergenza di due masse d'acqua ben distinte, la massa d'acqua di derivazione atlantica (*Atlantic Water*, AW), entrante dallo Stretto di Gibilterra, e la massa d'acqua del bacino mediterraneo (Tintoré *et al.*, 1988). Dalle immagini satellitari, si può vedere come tale convergenza avvenga nelle vicinanze di Cabo de Gata (Almeria, Spagna). Qui l'acqua atlantica modificata (*Modified Atlantic Water*, MAW) è deviata in direzione di Oran (Algeria) e, in vicinanza della costa, parte di essa continua verso est a formare la Corrente Algerina, mentre la restante parte è trattenuta all'interno della circolazione anticiclonica dell'*Eastern Alboran Gyre* (Fig. 3.2) che, con le sue dimensioni e la sua posizione, sembra controllare il FAO.



**Fig. 3.1.** Integrazione delle informazioni provenienti da immagini satellitari e fotografie scattate dallo shuttle (NOAA-9, 8 Ottobre 1984. #AVHRR Band 4).



**Fig. 3.2.** Immagine schematica della circolazione nel Mare di Alboran, che porta alla formazione del FAO (Tintoré *et al.*, 1988).

### 3.1.2 STRETTO DEI DARDANELLI (SD)

Lo Stretto dei Dardanelli (SD) costituisce la parte più sud-orientale del Sistema dello Stretto Turco (SST) e rappresenta il collegamento tra il bacino dell'Egeo, nel Mar Mediterraneo ed il Mare di Marmara, il quale comunica a nord-est con il Mar Nero, attraverso lo Stretto del Bosforo (Fig. 3.3). Lo SD ha una lunghezza approssimativa di 65 km, una larghezza di 3.5 km ed una profondità di 55 m (Özsoy *et al.*, 1986). Il confine tra lo SD e il bacino occidentale del Mare di Marmara è caratterizzato da una regione di congiunzione che si amplia gradualmente, mentre il confine tra lo SD e il Mar Egeo è costituito da una brusca apertura. Se prendiamo in considerazione anche la dinamica del flusso, la caratteristica geometrica maggiormente distinguibile risulta essere il restringimento del canale presente immediatamente a sud-ovest della curva

localizzata a circa metà dello SD. Il punto più stretto di SD, largo solamente 1.2 km, prende il nome di Passo di Nara e, proprio per la sua ridotta larghezza, influenza in modo evidente le caratteristiche dinamiche del flusso (Oğuz & Sur, 1989).



**Fig. 3.3.** Sistema dello Stretto Turco (SST). Lo Stretto dei Dardanelli (SD; area riquadrata) costituisce la parte più sud-orientale del SST e rappresenta il collegamento tra il bacino dell'Egeo, nel Mar Mediterraneo, ed il Mare di Marmara, il quale comunica ulteriormente con il Mar Nero, grazie alla presenza dello Stretto del Bosforo (area cerchiata) all'altra sua estremità.

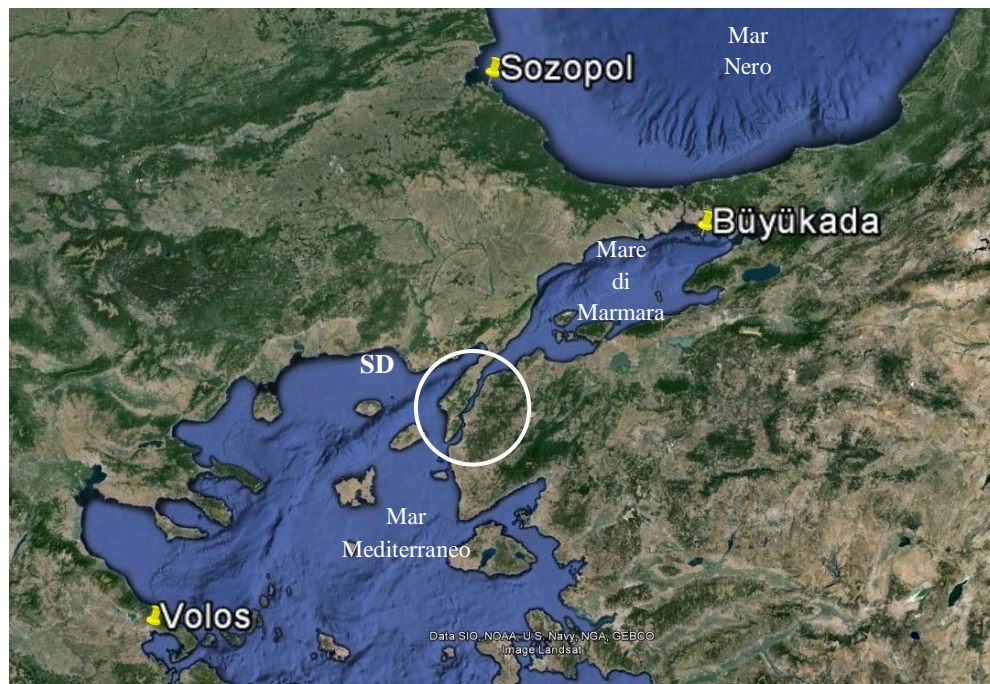
Come parte integrante del SST, lo SD riflette la struttura persistente a due strati del flusso. Il profilo di densità è controllato in maniera esclusiva dalla salinità, nonostante la presenza di variazioni stagionali significative della temperatura. In linea generale, i livelli superiori sono interessati da un flusso di acqua salmastra, proveniente dal Mar Nero e diretta verso il Mar Egeo, mentre lo strato profondo è interessato dal passaggio di acqua mediterranea più salata, che attraversa SD in direzione nord. Nonostante la struttura a due strati, vi è mescolamento tra le due masse d'acqua nello strato superiore e questa proprietà di SD deve essere tenuta in considerazione per il presente studio. Il maggiore flusso lungo SD si registra in primavera ed in estate, periodi in cui le precipitazioni e l'apporto fluviale nel Mar Nero aumentano considerevolmente (Oğuz & Sur, 1989).

### 3.1.3 SITI DI CAMPIONAMENTO

Le analisi genetiche sono state condotte su individui campionati in tre località poste in aree adiacenti a ciascuna delle due barriere: Agadir (Marocco), Tangeri (Marocco) e Palma de Mallorca (Spagna) per il FAO (Fig. 3.4); Volos (Grecia), Büyükada (Turchia) e Sozopol (Bulgaria) per lo SD (Fig. 3.5) (Tab. 3.1).



**Fig. 3.4.** Località di campionamento di *Chthamalus montagui* nei pressi del Fronte Almeria Oran (Google Earth).



**Fig. 3.5.** Località di campionamento di *Chthamalus montagui* nei pressi dello Stretto dei Dardanelli (Google Earth).

**Tab. 3.1.** Località oggetto di studio con relativa abbreviazione; sono riportate le coordinate geografiche dei siti di campionamento ed il bacino di appartenenza delle località

Località	Abbreviazione	Coordinate geografiche		Bacino
Agadir	Aga	30.43 N	9.65 W	Atlantico
Tangeri	Tan	35.79 N	5.93 W	Atlantico
Palma de Mallorca	Pal	39.45 N	2.74 E	Mediterraneo
Volos	Vol	39.34 N	22.94 E	Mediterraneo
Büyükada	Buy	40.84 N	29.11 E	Mare di Marmara
Sozopol	Soz	42.42 N	27.70 E	Mar Nero

### 3.2 PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA da *Chthamalus montagui* è stata effettuata, sia mediante il protocollo Salting Out (Aljanabi & Martinez, 1997), che permette di estrarre DNA di buona qualità in modo facile e veloce e senza utilizzare sostanze tossiche, sia mediante l'utilizzo di un kit commerciale (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich).

Il Salting Out, come la maggior parte delle estrazioni chimiche, è caratterizzato da quattro fasi fondamentali:

1. lisi cellulare mediante una miscela di SDS (Sodio-Dodecil-Solfato), tampone, NaCl, EDTA e Proteinasi K che permette di ottenere un lisato contenente DNA, lipidi, proteine e una serie di impurità derivate dal processo stesso di lisi cellulare;
2. precipitazione di proteine, lipidi e impurità mediante l'uso di NaCl che consente di avere un surnatante asportabile contenente il DNA;
3. precipitazione del DNA con etanolo assoluto a -20°C;
4. successiva reidratazione dello stesso con TE.

Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

#### Lisi delle membrane e denaturazione delle proteine:

- risospendere l'individuo privato della conchiglia (conservato dopo il campionamento a -20 °C in etanolo al 96%) in una provetta Eppendorf da 1.5 ml con 270 µl di una soluzione contenente TNE (Tris-NaCl-EDTA) 1X, 1.5% di SDS e 30 µl di Proteinasi K [10 mg/ml];
- agitare velocemente e centrifugare brevemente;
- incubare per 2 ore a 55°C;



Precipitazione proteine e lipidi:

- aggiungere 100 µl di NaCl 6M;
- agitare velocemente e centrifugare per 18' a 13000 rpm;

Precipitazione del DNA:

- preparare un nuovo set di provette Eppendorf da 1.5 ml in cui inserire 800 µl di etanolo assoluto;
- rimuovere il surnatante dal primo set (circa 300 µl) prestando attenzione a non prelevare l'eventuale schiuma presente sulla superficie e a non toccare il pellet bianco sul fondo della provetta;
- aggiungere il surnatante al set di provette Eppendorf contenenti etanolo assoluto ed agitare manualmente;
- mantenere la soluzione a  $-20^{\circ}\text{C}$  per almeno 2 ore;
- centrifugare per 15' a 13000 rpm;
- rimuovere l'etanolo assoluto, risospendere il pellet in 300 µl di etanolo al 70%, agitare velocemente e centrifugare per 5' a 13000 rpm; ripetere l'operazione 2-3 volte;
- asciugare il pellet all'aria o nel blocco termostato a  $37^{\circ}\text{C}$  lasciando aperto il coperchio della provetta;

Idratazione e conservazione del DNA:

- risospendere il pellet in 30 µl di TE (Tris-EDTA) buffer. Agitare velocemente e centrifugare brevemente;
- conservare il DNA in soluzione in freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

I protocolli per la preparazione delle soluzioni impiegate nell'estrazione del DNA sono riportate nell'Appendice I.

Il protocollo di estrazione del DNA effettuata mediante l'utilizzo di colonnine commerciali si compone dei seguenti passaggi:

Preparazione del tessuto:

- risospendere l'individuo privato della conchiglia (conservato dopo il campionamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  in etanolo al 96%) in una provetta Eppendorf da 1.5 ml con 180 µl di Soluzione di Lisi T e 20 µl di Proteinasi K [20 mg/ml];
- agitare velocemente e centrifugare brevemente;

- incubare per 2 ore a 55°C;
- aggiungere 20 µl di Soluzione di RNAasi ed incubare per 2' a temperatura ambiente;
- aggiungere 200 µl di Soluzione di Lisi C;
- agitare per 15" e centrifugare brevemente;
- incubare per 10' a 70°C;

Preparazione delle colonnine:

- aggiungere direttamente sulla membrana delle colonnine (contrassegnate da un anello rosso) 500 µl di Soluzione di preparazione delle colonnine, centrifugare per 1' a 12000 rpm e rimuovere il liquido;

Formazione legame DNA-membrana delle colonnine:

- aggiungere 200 µl di etanolo assoluto al lisato;
- agitare per 5-10" e centrifugare brevemente;
- trasferire l'intero contenuto della provetta nella colonnina utilizzando la pipetta, per ridurre la rottura del DNA durante il trasferimento;
- centrifugare per 1' a 6500 rpm;
- eliminare la provetta contenente il liquido e inserire la colonnina in una nuova provetta Eppendorf da 2.0 ml;

Lavaggi per la rimozione dei contaminanti:

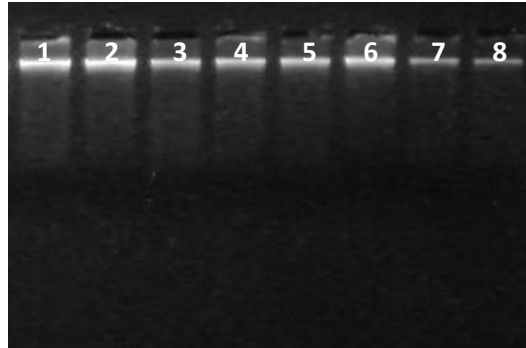
- aggiungere 500 µl di Soluzione di lavaggio e centrifugare per 1' a 6500 rpm;
- eliminare la provetta contenente il liquido e inserire la colonnina in una nuova Eppendorf da 2.0 µl;
- aggiungere 500 µl di Soluzione di lavaggio e centrifugare per 3' a 13000 rpm fino al completo asciugamento della membrana della colonnina (se necessario, centrifugare nuovamente per 1' a 13000 rpm);
- eliminare la provetta contenente il liquido ed inserire la colonnina in una nuova Eppendorf da 2.0 ml;

Eluizione del DNA purificato:

- aggiungere 30 µl di Soluzione di eluizione ed incubare per 5' a temperatura ambiente;
- centrifugare per 1' a 6500 rpm;
- conservare il DNA in soluzione in freezer a -20°C.

Le soluzioni impiegate nell'estrazione del DNA sono fornite dalla casa madre.

Una volta terminata l'estrazione del DNA, 5 dei 30  $\mu\text{l}$  di volume totale vengono sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%, applicando una differenza di potenziale di 100 mV per 30', al fine di verificare la qualità e la quantità di DNA estratto (Fig. 3.6).



**Fig. 3.6.** Elettroforesi su gel di agarosio all'1% di 5.0  $\mu\text{l}$  del DNA estratto. La foto riporta la banda del DNA estratto in 8 individui (1-8).

Per ciascuna delle 6 località indagate è stato estratto il DNA da 30 individui (31 per Tangeri), per un totale di 181.

### 2.3 PRIMER MICROSATELLITARI UTILIZZATI E PROTOCOLLI DI AMPLIFICAZIONE DEL DNA

Per l'analisi della genetica di popolazione di *Chthamalus montagui* sono stati impiegati sei loci microsatellitari specie-specifici le cui coppie di primer sono state precedentemente disegnate da Pannacciulli *et al.* (2005). I loci usati sono: CM2/15, CM4/3, CM4/5, CM5/18, CM5/23, CM9/11 (Tab. 3.2).

**Tab. 3.2.** Loci microsatellitari impiegati con la relativa struttura ripetitiva di basi, le sequenze e le temperature di *melting* ( $T_m$ ) dei primer forward (F) e reverse (R) ed il codice di accesso GeneBank (da Pannacciulli *et al.*, 2005).

Locus	Ripetizione	Primer (5'-3')	$T_m$ (°C)	GeneBank n°
CM2/15	(CA) <sub>10</sub>	F: GTACGAGTGGCTTCGCTTG	54.5	AY847005
		R: ATGTTTGCCATGATGTAGGC	52.1	
CM4/3	(GT) <sub>16</sub> AT(GT) <sub>2</sub>	F: TGCTCACAAACCATGACTGG	54.0	AY847006
		R: ACGCTAAAGAGGCACATTCCG	54.4	
CM4/5	(AC) <sub>29</sub> TCGC(AC) <sub>29</sub>	F: TGATTGTCGGTTTAGCAACG	52.5	AY847007
		R: TCACTGTGAAGTCTGACATGG	53.5	
CM5/18	(TG) <sub>2</sub> TA(TG) <sub>2</sub> TT(TG) <sub>13</sub>	F: GGGATGACTGCTCGATTAGG	53.2	AY847009
		R: GCATGTACACGTCAAACACG	53.9	
CM5/23	(AC) <sub>3</sub> (GC) <sub>8</sub> (AC) <sub>36</sub>	F: CGCTCTCCCTCAAACTCC	53.3	AY847010
		R: ACCGTGAGTAACAGCATAACG	53.5	
CM9/11	(GT) <sub>13</sub> AG(GT) <sub>10</sub>	F: ACAAGCCTTCGCCTCATTCC	56.3	AY847012
		R: CCCACTTATCAACGCTTCTGC	55.6	

L'amplificazione del DNA è stata effettuata mediante PCR su un campione di trenta individui per ciascuna località analizzata e per ciascuno dei sei loci microsatellitari. La master mix utilizzata nelle reazioni di polimerizzazione è la medesima per tutte le coppie di primer (Tab. 3.3).

**Tab. 3.3.** Master mix utilizzata per l'amplificazione tramite PCR dei sei loci microsatellitari. I reagenti vengono riportati con le relative concentrazioni iniziali (CI), concentrazioni finali (CF), volumi iniziali (VI) e volume finale (VF).

	CI	CF	VI
Buffer (senza MgCl <sub>2</sub> )	10 X	1 X	1.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	0.9 µl
Q solution (Qiagen)	5 X	1 X	3.0 µl
dNTPs	2.5 µM	0.2 µM	1.2 µl
Primer F	10 µM	1 µM	1.5 µl
Primer R	10 µM	1 µM	1.5 µl
H <sub>2</sub> O	/	/	3.75 µl
JumpStart Taq DNA Polimerase (Sigma)	5 U/µl	0.05 U/µl	0.15 µl
DNA template	30 ng/µl	3 ng/µl	1.5 µl
<b>VF</b>			<b>15 µl</b>

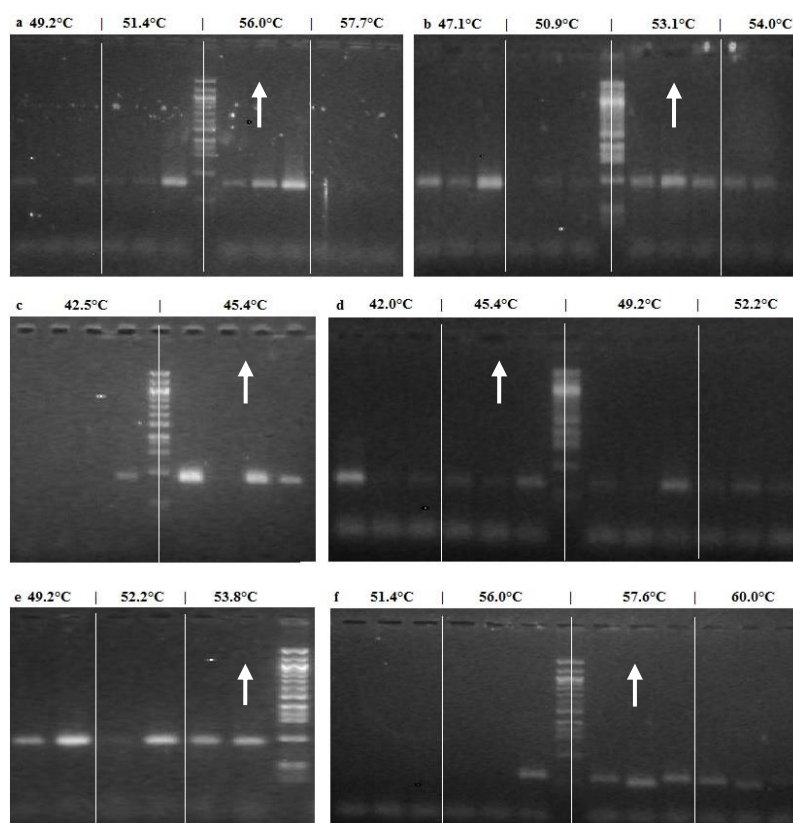
Le diverse fasi della PCR si svolgono alla stessa temperatura ed hanno la stessa durata per tutti i primer, ad eccezione della fase di appaiamento che viene condotta ad

una temperatura diversa per ciascuna coppia di primer. In particolare, ad una fase di denaturazione iniziale condotta a 95°C per 15 minuti, seguono 31 cicli di denaturazione-appaiamento-estensione. Ciascun ciclo prevede: una fase di denaturazione a 95°C per 30", una fase di appaiamento alla temperatura di appaiamento specifica di ciascuna coppia di primer per un tempo che diminuisce di 2" ogni ciclo, con tempo iniziale di 1'32" ed una fase di estensione a 72°C per 30". L'amplificazione termina con un'estensione finale di 10 minuti a 72°C (Tab. 3.4).

**Tab. 3.4.** Ciclo della PCR. La temperatura di appaiamento ( $T_{ann}$ ) varia a seconda della coppia di primer impiegata.

Fase della PCR	T (°C)	Durata	30 volte
Denaturazione iniziale	95.0	15'	
Denaturazione	95.0	30"	
Appaiamento	$T_{ann}$	1'32" (-2"/ciclo)	
Estensione	72.0	30"	
Estensione finale	72.0	10'	

Le temperature di appaiamento sono state ottimizzate in corso d'opera utilizzando un termociclatore a gradiente (PTC-200 DNA Engine, MJ Research). Per ciascun locus è stata selezionata la  $T_{ann}$  che ha prodotto l'amplificato di migliore qualità (Fig. 3.7; Tab. 3.5).



**Fig. 3.7.** Corsa elettroforetica dei prodotti amplificati nella PCR a gradiente. Come standard di riferimento è stata utilizzata una *Ladder* 100 bp (New England BioLabs).

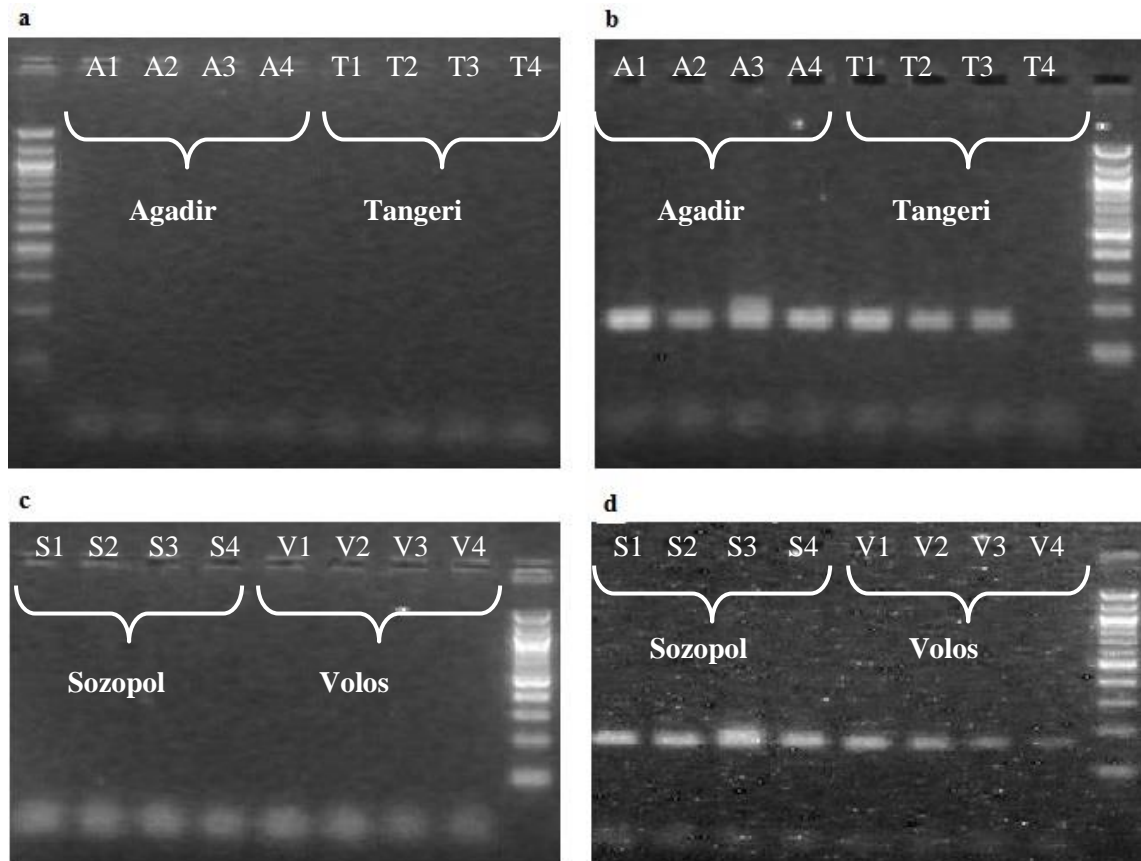
**Tab. 3.5.** Temperature di appaiamento di ciascuna coppia di primer.

<b>Locus</b>	<b>T<sub>ann</sub> (°C)</b>
CM2/15	56.0
CM4/3	53.1
CM4/5	45.4
CM5/18	45.4
CM5/23	53.8
CM9/11	57.6

Durante lo studio, sono stati riscontrati problemi di amplificazione in alcuni individui delle popolazioni atlantiche di Agadir e Tangeri per il locus CM4/3 e delle popolazioni di Sozopol e Volos per il locus CM4/5. È stato ipotizzato che l'assenza di amplificazione in tali popolazioni fosse riconducibile ad una possibile mutazione nei siti di attacco dei primer utilizzati e, di conseguenza, sulla base delle sequenze utilizzate per la costruzione dei primer originali (Pannacciulli *et al.*, 2005), sono stati disegnati nuovi primer “a monte” e “a valle” rispetto ai precedenti ed è stata effettuata una PCR a gradiente per determinare le nuove T<sub>a</sub> (Tab. 3.6). Le reazioni effettuate con le nuove coppie di primer hanno mostrato risultati migliori rispetto alle analisi precedenti (Fig. 3.8).

**Tab. 3.6.** Sequenze, temperature di *melting* (T<sub>m</sub>) e temperature di *annealing* (T<sub>ann</sub>) dei nuovi primer forward (AF) e reverse (AR-BR) per i loci CM4/3 e CM4/5.

<b>Locus</b>	<b>Sequenze primer (5'-3')</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>ann</sub> (°C)</b>
CM4/3	AF: GTGCAGTCTGCTCACAAACC	63.6	62.0
	AR: GAAAGCTGGTCAAGCTAACG	61.6	
CM4/5	AF: GTTTTGCCAGGTCGAGGC	65.9	62.0
	AR: TGAAGTCTGACATGGACGAAAG	64.2	
	BR: AAGCTGGAGAGACCGACTG	62.3	



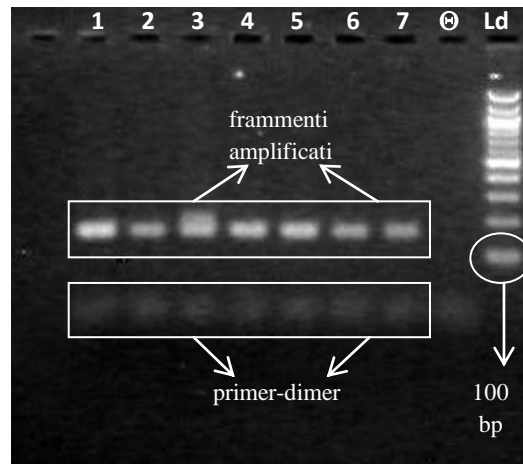
**Fig. 3.8.** Confronto dei risultati ottenuti: a sinistra la PCR eseguita su 4 campioni per popolazione con le coppie di primer disegnati da Pannacciulli *et al.* (2005) per i loci CM4/3 (a) e CM4/5 (c); a destra la PCR eseguita, sui medesimi campioni, con le nuove coppie di primer per i loci CM4/3 (b) e CM4/5 (d).

Per permettere la successiva analisi dei frammenti mediante elettroforesi capillare, il primer forward di ciascuna coppia di primer è stato marcato con fluorescenza (6-FAM, HEX o NED) all'estremità 5' (Tab. 3.7).

**Tab. 3.7.** Elenco dei primer forward (F) con relative fluorescenze all'estremità 5' e spettri di emissione.

Primer	Fluorescenza (5')	Spettro di emissione
CM2/15 F	6-FAM	Blu
CM4/3 F	HEX	Verde
CM4/3 AF	HEX	Verde
CM4/5 F	HEX	Verde
CM4/5 AF	HEX	Verde
CM5/18 F	NED	Giallo
CM5/23 F	6-FAM	Blu
CM9/11 F	NED	Giallo

Terminata la PCR, la presenza del prodotto amplificato è stata verificata mediante elettroforesi zonale su gel di agarosio al 2% contenente Bromuro di Etidio, utilizzando come riferimento un marcatore di corsa (*Ladder* 100 bp, New England BioLabs) ed applicando una differenza di potenziale di 80 mV per circa 1h 30'. In ciascun pozzetto sono stati caricati 7.0  $\mu$ l di prodotto (dei 15  $\mu$ l di volume totale) e 3.0  $\mu$ l di Orange-g per un totale di 10.0  $\mu$ l. (Fig. 3.9).



**Fig. 3.9.** Elettroforesi su gel di agarosio al 2% di 7.0  $\mu$ l dell'amplificato ottenuto in cui le bande indicano la presenza di prodotto amplificato. La foto riporta il risultato di una corsa elettroforetica effettuata sui prodotti di PCR di 7 individui (1-7). Oltre alla banda rappresentante il frammento amplificato del locus CM5/18, sono presenti la banda del primer-dimer ed il marcatore di corsa (*Ladder* 100 bp, New England BioLabs). In figura è riportato anche il controllo negativo (⊖).

### 3.4 PREPARAZIONE CAMPIONI PER L'ANALISI DEI FRAMMENTI

Una volta verificata la presenza dei frammenti amplificati, i prodotti della PCR sono stati preparati per essere inviati ad una ditta esterna (MCLAB - Molecular Cloning Laboratories, San Francisco, USA), che ha effettuato la corsa elettroforetica capillare.

Per le spedizioni sono state utilizzate piastre a 96 pozzetti e, per sfruttare nel migliore dei modi il sistema a quattro capillari del sequenziatore ABI 3730XL, in ciascun pozzetto sono stati caricati 9.0  $\mu$ l di prodotti amplificati, 3.0  $\mu$ l per ciascuna delle tre fluorescenze (6-FAM, HEX e NED) con cui sono stati marcati i primer utilizzati nello studio. Ciò ha reso possibile l'acquisizione di informazioni riguardo a tre differenti loci microsatellitari in una singola corsa. Tutte le corse (quindi, tutti i pozzetti) contengono, inoltre, uno standard di riferimento, l'*Orange DNA* (MCLAB; le dimensioni relative differiscono leggermente da quelle dello standard di riferimento *LIZ-500*, della ABI), che emette fluorescenza nello spettro dell'arancione.

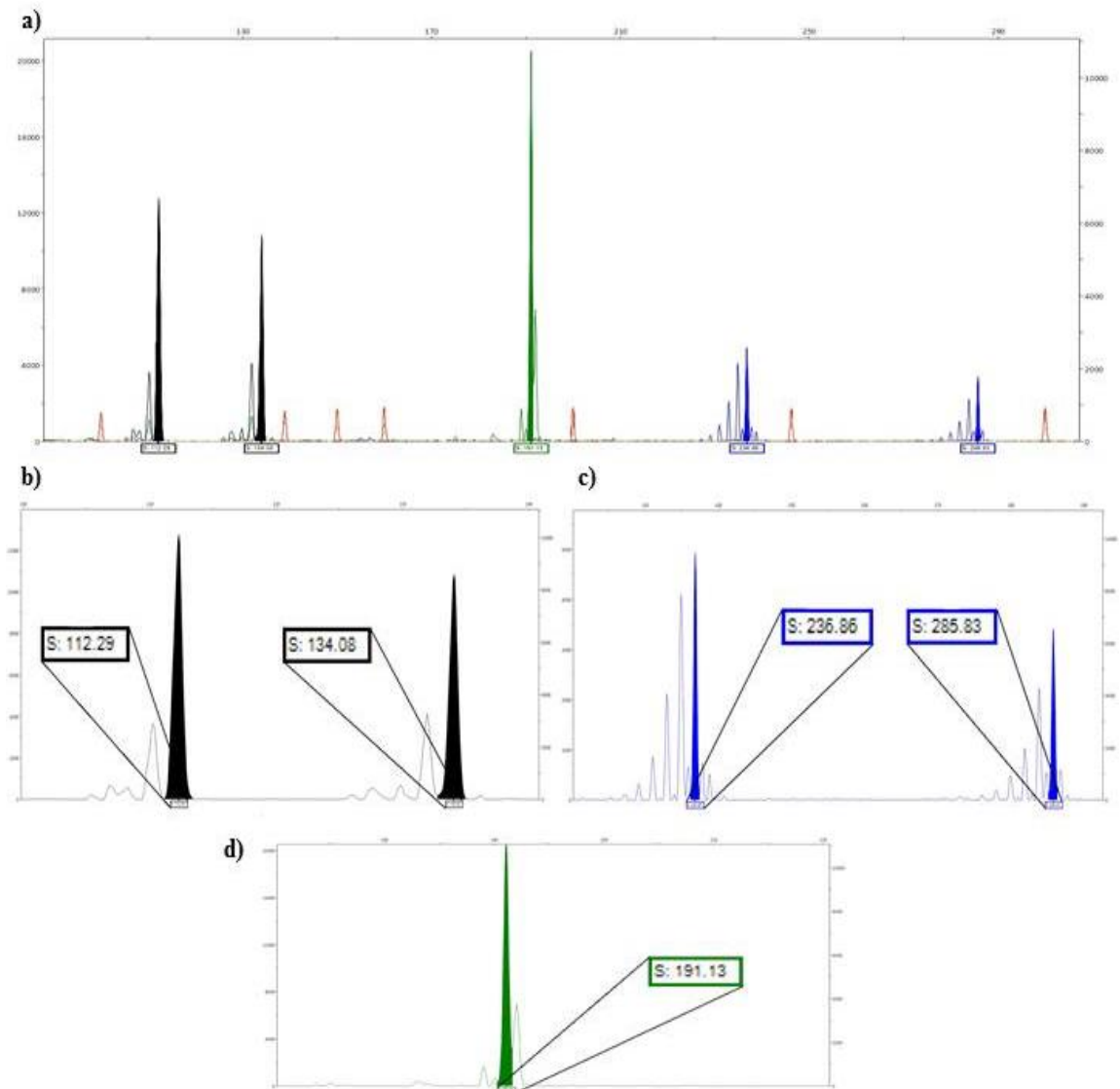


In ciascuna piastra inviata, è stato inserito un controllo positivo, per rendere confrontabili i risultati provenienti da piastre differenti, e sono stati inseriti prodotti amplificati di individui appartenenti alle sei diverse località considerate nel presente lavoro, per escludere l'ipotesi che l'eventuale diversità riscontrata tra le località sia dovuta a differenze nei processi di analisi, piuttosto che a divergenza genetica tra di esse. Al termine del caricamento dei prodotti amplificati nei pozzetti, le piastre sono state poste, prive di copertura ed al buio, all'interno di un termociclatore ABI 3700, settato ad una temperatura di 45°C e con il coperchio alzato, fino alla completa disidratazione del contenuto dei pozzetti. Quindi, sono state tappate, ricoperte con parafilm e con carta di alluminio (quest'ultima per evitare il decadimento della fluorescenza dovuto all'esposizione alla luce) e sono state spedite alla ditta MCLAB per essere processate.

### **3.5 GENOTIPIZZAZIONE DEI FRAMMENTI ANALIZZATI**

I risultati della corsa elettroforetica, spediti via email dalla MCLAB come file di estensione “.fsa”, sono stati visualizzati e analizzati usando il software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems). I singoli picchi sono stati misurati direttamente mentre, in presenza di *stutter bands*, è stato considerato solamente il picco più alto (Fig. 3.10).

Per ciascun locus, tutti i dati provenienti dall'analisi di tutti gli individui facenti parte dello studio sono stati riportati su un grafico taglia-frequenza, inserendo i valori al primo punto decimale. Questo ha permesso il raggruppamento di dati che, nonostante le piccole differenze di taglia, rappresentano un singolo allele. In questo modo le dimensioni degli alleli sono state stabilite per ciascun locus.



**Fig. 3.10.** Esempio di visualizzazione dei risultati con l'utilizzo del software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems). L'asse delle ascisse indica la lunghezza in bp, l'asse delle ordinate indica l'intensità dell'emissione. In questo caso i loci analizzati sono: CM9/11 (NED), CM5/23 (6-FAM) e CM4/3 (HEX). a) visualizzazione di tutte le fluorescenze: *Orange DNA* (standard di riferimento, arancione), NED (giallo; nelle analisi è stato modificato con il colore nero per renderlo più evidente, N.d.A.), 6-FAM (blu), HEX (verde). b) l'individuo risulta eterozigote per il locus CM9/11; gli alleli sono lunghi 112.29 bp e 134.08 bp. c) l'individuo risulta eterozigote per il locus CM5/23; gli alleli hanno lunghezza 236.85 bp e 285.83 bp. d) l'individuo è omozigote per il locus CM4/3 ed entrambi gli alleli hanno lunghezza 191.13 bp.

### 3.6 TRATTAMENTO STATISTICO DEI DATI

L'analisi dei dati genetici è stata effettuata utilizzando pacchetti software specifici per studi di genetica di popolazione. Nella Tabella 2.8 sono elencati i principali software impiegati.

**Tab. 2.8.** Principali software impiegati nell'analisi dei dati genetici.

<b>Software</b>	<b>Reference</b>
ARLEQUIN v 3.5.1.2	(Schneider <i>et al.</i> , 2000)
MSA v4.05	(Dieringer & Schlötterer, 2003)
GENETIX v4.05.2	(Belkhir <i>et al.</i> , 2002)
GenAEx v6.501	(Peakall R & Smouse, 2012)
GenePop on the Web v4.2	(Raymond & Rousset, 1995) (Pritchard <i>et al.</i> , 2000; Falush <i>et al.</i> , 2003)
STRUCTURE v2.3.4	(Felsenstein, 1993)
PHYLIP v3.695	(Clarke & Warwick, 2001)
PRIMER v6	

Di seguito è riportata una panoramica (seguendo Procaccini & Maltagliati, 2003) dei principali parametri calcolati per l'analisi dei dati genetici.

#### Linkage Disequilibrium

Il *linkage disequilibrium* (*LD*) è la tendenza di due loci ad essere presenti nello stesso cromosoma; alleli specifici presenti in due loci differenti, quindi, vengono trovati insieme in modo maggiore o minore di quanto avverrebbe grazie alla sola azione del caso. L'entità dell'effetto è espressa come valore delta ( $\Delta$ ) e corrisponde alla differenza tra la frequenza aplotipica attesa ed osservata. Può assumere valori positivi o negativi ed è contrastata dalla ricombinazione: di conseguenza, decresce ad ogni generazione che deriva da accoppiamenti casuali. Casi di *LD* permanente si possono avere grazie alla selezione naturale se, ad esempio, alcune combinazioni gametiche risultano avere un successo riproduttivo più alto rispetto ad altre combinazioni.

Nel presente lavoro il test per il linkage disequilibrium è stato effettuato con il software GenePop on the Web.

#### Equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE)

La legge di Hardy-Weinberg (Hardy, 1908; Weinberg, 1908; Stern, 1943) prevede che, in una situazione di stabilità dopo una generazione di accoppiamento casuale, le

frequenze genotipiche all'interno di una popolazione a livello di uno specifico gene raggiungano un valore di equilibrio. Questo valore può essere definito dal quadrato delle frequenze alleliche.

Se consideriamo la presenza di solamente due alleli,  $A$  e  $a$ , con frequenza allelica  $p$  e  $q$  rispettivamente, i tre possibili genotipi sono  $AA$ ,  $Aa$  e  $aa$  e le loro frequenze seguono l'espansione binomiale dell'equazione:

$$(p + q)^2 = p^2 + pq + q^2 = 1$$

La frequenza del genotipo  $AA$  sarà, quindi,  $p^2$ , quella del genotipo  $Aa$  sarà  $2pq$  e la frequenza del genotipo  $aa$  sarà, infine,  $q^2$ .

Le popolazioni sono considerate in equilibrio di Hardy-Weinberg quando soddisfano l'equazione, quindi quando omozigoti ed eterozigoti sono nelle proporzioni sopra indicate.

Le frequenze alleliche di un determinato *pool* genico rimangono costanti solo se vengono soddisfatte le seguenti condizioni restrittive: la popolazione deve essere infinitamente ampia e deve vivere in un ambiente completamente isolato (dove cioè non avvengono fenomeni migratori); inoltre, al suo interno ogni individuo ha la stessa probabilità di riprodursi con qualsiasi altro (condizione detta di “panmissia”), non si verificano mutazioni e la selezione naturale non agisce. Il venir meno di una o più di queste condizioni determina un cambiamento delle frequenze alleliche, cioè un'evoluzione.

In natura, è quasi impossibile che una popolazione si trovi in equilibrio di Hardy-Weinberg, in quanto su di essa agiscono diversi fattori, denominati “forze evolutive”, che fanno evolvere gruppi di organismi in popolazioni geneticamente distinte modificandone le frequenze alleliche (Hickman *et al.*, 2003). Tali forze sono la deriva genetica, le mutazioni, le migrazioni e la selezione naturale (Gray, 1997): deriva genetica, mutazioni e selezione naturale determinano una differenziazione delle popolazioni, mentre la migrazione le conduce ad un'omogeneizzazione (Gray, 1997). Anche gli accoppiamenti non casuali determinano una deviazione dalla condizione di equilibrio teorizzata da Hardy e Weinberg (Hickman *et al.*, 2003). Questi fenomeni, spesso, agiscono in sinergia influenzandosi a vicenda e rendendo più difficile la previsione delle frequenze alleliche (Hickman *et al.*, 2003).

Nel presente lavoro l'HWE è stato valutato mediante un test di permutazione con 10000 pseudorepliche, utilizzando il software GenePop on the Web. Ai valori di probabilità ottenuti è stata applicata la correzione sequenziale di Bonferroni, al fine di minimizzare l'errore di tipo I (Holm, 1979).

### Eterozigosità

L'eterozigosità è, spesso, uno dei primi parametri calcolati a partire da un data set, in quanto solitamente può fornire una grande quantità di informazioni riguardo la struttura e, talvolta, la storia di una popolazione. Per esempio, valori molto bassi di eterozigosità possono indicare effetti acuti sulle popolazioni di piccole dimensioni (effetto "collo di bottiglia" o dinamiche di metapopolazione che riducono fortemente il livello di diversità genetica osservato rispetto all'atteso). Generalmente, un valore elevato di eterozigosità è indice di un'ampia diversità genetica, mentre significato contrario è assunto da un basso valore. Di solito, se nel confronto tra l'eterozigosità osservata e quella attesa in equilibrio di HW, l'eterozigosità osservata assume valori minori di quella attesa si tende ad attribuire tale differenza a fenomeni di inbreeding, all'effetto Wahlund o alla presenza di alleli nulli; mentre, se essa risulta maggiore di quella attesa, si tende a imputare tale differenza ad un effetto di isolamento/rottura (mescolamento di due popolazioni precedentemente isolate).

Esistono molti metodi per calcolare l'eterozigosità e, generalmente, essa assume valori compresi tra zero (assenza di eterozigosità) e 1.0 (il sistema presenta un numero elevato di alleli con eguale frequenza). L'eterozigosità attesa,  $H_E$ , o diversità genetica,  $D$ , come viene chiamata da Weir (1990), è il parametro maggiormente impiegato per descrivere la variabilità genetica intra-popolazione ed è definita come la probabilità che un individuo risulti eterozigote per un determinato locus. Il metodo più semplice per calcolare l'eterozigosità attesa per un singolo locus è:

$$H_E = 1 - \sum p^2$$

dove  $p$  è la frequenza allelica, mentre tra loci è solitamente impiegata l'eterozigosità media. Le eterozigosità ricavate per le singole popolazioni possono essere statisticamente confrontate attraverso il *t-test* a due code applicato sui valori di ciascun locus trasformati in arcoseno  $\sqrt{x}$  (Archie, 1985).

Se una popolazione si discosta dall'equilibrio di Hardy Weinberg, è più opportuno considerare l'eterozigosità osservata (Archie, 1985):

$$H_O = \text{n. individui eterozigoti} / \text{n. totale individui}$$

Nel presente lavoro i valori di eterozigosità sono stati calcolati con il software MSA, mentre il *t*-test è stato effettuato con Microsoft Excel.

#### Diversità genica di Nei all'interno delle popolazioni ( $H_S$ )

La diversità genica di Nei ( $H_S$ ) (Nei, 1973) è una stima della diversità genetica all'interno delle popolazioni basata sulle frequenze alleliche o genotipiche di un locus. È calcolata secondo la formula (Nei, 1973):

$$H_S = 1 - \sum p^2$$

dove  $p$  è la frequenza allelica o genotipica dell'*i*-esimo allele all'interno della popolazione.

Nel presente lavoro,  $H_S$  è stata calcolata, per ciascun locus in ciascuna località, sulla base delle frequenze genotipiche utilizzando il software MSA. I valori ricavati per le singole popolazioni sono stati statisticamente confrontati attraverso il *t*-test a due code applicato sui valori di ciascun locus, mediante l'uso di Microsoft Excel.

#### F-statistica

In genetica di popolazione, “*F*” sta per “*indice di fissazione*” e si definisce fissazione l'omozigosità che deriva dall'inincrocio (*inbreeding*). Wright (1951; 1978) ha sviluppato tre indici di fissazione per valutare la suddivisione delle popolazioni:  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  e  $F_{IT}$ . In seguito, questa statistica è stata sviluppata applicando la tecnica di ricampionamento statistico del *jackknifing* (Miller, 1974), in modo da ottenere estimatori indipendenti dalle dimensioni del campione (Weir & Cockerham, 1984; Weir, 1996).

$F_{IS}$  è una misura della deviazione delle frequenze genotipiche dalla situazione di panmissia, in termini di deficit o eccesso di individui eterozigoti. Denominato anche “coefficiente di inincrocio” (Weir & Cockerham, 1984), è la probabilità che due alleli in un individuo siano identici per origine (autozigoti). In una singola popolazione è dato da:

$$F_{IS} = 1 - (H_O / H_E)$$

dove  $H_O$  = eterozigosità osservata (rapporto tra individui eterozigoti ed individui totali) e  $H_E$  = eterozigosità attesa. Valori negativi di  $F_{IS}$  indicano *outbreeding*, ossia un eccesso di individui eterozigoti, mentre valori positivi di  $F_{IS}$  indicano *inbreeding*, cioè un deficit di eterozigoti rispetto alle attese previste dalla legge di HW.

$F_{IT}$ , usato molto di rado, è il cosiddetto “coefficiente di inincrocio totale” ( $F$ ) (Weir & Cockerham, 1984) e stima la correlazione dei gameti che si uniscono relativa ai gameti nell’insieme di tutte le popolazioni.

$F_{ST}$  è la misura della riduzione in eterozigosità di una popolazione dovuta alla deriva genetica, causata dalla sua suddivisione in popolazioni. Denominato “*coancestry coefficient*” ( $\theta$ ) da Weir & Cockerham (1984), è definito come la correlazione dei gameti entro le popolazioni relativa ai gameti estratti a caso dall’insieme delle popolazioni ed assume sempre valori positivi. In particolare, può assumere valori compresi tra zero, che indica assenza di suddivisione tra le popolazioni (panmissia), ed 1.0, che indica una situazione di isolamento completo (divergenza genetica estrema). Come regola empirica, valori di  $F_{ST} \leq 0.05$  indicano una trascurabile differenziazione genetica, mentre valori di  $F_{ST} \geq 0.25$  indicano elevata divergenza genetica.

La suddivisione genetica tra popolazioni è stata quantificata utilizzando la  $F$ -statistica (Weir & Cockerham, 1984).

I parametri della  $F$ -statistica sono stati calcolati mediante i software MSA e GENETIX.

Il flusso genico tra popolazioni è stato stimato sia attraverso il parametro  $F_{ST}$ , secondo la seguente relazione (Wright, 1943):

$$Nm = 0.25 (1 - F_{ST}) / F_{ST}$$

dove  $Nm$  = numero di migranti efficaci (cioè che si riproducono nella popolazione di destinazione) per generazione, sia mediante il metodo degli alleli privati (Slatkin, 1985), secondo la seguente relazione:

$$\ln [p (I)] = a \ln (Nm) + b$$

dove  $p(I)$  è la frequenza degli alleli privati,  $a$  e  $b$  sono costanti che dipendono dalla taglia del campione (Slatkin, 1985).

Le stime di flusso genico basate sui valori di  $F_{ST}$  sono state calcolate con il software GENETIX, mentre quelle basate sul metodo degli alleli privati sono state ottenute tramite il software GenePop on the Web.

### Il Bootstrap

Il *bootstrap* (Efron, 1979) è una tecnica di ricampionamento statistico che stima la distribuzione della statistica considerata. L'idea base del *bootstrap* riguarda la stima della varianza in una distribuzione sconosciuta dalla quale i dati vengono estratti mediante ricampionamento casuale. Il *bootstrap* costruisce un numero di *data set* fittizi. Il processo di ricampionamento viene effettuato  $r$  volte (di solito  $1000 < r < 100000$ ) ottenendo un insieme di  $r$  stime del parametro in questione. In genetica di popolazione è applicato, per esempio, per ottenere l'intervallo di confidenza di parametri quali,  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ ,  $Nm$  ecc. Un'altra importante applicazione in ecologia molecolare ed in sistematica è la valutazione della "robustezza" dei nodi di un albero filogenetico o filogeografico. In questo caso, invece di campionare punti  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , si ha una tabella di popolazioni o di specie per carattere: si applica il *bootstrap* ai caratteri e, quindi, i caratteri della matrice originale sono ricampionati e rimpiazzati casualmente. Il valore *bootstrap* riportato sui nodi dell'albero filogenetico indica la percentuale delle volte in cui quel nodo è stato prodotto.

### Albero neighbour-joining

L'albero filogenetico *neighbour-joining* è stato costruito mediante l'utilizzo del software PHYLIP, in particolare con l'uso del subprogramma Neighbor.

### Analisi della Varianza Molecolare

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) consente di ripartire la variabilità molecolare tra i fattori gerarchici per i quali sono state individuate deviazioni significative dall'ipotesi nulla. L'AMOVA si basa sul fatto che la somma dei quadrati in un'analisi della varianza convenzionale può essere scritta come somma delle distanze quadrate tra coppie di fenotipi (Excoffier *et al.*, 1992).



L'AMOVA gerarchica ripartisce la varianza totale nei componenti della covarianza dati dalle differenze intra-individuali, tra individui all'interno delle popolazioni e tra le popolazioni.

Nel presente lavoro sono state effettuate, mediante il software ARLEQUIN, due AMOVA: la prima considerando due fattori ("tra località" e "entro località") e la seconda considerando tre fattori ("tra aree", "tra località entro aree" ed "entro località"), dove per area si intende la zona geografica che include le tre località di Agadir, Tangeri e Palma de Mallorca (FAO) e le tre località di Volos, Büyükada e Sozopol (SD).

#### Analisi di assegnazione bayesiana

Il metodo di assegnazione bayesiana sviluppato da Pritchard *et al.* (2000) è stato usato per inferire la struttura genetica presente all'interno del dataset. Questo approccio differisce dalle analisi sopradescritte, in quanto gli individui sono assegnati a *cluster* genetici esclusivamente in base ai loro genotipi individuali. Questa analisi è stata effettuata mediante il software STRUCTURE.

È stato applicato l'algoritmo di assegnazione basato sul modello al fine di dare visione della struttura genetica all'interno della specie, tramite l'assegnazione degli individui ai *cluster* genetici. Il modello considera  $K$  *cluster* genetici, rappresentati da popolazioni (o gruppi di popolazioni), sulla base di dati genotipici. Il modello utilizzato è l'*admixture model*, in cui ciascun individuo proviene puramente da una delle popolazioni  $K$ . Lo scopo di questa analisi è di rilevare il numero di *cluster* genetici ( $K$ ) che massimizza la probabilità a posteriori dei dati (PPD), o, in altri termini, il minimo valore  $K$  che include la struttura più ampia nei dati.

Sono state effettuate cinque repliche del programma per valori di  $K$  compresi tra uno e nove. È stato usato un *burnin* di 50000 iterazioni della catena di Markov seguita da una corsa di 100000 iterazioni, perché ciò produce risultati consistenti in prove di corse ripetute.

**CAPITOLO 4**  
**RISULTATI**

#### 4.1 MULTIPLEX PCR

Uno degli obiettivi dello studio condotto su *Chthamalus montagui* ha riguardato la messa a punto di due protocolli Multiplex PCR per i sei loci microsatellitari analizzati. L'obiettivo finale ha previsto lo sviluppo di due protocolli Multiplex PCR in cui fossero inclusi tutti e sei i loci dello studio, per minimizzare i tempi e ridurre al minimo i costi delle analisi. Ciò non è risultato possibile, in quanto alcuni loci microsatellitari non sono risultati idonei a tale scopo. Sono, quindi, stati ottimizzati due protocolli, comprendenti cinque dei sei loci dello studio. Nello specifico, il primo protocollo Multiplex-PCR, denominato *Multiplex A*, ha previsto l'amplificazione dei loci microsatellitari CM4/3, CM5/23 e CM9/11, mentre il secondo, *Multiplex B*, ha portato all'amplificazione simultanea dei loci CM4/5 e CM5/18. Il locus CM2/15, per motivi di incompatibilità con le condizioni di PCR delle *Multiplex A* e *B*, è stato amplificato separatamente.

Per la messa a punto dei due protocolli sono stati utilizzati primer non marcati con fluorescenza, per testare le diverse combinazioni di loci microsatellitari e, in seguito, per assegnare le fluorescenze sulla base dei protocolli considerati più idonei.

Per ciò che riguarda il protocollo *Multiplex A*, è stata utilizzata la master mix mostrata nella Tabella 4.1.

**Tab. 4.1.** Master mix utilizzata nel protocollo *Multiplex A* con le relative concentrazioni iniziali (CI), concentrazioni finali (CF), volumi iniziali (VI) e volumi finali (VF).

	CI	CF	VI
Buffer (senza MgCl <sub>2</sub> )	10 X	1 X	1.0 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	0.6 µl
Q solution	5 X	1 X	2.0 µl
dNTPs	2.5 µM	0.2 µM	0.8 µl
CM4/3 F	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
CM4/3R	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
CM5/23 F	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
CM5/23 R	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
CM9/11 F	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
CM9/11R	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
H <sub>2</sub> O	/	/	1.5 µl
JumpStart Taq DNA Polimerase (Sigma)	5 U/µl	0.05 U/µl	0.1 µl
DNA templat	30 ng/µl	3 ng/µl	1.0 µl
<b>VF</b>			<b>10 µl</b>

Sulla base delle temperature di annealing ( $T_A$ ) dei primer presi in esame (vedi Tab. 3.5), con l'ausilio degli appunti concernenti i dettagli tecnici relativi al disegno e allo sviluppo dei primer (forniti da F.G. Pannacciulli; Pannacciulli *et al.*, 2005), ed in seguito a PCR condotte a diverse  $T_{ann}$  e con diversa durata delle varie fasi della reazione, è stato ottimizzato il profilo termico mostrato nella Tabella 4.2.

**Tab. 4.2.** Profilo termico impiegato nel protocollo *Multiplex A*.

Fase della PCR	T (°C)	Durata	
Denaturazione iniziale	95	15'	33 volte
Denaturazione	95	30"	
Appaiamento	52	45"	
Estensione	72	1'	
Estensione finale	72	10'	

Durante il lavoro di ottimizzazione di questo protocollo, inoltre, sono state effettuate prove inserendo il locus CM2/15, in sostituzione del locus CM9/11, per testarne l'efficienza. Si è scelto, però, di mantenere il locus CM9/11 all'interno del protocollo *Multiplex A*, in quanto esso ha mostrato risultati maggiormente soddisfacenti rispetto al locus CM2/15 (Fig. 4.1).

Una volta ottimizzato il protocollo, sono state assegnate le fluorescenze al primer forward di ciascuna coppia di primers (vedi Tab. 3.7).

Per quanto riguarda il protocollo *Multiplex B*, è stata usata la master mix mostrata nella Tabella 4.3.

**Tab. 4.3.** Master Mix utilizzata nel protocollo *Multiplex B* con le relative concentrazioni iniziali (CI), concentrazioni finali (CF), volumi iniziali (VI) e volumi finali (VF).

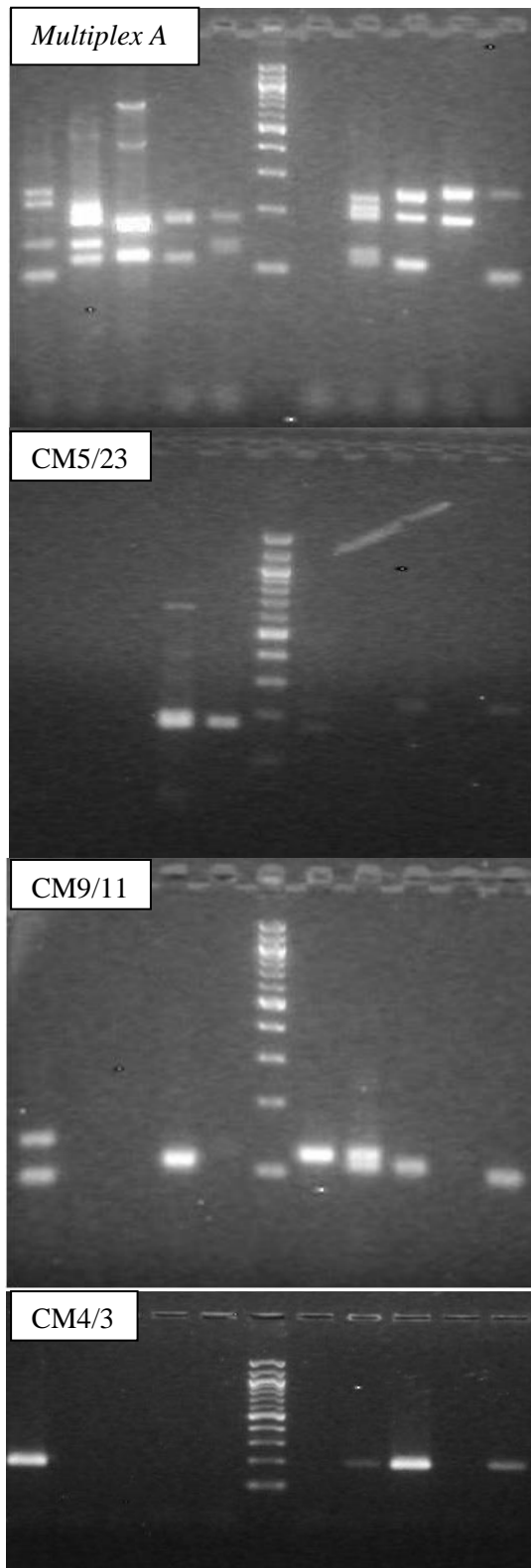
	CI	CF	VI
Buffer (senza MgCl <sub>2</sub> )	10 X	1 X	1.0 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	0.6 µl
Q solution	5 X	1 X	2.0 µl
dNTPs	2.5 µM	0.2 µM	0.8 µl
CM4/5 F	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
CM4/5 R	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
CM5/18 F	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
CM5/18R	10 µM	0.5 µM	0.5 µl
H <sub>2</sub> O	/	/	2.5 µl
JumpStart Taq DNA Polimerase (Sigma)	5 U/µl	0.05 U/µl	0.1 µl
DNA template	30 ng/µl	3 ng/µl	1.0 µl
<b>VF</b>			<b>10 µl</b>

Anche in questo caso, avendo a disposizione i dettagli tecnici riguardanti il lavoro di disegno ed ottimizzazione dei primer (Pannacciulli *et al.*, 2005) ed avendo effettuato PCR con diverse  $T_{ann}$ , è stato messo a punto il profilo termico mostrato nella Tabella 4.4.

**Tab. 4.4.** Profilo termico impiegato nel protocollo *Multiplex B*.

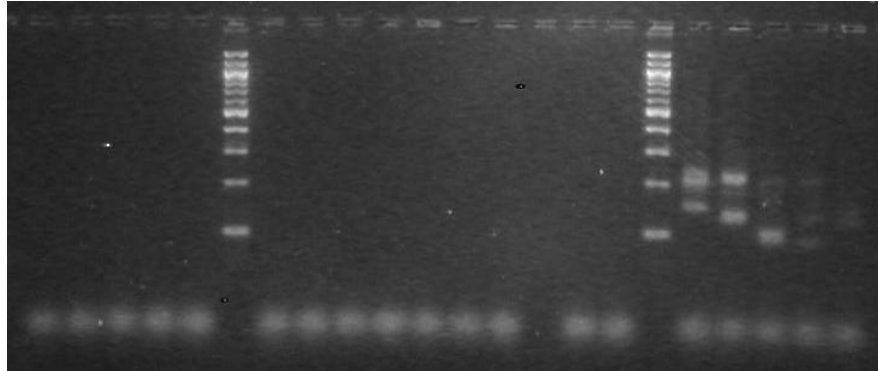
<b>Fase della PCR</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Durata</b>	
Denaturazione iniziale	95	15'	} 33 volte
Denaturazione	95	30''	
Appaiamento	45	45''	
Estensione	72	1'	
Estensione finale	72	10'	

Anche in questo caso, non è stato possibile inserire nella *Multiplex B* il locus CM2/15 in quanto i loci CM4/5 e CM5/18 si sono dimostrati efficienti solamente alla  $T_{ann} = 45.0^{\circ}\text{C}$ , temperatura troppo bassa per l'amplificazione del locus CM2/15. È stato deciso, di conseguenza, di utilizzare un protocollo con soli due loci e di trattare il locus CM 2/15 in una PCR separata. Anche in questo caso, una volta ottimizzato il protocollo, sono state assegnate le fluorescenze al primer forward di ciascuna coppia di primers (vedi Tab. 3.7) ed è stata assegnata la terza fluorescenza disponibile al locus CM2/15 per poter, comunque, inserire i prodotti, derivanti dalle due reazioni separate, in un unico pozzetto per l'analisi dei frammenti.



**Fig. 4.1.** Confronto tra prodotti amplificati mediante protocollo *Multiplex A* ed i prodotti amplificati mediante PCR singole dei medesimi loci (CM5/23, CM9/11, CM4/3).

Attraverso l'utilizzo di primer marcati con fluorescenza, tuttavia, sono stati riscontrati problemi nell'amplificazione dei frammenti (Fig. 4.2). Tale problema non è stato risolto e, quindi, ai fini dello studio di genetica di popolazione qui affrontato, si è scelto di proseguire l'amplificazione dei frammenti utilizzando protocolli di amplificazione singoli.



**Fig. 4.2.** Corsa elettroforetica di verifica di una reazione di amplificazione con protocollo *Multiplex A* e primer marcati con fluorescenza. Come si vede dall'immagine, l'amplificazione dei frammenti ha dato pochi prodotti e di scarsa qualità.

## 4.2 STRUTTURA GENETICA DI *CHTHAMALUS MONTAGUI* NELL'AREA DI STUDIO

Nell'ambito di questa Tesi sono stati analizzati 181 individui di *C. montagui*, provenienti da sei località (circa 30 individui per località): Agadir e Tangeri (O. atlantico), Palma de Mallorca (Mediterraneo occidentale), Volos, Büyükada (Mediterraneo orientale) e Sozopol (Mar Nero), in sei loci microsatellitari.

### Linkage disequilibrium

Il test per il linkage disequilibrium per coppie di loci è risultato non significativo (Tab. 4.5), pertanto i loci possono essere considerati indipendenti.

**Tab. 4.5.** Test per il linkage disequilibrium. Sotto la diagonale sono riportati i valori del test del chi-quadro; sopra la diagonale i rispettivi valori di probabilità.

Locus	CM2/15	CM4/3	CM4/5	CM5/18	CM5/23	CM9/11
CM2/15	•••	0.364	0.964	0.891	0.589	0.863
CM4/3	13.069	•••	0.935	0.997	0.949	0.999
CM4/5	3.591	4.252	•••	0.78	0.999	0.991
CM5/18	6.46	2.825	6.412	•••	0.251	0.998
CM5/23	10.302	5.259	1.072	14.831	•••	0.988
CM9/11	6.918	1.205	2.462	2.452	3.708	•••

### Variabilità genetica ed equilibrio di Hardy-Weinberg

Dalla distribuzione degli alleli nelle località e nei loci si osserva che i loci che hanno mostrato il numero maggiore e minore di alleli sono rispettivamente CM4/5 e CM2/15; mentre, per quanto riguarda le località, Tangeri ha il minor numero di alleli e Büyükada quello maggiore (Tab. 4.6). In linea generale, per tutti i loci è stato riscontrato un numero di alleli privati relativamente elevato (Tab. 4.6).

**Tab. 4.6.** Numero di alleli rilevati nei sei loci microsatellitari nelle sei località considerate nel presente lavoro. Gli alleli privati sono riportati tra parentesi. I valori totali per locus e per località sono in grassetto.

Locus	Località						Totale
	Agadir	Tangeri	Palma	Volos	Büyükada	Sozopol	
<b>CM2/15</b>	6 (0)	6 (0)	10 (2)	9 (2)	12 (1)	14 (3)	<b>21 (8)</b>
<b>CM4/3</b>	22 (6)	26 (9)	16 (1)	9 (2)	14 (7)	8 (2)	<b>49 (27)</b>
<b>CM4/5</b>	12 (2)	13 (3)	27 (3)	33 (3)	32 (3)	31 (4)	<b>63 (18)</b>
<b>CM5/18</b>	16 (2)	11 (2)	13 (1)	14 (3)	13 (2)	12 (3)	<b>31 (13)</b>
<b>CM5/23</b>	12 (4)	12 (3)	8 (1)	7 (1)	12 (3)	11 (1)	<b>28 (13)</b>
<b>CM9/11</b>	17 (0)	16 (0)	16 (1)	28 (4)	24 (3)	24 (1)	<b>43 (9)</b>
<b>Totale</b>	<b>85 (14)</b>	<b>84 (17)</b>	<b>90 (9)</b>	<b>100 (15)</b>	<b>107 (19)</b>	<b>100 (14)</b>	

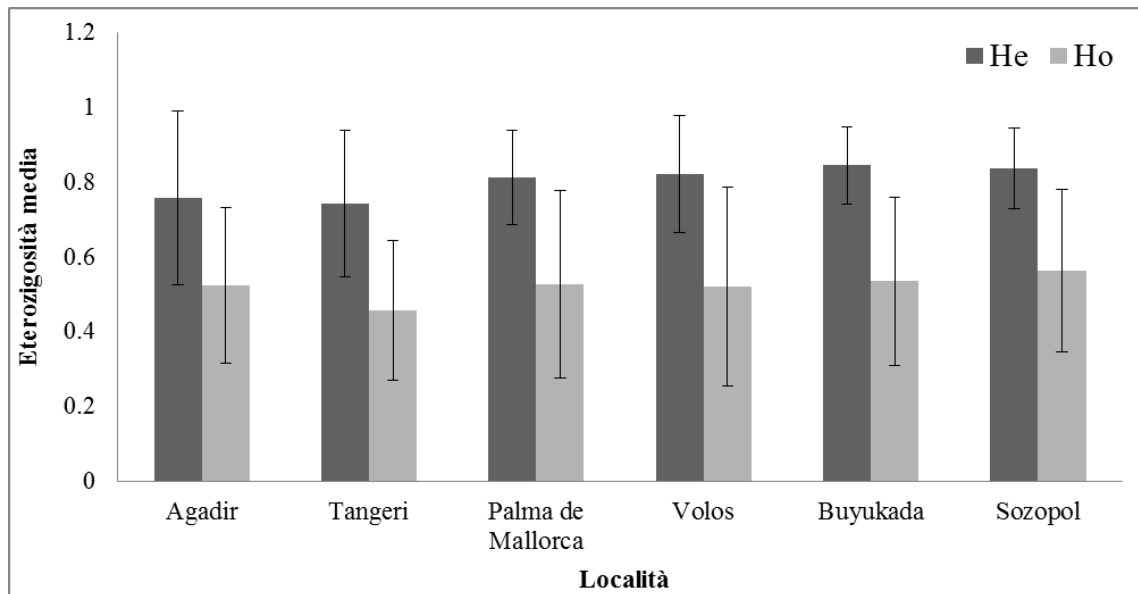
I principali parametri della variabilità genetica, calcolati per località, area geografica ed in totale, sono riportati in Tabella 4.7. Le sei località analizzate esibiscono livelli di polimorfismo comparabili, come mostrato dal numero medio di alleli ( $N_A$ ), dall'eterozigosità attesa ( $H_E$ ) e dalle frequenze alleliche (Appendice II; Appendice III).



**Tab. 4.7.** Principali parametri della variabilità genetica stimati nelle località, aree geografiche (FAO: fronte Almeria-Oran e SD: Stretto dei Dardanelli) ed in totale. Sono mostrati i valori medi (con relative deviazioni standard) di: numero di individui ( $N$ ); numero di alleli osservati ( $N_A$ ); eterozigotà attesa ( $H_E$ ); eterozigotà osservata ( $H_O$ ).

Area	Località	$N$	$N_A$	$H_E$	$H_O$
	Agadir	29.500 ± 0.837	14.167 ± 5.456	0.757 ± 0.233	0.523 ± 0.201
	Tangeri	30.500 ± 1.225	14.000 ± 6.723	0.743 ± 0.196	0.456 ± 0.187
	Palma	29.500 ± 1.225	15.000 ± 6.693	0.813 ± 0.126	0.527 ± 0.251
FAO		29.833 ± 1.150	27.000 ± 10.715	0.771 ± 0.181	0.502 ± 0.207
	Volos	29.333 ± 1.633	16.667 ± 11.076	0.821 ± 0.156	0.521 ± 0.266
	Büyükada	29.833 ± 0.408	17.833 ± 8.305	0.845 ± 0.104	0.535 ± 0.226
	Sozopol	29.500 ± 0.837	16.667 ± 8.892	0.836 ± 0.107	0.563 ± 0.217
SD		29.556 ± 1.042	28.667 ± 14.935	0.834 ± 0.118	0.540 ± 0.224
<b>Totale</b>		<b>29.694 ± 1.091</b>	<b>39.000 ± 16.577</b>	<b>0.802 ± 0.154</b>	<b>0.521 ± 0.213</b>

I valori medi di eterozigotà attesa ( $H_E$ ) ed osservata ( $H_O$ ) per località sono mostrati in Figura 4.3:  $H_E$  varia da 0.743 (Tangeri) a 0.845 (Büyükada),  $H_O$  da 0.456 (Tangeri) a 0.563 (Sozopol).



**Fig. 4.3.** Eterozigotà media attesa ( $H_E$ ) ed osservata ( $H_O$ ) nelle località analizzate (con relative deviazioni standard).

Partendo dai dati multilocus di  $F_{IS}$ , i valori di probabilità, ottenuti mediante test di permutazione con 10000 pseudorepliche, mostrano un generale discostamento dall'equilibrio di Hardy-Weinberg in quasi tutte le località e per quasi tutti i loci (Tab. 4.7). Fanno eccezione le località di Agadir per il locus CM5/23, Tangeri per i loci

CM4/5 e CM5/23, Palma de Mallorca per il locus CM9/11 e Sozopol per il locus CM2/15 (Tab. 4.8). Medesimo risultato è ottenuto applicando la correzione sequenziale di Bonferroni ai valori di probabilità ottenuti (Tab. 4.9).

**Tab. 4.8.** Schema riassuntivo della significatività delle probabilità ottenute con test di permutazione (10000 pseudorepliche) per la valutazione dell'equilibrio di Hardy-Weinberg per le località ed i loci analizzati.

		<i>Locus</i>					
		CM2/15	CM4/3	CM4/5	CM5/18	CM5/23	CM9/11
Località	Agadir	**	***	**	***	ns	***
	Tangeri	***	***	ns	***	ns	***
	Palma	**	***	***	***	***	ns
	Volos	***	***	***	***	***	***
	Büyükada	*	***	***	***	***	**
	Sozopol	ns	***	***	***	***	***
	* p < 0.05		** p < 0.01		*** p < 0.001		ns non significativo

**Tab. 4.9.** Schema riassuntivo della significatività delle probabilità ottenute applicando la correzione sequenziale di Bonferroni ai valori del test di permutazione.

		<i>Locus</i>					
		CM2/15	CM4/3	CM4/5	CM5/18	CM5/23	CM9/11
Località	Agadir	*	***	**	***	ns	***
	Tangeri	***	***	ns	***	ns	***
	Palma	**	***	***	**	***	ns
	Volos	***	***	**	**	***	***
	Büyükada	*	***	***	***	***	*
	Sozopol	ns	**	***	***	***	***
	* p < 0.05		** p < 0.01		*** p < 0.001		ns non significativo

Il confronto per coppie di località dei valori di  $H_S$  (Tab. 4.10) per locus sono risultati non significativi al  $t$ -test a due code (Tab. 4.11).

**Tab. 4.10.** Valori di  $H_S$  per ciascun locus di ciascuna località.

		<i>Località</i>					
$H_S$		Agadir	Tangeri	Palma	Volos	Büyükada	Sozopol
Locus	CM2/15	0.312	0.410	0.720	0.803	0.859	0.882
	CM4/3	0.938	0.952	0.901	0.844	0.827	0.799
	CM4/5	0.809	0.751	0.955	0.972	0.966	0.964
	CM5/18	0.883	0.826	0.851	0.870	0.873	0.815
	CM5/23	0.729	0.659	0.619	0.539	0.669	0.673
	CM9/11	0.924	0.910	0.890	0.954	0.934	0.940

**Tab. 4.11.** Valori del  $t$ -test a due code per coppie di località, basati sui valori di  $H_S$ .

Località	Agadir	Tangeri	Palma	Volos	Büyükada	Sozopol
<b>Agadir</b>	•••					
<b>Tangeri</b>	0.912	•••				
<b>Palma</b>	0.615	0.477	•••			
<b>Volos</b>	0.588	0.462	0.643	•••		
<b>Büyükada</b>	0.418	0.285	0.643	0.759	•••	
<b>Sozopol</b>	0.467	0.330	0.741	0.849	0.885	•••

### Struttura genetica

La variabilità genetica, stimata mediante la  $F$ -statistica, registrata tra ( $F_{ST}$ ) ed all'interno ( $F_{IS}$ ) dei sei loci, mostra un valore medio di  $F_{ST}$  di 0.062 ed un valore medio di  $F_{IS}$  di 0.364 (Tab. 4.12). Il valore più alto di  $F_{ST}$  (0.136) è stato registrato al locus CM2/15.

**Tab. 4.12.** Valori riassuntivi della  $F$ -statistica per ciascun locus ed in totale, secondo Weir & Cockerham (1984), con relative deviazioni standard.

<i>Locus</i>	$F_{IS}$	$F_{ST}$
<b>CM2/15</b>	0.324 ± 0.072	0.136 ± 0.066
<b>CM4/3</b>	0.538 ± 0.076	0.052 ± 0.008
<b>CM4/5</b>	0.237 ± 0.019	0.064 ± 0.026
<b>CM5/18</b>	0.460 ± 0.064	0.050 ± 0.024
<b>CM5/23</b>	0.378 ± 0.121	0.047 ± 0.017
<b>CM9/11</b>	0.244 ± 0.073	0.032 ± 0.010
<b>TOTALE</b>	<b>0.364 ± 0.055</b>	<b>0.062 ± 0.015</b>

La distribuzione delle frequenze alleliche al locus CM2/15, il cui valore di  $F_{ST}$  si discosta in modo evidente dal valore medio, è risultata diversa nei due bacini (atlantico e mediterraneo) (Fig. 4.4). In particolare, l'allele 152 è molto frequente nel bacino atlantico in confronto agli altri alleli, mentre nel bacino mediterraneo è nettamente meno frequente (Fig. 4.4).



**Fig. 4.4.** Grafici delle frequenze alleliche relative al locus CM2/15. Il primo grafico mostra la frequenza dell'allele 152 nel bacino atlantico (nero) e mediterraneo (bianco); nel secondo e nel terzo grafico è riportata la frequenza dell'allele 152 (nero) rispetto agli altri alleli (bianco) nel bacino atlantico e mediterraneo.

Le stime di  $F_{ST}$  per coppie di località, secondo Weir & Cockerham (1984) e la distanza genetica di Cavalli-Sforza & Edwards (1967) sono mostrate nella Tabella 4.13.

**Tab. 4.13.** Stime dei valori di  $F_{ST}$  (al di sotto della diagonale) e distanza genetica di Cavalli-Sforza – Edwards (1967) (al di sopra della diagonale).

Località	Agadir	Tangeri	Palma	Volos	Büyükada	Sozopol
<b>Agadir</b>	●●●	0.021	0.061	0.060	0.064	0.063
<b>Tangeri</b>	0.015*	●●●	0.055	0.056	0.061	0.062
<b>Palma</b>	0.119*	0.108*	●●●	0.033	0.037	0.033
<b>Volos</b>	0.090 <sup>ns</sup>	0.080*	0.033*	●●●	0.026	0.023
<b>Büyükada</b>	0.101*	0.096*	0.038*	0.000 <sup>ns</sup>	●●●	0.028
<b>Sozopol</b>	0.105*	0.100*	0.029*	0.001 <sup>ns</sup>	0.004 <sup>ns</sup>	●●●

\* significativo

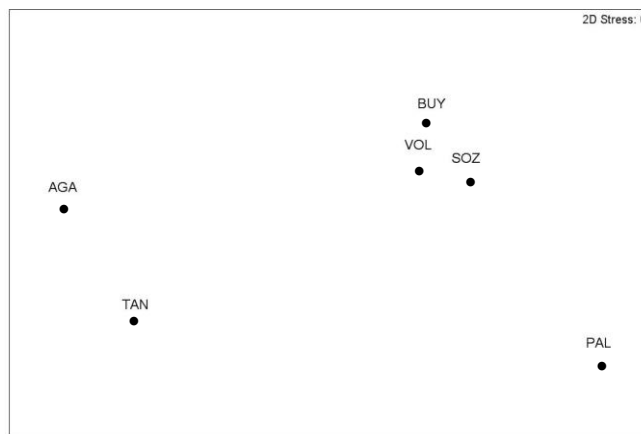
ns non significativo

Il flusso genico ( $Nm$ ) basato sui valori di  $F_{ST}$  è stato stimato per ciascuna coppia di località ed è mostrato nella Tabella 4.14.  $Nm$  varia tra 1.851 (tra Agadir e Palma de Mallorca) e  $\infty$  (tra Büyükada e Volos), ed il suo valore totale è  $Nm = 3.635$ . Il calcolo del flusso genico con il metodo degli alleli privati di Slatkin (1985), invece, ha dato un valore  $Nm = 6.625$ . Il metodo degli alleli privati risulta più sensibile ad errori nella raccolta dei dati e, quindi, è meno accurato, nella pratica, rispetto al metodo basato sull' $F_{ST}$  (Slatkin, 1994).

**Tab. 4.14.** Stima del flusso genico ( $Nm$ ) basata sui valori di  $F_{ST}$ , per ciascuna coppia di località.

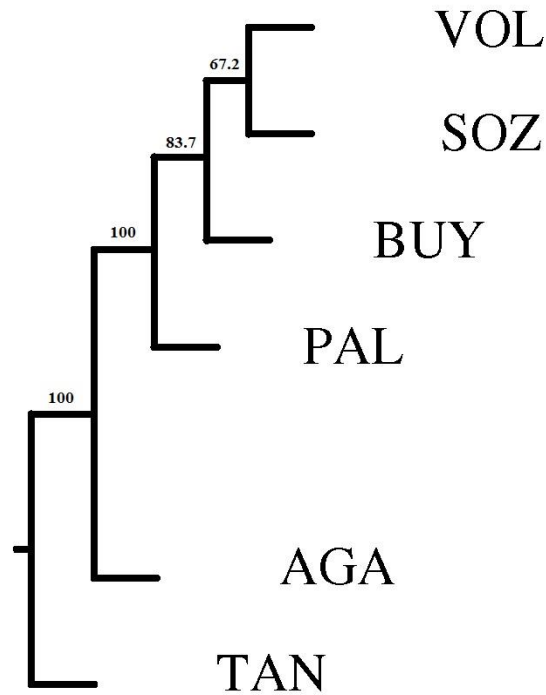
Località	Agadir	Tangeri	Palma	Volos	Büyükada	Sozopol
<b>Agadir</b>	•••					
<b>Tangeri</b>	16.417	•••				
<b>Palma</b>	1.851	2.065	•••			
<b>Volos</b>	2.528	2.875	7.326	•••		
<b>Büyükada</b>	2.225	2.354	6.329	∞	•••	
<b>Sozopol</b>	2.131	2.250	8.371	249.750	62.250	•••

Le rappresentazioni grafiche delle relazioni tra località, come indicato dai valori di  $F_{ST}$  e dalla distanza genetica di Cavalli-Sforza & Edwards (Tab. 4.13), sono state fornite dal grafico nMDS (Lessa, 1990). La distribuzione bidimensionale delle località basata su  $F_{ST}$  (Fig. 4.5) mostra tre cluster principali: 1. località atlantiche; 2. località nei pressi dello Stretto dei Dardanelli (SD); 3. Palma de Mallorca.



**Fig. 4.5.** Ordinamento spaziale delle sei località ottenuto mediante multidimensional scaling non metrico (nMDS) della matrice dei valori di  $F_{ST}$  a coppia. Indice di stress  $s = 0.000$  (per le abbreviazioni vedi Tab. 3.1).

L'albero filogenetico *neighbor-joining* (Fig. 4.6), costruito utilizzando 10000 repliche *bootstrap* delle matrici di distanza genetica di Cavalli-Sforza & Edwards (1967), mostra affinità tra le località ben supportate da alti valori *bootstrap* a livello dei nodi: 1. località atlantiche (*bootstrap* 100); 2. località nei pressi dello SD più la località di Palma de Mallorca (*bootstrap* = 100). Come precedentemente mostrato dal grafico nMDS, un'ulteriore separazione si ha nel gruppo 2, con la località di Palma de Mallorca separata dalle località nei pressi dello SD (*bootstrap* = 83.7).



**Fig. 4.6.** Albero filogenetico *neighbor-joining* (per le abbreviazioni vedi Tab. 3.1).

#### Analisi della varianza molecolare (AMOVA)

L'AMOVA a due fattori mette in evidenza che la maggior parte della varianza molecolare è distribuita all'interno delle località; tuttavia, una gran parte della varianza molecolare (34.3%) è attribuita alla componente "tra località". La divergenza genetica tra le località è confermata dalla significatività di  $\Phi_{ST}$  (Tab. 4.15).

**Tab. 4.15.** Risultati dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA) a due fattori

Sorgente di variazione	gL	Componente di varianza	% di varianza	$\Phi$ -statistica	<i>P</i>
Tra località	5	996.064	34.25	$\Phi_{ST} = 0.342$	< 0.001
Entro località	356	1912.208	65.75		

Considerando anche il fattore "Area", la ripartizione effettuata dall'AMOVA nei tre fattori, ha assegnato, anche in questo caso, la maggior parte della varianza molecolare al fattore "entro località". Anche agli altri due fattori sono state assegnate percentuali di varianza relativamente elevate (>15%), anche se il parametro  $\Phi_{CT}$ , relativo al fattore "tra aree" non è risultato significativo al test di permutazione (Tab. 4.16).

**Tab. 4.16.** Risultati dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA) a tre fattori.

Sorgente di variazione	gL	Componente di varianza	% di varianza	$\Phi$ -statistica	P
Tra aree	1	476.611	15.38	$\Phi_{CT} = 0.154$	0.300
Tra località entro aree	4	710.097	22.91	$\Phi_{SC} = 0.271$	< 0.001
Entro località	356	1912.208	61.71	$\Phi_{ST} = 0.383$	< 0.001

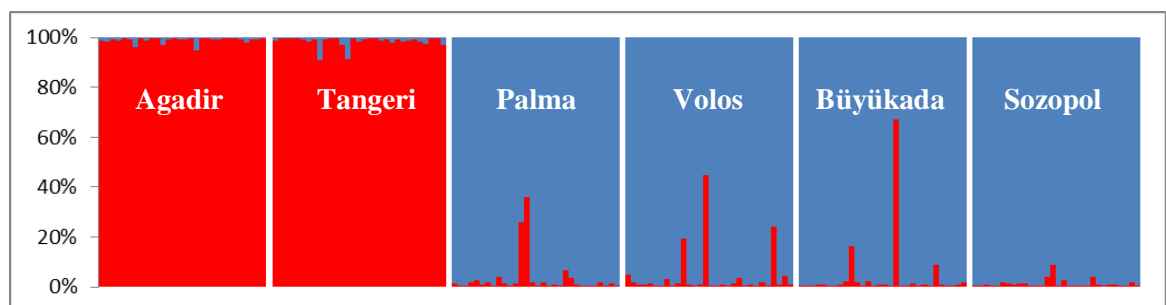
Per valutare in maniera più approfondita la struttura genetica di *C. montagui*, è stata effettuata una AMOVA ponendo “Atlantico” (Agadir e Tangeri) e “Mediterraneo + Mar Nero” (Palma de Mallorca, Volos, Büyükada e Sozopol) come livelli del fattore “Area” (Tab. 4.17). La ripartizione effettuata, in questo caso, ha assegnato la maggior parte della varianza molecolare al fattore “entro località”, anche se il 45.64% di varianza è stato assegnato al fattore “Area”, a indicare una differenziazione tra le due aree considerate, nonostante la non significatività del parametro.

**Tab. 4.17.** Risultati dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA) a tre fattori.

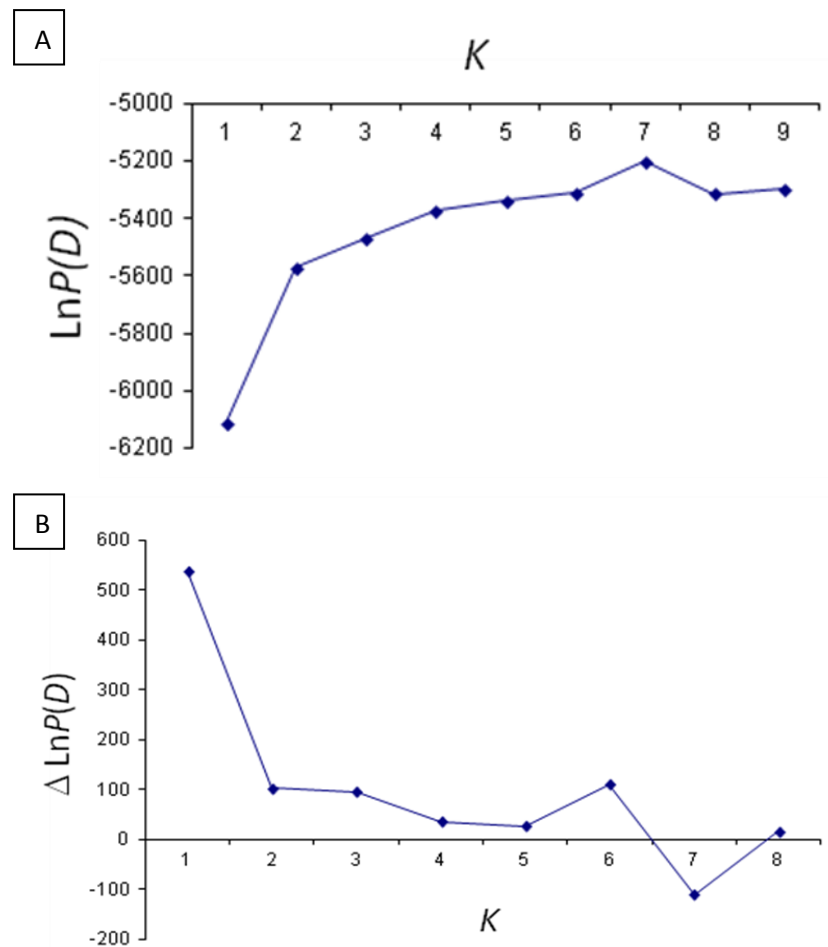
Sorgente di variazione	gL	Componente di varianza	% di varianza	$\Phi$ -statistica	P
Tra aree	1	1683.749	45.64	$\Phi_{CT} = 0.456$	0.067
Tra località entro aree	4	93.13	2.52	$\Phi_{SC} = 0.046$	< 0.001
Entro località	356	1912.208	51.83	$\Phi_{ST} = 0.482$	< 0.001

### Analisi di assegnazione bayesiana

Per  $K=2$ , le località sono risultate separate in due cluster nettamente distinti (Fig. 4.7): 1. Agadir e Tangeri; 2. Palma de Mallorca, Volos, Büyükada e Sozopol.

**Fig. 4.7.** Analisi di assegnazione bayesiana condotta mediante STRUCTURE 2.3 ( $1 < k < 9$ ). Nel grafico a barre, ciascuna barra verticale rappresenta uno dei 181 individui, raggruppati per località; l'asse y indica le percentuali di assegnazione di ciascun individuo ai due cluster (rosso e azzurro).

La scelta di  $K=2$  deriva dalla statistica di Evanno et al. (2005), in cui si può osservare chiaramente che il punto di maggiore decremento in entrambi i grafici si trova in corrispondenza del suddetto valore (Fig. 4.8).



**Fig. 4.8.** Andamento della probabilità a posteriori dei dati al variare di  $K$  (A) e andamento del decremento della probabilità a posteriori (B). Questo decremento è stato calcolato come  $\text{Ln}P(D_K) - \text{Ln}P(D_{K-1})$ . Il maggior decremento si ha in corrispondenza di  $K = 2$ , che è quindi il valore da accettare (Evanno et al., 2005).



**CAPITOLO 5**  
**DISCUSSIONE**

## 5.1 MULTIPLEX PCR

Parte del lavoro di Tesi ha interessato la messa a punto di due protocolli di amplificazione multiplex PCR per i loci microsatellitari presi in esame nello studio della struttura genetica di *Chthamalus montagui*: *Multiplex A* (loci CM4/3, CM5/23 e CM9/11) e *Multiplex B* (CM4/5 e CM5/18) (Tab. 3.2). Il lavoro di ottimizzazione dei suddetti protocolli è stato effettuato utilizzando primer non marcati con fluorescenza e, una volta scelte le concentrazioni dei reagenti e le condizioni termiche che restituivano i risultati migliori in termini di prodotto amplificato, sono state assegnate tre diverse fluorescenze ai primer forward. Al momento dell'applicazione dei protocolli multiplex PCR alle reazioni con primer fluorescenti, però, sono stati riscontrati problemi nell'amplificazione. Sulla base delle informazioni ottenute dalla letteratura, le differenze riscontrate tra le due reazioni sono state imputate alla presenza della marcatura fluorescente all'estremità 5' dei primer forward utilizzati (Yu *et al.*, 2010). Nella miscela di reazione necessaria al processo di amplificazione, infatti, tutte le molecole, inclusi i primer, influenzano i movimenti termici. Secondo il teorema dell'equipartizione dell'energia, la velocità del movimento termico di una molecola è inversamente proporzionale alla massa della molecola stessa (Pasquetto & Patrone, 1990). Di conseguenza, l'introduzione di una marcatura fluorescente aumenta la massa molecolare del primer, riducendo la sua velocità di movimento. Questo decremento di velocità diminuisce la probabilità che si verifichino collisioni efficaci tra i primer ed i DNA templati e, quindi, accentua la difficoltà nella formazione di un legame stabile tra primer e template (Yu *et al.*, 2010). Dato che la stabilità del legame primer-template è uno dei fattori che determina l'efficienza di amplificazione della PCR (Suzuki & Giovannoni, 1996; Wintzingerode *et al.*, 1997), la marcatura fluorescente aumenta la difficoltà di amplificazione in una reazione. Per ovviare a tale problematica, Yu *et al.* (2010) hanno messo a punto il cosiddetto "Programma con fase di *annealing* a gradiente decrescente": una maggiore durata della fase iniziale di appaiamento dovrebbe essere utile ad incrementare la possibilità che il primer marcato con fluorescenza acceda al DNA template e, quindi, ad aumentare l'accessibilità al legame primer-template. Successivamente ai cicli iniziali, la concentrazione delle molecole di DNA template può aumentare significativamente, con conseguente incremento della possibilità di legame primer-template; il decremento ad ogni ciclo successivo della durata della fase di appaiamento può evitare la probabile amplificazione aspecifica.

Nel presente lavoro, il programma messo a punto da Yu *et al.* (2010) è stato testato, in un primo momento, in reazioni che prevedevano l'amplificazione dei singoli loci e, successivamente, nelle reazioni di multiplex PCR. Per ciò che riguarda le reazioni singole, le prove effettuate in laboratorio hanno mostrato un evidente miglioramento dell'efficienza della reazione ed hanno portato alla messa a punto del profilo termico esposto nella Tabella 3.4, mentre, per ciò che concerne i protocolli multiplex PCR, non sono stati riscontrati miglioramenti tali da preferire il loro utilizzo nel presente studio di genetica di popolazione di *C. montagui*.

## 5.2 STRUTTURA DI *CHTHAMALUS MONTAGUI* NELL'AREA DI STUDIO

L'analisi dei microsatelliti in *C. montagui* ha messo in evidenza la presenza di un elevato numero di alleli nei sei loci considerati, con un valore medio di 39 alleli per locus (Tab. 4.7). Tra di essi, circa il 37% del totale è rappresentato da alleli privati (Tab. 4.6).

Le stime del parametro  $F_{IS}$  (Tab. 4.12) ed i valori esatti di probabilità ad essi associati ottenuti mediante un test di permutazione con 10000 pseudorepliche (Tab. 4.8) ed applicando la correzione sequenziale di Bonferroni (Tab. 4.9) evidenziano un significativo discostamento delle località considerate dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, in contrasto con i risultati ottenuti per *C. montagui* mediante l'uso degli alloenzimi (Pannacciulli *et al.*, 1997), ma concordi con i risultati ottenuti da Fontani (2009), utilizzando i medesimi loci microsatellitari del presente studio. Tale discostamento può essere notato, inoltre, dalle differenze riscontrate ponendo a confronto i valori di eterozigosità attesa ed osservata calcolati per ciascuna località (Tab. 4.7; Fig. 4.3). Deficit di individui eterozigoti sono stati frequentemente osservati in studi condotti su invertebrati marini (Zouros & Foltz, 1984; Gaffney, 1994; David *et al.*, 1997; Ayre & Hughes, 2000; Ridgway *et al.*, 2001; Addison & Hart, 2004; Duran *et al.*, 2004; Le Goff-Vitry *et al.*, 2004; Peijnenburg *et al.*, 2006; Andrade & Solferini, 2007; Costantini *et al.*, 2007; Pérez-Portela & Turon, 2008; Dupont *et al.*, 2009; Mokhtar-Jamai *et al.*, 2011; Palero *et al.*, 2011), inclusi quelli relativi a ctamali mediante uso di marcatori microsatellitari (Veliz *et al.*, 2006; York *et al.*, 2008), ma anche su specie di vertebrati marini, per esempio *Serranus cabrilla* (Schunter *et al.*, 2011a). La presenza di deficit di

individui eterozigoti può essere imputabile a diversi fattori: tecnici, quali la presenza di alleli nulli (Foltz, 1986; Callen *et al.*, 1993; Peijnenburg *et al.*, 2006; Puebla *et al.*, 2008; Palero *et al.*, 2011) e biologici, come il fenomeno dell'*inbreeding* o l'effetto Wahlund (Pogson *et al.*, 1995; Duran *et al.*, 2004, Plutchack *et al.*, 2006; Costantini *et al.*, 2007; Mokhtar-Jamai *et al.*, 2011), o ad entrambi i fattori (Schunter *et al.*, 2011a). Per ciò che concerne il presente lavoro, la causa del deficit di individui eterozigoti sembra dovuto a fattori biologici, in quanto *C. montagui* è una specie ermafrodita a fecondazione incrociata capace, in condizioni di isolamento, di compiere autofecondazione (Barnes & Barnes, 1958; Barnes, 1989) e, quindi, il deficit riscontrato potrebbe essere imputabile ad una situazione di *inbreeding* che si viene a creare in periodi caratterizzati da condizioni ambientali sfavorevoli. Inoltre, *C. montagui* occupa la parte più alta della zona intertidale in aree con moto ondoso moderato, quali baie ed estuari. Il deficit di eterozigoti riscontrato, perciò, potrebbe essere dovuto alla presenza di autofecondazione in periodi di isolamento dovuti sia alla ridotta presenza di acqua (periodo riproduttivo estivo, con forte evaporazione e moto ondoso molto ridotto), sia all'assenza di individui conspecifici nelle immediate vicinanze. Inoltre, la presenza di correnti locali potrebbe creare ristagni all'interno delle baie e degli estuari e promuovere la ritenzione larvale.

In linea generale sono stati riscontrati valori di eterozigosità osservata relativamente elevati nelle località considerate, in linea con studi condotti nelle medesime aree tramite microsatelliti su altre specie di crostacei ( $H_O=0.649-0.987$  Pascoal *et al.*, 2009;  $H_O=0.577-0.716$  Palero *et al.*, 2011) e su specie di gorgonie ( $H_O=0.58-0.83$  in Mokhtar-Jamai *et al.*, 2011) e teleostei ( $H_O=0.65-0.79$  Schunter *et al.*, 2011a).

Il confronto tra le stime di diversità genetica nelle sei località analizzate (Tab. 4.7), in particolare le differenze riscontrate fra i valori di  $H_O$  e  $N_A$ , rivelano un grado di diversità genetica apparentemente più elevato nelle tre località del bacino mediterraneo (Palma de Mallorca, Volos e Büyükada) e nella località di Sozopol (Mar Nero) rispetto alle due località del bacino atlantico (Agadir e Tangeri). In studi precedenti condotti sull'ostrica *Ostrea edulis* (Saavedra *et al.*, 1993) e sullo stesso *C. montagui* (Pannacciulli *et al.*, 1997; Fontani, 2009), tali differenze hanno portato ad affermare la presenza di un gradiente crescente di diversità genetica da ovest verso est, frutto delle caratteristiche della circolazione presente nel Mar Mediterraneo: a livello dello Stretto di Gibilterra, infatti, la massa di acqua entrante occupa lo strato superficiale della colonna d'acqua, mentre il flusso uscente dallo Stretto interessa lo strato profondo (Endler, 1977). Questo

tipo di circolazione influenzerebbe la dispersione delle larve del cirripede *C. montagui* (Pannacciulli *et al.*, 1997), in quanto esse vivono negli strati superficiali della colonna d'acqua; le caratteristiche evidenziate a livello dello Stretto di Gibilterra, quindi, permettono alle larve provenienti dall'Oceano Atlantico di entrare all'interno del bacino mediterraneo, ma non viceversa, provocando, in primo luogo, una tendenza all'accumulo di alleli dall'O. Atlantico verso il Mar Mediterraneo e, successivamente, un gradiente di accumulo diretto verso est all'interno del bacino mediterraneo, in linea con il percorso della circolazione superficiale. Situazioni analoghe sono state riscontrate nel chetognato *Sagitta setosa* (Peijnenburg *et al.*, 2006), specie oloplanctonica ad alta dispersione, ma geneticamente strutturata e nel decapode *Palinurus elephas* (Palero *et al.*, 2011), anch'esso ad alta dispersione larvale. Tuttavia, per ciò che concerne il presente studio, i valori ottenuti con il *t*-test a due code per coppie di località, basato sui valori di  $H_S$  (Tab. 4.10; Tab. 4.11), non sono risultati significativi, quindi l'ipotesi appena esposta non è stata confermata; tale discordanza con i lavori pregressi (in particolare con Fontani, 2009), potrebbe essere causata dal numero esiguo di località analizzate nel presente lavoro (sei località, di cui solamente due atlantiche).

I valori medi del parametro  $F_{ST}$  per ciascun locus (Tab. 4.12) risultano omogenei, eccezione fatta per il locus CM2/15 che, presentando un valore medio di  $F_{ST} = 0.136$  e discostandosi in modo evidente dai valori degli altri loci ( $F_{ST} = 0.032-0.064$ ), contribuisce in maniera marcata alla divergenza genetica tra le località. Analizzando nel dettaglio le frequenze alleliche nel locus in questione, l'allele 152 è risultato più frequente nel bacino atlantico rispetto al quello mediterraneo. L'allele 152 in Atlantico domina rispetto ai restanti alleli presenti, mentre in Mediterraneo è nettamente meno frequente (Fig. 4.4).

Dai valori di  $F_{ST}$  e di  $Nm$  ottenuti (Tab. 4.13; Tab. 4.14), dall'osservazione del grafico nMDS (Fig.4.5), dell'albero NJ (Fig.4.6), dall'analisi della varianza molecolare (Tabb. 4.15, 4.16 e 4.17) e dai risultati ottenuti dall'analisi di assegnazione bayesiana (Fig. 4.7), si riscontra una differenza netta tra le località atlantiche (Agadir e Tangeri) e le restanti località, in accordo con studi pregressi effettuati su *C. montagui* (Dando & Southward, 1981; Pannacciulli *et al.*, 1997; Fontani, 2009).

Secondo Dando & Southward (1981), gli eventi storici che hanno caratterizzato la formazione del Mediterraneo avrebbero promosso la differenziazione di *C. montagui* tra i due bacini ed il pattern idrografico attuale sarebbe responsabile del mantenimento di

tale divergenza. Infatti, nel periodo successivo alla crisi della salinità del Messiniano (circa 5.5 Mya) (Hsu *et al.*, 1977; McCullach & De-Deckker, 1989), la comunicazione tra Oceano Atlantico e Mar Mediterraneo venne ristabilita e le condizioni ambientali furono completamente ripristinate durante il Pliocene (5.4-1.8 Mya). Nel Pleistocene (1.8-0 Mya), ed in particolare durante il Quaternario, vi fu poi un alternarsi di periodi glaciali freddi ed interglaciali caldi associato a regressioni e trasgressioni marine (Blanc, 1968). Proprio durante questo alternarsi di fasi, si sarebbe venuta a creare la divergenza genetica presente tra le due aree.

I bassi valori di *Nm* tra la località di Palma de Mallorca e le località di Tangeri (a livello dello Stretto di Gibilterra, sul versante atlantico) e Agadir (O. Atlantico) supportano l'ipotesi che il Fronte Almeria-Oran (FAO) sia la maggiore barriera al flusso genico tra Atlantico e Mediterraneo e che, quindi, esso rappresenti il fattore determinante il mantenimento della divergenza genetica tra i due bacini. Il ruolo di barriera biogeografica che il FAO assume nella strutturazione genetica di *C. montagui* è stato evidenziato in molti altri organismi appartenenti ai più svariati taxa, dagli invertebrati, come il bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Quesada *et al.*, 1995; Sanjuan *et al.*, 1996; Ladoukakis *et al.*, 2002), il chetognato *Sagitta setosa* (Peijnenburg *et al.*, 2006), il riccio *Paracentrotus lividus* (Calderón *et al.*, 2008; Maltagliati *et al.* 2010), la gorgonia rossa *Paramuricea clavata* (Mokhtar-Jamai *et al.*, 2011) ed il decapode *Palinurus elephas* (Palero *et al.*, 2011), ai vertebrati, come i teleostei *Merluccius merluccius* (Roldán *et al.*, 1998) *Engraulis encrasicolus* (Magoulas *et al.*, 1996; 2006), *Coris julis* (Fruciano *et al.*, 2011), *Serranus cabrilla* (Schunter *et al.*, 2011a) e *Mugil cephalus* (Durand *et al.*, 2013), fino alle fanerogame marine *Zostera marina* (Olsen *et al.*, 2004) e *Zostera noltii* (Coyer *et al.*, 2004) (un'estesa rassegna è riportata in Patarnello *et al.*, 2007). Galarza *et al.* (2009) hanno investigato sette specie di teleostei costieri, comprendendo il maggior numero di caratteristiche vitali riscontrate in questa tipologia di pesci. L'ipotesi prevedeva che le specie caratterizzate da fasi pelagiche prolungate e distribuzione *offshore* delle larve fossero più adatte a disperdersi su una maggiore distanza rispetto alle specie con fase pelagica ridotta o assente e distribuzione *inshore* (Mora *et al.*, 2003) e che, di conseguenza, vi fosse un diverso effetto delle barriere idrografiche. I risultati hanno mostrato un effetto di FAO sulla struttura genetica delle specie, ma non è stata rilevata una correlazione evidente tra le caratteristiche vitali ed i pattern osservati. Medesimo risultato è stato ottenuto in uno studio su sette specie di crostacei decapodi appartenenti a batimetrie differenti (García-

Merchán *et al.*, 2012) ed in *Aristeus antennatus* (Fernández *et al.*, 2011). È stato rilevato anche il caso in cui specie con caratteristiche biologiche simili abbiano presentato risultati discordanti riguardo alla struttura genetica (Bargelloni *et al.*, 2003). Vi sono, poi, specie che non presentano strutturazione genetica evidente nel bacino di studio e che, quindi, non sembrano essere interessate dalla presenza del FAO, come ad esempio la cernia bruna *Epinephelus marginatus* (Schunter *et al.*, 2011b) ed il decapode *Scyllarides latus* (Faria *et al.*, 2013).

I risultati del presente lavoro hanno evidenziato, inoltre, differenze meno marcate fra Palma de Mallorca e le tre località del bacino mediterraneo orientale (Volos, Büyükada e Sozopol), probabilmente riconducibili sia ad una differenza delle caratteristiche ambientali presenti nel Mar Nero, molto simili a quelle dell'Adriatico, e nel Mar Egeo rispetto a quelle presenti nel bacino occidentale (McLellan, 1965; Fairbridge, 1966), sia alla possibile presenza di una barriera biogeografica tra i bacini occidentali ed orientali del Mediterraneo, probabilmente in corrispondenza del Canale di Sicilia e/o dello Stretto di Messina.

Infine, dai risultati del presente lavoro è emerso che la località di Sozopol, situata nel Mar Nero, non si discosta geneticamente dalle località del bacino mediterraneo orientale, nonostante la presenza dello Stretto dei Dardanelli (SD). Questa similarità genetica, in accordo con studi pregressi (Pannacciulli *et al.*, 1997), sembra essere dovuta al fatto che *C. montagui*, come molte altre specie mediterranee, abbia ricolonizzato il Mar Nero in seguito alla riapertura dallo SD durante il Quaternario (Ekman, 1953). Attualmente, il movimento delle masse d'acqua attraverso SD avviene in direzione del Mediterraneo, eccetto che nel periodo autunnale in cui le correnti superficiali possono invertire il flusso (Pektas, 1958). In primavera ed in estate, durante la stagione riproduttiva di *C. montagui* (Pannacciulli & Falautano, 1999; Pannacciulli & Relini, 1999), le correnti superficiali a livello dello SD scorrono dal Mar Nero verso il Mediterraneo e, di conseguenza, le larve provenienti dal Mar Nero hanno la possibilità di colonizzare in maniera massiccia ed influenzare la diversità genetica del Mar Egeo, facendo del Mar Nero una "sorgente di alleli". L'assenza di una divergenza genetica tra il bacino mediterraneo ed il Mar Nero non sorprende, poiché in letteratura sono pochi i casi in cui si ha un effetto contemporaneo del FAO e dello SD sul flusso genico degli organismi all'interno dell'area oggetto del presente studio (Peijnenburg *et al.*, 2006; Durand *et al.*, 2013).

**CAPITOLO 6**  
**CONCLUSIONI**



Per ciò che concerne la parte tecnica, il presente studio è stato il primo ad aver intrapreso un lavoro di sviluppo di protocolli multiplex PCR per i loci microsatellitari utilizzati; questo step, in accordo con i progetti futuri riguardanti la genetica di popolazione di *Chthamalus montagui*, risulta essere un ottimo trampolino di lancio per futuri lavori di ottimizzazione di tali protocolli per l'utilizzo di primer fluorescenti e, di conseguenza, per le analisi utili alla genetica di popolazione.

I dati genetici acquisiti nel presente studio, condotto sulla struttura genetica di *Chthamalus montagui*, hanno permesso, in primo luogo, di arricchire il dataset già esistente per la specie in questione; hanno confermato, inoltre, la presenza di divergenza genetica tra il bacino atlantico ed il bacino mediterraneo e, per la prima volta, hanno messo in luce la presenza di similarità genetiche tra il Mar Nero ed il Mar Egeo.

La lieve divergenza genetica messa in evidenza tra Palma de Mallorca ed il bacino orientale del Mar Mediterraneo, inoltre, risulta essere un ottimo punto di partenza per future indagini sulla struttura genetica di *Chthamalus montagui* all'interno del Mar Mediterraneo, sia mediante l'utilizzo di marcatori nucleari, come i microsatelliti, sia tramite l'analisi con marcatori mitocondriali.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Addison JA & Hart MW, 2004. Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites. *Marine Biology*, **144**: 251.
- Aljanabi SM and Martinez I, 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4692-4693.
- Andrade SCS & Solferini VN, 2007. Fine-scale genetic structure overrides macro-scale structure in a marine snail: nonrandom recruitment, demographic events or selection? *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**: 23-36.
- Archie JW, 1985. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. *Evolution*, **39**: 623-637.
- Arnheim N & Erlich H, 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annual Review of Biochemistry*, **61**: 131-156.
- Ayre DJ & Hughes TP, 2000. Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the Great Barrier Reef, Australia. *Ecology*, **54**: 1590-1605.
- Bargelloni L, Alarcon JA, Alvarez MC, Penzo E, Magoulas A, Reis C & Patarnello T, 2003. Discord in the family Sparidae (Teleostei): divergent phylogeographical patterns across the Atlantic-Mediterranean divide. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**(6): 1149-1158.
- Barnes H & Barnes M, 1958. Further observations on self-fertilisation in *Chthamalus* sp. *Ecology*, **39**: 550.
- Barnes M, 1989. Egg production in Cirripedia. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, **27**: 91-166.
- Barnes RD, 1972. *Zoologia degli invertebrati*. Piccin Editore, Padova, 1098 pp.
- Beckmann JS & Soller M, 1990. Toward a Unified Approach to Genetic Mapping of Eukaryotes Based on Sequence Tagged Microsatellite Sites. *Bio/Technology* **8**: 930-932.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N & Bonhomme F, 2000. Genetix, A Windows<sup>TM</sup> Based Software for Population Genetic Analyses. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bell GI & Jurka J, 1997. The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. *Journal of Molecular Evolution*, **44**: 414-421.
- Blanc JJ, 1968. Sedimentary geology of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine Pollution Bulletin*, **40**: 367-376.
- Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C & Little S, 1997. The elimination of primer dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research*, **25**: 3235-3241.

- Bullini L, Pignatti S & Virzo De Santo A, 1998. *Ecologia generale*. UTET, Torino, 520 pp.
- Burrows MT, 1988. The comparative biology of *Chthamalus stellatus* (Poli) and *Chthamalus montagui* Southward. PhD Thesis, University of Manchester, UK, 318 pp.
- Burrows MT, Hawkins SJ & Southward AJ, 1992. A comparison of reproduction in co-occurring chthamalid barnacles, *Chthamalus stellatus* (Poli) and *Chthamalus montagui* Southward. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **160**: 229-249.
- Calabrese P & Durrett R, 2003. Dinucleotide repeats in the *Drosophila* and human genomes have complex, lengthdependent mutation processes. *Molecular Biology and Evolution*, **20**: 715-725.
- Calderón I, Giribet G & Turon X, 2008. Two markers and one history: phylogeography of the edible common sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Lusitanian region. *Marine Biology*, **154**: 137-151.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC & Sutherland GR, 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, **52**: 922-927.
- Cavalli-Sforza LL & Edwards AWF, 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, **19**: 233-257.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN & Caskey CT, 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, **16**: 11141-11156.
- Clarke KR & Warwick RM, 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition. PRIMER-E, Plymouth.
- Cognetti & Maltagliati, 2000. Biodiversity and adaptive mechanisms in brackish water fauna. *Marine Pollution Bulletin*, **40**(1): 7-14.
- Cognetti G & Maltagliati F, 2004. Strategies of genetic biodiversity conservation in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, **48**: 811-812.
- Cognetti G, Sarà M & Magarrù M, 2004. *Biologia marina*. Calderini, 594 pp.
- Connell JH, 1961. The influence of interspecific competition and other factors on the distribution of the barnacle *Chthamalus stellatus*. *Ecology*, **42**: 710-723.
- Connell JH, 1978. Diversity in tropical rainforests and coral reefs. *Science*, **199**: 1302-1310.
- Costantini F, Fauvelot C & Abbiati M, 2007. Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellites and nuclear sequences. *Molecular Ecology*, **16**: 5168-5182.

- Coyer JA, Diekmann OE, Serrão EA, Procaccini G, Milchakova N, Pearson GA, Stam WT & Olsen JL, 2004. Population genetics of dwarf eelgrass *Zostera noltii* throughout its biogeographic range. *Marine Ecology Progress Series*, **281**: 51-62.
- Crisp DJ, Southward AJ & Southward EC, 1981. On the distribution of the intertidal barnacles *Chthamalus stellatus*, *Chthamalus montagui* and *Euraphia depressa*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **61**: 359-380.
- Dando PR & Southward AJ, 1981. Existence of 'Atlantic' and 'Mediterranean' forms of *Chthamalus montagui* (Crustacea, Cirripedia) in the Western Mediterranean. *Marine Biology Letters*, **2**: 239-248.
- Dando PR, Southward AJ & Crisp DJ, 1979. Enzyme variation in *Chthamalus stellatus* and *Chthamalus montagui* (Crustacea, Cirripedia) – evidence for the presence of *Chthamalus montagui* in the Adriatic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **59**: 307-320.
- Darwin C, 1851. Living Cirripedia, A monograph on the sub-class Cirripedia, with figures of all the species. The Lepadidæ; or, pedunculated cirripedes. Vol. 1. C & J Adlard Printers, Bartholomew Close. Printed for The Ray Society, 400 pp.
- Darwin C, 1854. Living Cirripedia, The Balanidæ, (or sessile cirripedes); the Verrucidæ. Vol. 2. C & J Adlard Printers, Bartholomew Close. Printed for The Ray Society.
- Darwin C, 1859. On the origin of species. John Murray, London.
- David P, Perdieu MA, Pernot AF & Jarne P, 1997. Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution*, **51**: 1318-1322.
- Delany J, Myers AA, Mcgrath D, O'Riordan RM & Power AM, 2003. Role of the post-settlement mortality and 'supply-side' ecology in setting patterns of intertidal distribution in the chthamalid barnacles *Chthamalus montagui* and *C. stellatus*. *Marine Ecology Progress Series*, **249**: 207-214.
- Dieringer D & Schlötterer, 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, **3**(1): 167-169.
- Di Rienzo A, Peterson A, Garza J, Valdes A & Slatkin M, 1994. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, **91**: 3166-3170.
- Doolittle WF & Sapienza C, 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, **284**: 601-603.
- Dupont S, Thorndike W, Thorndike MC & Burke RD, 2009. Neutral development of brittlestar *Amphiura filiformis*. *Development genes and evolution*, **219**(3): 159-166.
- Duran S, Pascual M, Estoup A & Turon X, 2004. Strong population structure in the marine sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida) as revealed by microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **13**: 511-522.

- Durand JD, Blel H, Shen KN, Koutrakis ET & Guinard B, 2013. Population genetic structure of *Mugil cephalus* in the Mediterranean and Black Seas: a single mitochondrial clade and many nuclear barriers. *Marine Ecology Progress Series*, **474**: 243-261.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA & Caskey CT, 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, **49**: 746-756.
- Efron B, 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Annals of Statistics*, **7**: 1-26., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**: 2611-2620.
- Ekman S, 1953. Zoogeography of the sea. Sidgwick & Jackson (eds.), London, 412 pp.
- Ellegren H, 2004. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, **5**: 435-445.
- Endler JA, 1977. Geographic variation, speciation and clines. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Evanno G, Regnaut S & Goudet J, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**(8): 2611-2620.
- Excoffier L, Smouse P & Quattro J, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479-491.
- Fairbridge RW, 1966. The encyclopedia of oceanography. Reinhold Publishing Corporation, New York.
- Falush D, Stephens M & Pritchard JK, 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* **164**(4): 1567-1587.
- Faria J, Froufe E, Tuya F, Alexandrino P & Pérez-Losada M, 2013. Panmixia in the endangered slipper lobster *Scyllarides latus* from the Northeastern Atlantic and Western Mediterranean. *Journal of Crustacean Biology*, **33**(4): 557-566.
- Feldman MW, Bergman A, Pollock DD & Goldstein DB, 1997. Microsatellite genetic distances with range constraints: analytic description and problems of estimation. *Genetics*, **145**: 207-216.
- Felsenstein J, 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fernández M, Heras S, Maltagliati F, Turco A & Roldan M, 2011. Genetic structure in the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* and the role played by hydrographical and oceanographical barriers. *Marine Ecology Progress Series*, **421**: 163-171.
- Foltz DW, 1986. Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. *Evolution*, **40**: 869-870.

- Fontani S, 2009. Genetic biodiversity of the European barnacle *Chthamalus montagui*. Ph. D. Thesis (Not Published Data), University of Plymouth, UK.
- Foster BA, 1971. Desiccation as a factor in the intertidal zonation of barnacles. *Marine Biology*, **8**: 12-29.
- Fruciano C, Hanel R, Debes PV, Tigano C & Ferrito V, 2011. Atlantic-Mediterranean and within-Mediterranean molecular variation in *Coris julis* (L.1758) (Teleostei, Labridae). *Marine Biology*, **158**: 1271-1286.
- Gaffney PM, 1994. Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light?. In: *Genetics and evolution of aquatic organisms*, Beaumont AR (ed.), Chapman & Hall, London, 146-153 pp.
- Galarza JA, Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M, Roques S, Turner GF & Rico C, 2009. The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(5): 1473-1478.
- García-Merchán VH, Robainas-Barcia A, Abelló P, Macpherson E, Palero F, García-Rodríguez M, Gil del Sola L & Pascual M, 2012. Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic-Mediterranean transition. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **62**(2): 664-672.
- Garza JC, Slatkin M & Freimer NB, 1995. Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution*, **12**: 594-603.
- Gray JS, 1997. Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation*, **6**: 153-175.
- Hardy GH, 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, **28**(706): 49-50.
- Hartl DL & Clark AG, 1989. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 682 pp.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH & Vogt PH, 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, **23**: 504-511.
- Hickman CP Jr, Roberts LS & Larson A, 2003. *Diversità animale*. McGraw-Hill, Milano, 403 pp.
- Hillis DM, Moritz C & Mable BK, 1996. *Molecular Systematics – 2<sup>nd</sup> Edition*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA, 655 pp.
- Holm S, 1979. A simple sequential rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, **6**: 65-70.
- Hsü KJ, Montadert L, Bernoulli D, Cita MB, Erickson A, Garrison RE, Kidd RB, Mèlières F, Müller C & Wright R, 1977. History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature*, **267**: 399-403.

- Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao YP, Ganten D, Dzau VJ & Lander ES, 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. *Cell*, **67**: 213-224.
- Jenkins SR, 2005. Larval habitat selection, not larval supply, determines settlement patterns and adult distribution in two chthamalid barnacles. *Journal of Animal Ecology*, **74**: 893-904.
- Kao TW, Pao HP & Park C, 1977. Surface intrusions, fronts and internal waves: a numerical study. *Journal of Geophysical Research*, **83**: 4641-4650.
- Kendall MA & Bedford ML, 1987. Reproduction and recruitment of the barnacle *Chthamalus montagui* at Aberystwyth (mid-Wales). *Marine Ecology Progress Series*, **38**: 305-308.
- Kimmel M & Chakraborty R, 1996. Measures of variation at DNA repeat loci under a general stepwise mutation model. *Theoretical Population Biology*, **50**: 345-367.
- Kimmel M, Chakraborty R, Stivers DN & Deka R, 1996. Dynamics of repeat polymorphisms under a forwardbackward mutation model: within- and between-population variability at microsatellite loci. *Genetics*, **143**: 549-555.
- Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD & Aquadro CF, 1998. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, **95**: 10774-10778.
- Ladoukakis ED, Saavedra C, Magoulas A & Zouros E, 2002. Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Molecular Ecology*, **11**(4): 755-769.
- La Violette PE, 1987. Portion of Western Mediterranean Circulation Experiment completed. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, **68**(9): 123-124.
- Le Goff-Vitry MC, Pybus OG & Rogers AD, 2004. Genetic structure of the deep-sea coral *Lophelia pertusa* in the northeast Atlantic revealed by microsatellite and internal transcribed spacer sequences. *Molecular Ecology*, **13**: 537-549.
- Lessa EP, 1990. Multidimensional-analysis of geographic genetic-structure. *Systematic Zoology*, **39**: 242-252.
- Magoulas A, Castilho R, Caetano S, Marcato S & Patarnello T, 2006. Mitochondrial DNA reveals a mosaic pattern of phylogeographical structure in Atlantic and Mediterranean populations of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **39**: 734-746.
- Magoulas A, Tsimenides N & Zouros E, 1996. Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Molecular Biology and Evolution*, **13**(1): 178-190.



- Maltagliati F, Di Giuseppe G, Barbieri M, Castelli A & Dini F, 2010. Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Biological Journal of Linnean Society*, **100**: 910-923.
- Markoulatos P, Siafakas N & Moncany M, 2002. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **16**: 47-51.
- McCullach MT & De-Deckker P, 1989. Sr isotope constraints on the Mediterranean environment at the end of the Messinian salinity crisis. *Nature*, **342**: 62-65.
- McLellan HJ, 1965. *Elements of Physical Oceanography*. Oxford, Pergamon Press.
- Miller RG, 1974. The jackknife. A review. *Biometrika*, **61**: 1-17.
- Mokhtar-Jamai K, Pascual M, Ledoux JB, Coma R, Féral JP, Garrabou J & Aurelle D, 2011. From global to local genetic structuring in the red gorgonian *Paramuricea clavata*: the interplay between oceanographic conditions and limited larval dispersal. *Molecular Ecology*, **20**(16): 3291-3305.
- Mora C, Chittaro PM, Sale PF, Kritzer JP & Ludsin SA, 2003. Patterns and processes in reef fish diversity. *Nature*, **421**: 933-936.
- Mutter GL & Boyton KA, 1995. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. *Nucleic Acids Research*, **23**: 1411-1418.
- Nauta MJ & Weissing FJ, 1996. Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics*, **143**: 1021-1032.
- Nei M, 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**(12): 3321-3323.
- Nevo E, Beiles A & Ben-Shlomo R, 1984. The evolutionary significance of genetic diversity: ecological, demographic and life history correlates. In: *Evolutionary Dynamics of Genetic Diversity. Lecture Notes in Biomathematics*. G.S.Mani (ed.) **53**: 13-213.
- Newman WA & Ross A, 1976. Revision of the balanomorph barnacles; including a catalog of the species. *San Diego Society of Natural History, Memoir* **9**: 1-108.
- Oğuz T & Sur I, 1989. A two-layer model of water exchange through the Dardanelles Strait. *Oceanologica Acta*, **12**(1): 23-31.
- Ohta T & Kimura M, 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Research*, **22**: 201-204.
- Olsen JK, Stam WT, Coyer JA, Reusch TBH, Billingham M, Boström C, Calvert E, Christie H, Granger S, La Lumière R, Milchakova N, Oudot-Le Secq MP, Procaccini G, Sanjabi B, Serrão E, Veldsink J, Widdicombe S, Wyllie-Echeverria S, 2004. North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L. *Molecular Ecology*, **13**(7): 1923-1941.

- Orgel LE & Crick FH, 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, **284**: 604-607.
- Özsoy E, Oğuz T, Latif MA, & Ünlüata Ü, 1986. Oceanography of the Turkish Straits – First Annual Report, vol 1, Physical Oceanography of Turkish Straits. Technical Report submitted to the Istanbul Water and Sewerage Administration, Inst. Mar. Sci., Middle East Tech. Univ., 108 p.
- Palero F, Pascual M & Beaumont M, 2011. Effect of oceanographic barriers and overfishing on the population genetic structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*): influence of current oceanographical features and historical processes. *Molecular, Phylogenetics and Evolution*, **48**: 708-717.
- Pannacciulli FG, Bishop JDD & Hawkins SJ, 1997. Genetic structure of populations of two species of *Chthamalus* (Crustacea: Cirripedia) in the north-east Atlantic and Mediterranean. *Marine Biology*, **128**: 73-82.
- Pannacciulli FG & Falautano M, 1999. Time of larval release in barnacles of the genera *Chthamalus* and *Euraphia* in the Gulf of Genoa (Ligurian Sea) and in the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Biologia Marina Mediterranea*, **6**(1): 407-410.
- Pannacciulli FG & Relini G, 1999. Time of settlement in barnacles of the genus *Chthamalus* in the Gulf of Genoa (Ligurian Sea) and the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Biologia Marina Mediterranea*, **6**(1): 411-414.
- Pannacciulli FG & Relini G, 2000. The vertical distribution of *Chthamalus montagui* and *Chthamalus stellatus* (Crustacea, Cirripedia) in two areas of the NW Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, **426**: 105-112.
- Pannacciulli FG, Piyapattanakorn S, Bishop JDD, Hawkins SJ & Maclean N, 2005. Isolation of highly polymorphic microsatellite markers from the intertidal barnacle *Chthamalus montagui* Southward. *Molecular Ecology Notes*, **5**(3): 641-643.
- Pascoal S, Creer S, Taylor MI, Queiroga H, Carvalho G & Mendo S, 2009. Development and application of microsatellites in *Carcinus maenas*: genetic differentiation between northern and central Portuguese populations. *PlosOne*, **4**: e7268.
- Pasquetto S & Patrone L, 1990. *Chimica Fisica vol.3*. Masson Editore, 480 pp.
- Patarnello T, Volckaert FA & Castilho R, 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break. *Molecular Ecology*, **16**(21): 4426-4444.
- Peakall R & Smouse P, 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, **28**(19): 2537-2539.
- Peijnenburg KTCA, Fauvelot C, Breeuwer JAJ & Menken SBJ, 2006. Spatial and temporal genetic structure of the planktonic *Sagitta setosa* (Chaetognatha) in the European seas as revealed by mitochondrial and nuclear DNA markers. *Molecular Ecology*, **15**: 3319-3338.

- Pektas H, 1958. The influence of the Mediterranean water on the hydrography of the Black Sea. Rapport et Procés-Verbaux del Réunions de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée, **14**: 85-93.
- Pérez-Losada M, Harp M, Hoehg JT, Achituv Y, Jones D, Watanabe H & Crandall KA, 2008. The tempo and mode of barnacle evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46**: 328-346.
- Pérez-Portela R & Turon X, 2008. Cryptic divergence and strong population structure in *Pycnoclavella communis* (Ascidiacea) inferred from COI and microsatellite data. *Zoology* **111**: 163-178.
- Pilsbry HA, 1916. The sessile barnacles (Cirripedia) contained in the collections of the U.S. National Museum; including a monograph of the American species. *Bulletin United States Natural Museum*, **93**: 1-366.
- Plutchak LL, Simmons RE & Woodruff DS, 2006. Multilocus allozyme heterozygote deficiencies in *Crepidula onyx*: geographic and temporal patterns among adult snails in Mission Bay, California. *Journal of Molluscan Studies*, **72**: 337-348.
- Pogson GH, Mesa KA & Boutilier RG, 1995. Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics*, **139**: 375-385.
- Pollock DD, Bergman A, Feldman MW & Goldstein DB, 1998. Microsatellite behavior with range constraints: parameter estimation and improved distances for use in phylogenetic reconstruction. *Theoretical Population Biology*, **53**: 256-271.
- Power AM, Myers AA, O'Riordan RM, McGrath D & Delany J, 2001. An investigation into rock surface wetness as a parameter contributing to the distribution of the intertidal barnacle *Chthamalus stellatus* (Poli) and *Chthamalus montagui*. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **52**: 349-356.
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945-959.
- Procaccini G & Maltagliati F, 2003. Approcci metodologici all'analisi della diversità genetica di organismi bentonici. In: *Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo*. Gambi MC & Dappiano M (eds.). *Biologia Marina Mediterranea (suppl.)*, **10**: 509-548.
- Puebla O, Seignny JM, Sainte-Marie B, Brethes JC, Burmeister A, Dawe EG & Moriyasu M, 2008. Population genetic structure of the snow crab (*Chionoecetes opilio*) at the Northwest Atlantic scale. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **3**: 425-436.
- Quesada H, Beynon CM & Skibinski DO, 1995. A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* LMK: Pleistocene vicariance biogeography and secondary intergradation. *Molecular Biology and Evolution*, **12**(3): 521-524.
- Raymond M & Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**:248-249.

- Relini G, 1980. Cirripedi Toracici. AQ/1/91 2. Consiglio Nazionale delle Ricerche, 177 pp.
- Ridgway T, Hoegh-Guldberg O & Ayre DJ, 2001. Panmixia in *Pocillopora verrucosa* from South Africa. *Marine Biology*, **139**: 175-181.
- Riedl R, 2005. Fauna e Flora del Mediterraneo. Franco Muzzio Editore, Padova, 777 pp.
- Riley K, 2002. *Chthamalus montagui*. Montagu's stellate barnacle. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [<http://www.marlin.ac.uk/speciesbibliography.php?hPhylum=2326&species=2981>]. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom.
- Rithidech KN, Dunn JJ & Gordon CR, 1997. Combining multiplex and touch down PCR to screen murine microsatellite polymorphisms. *BioTechniques*, **23**: 36-45.
- Roldán MI, Garcia-Marin JL, Utter FM & Pla C, 1998. Population genetic structure of European hake, *Merluccius merluccius*. *Heredity*, **81**: 327-334.
- Saavedra C, Zapata C, Guerra A & Alvarez G, 1993. Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, **115**: 85-95.
- Sanjuan A, Comesana AS & DeCarlos A, 1996. Macrogeographic differentiation by mtDNA restriction site analysis in the SW European *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **198**: 89-100.
- Schneider S, Roessli D & Excoffier L, 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva; Geneva.
- Schunter C, Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Tintoré J, Vidal-Vijande E, Pascual A, Guidetti P & Pascual M, 2011a. Matching genetics with oceanography: directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Molecular Ecology*, **20**: 5167-5181.
- Schunter C, Carreras-Carbonell J, Planes S, Sala E, Ballesteros E, Zabala M, Harmelin JG, Harmelin-Vivien M, Macpherson E & Pascual M, 2011b. Genetic connectivity patterns in an endangered species: The dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **401**(1-2): 126-133.
- Shemesh E, Huchon D, Simon-Blecher N & Achituv Y, 2009. The distribution and molecular diversity of the Eastern Atlantic and Mediterranean chthamalids (Crustacea, Cirripedia). *Zoologica Scripta*, **34**(4): 365-378.
- Shriver MD, Jin L, Chakraborty R & Boerwinkle E, 1993. VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model: a computer simulation approach. *Genetics*, **134**: 983-993.
- Shuber AP, Skoletsky J, Stern R & Handelin BL, 1993. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Human Molecular Genetics*, **2**: 153-158.
- Slatkin M, 1985. Rare alleles as indicators of gene flows. *Evolution*, **39**(1): 53-65.

- Slatkin M, 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**: 787-792.
- Slatkin M, 1994. Gene flow and population structure. In: *Ecological genetics*, Real LA (ed.). Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 3-17 pp.
- Southward AJ, 1976. On the taxonomic status and distribution of *Chthamalus stellatus* (Cirripedia) in the North Eastern Atlantic region: with key to the common intertidal barnacles of Britain. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, **56**: 1007-1028.
- Stefanini FM & Feldman MW, 2000. Bayesian estimation orange for microsatellite loci. *Genetic Research*, **75**: 167177.
- Stephenson TA & Stephenson A, 1972. Life between tide marks on rocky shores. Freeman WH & co. (eds.). San Francisco, 425 pp.
- Stern C, 1943. The Hardy–Weinberg law. *Science*, **97**: 137-138.
- Stubbings HG, 1975. *Balanus balanoides*. Liverpool University Press, Liverpool, 175 pp.
- Suzuki MT & Giovannoni SJ, 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 625-630.
- Tintoré J, La Violette PE, Blade I & Cruzado A, 1988. A study of an intense density front in the Eastern Alboran Sea: the Almeria-Oran Front. *Journal of Physical Oceanography*, **18**: 1384-1397.
- Valdes AM, Slatkin M & Freimer NB, 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics*, **133**: 737-749.
- Veliz D, Duchesne P, Bouget E & Bernatchez L, 2006. Genetic evidence for kin aggregation in the intertidal acorn barnacle (*Semibalanus balanoides*). *Molecular Ecology*, **15**: 4193-4202.
- Wagner A, Blackstone N, Cartwright P, Dick M, Misof B, Snow P, Wagner GP, Bartels J, Murtha M & Pendleton J, 1994. Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *Systems Biology*, **43**: 250-261.
- Wang DP, 1984. Mutual intrusions of a current and density front formation. *Journal of Physical Oceanography*, **7**: 1191-1199.
- Weber JL, 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, **7**: 524-530.
- Weber JL & Wong C, 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, **2**: 1123-1128.
- Weinberg W, 1908. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahresh. Ver. Vaterl. Naturkd. Württemb*, **64**: 369-382. (traduzione in inglese: Boyer, 1963; Jameson, 1977).

- Weir BS, 1990. Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Massachusetts, 377 pp.
- Weir BS, 1996. Intraspecific differentiation. In: Molecular Systematics. Hillis DM, Moritz C & Mable BK (eds.). Sinauer Associates, Massachusetts, 385-406 pp.
- Weir BS & Cockerham CC, 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.
- Wintzingerode FV, Göbel UB & Stackebrandt E, 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, **21**: 213-229.
- Wright S, 1943. Isolation by distance. *Genetics*, **28**: 114-138.
- Wright S, 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics*, **15**: 323-354.
- Wright S, 1978. Evolution and genetics of populations. Vol. 2. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press., Chicago, 580 pp.
- York KL, Blackett MJ & Appleton BR, 2008. The Bassian Isthmus and the major ocean currents of southern Australia influence the phylogeography and population structure of a southern Australian intertidal barnacle *Catomerus polymerus* (Darwin). *Molecular Ecology*, **17**: 1948-1961.
- Yu SL, Tang YQ, Li Y, Zhang H & Wu XL, 2010. Gradient decrement of annealing time can improve PCR with fluorescent-labeled primer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **110**(4): 500-504.
- Zhivotovsky LA, 1999. A new genetic distance with application to constrained variation at microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 467-471.
- Zimmermann KD, Schogl B, Plaimauer B & Manhalter JW, 1996. Quantitative multiple competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube. *BioTechniques*, **21**: 480-484.
- Zouros E & Foltz DW, 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia*, **25**: 583-591.

## APPENDICI

## APPENDICE I

### PREPARAZIONE DEI REAGENTI E DEL GEL PER ELETTROFORESI

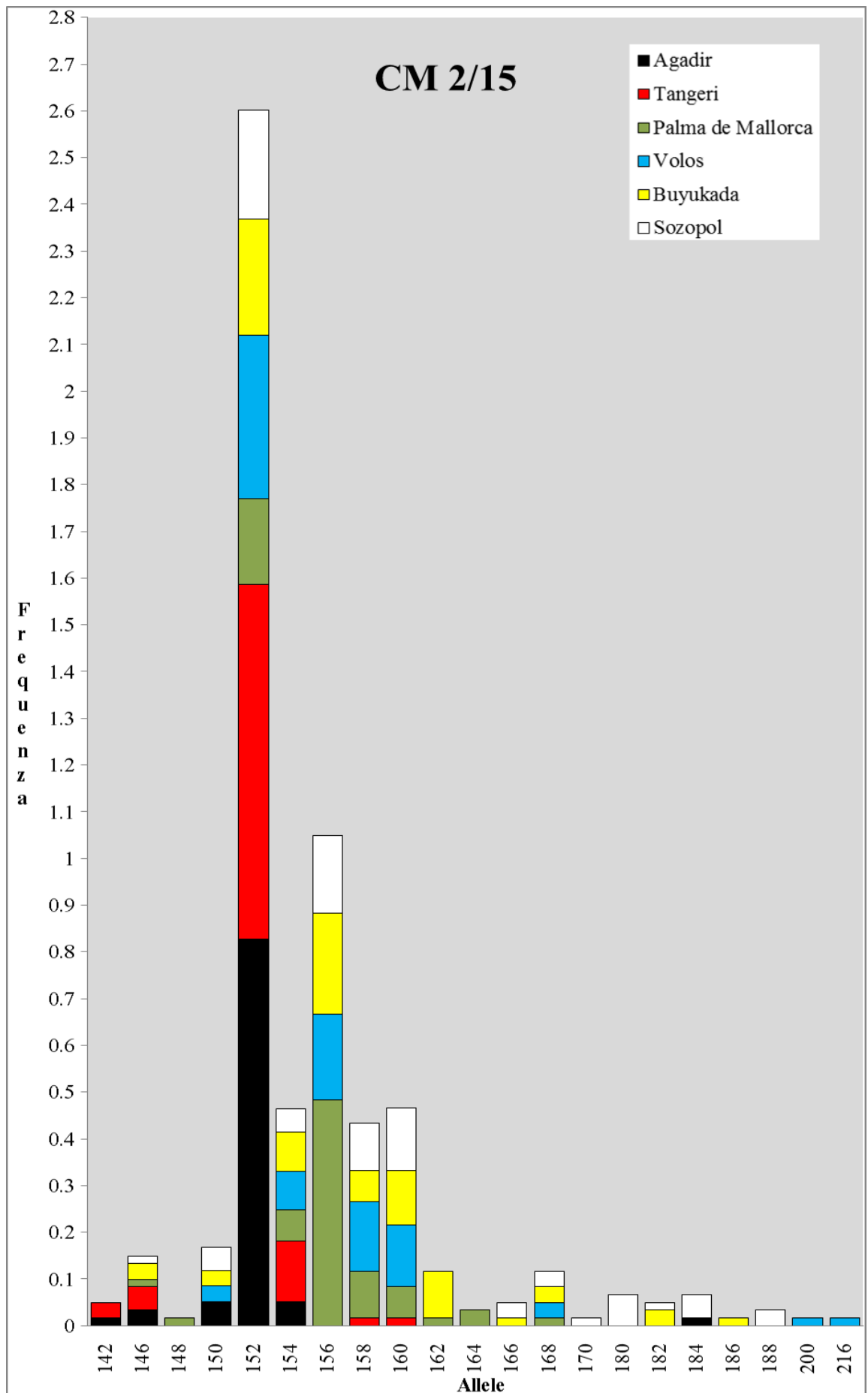
<b>TBE 10X</b>	1.0 l	<b>SDS 1.5%</b>	100 ml
Tris HCl base	108 g	SDS	1.5 g
Acido borico	55 g	H <sub>2</sub> O	a volume
EDTA [0.5 M] pH 8.0	40 ml		
H <sub>2</sub> O	a volume	<b>LADDER</b>	50.0 ml
		DNA ladder [500 mg/ml]	5.0 ml
<b>TNE 10X</b>	200 ml	Orange-g	10.0 ml
Tris HCl base	12.11 g	H <sub>2</sub> O	35.0 ml
NaCl [100 mM]	11.68 g		
EDTA [1 mM]	0.74 g	<b>ORANGE-G</b>	10.0 ml
H <sub>2</sub> O	a volume	Orange-g	0.05 g
		Glicerolo	5.0 ml
<b>TE</b>	200 ml	H <sub>2</sub> O	5.0 ml
Tris HCl	2.0 ml		
EDTA [0.5 M] pH 8.0	0.4 ml	<b>dNTPs</b>	100 ml
H <sub>2</sub> O	a volume	dCTP	25.0 ml
		dGTP	25.0 ml
<b>PROTEINASI K [10 mg/ml]</b>	2.0 ml	dATP	25.0 ml
Proteinasi K	0.2 g	dTTP	25.0 ml
H <sub>2</sub> O	a volume		

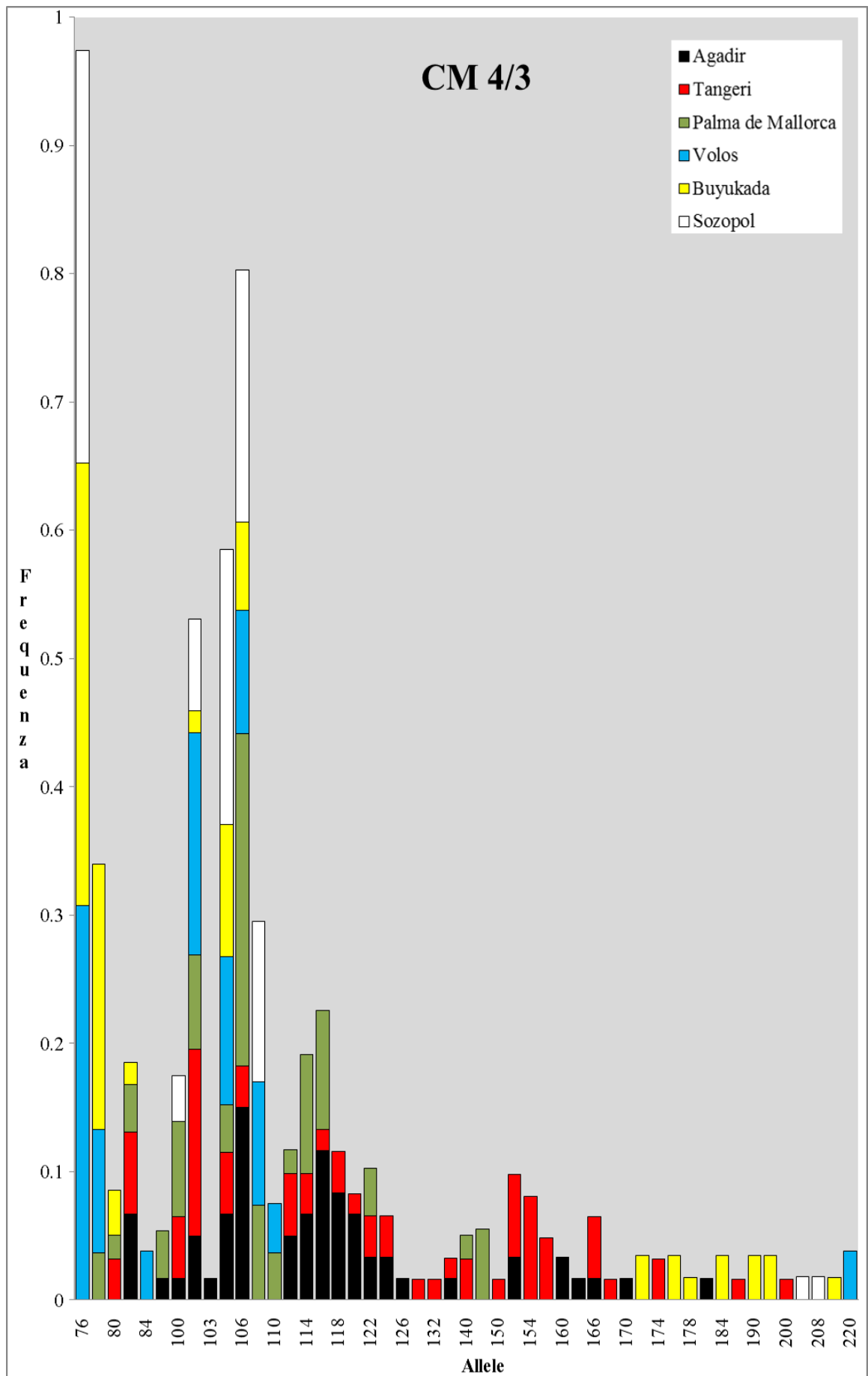
<b>GEL D'AGAROSIO</b>	<b>1%</b>		<b>2%</b>	
	<b>mini</b>	<b>midi</b>	<b>mini</b>	<b>midi</b>
Agarosio	0.5 g	1.0 g	1.0 g	2.0 g
TBE 1X	50 ml	100 ml	50 ml	100 ml
Bromuro d'etidio	0.6 ml	1.3 ml	0.6 ml	1.3 ml

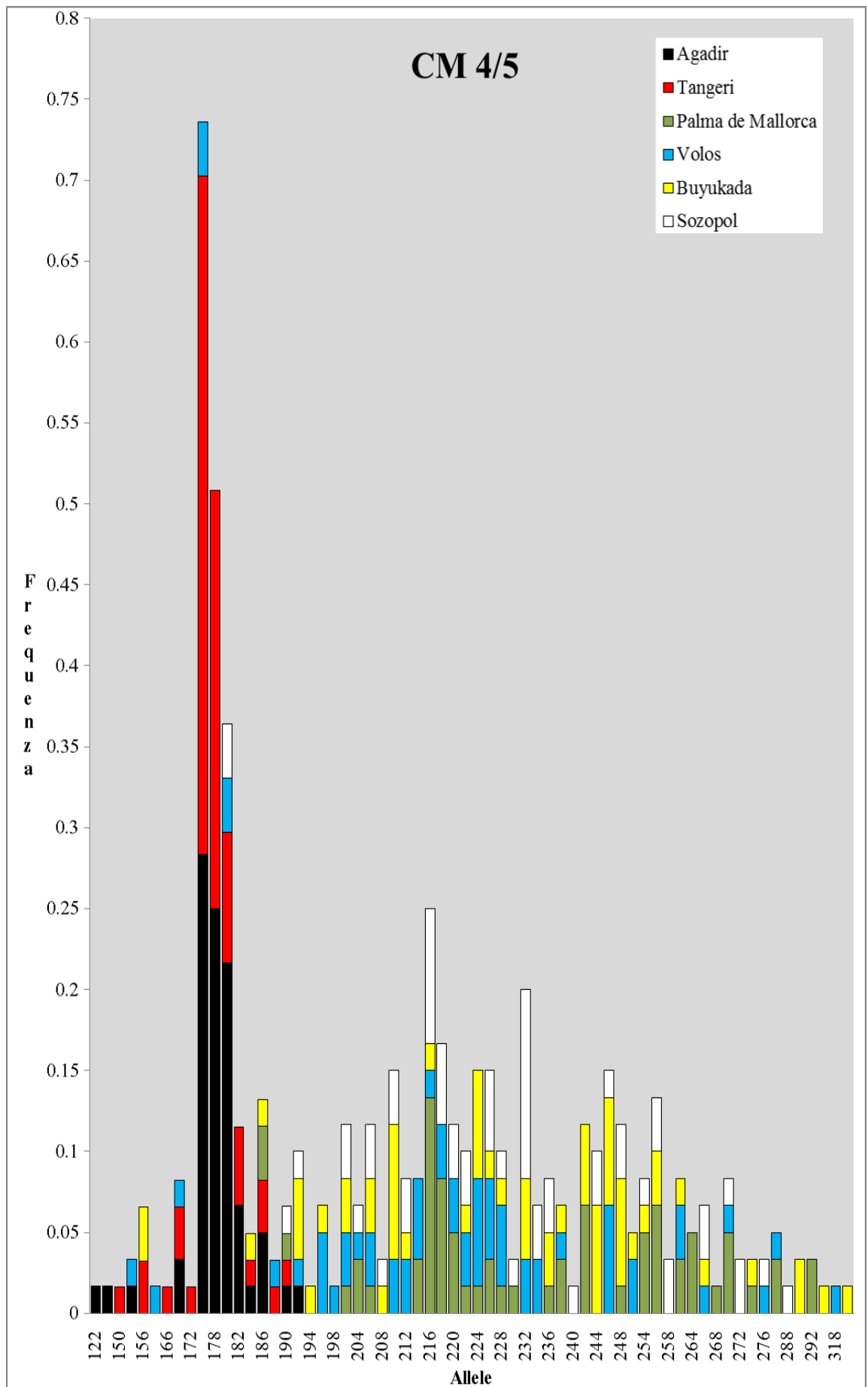


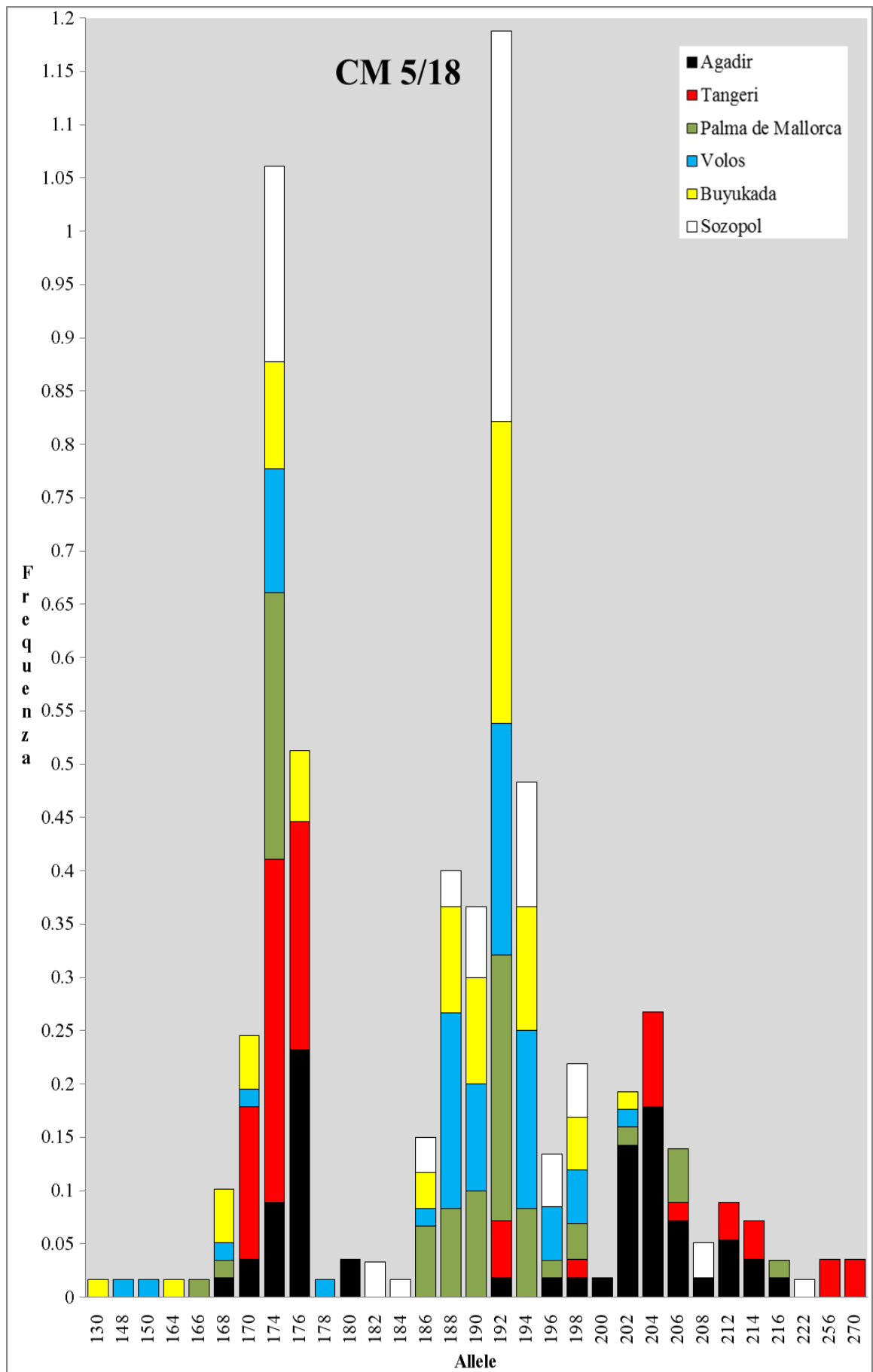
## **APPENDICE II**

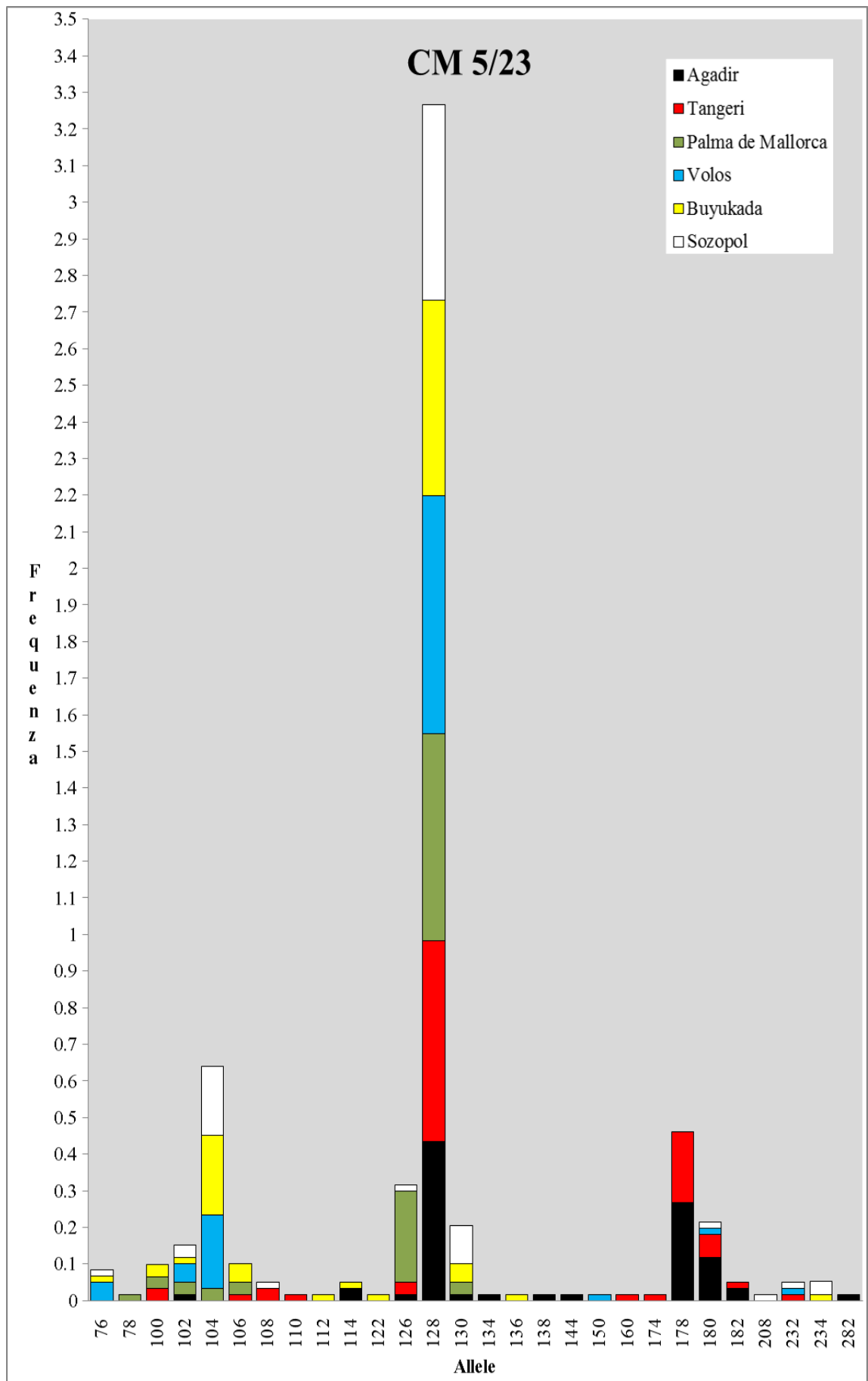
Grafici delle frequenze alleliche per i sei loci microsatellitari dei campioni  
di *Chthamalus montagui* nelle località analizzate

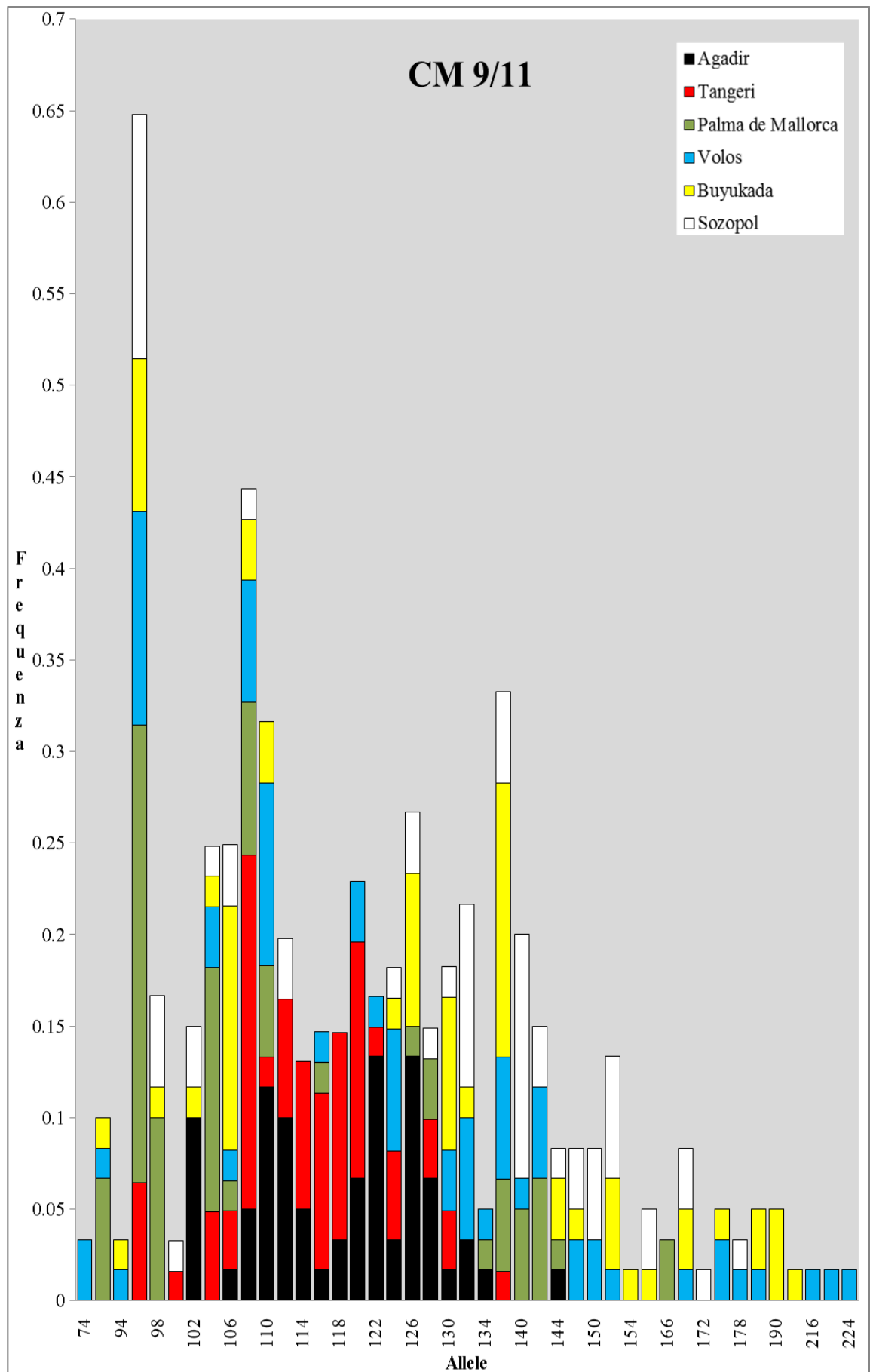












### **APPENDICE III**

Frequenze alleliche per i sei loci microsatellitari dei campioni di  
*Chthamalus montagui* nelle località analizzate



## CM2/15

	142	146	148	150	152	154	156	158	160	162	164	166	168	170	180	182	184	186	188	200	216
Agadır	0.017	0.034	0.000	0.052	0.828	0.052	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
Tangeri	0.032	0.048	0.000	0.000	0.758	0.129	0.000	0.016	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Palma	0.000	0.017	0.017	0.000	0.183	0.067	0.483	0.100	0.067	0.017	0.033	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Volos	0.000	0.000	0.000	0.033	0.350	0.083	0.183	0.150	0.133	0.000	0.000	0.033	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.017
Büyükada	0.000	0.033	0.000	0.033	0.250	0.083	0.217	0.067	0.117	0.100	0.000	0.017	0.033	0.000	0.000	0.033	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000
Sözopol	0.000	0.017	0.000	0.050	0.233	0.050	0.167	0.100	0.133	0.000	0.000	0.033	0.033	0.017	0.067	0.017	0.050	0.000	0.033	0.000	0.000

CM4/3  
(prima parte)

	76	78	80	82	84	98	100	102	103	104	106	108	110	112	114	116	118	120	122	124	126	130	132	138
Agadır	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.017	0.017	0.050	0.017	0.067	0.150	0.000	0.000	0.050	0.067	0.117	0.083	0.067	0.033	0.033	0.017	0.000	0.000	0.017
Tangeri	0.000	0.000	0.032	0.065	0.000	0.000	0.048	0.145	0.000	0.048	0.032	0.000	0.000	0.048	0.032	0.016	0.032	0.016	0.032	0.032	0.000	0.016	0.016	0.016
Palma	0.000	0.037	0.019	0.037	0.000	0.037	0.074	0.074	0.000	0.037	0.259	0.074	0.037	0.019	0.093	0.093	0.000	0.000	0.037	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Volos	0.308	0.096	0.000	0.000	0.038	0.000	0.000	0.173	0.000	0.115	0.096	0.096	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Büyükada	0.345	0.207	0.034	0.017	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.103	0.069	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Sözopol	0.321	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.036	0.071	0.000	0.214	0.196	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

CM4/3  
(seconda parte)

	140	148	150	152	154	158	160	162	166	168	170	172	174	176	178	182	184	186	190	192	200	206	208	212	220
Agadır	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.033	0.017	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tangeri	0.032	0.000	0.016	0.065	0.081	0.048	0.000	0.000	0.048	0.016	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
Palma	0.019	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Volos	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038
Büyükada	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.034	0.000	0.017	0.000	0.034	0.000	0.034	0.000	0.034	0.000	0.000	0.017	0.000
Sözopol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.018	0.000	0.000

<b>CM4/5 (prima parte)</b>																										
	<b>122</b>	<b>128</b>	<b>150</b>	<b>154</b>	<b>156</b>	<b>160</b>	<b>166</b>	<b>170</b>	<b>172</b>	<b>176</b>	<b>178</b>	<b>180</b>	<b>182</b>	<b>184</b>	<b>186</b>	<b>188</b>	<b>190</b>	<b>192</b>	<b>194</b>	<b>196</b>	<b>198</b>	<b>200</b>	<b>204</b>	<b>206</b>	<b>208</b>	
<b>Agadir</b>	0.017	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.283	0.250	0.217	0.067	0.017	0.050	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>Tangeri</b>	0.000	0.000	0.016	0.000	0.032	0.000	0.016	0.032	0.016	0.419	0.258	0.081	0.048	0.016	0.032	0.016	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>Palma</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.033	0.017	0.000
<b>Votos</b>	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.017	0.000	0.017	0.000	0.033	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.017	0.000	0.050	0.017	0.033	0.017	0.033	0.017	0.000
<b>Büyükada</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000	0.050	0.017	0.017	0.000	0.033	0.000	0.033	0.000	0.017
<b>Sozopol</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.033	0.017	0.033	0.017	0.000
<b>CM4/5 (seconda parte)</b>																										
	<b>210</b>	<b>212</b>	<b>214</b>	<b>216</b>	<b>218</b>	<b>220</b>	<b>222</b>	<b>224</b>	<b>226</b>	<b>228</b>	<b>230</b>	<b>232</b>	<b>234</b>	<b>236</b>	<b>238</b>	<b>240</b>	<b>242</b>	<b>244</b>	<b>246</b>	<b>248</b>	<b>252</b>	<b>254</b>	<b>256</b>	<b>258</b>	<b>262</b>	
<b>Agadir</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>Tangeri</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>Palma</b>	0.000	0.000	0.033	0.133	0.083	0.050	0.017	0.017	0.033	0.017	0.017	0.000	0.000	0.017	0.033	0.000	0.067	0.000	0.000	0.017	0.000	0.050	0.067	0.000	0.067	0.000
<b>Votos</b>	0.033	0.033	0.050	0.017	0.033	0.033	0.033	0.067	0.050	0.050	0.000	0.033	0.033	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033
<b>Büyükada</b>	0.083	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.017	0.067	0.017	0.017	0.000	0.050	0.000	0.033	0.017	0.000	0.050	0.067	0.067	0.067	0.017	0.017	0.017	0.033	0.000	0.017
<b>Sozopol</b>	0.033	0.033	0.000	0.083	0.050	0.033	0.033	0.000	0.050	0.017	0.017	0.117	0.033	0.033	0.000	0.017	0.000	0.033	0.017	0.033	0.000	0.017	0.033	0.017	0.033	0.000
<b>CM4/5 (terza parte)</b>																										
	<b>264</b>	<b>266</b>	<b>268</b>	<b>270</b>	<b>272</b>	<b>274</b>	<b>276</b>	<b>282</b>	<b>288</b>	<b>290</b>	<b>292</b>	<b>296</b>	<b>318</b>													
<b>Agadir</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000													
<b>Tangeri</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000													
<b>Palma</b>	0.050	0.000	0.017	0.050	0.000	0.017	0.000	0.033	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000													
<b>Votos</b>	0.000	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017													
<b>Büyükada</b>	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.017	0.000													
<b>Sozopol</b>	0.000	0.033	0.000	0.017	0.033	0.000	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000													

<b>CM5/18 (prima parte)</b>																										
	<b>130</b>	<b>148</b>	<b>150</b>	<b>164</b>	<b>166</b>	<b>168</b>	<b>170</b>	<b>174</b>	<b>176</b>	<b>178</b>	<b>180</b>	<b>182</b>	<b>184</b>	<b>186</b>	<b>188</b>	<b>190</b>	<b>192</b>	<b>194</b>	<b>196</b>	<b>198</b>	<b>200</b>	<b>202</b>	<b>204</b>	<b>206</b>	<b>208</b>	
<b>Agadir</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,036	0,089	0,232	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,018	0,018	0,018	0,018	0,143	0,179	0,071	0,018
<b>Tangeri</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143	0,321	0,214	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,054	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,089	0,018	0,000
<b>Palma</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,083	0,100	0,250	0,083	0,017	0,033	0,000	0,017	0,000	0,017	0,000	0,050	0,000
<b>Volos</b>	0,000	0,017	0,017	0,000	0,000	0,017	0,017	0,117	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,017	0,183	0,100	0,217	0,167	0,050	0,050	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Büyükada</b>	0,017	0,000	0,000	0,017	0,000	0,050	0,050	0,100	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,100	0,100	0,283	0,117	0,000	0,050	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Sozopol</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,183	0,000	0,000	0,000	0,033	0,017	0,033	0,033	0,067	0,367	0,117	0,050	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
<b>CM5/18 (seconda parte)</b>																										
	<b>212</b>	<b>214</b>	<b>216</b>	<b>222</b>	<b>256</b>	<b>270</b>																				
<b>Agadir</b>	0,054	0,036	0,018	0,000	0,000	0,000																				
<b>Tangeri</b>	0,036	0,036	0,000	0,000	0,036	0,036																				
<b>Palma</b>	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000																				
<b>Volos</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																				
<b>Büyükada</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																				
<b>Sozopol</b>	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000																				
<b>CM5/23 (prima parte)</b>																										
	<b>76</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>102</b>	<b>104</b>	<b>106</b>	<b>108</b>	<b>110</b>	<b>112</b>	<b>114</b>	<b>122</b>	<b>126</b>	<b>128</b>	<b>130</b>	<b>134</b>	<b>136</b>	<b>138</b>	<b>144</b>	<b>150</b>	<b>160</b>	<b>174</b>	<b>178</b>	<b>180</b>	<b>182</b>	<b>208</b>	
<b>Agadir</b>	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,017	0,433	0,017	0,017	0,000	0,017	0,017	0,000	0,000	0,000	0,267	0,117	0,033	0,000	
<b>Tangeri</b>	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,016	0,032	0,016	0,000	0,000	0,000	0,032	0,548	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016	0,016	0,194	0,065	0,016	0,000	0,000	
<b>Palma</b>	0,000	0,017	0,033	0,033	0,033	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,567	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>Volos</b>	0,050	0,000	0,000	0,050	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,650	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	
<b>Büyükada</b>	0,017	0,000	0,033	0,017	0,217	0,050	0,000	0,000	0,017	0,017	0,000	0,000	0,533	0,050	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>Sozopol</b>	0,017	0,000	0,000	0,034	0,190	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,534	0,103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,017	

<b>CM5/23</b>	(seconda parte)																										
	<b>232</b>	<b>234</b>	<b>282</b>																								
<b>Agadir</b>	0.000	0.000	0.017																								
<b>Tangeri</b>	0.016	0.000	0.000																								
<b>Palma</b>	0.000	0.000	0.000																								
<b>Volos</b>	0.017	0.000	0.000																								
<b>Büyükada</b>	0.000	0.017	0.000																								
<b>Sozopol</b>	0.017	0.034	0.000																								
<b>CM9/11</b>	(prima parte)																										
	<b>74</b>	<b>90</b>	<b>94</b>	<b>96</b>	<b>98</b>	<b>100</b>	<b>102</b>	<b>104</b>	<b>106</b>	<b>108</b>	<b>110</b>	<b>112</b>	<b>114</b>	<b>116</b>	<b>118</b>	<b>120</b>	<b>122</b>	<b>124</b>	<b>126</b>	<b>128</b>	<b>130</b>	<b>132</b>	<b>134</b>	<b>136</b>	<b>140</b>		
<b>Agadir</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.017	0.050	0.117	0.100	0.050	0.017	0.033	0.067	0.133	0.033	0.133	0.067	0.017	0.033	0.017	0.033	0.017	0.000	0.000
<b>Tangeri</b>	0.000	0.000	0.000	0.065	0.000	0.016	0.000	0.048	0.032	0.194	0.016	0.065	0.081	0.097	0.113	0.129	0.016	0.048	0.000	0.032	0.032	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	
<b>Palma</b>	0.000	0.067	0.000	0.250	0.100	0.000	0.000	0.133	0.017	0.083	0.050	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.033	0.000	0.000	0.000	0.017	0.050	0.050	
<b>Volos</b>	0.033	0.017	0.017	0.117	0.000	0.000	0.000	0.033	0.017	0.067	0.100	0.000	0.000	0.017	0.000	0.033	0.017	0.067	0.000	0.000	0.033	0.067	0.017	0.067	0.017	0.067	0.017
<b>Büyükada</b>	0.000	0.017	0.017	0.083	0.017	0.000	0.017	0.017	0.133	0.033	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.083	0.000	0.083	0.017	0.000	0.150	0.000	0.000	
<b>Sozopol</b>	0.000	0.000	0.000	0.133	0.050	0.017	0.033	0.017	0.033	0.017	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.033	0.017	0.017	0.100	0.000	0.050	0.133	0.000	
<b>CM9/11</b>	(seconda parte)																										
	<b>142</b>	<b>144</b>	<b>148</b>	<b>150</b>	<b>152</b>	<b>154</b>	<b>156</b>	<b>166</b>	<b>170</b>	<b>172</b>	<b>174</b>	<b>178</b>	<b>180</b>	<b>190</b>	<b>204</b>	<b>216</b>	<b>218</b>	<b>224</b>									
<b>Agadir</b>	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>Tangeri</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>Palma</b>	0.067	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>Volos</b>	0.050	0.000	0.033	0.033	0.017	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.033	0.017	0.017	0.000	0.000	0.017	0.017	0.017	0.000	0.000	0.033	0.067	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017
<b>Büyükada</b>	0.000	0.033	0.017	0.000	0.050	0.017	0.017	0.000	0.033	0.000	0.017	0.000	0.033	0.050	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.033	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>Sozopol</b>	0.033	0.017	0.033	0.050	0.067	0.000	0.033	0.000	0.033	0.017	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

# **RINGRAZIAMENTI**

Un immenso grazie ai miei genitori, che mi hanno fatto diventare la persona che sono e che mi hanno permesso di seguire i miei sogni, e a mio fratello, vi voglio bene.

Grazie a nonni, zii e cugini, che in tutti questi anni si sono interessati alla mia carriera universitaria, e non solo.

Un ringraziamento particolare alla Dott. ssa Pannacciulli, è stato un anno duro ma bellissimo, sono contenta di averlo passato in sua compagnia; un grazie al Dott. Maltagliati, per la compagnia, le risate e la disponibilità nelle lunghe giornate di analisi; un grazie al Prof. Castelli, per l'immensa cortesia.

Un sincero ringraziamento al Dott. Tofanelli e alla Dott. ssa Guerrini per i consigli che mi hanno dato.

Un sentito ringraziamento all'ENEA per il supporto scientifico-tecnologico e didattico offertomi per la realizzazione di questo lavoro.

Grazie al Prof. Achituv, della Bar Ilan University di Tel Aviv (Israele), per aver fornito i campioni utilizzati nel presente studio ed aver sostenuto le spese relative ai beni di consumo ed alle analisi necessari per il presente studio.

Un sincero grazie a Luca, che ha condiviso con me il frenetico trantran degli ultimi mesi, segno inconfondibile della stesura di una tesi.

Un grazie ai miei amici, che mi sono stati vicini in ogni momento, bello o brutto, e su cui so di poter sempre contare, anche quando gli impegni non permettono di sentirsi tanto spesso; vorrei scrivere qui tutti i nomi ma, data la mia stanchezza mentale, rischierei di dimenticarmi qualcuno, perciò non lo farò.

Un grazie, infine, al “pulmino di Sarzana”, che ha reso più leggeri i viaggi in treno ogni mattina, e a tutte le persone con cui, per qualche ragione, mi sono trovata a dovermi rapportare e grazie ai quali ho imparato qualcosa in più.