



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

DOTTORATO DI RICERCA

Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente
Ciclo XXVIII

**Analisi della variabilità genetica e della connettività tra
popolazioni di due specie di Elasmobranchi:
Raja clavata L., 1758 e *Scyliorhinus canicula* (L., 1758)**

BIO/05

Presentato da:

Dott.ssa Laura Vacca

Coordinatore Dottorato:

Prof Emanuele Sanna

Tutor/Relatore:

Prof.ssa Rita Cannas

Esame finale Anno Accademico 2014-2015



La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2014/2015 - XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse dell'Istituto Nazionale della Previdenza Sociale (progetto INPS G.E.I. "Doctor J").

SOMMARIO

ABSTRACT	6
1. INTRODUZIONE.....	9
1.1 I CONDROITTI: CARATTERI GENERALI	13
1.2 CONDROITTI IN MEDITERRANEO	15
1.3 STATUS DEI CONDROITTI IN MEDITERRANEO: MINACCIA E CONSERVAZIONE.....	18
1.3.1 <i>By catch e mercato</i>	18
1.3.2 <i>STATUS NELLA IUCN Red List of Threatened Species™</i>	20
1.3.3 <i>Strumenti legali di protezione</i>	22
1.4 <i>RAJA CLAVATA</i> LINNAEUS, 1758.....	24
1.4.1 <i>Tassonomia</i>	24
1.4.2 <i>Morfologia</i>	25
1.4.3 <i>Distribuzione</i>	25
1.4.4 <i>Dieta</i>	26
1.4.5 <i>Riproduzione</i>	26
1.4.6 <i>Migrazione</i>	27
1.5 <i>SCYLORHINUS CANICULA</i> (LINNAEUS, 1758).....	28
1.5.1 <i>Tassonomia</i>	28
1.5.2 <i>Morfologia</i>	29
1.5.3 <i>Dieta</i>	29
1.5.4 <i>Distribuzione</i>	29
1.5.5 <i>Riproduzione</i>	30
1.6 STATUS DI CONSERVAZIONE.....	31
1.6.1 <i>R. clavata</i>	31
1.6.2 <i>S. canicula</i>	31
1.6.3 <i>Le due specie in Sardegna</i>	32
2. GENETICA DI POPOLAZIONE.....	34
2.1 IL CONCETTO DI STOCK E LA GENETICA DELLA PESCA	36
2.2 MARCATORI MICROSATELLITI.....	41
2.2.1 <i>Meccanismi mutazionali dei microsatelliti</i>	43
3. MATERIALI E METODI.....	45
3.1 CAMPIONAMENTO <i>RAJA CLAVATA</i>	46
3.1.1 <i>Campionamento nel Mediterraneo occidentale: Sardegna</i>	46
3.1.2 <i>Campionamento nel Mediterraneo e Atlantico</i>	47
3.2 CAMPIONAMENTO <i>S. CANICULA</i>	49
3.2.1 <i>Campionamento nel Mediterraneo occidentale: Sardegna</i>	49
3.2.2 <i>Campionamento nel Mediterraneo e Atlantico</i>	50
3.3 ESTRAZIONE DEL DNA	51
3.4 AMPLIFICAZIONE POLYMERASE CHAIN REACTION	51
3.4.1 <i>Raja clavata</i>	52
3.4.2 <i>S. canicula</i>	54

3.5	CORSA ELETTROFORETICA CAPILLARE	55
3.6	GENOTIPIZZAZIONE.....	55
3.7	ERRORI DI GENOTIPIZZAZIONE	57
3.8	ALLELI NULLI.....	58
3.9	LINKAGE DISEQUILIBRIUM	58
3.10	DIVERSITÀ GENETICA.....	59
3.11	HARDY WEINBERG EQUILIBRIUM.....	60
3.12	INBREEDING	60
3.13	ANALISI DEL DIFFERENZIAMENTO TRA LE POPOLAZIONI	61
3.14	ANALISI BAYESIANA DEI CLUSTER	62
3.15	ISOLAMENTO PER DISTANZA	62
3.16	ANALISI DEMOGRAFICA DELLE POPOLAZIONI.....	63
3.17	DISPERSIONE DIFFERENZIALE LEGATA AL SESSO	65
3.18	CORREZIONE PER TEST MULTIPLI	65
3.19	RAJA CLAVATA: CONFRONTO TEMPORALE NELLE POPOLAZIONI SARDE.....	66
4.	RISULTATI - RAJA CLAVATA.....	67
4.1	ESTRAZIONE DNA	68
4.2	AMPLIFICAZIONE PCR.....	68
4.2.1	<i>Genotipizzazione o allele calling</i>	68
4.3	ANALISI DEI DATI.....	69
4.3.1	<i>Correzione errori di genotipizzazione</i>	69
4.3.2	<i>Variabilità genetica</i>	69
4.3.3	<i>Linkage disequilibrium</i>	71
4.3.4	<i>Alleli nulli</i>	72
4.3.5	<i>Eterozigosità e equilibrio di Hardy-Weinberg</i>	72
4.3.6	<i>Coefficiente di Inbreeding Fis</i>	74
4.3.7	<i>Analisi del differenziamento: F_{ST} e D_{EST}</i>	75
4.3.8	<i>Analisi delle coordinate principali: F_{st} e D_{est} a confronto.</i>	77
4.3.9	<i>Indagine sulla struttura di popolazione: AMOVA</i>	78
4.3.10	<i>Analisi bayesiana dei cluster</i>	80
4.3.11	<i>Isolamento da distanza</i>	82
4.3.12	<i>Analisi demografica: bottleneck ed espansione</i>	83
4.3.13	<i>Dispersione differenziale legata al sesso</i>	84
4.4	ANALISI TEMPORALE DELLA VARIABILITÀ GENETICA.....	85
4.4.1	<i>Equilibrio di Hardy Weinberg</i>	87
4.4.2	<i>Coefficiente di inbreeding</i>	87
4.4.3	<i>Differenziazione temporale</i>	88
4.4.4	<i>Test del Bottleneck e Kg-test</i>	88
5.	DISCUSSIONE – RAJA CLAVATA.....	90
6.	RISULTATI – SCYLIORHINUS CANICULA	95
6.1	ESTRAZIONE DNA	96
6.2	AMPLIFICAZIONE PCR	96
6.2.1	<i>Genotipizzazione</i>	96
6.3	ANALISI DEI DATI.....	97

6.3.1	<i>Correzione errori di genotipizzazione</i>	97
6.3.2	<i>Variabilità genetica</i>	97
6.3.3	<i>Eterozigosità e equilibrio di Hardy-Weinberg</i>	100
6.3.4	<i>Linkage disequilibrium</i>	101
6.3.5	<i>Alleli nulli</i>	102
6.3.6	<i>Indice di Inbreeding</i>	103
6.3.7	<i>Analisi del differenziamento: F_{st} e D_{est}</i>	104
6.3.8	<i>Analisi delle coordinate principali: F_{st} e D_{est} a confronto.</i>	106
6.3.9	<i>Indagine sulla struttura di popolazione: AMOVA</i>	107
6.3.10	<i>Analisi bayesiana dei cluster <i>S. canicula</i></i>	109
6.3.11	<i>Isolamento per distanza IBDW</i>	111
6.3.12	<i>Analisi demografica: bottleneck e espansione</i>	111
6.3.13	<i>Dispersione differenziale legata al sesso</i>	112
7.	DISCUSSIONE – <i>SCYLIORHINUS CANICULA</i>	115
8.	CONCLUSIONI	121
	BIBLIOGRAFIA	124

ABSTRACT

Analysis of genetic variability and connectivity among populations of two elasmobranch species: *Raja clavata* L., 1758 and *Scyliorhinus canicula* (L., 1758)

Studies concerning the status of conservation and exploitation of cartilaginous fish are essential to better understanding the biology and degree of threat of this important taxonomic group, that takes on great importance for his ecological role in the control of coastal and oceanic ecosystems. Taking into account the vulnerability of elasmobranchs, due to of their biological characteristics (low fecundity, late maturity and slow growth rates), they are mainly affected by anthropic influence, as fishing pressure. In fact, there is evidence that the elasmobranchs of the Mediterranean are declining in abundance, diversity and range due to the intense fishing activity.

The genetic application to the fisheries plays an important role to define the level of intraspecific differentiation, genetic variability and the definition of *stocks*, proved to be a powerful tool to establish correct management plans for the marine resources.

6

In this background, the main objective of this study is to assess genetic variability and connectivity in populations of two demersal elasmobranch species: *Raja clavata* and *Scyliorhinus canicula*, using microsatellites markers. The two species are caught by different fishing techniques like trawling, trammel nets and longline, but their commercial value is restricted to certain regions of the Mediterranean and they are primarily caught as bycatch in various demersal fisherier.

The thornback ray, *Raja clavata* is widely distributed in Mediterranean, Black Sea and the Atlantic coasts of Europe and Africa. The recent decreases in abundance and distribution in several areas of its geographical range led to inclusion of this taxon in the IUCN Red List as Near Threatened. Analyses were carried out on a total of 294 individuals collected from seven areas in Mediterranean (Western, Central and Eastern) and comparing them to Northeastern Atlantic using 8 microsatellite loci.

Moderate levels of genetic diversity were found ($uHe=0.66$), with the highest values recorded in the North Sea (0.67) while the lowest in the Tyrrhenian Sea (0.57). Pairwise F_{ST} and D_{EST}

estimates revealed genetic homogeneity between samples geographically close. North Sea samples were significantly differentiated among Mediterranean populations, but Cyprus was found to be highly divergent from all the other samples, showing the highest pairwise F_{ST} and D_{EST} values. The results of the AMOVA highlighted significant genetic differentiation comparing on three groups Cyprus/central western Mediterranean/North Sea ($F_{CT}= 0.058$, $P=0.000$) Excluding eastern sample (Cyprus), the differentiation between the 2 groups (western Mediterranean/Atlantic Ocean), was lower but still significant. Within the Mediterranean basin, pooling samples based on geographical distribution (Western/Central/Eastern) a significant differentiation emerged (AMOVA: $F_{CT}=0.038$, $P<0.05$), furthermore Mantel test found a significant association between genetic and geographical distance across all samples. The strong subdivision between eastern Mediterranean and other samples is also consistent with the number of clusters identified in STRUCTURE, in which Cyprus had the highest proportion in a separated cluster from other populations. According to the bottleneck results, only North Sea sample seemed to show a bottleneck signal, whereas all the other investigated populations showed a substantial demographic stability. Temporal comparison in three locations in Sardinia, sampled twice (in 2005 and 2012), highlighted no significant difference in genetic variability and differentiation.

The small spotted catshark, *S. canicula* is one of the smallest catshark species and the most abundant in the European inshore waters. Although the species is listed as Least Concern in the red list IUCN it was considered overexploited in some areas. It is primarily caught as bycatch in demersal fisheries, but also it is important as commercial species.

Analyses were carried out on a total of 265 individuals sampled from ten areas within the Mediterranean Sea (Western, Central and Eastern) and one in Northeastern Atlantic, using twelve microsatellite loci.

Genetic diversity was similar among populations (overall $uHe=0.66$), with the highest value for Morocco sample (MOR $uHe=0.73$). AMOVA analyses indicated a significant genetic differentiation among all locations (overall $F_{ST} = 0.045$; $P\text{-value}=0.00$). Pairwise F_{ST} and D_{EST} values confirmed significant differentiation among all samples, with North Sea showing the highest heterogeneity. Mantel Test revealed a positive correlation between geographical and genetic distance among all samples, but not within the Mediterranean basin. AMOVA within the Mediterranean Sea found the highest values of F_{CT} pooling samples on four groups (Sardinian samples/Morocco/Algeria/Cyprus) ($F_{CT}= 0.049$ $P=0.000$). Bayesian analysis

confirmed the results of genetic differentiation testing for the $K=5$ in which also North Sea sample (sharing cluster with Algery) showed high genetic separation from the other Mediterranean samples. Demographic analysis revealed a bottleneck signal only for the North Sea sample, as registered for the thornback ray. Furthermore, for both species no significant differences consistent for sex-biased dispersal was found.

The present study has been helpful to provide genetic data for both species in order to assess the genetic diversity and connectivity at intraspecific level. As regard *R. clavata*, the previous population genetic studies were limited to the Atlantic Ocean, including just a small sample in three areas in the Mediterranean and the Black Sea. For this reason it was necessary to provide new insights for thornback ray populations within the Mediterranean Sea. Results obtained instead for *S. canicula* provided further genetic data to compare with the scientific paper produced in recent years, and also they provided more details for population around Sardinia coasts.

1. INTRODUZIONE

La crescita della pesca su scala globale ha aumentato il grado di minaccia di molte specie, soprattutto di quelle che, presentando caratteristiche biologiche come crescita lenta, tarda maturità sessuale e bassa fecondità (Worm *et al.* 2013) hanno una limitata capacità di ripresa dopo il declino (Cailliet *et al.* 2005). I condroitti presentando queste caratteristiche, pertanto risentono fortemente dell'impatto della pressione antropica. Appare evidente l'urgenza di arrivare quanto prima ad uno loro sfruttamento sostenibile attraverso la regolamentazione razionale del prelievo, anche alla luce dell'importante ruolo ecologico che essi rivestono negli ecosistemi marini. Molte specie hanno infatti il ruolo ecologico di predatori d'apice.

La sostenibilità della pesca dipende da appropriate strategie di gestione che dovrebbero fare affidamento su un approccio multidisciplinare che prevede lo studio dei differenti fattori biologici e ecologici delle risorse. In particolare, la mancanza di adeguate informazioni sulla struttura di popolazione dei condroitti è spesso una delle ragioni del fallimento all'introduzione di misure di gestione per la loro conservazione (Cavanagh e Gibson 2007). A questo proposito, il metodo genetico può fornire un valido contributo per l'identificazione di *stock* distinti (Hauser e Ward 1998), informazione essenziale per la gestione della pesca in quanto questi necessitano di separati e specifici modelli di gestione (Pawson e Jennings 1996; Hauser e Seeb 2008; Waples *et al.* 2008).

La maggior parte dei lavori che indagano sulla diversità genetica e la struttura di popolazione dei condroitti sono focalizzati sui grandi squali pelagici, considerati particolarmente vulnerabili allo sfruttamento della pesca in alto mare. Tuttavia questi rappresentano una piccola frazione della biodiversità degli elasmobranchi (Dulvy *et al.* 2014).

Questo studio vuole indagare su due specie di elasmobranchi tra le più abbondanti in Mar Mediterraneo: *Raja clavata* Linnaeus, 1758 e *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758).

R. clavata appartiene alla famiglia dei Rajidae ed è vastamente distribuita in tutto il Mediterraneo e Atlantico Orientale; è una specie demersale che occupa ampie batimetrie, ritrovandosi dai 10 m fino agli 300 e anche fino ai 570 nel Mar Ionio (Whitehead *et al.* 1986)

S. canicula è una delle specie più piccole all'interno del gruppo dei gattucci, famiglia *Scyliorhinidae*, e il più abbondante nelle acque costiere europee (Ellis e Shackley 1997). E' un specie demersale che vive su fondali sabbiosi, ghiaiosi, fangosi o corallini, occupando batimetrie che vanno dai pochi metri fino a circa 550 in Oceano Atlantico (Compagno 1984) e fino agli 800 m nel Mediterraneo orientale (Mytilineou *et al.* 2005).

Le due specie vengono catturate tramite diverse tecniche di pesca come strascico, tramaglio e palamito (Bradai 2012; Ligas *et al.* 2013). Il loro valore commerciale riguarda solo alcune regioni del Mediterraneo (Capapé *et al.* 2014) dove vengono apprezzate come cibo (per esempio il gattuccio comune in Sardegna) tuttavia nella maggior parte delle zone di pesca detengono un valore economico basso e vengono catturate come specie bycatch (Rodríguez-Cabello *et al.* 2004; Fowler *et al.* 2005).

Le due specie sono inserite all'interno della IUCN Red List of Threatened Species™ con differente grado di minaccia. La razza chiodata è inserita sia a livello globale che regionale (Mediterraneo) come *Near Threatened* (vicino alla minaccia), mentre il gattuccio comune come *Least Concern* (Minor Preoccupazione). Per entrambe le specie è stato registrato un overfishing in alcune zone del Mediterraneo e dell'Atlantico nord orientale, mentre in altre zone i trend risultano stabili o in aumento (Gibson *et al.* 2006; Cavanagh e Gibson 2007; Bradai 2012; Follesa *et al.* 2013; Barausse *et al.* 2014).

Costituendo parte del by catch delle specie demersali, per cui i dati risultano estremamente limitati e incompleti, le catture dovrebbero essere monitorate e gestite cautamente, poiché le informazioni sullo status di popolazione, considerando il basso potenziale riproduttivo della specie risultano limitate (Gibson *et al.* 2006). Nell'Atlantico nord orientale recentemente la pesca di *Raja clavata* risulta regolamentata da TACs (*total allows catches*) e in alcune zone è proibita la pesca (ICES 2015)

In questo scenario, la caratterizzazione degli *stock* di *R. clavata* e *S. canicula* in Mediterraneo può fornire un valido contributo per la creazione di misure gestionali atte alla conservazione delle specie. Accanto agli studi di biologia della pesca e di riproduzione (Olivereau e Leloup 1950; Mellinger *et al.* 1986; Ellis e Shackley 1997; Capapé *et al.* 2008), lo studio genetico si rivela molto efficace nel fornire informazioni sia sullo stato di salute della risorsa in esame, in termini di valutazione della variabilità genetica della popolazione, sia sull'identificazione di sotto-popolazioni.

Il presente studio si inserisce all'interno di un progetto multidisciplinare che si compone di attività di monitoraggio e integra analisi biologiche, ecologiche e genetiche, per differenti specie target di elasmobranchi presenti nei mari della Sardegna con finalità gestionali e conservazionistiche. Lo studio inizialmente incentrato sui campioni della Sardegna, è stato successivamente esteso a differenti zone del Mediterraneo occidentale, centrale e orientale e

del Mare del Nord, grazie a campioni raccolti da membri dell'Elasmomed Consortium, costituito da Istituti di Ricerca di molti paesi Mediterranei.

Le analisi genetiche sono state condotte utilizzando marcatori molecolari nucleari specifici per le due specie. La variabilità dei loci microsatelliti scelti, precedentemente isolati e caratterizzati da (Griffiths *et al.* 2011) per *S. canicula*, e da (Chevolot *et al.* 2005; El Nagar *et al.* 2009) per *R. clavata*, fa di questi marcatori uno strumento efficace per studi di genetica di popolazione. Questi hanno permesso di caratterizzare le popolazioni della razza chiodata e del gattuccio comune dal punto di vista della variabilità genetica, misurando il grado di connettività genetica tra le popolazioni, con il fine ultimo di identificare eventuali sottopopolazioni corrispondenti ad unità gestionali distinte.

Infatti, la presenza di popolazioni differenziate geneticamente è altamente probabile, date le limitate capacità di dispersione di entrambe le specie dovuta alle caratteristiche biologiche tipiche dei condroitti, come deposizione di uova bentoniche, assenza di stadi larvali pelagici, e adulti che mostrano un alto grado di fedeltà all'habitat (Rodríguez-Cabello *et al.* 2004).

In particolare, questo lavoro è incentrato sulla genetica di popolazione di *R. clavata* e *S. canicula* su due diverse scale spaziali: scala locale (lungo le coste delle Sardegna) e su scala regionale (Mediterraneo e Mare del nord).

In particolare si prefigge di:

- Misurare la diversità genetica e il grado di differenziazione tra popolazioni;
- Misurare la connettività (flusso genico) tra le popolazioni, valutando l'esistenza di un eventuale strutturazione genetica geografica e indagando la presenza di distinti *stock* genetici.
- Valutare, attraverso la misura della variabilità genetica, se si sono verificati nel recente passato eventuali crolli demografici (eventi bottleneck) come conseguenza dell'eccessivo sfruttamento della risorsa da parte della pesca;
- Misurare variazioni nella dimensione effettiva di popolazione in un arco temporale di quasi dieci anni per tre popolazioni di *R. clavata* della Sardegna

1.1 I CONDROITTI: CARATTERI GENERALI

I pesci cartilaginei o Condroitti (dal greco *chondròs*, cartilagine, e *ichthis*, pesce) costituiscono una classe di Vertebrati acquatici di origine marina. Oggi occupano nicchie in qualsiasi ambiente marino, dalle barriere coralline alle fredde acque costiere, dalle distese pelagiche alle profondità degli oceani di tutto il mondo; alcuni si ritrovano anche in acque dolci (Compagno *et al.* 2005). La maggior parte sono predatori, alcuni si alimentano di piccoli invertebrati di fondo altri sono predatori apicali che si nutrono di grandi pesci ossei tetrapodi marini; altri ancora sono si nutrono di plankton (Compagno *et al.* 2005).

Possiedono generalmente una crescita lenta, una tarda maturità sessuale, lunghi periodi di gestazione, un'alta sopravvivenza naturale che si riscontra in tutte le classi di età e una lunga durata di vita (Camhi 1998; Cailliet *et al.* 2005)

Si suddividono in due grandi gruppi o Sottoclassi: gli Elasmobranchi, che comprendo ~1125 specie e gli Olocefali o Chimere, che invece ne comprendono solo ~43, suddivisi in tre famiglie (Callorhynchidae, Chimaeridae e Rhinochimaeridae) (Didier 2004; Compagno *et al.* 2005). La suddivisione tassonomica della Sottoclasse Elasmobranchi, mostrando una più ampia differenziazione, con ~17 ordini e ~52 famiglie, risulta più complicata e discordante (McEachran *et al.* 1996; Shirai 1996; Compagno *et al.* 2005). Secondo la dicotomia classica, gli Elasmobranchi si dividono in due grandi gruppi (Notarbartolo di Sciara and Bianchi 1998):

- **Squali**, comunemente detti (Squalii, Pleurotremata) provisti di corpo cilindrico o moderatamente depresso, fessure brachiali sui lati del capo, pinne pettorali chiaramente separate dal capo, e coda ben sviluppata atta alla propulsione. A questo grande gruppo appartengono 8 ordini: Carcharhiniformes, Lamniformes, Orectolobiformes, Heterodontiformes, Squatiniformes, Pristiophoriformes, Squaliformes, Hexanchiformes, (Ebert e Compagno 2007)
- **Razze** comunemente dette (Batoidea, Hypotremata), fornite di corpo largo e marcatamente depresso dorso ventralmente, fessure branchiali sul lato ventrale del corpo, pinne pettorali fuse al capo, e coda in genere poco o per nulla atta alla propulsione. Esse appartengono all'ordine Rajiformes, all'interno del quale si ritrovano 9 sottordini: Pristoidei, Rhinoidei, Rhynchobatoidei, Rhinobatoidei, Platyrhinoidei, Zanoatoidei, Torpedinoidei, Myliobatoidei (Ebert e Compagno 2007).

Notare come, mentre in italiano con il nome razza si definiscono comunemente tutti i pesci cartilaginei appiattiti dorso ventralmente, morfologicamente simili alle generiche razze, in inglese le specie del superordine Batoidea vengono distinte in *skates* e *rays*. Con il nome *skate* si indicano le razze appartenenti al sottordine ordine Rajoidei che hanno le seguenti caratteristiche:

- Ciascuna pinna pelvica è divisa in due lobi.
- La coda è relativamente robusta, senza una spina dorsale pungente, di solito si trovano due piccole pinne dorsali vicino alla punta e una piccola pinna caudale (anche se alcune specie non hanno pinne dorsali e caudale).
- Le spine possono essere presenti lungo la linea mediana della zona dorsale o delle coda (spine nicali, scapolari, spine medio-caudali, latero-caudali), o possono essere anche presenti in alcune specie ai margini del corpo (vicino alla base delle pinne pettorale).
- I maschi hanno spine vicino agli occhi e alle estremità delle ali (chiamate spine malari e spine alari, rispettivamente) erettili (caratteri sessuali secondari)
- Le *skate* depongono le uova, incluse in capsule; sono quindi ovipare.

Mentre il nome comune *rays* identifica le razze appartenenti agli altri sottordini, che non presentano le caratteristiche descritte sopra.

Non mancano le eccezioni al nome comune infatti, ad esempio la razza chiodata è chiamata *thornback ray* essendo in realtà una *skate*, corrispondendo alle caratteristiche morfologiche tipiche del gruppo dei batoidei.

1.2 CONDROITTI IN MEDITERRANEO

Il numero di specie effettivamente presenti in Mediterraneo è controverso. Secondo (Serena 2005) si contano 84 specie di Condroitti, corrispondenti al 8% circa della diversità di specie globale. Una revisione critica dei dati di letteratura e nuovi studi hanno portato all'aggiornamento della lista delle specie, che sarebbero 87, di cui 49 specie di squalo, 37 batoidei 1 specie di chimera (Compagno 2001; Bradai 2012; Psomadakis *et al.* 2012; Nieto *et al.* 2015).

Esistono molte controversie sulla tassonomia di alcune specie, per le quali servirebbero studi più dettagliati. Al momento sono state incluse nella lista aggiornata delle specie proposta da Bradai: *Squalus megalops*, *Dasyatis tortonesei*, *Dasyatis marmorata*, *Centrophorus granulosus* e *Centrophorus uyato*, *Isurus paucus*, *Carcharhinus melanopterus*, *Raja africana*. Altre specie, segnalate in passato ma la cui identificazione è apparsa fortemente dubbia, sono state escluse: *Glaucostegus halavi*, *Galeocerdo cuvier*, *Torpedo alexandrinis* e *T. fuscomaculata*, *Raja rondeleti*, *Carcharhinus acarenatus*, *Carcharhinus amboinensis*.

Risultano cinque specie endemiche, tra i Batoidei: la razza maltese *Leucoraja melitensis*, la razza polistimma *Raja polystigma*, la razza radula *R. radula*, la razza stellata *R. asterias* la manta *Mobula mobular* (Serena *et al.* 2005). Per quest'ultima specie lo status di endemismo è stato recentemente messo in discussione in quanto è incerta la separazione dalla sua congenerica *Mobula japonica* (Poortvliet e Hoarau 2013).

La condrofauna mediterranea si sarebbe arricchita recentemente con la presenza di almeno sette nuove specie aliene: *Torpedo sinuspersici*, *Himantura uarnak*, *Rhizoprionodon acutus*, *Sphyrna mokarran*, *Galeocerdo cuvier*, *Carcharhinus altimus*, *Carcharhinus falciformis*. In realtà secondo (Cavanagh e Gibson 2007), queste potrebbero non riprodursi in Mediterraneo, o risultare rare in quanto il Mediterraneo rappresenterebbe il limite del loro range di distribuzione.

All'interno del Mediterraneo la distribuzione dei Condroitti non è omogenea (Serena *et al.* 2005). Di seguito viene mostrata la mappa del pattern spaziale che mostra la ricchezza di specie, considerando 80 specie di Elasmobranchi (Coll *et al.* 2010) (Figura 1). Si può notare che la concentrazione di specie nelle acque costiere e continentali è più pronunciata ne Mediterraneo occidentale, Mar Adriatico, e Mar Egeo, mentre meno della metà delle specie sarebbero presenti nelle acque profonde del Mediterraneo Centrale. Infine la biodiversità risulterebbe bassa nelle acque pelagiche del Mediterraneo orientale.

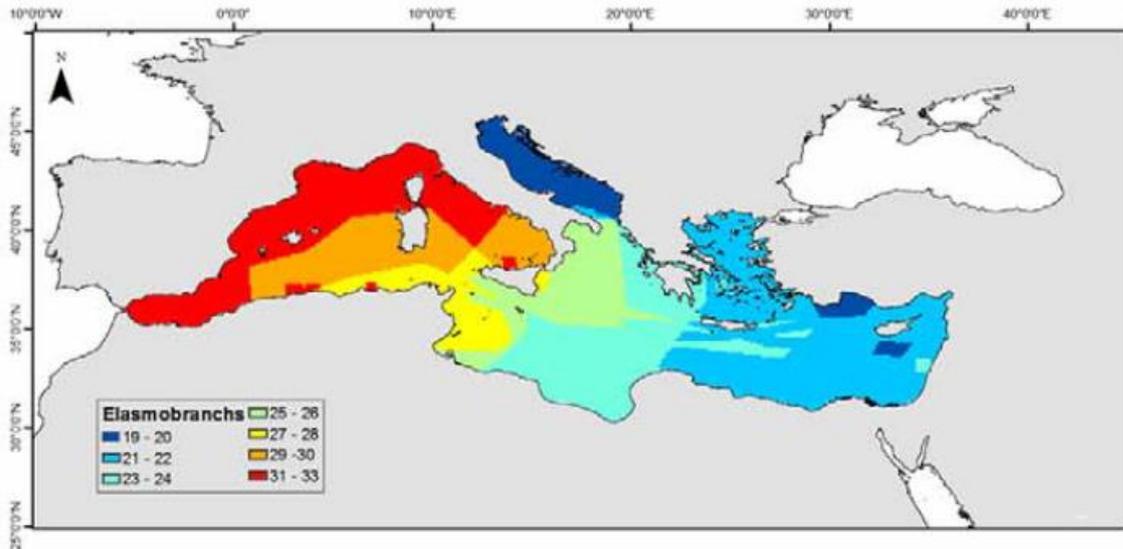


Figura 1. Distribuzione spaziale della ricchezza di specie di Elasmobranchi nel bacino del Mediterraneo. Elasmobranchi (n=80). I colori esprimono la occurrenze di specie, dal blu (poca o nessuna) al rosso (alta)

Secondo la seconda Checklist dei Mari Italiani compilata nel 2010 dalla SIBM (Vacchi e Serena 2010), la selacofauna dei mari italiani comprende quasi tutti i pesci cartilaginei del Mediterraneo, registrando un totale di 78 specie. Di queste, quattro specie di squali (*Carcharhinus altimus*, *C. limbatus*, *C. melanopterus* e *Sphyrna lewini*) risultano segnalate per il Mediterraneo, ma la loro presenza per le acque italiane deve essere ancora accertata. Nella lista sono incluse anche due specie di pesci sega (*Pristis pectinata* e *P. pristis*), che in passato erano parte dell'ittiofauna mediterranea e dei mari italiani, ma per le quali al momento non esiste alcuna documentazione precisa e valida sulla loro effettiva presenza (Tortonese, 1987).

Nei mari italiani sono presenti quattro specie di pesci cartilaginei endemici del Mediterraneo: *Leucoraja melitensis* (razza maltese), *Raja asterias* (razza stellata), *R. polystigma* (razza polistimma) e *R. radula* (razza scuffina). In Italia sono presenti lo squalo latteo (*Rhizoprionodon acutus*) e lo squalo martello maggiore (*Sphyrna mokarran*), considerati specie aliene per il Mediterraneo (Golani *et al.* 2002), e una terza specie, *Galeocerdo cuvier*, segnalata nello stretto di Messina (Celona 2000) che richiede ulteriori conferme (Serena 2005).

Recenti studi hanno permesso di stimare abbondanza e distribuzione batimetrica delle principali specie di condroitti demersali nelle acque sarde; queste ammonterebbero a 58 specie (Follesa *et al.* 2003; Relini 2010), una delle più alte diversità di Selaci nei mari Italiani. Tuttavia, i dati sui grandi squali pelagici e altre specie sono scarsi. Secondo la Checklist della SIBM (Vacchi e Serena 2010) nelle acque circostanti la Sardegna, intesa come macroarea secondo la suddivisione biogeografica proposta da (Bianchi 2004) (zona 2 comprendente le coste della

Sardegna e della Corsica e l'alto Tirreno, da Piombino al Golfo di Gaeta) sarebbero presenti 68 specie di Elasmobranchi. Tra queste vengono considerate anche cinque specie di dubbia presenza nell'area (*Carcharhinus altimus*, *Carcharhinus falciformis*, *Carcharhinus limbatus*, *Carcharhinus melanopterus*, *Sphyrna lewini*). La lista delle specie sarde si arricchisce della razza norvegese (*Dipturus nidarosiensis*), segnalata recentemente per la prima volta in Mediterraneo al largo delle coste sarde (Cannas *et al.* 2010).

1.3 STATUS DEI CONDROITTI IN MEDITERRANEO: MINACCIA E CONSERVAZIONE

Nonostante il successo evolutivo raggiunto in 400 anni di evoluzione, oggi i Condroitti sono fortemente minacciati dall'attività antropica, principalmente a causa di caratteristiche biologiche che li rendono vulnerabili rispetto ad altri taxa marini (Nieto et al 2015). Essi possiedono una strategia riproduttiva di tipo k (Holden 1974), sono quindi caratterizzati da lunga durata del ciclo vitale, una crescita lenta, maturità tardiva, bassa fecondità, lunghi periodi di gestazione, basso numero di prole, (Caillet *et al.* 2005) e scarsa compensazione densità-dipendente nella sopravvivenza dei giovanili (Dulvy *et al.* 2014; Nieto *et al.* 2015)

Queste caratteristiche comportano in una bassa capacità di recupero delle popolazioni dopo aver subito danni a causa dell'eccessiva pesca (overfishing) o di altre attività esercitate dall'uomo (degradazione degli habitat, bioaccumulazione di inquinanti) (Caillet *et al.* 2005; Stevens *et al.* 2005).

A livello globale lo stato attuale dei Condroitti risulta in declino per abbondanza, diversità e range di distribuzione. Lo scenario per le popolazioni di condroitti del Mediterraneo è persino peggiore rispetto ad altre zone del mondo (Walker *et al.* 2005). Il Mediterraneo, infatti, costituisce un hotspot di biodiversità per le specie di Condroitti (Dulvy *et al.* 2014), tuttavia la sua natura geografica, in combinazione con le caratteristiche biologiche del gruppo e la crescente minaccia antropica rende i Condroitti mediterranei particolarmente sensibili allo sfruttamento (Camhi 1998; Stevens *et al.* 2005; Walker *et al.* 2005; Cailliet *et al.* 2005), anche in conseguenza degli altissimi livelli di sovrapesca non regolamentata (unregulated overfishing; (Nieto *et al.* 2015)

1.3.1 By catch e mercato

Le specie di Elasmobranchi vengono pescate per le loro pinne, per la pelle o la loro carne, tuttavia il loro valore commerciale è, in genere, basso rispetto ai pesci teleostei, ai crostacei e ai molluschi.

Esse possono costituire specie target della pesca commerciale o ricreativa o in altri casi essere pescate accidentalmente, rientrando nella categoria delle specie soggette a 'bycatch'. Secondo la definizione di (Bonfil 2000) le specie bycatch costituiscono "tutte le catture di squali e razze nell'ambito della pesca di altre specie".

Tutte le specie di Condroitti nel Mediterraneo sono state o sono attualmente minacciate o potenzialmente minacciate a causa del bycatch nella pesca. (Cavanagh e Gibson 2007). Nella regione, la pesca accidentale costituisce la causa maggiore di minaccia dovuta principalmente all'uso delle reti a strascico che colpiscono il 100 % delle specie, del tramaglio (94%) e del palamito (67%) (Cavanagh e Gibson 2007).

L'entità del bycatch è poco documentata: i dati FAO riportano solo gli sbarcati ufficiali, mentre non viene inclusa nelle statistiche ufficiali la porzione di bycatch (che rappresenterebbe circa il 50% delle catture di pesci cartilaginei) che viene ributtata in mare (Camhi 1998; Stevens *et al.* 2005; Bradai 2012; Dulvy *et al.* 2014). Esiste inoltre la difficoltà da parte dei pescatori di riconoscere le specie in lista rossa, problema che si ripercuote anche sulla rete delle statistiche ufficiali che obbliga a registrare le catture non a livello di specie ma per gruppi, impedendo qualsiasi approccio gestionale (SHARKLIFE 2014)

Per quanto riguarda la pesca mirata (non particolarmente diffusa in Mediterraneo), si sta assistendo in molte aree del mondo ad una diminuzione degli sbarcati di pesci cartilaginei nonostante lo sforzo di pesca stia aumentando: mentre si sono raggiunte 24000 tonnellate nel 1983, successivamente si è osservato un regolare decremento del trend di catture arrivando nel 2007-2008 a circa 7000 tonnellate annue (Bradai 2012).

Secondo (Dent e Clarke 2015) il valore complessivo dichiarato del commercio mondiale dei prodotti di squalo (pinne e carne di squalo) si aggira su 1 miliardo di dollari ogni anno, tuttavia lo stato delle conoscenze di questo crescente mercato globalizzato resta limitata. La stragrande maggioranza delle pinne di squalo sono destinati per il consumo dei paesi orientali, mentre i più grandi consumatori al mondo di carne di squalo si trovano in Sud America e in Europa (tra gli importatori più importanti risulta anche l'Italia). Lo squalo martello, la verdesca e lo squalo pinna bianca sono preferiti per le pinne mentre il gattuccio, lo squalo mako e lo squalo galea sono preferiti per la carne.

L'Europa storicamente è sempre stato il più grande consumatore e specie come la verdesca, spinarolo vengono ampiamente commercializzati, soprattutto nel nord del Paese, come bistecche di carne congelata. Negli ultimi anni la più economica verdesca ha sostituito il commercio di squali più piccoli come spinarolo e gattuccio, a causa della sovrappesca di queste ultime specie in acque europee e alle regolazioni *antifinning* che prevedono l'utilizzo dell'intera carcassa delle verdesche.

L'Italia è uno dei più grandi mercati di consumo del mondo per carne di squalo e costituisce il secondo più grande importatore.

Tuttavia le statistiche delle catture, anche se in miglioramento, raramente fanno distinzione tra le specie che vengono commercializzate senza essere identificate con precisione nei documenti commerciali.

1.3.2 STATUS NELLA IUCN Red List of Threatened Species™

La IUCN Red List of Threatened Species è ampiamente riconosciuta come sistema per la classificazione delle specie a rischio globale di estinzione. Nonostante non abbia un valore legale viene frequentemente usata da parte dei governi e delle associazioni ambientaliste per definire le priorità e le azioni di conservazione (Bradai 2012). All'interno della IUCN, è stato istituito nel 1991 il gruppo IUCN Shark Specialist Group (SSG) allo scopo di valutare e rispondere alle esigenze di conservazione degli squali, completando le valutazioni globali per tutte le specie di Condroitti.

Un recente studio condotto da (Nieto *et al.* 2015), indaga lo stato di minaccia delle specie di pesci marini nelle acque europee (comprendendo il Mar Mediterraneo, il Mar Nero, l'Oceano Atlantico Settentrionale e nord orientale) e la loro inclusione nelle categorie nella IUCN Red List of Threatened Species™. Secondo i dati più aggiornati, la classe dei Condroitti mostra la più alta percentuale di specie minacciate (40.4%), in comparazione con gli Actinopterygii (2.5%) e dei Myxini (per i quali le tre specie sono incluse nella categoria Minor Preoccupazione (Least Concern LC).

E' importante sottolineare che tutte le 15 specie di pesci marini europei Criticamente minacciati (CR) e 15 su 22 specie Minacciate (EN) sono Condroitti. Entro i Condroitti tutti gli *Squatiniiformes* sono minacciati d'estinzione, così come un'alta percentuale di *Lamniformes*, *Squaliformes*, e *Rajiformes* (87,5%, 55,6% and 36,2%, rispettivamente). *Carcharhiniiformes* e *Squaliformes* includono molte specie Data Deficient (DD) (Nieto et al 2015).

Tuttavia il vero numero di specie minacciate è incerto dato che 27 specie (20,6%) sono state classificate come Data Deficient (DD). A seconda dello status delle specie DD, la vera percentuale di specie minacciate potrebbe attestarsi tra 32.1% (se tutte le specie DD non sono minacciate) e 52.7% (se tutte le specie DD non sono minacciate). In Europa, 11.5% (15 specie) sono Critically Endangered, 13% (17 specie) sono Endangered, 7.6% (10 specie) sono Vulnerable, 10.7% (14 specie) sono Near reatened.

Inoltre, 39.7% (52 specie) delle specie di condroitti hanno popolazioni in declino, 22.9% (30 specie) sono stabili, 2.3% (3 specie) sono in aumento, mentre il trend di 46 specie (52.9%) è sconosciuto.

Il grafico (Figura 2) mostra il grado di minaccia e la categorizzazione all'interno della Red List IUCN delle 87 specie che costituiscono la selacofauna del Mediterraneo. Il 45% (39 specie) dei condroitti mediterranei è minacciato (Critically Endangered, Endangered o Vulnerable). Un ulteriore 17% (15 specie) sono classificate come Near Threatened e il 14% (12 specie) come Least Concern. Si hanno poche informazioni sul 22% dei condroitti (19 specie), che sono stati inseriti nella categoria Data Deficient, o addirittura nessuna valutazione (2%, 2 specie).

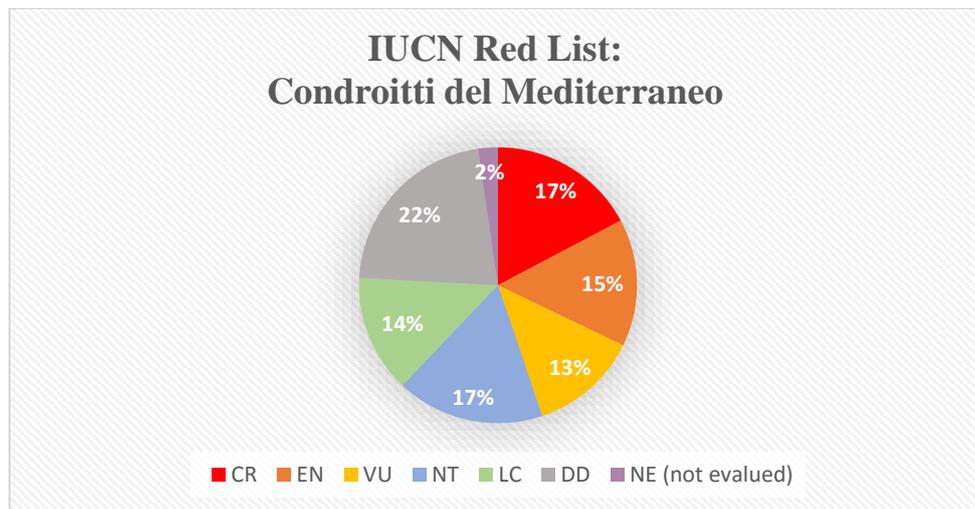


Figura 2. Grafico del grado di minaccia dei condroitti del mediterraneo e categorizzazione all'interno della Red List IUCN
Condroitti n=87

Nelle acque italiane delle 78 specie di Condroitti, il 21% risulta minacciato (CR, EN, VU), il 3% vicino alla minaccia (NT), mentre per più della metà delle specie (52%) non esistono dati sufficienti per determinare il grado di minaccia (DD) (Rondinini *et al.* 2013). Evidente declino rispetto all'abbondanza storica ha portato a classificare nove specie di pesci cartilaginei come CR nelle acque italiane (*Alopias vulpinus*, *Galeorhinus galeus*, *Squalus acanthias*, *Squatina aculeata*, *Squatina oculata*, *Squatina squatina*, *Rostroraja alba*, *Rhinobatos cemiculus*, *Rhinobatos rhinobatos*). I palombi (*Mustelus asterias*, *Mustelus mustelus*, *Mustelus punctulatus*), la mobula o manta mediterranea (*Mobula mobular*) sono giudicati in pericolo (EN), la verdesca *Prionace glauca* vulnerabile (VU) con declino nella abbondanza delle popolazioni di oltre il 30% nelle ultime tre generazioni. Due specie risultano vicine allo stato

di minaccia (NT): la razza maltese *Raja melitensis*, per il suo ridotto areale geografico, e lo spinarolo bruno *Squalus blainville* di cui si hanno indicazioni di declino. Il gruppo di condritti il cui stato attuale non desta particolari preoccupazioni (LC) risulta formato da un totale di 16 specie, in gran parte costiere.

1.3.3 Strumenti legali di protezione

Sono quattro le Convenzioni internazionali che garantiscono la protezione dei Condritti minacciati in Mediterraneo:

- CMS (Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals Bonn Convention),
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora),
- Convenzione di Berna (Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats),
- Convenzione di Barcellona (Convention for the Protection of the Marine Environment and the Coastal Region of the Mediterranean).

Nella convenzione di Bonn (CMS) sono inclusi *Carcharodon carcharias*, *Cetorhinus maximus*, *Pristis pristis*, *Pristis pectinata*, *Mobula mobular* in Appendice I (specie minacciate) e II (specie conservate grazie a trattati), *Isurus oxyrinchus*, *Lamna nasus*, *Alopias vulpinus*, *Sphyrna lewini*, *Sphyrna mokarran* in Appendice II.

Per il Mediterraneo la CITES, che regola il commercio internazionale delle specie di squali, ha inserito due specie di Pristidi (*Pristis pristis*, *Pristis pectinata*) in Appendice I (il cui commercio internazionale è proibito), e sette specie (*Cetorhinus maximus*, *Carcharodon carcharias*, *Rhincodon typus*, *Sphyrna lewini*, *Sphyrna mokarran*, *Sphyrna zygaena*, *Lamna nasus*) nell'Appendice II (specie non necessariamente minacciate di estinzione, ma il cui commercio internazionale deve essere controllato al fine di evitare uno sfruttamento incompatibile con la loro sopravvivenza).

Nell'Appendice 2 della Convenzione di Berna sono incluse 3 specie strettamente protette in ambito mediterraneo: *Cetorhinus maximus*, *Carcharodon carcharias*, *Mobula mobular*.

Nell'Appendice 2 della Convenzione di Berna sono incluse 4 specie protette in ambito mediterraneo: *Isurus oxyrinchus*, *Lamna nasus*, *Prionace glauca*, *Squatina squatina*, *Rostroraja alba*.

L'Annesso 2 della Convenzione di Barcellona elenca 24 specie come in pericolo o minacciate: *Carcharias taurus*, *Carcharodon carcharias*, *Cetorhinus maximus*, *Dipturus batis*, *Galeorhinus galeus*, *Gymnura altavela*, *Isurus oxyrinchus*, *Lamna nasus*, *Leucoraja circularis*, *Leucoraja melitensis*, *Mobula mobular*, *Odontaspis ferox*, *Oxynotus centrina*, *Pristis pectinata*, *Pristis pristis*, *Rhinobatos cemiculus*, *Rhinobatos rhinobatos*, *Rostroraja alba*, *Sphyrna lewini*, *Sphyrna mokarran*, *Sphyrna zygaena*, *Squatina aculeata*, *Squatina oculata*, *Squatina squatina*

L'Annesso 3 della Convenzione di Barcellona elenca 8 specie come specie il cui sfruttamento deve essere regolamentato: *Carcharhinus plumbeus*, *Centrophorus granulosus*, *Heptranchias perlo*, *Mustelus asterias*, *Mustelus mustelus*, *Mustelus punctulatus*, *Prionace glauca*, *Squalus acanthias*.

1.4 *RAJA CLAVATA* LINNAEUS, 1758

1.4.1 Tassonomia



Figura 3 Esemplare di *Raja clavata*. (Fonte web <http://especiesmarinasdeinteresbromatologic.blogspot.it>)

Tabella 1. Classificazione tassonomica della specie *Raja clavata* Linnaeus, 1758

REGNO	Animalia
PHYLUM	Chordata
SUBPHYLUM	Vertebrata
SUPERCLASSE	Gnathostomata
CLASSE	Elasmobranchii
INFRACLASSE	Batoidea
ORDINE	Rajiformes
FAMIGLIA	Rajidae
GENERE	<i>Raja</i>
SPECIE	<i>Raja clavata</i> Linnaeus, 1758

Varianti del nome scientifico: *Malacoraja clavata* (IUCN 2015)

Nome comune (italiano): razza chiodata

Nome comune (inglese): thornback ray

La razza chiodata (Figura 3), *Raja clavata* Linneus 1758, è una razza appartenente alla famiglia dei Rajidae, di cui fanno parte in Mediterraneo 16 possibili valide specie appartenenti a quattro generi (*Raja*, *Dipturus*, *Leucoraja* e *Rostroraja*) (Mancusi *et al.* 2010). In Tabella 1 è riportata la classificazione sistematica di *R. clavata* della specie

1.4.2 Morfologia

Disco più largo che lungo con margini anteriori più o meno sinuosi. Rostro breve e ottuso. Dorso sempre completamente spinuloso anche nei giovani; negli adulti sono presenti grosse spine ricurve su placche ossee anche sul ventre. Coda con spine mediamente sempre presenti, spine laterali certe volte assenti. Colore del dorso estremamente variabile da grigio a bruno scuro con molti punti neri, talvolta sono presenti grosse macchie nere sulle ali e bande nere trasversali sulla coda (Serena *et al.* 2005).

1.4.3 Distribuzione

Raja clavata è vastamente distribuita in tutto il bacino del Mediterraneo, Mar Nero, nell'Oceano Atlantico orientale dalle isole Faroe alla Mauritania. E' stata segnalata, inoltre, lungo le coste dell'Oceano Atlantico e Indiano nell'Africa meridionale, tuttavia il suo quadro tassonomico in queste acque risulta ancora poco chiaro (Stehmann e Bürkel 1984) (Figura 4). L'abbondanza della specie è fortemente correlata con la profondità, il tipo di sedimento, la disponibilità di prede e il substrato per la deposizione delle uova (Martin *et al.* 2005; Griffiths *et al.* 2010) E' una specie demersale che occupa ampie batimetrie, ritrovandosi dai 10 m fino agli 300 e anche fino ai 570 nel Mar Ionio (Whitehead *et al.* 1986). In Sardegna la specie secondo (Follesa *et al.* 2003) mostra una distribuzione batimetrica ampia, con una frequenza maggiore tra 100-200 m.



Figura 4 Distribuzione geografica di *R. clavata*. (Fonte: <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=39399>)

1.4.4 Dieta

La razza chiodata è un predatore notturno e si nutre di teleostei, molluschi cefalopodi e soprattutto di crostacei (Fischer 1973; Whitehead *et al.* 1986). La dieta si modifica con l'aumentare delle dimensioni essendo essenzialmente malacofaga nelle fasi giovanili e sempre più ittiofaga man mano che si accresce (Cunha *et al.* 1986)

1.4.5 Riproduzione

Raja clavata è una specie ovipara con fertilizzazione interna, le femmine maturano tra i 9 e i 12 anni di età (Nottage e Perkins 1983). L'accoppiamento avviene in primavera; uno studio sull'analisi dei clutches di uova condotto da (Chevolot *et al.* 2007) con l'impiego di marcatori microsatelliti ha permesso di indagare la paternità multipla per la specie. Questa era stata precedentemente ipotizzata sulla base dell'osservazione del comportamento, senza poter stabilire il successo dell'accoppiamento (Chapman *et al.* 2003). L'analisi genetica ha stabilito che le femmine di *R. clavata* sono poliandre e che le uova vengono fecondate da più di un maschio (i quattro clutches di uova oggetto di studio contenevano embrioni fecondati da 4-6 padri). Le uova (capsule) vengono depositate nel substrato a giorni alterni per un periodo di diverse settimane da febbraio a settembre (Holden 1975; Koop 2005). Il tasso di fecondità per le femmine è basso ed è stato stimato tra 48-150 uova per anno (Holden 1975; Ryland e Ajayi 1984; Ellis e Shackley 1995). Dopo 4-5 mesi di incubazione si ha la schiusa di una piccola razza del tutto simile all'adulto (Ellis e Shackley 1995). In Figura 5 è mostrato il ciclo vitale di *Raja clavata*.

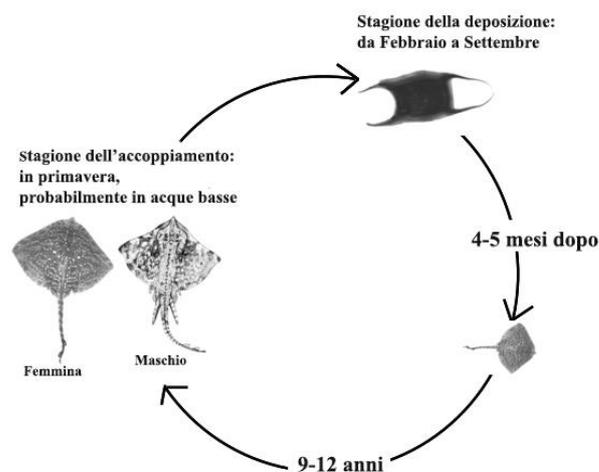


Figura 5 Ciclo vitale di *R. clavata* (Da Chevolot *et al.* 2006, modificato)

1.4.6 Migrazione

La migrazione di *Raja clavata* è stata analizzata in due studi di marcatura (tagging) condotti nell'estuario del Tamigi. I risultati di marcatura e ricattura hanno mostrato che i giovanili tendono a rimanere in acque profonde (10-30 m) per diversi anni, mentre gli adulti mostrano movimenti stagionali, dalle acque più profonde in inverno a quelle più superficiali (<10 m) in primavera, dove presumibilmente avviene accoppiamento e riproduzione (Walker *et al.* 1997). L'*home range* è stato stimato essere piuttosto ristretto, come si osserva dalle ricatture molto vicine al punto di rilascio, con 80% entro i 75 km (Walker *et al.* 1997). Un secondo studio, effettuato usando Data Storage Tags (DSTs), ha rivelato che i movimenti stagionali possono essere effettuati anche dai giovanili (tra 30 e 60 cm in lunghezza), e inoltre ha indicato che la maggior parte degli individui sono filopatrici, ritornando nella stesse aree ogni stagione (Hunter *et al.* 2005a; Hunter *et al.* 2005b).

1.5 SCYLIORHINUS CANICULA (LINNAEUS, 1758)

1.5.1 Tassonomia

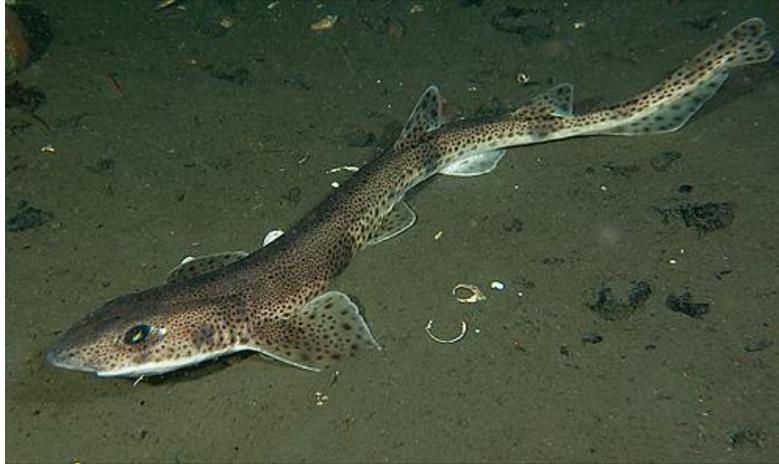


Figura 6 Esemplare di *S. canicula*. (Fonte web <https://www.flickr.com/photos>)

Tabella 2. Classificazione tassonomica della specie *Scyliorhinus canicula* Linnaeus, 1758

REGNO	Animalia
SUBPHYLUM	Vertebrata
SUPERCLASSE	Gnathostomata
CLASSE	Chondrichthyes
SUBCLASSE	Elasmobranchii
SUPERORDINE	Euselachii
ORDINE	Carcharhiniformes
FAMIGLIA	Scyliorhinidae
GENERE	Scyliorhinus
SPECIE	<i>Scyliorhinus canicula</i> (Linnaeus, 1758)

Nome comune (italiano): gattuccio comune

Nome comune (inglese): Smallspotted Catshark, Lesser Spotted Dogfish

Il gattuccio comune (Figura 6) *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758) è un piccolo squalo appartenente alla famiglia Scyliorhinidae (Tabella 2), la più grande e diversificata famiglia di squaliformi ancora viventi: è, infatti, costituita da 16 generi e da approssimativamente 134

specie, con distribuzione mondiale (Compagno *et al.* 2005; Flammang *et al.* 2008). In Tabella 2 è riportata la descrizione tassonomica della specie.

1.5.2 Morfologia

Il gattuccio raggiunge una lunghezza massima di 100 cm (Compagno 1984); il corpo è molto slanciato e affusolato, il capo è schiacciato, il muso è corto e arrotondato. La bocca è molto arcuata e coperta nel margine anteriore dalle valve nasali, con le narici più vicine all'esterno del muso che alla bocca; lo spiracolo è dietro l'occhio. Oltre alle due pettorali, il gattuccio possiede due pinne dorsali: la prima è molto arretrata, più grande della seconda (Compagno 1984). Presenta due pinne pelviche triangolari, lunghe e strette: nel maschio danno origine agli pterigopodi, supportati dall'endoscheletro e necessari per la fecondazione interna (Compagno 1999). Infine, presenta una pinna anale e la pinna caudale, eterocerca, con il lobo superiore molto più sviluppato rispetto a quello inferiore. Il colore degli esemplari adulti è tra il giallastro e il bruno, con numerose macchie nere e marroni lungo tutto il corpo a eccezione del ventre, che è bianco. Negli esemplari giovani possono essere presenti delle fasce trasversali scure.

1.5.3 Dieta

S. canicula viene considerato un predatore generalista che gioca un ruolo ecologico significativo nella strutturazione delle reti trofiche delle comunità demersali (Bowen 1997), rappresentando l'anello di congiunzione tra gli invertebrati ed i predatori più grandi (Storelli e Marcotrigiano 2005; Coelho *et al.* 2012).

Studi basati sulla tecnica della marcatura e ricattura hanno dimostrato che gli individui adulti presentano areali d'alimentazione relativamente piccoli, in cui tendono a consumare con maggiore frequenza le categorie di prede più rappresentate (Sims *et al.* 2001). La dieta di *S. canicula*, infatti, si basa su una vasta gamma di prede della fauna megabentonica.

1.5.4 Distribuzione

La specie è distribuita nella piattaforma e scarpata continentale nel Mar Mediterraneo e nell'oceano Atlantico nord orientale, a nord dalla Norvegia fino alle isole inglesi, a sud dal Senegal e probabilmente lungo la Costa d'Avorio (Compagno *et al.* 2005) (Figura 7). È una specie di climi temperati con temperatura ottimale di 11-17 °C (Sánchez e Gil 2000). Specie demersale ha distribuzione batimetrica compresa tra 10 e circa 550 m in Oceano Atlantico

(Compagno 1984) e fino agli 800 m nel Mediterraneo. Abita fondali sassosi, sabbiosi e corallini, ancorando le capsule ovigere alle macroalghe o ad altre strutture solide (Wheeler *et al.* 1978) Secondo i risultati di studi di marcatura (tagging) e distribuzione, gli adulti mostrano un elevato grado di fedeltà per l'habitat; infatti il 70% degli individui marcati e ricatturati non hanno percorso distanze maggiori di 24 km e la massima distanza registrata di 256 km (Rodríguez-Cabello *et al.* 2004)



Figura 7. Mappa di distribuzione di *S. canicula*. Fonte:<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=161399>

1.5.5 Riproduzione

Come la maggior parte degli Sciliorinidi, *S. canicula* è una specie ovipara (Kormanik 1993) che depone le proprie uova telolecitiche all'interno di capsule protettive (Thomason *et al.* 1994; Thomason *et al.* 1996; Ellis and Shackley 1997). Uno studio sulla genetica applicata sullo studio della riproduzione condotto da (Griffiths *et al.* 2012) analizzando la progenie con marcatori microsatelliti dimostra che la paternità multipla è tipica per la specie

1.6 STATUS DI CONSERVAZIONE

1.6.1 *R. clavata*

La razza chiodata è una specie comune nel Mar Mediterraneo (Bradai 2012) ed una delle specie più comunemente catturata con la pesca a strascico come by catch (Bertrand et al. 2000; (Abella e Serena 2005). E' valutata secondo la lista rossa IUCN come Near Threatened in Europa e Mediterraneo (Nieto et al 2015, Cavanagh 2007).

In Mediterraneo. *Raja clavata* registra un aumento della produzione (osservando i dati tra il 1980 e il 2008), secondo (Bradai 2012) questo non è dovuto al buono stato di sfruttamento della risorsa ma alle nuove tecniche di prelievo. I dati di *stock assessment* relativi all'area GFCM (GFCM:SAC14/2012/Inf.16) descrivono uno status di overfishing per la specie nel Mar Tirreno, nell'isola di Malta e a sud della Sicilia (Bradai 2012). In Mediterraneo non esiste una regolamentazione della pesca, come quote di pesca o taglia minima di cattura.

In Atlantico. La pesca della razza chiodata nell'Atlantico Nord Orientale: Mare del Nord, Canale d'Inghilterra, *Skagerrak* e il Kattegat (Area 27 FAO, Subarea IV e divisione IIIa and VIId secondo ICES) è regolamentata (Council Regulation (EU) 2015/104) stabilendo il totale delle catture ammissibili (TACs). Inoltre risulta proibita la pesca della specie nella suddivisione IIIa, con obbligo di rilascio se catturata accidentalmente (ICES Advice 2012 Book 6)(ICES 2015)

1.6.2 *S. canicula*

Il gattuccio comune è uno degli elasmobranchi più abbondanti nel Mediterraneo e nell'Atlantico Nord orientale. La specie è inserita nella lista rossa IUCN come specie Least Concern in Europa e Mediterraneo (Cavanagh and Gibson 2007; Nieto *et al.* 2015) in quanto il trend di popolazione è stabile e non vi sono evidenze che indichino un declino significativo. Tuttavia le catture dovrebbero essere monitorate e gestite cautamente, poiché le informazioni sullo status di popolazione considerando il basso potenziale riproduttivo della specie risultano limitate (Gibson *et al.* 2006).

In Atlantico costituisce soprattutto una specie di scarto della pesca demersale e sono il 10 % delle catture vengono commercializzate (Gibson *et al.* 2006) Le statistiche FAO e ICES mostrano che gli sbarchi per l'Atlantico Nord orientale sono rimasti stabili o in aumento (ICES 2008; FAO 2008), tuttavia i dati del 2009 mostrano al largo della Spagna atlantica si sono ridotti

tra il 2002 e il 2006. E' stata inoltre documentato il suo sfruttamento nel mare dei Widden e a largo di Malta (Gibson *et al.* 2006).

In Mediterraneo. Oltre a costituire una specie by catch della pesca demersale, presenta un moderato valore commerciale, anche in Sardegna. Un'analisi a lungo termine condotta nel Mar Tirreno documenta un trend di declino per la specie tra il 1960 e il 1990, tuttavia i dati di *stock assessment* relativi all'area GFCM (GFCM:SAC14/2012/Inf.16) descrivono uno status di overfishing per la specie nel Mar Tirreno e in Algeria. Inoltre, in Adriatico viene registrata una diminuzione delle catture tra il 1945 e il 2012, e collasso nel 1987, che ancora non ha subito una ripresa, registrando tra il 2008 e il 2012 solo il 10,6 % delle catture rispetto agli anni '40 (Barausse *et al.* 2014). Per la specie in Mediterraneo non esiste una regolamentazione della pesca, come quote di pesca o taglia minima di cattura.

1.6.3 Le due specie in Sardegna

Un recente studio (Marongiu 2014) ha analizzato i dati di pesca ottenuti dalla campagne di pesca a strascico sperimentale MEDITS (progetto internazionale Mediterranean Trawl Survey, (Bertrand *et al.* 2000) tra il 1994 e il 2013, ottenendo informazioni in termini di analisi della frequenza media (occurrence), e degli indici di abbondanza (indice di densità e indice di biomassa) per 25 delle 28 specie di Condroitti nei Mari della Sardegna (GSA 11).

Le due specie oggetto di questo lavoro risultano essere tra le specie più rappresentative e più frequenti nei mari circostanti la Sardegna sia nella la platea continentale (10-200 m) che nella scarpata continentale (200-800 m). In particolare il gattuccio comune è la specie più frequente a confronto con le altre specie di Condroitti (46.16 ± 8.35 , $\text{media} \pm \text{D.S.}$), mentre la razza chiodata risulta essere la più rappresentativa tra gli esemplari della famiglia Rajidae, (29.92 ± 3.84 , $\text{media} \pm \text{D.S.}$) Infine entrambe sembrano presentare un trend temporale di crescita.

Scyliorhinus canicula. Dallo studio emerge che, analizzando i valori di occurrence delle specie, il gattuccio comune *Scyliorhinus canicula* costituisce la frazione maggiore delle catture tra i Condroitti (19%) e inoltre tra gli squaliformi rappresenta la specie più frequentemente catturata (41%). E' distribuito quasi uniformemente in tutte le sub-aree della Sardegna (in base alle sette zone individuate all'interno del progetto MEDITS) con una leggera preferenza per la costa occidentale e in particolare per la zona Nord occidentale dove viene registrato il valore medio massimo di occurrence (70.81 ± 18.67 , $\text{media} \pm \text{D.S.}$). Inoltre ha mostrato una distribuzione batimetrica piuttosto ampia (tra i 10 e gli 800 m) con le frequenze maggiori registrate dai 50 ai

500m (valore più alto nello strato batimetrico dei 100-200m, 80.47 ± 11.35 , media \pm D.S.) e, un'abbondanza piuttosto rilevante sia in termini di densità che di biomassa. L'andamento del trend temporale risulta essere in crescita.

Raja clavata. La razza chiodata *Raja clavata* nei mari sardi rappresenta il 12% delle catture tra i Condroititi e il 23 % tra i 14 batoidei (stessa frequenza di *Raja polystigma*), presentando una distribuzione uniforme nelle sette sub-aree. Tra gli esemplari della famiglia Rajidae, è la specie che ha mostrato la distribuzione batimetrica più ampia, con una frequenza maggiore tra 100-200 m (57.05 ± 12.53 , media \pm D.S.) e 200-500m (58.10 ± 10.91 , media \pm D.S.) e valori degli indici di abbondanza maggiori (ID= 47.5 ± 14.4 , IB= 32.4 ± 11.8)

2. GENETICA DI POPOLAZIONE

I problemi riguardanti la gestione della pesca sono cresciuti sostanzialmente nell'ultimo periodo; oltre alle difficoltà di gestione convenzionale si devono considerare altri problemi correlati, come gli effetti della pesca sull'ecosistema e la sorveglianza della pesca illegale (Ovenden *et al.* 2013). L'approccio classico nella gestione della pesca si focalizza su fattori riguardanti cambiamenti demografici nelle popolazioni nel breve periodo (cambiamento quantitativo), basandosi su stime di abbondanza e taglia delle risorse ittiche (Ward *et al.* 1995). Tuttavia una gestione di questo tipo può essere economicamente vantaggiosa nel breve periodo, ma causare a lungo termine lo sfruttamento o l'estinzione della popolazione ittica (Çiftci e Okumuş 2002).

In questo quadro, la genetica può rappresentare un valido e versatile strumento per una gestione delle risorse ittiche a lungo termine, e può, in combinazione con l'approccio analitico, esplorare il ruolo dei fattori fisici e biologici che influenzano le dinamiche e la distribuzione (Hauser e Carvalho 2008), mirando alla conservazione del pool genico e della diversità genetica. L'approccio genetico, infatti, valuta l'entità dei cambiamenti nella composizione delle popolazioni (cambiamenti qualitativi) sia come alterazione dei tratti fenotipici, sia come risposta a lungo termine alle perturbazioni naturali o antropogeniche (Frankham 2005). La ricerca genetica nell'ultimo ventennio ha subito una rivoluzione derivata degli avanzamenti della tecnica e dai significativi progressi nell'analisi di dati genetici (Ovenden *et al.* 2013), che si riflettono in una rapida crescita delle pubblicazioni scientifiche sulla tematica classificata come 'genetica della pesca', come si può vedere dal grafico in Figura 8

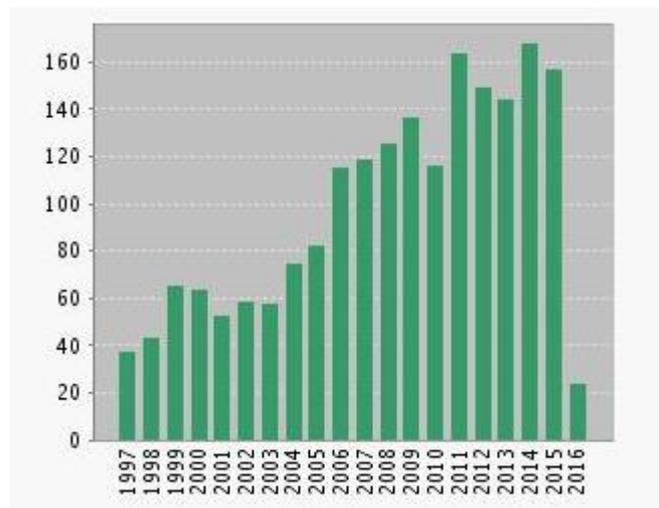


Figura 8. Grafico del numero di pubblicazioni scientifiche sulla tematica 'genetica della pesca' dal 1997 ad oggi. Fonte Web of Science, Topic = Fisheries AND Genetic, risultati trovati: 2950.

Molte di queste pubblicazioni hanno focalizzato l'attenzione sull'uso dello strumento genetico per definire le unità di popolazione ed identificare gli *stock* ittici (Hauser e Carvalho 2008; Waples *et al.* 2008; Waples e Naish 2009).

2.1 IL CONCETTO DI STOCK E LA GENETICA DELLA PESCA

Il termine stock è stato utilizzato in differenti contesti gestionali e sono stati proposti diversi approcci per definirne il termine. Innanzitutto l'idea che le specie ittiche marine dovessero essere gestite a un livello di sottospecie viene fatta risalire al ventesimo secolo, quando due biologi della pesca (Heincke 1889; Hjort 1914) hanno introdotto il concetto di popolazione locale autosufficiente come unità di studio per la gestione della pesca (Hauser e Carvalho 2008).

Nella gestione della pesca, un'unità di stock da pesca ("fishery stock") viene definita generalmente come un gruppo di pesci sfruttati in un'area specifica o con uno specifico metodo (Smith 1990); definizione che facilita la raccolta di dati sulle catture e sullo sforzo da pesca e l'applicazione di misure di gestione, ma non rappresenta necessariamente la sottostrutturazione delle specie ittiche (Carvalho e Hauser 1994).

Altre definizioni puntano a definire lo stock dal punto di vista biologico piuttosto che pratico e/o politico (Figura 9). (Ihssen *et al.* 1981) ha definito lo stock come "un gruppo intraspecifico di individui che si riproducono casualmente con integrità spaziale o temporale". Il grado di integrità permette di definire lo stock attraverso differenti interpretazioni, rappresentando i due estremi della gestione della pesca in scala temporale. Da una parte il concetto di stock ad un basso livello di integrità definito come "stock sfruttato" ("*harvest stocks*"): le risorse ittiche accessibili localmente, nelle quali la pressione da pesca in una risorsa non ha effetti sull'abbondanza del pesce in altre risorse adiacenti (Gauldie 1988). In contrasto con la maggior parte delle definizioni di stock, il concetto di "harvest stock" non implica alcuna differenza fenotipica o genetica tra stock diversi. Esso descrive un gruppo di individui la cui abbondanza dipende dal grado di reclutamento e mortalità da pesca, piuttosto che dall'immigrazione ed emigrazione. Lo scambio di individui con altri gruppi può essere sufficiente a prevenire lo sviluppo di differenze biologiche. Dall'altra il concetto di stock genetico ("*genetic stock*"), secondo il quale lo stock consiste in un'unità riproduttivamente isolata, che è geneticamente differente da altri stock (Jamieson 1974; Ovenden 1990). Il grado di integrità di un genetic stock è molto alto, pochi migranti sarebbero sufficienti a prevenire lo sviluppo di differenziazione genetica tra stock monospecifici (Gyllensten 1985; Waples 1987; Ward *et al.* 1994).

Harvest e genetic stock rappresentano due estremi nella scala temporale della gestione della pesca. Nel breve termine la gestione mira a perpetuare i benefici di una risorsa locale cercando di evitarne il sovrasfruttamento. Quindi il gruppo di individui che mostra gli effetti della pesca, cioè l'harvest stock' è l'unità gestionale di riferimento. Nel lungo termine, tuttavia, la gestione dovrebbe mirare a conservare la biodiversità delle specie sfruttate. Parte di questa biodiversità è intraspecifica, cioè diversità tra ed entro le popolazioni, e quindi il 'genetic stock' diventa il concetto chiave.

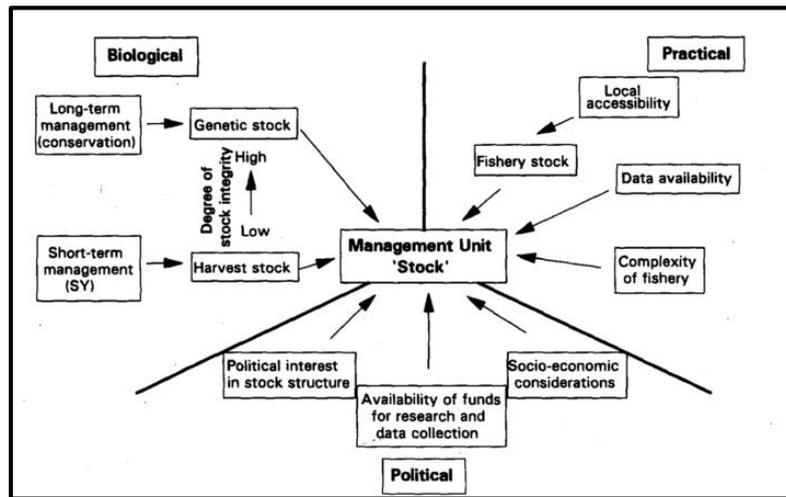


Figura 9. Rappresentazione schematica dei fattori che influenzano l'applicazione del concetto di stock. Sono definiti tre tipi di stocks: fishery, harvest and genetic stock (da Carvalho e Hauser 1994)

A questo proposito risulta differente anche il concetto di popolazione. Dal punto di vista genetico, la struttura di popolazione varia non solo lungo lo spazio, dal completo isolamento alla panmissia, ma anche temporalmente, lunga la storia evolutiva, dal contatto secondario tra popolazioni isolate, alla recente separazione di una singola popolazione in diverse sottopopolazioni.

Risulta importante identificare cambiamenti genetici all'interno di una popolazione in quanto la pesca può causare drastici effetti nel lungo periodo sulle popolazioni. Se si conosce la struttura genetica di una popolazione, può essere stimata la distribuzione delle sottopopolazioni (Utter 1991), e basare le regolazioni della pesca per le popolazioni sfruttate su questa distribuzione. In questo modo la strategia gestionale determinerà non solo un beneficio economico ma anche un sostegno continuo alle popolazioni naturali.

La genetica di popolazione si serve di marcatori molecolari per indagare la strutturazione delle popolazioni e l'identificazione degli stock, basandosi sulla misura della variazione genetica all'interno e tra popolazioni, determinando la frequenza genica e gli aspetti che possono influire

su questa come la migrazione, la mutazione, la selezione e la deriva genetica (Gall 1987). In genere la presenza di differenziazione genetica tra campioni spazialmente o temporalmente separati suggerisce l'esistenza di diversi livelli di indipendenza demografica e la presenza di stock separati (Waples 1998; Waples e Gaggiotti 2006)

L'idea classica, per cui gli ambienti marini tendono ad essere demograficamente "aperti", e che le specie marine presentino un vasto flusso genico e una dimensione infinita di popolazione, viene confutata. Nonostante in ambiente marino si osservino in generale bassi livelli differenziazione genetica a causa di minori barriere alla migrazione e ad un'ampia mobilità e dispersione degli individui, (Carvalho e Hauser 1994), si osserva in alcuni casi una strutturazione genetica anche su piccola scala spaziale (Hauser e Carvalho 2008). Questo può essere dovuto ad una dispersione larvale non sempre agevole o localizzata da particolari sistemi di correnti, o alla presenza di barriere oceanografiche, o di frammentazione degli habitat (Galarza *et al.* 2009). Restrizioni del flusso genico possono determinare una suddivisione genetica, si è visto in alcune specie che un tasso del flusso genico del 10% può indicare la presenza di stock separati (Carvalho e Hauser 1994).

Le misure indirette del flusso genico sono basate su modelli demografici in cui si verifica la migrazione tra sottopopolazioni discrete (Neigel 1997). Il più semplice è il modello a isola in cui una popolazione è divisa in sotto-popolazioni di uguale dimensione che scambiano geni le une con le altre con lo stesso tasso di migrazione; tutte le isole sono equivalenti e ogni isola può scambiare migranti con ognuna delle altre. Un difetto abbastanza ovvio di questo modello è la mancanza di struttura geografica della popolazione. L'idea di distanza geografica come limitatore dello scambio di geni è presente nel modello dell'arcipelago ("stepping-stone" model), in cui le sotto-popolazioni sono strutturate geograficamente e il flusso genico può avvenire solo tra due sotto-popolazioni adiacenti. Un'ulteriore evoluzione di questo modello è il cosiddetto modello IBD ("isolation-by-distance" model) in cui le migrazioni non avvengono tra sottopopolazioni discrete, ma all'interno di una popolazione continua in cui le frequenze alleliche si modellano sulla base delle distanze geografiche (Caramelli 2009). Il flusso genico costituisce un parametro fondamentale per lo studio della genetica di popolazione. Con alti livelli di migrazione e flusso genico tra popolazioni la "somiglianza" genetica aumenta (Neigel 1997). Perciò risulta di primaria importanza, per la definizione della popolazione genetica di una determinata specie, considerare quale modello risulta più appropriato per descriverne la sua struttura.

I tre fattori che influenzano i livelli di differenziamento genetico (misurato dall'indice di fissazione F_{ST}) sono rappresentato nel diagramma concettuale in Figura 10: il grado di connettività delle popolazioni, la loro storia evolutiva e la dimensione effettiva delle popolazioni (Hauser e Carvalho 2008). Il diagramma mostra l'influenza di questi fattori sui livelli di differenziazione genetica in popolazioni non in equilibrio. Le frecce grigie indicano una relazione negativa, cioè il fattore riduce la differenziazione esistente, le frecce nere designano invece relazioni che presumibilmente promuovono la differenziazione. Valori di differenziazione più bassi sono in relazione con un alto grado di connettività (migrazione), popolazioni di grandi dimensioni e popolazioni che stanno subendo un'espansione del proprio areale di distribuzione (frecce grigie in figura). Al contrario, alti livelli di differenziazione sono imputabili alla presenza di bassi livelli di connettività, popolazioni piccole e che hanno subito una drastica riduzione (frecce nere in figura) (Hauser e Carvalho 2008).

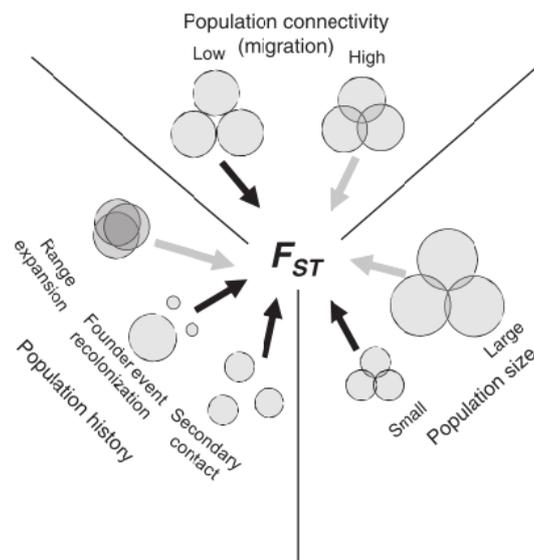


Figura 10. Diagramma concettuale che mostra l'influenza dei principali fattori (connettività, dimensione della popolazione e storia demografica) sul valore di differenziazione in popolazioni non in equilibrio. Le frecce indicano interazione positiva (in nero) o negativa (in grigio) sul grado di differenziazione. (Hauser e Carvalho 2008)

Poiché la maggior parte dei pesci marini hanno un grande potenziale per la dispersione (grazie ad una fase passiva larvale e il nuoto attivo degli adulti, e a popolazioni molto grandi), ci aspetta un flusso genico elevato e bassi effetti di deriva genetica. Tuttavia gli elasmobranchi possiedono caratteristiche biologiche diverse rispetto ai teleostei (la fecondazione è interna, assenza di fase pelagica larvale, dimensione della popolazione più piccola e filopatria), perciò ci si aspetta che la differenziazione genetica delle popolazioni avvenga su scala più piccola e venga influenzata dal comportamento piuttosto che dalle barriere geografiche fisiche.

La struttura genetica viene misurata con marcatori genetici che devono essere polimorfici all'interno delle popolazioni, e le cui forme (alleli o aplotipi) si presume siano neutrali (Heist 2005). In passato si utilizzavano gli allozimi, ancora oggi sequenze di DNA mitocondriale e i microsatelliti o ancora più recenti e innovativi i marcatori a singolo nucleotide (SNP). Essenzialmente, le differenze nella frequenza delle forme variabili dei marcatori molecolari (alleli per allozimi e microsatelliti, aplotipi nel DNA mitocondriale) tra gruppi geografici vengono usati per determinare la presenza e il grado di isolamento riproduttivo e quindi di struttura dello *stock*. Le frequenze geniche dei marcatori neutrali, come i microsatelliti, cambiano a causa della deriva genetica in modo che con il tempo gli *stock* isolati assumano diverse frequenze geniche.

Fluttuazioni nelle condizioni ambientali o nella densità di popolazione possono causare effetti sulla variabilità. Importanti fattori che influenzano la variabilità genetica, come la selezione, la migrazione e la deriva genetica possono risentire delle attività umane. Le dimensioni selettive degli attrezzi di pesca, la distruzione degli habitat, l'alterazione della disponibilità di prede, lo stress e l'inquinamento possono imporre nuove pressioni sulla *stock* e alterare i parametri di selezione esistenti in natura. Inoltre le attività umane che influenzano il movimento degli organismi, direttamente attraverso la creazione o la rimozione di barriere o indirettamente modificando la densità o le condizioni ambientali (alterazione dell'habitat, introduzione di *stock* esotici o di allevamento nell'ambiente naturale, sovrasfruttamento), possono alterare la diversità genetica di una popolazione.

Lo studio della variazione genetica nelle popolazioni, l'indagine delle frequenze alleliche nello spazio e nel tempo costituiscono il soggetto principale della genetica di popolazione. Le variazioni genetiche, derivanti sia da mutazioni spontanee dei geni che dalla immigrazione di individui geneticamente differenti, permettono in una specie o nelle popolazioni un adattamento in condizioni di stress o di cambiamenti ambientali (Allendorf *et al.* 1987). Perciò la perdita di variabilità genetica, dovuta alla prolungata selezione, la perdita di eterozigosità dovuta all'inbreeding o all'isolamento può portare ad una diminuzione del potenziale di adattabilità delle popolazioni (Ferguson *et al.* 1995). La conseguenza diretta della suddivisione delle popolazioni ittiche a causa di accoppiamento non casuale e deriva genetica è la fissazione dei geni, e la perdita della fitness e, infine, l'estinzione delle popolazioni locali (Ferguson *et al.* 1995). Inoltre, lo stress come lo sfruttamento può aumentare questi pericoli attraverso effetti sulla dimensione effettiva della popolazione (Nelson e Soule 1987).

2.2 MARCATORI MICROSATELLITI

I microsatelliti possono ritenersi i marcatori molecolari più usati negli studi genetici grazie alla loro applicazione in molti settori, tra cui la genetica della conservazione, la genetica delle popolazioni e la genetica forense (Figura 11). Il motivo di questo largo impiego va ricercato nel fatto che i microsatelliti sono co-dominanti, multi-allelici, altamente riproducibili, hanno un'alta risoluzione e sono basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR).

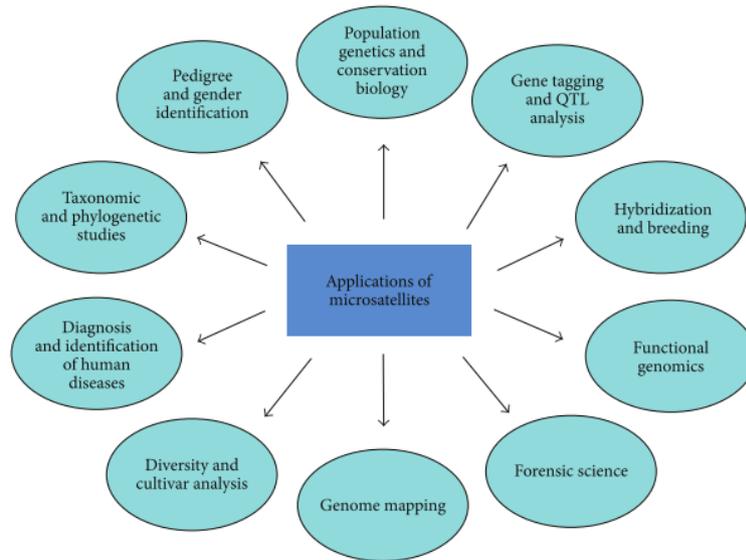


Figura 11. Esempi delle applicazioni dei loci microsatelliti nei vari settori della genetica (da Abdul-Muneer 2014)

I microsatelliti, conosciuti anche come ripetizioni di sequenze semplici (SSRs Simple Sequence Repeats) o corte ripetizioni in tandem (STR Short Tandem Repeat), sono regioni non codificate ripetute nel DNA, composte da piccoli motivi da 1 a 6 nucleotidi ripetuti in tandem per decine di volte fino ad una lunghezza massima della successione di 300 paia di basi (Rassmann *et al.* 1991). Queste ripetizioni sono ampiamente diffuse sia nel genoma eucariotico che in quello procariotico (Field e Wills 1996; Tóth *et al.* 2000). Sono più lunghe ed abbondanti nei vertebrati che negli invertebrati e la maggior parte di esse è costituita da ripetizioni dinucleotidiche (Wang *et al.* 1994). In base alla composizione, i microsatelliti si distinguono in perfetti, composti, interrotti e imperfetti (Jarne e Lagoda 1996). Le ripetizioni più diffuse sono i di-, tri- e tetra-nucleotidi. I loci microsatelliti con motivo di-nucleotidico sono usati con maggior frequenza, poiché risultano di più facile isolamento, data la maggiore densità di presenza (in media si trova una ripetizione di dinucleotidi ogni 30-50 kb (Jarne e Lagoda 1996). Le ripetizioni dinucleotidiche più frequenti sono CA (particolarmente diffusa negli animali) e TG (Beckmann e Weber 1992) che mostrano una frequenza doppia rispetto al dinucleotide AT e tripla rispetto

alla coppia AG. Sono codominanti, vengono perciò visualizzati entrambi gli alleli in un individuo eterozigote, e sono ipervariabili: sono stati identificati fino a 50 alleli per un singolo locus; l'eterozigosità media è del 50% e per alcuni loci raggiunge picchi del 100%.

Ogni locus microsatellite è composto da una sequenza unica di DNA (regione fiancheggiante), che definisce il locus, e da un motivo ripetuto che può essere comune a più loci microsatelliti (DeWoody e Avise 2000). Le SSRs hanno un tasso di mutazione maggiore rispetto ad altre regioni del genoma e ciò le rende funzionali come marcatori molecolari (Jarne e Lagoda 1996). Varia da 10^{-2} e 10^{-6} eventi di mutazione per locus in ogni generazione (Schlötterer 2000), con un tasso medio generalmente accettato nei pesci di $5 \cdot 10^{-4}$ mutazioni per generazione (Lippe *et al.* 2006).

Le mutazioni avvengono come inserzione e/o delezione del motivo ripetuto, che causano variazioni nella lunghezza complessiva della sequenza (Goldstein 1999) determinando il polimorfismo dei loci microsatelliti. Le cause delle mutazioni possono essere attribuite prevalentemente ad un processo noto come *slipped-strand mispairing* o *slippage* della DNA polimerasi durante la replicazione (Levinson e Gutman 1987), o anche alla riparazione del DNA (Tautz 1989; Strand *et al.* 1993), o ad un evento di ricombinazione tra molecole di DNA.

L'alto tasso di mutazione determina alti livelli di diversità allelica e un'alta variazione intraspecifica, che fa dei marcatori microsatelliti un potente strumento per studi su differente scala, includendo comparazioni tra specie, struttura genetica dello *stock* all'interno delle specie e misura del flusso genico, analisi concernenti la parentela (ad esempio paternità) all'interno delle famiglie (McDonald e Potts 1997; Shaw *et al.* 1999).

Parallelamente, le regioni fiancheggianti tendono a mantenersi costanti, in quanto i tassi di mutazione puntiforme (10^{-9} - 10^{-10} mutazioni per locus per generazione, (Goldstein 1999) sono molto più bassi di quelli del microsatellite vero e proprio. Ciò consente di disegnare dei primer specifici che permettono l'amplificazione via PCR (Polymerase Chain Reaction) del locus da diversi individui e funzionano spesso anche in specie filogeneticamente vicine (Goldstein *et al.* 1995; Heist 2005). La trasferibilità o amplificazione cross-specie può rappresentare un fattore importante nell'agevolare l'uso dei microsatelliti difficili da isolare e di quelli con bassa frequenza. Tuttavia, il tasso di successo dell'amplificazione diminuisce con l'aumentare delle differenze genetiche tra le specie (Primmer e Merilä 2002).

Diversi studi condotti sui pesci indagano la struttura di popolazione servendosi di marcatori microsatelliti in *cross amplification*. I loci microsatelliti che verranno utilizzati in questo studio per la specie *Raja clavata*, quelli isolati da (El Nagar *et al.* 2009), sono stati caratterizzati per

quattro specie di razze europee (*Raja clavata*, *Raja montagui*, *Dipturus batis*, and *Leucoraja naevus*) da sequenze tag espresse (ESTs) di *Leucoraja erinacea*.

Le metodologie di analisi che si basano sull'impiego di tali marcatori, tuttavia, possono presentare alcuni inconvenienti, che portano a sottostimare le differenze genetiche.

Di seguito sono elencati alcuni problemi tipici dei microsatelliti riscontrabili nella fase di genotipizzazione:

Omoplasia. Causata dal processo di *slipped-strand mutation*, è la condizione di uguaglianza nella tipologia e nel numero di *repeats* microsatelliti tra due alleli che hanno diversa discendenza ma che si presentano 'identici in stato' (non distinguibili elettroforeticamente) (Estoup *et al.* 2002) Questo fenomeno induce a sottostimare il reale livello di divergenza tra due popolazioni.

Large allele dropout or short allele dominance. Gli errori di genotipizzazione possono verificarsi a causa dell'amplificazione preferenziale di alleli piccoli mentre l'allele più grande non viene amplificato (Wattier *et al.* 1998).

Replication slippage. Durante l'amplificazione PCR lo slittamento della polimerasi (slippage) può produrre elementi addizionali (sottoforma di pre-picchi allelici che precedono l'allele effettivo) detti *stutters*, che differiscono dal template originale per multipli dell'unità ripetuta (Shinde *et al.* 2003). Gli *stutters* sono comuni nei loci dinucleotidici, rendendo difficili le interpretazioni tra omozigoti e eterozigoti.

Alleli nulli. Eventuali mutazioni nel sito di appaiamento dei primers per l'amplificazione del locus possono impedire l'appaiamento stesso dell'oligonucleotide alla sequenza bersaglio, causando la mancata amplificazione di alcuni alleli (alleli nulli) e quindi di falsi omozigoti (Shaw *et al.* 1999). Il calcolo della frequenza degli alleli nulli per ciascun locus, causati da mutazione della *flanking region*, viene effettuato durante l'analisi dati al fine di indagare sulle cause di un possibile eccesso di omozigoti (Chapuis e Estoup 2006).

A questi errori, si affianca la soggettività dell'interpretazione dell'operatore, a cui si può ovviare confrontando risultati dello *scoring* effettuato da più operatori.

2.2.1 Meccanismi mutazionali dei microsatelliti

Nell'analisi dei dati, una delle sfide più complesse dei genetisti è rappresentata dalla corretta identificazione del meccanismo mutazionale che dà origine ai microsatelliti stessi (Schlötterer 2000; Beck *et al.* 2003; Ellegren 2004). Per la maggior parte delle applicazioni ecologiche, non è importante conoscere l'esatto meccanismo mutazionale di ogni locus, visto che la maggior

parte delle analisi sono insensibili al meccanismo mutazionale (Neigel 1997). Tuttavia, diversi statistiche basate su stime di frequenze alleliche (come gli indici di differenziazione F_{ST} e R_{ST}) si basano su uno specifico modello di mutazione. Tradizionalmente, l'*infinite allele model* (IAM), secondo il quale ogni evento mutazione crea un nuovo allele (la cui dimensione è indipendente dal allele progenitore) risulta il modello scelto per le analisi di genetica di popolazione essendo anche il modello più semplice. Tuttavia, *stepwise mutation model* (SMM), nel quale ciascun evento mutazionale determina la perdita o l'aggiunta di un'unica unità di *repeat* risulta più appropriato per descrivere il processo mutazionale dei microsatelliti (Slatkin 1995).

3. MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONAMENTO *RAJA CLAVATA*

Gli individui di *Raja clavata* oggetto del presente studio provengono da 6 siti geografici di campionamento, cinque Mediterranei e un Atlantico per un totale di 294 campioni (Figura 12).

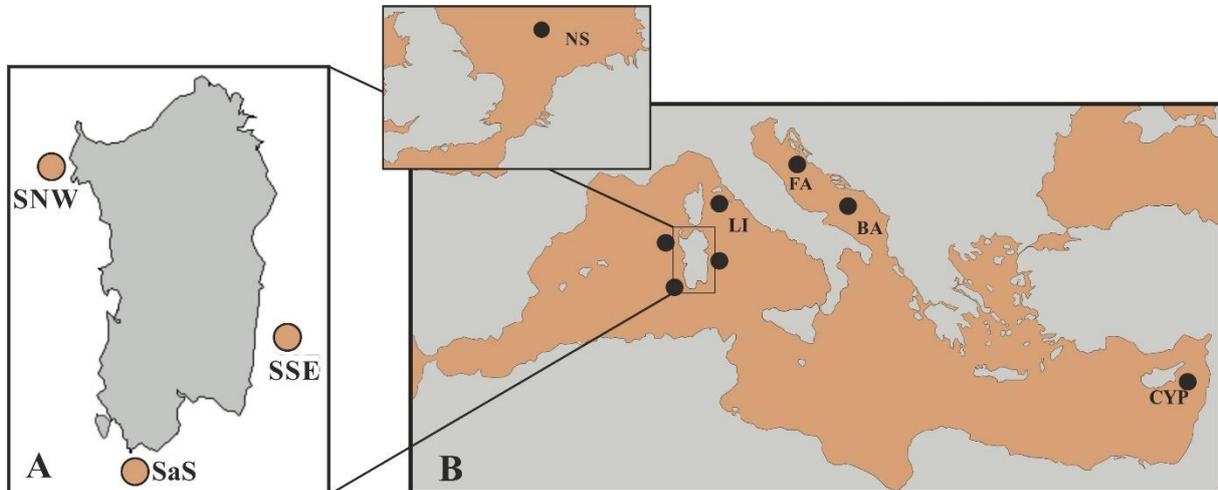


Figura 12. Mappa delle località di campionamento di *R. clavata*. A) Particolare delle tre località campionate in Sardegna. B) Località di campionamento in Mediterraneo e Oceano Atlantico

3.1.1 Campionamento nel Mediterraneo occidentale: Sardegna

All'interno del Mediterraneo occidentale (secondo la suddivisione FAO), nelle acque che circondano la Sardegna, sono state individuate tre zone di campionamento corrispondenti all'area geografica Nord Occidentale, Nord orientale, e Meridionale (Figura 12A). In vengono riportati i dettagli. Il campionamento è stato effettuato durante la campagna di pesca sperimentale a strascico MEDITS negli anni 2005 e 2012, condotto per le acque circostanti la Sardegna dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari, raccogliendo un totale di 149 esemplari, con una media di 25 campioni per area. Per ciascun campione sono stati rilevati i principali parametri biometrici, il sesso, lo stadio di maturità riproduttiva, e prelevato un campione di tessuto muscolare fresco (5-10 mg), conservato in etanolo assoluto a $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$, ai fini delle analisi genetiche scopo del presente studio.

Tabella 3. Area FAO, Località, codice, coordinate geografiche, periodo, campagna di pesca e numero di individui di *R. clavata* campionati in Sardegna (Mediterraneo Occidentale)

Località	Cod.	Coordinate (LAT-LONG)		Periodo	N	Campagna
37.1.3 Sardegna (Mediterraneo Occidentale)						
Sardegna Nord-ovest	SNW	40°44'22.20"N	7°59'14.40"E	Giu-12	30	MEDITS
		40°46'16"N	8°00'35"E	Giu-05	20	MEDITS
		40°28'15"N	8°11'25"E			
Sardegna Est	SSE	39°27'35.40"N	9°45'50.22"E	Giu-12	30	MEDITS
		40°49'39.00"N	9°54'47.40"E			
		40°45'81"N	9°53'84"E	Giu-05	19	MEDITS
41°11'00"N	9°49'35"E					
Sardegna Sud	SaS	38°48'57.00"N	8°34'10.20"E	Lug-12	30	MEDITS
		38°56'21.60"N	8°35'2.40"E			
		38°43'36.60"N	8°50'20.40"E			
		38°39'4.20"N	8°52'22.80"E			
		38°55'63"N	9°10'89"E	Lug-05	20	MEDITS
		38°49'59"N	8°37'36"E			
		38°47'15"N	8°16'81"E			
		38°40'97"N	8°34'06"E			
		38°54'87"N	9°14'35"E			

3.1.2 Campionamento nel Mediterraneo e Atlantico.

Oltre alla raccolta di esemplari di razza chiodata in acque sarde, è stato condotto tra il 2004 e 2012 un campionamento su ampia scala all'interno del Mediterraneo, coinvolgendo un campione del Mare del Nord (Atlantico Settentrionale), tramite differenti campagne di pesca sperimentale (MEDITS, GRUND, Campbiol) (si vedano i dettagli in Tabella 4). Tutti i 149 campioni sono stati raccolti e forniti dall'Elasmomed Consortium, (di cui il Dipartimento fa parte), che riunisce differenti centri di ricerca nel Mediterraneo ai fini di indagare lo stato tassonomico e di conservazione degli Elasmobranchi. Come si può osservare anche dalla mappa (Figura 12B) i campioni provengono dal Mediterraneo Occidentale (Mar Tirreno): area di Livorno, Mediterraneo Centrale (Adriatico): area Fano, area Bari, Mediterraneo orientale: area Cipro.

Tabella 4. Area FAO, località, codice, periodo, campagna di pesca e numero di individui di *R.clavata* oggetto di studio campionati nelle altre aree del Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico

AREA FAO	Località	Codice	Anno	N	Campagna
37.1 Mediterraneo occidentale					
37.1.3	Livorno	LI	2006	30	MEDITS GRUND
37.2 Mediterraneo centrale					
37.2.1	Bari	BA	2004 2005	30	MEDITS GRUND CampBiol
37.2.2	Fano	FA	2007	29	GRUND
37.3 Mediterraneo Orientale					
37.3.2	Cipro	CY	2012	30	MEDITS
Atlantico Settentrionale					
Sub. IV	Mare del Nord	NS	2005	30	---

I campioni sono stati ottenuti tramite prelievo di una porzione di muscolo fresco (5-10 mg), e conservati in *cryovial*, identificate da un codice specifico per ogni individuo, in etanolo assoluto ad una temperatura di 4 °C, fino al momento dell'estrazione del DNA

Durante il campionamento, particolare attenzione è stata rivolta a non contaminare i campioni, pulendo accuratamente gli strumenti (con etanolo all'80%) dopo il campionamento di ogni singolo individuo.

3.2 CAMPIONAMENTO *S. CANICULA*

Il campionamento per la specie *Scyliorhinus canicula* è stato effettuato in sette differenti aree all'interno del Mediterraneo e una nel Mare del Nord raccogliendo un totale di 265 campioni (Figura 13).

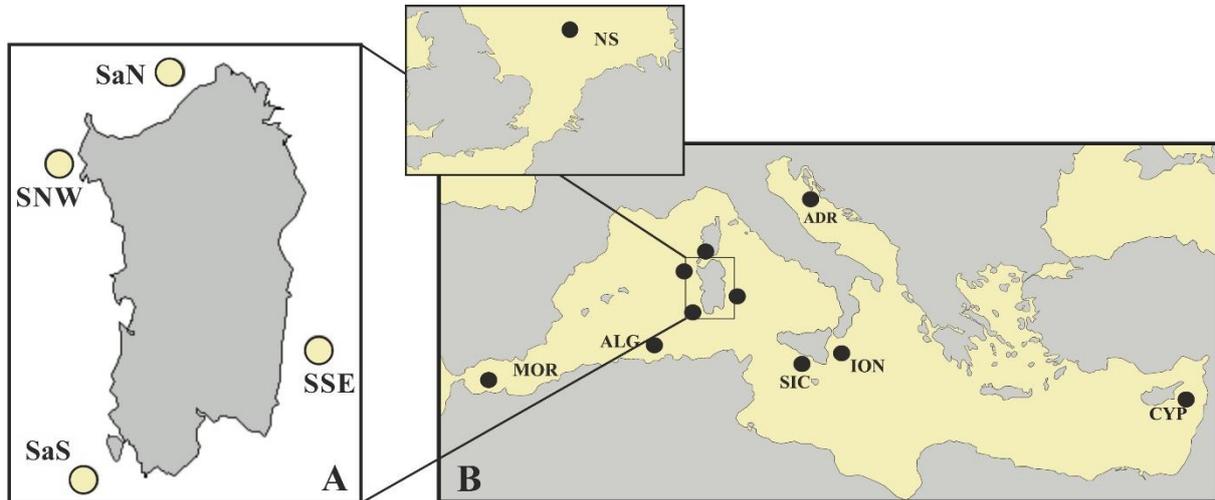


Figura 13. Mappa delle località di campionamento di *S. canicula*. A) Particolare delle quattro località campionate in Sardegna. B) Località di campionamento in Mediterraneo e Oceano Atlantico

3.2.1 Campionamento nel Mediterraneo occidentale: Sardegna

Gli esemplari di *S. canicula* sono stati campionati tramite campagna di pesca sperimentale a strascico MEDITS (condotta dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari), nell'anno 2012 in quattro differenti zone circostanti la Sardegna tenendo conto della suddivisione geografica: Sardegna Nord occidentale, Settentrionale, Sud orientale, Sud occidentale (Tabella 5 e Figura 13). Per tutti i campioni stati rilevati i principali parametri biometrici, il sesso, lo stadio di maturità riproduttiva. Il tessuto muscolare fresco (5-10 mg) di un totale di 128 campioni, utile per le analisi genetiche è stato prelevato e conservato in etanolo assoluto a -20°C.

Tabella 5. Area FAO, Località, codice, coordinate geografiche, periodo, campagna di pesca e numero di individui di *S. canicula* campionati in Sardegna (Mediterraneo Occidentale)

Località	Cod.	Coordinate LAT.-LONG.		anno	N	Campagna
37.1.3 Sardegna (Mediterraneo Occidentale)						
Nord-ovest	SNW	40°46'48"N	8°00'45"E	giu-12	32	MEDITS
Nord	SaN	41°09'68"N	8°58'13"E	giu-12	32	MEDITS
Sud-est	SSE	39°33'34"N	9°44'59"E	giu-12	32	MEDITS
Sud-ovest	SSW	38°44'44"N	8°14'56"E	lug-12	32	MEDITS

3.2.2 Campionamento nel Mediterraneo e Atlantico.

All'interno del Mediterraneo, oltre all'area della Sardegna sono state individuate sei località: Marocco, Algeria (Mediterraneo occidentale), Sicilia, Mar Ionio, Mar Adriatico (Mediterraneo centrale), Cipro (Mediterraneo Orientale). Gli individui provengono da pesca sperimentale e commerciale (Algeria) e sono stati forniti al nostro Dipartimento dall'ElasmoMed Consortium. I dettagli del campionamento sono riportati in Figura 13 e Tabella 6.

Tabella 6. Area FAO, località, codice, periodo, campagna di pesca e numero di individui di *S. canicula* oggetto di studio campionati nelle altre aree del Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico

Area FAO	Località	Codice	Coordinate LAT.-LONG.		Periodo	N	Campagna
37.1 Mediterraneo occidentale							
37.1.1	Marocco	MOR	35.2157	-3.1820	nov-09	17	MEDITS
37.1.1	Algeria	ALG	---	---	mar-10	27	-
37.2 Mediterraneo centrale							
37.2.2	Sicilia	SIC	36.818	13.394		5	
37.2.2	Mar Ionio	ION	36.922	15.378	nov-08	5	GRUND
37.2.2	Adriatico	ADR	44.1946	14.0505	2008-09-11	46	MEDITS/GRUND
37.3 Mediterraneo Orientale							
37.3.2	Cipro	CYP	34.55 34.34 34.35	34.05 33.09 32.5	giu-12	30	MEDITS
Atlantico Settentrionale							
Sub. IV	Mare del Nord	NoS	---	---	---	7	---

3.3 ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA genomico totale è stata effettuata seguendo il protocollo *Salting out* (Miller *et al.* 1988), un metodo sicuro, economico e veloce che prevede la separazione del DNA dalle proteine, ottenuta per disidratazione e precipitazione delle proteine con una soluzione di NaCl sovrasatura (>6M). Il DNA estratto è stato idratato in 70 µl di H₂O sterile.

Il buon esito dell'estrazione è stato verificato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% in tampone TAE 1X, colorato con bromuro di etidio (colorante intercalante fluorescente). Avvenuta la migrazione, il gel è stato posto al transilluminatore a raggi UV (UVIDOC modello GAS9500/910, UVITEC), che ha permesso di evidenziare la quantità e la qualità del DNA genomico totale.

3.4 AMPLIFICAZIONE POLYMERASE CHAIN REACTION

L'amplificazione dei frammenti di interesse è stata eseguita tramite PCR (Polymerase chain reaction), tecnica che permette l'amplificazione selettiva per via enzimatica di una specifica sequenza genomica. Ogni campione di DNA estratto è stato diluito da 5 a 20 volte in acqua sterile a seconda della qualità e quantità di DNA ottenuta con l'estrazione. La reazione di PCR è stata effettuata in un volume totale di 25 µl contenente; i reagenti e le concentrazioni sono mostrati in Tabella 7

Tabella 7. Reagenti e concentrazioni della reazione di amplificazione PCR

REAGENTE	CONCENTRAZIONE FINALE
DreamTaqBuffer	1X
dNTPs	0,2 mM
MgCl₂	2,5 mM
Primers	2 pmol/campione
Taq	0,8 U/campione
DNA templato	2 µl
Acqua sterile	a volume

Ogni reazione di amplificazione è stata realizzata in un termociclatore Eppendorf® Mastercycler ep gradient S. Gli amplificati ottenuti sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica orizzontale su gel di agarosio all'1,5 %.

Per ciascuna delle due specie sono stati utilizzati primers differenti, precedentemente isolati e caratterizzati da altri autori.

3.4.1 Raja clavata

Per la specie *Raja clavata* sono stati scelti 9 loci microsatelliti tra quelli già precedentemente isolati sulla specie:

- Due loci caratterizzati da (Chevolot *et al.* 2005) direttamente su *Raja clavata*.
- Sei loci isolati da (El Nagar *et al.* 2009) da ESTs di *Leucoraja erinacea* per cinque specie di Rajidae tra cui *Raja clavata*.

Una prima fase ha previsto l'ottimizzazione delle reazioni di PCR, amplificando i loci con i primer non marcati su pochi campioni. Per ciascuno dei primer sono state valutate le condizioni ottimali di amplificazione, modificando la temperatura di annealing, il numero dei cicli PCR e/o la concentrazione del template al fine di ottenere un amplificato di buona qualità privo di bande aspecifiche. Una volta ottenuto il profilo PCR specifico per ciascun primer, la sequenza forward degli oligonucleotidi è stata marcata con un fluoroforo, e successivamente amplificati i loci per tutti i 298 campioni. I dettagli relativi ai loci microsatelliti e alle coppie di primers e le condizioni di amplificazione PCR, sono descritti in Tabella 8 e Tabella 9 per i due loci di Chevolot *et al.* (2005), e in Tabella 10 e Tabella 11 i sette loci microsatelliti isolati da El Nagar *et al.* (2009).

Tabella 8 Descrizione dei primers per l'analisi di loci microsatelliti isolati da Chevolot *et al.* 2005: sequenza dei primers R e F, fluorocromo, unità ripetuta e range

Locus	Primers (5'-3')	Dye	Unità ripetuta	Size (bp)
Rc-B3 AY822712	F:CTGGCTGGAGTTTTTGAAGG R:CACCACCGTACCATTGATGA	5'-FAM	(GA) ₁₇ T(GA)	213 – 233
Rc-G2 AY822716	F:GCTACAAGCATGAGCCGATT R:CAAAGCCTATGTGGTTTGATTG	5'-AT565	(CT) ₁₆ GTG(CT) ₃	170 – 192

Tabella 9 Profilo della reazione di amplificazione PCR, loci microsatelliti isolati da Chevolut *et al.* 2005

Fase	Temperatura	Durata	Ripetizioni
Denaturazione iniziale	94 °C	60 sec	
Denaturazione	94 °C	30 sec	33 cicli
Annealing	58-60 °C	60 sec	
Estensione	72 °C	30 sec	
Estensione finale	72 °C	5 min	

Tabella 10 Descrizione dei primers per l'analisi di loci microsatelliti isolati da (El Nagar *et al.* 2009): sequenza dei primers Forward e Reverse, fluorocromo, unità ripetuta e range

Locus	Primers (5'-3')	Dye	Unità ripetuta	size (bp)
LERI21 DR713256	F:TTATTTTATTGCCCCCGATG R:AGTTTCTTCAGTGGGGTAGGG	5'HEX	(TG) ₁₂	267–273
LERI24 CV221951	F:GCACGTACGCAGAATTTGAA R:CCGGCACGTGTAATTTAAGG	5'TAM	(TC) ₈	254–264
LERI26 CV068031	F:GGAGCAGCAGTGAGGACAAT R:CTCCTACCGTCATGCCTCAT	5'-FAM	(GA) ₁₂	123–137
LERI34 CO050073	F:CTTGCAATCTTTTGCCGAGT R:GTTTCATCGGCCTCTTGATGT	5'-AT565	(GT) ₁₁	273–277
LERI44 EE991287	F:CAGCGAGTAAACACCGACCT R:TGCGATGATCTTGAAAGACG	5'-FAM	(GT) ₁₁	289–309
LERI63 CV221951	F:TTTTGATCGGCTGCAAAAAT R:CGGACTGTATAATGTGTACCAACC	5'HEX	(TC) ₈	287–301

Tabella 11 Profilo della reazione di amplificazione PCR, loci microsatelliti El Nagar

Fase	Temperatura	Durata	Ripetizioni
Denaturazione iniziale	94 °C	10 min	
Denaturazione	95 °C	45 sec	30-34 cicli
Annealing	53-55 °C	60 sec	
Estensione	72 °C	60 sec	
Estensione finale	72 °C	5 min	

3.4.2 *S. canicula*

I dodici loci microsatelliti analizzati in questo studio per la specie *S. canicula* sono stati scelti tra quelli isolati e caratterizzati specificatamente per la specie da (Griffiths *et al.* 2011). Dopo una prima fase di ottimizzazione dei profili PCR condotta su pochi campioni con primer non marcati, si è proceduto con l'amplificazione dei loci per tutti i campioni estratti. Il primer forward per ciascuna coppia di oligonucleotidi è stato precedentemente marcato con un fluoroforo. La Tabella 12 mostra le caratteristiche dei loci e delle coppie di primers, mentre la Tabella 13 il profilo dell'amplificazione PCR.

Tabella 12 Descrizione dei primers per l'analisi di loci microsatelliti isolati da Griffiths *et al.* 2011: sequenza dei primers Forward e Reverse, fluorocromo, unità ripetuta e range

Locus	Primers (5'-3')	Dye	Unità ripetuta	size (bp)
Scan02	F TGCAGCTTCGCTATCTTATGC R AAATCTGCTGCTCGCTTCAT	5'-FAM	(TG) ₉	104–128
Scan03	F TGGATAATTGACAGAATCGGC R TGGATTGTAATAATGGACACA	5'-HEX	(AT) ₉	170–180
Scan05	F ACCGATTCAAGGATCACGAG R ACCATCAGTAAAGGCAACCG	5'-FAM	(GA) ₉	176–184
Scan06	F GGCAGTGATTGCATTCTTGA R CAGAAACTGTGCAGAAATCACA	5'-TAM	(TG) ₉	204–224
Scan07	F CCTGCACACAGCAGGTAGAA R TGAGCAGCTGCAACTACAGG	5'-TAM	(AT) ₉	210–252
Scan10	F CGGTACGACCTGGATCAACT R TTCACACGAACACTCTTGGC	5'-FAM	(TC) ₉	249–260
Scan12	F GCCAGTGGCTATAACGGAAC F TCCACACAGTCCTGTTGAA	5'-FAM	(AG) ₉	99–107
Scan13	F CGCCCTCCCTAAAATAGAC R TGAACACAAGCGAACGAAAC	5'-HEX	(TG) ₁₁	174–188
Scan14	F AACCATCCTCCGCAAATAAA R GAACAGTGCCCAAGTTCAT	5'-ATT565	(CA) ₉	277–284
Scan15	F TCATCATCATCACCACCAGAA R GAGCTATGCTGGCAATTCGT	5'-HEX	(CA) ₁₅	228–246
Scan16	F CCGACTCCTTTGGATGTGTT R GGACGCTCTCGTTCTTATGC	5'-ATT565	(TG) ₉	256–268
Scan17	F CAATGTTAGGCGCATGACTG R ATCCAAACCGTGCAAATAGG	5'-ATT565	(AT) ₁₁ AA(AT) ₅	231–243

Tabella 13 Profilo della reazione di amplificazione PCR, loci microsatelliti isolati da Griffiths *et al.* 2011

Fase	Temperatura	Durata	Ripetizioni
Denaturazione iniziale	94 °C	10 min	
Denaturazione	95 °C	45 sec	37 cicli
Annealing	60 °C	60 sec	
Estensione	72 °C	60 sec	
Estensione finale	60 °C	5 min	

3.5 CORSA ELETTROFORETICA CAPILLARE

L'analisi dei frammenti è stata effettuata grazie al servizio genescan dell'azienda MacroGen con sequenziatore ABI3730XL. La corsa elettroforetica capillare è stata compiuta in *multiplex running* con 50 ng/ µl of di prodotto PCR con i primers marcati con ciascun fluoroforo e un marcatore standard di peso molecolare noto (LIZ500, rilevamento massimo di 500 bp, marcato con il fluoroforo LIZ). Il servizio Genescan restituisce i risultati sottoforma di file *Raw Data* (.fsa); un programma apposito di Genotyping permetterà di assegnare la dimensione allelica per ciascun locus di ciascun individuo.

55

3.6 GENOTIPIZZAZIONE

Il programma GeneMarker v1.75 (SoftGenetics, LCC) ha permesso di esaminare i profili dei microsatelliti per ogni marcatore fluoroforo. Ciascun profilo è stato individuato sotto forma di picco allelico visualizzando un grafico avente per ascissa il tempo di migrazione su gel e per ordinata l'intensità del prodotto amplificato, messo a confronto con un marcatore standard interno. Per ogni campione è stato possibile separare i frammenti amplificati per colore del fluoroforo e dimensionare gli alleli di ogni locus microsatellite (Figura 14).

La combinazione di tutti gli alleli rilevati nel set di loci analizzato costituisce la configurazione genotipica individuale che costituisce lo *scoring grezzo* per le analisi bioinformatiche.

Il *binning* è stato effettuato impostando il modulo specifico per ciascun locus e creando un pannello locus specifico corrispondente alle classi alleliche riscontrate. I picchi allelici sono stati individuati automaticamente dal programma e sottoposti a modifica manuale quando necessario

La mancata genotipizzazione viene individuata dal genotipo 00 (*missing data*), valutando nella fase di scoring totale se mantenere tali individui per le analisi successive.

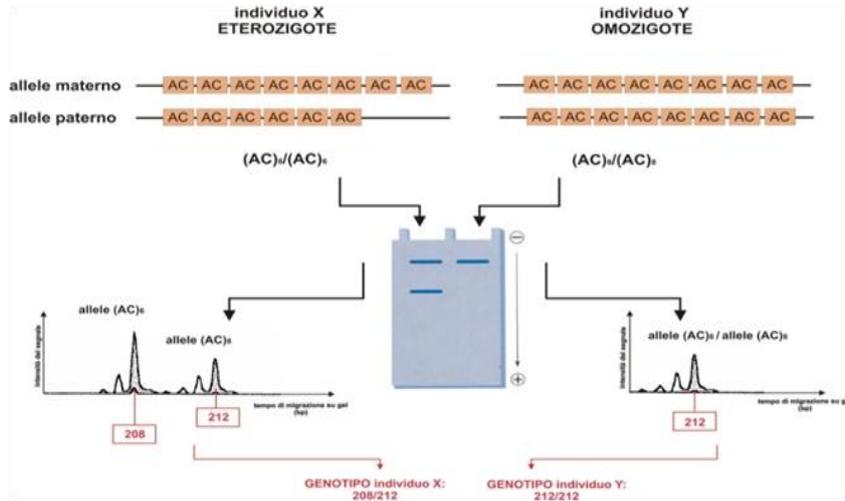


Figura 14. Dimensionamento dei picchi allelici

In questo capitolo verranno illustrati i metodi e gli strumenti utilizzati durante la fase di elaborazione dati mediante programmi bioinformatici. L'analisi dati viene effettuata per entrambe le specie *R. clavata* e *S. canicula*, su un data set di genotipi ottenuti durante la fase di genotipizzazione, che andrà in un primo momento corretto da eventuali errori di scoring, valutando l'adeguatezza dei loci microsatelliti sulle popolazioni oggetto di studio (polimorfismo, alleli nulli, linkage disequilibrium, equilibrio di Hardy-Weinberg). Verranno successivamente indagati gli elementi su cui si basa lo studio di genetica di popolazione per la conservazione delle specie: la diversità genetica delle popolazioni, il differenziamento genetico e la presenza di strutturazione valutando la connettività e il flusso genico e infine determinando eventuali riduzioni della popolazioni come causa della riduzione nella dimensione effettiva di popolazione nel tempo.

3.7 ERRORI DI GENOTIPIZZAZIONE

Una volta ottenuto lo scoring, i dati grezzi dei genotipi vengono sottoposti ad analisi per valutare la presenza di errori di genotipizzazione tramite il programma Microchecker v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Gli errori di genotipizzazione (si veda il capitolo sugli svantaggi dei microsatelliti) possono causare deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, in particolare come deficit di eterozigoti (Shaw *et al.* 1999), determinando conseguenti errori nelle analisi di genetica di popolazione. Queste deviazioni sono spesso molto simili a quelle causate da inbreeding o dall'effetto Wahlund. Tuttavia, *short allele dominance*, *stuttering* e alleli nulli determinano una specifica "firma allelica" che dipende dalla misura dell'allele stesso, è quindi possibile discriminare tra deviazioni dovute a non panmissia o causate da errori di genotipizzazione.

Il software Microchecker aiuta a identificare errori di genotipizzazione calcolando il discostamento dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, e quindi discriminando tra errori di scoring dovuti ad alleli nulli, *short allele dominance* (*large allele dropout*) o *stuttering*. Il mis-scoring dato da *stuttering* viene identificato da un deficit di eterozigoti, a causa della presenza di alleli che differiscono di un singolo repeat, o dalla presenza di molti profili omozigoti grandi (in quanto lo *stuttering* è più diffuso negli alleli grandi). Il *short allele dominance* viene suggerito da un eccesso di omozigoti dato da molti omozigoti individuati agli estremi del range di distribuzione del locus o quando il range allelico supera 150 paia di basi. Infine gli alleli nulli vengono individuati se si rivela un eccesso di omozigoti significativo globale. Il programma

costruisce genotipi random con gli alleli osservati per ciascun locus e ciascun campione. I genotipi osservati vengono poi comparati con la distribuzione dei genotipi randomizzati.

3.8 ALLELI NULLI

Variazioni nella sequenza nucleotidica della flanking region (come sostituzioni o indel) possono impedire l'annealing del primer durante l'amplificazione del locus microsatellite che darà luogo ad alleli nulli (Chapuis e Estoup 2006). Essi possono influenzare la stima della differenziazione della popolazione, riducendo la diversità genetica all'interno delle popolazioni (Paetkau e Strobeck 1995). Secondo (Chapuis e Estoup 2006) la presenza di alleli nulli può indurre una sovrastima dell'indice F_{st} , in caso di bassi livelli di flusso genico e differenziazione significativa della popolazione. Gli alleli nulli possono essere rilevati testando l'equilibrio di Hardy-Weinberg il quale in caso di alta frequenza di alleli nulli risulta come deficit di eterozigoti.

La frequenza degli alleli nulli (\hat{r}) per ciascun locus e popolazione è stata calcolata utilizzando l'algoritmo Expectation Maximization (EM) di (Dempster *et al.* 1977), come implementato nel software FreeNA (Chapuis e Estoup 2006). Viene attribuita una bassa frequenza di alleli nulli se risulta minore di 0,05, moderata se compresa tra 0,05 e 0,20 e alta se superiore a 0,20 (Chapuis e Estoup 2006).

3.9 LINKAGE DISEQUILIBRIUM

Il linkage disequilibrium (LD) o associazione allelica, è il fenomeno per cui due alleli a due loci adiacenti segregano insieme più frequentemente di quanto atteso se fossero indipendenti, condizione nella quale i due loci si dicono in linkage equilibrium (Hartle e Clark 1989).

Il linkage disequilibrium si verifica quando due loci sono molto vicini su un cromosoma, non possono assortire indipendentemente e saranno trasmessi alla progenie come una coppia.

Anche se i loci non sono fisicamente collegati sul cromosoma, possono essere funzionalmente in relazione o sotto selezione ed essere trasmessi come coppia. Dato che i loci microsatelliti posso trovarsi essere raggruppati nel genoma (Bachtrog *et al.* 1999) e quindi risultare incompatibili con le analisi che prevedono che i loci siano indipendenti, è necessario testare il linkage disequilibrium e eventualmente scartare il locus se lo squilibrio risulta costantemente significativo (Selkoe e Toonen 2006).

Genepop v4.2 (Rousset 2008) è stato utilizzato per il test del linkage disequilibrium per ciascun locus (a coppie di loci) per popolazione. Viene testata l'ipotesi nulla per cui i genotipi di ciascun locus sono indipendenti dai genotipi di altri loci, utilizzando la statistica log likelihood ratio (G-test) per l'analisi di ciascun locus all'interno di ciascuna popolazione e il global test (metodo di Fisher) per ciascun locus per il totale delle popolazioni. Il test è stato eseguito usando the Markov chain algorithm di (Rousset e Raymond 1995) con una catena di 5000 step (500 batches di 5000 interazioni). Il livello di significatività globale del test è $\alpha = 0,05$, e consiste nella probabilità massima di errore che si è disposti ad accettare nel respingere l'ipotesi H_0 .

3.10 DIVERSITÀ GENETICA

La diversità genetica è un importante aspetto delle dinamiche di popolazione, in quanto è direttamente legata al potenziale di evoluzione della popolazione e agli effetti deleteri dell'inbreeding (Hughes *et al.* 2008). In genetica di popolazione viene calcolata come livello di polimorfismo del locus (o dei loci) espresso come eterozigosità attesa e come diversità allelica (Templeton *et al.* 1995).

Un locus è polimorfico se presenta più di un allele e se l'allele più comune non presenta una frequenza allelica superiore a 0,99 o 0,95 (Templeton *et al.* 1995).

L'eterozigosità osservata, ossia la frequenza degli individui eterozigoti in una popolazione e l'eterozigosità attesa, come probabilità che due gameti scelti casualmente dal pool genico siano alleli differenti, rappresentano il parametro più utile per descrivere il grado di variabilità genetica di una popolazione, sono state calcolate con il software GenAlEx v6.5 (Peakall e Smouse 2012). Il calcolo dell'eterozigosità attesa corretta, eseguito per ogni locus, è stato basato sulla correzione proposta da Nei (1987) per evitare l'effetto del campionamento (uH_e). L'eterozigosità attesa corretta (H_e) è il numero di eterozigoti sotto l'equilibrio di Hardy-Weinberg, quando più due alleli sono presenti nel locus.

La diversità allelica (N_a) è il numero totale di alleli per tutti i loci, diviso per il numero di loci. Risulta più sensibile rispetto all'eterozigosità attesa nel rilevare la perdita di diversità grazie alla sua maggiore sensibilità alla dimensione della popolazione (Spencer *et al.* 2000)

Gli indici che descrivono la diversità genetica (numerosità allelica, eterozigosità osservata e attesa) sono stati calcolati tramite il software GenAlEx6.5 (Peakall e Smouse 2006).

Inoltre, il programma FSTAT v2.9.3 (Goudet 2001) ha consentito di stimare la ricchezza allelica (A_r), per locus e per campione con il metodo della rarefazione, permettendo in questo modo un confronto tra campioni di diverse dimensioni.

3.11 HARDY WEINBERG EQUILIBRIUM

Il test per l'equilibrio di Hardy Weinberg si basa sulla comparazione delle frequenze dei genotipi osservati con le frequenze attese in una popolazione ideale (accoppiamento casuale, assenza di mutazione, assenza di deriva genetica, nessuna migrazione). L'eccesso di eterozigoti (chiamato anche deficit di omozigoti) si verifica quando il data set contiene meno omozigoti di quando ci si aspetta sotto HWE, al contrario il deficit di eterozigoti (eccesso di omozigoti) si presenta quando si osservano più omozigoti rispetto alle attese in equilibrio. La più comune deviazione dall'HWE è il deficit di eterozigoti, che può essere dovuto a caratteristiche biologiche che violano i criteri di una popolazione ideale, come forte inbreeding o selezione di alcuni alleli (Selkoe e Toonen 2006). In alternativa, all'effetto Wahlund, ossia quando due gruppi geneticamente distinti vengono inavvertitamente raggruppati in una singola unità di campionamento, sia perché coesistono ma raramente incrociano (all'insaputa del campionario), o perché la scala spaziale di campionamento di un sito scelta è più grande della vera scala di una popolazione, che causerà più omozigoti di quelli previsti sotto HWE (Johnson and Black 1984; Nielsen *et al.* 2003) In genere queste due cause di deficit di eterozigoti dovrebbero verificarsi in tutti i loci, non solo in uno o in pochi. Un'altra causa comune è determinata dalla presenza di alleli nulli (si veda descrizione in alto).

Il test per la verifica del discostamento dall'equilibrio di HW è stato condotto con Genepop tramite il score test (U test) (Rousset 1995) per deficit di eterozigoti (ipotesi nulla H_0 di equilibrio di HW, ipotesi alternativa H_1 di deficit di eterozigoti). Viene utilizzato l'algoritmo delle catene di Markov (MC) per stimare senza errori il P-value ottenuto dal test, attraverso tre valori di impostazione: 5000 *Dememorisation*, 5000 *BatchLength* e 500 *BatchNumber* (Guo e Thompson 1992)

3.12 INBREEDING

L'inbreeding o inincrocio ossia l'incrocio tra individui imparentati costituisce una causa di riduzione dell'eterozigosità e della fitness riproduttiva: la progenie ha un'aumentata probabilità di ereditare alleli che siano identici per discendenza (IBD, Identical By Descendant). Questa probabilità è definita come coefficiente di inincrocio e secondo la statistica F di Wright (Wright 1965) si esprime con F_{is} , che misura le deviazioni, in termini di eterozigosità, di una sottopopolazione in esame e la stessa in condizione di panmissia (intesa come deficit di eterozigoti rispetto alle attese dell'equilibrio di HW a causa di accoppiamento non casuale).

L'inincrocio non altera le frequenze alleliche ma cambia quelle genotipiche, riflettendo un aumento di omozigoti. Il coefficiente di F_{IS} assume valori da -1 (inincrocio assente, eccesso di eterozigoti) a 1 (riproduzione non casuale, eccesso di omozigoti). E' stato calcolato in questo studio con il programma FSTAT secondo la statistica di (Weir e Cockerham 1984) con 1000 repliche di bootstrap. Il programma restituisce i valori di F_{IS} per locus e per popolazione con i relativi P-value per testare la significatività dell'osservazione e inoltre la media per tutti i loci per ciascuna popolazione.

3.13 ANALISI DEL DIFFERENZIAMENTO TRA LE POPOLAZIONI

La struttura di popolazione è stata esaminata tramite la statistica F di Wright (1951, 1965), che si basa su tre indici per valutare la suddivisione di una popolazione in equilibrio di Hardy-Weinberg in più sottopopolazioni: F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} . Il parametro F_{ST} , indice di fissazione, misura la riduzione di eterozigosità di una sottopopolazione dovuta alla deriva genetica casuale ed è in grado di fornire una stima della distanza fra sottopopolazioni. L'indice F_{ST} varia da 0 (identica composizione allelica, assenza di differenziamento fra le sottopopolazioni) e 1 (assenza di alleli condivisi, differenziamento massimo).

In questo lavoro gli indici di Wright sono stati calcolati utilizzando parametri analoghi appositamente corretti per essere adattati a casi di studio specifici, per identificare, quantificare e comparare il grado di differenziazione genetica tra popolazioni (Bird *et al.* 2011). In particolare il grado di differenziazione delle popolazioni (*pairwise Fst*) è stata indagato tramite: theta (θ), estimatore di F_{ST} (Weir e Cockerham, 1984) in grado di correggere errori dovuti a campionamenti

Per il calcolo di θ è stato utilizzato il software Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.* 1992). I livelli di significatività dei valori di F_{ST} sono stati calcolati con il metodo delle catene di Markov in un test esatto per la differenziazione delle popolazioni utilizzando 10000 permutazioni.

L'analisi gerarchica della varianza molecolare (AMOVA), implementata nel programma Arlequin, è stata utilizzata per valutare l'esistenza di una struttura genetica all'interno del campione. In particolare è stata condotta un'AMOVA locus by locus, che è preferita quando vi sono *missing data* (Excoffier e Lischer 2011). La proporzione di variazione genetica totale, ripartita in componenti di covariazione in relazione alle differenze "fra gruppi di popolazioni", "fra popolazioni all'interno dei gruppi" e "fra individui all'interno delle popolazioni", è stata

stimata tramite la statistica F di Wright. La significatività dell'indice di fissazione relativo ai tre livelli di analisi (fra gruppi: F_{ct} ; fra popolazioni: F_{sc} ; all'interno delle popolazioni: F_{st}) è stata verificata attraverso un test non parametrico descritto da Excoffier *et al.* (1992) con 16000 permutazioni. L'AMOVA è stata dapprima calcolata overall, testando un unico gruppo che riunisse tutte le popolazioni e successivamente a gruppi di struttura, sia raggruppando i campioni all'interno del Mediterraneo testando la struttura con l'aggiunta del campione Atlantico.

3.14 ANALISI BAYESIANA DEI CLUSTER

Il programma STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.* 2000) è stato utilizzato per “dedurre” la struttura di popolazione dai dati genetici.

Applica un modello basato sul metodo di clustering su dati di genotipi di marcatori indipendenti, come i microsatelliti oggetto di studio per le due specie, assumendo che i loci siano in equilibrio di Hardy Weinberg. I cluster genetici (k) vengono identificati in base alle frequenze alleliche dei loci senza l'approccio della suddivisione “a priori” in popolazioni (al contrario della statistica F). Gli individui nel campione vengono assegnati probabilisticamente alle popolazioni, o unitamente a due o più popolazioni se il loro genotipo indica che sono admixed. Per ogni valore di K sono state effettuate cinque runs indipendenti con 500000 burning, seguite da 100000 MCMC interazioni, selezionando un modello admixed e l'opzione LOCPRIOR. Il numero più probabile di cluster è stato assegnato comparando la probabilità dei K usando il metodo ΔK di Evanno *et al.* (2005) e ΔF_{ST} (Campana *et al.* 2011), considerando i valori più alti osservati per ciascuno dei due indici. I risultati dei runs di STRUCTURE corrispondenti al K scelto sono stati ottenuti con CLUMPP (Jakobsson e Rosenberg 2007) e visualizzate con DISTRUCT (Rosenberg 2004).

3.15 ISOLAMENTO PER DISTANZA

L'isolamento per distanza, utilizzato per descrivere i pattern di variazione genetica di una popolazione che derivano da un limitato flusso genico a livello spaziale; è definito come riduzione nella similarità genetica tra popolazioni in rapporto all'incremento della loro distanza geografica. Attraverso il servizio web Isolation by distance (Jensen *et al.* 2005) è stato testato statisticamente l'isolamento per distanza utilizzando il test di Mantel (Rousset distance), mettendo in relazione la distanza genetica (rappresenta dagli indici F_{st}) secondo l'equazione $F_{ST}/(1-F_{ST})$, con la distanza geografica (espressa in km) in modo da effettuare una regressione

lineare e verificare se vi fosse correlazione tra le matrici di distanze genetiche e le matrici di distanze geografiche. Il test è stato eseguito per entrambe le specie confrontando i campioni interni al Mediterraneo e successivamente includendo il confronto con la popolazione dell'Atlantico.

3.16 ANALISI DEMOGRAFICA DELLE POPOLAZIONI

Le popolazioni che hanno subito una recente riduzione della dimensione effettiva di popolazione esibiscono una riduzione nel numero di alleli e di diversità genica (H_e) in loci polimorfici. Tuttavia in una situazione di questo tipo il numero di alleli si riduce più velocemente rispetto alla diversità genica. Perciò in popolazioni che hanno subito un bottleneck di recente ci si aspetta che la diversità genica osservata sia più alta di quella attesa in situazione di equilibrio di HW (H_{eq}) che viene calcolata dal numero di alleli osservati, assumendo che le popolazioni siano all'equilibrio (Luikart *et al.* 1998).

Il programma Bottleneck v1.2.02 (Piry *et al.* 1999) è stato utilizzato per evidenziare possibili eventi di Bottleneck nelle popolazioni in esame. Esso calcola per ciascuna popolazione e locus la distribuzione della diversità genica attesa a partire dal numero di alleli osservati, assumendo mutation-drift equilibrium. Le distribuzioni vengono ottenute simulando tre possibili modelli di mutazione: IAM (Infinite Allele Model), TPM (Two-phased model of mutation) e SMM (Stepwise Mutation Model). Inoltre ricava la media dell'eterozigosità attesa e testa eventuale eccesso di eterozigoti calcolando la probabilità mediante tre test statistici. In questo studio si è deciso di usare il modello intermedio tra i due TPM (Di Rienzo *et al.* 1994) come suggerito dall'autore più adatto per i loci microsatelliti con una percentuale di *multi-step changes* del 5% e una varianza di 12 e il test statistico Wilcoxon test che può essere usato anche con pochi loci e individui.

Una possibile espansione delle popolazioni è stata indagata attraverso due test k e g test, descritti da Reich e Goldstein (1998) e Reich *et al.* (1999) specifici per microsatelliti, attraverso una semplice macro di Excel chiamata *kgtest* (Bilgin 2007). In particolare k test calcola la varianza intralocus, dove valori negativi di k per i loci analizzati indicano una popolazione in espansione mentre il g test la varianza interlocus, testando l'ipotesi nulla di popolazione di dimensione costante. Per il k test valori negativi di k per i loci indicano una popolazione in espansione. Il valore dei due test viene restituito dal programma, così come la significatività statistica di k , mentre la significatività statistica del test g viene valutata consultando la tabella riportata in Reich *et al.* (1999) (Tabella 14), basata sui valori cut-off per un determinato numero di campioni e loci.

Tabella 14 Valori del parametro g per combinazioni di loci e dimensioni delle popolazioni, tratto da Reich *et al.* (1999)

NUMBER OF LOCI	SAMPLE SIZE				
	10	20	40	80	160
5....	0.12	0.10	0.08	0.08	0.08
6....	0.13	0.12	0.11	0.10	0.10
7....	0.16	0.15	0.14	0.13	0.12
8....	0.19	0.16	0.15	0.15	0.14
10....	0.23	0.19	0.17	0.18	0.17
12....	0.26	0.21	0.20	0.19	0.19
14....	0.29	0.24	0.22	0.22	0.22
17....	0.31	0.26	0.25	0.24	0.24
21....	0.35	0.29	0.28	0.27	0.27
25....	0.38	0.33	0.31	0.30	0.29
30....	0.39	0.36	0.33 ^a	0.33	0.32
37....	0.47	0.39	0.37	0.35	0.35
44....	0.48	0.43	0.40	0.37	0.37
53....	0.53	0.46	0.42	0.41	0.41
64....	0.54	0.47	0.45	0.43	0.44
77....	0.56	0.51	0.47	0.46	0.45
92....	0.60	0.54	0.50	0.49	0.48
110....	0.63	0.56	0.54	0.51	0.51
133....	0.67	0.59	0.56	0.53	0.53
159....	0.70	0.61	0.57	0.57	0.56
191....	0.73	0.65	0.61	0.58	0.58
230....	0.76	0.67	0.64	0.62	0.61

3.17 DISPERSIONE DIFFERENZIALE LEGATA AL SESSO

E' stato verificato se nella specie *S. canicula* potesse esistere una dispersione distorta in base al sesso (*sex-biased dispersal*). Le analisi sono state effettuate sia per l'intero data set, sia separatamente per le popolazioni sarde, rimuovendo dalle analisi i campioni in cui non era disponibile alcuna informazione relativa al sesso dell'individuo.

Le analisi sono state realizzate con GenAIEx e FSTAT, usando cinque metodi basati su differenze significative tra i due sessi (filopatrino e migrante) relativamente a: 1) coefficiente di inbreeding (F_{IS}), 2) indice di fissazione (F_{ST}), 3) grado di relatedness, 4) valori medi indice di assegnazione corretto ($mAic$) e 5) varianza dell'indice di assegnazione ($vAic$).

Considerando che, i migranti possono introdurre nuovi alleli nella popolazione, si può stimare la probabilità che un individuo sia residente o un migrante utilizzando l'indice Aic . Aic assume valori vicini allo zero, valori positivi caratterizzano individui con un'alta probabilità di essere 'residenti', mentre valori negativi indicano un'alta probabilità di essere 'migranti'. In particolare viene calcolata la media di Aic ($mAic$) (calcolato in GenAIEx): poiché i migranti tendono ad avere bassi valori di Aic rispetto agli individui filopatrinici, ci si aspetta che la media dell'indice, per il sesso che mostra dispersione, sia più basso di quello del sesso filopatrino; la varianza di Aic ($vAic$) (calcolato in FSTAT): poiché gli individui del sesso mostrante dispersione saranno sia residenti (con un genotipo comune) sia migranti (con genotipi rari), ci si aspetta che la varianza dell'indice per il sesso in dispersione sia più grande del sesso filopatrino. Quindi, l'indice di assegnazione Aic indica la probabilità che un genotipo si rinvenga in una popolazione, e livelli ineguali di flusso genico tra maschi e femmine potrebbero portare a valori negativi di $mAic$ e valori più alti di $vAic$ nel sesso che si disperde maggiormente. E' stato usato il test di Wilcoxon per valutare differenze significative nei valori di Aic tra i sessi. Inoltre con il programma FSTAT è stato possibile effettuare il confronto dei principali indici genetici suddividendo il campione secondo il sesso. I livelli diversi di flusso genico tra maschi e femmine dovrebbero portare ad un effetto Wahlund, e ad un deficit di eterozigoti risultante in F_{IS} più alti, F_{ST} e relatedness inferiori nel sesso che si disperde maggiormente. La significatività dei cinque tests è stata testata usando 1000 permutazioni.

3.18 CORREZIONE PER TEST MULTIPLI

Per i test statistici è stato utilizzato come livello di significatività $\alpha = 0,05$ e consiste nella probabilità massima di errore che si è disposti ad accettare nel respingere l'ipotesi nulla. È stata

effettuata la correzione del livello di significatività secondo il metodo di Benjamini-Hochberg (false discovery rate FDR correction; Benjamini e Yekutieli 2005), implementato nel programma SGoF+ (Carvajal-Rodriguez and de Uña-Alvarez 2011) per tutti i test multipli, dove non è specificato diversamente.

3.19 RAJA CLAVATA: CONFRONTO TEMPORALE NELLE POPOLAZIONI SARDE

Le principali analisi di diversità genetica, differenziazione e demografia verranno effettuate per le tre popolazioni della Sardegna di *Raja clavata* per un confronto temporale, dividendo i campioni in base all'anno di campionamento: uno più recente effettuato nel 2012, l'altro effettuato nelle stesse tre aree nel 2005, al fine di valutare variazioni di variabilità genetica nei campioni a distanza di sette anni. Si confronteranno: il campione della Sardegna Sud orientale campionato nel 2005 composto da 20 individui (SSE_05), con quello del 2012 (SSE_2012; 30 individui); il campione della Sardegna Nord occidentale del 2005 (SNW_2005; 19 esemplari) con i 30 individui prelevati della stessa area nel 2012 (SNW_12) e infine i 20 campioni prelevati nel 2005 nella Sardegna meridionale (SaS_05) con i 30 della stessa area campionati nel 2012 (SaS_12)

4. RISULTATI - *Raja clavata*



4.1 ESTRAZIONE DNA

Il protocollo *Salting Out* si è rivelato un metodo affidabile ed efficace per l'isolamento del DNA genomico totale. L'estrazione è riuscita per tutti i 298 campioni, fornendo, per ognuno, una quantità di DNA ad alto peso molecolare sufficiente per l'attività della *Taq* polimerasi in fase di amplificazione.

In generale per tutti i campioni l'efficacia dell'estrazione è dovuta anche alla modalità di prelievo e conservazione: i tessuti raccolti specificamente allo scopo di condurre analisi genetiche, sono stati prelevati con strumenti sterilizzati e posti in etanolo al 90% a -18 °C.

4.2 AMPLIFICAZIONE PCR

L'efficacia delle amplificazioni è stata testata attraverso reazioni PCR di pochi individui per ogni singolo locus. Dopo aver ottenuto il profilo di PCR ottimale locus specifico, si è preceduto con l'amplificazione degli otto loci per tutti i 298 campioni.

Le difficoltà maggiori di amplificazione si sono riscontrate con il locus Rc-B3, a causa di amplificazioni aspecifiche di una banda ad alto peso molecolare (rispetto alla dimensione di B3 range size: 213 – 233 bp). L'ottimizzazione ulteriore dei cicli PCR per il locus in questione, anche specificatamente per ciascun individuo, ha permesso di amplificare la maggior parte dei campioni, ottenendo un prodotto di amplificazione corrispondente al locus.

4.2.1 Genotipizzazione o allele calling

Ciascun amplificato è stato sottoposto a corsa capillare ottenendo dei picchi allelici, che sono stati analizzati con il software GeneMarker. E' stato in questo modo ottenuto un genotipo per ciascun locus per tutti gli individui. Durante la fase di scoring totale dei dati grezzi si è deciso di eliminare 4 campioni del Mare del Nord (NS) in quanto la genotipizzazione è fallita per cinque loci su otto, e quindi proseguire le analisi con un totale di 294 campioni.

4.3 ANALISI DEI DATI

4.3.1 *Correzione errori di genotipizzazione*

La presenza di errori di scoring è stata verificata mediante il software MICROCHECKER su tutte le otto popolazioni per i gli otto loci. In questo modo è stato possibile ottenere un *dataset* corretto da utilizzare per tutte le analisi statistiche successive.

Oltre ai possibili errori effettuati durante il dimensionamento allelico per ogni individuo, è stata verificata inoltre la presenza di *stuttering*, *large allele dropout* e alleli nulli per ciascuna popolazione e locus. L'analisi statistica, condotta omettendo i genotipi mancanti (00, *missing data*), non ha rivelato la presenza di *stuttering* e *large allele dropout* per nessun locus.

4.3.2 *Variabilità genetica*

Le analisi di statistica descrittiva sono state condotte utilizzando un *dataset* composto da 294 individui (appartenenti a 8 popolazioni) e otto loci. La stima del numero di alleli (N_a) per popolazione e per *locus*, implementata con GENALEX, ha permesso innanzitutto di valutare il polimorfismo dei loci microsatelliti. Un locus è stato considerato polimorfo quando presenti più di un allele per locus e per popolazione, e dove l'allele più comune non presenti una frequenza allelica superiore al 0,99.

I risultati in Tabella 15 mostrano la variabilità per tutti i loci, con un numero totale di alleli per locus compreso tra un massimo di 21 (LERI44) e un minimo di a 3 alleli (LERI21). Ad eccezione di LERI21, i loci in tutte le popolazioni esprimono un polimorfismo del 100%, mostrando in alcuni casi un numero di alleli e un range allelico maggiore rispetto a quello risultante dalla letteratura (El Nagar *et al.* 2009).

Per quanto riguarda LERI21, il quale presenta complessivamente tre sole classe alleliche è mostrata la frequenza allelica dell'allele più comune (A+) per popolazione. Dai risultati specifici per il locus in questione, si evince che esso risulta monomorfo per la popolazione Fano (FA) e raggiunge il 97% di frequenza dell'allele più comune su altre tre popolazioni. Perciò, si è deciso di eliminare LERI21 dalle analisi successive in quanto monomorfo e/o poco informativo.

Osservando le singole popolazioni, è emerso che il numero di alleli più alto è stato riscontrato per Livorno (LI) per il locus LERI44, con 17 alleli, mentre il valore minimo (escludendo il locus LERI21) si osserva per il campione di Cipro (CY) in LERI34 che esprime solo due alleli. Tuttavia si valuta anche l'indice di ricchezza allelica (A_r), calcolata per un minimo di 24

individui diploidi che permette un confronto delle frequenze alleliche tra le popolazioni nonostante la diversa numerosità dei campioni. Anche in questo caso LI per il locus LERI44 detiene la variabilità maggiore ($Ar = 15,73$), e CY con LERI34 la variabilità minore ($Ar = 2,00$). Complessivamente i valori risultano simili per tutte le popolazioni, a eccezione di Cipro che presenta il numero di alleli e la ricchezza allelica minore fra tutte (CY, $Na = 4,67$; $Ar = 4,52$).

Tabella 15. Indici descrittivi della variabilità allelica per locus e per popolazione. Sono riportati il numero di individui analizzati (N), il numero allelico (Na), ricchezza allelica calcolata su 24 individui (Ar). Per il locus LERI21, che si è deciso di escludere in quanto poco informativo, è riportata inoltre la frequenza dell'allele più comune (A+).

	SSE	SNW	SaS	LI	FA	BA	CY	NS	tot
Rc-B3									
<i>N</i>	44	44	40	30	26	28	30	26	268
<i>Na</i>	6	6	5	4	5	6	3	5	8
<i>Ar</i>	5,50	5,47	4,20	3,96	5,00	5,71	3,00	5,00	5,48
Rc-G2									
<i>N</i>	50	49	50	30	29	30	30	25	293
<i>Na</i>	3	4	4	4	5	4	4	6	8
<i>Ar</i>	2,99	3,74	3,73	3,60	4,80	4,00	4,00	5,96	4,77
LERI21									
<i>N</i>	30	29	30	30	29	30	30	26	233
<i>Na</i>	2	2	2	3	1	2	2	2	3
<i>A+</i>	80%	97%	97%	92%	100%	97%	93%	94%	
LERI24									
<i>N</i>	50	49	50	30	29	29	30	26	293
<i>Na</i>	6	6	4	6	4	3	4	4	7
<i>Ar</i>	4,54	4,94	3,82	5,56	3,97	2,83	3,80	3,85	4,68
LERI26									
<i>N</i>	50	48	50	30	29	30	30	25	292
<i>Na</i>	5	5	9	5	5	6	5	4	11
<i>Ar</i>	4,47	4,88	6,65	4,60	4,97	5,56	4,80	4,00	5,56
LERI34									
<i>N</i>	50	49	50	30	29	30	30	26	294
<i>Na</i>	5	4	4	3	4	4	2	4	7
<i>Ar</i>	4,72	3,81	3,93	3,00	3,66	3,80	2,00	3,92	4,11
LERI44									
<i>N</i>	49	49	49	29	28	30	30	24	288
<i>Na</i>	14	14	15	17	14	15	10	15	21
<i>Ar</i>	12,80	11,63	13,56	15,73	13,39	14,40	9,32	15,00	14,23
LERI63									
<i>N</i>	50	49	50	30	28	30	30	26	293
<i>Na</i>	5	5	5	5	5	4	4	4	8
<i>Ar</i>	4,40	4,23	4,58	4,92	4,95	3,76	4,00	3,92	5,15
<i>Na all pop</i>	6,33	6,33	7,00	6,33	6,33	6,50	4,67	6,33	
<i>Ar all pop</i>	5,81	5,62	6,11	5,97	6,13	6,21	4,52	6,30	

4.3.3 Linkage disequilibrium

La condizione di associazione gametica preferenziale (*Linkage disequilibrium*) tra i loci microsatelliti è stata misurata mediante il calcolo del valore di probabilità di LD utilizzando software Genepop v4.2, valutando questa condizione per ogni popolazione e per il totale del campione preso in analisi. In Tabella 16 sono riportati i valori di P-value per ciascun locus complessivo per le otto popolazioni, ottenuti mediante il metodo di Fisher.

Tabella 16. Valori di probabilità di Linkage Disequilibrium tra coppie di loci per il totale delle popolazioni (metodo di Fisher). I valori sottolineati e in grassetto sono risultati ancora statisticamente significativi dopo la correzione FDR, l'asterisco indica il grado di significatività (* P<0.05; ***P< 0,001).

Locus 1	Locus 2	P-value	Locus 1	Locus 2	P-value
Rc-B3	Rc-G2	0,328	Rc-G2	LERI44	0,361
Rc-B3	LERI24	0,434	LERI24	LERI44	0,873
Rc-G2	LERI24	<u>0,044*</u>	LERI26	LERI44	0,784
Rc-B3	LERI26	0,271	LERI34	LERI44	0,095
Rc-G2	LERI26	0,809	Rc-B3	LERI63	0,656
LERI24	LERI26	0,318	Rc-G2	LERI63	0,206
Rc-B3	LERI34	0,097	LERI24	LERI63	<u>0,00***</u>
Rc-G2	LERI34	0,280	LERI26	LERI63	0,353
LERI24	LERI34	<u>0,029*</u>	LERI34	LERI63	0,061
LERI26	LERI34	0,664	LERI44	LERI63	0,685
Rc-B3	LERI44	0,997			

La condizione di *linkage disequilibrium*, è stata trovata fra la coppie LERI24-LERI34, LERI24-Rc-G2, LERI24-LERI64, quest'ultima con un P-value altamente significativo.

Da un'analisi più dettagliata (Tabella 17) per le singole popolazioni per i loci in questione si riscontra che:

- 1) per le coppie LERI24- LERI34, LERI24-Rc-G2 la probabilità che i loci siano concatenati risulta verificata solo in due popolazioni e non permane dopo la correzione per le comparazioni multiple,
- 2) per la coppia LERI24-LERI64 la condizione di disequilibrio è presente in sei popolazioni su otto (con P-value <0.01 anche dopo la correzione FDR).

A causa del linkage disequilibrium riscontrato per la coppia di loci, si è deciso di eliminare dal dataset LERI24 e proseguire le analisi con sei loci.

Tabella 17. Valori di probabilità di Linkage Disequilibrium per singole delle popolazioni per le coppie di loci statisticamente significative nel global test. I valori sottolineati e in grassetto sono statisticamente significativi dopo la correzione FDR, mentre quelli sottolineati sono i valori corretti secondo BH, non più statisticamente significativi dopo la correzione.

<i>P-value</i>	LERI24 LERI63	LERI24 LERI34	LERI24 Rc-G2
SSE	<u>0,000</u>	0,327	<u>0,436</u>
SNW	<u>0,000</u>	0,184	<u>0,224</u>
SaS	<u>0,000</u>	<u>0,436</u>	1,000
LI	<u>0,002</u>	0,418	0,810
FA	<u>0,436</u>	<u>0,224</u>	<u>0,106</u>
BA	<u>0,168</u>	<u>0,106</u>	0,856
CY	<u>0,000</u>	0,222	0,159
NS	<u>0,010</u>	0,810	0,149

4.3.4 Alleli nulli

La presenza di alleli nulli viene valutata statisticamente attraverso il calcolo della frequenza degli alleli nulli (\hat{r}) con il metodo di Dempster et al. (1977). Si può dire che complessivamente i loci presentano una bassa o moderata presenza di alleli nulli (\hat{r} sempre < 0.20), con la massima frequenza riportata per il locus LERI44 ($\hat{r} = 0.11$) (Tabella 18).

Tabella 18 Frequenza di alleli nulli \hat{r} per locus per popolazione. Le celle vuote corrispondono ad assenza di alleli nulli.

\hat{r}	SSE	SNW	SaS	LI	FA	BA	CY	NS	<i>all pop</i>
Rc-B3	0,03	0,10	0,12	0,02				0,01	0,03
Rc-G2				0,11	0,04				0,02
LERI26	0,03				0,03		0,04	0,13	0,03
LERI34	0,06	0,09	0,11	0,05					0,04
LERI44	0,09	0,13	0,06	0,10	0,12	0,10	0,01	0,27	0,11
LERI63	0,05	0,04	0,05	0	0,10	0,03			0,03
<i>all loci</i>	0,04	0,06	0,06	0,05	0,05	0,02	0,01	0,07	

4.3.5 Eterozigosità e equilibrio di Hardy-Weinberg

L'eterozigosità osservata (H_o) e attesa corretta (uHe) è stata stimata nell'intero *data set* per loci e popolazioni, come si può osservare in Tabella 19. L'eterozigosità attesa corretta, che costituisce un indice di diversità genetica, è stata calcolata anche a livello globale per le popolazioni, e mostra valori simili per tutti i campioni (media uHe per tutte le pop = 0.61) con il valore massimo riscontrato per la popolazione del Mare del Nord (NS, $uHe = 0.67$) e valore minimo per la popolazione del Mar Tirreno (LI, $uHe = 0.57$). Complessivamente risulta un eccesso di omozigoti, per tutte i campioni (ad eccezione di CY, e BA), poiché l'eterozigosità osservata è inferiore a quella attesa, come si può osservare dal grafico in Figura 15.

Tabella 19. Eterozigosità osservata (H_o) e attesa corretta (uHe) per locus per popolazione.

		SSE	SNW	SaS	LI	FA	BA	CY	NS	totale
Rc-B3	<i>Ho</i>	0,45	0,41	0,35	0,63	0,81	0,54	0,77	0,88	0,61
	<i>uHe</i>	0,51	0,54	0,53	0,53	0,65	0,48	0,55	0,72	0,56
Rc-G2	<i>Ho</i>	0,38	0,43	0,58	0,17	0,55	0,57	0,63	0,72	0,50
	<i>uHe</i>	0,35	0,44	0,51	0,32	0,55	0,52	0,58	0,69	0,50
LERI26	<i>Ho</i>	0,54	0,67	0,78	0,63	0,69	0,67	0,63	0,40	0,63
	<i>uHe</i>	0,60	0,63	0,72	0,57	0,66	0,61	0,70	0,63	0,64
LERI34	<i>Ho</i>	0,52	0,43	0,46	0,50	0,52	0,53	0,40	0,54	0,49
	<i>uHe</i>	0,62	0,57	0,61	0,52	0,52	0,59	0,33	0,56	0,54
LERI44	<i>Ho</i>	0,73	0,59	0,78	0,69	0,68	0,73	0,73	0,38	0,66
	<i>uHe</i>	0,91	0,85	0,90	0,91	0,90	0,91	0,72	0,91	0,88
LERI63	<i>Ho</i>	0,48	0,61	0,48	0,63	0,43	0,57	0,60	0,54	0,54
	<i>uHe</i>	0,52	0,61	0,53	0,57	0,50	0,49	0,63	0,50	0,54
totale	<i>Ho</i>	0,52	0,52	0,57	0,54	0,61	0,60	0,63	0,58	
	<i>uHe</i>	0,59	0,61	0,63	0,57	0,63	0,60	0,58	0,67	

**Figura 15.** Eterozigosità osservata (H_o) e attesa corretta (uHe) per popolazione

Poiché è stata evidenziata la possibile situazione di deficit di eterozigoti, è stato valutato statisticamente il discostamento dell'equilibrio di Hardy Weinberg dovuto a questa condizione, per singola popolazione, singolo locus e complessivamente. Nella Tabella 20 sono illustrati i valori di probabilità PHW (ipotesi nulla assenza di deficit di eterozigoti), per i sei loci e per le otto popolazioni. Dopo la correzione FDR per le comparazioni multiple, nessun locus e nessuna popolazione risulta in disequilibrio per deficit.

Tabella 20. Valori di probabilità per il discostamento di Hardy Weinberg come deficit di eterozigoti (PHW). I valori sottolineati e in grassetto sono statisticamente significativi dopo la correzione FDR, mentre quelli sottolineati sono i valori corretti secondo BH, non più statisticamente significativi dopo la correzione.

<i>PHW</i>	SSE	SNW	SaS	LI	FA	BA	CY	NS	<i>pop</i>
Rc-B3	0,126	<u>0,006</u>	<u>0,079</u>	<u>0,117</u>	0,995	0,952	1,000	0,208	0,435
Rc-G2	0,721	0,498	0,664	<u>0,058</u>	<u>0,059</u>	0,667	0,768	0,628	0,508
LERI26	0,160	0,805	0,727	0,862	<u>0,120</u>	0,851	0,106	<u>0,120</u>	0,469
LERI34	<u>0,046</u>	<u>0,046</u>	<u>0,020</u>	0,069	0,559	0,382	1,000	0,514	0,329
LERI44	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,202	<u>0,000</u>	<u>0,179</u>
LERI63	<u>0,024</u>	<u>0,021</u>	<u>0,021</u>	0,815	<u>0,007</u>	<u>0,027</u>	0,436	0,774	0,265
<i>locus</i>	0,179	0,229	0,252	0,320	0,290	0,480	0,585	0,374	

4.3.6 Coefficiente di Inbreeding Fis

I valori di Fis, coefficiente di inbreeding, sono stati calcolati secondo Weir e Cockerham, (1984) con Fstat. I valori più alti e statisticamente significativi per l'indice di Fis si registrano per il locus LERI44 solo per alcune popolazioni. I valori medi di Fis per popolazione indicano deboli livelli di inbreeding, infatti non si registrano valori significativi dopo la correzione per i test multipli (Tabella 21).

Tabella 21. Valori dell'indice di inbreeding Fis per locus per popolazione calcolato con Fstat. I valori sottolineati sono statisticamente significativi. In grassetto sono riportati i valori significativi dopo la correzione per i test multipli.

<i>Fis value</i>	SSE	SNW	SaS	LI	FA	BA	CY	NS
Rc-B3	0,107	<u>0,242</u>	<u>0,347</u>	-0,203	-0,247	-0,127	-0,392	-0,226
Rc-G2	-0,071	0,027	-0,137	<u>0,476</u>	0,002	-0,082	-0,098	-0,038
LERI26	0,105	-0,061	-0,090	-0,108	-0,045	-0,096	0,098	<u>0,366</u>
LERI34	0,163	<u>0,249</u>	<u>0,248</u>	0,046	0,007	0,096	-0,234	0,032
LERI44	<u>0,191</u>	<u>0,303</u>	0,141	<u>0,245</u>	<u>0,252</u>	<u>0,200</u>	-0,022	<u>0,591</u>
LERI63	0,081	-0,005	0,092	-0,104	0,143	-0,149	0,047	-0,085
all	<u>0,116</u>	<u>0,138</u>	<u>0,100</u>	0,050	0,030	0,001	-0,076	<u>0,139</u>

4.3.7 Analisi del differenziamento: F_{ST} e D_{EST}

Gli indici di differenziamento F_{ST} e D_{EST} , sono stati ottenuti con il programma Arlequin e Demetics. L'ipotesi nulla di assenza di differenziazione è stata testata attraverso il test di differenziamento fra coppie di popolazioni. In Tabella 22 sono illustrati i valori di F_{ST} e i relativi valori di P-value tra coppie di popolazioni e la rappresentazione grafica ottenuta con Arlequin R.

Tabella 22. Valori di F_{ST} calcolato tra coppie di popolazioni (sotto la diagonale) e i relativi P-value corretti con FDR (sopra la diagonale). I valori sottolineati sono risultati significativi prima della correzione FDR, in grassetto sottolineati sono statisticamente significativi dopo la correzione FDR

<i>Fst</i> \Pvalue	SSE	SNW	SaS	LI	FA	BA	CY	NS
SSE	*	0,252	0,253	0,515	0,083	0,288	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
SNW	0,003	*	0,095	<u>0,046</u>	<u>0,028</u>	<u>0,053</u>	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>
SaS	0,003	0,007	*	<u>0,047</u>	0,334	0,060	<u>0,000</u>	<u>0,050</u>
LI	0,000	0,015	0,011	*	<u>0,037</u>	<u>0,011</u>	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>
FA	0,008	0,014	0,002	0,012	*	0,174	<u>0,000</u>	0,162
BA	0,003	0,011	0,010	0,021	0,005	*	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>
CY	0,096	0,107	0,079	0,094	0,070	0,103	*	<u>0,000</u>
NS	0,034	0,037	0,014	0,038	0,007	0,035	0,092	*

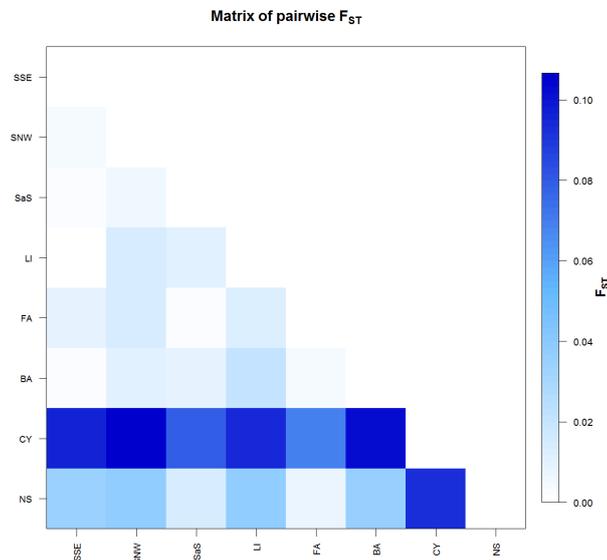


Figura 16. Matrice di valori di F_{ST} a coppie

Osservando i valori di F_{ST} si può notare che risultano bassi (F_{ST} sempre minore di 0.108), indicando un debole differenziamento tra le popolazioni. I valori più alti di F_{ST} si registrano per la popolazione di Cipro (CY) a confronto con tutte le altre, con valore medio 0.092. Si

registrano valori statisticamente significativi di F_{st} per le popolazioni di Cipro e Mare del Nord (a eccezione della coppia NS-FA). Le popolazioni che risultano meno differenziate geneticamente sono tra loro anche le più vicine geograficamente: Fano e Bari (F_{st} BA-FA = 0.005) e le popolazioni della Sardegna. Inoltre si nota assenza di differenziazione con valore di $F_{st} = 0$ tra i due campioni che si affacciano nel Mar Tirreno (SSE-LI).

Nella Tabella 23 sono riportati i valori $Dest$ e i relativi P -value. I valori risultano più alti rispetto a quelli di F_{st} , registrando un massimo di 0.207 per la coppia NS-CY. Anche in questo caso CY presenta la massima differenziazione a confronto con tutti campioni con valori tutti statisticamente simili, mentre risulta bassa tra le popolazioni sarde (Ad eccezione di SNW-SaS significativamente differenziata anche se molto debolmente) e assente tra BA e FA.

Tabella 23. Valori di $Dest$ calcolato tra coppie di popolazioni (sotto la diagonale) e i relativi P -value corretti con FDR (sopra la diagonale). I valori sottolineati e in grassetto sono statisticamente significativi dopo la correzione FDR

<i>Dest</i> \ <i>P-value</i>	SSE	SNW	SaS	LI	FA	BA	CY	NS
SSE	*	0,099	0,381	0,425	0,180	0,165	<u>0,003</u>	<u>0,003</u>
SNW	0,017	*	<u>0,012</u>	<u>0,015</u>	<u>0,070</u>	<u>0,014</u>	<u>0,003</u>	<u>0,003</u>
SaS	0,005	0,029	*	0,167	0,258	<u>0,015</u>	<u>0,003</u>	<u>0,015</u>
LI	0,007	0,042	0,016	*	0,137	<u>0,014</u>	<u>0,003</u>	<u>0,006</u>
FA	0,018	0,028	0,013	0,029	*	0,688	<u>0,003</u>	0,359
BA	0,019	0,038	0,039	0,065	0	*	<u>0,003</u>	<u>0,010</u>
CY	0,176	0,204	0,163	0,191	0,146	0,199	*	<u>0,003</u>
NS	0,077	0,073	0,060	0,082	0,017	0,074	0,207	*

4.3.8 Analisi delle coordinate principali: *Fst* e *Dest* a confronto.

I due grafici sottostanti (Figura 17 e Figura 18) mostrano l'analisi delle coordinate principali (PCoA) effettuata con i valori *Fst* e *Dest*. Si può notare in maniera più intuitiva come popolazioni del Mediterraneo occidentale e centrale risultino poco differenziate tra loro rispetto alla popolazione di Cipro altamente differenziata geneticamente e del Mare del Nord, le quali anche graficamente risultano le più lontane.

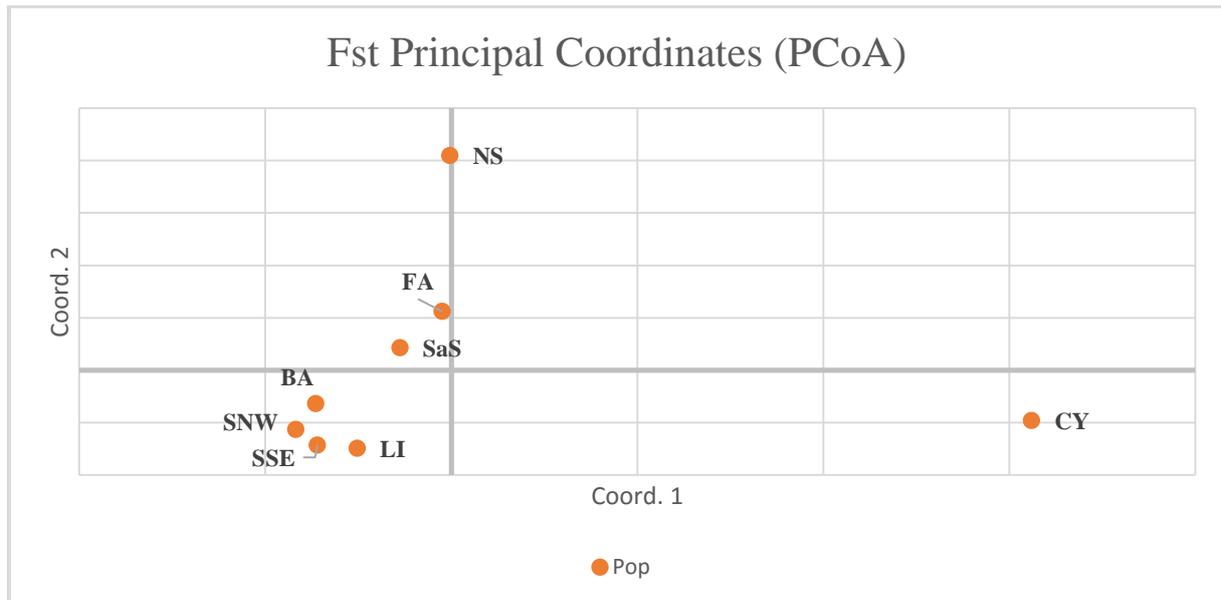


Figura 17. Grafico della PCoA ottenuta a partire dalla matrice di valori di *FST* calcolati con Arlequin.

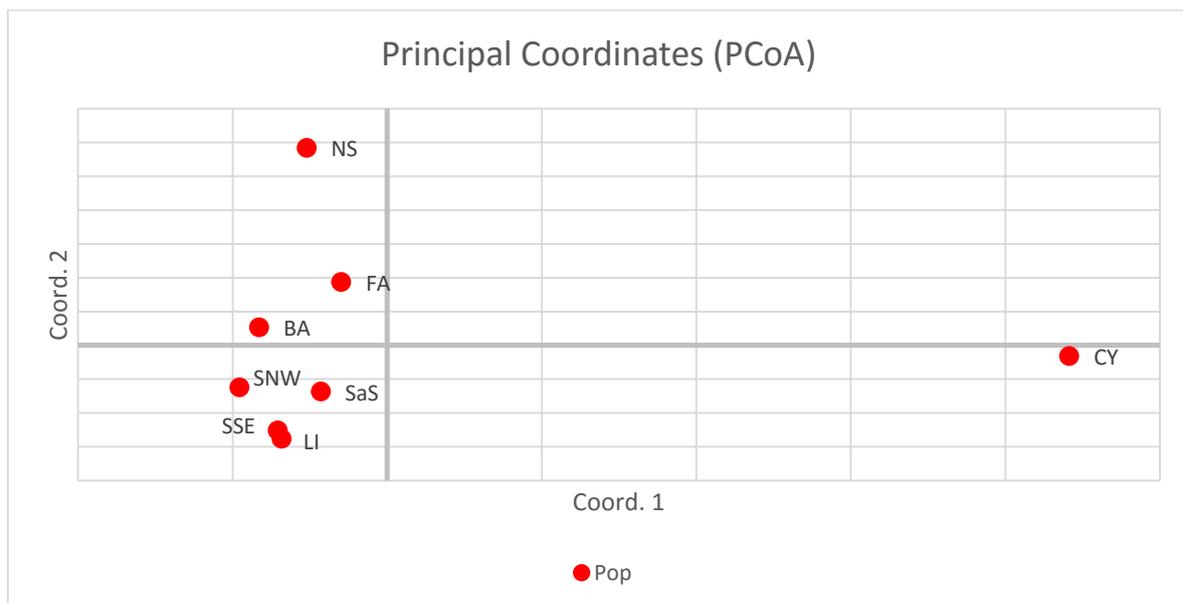


Figura 18. Grafico della PCoA ottenuta a partire dalla matrice di valori di *Dest* calcolati con Demetics.

4.3.9 Indagine sulla struttura di popolazione: AMOVA

Con Arlequin è stato possibile testare le strutture genetiche a gruppi di popolazioni, sia per le tutte le 8 popolazioni, che all'interno del Mediterraneo.

Inizialmente tutte le popolazioni sono state unite in un unico gruppo, L'AMOVA globale i cui valori sono riportati in Tabella 24, rivela che una buona porzione di variazione genetica è attribuibile a differenze tra individui (96.59%), mentre il 3.06 % è attribuibile a differenze tra campioni, con un valore di Fst basso ma statisticamente (Fst = 0.031, P-value = 0.000). Da un confronto tra le popolazioni del Mediterraneo e del Mare del Nord (Tabella 24) non emerge una strutturazione statisticamente significativa nella struttura a due gruppi (Med/NS). Tuttavia si riscontra una strutturazione raggruppando i campioni del Mediterraneo: il valore più alto dell'indice di differenziazione tra gruppi, Fct, risulta nella struttura a tre gruppi (SSE, SNW, SaS, LI, FA, BA / CY / NS) (Fct= 0.058, P=0.000), con una percentuale di variazione di 5.88% tra i gruppi.

Tabella 24. Analisi dell'AMOVA calcolata per struttura globale, a due, tre e quattro gruppi per il confronto tra Mediterraneo e Atlantico. La tabella riporta la percentuale della variazione da attribuire agli individui entro le popolazioni, tra popolazioni entro i gruppi e tra gruppi, i relativi indici di fissazione con il valore di probabilità

STRUTTURA	% VARIAZIONE	INDICE DI FISSAZIONE	P-VALUE
1 gruppo	SSE; SNW; SaS; LI; FA; BA; CY; NS		
Tra popolazioni	3,06	Fst = 0,031	0,000
Entro popolazioni	96,94		
2 gruppi	Med/NS		
Tra gruppi	1,17	Fct = 0,011	0,212
Tra pop. entro i gruppi	2,81	Fsc = 0,028	0,000
Entro le pop.	96,01	Fst = 0,039	0,000
3 gruppi	SSE, SNW, SaS, LI, FA, BA / CY / NS		
Tra gruppi	5,88	Fct = 0,058	0,000
Tra pop. entro i gruppi	0,73	Fsc = 0,007	0,004
Entro le pop.	93,39	Fst = 0,066	0,000
4 gruppi	SSE, SNW, SaS, LI / FA, BA / CY / NS		
Tra gruppi	3,68	Fct = 0,037	0,000
Tra pop. entro i gruppi	0,59	Fsc = 0,006	0,023
Entro le pop.	95,72	Fst = 0,043	0,000

Si è successivamente testata la struttura all'interno del Mediterraneo (Tabella 25). Globalmente, esiste una variazione tra popolazioni del 2.87% con valore di indice di differenziazione basso

ma statisticamente significativo (AMOVA overall, $F_{st}=0.029$, $P\text{-value}=0.000$). Inoltre viene evidenziata una bassa ma statisticamente significativa strutturazione del Mediterraneo anche suddividendo in gruppi in base alla struttura geografica (Mediterraneo occidentale/centrale/orientale).

Tabella 25. Analisi dell'AMOVA calcolata per struttura global e tre gruppi per il confronto all'interno del Mediterraneo. La tabella riporta la percentuale della variazione da attribuire agli individui entro le popolazioni, tra popolazioni entro i gruppi e tra gruppi, i relativi indici di fissazione con il valore di probabilità

STRUTTURA	% VARIAZIONE	INDICE DI FISSAZIONE	P-VALUE
1 gruppo	Med: SSE; SNW; SaS; LI; FA; BA; CY		
Tra popolazioni	2,87	$F_{st} = 0,029$	0,000
Entro popolazioni	97,12		
3 gruppi	Med: SSE; SNW; SaS LI/ FA; BA/ CY		
Tra gruppi	3,82	$F_{ct} = 0,038$	0,000
Tra pop. entro i gruppi	0,61	$F_{sc} = 0,006$	0,024
Entro le pop.	95,57	$F_{st} = 0,044$	0,000

Essendo evidente una differenziazione della popolazione di Cipro rispetto alle altre, si è testata la differenziazione tra Mediterraneo e Atlantico escludendo la popolazione orientale. La variazione maggiore tra gruppi si ritrova nella struttura a 2 gruppi (Mediterraneo centro-occidentale / Mare del Nord), con un debole ma significativo valore di F_{ct} (Tabella 26).

Tabella 26. Analisi dell'AMOVA calcolata per struttura a due e a tre gruppi per il confronto tra Mediterraneo e Atlantico, senza CY. La tabella riporta la percentuale della variazione da attribuire agli individui entro le popolazioni, tra popolazioni entro i gruppi e tra gruppi, i relativi indici di fissazione con il valore di probabilità

STRUTTURA	% VARIAZIONE	INDICE DI FISSAZIONE	P-VALUE
2 gruppi	SSE, SNW, SaS, LI, FA, BA / NS		
Tra gruppi	2,48	$F_{ct} = 0,032$	0,001
Tra pop. entro i gruppi	0,75	$F_{sc} = 0,007$	0,004
Entro le pop.	96,77	$F_{st} = 0,024$	0,000
3 gruppi	SSE, SNW, SaS, LI / FA, BA / NS		
Tra gruppi	1,22	$F_{ct} = 0,012$	0,002
Tra pop. entro i gruppi	0,60	$F_{sc} = 0,006$	0,020
Entro le pop.	98,18	$F_{st} = 0,018$	0,000

4.3.10 *Analisi bayesiana dei cluster*

L'Analisi bayesiana dei cluster ha permesso di testare quale fosse il numero di cluster ideale in cui suddividere i 294 individui analizzati in questo studio per valutare un'eventuale strutturazione della popolazione attraverso l'admixture model, testando un numero massimo di 11 cluster (K), ottenuti dal numero delle popolazioni (8) più 3 gruppi aggiuntivi.

Sono dapprima stati calcolati i valori di delta k e delta F_{st} per ogni K , individuando il valore più alto per entrambe le variabili, che coincide con il valore di K più probabile. Come si può vedere dal grafico dei valori di Delta K e Delta F_{st} (Figura 19), i risultati di tale analisi hanno indicato come situazione più probabile, quella che prevede una suddivisione del campione in due popolazioni (valore più alto $K = 2$) per entrambi gli indici. Si notano tuttavia dei picchi secondari in $K = 5$ secondo il Delta F_{st} , e $K = 7$ per il Delta K .

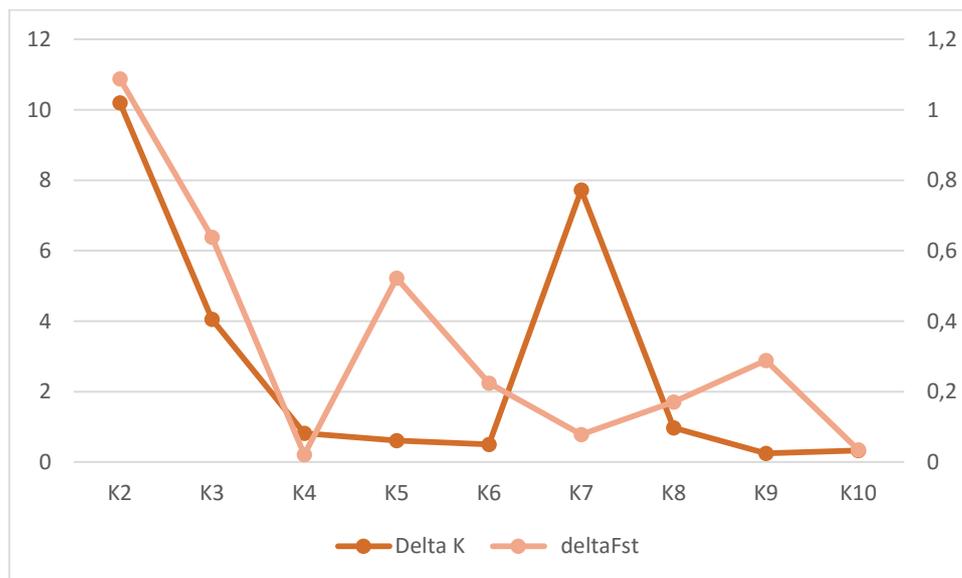


Figura 19. Grafico dei valori di ΔK (in rosa) e ΔF_{ST} (in arancione) calcolati per i diversi K (K da 2 a 10).

I due clusters K identificati dal software sono rappresentati in

Figura 20. Il grafico si presenta come un fitto istogramma in cui a ciascuno dei 294 individui corrisponde una sottile barra verticale, ripartita in K colori. Ogni colore rappresenta la probabilità che ogni singolo individuo ha di appartenere ad uno dei due cluster. Gli individui sono disposti in base alla suddivisione geografica del campione in 8 popolazioni. I due cluster identificati dal programma appaiono ben distinti: da una parte la probabilità di appartenenza al

cluster 1 (indicata dal colore blu) per gli individui di 7 popolazioni (SSE, SNW, SaS, LI, FA, BA, NS), dall'altra la probabilità di appartenere al cluster 2 (colore arancione) per la popolazione di Cipro. Si osserva quindi una componente dominante che mostra unite le 7 popolazioni del Mediterraneo occidentale e centrale e un altissima probabilità della popolazione del Mediterraneo orientale di risultare separata. In Figura 21 è mostrata la strutturazione delle popolazioni con $K=5$, dove si osserva una differente probabilità degli individui di appartenere ad uno dei cinque cluster. Il cluster 1 (arancione) si ritrova in tutte le popolazioni, ma in differenti proporzioni: le popolazioni del Mediterraneo occidentale (SSE, SNW, SaS, LI) presentano la più alta probabilità rispetto agli altri campioni di appartenere a quel cluster; FA e BA condividono il cluster 2 (blu), il quale non è presente nelle altre popolazioni (se non per alcuni individui); CY ha un altissima probabilità per tutti gli individui di appartenere al cluster 3 (verde), che non viene visualizzato in nessun'altra popolazione; e infine NS in cui è alta la probabilità degli individui di appartenenza al cluster 4 (rosa), condiviso in porzione minore con BA e FA. Il $K=7$ rappresentato nella Figura 22 mostra una situazione simile al $K=5$: tutte le popolazioni tranne CY manifestano il cluster aggiuntivo (cluster 6), mentre solo le popolazioni del Mediterraneo occidentale hanno una probabilità di appartenenza al cluster 7.

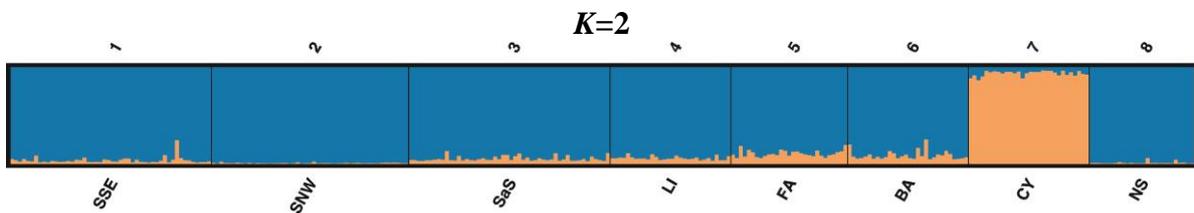


Figura 20 Ripartizione delle probabilità (Q) che ogni individuo delle otto popolazioni geografiche ha di appartenere ad uno dei due clusters individuati da STRUCTURE per $K = 2$. Istogramma ordinato per popolazioni geografiche.

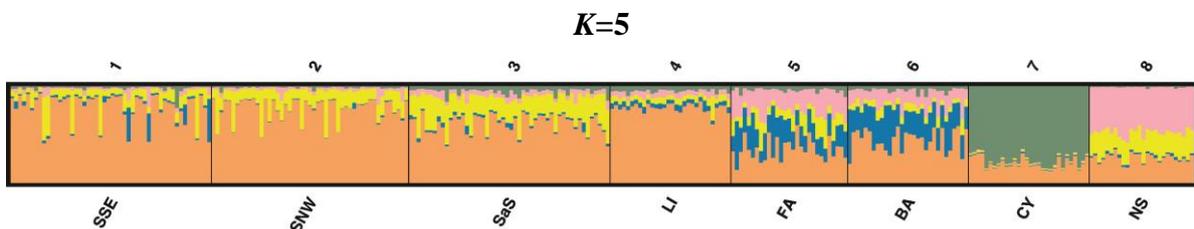


Figura 21 Ripartizione delle probabilità (Q) che ogni individuo delle otto popolazioni geografiche ha di appartenere ad uno dei due clusters individuati da STRUCTURE per $K = 5$. Istogramma ordinato per popolazioni geografiche.

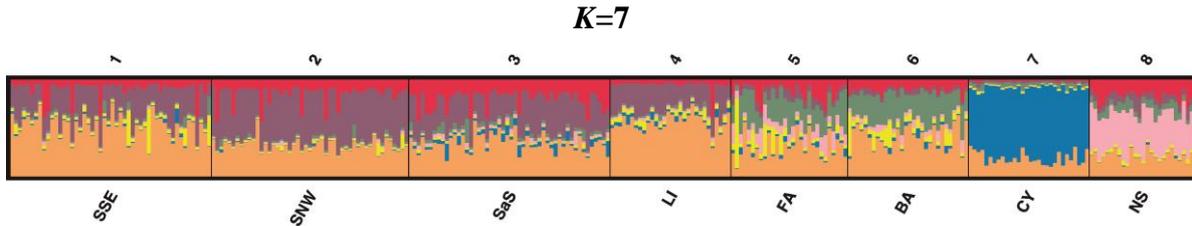


Figura 22. Ripartizione delle probabilità (Q) che ogni individuo delle otto popolazioni geografiche ha di appartenere ad uno dei due clusters individuati da STRUCTURE per $K = 7$. Istogramma ordinato per popolazioni geografiche.

4.3.11 *Isolamento da distanza*

Il web service IBD ha permesso di testare statisticamente l'isolamento per distanza attraverso il test di Mantel. Nel grafico ottenuto confrontando tutte le 8 popolazioni includendo il campione più lontano, il Mare del Nord si può notare come non venga riscontrata correlazione positiva tra distanza genetica e geografica: il coefficiente di correlazione è basso e non statisticamente significativo ($r=0.3341$ $P = 0.140$) (Figura 23A). Al contrario, per le 7 popolazioni del Mediterraneo (Figura 23B) si è evidenziata una correlazione positiva tra le due variabili: popolazioni geograficamente più distanti sono anche geneticamente più diverse tra loro. Il modello risulta adeguato a descrivere l'86% dei dati ricavati ($R^2=0.863$). Il coefficiente di correlazione restituito dal test, r , è pari a 0.93 risulta statisticamente significativo, con un P-value di 0.043.

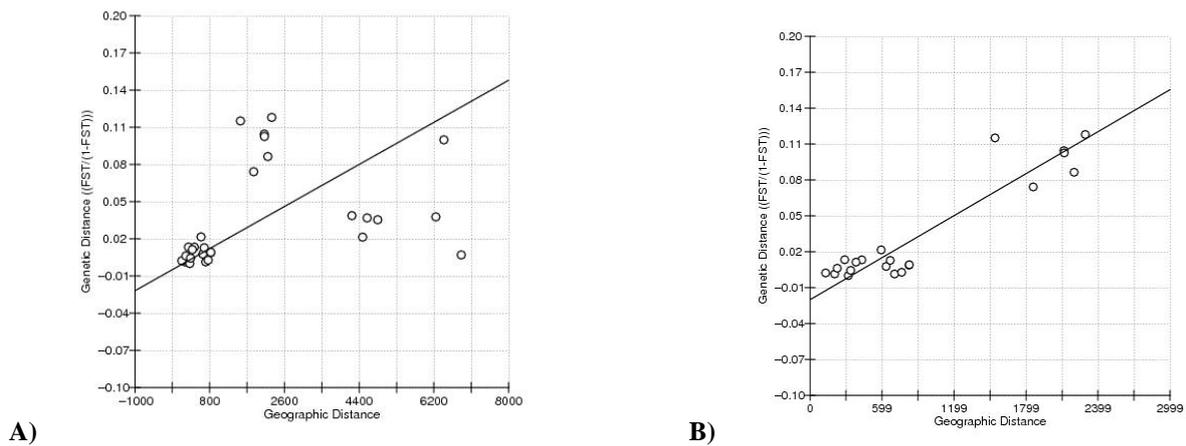


Figura 23. Grafico del Mantel Test per la valutazione della correlazione tra distanze genetiche $[FST/(1-FST)]$ e distanze geografiche espresse in km. A) Mantel test condotto i campioni del Mediterraneo e dell'Atlantico (8 popolazioni). B) Mantel test condotto all'interno del Mediterraneo (7 popolazioni);

4.3.12 *Analisi demografica: bottleneck ed espansione*

Utilizzando l'intero dataset, si è potuta testare la possibilità che le popolazioni in esame abbiano subito oscillazioni demografiche recenti, ad esempio riducendo le proprie dimensioni effettive (N_e), come accade in un 'collo di bottiglia' o 'bottleneck'. Il programma ha calcolato l'eterozigosità osservata per popolazione e per locus, confrontandola con quella attesa in condizioni di equilibrio, con la condizione che i loci seguano il modello TPM (Two Phase model). In Tabella 27 si osserva per tutti i campioni, ad eccezione di LI e BA, una eterozigosità osservata H_e maggiore dell'attesa (H_{eq}), tuttavia dal test statistico di Wilcoxon, emerge che vi sia un eccesso di eterozigoti statisticamente significativo solo per la popolazione del Mare del Nord (NS P-value =0.016). Tutte le popolazioni del Mediterraneo sembrano non aver subito una perturbazione della popolazione dovuto a crollo demografico.

Tabella 27. Test del bottleneck sotto TPM per le otto popolazioni. Sono riportate la diversità genica (H_e), la diversità genica attesa all'equilibrio (H_{eq}) e la probabilità di eccesso di eterozigoti secondo il Wilcoxon test.

TPM	SSE	SNW	SaS	LI	FA	BA	CY	NS
<i>mean H_e</i>	0,59	0,61	0,63	0,57	0,63	0,60	0,58	0,67
<i>mean H_{eq}</i>	0,58	0,58	0,61	0,57	0,62	0,61	0,50	0,61
<i>P excess H</i>	0,281	0,344	0,563	0,578	0,281	0,422	0,219	0,016

L'espansione delle popolazioni è stata testata attraverso il k_g test. In Tabella 28 sono riportati il numero di loci con k negativi, dove i valori negativi ipotizzano un'espansione della popolazione. In nessuna popolazione si registrano valori di k negativi per tutti i sei loci, e i valori di P-value non statisticamente significativi, non permettono di rifiutare l'ipotesi nulla secondo la quale la dimensione della popolazione è costante. I risultati del k test vengono confermati anche dal g test, i cui valori sono riportati in Tabella 28, nessuno dei quali risulta statisticamente significativo.

Tabella 28. k_g -test per popolazione. In tabella sono riportati il numero di loci con k negativo (su 6 loci analizzati), il valore di probabilità per il k test e valore del g test. La significatività statistica del g test è stata valutando consultando la tabella di Reich

	SSE	SNW	SaS	LI	FA	BA	CY	NS
<i>loci con -k</i>	3	3	5	6	4	5	4	2
<i>k-test (p-value)</i>	0,628	0,628	0,096	0,013	0,316	0,096	0,316	0,876
<i>g-test (value)</i>	1,331	3,718	2,854	4,232	0,981	4,163	0,858	2,506

4.3.13 *Dispersione differenziale legata al sesso*

La dispersione differenziale legata al sesso (*Sex-biased dispersal*) è stata testata attraverso il calcolo dell'indice di assegnazione *Aic*. Il grafico della Figura 24 in mostra i valori medi di *Aic* rispetto al sesso per le popolazioni sarde. I valori medi di *Aic* risultano positivi per le femmine e negativi per i maschi facendo ipotizzare che i primi sarebbero più stanziali mentre i maschi presenterebbero una maggiore capacità di dispersione.

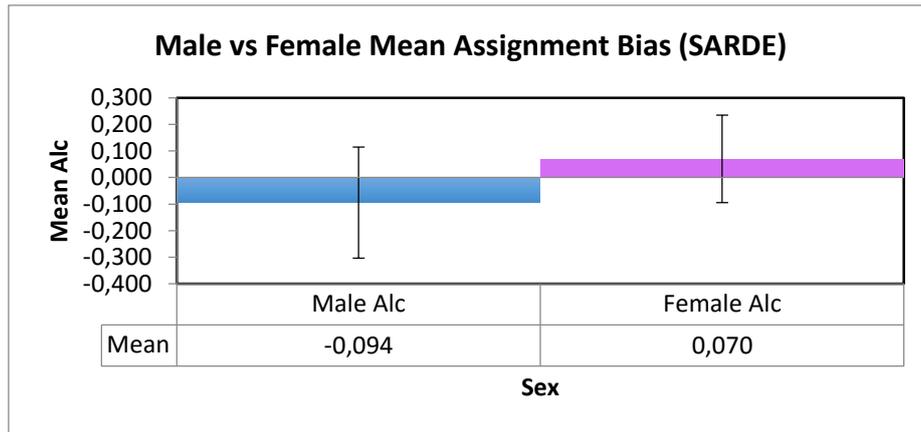


Figura 24 Grafico dei valori medi di *Aic* per maschi e femmine calcolati con GenAlEx.

In Tabella 29 sono mostrati gli indici genetici *Fis*, *Fst*, media e varianza degli Indici di Assegnazione corretti (rispettivamente *mAic* e *vAic*) e infine l'indice di parentela (*relatedness*) fra gli individui dello stesso sesso. L'analisi dei dati microsatelliti ha mostrato l'assenza di differenze significative tra maschi e femmine relativamente ai valori di F_{IS} , F_{ST} , *relatedness*, *mAic* e *vAic*, portando a rigettare l'ipotesi di dispersione distorta in base al sesso sia nel campione sardo.

Tabella 29 Principali indici di differenziamento per gli individui separati per sesso. Sono riportati gli indici *FST* e *FIS*, l'indice *r* di parentela e la media e la varianza degli indici di assegnazione corretto (*vAic*)

Popolazioni sarde				
Sesso	FIS	FST	relatedness	vAic
M (56)	0,108	0,023	0,040	6,087
F (77)	0,107	0,011	0,020	6,562
P-value	0,500	0,740	0,730	0,630

4.4 ANALISI TEMPORALE DELLA VARIABILITÀ GENETICA

Le tre popolazioni della Sardegna sono state confrontate in base all'anno di campionamento: 2005 e 2012. Sono stati calcolati i principali indici di variabilità genetica come si può osservare in Tabella 30 (Na , Ar , Ho , uHe), e complessivamente per il numero di alleli e ricchezza allelica nei grafici in Figura 25. I risultati del confronto della variabilità allelica in termini di numero di alleli Na , mostrano valori minori nell'anno 2005 a confronto con il 2012 per due popolazioni (SNW e SaS), mentre per SSE risultano uguali. La maggiore variabilità allelica si ritrova nella popolazione della Sardegna meridionale campionamento del 2012.

La ricchezza allelica, calcolata per un minimo di 14 individui diploidi, mostra per la popolazione della Sardegna meridionale SaS e della Sardegna Nord occidentale SNW, un andamento simile a quello riscontrato per la stima del numero di alleli, ossia una minore ricchezza per l'anno 2005 rispetto al 2012; mentre si riscontra una situazione contraria per la Sardegna sud orientale SSE dove la ricchezza diminuisce nel campionamento più recente. Tuttavia in entrambe le analisi, le differenze in termini di variabilità allelica risultano minime nel confronto tra popolazioni appartenenti alla stessa area di campionamento a distanza di 7 anni. Gli istogrammi (Figura 25) riportano i valori complessivi di Na e Ar per popolazione per anno di campionamento.

L'eterozigosità osservata Ho risulta per tutte le popolazioni per ciascun anno di campionamento sempre minore di quella attesa, ipotizzando un discostamento dall'equilibrio di Hardy Weinberg per deficit di eterozigoti. Osservando l'eterozigosità attesa corretta che costituisce un indice di diversità genetica si può notare come nella popolazione della Sardegna Sud orientale e meridionale la diversità genetica aumenta nel campionamento del 2012, mentre per la popolazione nord occidentale diminuisce nel campionamento più recente.

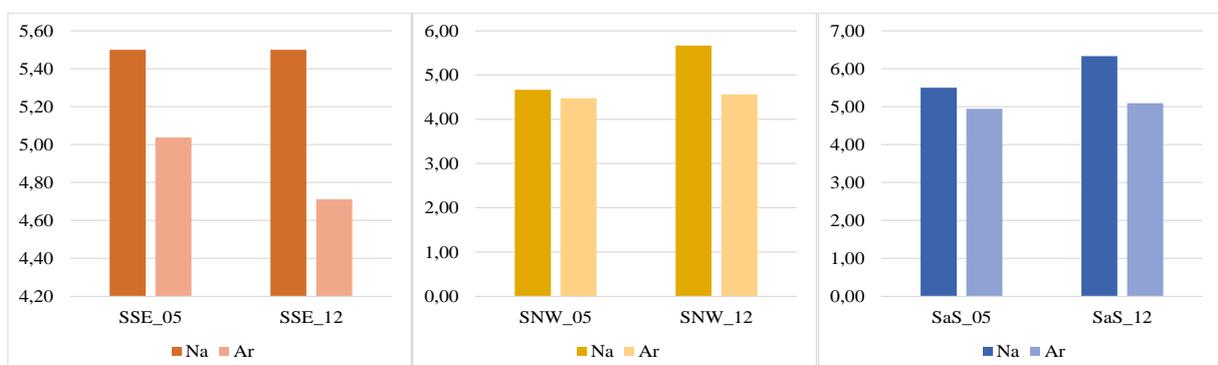


Figura 25. Grafici per gli indici di variabilità allelica Na e Ar complessivi per popolazioni e confronto tra campioni provenienti dalla stessa area di campionamento a sette anni di distanza (2005 e 2012)

Tabella 30. Indici descrittivi della variabilità allelica per locus e per popolazione. Sono riportati il numero di individui analizzati (N), il numero allelico (Na), ricchezza allelica calcolata su 14 individui (Ar) per le tre popolazioni a confronto per anno di campionamento.

		SSE_05	SSE_12	SNW_05	SNW_12	SaS_05	SaS_12
Rc-B3	<i>N</i>	15	29	15	29	13	27
	<i>Na</i>	3	6	3	5	2	5
	<i>Ar</i>	2,85	4,97	2,99	4,35	2,00	3,96
	<i>Ho</i>	0,067	0,655	0,000	0,621	0,077	0,481
	<i>uHe</i>	0,191	0,622	0,349	0,604	0,409	0,588
Rc-G2	<i>N</i>	20	30	19	30	20	30
	<i>Na</i>	3	3	4	4	3	4
	<i>Ar</i>	2,65	2,96	3,68	3,25	3,00	3,59
	<i>Ho</i>	0,40	0,37	0,53	0,37	0,55	0,60
	<i>uHe</i>	0,34	0,37	0,57	0,35	0,48	0,53
LERI26	<i>N</i>	20	30	18	30	20	30
	<i>Na</i>	5	4	5	5	6	8
	<i>Ar</i>	4,60	3,81	4,92	4,26	5,30	5,70
	<i>Ho</i>	0,50	0,57	0,61	0,70	0,75	0,80
	<i>uHe</i>	0,53	0,62	0,68	0,60	0,73	0,72
LERI34	<i>N</i>	20	30	19	30	20	30
	<i>Na</i>	5	4	4	3	4	3
	<i>Ar</i>	4,81	3,34	3,90	2,43	3,65	2,83
	<i>Ho</i>	0,55	0,50	0,58	0,33	0,50	0,43
	<i>uHe</i>	0,66	0,58	0,65	0,52	0,68	0,55
LERI44	<i>N</i>	20	29	19	30	19	30
	<i>Na</i>	13	12	8	13	14	13
	<i>Ar</i>	11,47	10,08	7,46	9,65	11,85	10,68
	<i>Ho</i>	0,60	0,83	0,58	0,60	0,68	0,83
	<i>uHe</i>	0,91	0,90	0,82	0,86	0,91	0,90
LERI63	<i>N</i>	20	30	19	30	20	30
	<i>Na</i>	4	4	4	4	4	5
	<i>Ar</i>	3,85	3,12	3,90	3,43	3,87	3,80
	<i>Ho</i>	0,55	0,43	0,63	0,60	0,60	0,40
	<i>uHe</i>	0,59	0,48	0,64	0,60	0,58	0,50
Pop	<i>Na</i>	5,50	5,50	4,67	5,67	5,50	6,33
	<i>Ar</i>	5,04	4,71	4,47	4,56	4,94	5,09
	<i>Ho</i>	0,44	0,56	0,49	0,54	0,53	0,59
	<i>uHe</i>	0,536	0,595	0,617	0,589	0,630	0,632

4.4.1 *Equilibrio di Hardy Weinberg*

Il discostamento dell'equilibrio di Hardy Weinberg, come deficit di eterozigoti, suggerito da un eterozigosità attesa maggiore rispetto a quella osservata per tutte le osservazioni, è stato verificato con Genepop. Si registrano alcuni valori di P statisticamente significati dopo la correzione FDR, tuttavia complessivamente i campioni non presentano deviazioni dall'equilibrio per deficit (Tabella 31).

Tabella 31. Valori di probabilità per il discostamento di Hardy Weinberg per deficit di eterozigoti (PHW). I valori sottolineati e in grassetto sono statisticamente significativi dopo la correzione FDR, mentre quelli sottolineati sono i valori corretti secondo BH, non più statisticamente significativi dopo la correzione

<i>PHW</i>	SSE_05	SSE_12	SNW_05	SNW_12	SaS_05	SaS_12
Rc-B3	<u>0,091</u>	0,453	<u>0,002</u>	0,881	<u>0,036</u>	0,109
Rc-G2	1,000	0,490	0,390	0,748	0,909	0,179
LERI26	0,532	0,083	0,354	0,881	0,752	0,536
LERI34	0,082	0,220	0,123	<u>0,099</u>	<u>0,043</u>	0,114
LERI44	<u>0,000</u>	0,068	<u>0,019</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	0,113
LERI63	<u>0,091</u>	0,342	<u>0,084</u>	0,389	0,688	<u>0,084</u>
Pop	0,299	0,276	0,162	0,500	0,405	0,189

4.4.2 *Coefficiente di inbreeding*

I valori di Fis e i relativi valori di probabilità corretti, sono mostrati in Tabella 32 per i due campionamenti temporali delle tre popolazioni.

Complessivamente si evidenzia una diminuzione dei valori di Fis nell'anno più recente di campionamento (2012), per tutte le popolazioni e inoltre nessun valore risulta statisticamente significativo dopo la correzione per i test multipli.

Tabella 32. Valori dell'indice di inbreeding Fis per locus per popolazione calcolato con Fstat. I valori sottolineati sono statisticamente significativi. In valori sottolineati non sono statisticamente significativi dopo la correzione di Bonferroni.

<i>Fis value</i>	SSE_05	SSE_12	SNW_05	SNW_12	SaS_05	SaS_12
Rc-B3	<u>0,66</u>	-0,06	<u>1,00</u>	-0,03	<u>0,82</u>	0,18
Rc-G2	-0,19	0,01	0,08	-0,06	-0,16	-0,13
LERI26	0,05	0,09	0,10	-0,16	-0,03	-0,11
LERI34	0,17	0,14	0,11	<u>0,37</u>	0,27	0,22
LERI44	<u>0,35</u>	0,08	<u>0,30</u>	<u>0,30</u>	<u>0,25</u>	0,08
LERI63	0,06	0,10	0,01	0,00	-0,04	0,20
All	<u>0,18</u>	0,06	0,21	0,09	0,17	0,07

4.4.3 Differenziazione temporale

La differenziazione temporale è stata valutata attraverso il calcolo Fst a coppie: campioni della stessa area geografica a confronto per anno di campionamento.

Come si può notare dalla Tabella 33, non esiste una differenziazione temporale confermata da valori bassi e non significativi di Fst e per tutte le osservazioni e non statisticamente significativi.

Tabella 33. Indici di Fst a coppie tra campioni della stessa zona geografica, a distanza di sette anni.

		Fst
SSE_05	SSE_12	0,018
SNW_05	SNW_12	0,003
SaS_05	SaS_12	0

4.4.4 Test del Bottleneck e Kg-test

Il test del bottleneck è stato utilizzando anche per le popolazioni sarde nel confronto temporale. Il programma ha calcolato l'eterozigosità osservata per popolazione e per locus, confrontandola con quella attesa in condizioni di equilibrio, con la condizione che i loci seguano il modello TPM (Two Phase model). Si osserva in alcuni campioni una eterozigosità osservata *He* maggiore dell'attesa *Heq*. Tuttavia dal statistico di Wilcoxon, emerge un eccesso di eterozigoti statisticamente significativo solo la popolazione della Sardegna meridionale e nord occidentale del 2005 (SaS_05, P-value=0.039, SNW_05, P-value= 0.039), ipotizzando un crollo demografico dovuto ad un collo di bottiglia, che però non viene registrato nel campionamento del 2012 Tabella 34.

Tabella 34. Test del bottleneck sotto TPM per il confronto temporale 2005-2012 per le 3 popolazioni sarde. Sono riportate la diversità genica (*He*), la diversità genica attesa all'equilibrio (*Heq*) e la probabilità di eccesso di eterozigoti secondo il Wilcoxon test.

TPM	SSE_05	SSE_12	SNW_05	SNW_12	SaS_05	SaS_12
<i>mean He</i>	0,536	0,595	0,617	0,589	0,630	0,632
<i>mean Heq</i>	0,581	0,562	0,573	0,565	0,553	0,607
<i>P excess H</i>	0,719	0,219	0,039	0,281	0,008	0,344

Il kg test ha permesso di indagare un'eventuale espansione delle popolazioni I valori sia del k test che del g test risultano statisticamente non significativi, indicando popolazioni stabili nel tempo Tabella 35.

Tabella 35. Kgttest per campione per anno 2005-2012. In tabella sono riportati il numero di loci con k negativo (sui 7 loci analizzati), il valore di probabilità per il k test e valore del g test. La significatività statistica del g test è stata valutando consultando la tabella di Reich.

	SSE_05	SSE_12	SNW_05	SNW_12	SaS_05	SaS_12
<i>loci con -k</i>	2	4	3	3	3	4
<i>k-test (p-value)</i>	0,876	0,316	0,628	0,628	0,628	0,316
<i>g-test (value)</i>	1,311	1,998	3,568	4,139	2,333	4,354

5. DISCUSSIONE – *Raja clavata*



Gli studi di genetica della pesca per la specie *Raja clavata* sono limitati; dalla letteratura scientifica emerge che gli studi di Chevolot (Chevolot *et al.* 2006a; Chevolot *et al.* 2006b), risultano gli unici esistenti, e si concentrano in gran parte su campioni dell'Oceano Atlantico, mentre analizza solo due campioni all'interno del bacino del Mediterraneo (Adriatico e Corsica) e un campione del Mar Nero (Chevolot *et al.* 2006b). Con questa premessa, il presente studio ha avuto come obiettivo quello di ampliare le conoscenze dal punto di vista genetico per la razza chiodata nel Mediterraneo. Inoltre costituisce la prima caratterizzazione genetica per campioni della Sardegna. Sono state caratterizzate tre aree di campionamento intorno ai mari sardi: Sardegna Sud orientale (SSE), Sardegna Nord occidentale (SNW) e la Sardegna meridionale (SaS), ripetendo il prelievo e le analisi nel 2005 e nel 2012 per ognuna delle aree. In questo modo si è potuta testare la stabilità temporale delle caratteristiche genetiche delle popolazioni sarde a distanza di sette anni. Per l'intero bacino del Mediterraneo sono state inoltre campionate sette aree: Mar Tirreno, area Livorno (LI), Fano (FA) e Bari (BA) per il Mar Adriatico e infine Cipro nel Mar di Levante, al fine di valutare la connettività lungo tutto il bacino, dalla Sardegna nella zona occidentale a Cipro nel bacino orientale. Inoltre un campione del Mare del Nord ha permesso un confronto genetico anche tra il Mar Mediterraneo e l'Oceano Atlantico.

La differenza principale tra il presente studio e i lavori di Chevolot è nel numero dei loci utilizzati. Nel suo primo studio di genetica di popolazione sulla specie (Chevolot *et al.* 2005) sono stati utilizzati cinque 5 loci microsatelliti specie-specifici. Successivamente si sono resi disponibili altri loci microsatelliti isolati da ESTs in *Leucoraja erinacea* da (El Nagar *et al.* 2009) che funzionano in cross-amplificazione per cinque specie di Rajidae tra cui *Raja clavata*.

Pertanto in questo studio si sono utilizzati due dei loci isolati da (Chevolot *et al.* 2005) e sei di (El Nagar *et al.* 2009) per genotipizzare un totale di 294 individui appartenenti a 8 popolazioni di *Raja clavata* al fine di valutare la variabilità intraspecifica e la connettività tra i campioni. Sul totale di otto loci, due sono stati esclusi dalle successive analisi: LERI21, poiché è risultato monomorfico, mentre LERI24 in quanto ha manifestato linkage disequilibrium con altri loci. I sei loci rimasti sono risultati essere per tutte le popolazioni polimorfici al 100%, quindi un valido strumento per la caratterizzazione delle popolazioni oggetto di studio. Tutte le località investigate hanno mostrato una buona variabilità allelica, registrando la minima per la popolazione di Cipro (CY, $N_a=4.67$) e massima per la Sardegna meridionale (SaS).

I test di differenziamento tra popolazioni attraverso gli indici di Fst e Dest hanno evidenziato una omogeneità delle tre popolazioni della Sardegna con valori molto bassi non statisticamente significativi (ad eccezione della coppia SaS-SNW, Dest=0.209, P=0.012). L'assenza di differenziazione si osserva anche per le altre coppie di popolazioni vicine geograficamente, come quelle Adriatiche (FA e BA) e del Mar Tirreno (SSE-LI).

I risultati sono coerenti con quelli descritti da Chevolut *et al.* (2006a) per le acque britanniche dove è stata descritta l'assenza di differenziamento, talvolta anche tra campioni distanti tra loro.

Al contrario la popolazione del bacino orientale CY mostra una moderata differenziazione, con valori statisticamente significativi, rispetto alle altre popolazioni mediterranee, raggiungendo il valore massimo di Fst e Dest con la Sardegna nord occidentale (SNW).

Non è possibile il confronto con lo studio precedente, perché nella pubblicazione di Chevolut *et al.* (2006b) non vengono riportati i valori del confronto a coppie delle singole località campionate ma solo dopo il loro raggruppamento per macroaree (bacini). In altri termini non sappiamo se esiste e a quanto ammonta la differenziazione tra Corsica, Adriatico e Mare del Nord ma solo che questi, nel complesso, sono significativamente diversi dai campioni Atlantici.

Anche nel nostro studio il campione del Mare del Nord presenta un moderato e significativo differenziamento genetico a confronto con le popolazioni mediterranee (ad eccezione di FA), tuttavia la differenziazione è più bassa rispetto a quella riscontrata per Cipro.

I risultati dell'analisi della varianza molecolare evidenziano che esiste una strutturazione significativa (3 gruppi) tra CY, gli altri campioni del bacino centro occidentale e il Mare del Nord con una percentuale di variazione tra gruppi del 5.88% (Fct= 0.058, P=0.000). Se si esclude il campione orientale (2 gruppi: bacino centro occidentale/mare del Nord) l'indice di differenziamento tra gruppi diminuisce (Fct= 0.032 P=0.032) ma rimane comunque statisticamente significativo.

La forte differenziazione tra Mediterraneo /Azzorre /platea continentale europea (Spagna + Portogallo + Isole Britanniche) è stata confermata sia con marcatori microsatelliti che mitocondriali (citocromo b) (global θ 0.042 (θ_{msat}) e 0.348 (θ_{mtDNA}) (P<0.0001)) (Chevolut *et al.* 2006a). Il Mediterraneo, caratterizzato da un unico aplotipo mitocondriale ma da una buona diversità allelica microsatellite, sarebbe servito come rifugio per la specie durante le glaciazioni del Pleistocene (Chevolut *et al.* 2006a).

Considerando le popolazioni interne al bacino Mediterraneo, il Mantel test evidenzia una correlazione positiva tra le distanze genetiche misurate tra popolazioni e le distanze geografiche che le separano. Inoltre i risultati dell'AMOVA confermano l'esistenza di 3 gruppi (cluster genetici) significativamente differenziati: Mediterraneo Occidentale (popolazioni sarde + Livorno), Adriatico e Cipro.

L'analisi bayesiana in STRUCTURE indica come ottimale la presenza di due cluster ($K=2$), in uno dei quali si collocano gli individui di Cipro e nell'altro tutti gli altri mediterranei e atlantici. I valori dei Delta K indicano come possibile anche la struttura $K=5$, con una debole separazione tra Mare del Nord, Cipro, Sardegna, Livorno e Adriatico.

Dall'analisi demografica tutte le popolazioni studiate risultano stabili, non mostrando segni di un'espansione demografica o un bottleneck nel recente passato, ad eccezione della popolazione del Mare del Nord. Per quest'ultima, si può ipotizzare una riduzione della dimensione effettiva di popolazione N_e in seguito ad un collo di bottiglia. Questo risultato darebbe una conferma genetica a quanto osservato negli studi sulla biologia nella stessa zona. Mentre prima del 1950 la specie era comune e diffusa nel Mare del Nord, si è registrato un declino in distribuzione e abbondanza (Walker e Heessen 1996; Walker e Hislop 1998) dovuto probabilmente a over-fishing (Dulvy e Reynolds 2002; Heessen 2004).

La struttura di popolazione descritta per *R. clavata* in questo studio non sarebbe influenzata da dispersione distorta tra i due sessi, specificatamente per il campione della Sardegna.

L'ultimo obiettivo di questo lavoro di tesi era osservare e valutare attraverso un confronto temporale le possibili differenze genetiche in termini di variabilità, differenziazione e riduzione delle dimensioni di popolazione, in tre popolazioni della Sardegna campionate nelle stesse zone nel 2005 e nel 2012.

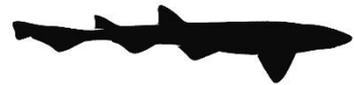
Complessivamente si sono osservati valori simili in numero di alleli e ricchezza allelica tra i due campionamenti. Non si evidenzia differenziazione genetica nei campioni raccolti a distanza di sette anni in nessuna popolazione attraverso l'indice di F_{st} . Dal test del bottleneck emergerebbe un segnale di un collo di bottiglia nella Sardegna Nord occidentale e meridionale 2005, che tuttavia non viene registrato per l'anno 2012.

I risultati ottenuti complessivamente non descrivono cambiamenti sostanziali nel confronto temporale. Analogamente, una condizione di stabilità temporale nelle caratteristiche genetiche

è stata descritta da Chevolot et al (2006b) nei mari delle isole britanniche, analizzando cinque siti e ripetendo il campionamento l'anno successivo.

I loci microsatelliti si sono rivelati un ottimo strumento di indagine della variabilità intraspecifica in *Raja clavata*, in grado di individuare differenze genetiche tra i campioni oggetto di studio. I risultati ottenuti indicano che le popolazioni della razza chiodata sono debolmente differenziate fra loro nel bacino del Mediterraneo occidentale e Adriatico, mentre risulta evidente una forte differenziazione del bacino orientale con la popolazione di Cipro. Si misura inoltre una significativa differenziazione tra l'Atlantico e il Mediterraneo, come già osservato per la specie in un altro studio, confermando che lo Stretto di Gibilterra possa costituire un ostacolo al flusso genico. I valori di differenziazione intraspecifica misurati in questo studio non dovrebbero essere sottovalutati poiché forniscono un'importante informazione sullo status genetico attuale delle popolazioni di razza chiodata esaminate e, per questo, potrebbero essere presi in considerazione nella eventuale definizione degli stock di pesca e delle misure di protezione.

6. RISULTATI – *Scyliorhinus canicula*



6.1 ESTRAZIONE DNA

L'estrazione del DNA genomico totale tramite il protocollo *Salting Out* è avvenuta efficacemente per un totale di 239 campioni. I campioni dell'Adriatico hanno mostrato maggiori difficoltà nell'applicazione del metodo a causa del prelievo della pelle e non del tessuto muscolare durante la fase di campionamento; è stato necessario per questi campioni riestrarre il DNA una seconda volta ottenendo una buona quantità di DNA genomico totale ad alto peso molecolare per 20 campioni su un totale di 46 individui campionati.

6.2 AMPLICAZIONE PCR

Inizialmente sono stati amplificati pochi individui per tutti i dodici loci al fine di ottenere condizioni di PCR ottimali, specifiche per ciascun locus. Successivamente si è preceduto con l'amplificazione di tutti i 239 campioni per tutti i loci utilizzando primers marcati. Come per l'estrazione, le maggiori difficoltà si sono riscontrate per i campioni dell'Adriatico, a causa, probabilmente, della poca quantità di DNA genomico ad alto peso molecolare estratto. In particolare, l'amplificazione del locus Scan07 è fallita per tutti i 20 campioni dell'Adriatico.

6.2.1 Genotipizzazione

Sono stati genotipizzati dodici loci per tutte le popolazioni, fatta eccezione per i 20 campioni dell'Adriatico genotipizzati per undici loci (escluso Scan07). I risultati della corsa capillare per tutti i loci e campioni sono stati visualizzati sotto forma di picchi allelici sul software GenMarker col metodo dell'*allele calling*, attribuendo un genotipo corrispondente alla misura dell'allele. In caso di mancato genotyping è stato assegnato il genotipo 00 (*missing data*). Durante la fase di scoring totale dei dati grezzi si è deciso di eliminare un campione di Cipro, in quanto la genotipizzazione è fallita per 9 loci su 12, e 8 campioni dell'Adriatico (genotipizzazione non riuscita per più di 5 loci su 11) e un individuo del mare del Nord.

Riassumendo, le successive analisi relative alla genetica di popolazione sono state effettuate su un totale di 229 campioni, divisi in 11 popolazioni e 12 loci (tranne per AD con 11 loci).

6.3 ANALISI DEI DATI

6.3.1 *Correzione errori di genotipizzazione*

L'intero *scoring* di dati grezzi è stato sottoposto a verifica per gli errori di genotipizzazione tramite software MICROCHECKER, ottenendo un *dataset* corretto da utilizzare per tutte le analisi statistiche successive.

Il software ha permesso inoltre, di indagare la presenza di *stuttering*, *large allele dropout* e alleli nulli per ciascuna popolazione e locus. Non è stata evidenziata alcuna presenza di *large allele dropout* né di *stuttering*.

6.3.2 *Variabilità genetica*

La stima del numero di alleli (N_a) per popolazione e per *locus*, implementata con GenAlEx ha permesso innanzitutto di valutare il polimorfismo dei loci microsatelliti. Si è valutata la variabilità allelica del locus in base alla presenza di più di un allele per locus, per popolazione, con il criterio del 5%.

I dodici loci evidenziano in tutte le popolazioni un polimorfismo del 100% (tranne per la popolazione ION in cui il polimorfismo è al 91,67%, derivato sicuramente dal basso numero di campioni). In alcuni casi, risulta inoltre un numero di alleli e un range allelico maggiore rispetto a quello risultante dalla letteratura (Griffiths *et al.* 2011).

Come si può osservare dalla Tabella 36, il numero di alleli complessivo per locus, varia da un minimo di 6 per il locus Scan05, ad un massimo di 14 alleli per i loci Scan07 e Scan17.

Tabella 36. Numero di alleli complessivo per ciascuno dei dodici loci.

Locus	N_a
Scan2	11
Scan3	10
Scan5	6
Scan6	10
Scan7	14
Scan10	7
Scan12	7
Scan13	9
Scan14	8
Scan15	9
Scan16	8
Scan17	14

In Tabella 37 vengono mostrati inoltre, il numero di alleli in ciascun campione (N_a) calcolati con GenAEx e la ricchezza allelica (A_r) calcolata con Fstat. La variabilità allelica (N_a) tra le popolazioni risulta massima per la Sardegna settentrionale (SaN, $N_a = 6.42$) e minima per il campione del Mar Ionio (ION, $N_a = 3.67$).

La ricchezza allelica è stata calcolata con il metodo della rarefazione per sette popolazioni (SNW, SaN, SSE, SSW, MOR, ALG, CYP) su un minimo di 15 individui diploidi. Le restanti popolazioni SIC, ION, NoS sono state escluse dall'analisi a causa del numero ridotto di campioni e ADR in quanto manca dei genotipi per il locus Scan07. Come si può osservare la ricchezza allelica calcolata per tutti i loci raggiunge il valore più alto con la popolazione del Marocco (MOR $A_r = 6.14$); per gli altri campioni si osserva una ricchezza allelica simili, con il valore più basso per la Sardegna Sud orientale SSE.

Tabella 37. Indici descrittivi della variabilità allelica per locus e per popolazione. Sono riportati il numero di individui analizzati (N), il numero allelico (Na), ricchezza allelica calcolata su 15 individui (Ar) per sette popolazioni.

		SNW	SaN	SSE	SSW	MOR	ALG	SIC	ION	ADR	CYP	NoS
Scan02	<i>N</i>	32	32	32	31	17	27	5	5	8	29	6
	<i>Na</i>	7	6	7	7	7	9	5	4	6	7	7
	<i>Ar</i>	6,55	5,42	6,11	6,65	6,98	8,31				5,70	-
Scan03	<i>N</i>	32	32	32	32	16	27	5	5	8	29	5
	<i>Na</i>	8	7	6	7	9	7	6	5	6	8	5
	<i>Ar</i>	6,80	6,73	5,84	6,52	8,81	6,33				6,69	-
Scan05	<i>N</i>	32	32	32	32	17	27	5	5	11	28	6
	<i>Na</i>	5	4	4	4	4	4	2	3	4	4	2
	<i>Ar</i>	4,33	3,86	3,86	3,47	3,77	3,36				3,07	-
Scan06	<i>N</i>	31	32	32	32	15	27	5	5	4	29	4
	<i>Na</i>	7	8	8	8	8	9	6	5	3	6	5
	<i>Ar</i>	5,96	7,00	7,28	6,77	8,00	7,68	-	-	-	5,80	-
Scan07	<i>N</i>	31	32	30	29	15	24	5	5	-	29	6
	<i>Na</i>	6	9	8	7	7	5	2	5	NA	7	2
	<i>Ar</i>	5,77	7,60	6,73	6,22	7,00	4,58	-	-	-	5,32	-
Scan10	<i>N</i>	32	32	32	32	16	25	5	5	7	29	5
	<i>Na</i>	6	5	5	5	5	3	3	4	4	6	2
	<i>Ar</i>	5,64	4,41	4,69	4,80	5,00	2,60	-	-	-	5,28	-
Scan12	<i>N</i>	32	32	32	32	17	24	5	5	12	28	6
	<i>Na</i>	3	4	4	3	3	6	2	2	5	4	4
	<i>Ar</i>	2,96	3,58	3,46	2,99	3,88	5,43	-	-	-	4,98	-
Scan13	<i>N</i>	32	32	32	32	17	27	5	5	12	29	6
	<i>Na</i>	5	5	4	6	7	5	3	1	3	5	3
	<i>Ar</i>	3,38	4,23	2,91	4,12	6,63	4,11	-	-	-	4,03	-
Scan14	<i>N</i>	32	32	32	32	16	27	5	5	12	29	6
	<i>Na</i>	5	5	4	6	5	6	3	3	4	5	4
	<i>Ar</i>	3,94	3,66	3,33	4,65	4,88	5,11	-	-	-	4,49	-
Scan15	<i>N</i>	32	32	32	31	17	27	5	5	12	29	6
	<i>Na</i>	5	5	5	5	6	6	5	4	4	7	5
	<i>Ar</i>	4,86	4,89	4,41	4,47	5,98	5,76	-	-	-	5,98	-
Scan16	<i>N</i>	31	32	32	32	17	26	5	5	12	29	6
	<i>Na</i>	7	7	7	5	6	8	4	2	4	7	5
	<i>Ar</i>	6,45	6,42	6,30	4,99	5,99	7,36	-	-	-	6,42	-
Scan17	<i>N</i>	28	32	32	32	17	27	5	5	7	28	6
	<i>Na</i>	10	12	10	12	7	11	7	6	6	9	5
	<i>Ar</i>	9,11	9,58	8,27	9,54	6,75	8,69	-	-	-	7,93	-
Pops	<i>Na</i>	6,17	6,42	6,00	6,25	6,17	6,58	4,00	3,67	4,08	6,25	4,08
	<i>Ar</i>	5,48	5,61	5,26	5,43	6,14	5,78	-	-	-	5,47	5,60

6.3.3 Eterozigosità e equilibrio di Hardy-Weinberg

L'eterozigosità osservata (H_o) e attesa corretta (uHe) costituiscono un altro indice della variabilità genetica all'interno delle popolazioni e dei loci. Nelle tabelle sottostanti (Tabella 38 e Tabella 39) sono mostrati i valori medi per ciascun locus e popolazione. Complessivamente risulta un eccesso di omozigoti per tutte le popolazioni, dal momento che l'eterozigosità osservata è sempre inferiore a quella attesa.

L'eterozigosità attesa corretta, che costituisce un indice per la diversità genetica, assume valori simili per tutte le popolazioni, con una media di 0.66. Il valore massimo è riscontrato per la popolazione del Marocco (MOR, $uHe = 0.73$) mentre il minimo si osserva per l'Adriatico (ADR, $uHe = 0.59$).

Tabella 38. Eterozigosità osservata (H_o) e attesa corretta (UHe) per locus.

	S2	S3	S5	S6	S7	S10	S12	S13	S14	S15	S16	S17
<i>H_o</i>	0,79	0,69	0,52	0,79	0,40	0,57	0,51	0,38	0,58	0,61	0,70	0,72
<i>uHe</i>	0,80	0,75	0,55	0,79	0,61	0,64	0,54	0,40	0,64	0,63	0,73	0,82

Tabella 39. Eterozigosità osservata (H_o) e attesa corretta (UHe) per popolazione.

	SNW	SaN	SSE	SSW	MOR	ALG	SIC	ION	ADR	CYP	NoS
<i>H_o</i>	0,61	0,60	0,63	0,62	0,66	0,65	0,58	0,57	0,49	0,62	0,61
<i>uHe</i>	0,65	0,65	0,64	0,66	0,73	0,68	0,69	0,60	0,59	0,66	0,69

100

Il discostamento dell'equilibrio di Hardy Weinberg, come deficit di eterozigoti, suggerito da un'eterozigosità attesa maggiore rispetto a quella osservata, è stato verificato con Genepop (Tabella 40). I valori di probabilità statisticamente significativi ($P < 0,05$) sono stati corretti con il metodo FDR.

Tabella 40. Valori di probabilità per il discostamento di Hardy Weinberg per deficit di eterozigoti (PHW). I valori sottolineati e in grassetto sono statisticamente significativi dopo la correzione FDR, mentre quelli sottolineati sono i valori corretti secondo BH, non più statisticamente significativi dopo la correzione.

<i>PHW</i>	SNW	SaN	SSE	SSW	MOR	ALG	SIC	ION	ADR	CYP	NoS	<i>Locus</i>
Scan02	0,81	0,58	0,97	0,19	0,88	0,89	0,15	0,72	0,15	0,81	0,49	0,61
Scan03	0,85	0,40	0,07	0,57	0,37	0,19	0,64	0,61	0,18	0,53	0,16	0,42
Scan05	0,62	0,11	0,42	0,34	0,66	0,38	1,00	0,14	0,73	0,78	0,76	0,54
Scan06	0,06	0,24	0,36	0,23	0,15	0,43	1,00	1,00	0,14	0,91	1,00	0,50
Scan07	0,05	0,00	0,44	0,21	0,04	0,00	0,33	<u>0,52</u>	NA	0,09	<u>0,36</u>	0,20
Scan10	0,83	0,99	0,51	0,15	0,01	0,88	<u>0,19</u>	0,10	0,34	<u>0,10</u>	1,00	0,47
Scan12	0,49	0,28	0,88	0,17	0,92	0,07	0,24	1,00	0,73	<u>0,10</u>	0,76	0,51
Scan13	1,00	1,00	1,00	0,48	0,13	0,05	1,00	NA	0,58	0,52	0,52	0,63
Scan14	0,04	0,02	0,46	<u>0,25</u>	0,34	0,57	0,80	1,00	0,25	<u>0,10</u>	0,14	0,36
Scan15	0,11	0,33	<u>0,06</u>	0,57	0,60	0,80	1,00	1,00	0,21	0,28	0,48	0,49
Scan16	0,21	0,55	0,23	0,74	0,61	0,27	0,34	1,00	0,17	0,25	0,93	0,48
Scan17	0,09	0,03	<u>0,25</u>	<u>0,10</u>	0,15	0,83	0,61	0,08	0,09	0,36	0,23	0,26
Pop	0,43	0,38	0,47	0,33	0,40	0,45	0,61	0,65	0,32	0,40	0,57	

6.3.4 Linkage disequilibrium

La condizione di *Linkage disequilibrium* tra i dodici loci microsatelliti è stata valutata mediante il calcolo del valore di probabilità di LD. In Tabella 41 sono riportati i valori di P-value per ciascun locus complessivo per le undici popolazioni, ottenuto mediante il metodo di Fisher.

Come si può osservare dai valori di probabilità non statisticamente significativi, tutti i dodici loci risultano tra loro indipendenti e perciò adatti per uno studio di genetica di popolazione.

Tabella 41. Valori di probabilità di Linkage Disequilibrium tra coppie di loci per il totale delle popolazioni (metodo di Fisher).

Locus 1	Locus 2	P-value	Locus 1	Locus 2	P-value
Scan02	Scan03	0,752	Scan10	Scan14	0,940
Scan02	Scan05	0,822	Scan12	Scan14	0,871
Scan03	Scan05	0,963	Scan13	Scan14	0,725
Scan02	Scan06	0,882	Scan02	Scan15	0,544
Scan03	Scan06	0,935	Scan03	Scan15	0,769
Scan05	Scan06	0,299	Scan05	Scan15	0,666
Scan02	Scan07	0,531	Scan06	Scan15	0,259
Scan03	Scan07	0,808	Scan07	Scan15	0,998
Scan05	Scan07	0,870	Scan10	Scan15	0,951
Scan06	Scan07	0,415	Scan12	Scan15	0,434
Scan02	Scan10	0,896	Scan13	Scan15	0,437
Scan03	Scan10	0,825	Scan14	Scan15	0,856
Scan05	Scan10	0,999	Scan02	Scan16	1,000
Scan06	Scan10	0,971	Scan03	Scan16	0,949
Scan07	Scan10	0,762	Scan05	Scan16	0,616
Scan02	Scan12	0,260	Scan06	Scan16	0,996
Scan03	Scan12	0,468	Scan07	Scan16	0,954
Scan05	Scan12	0,893	Scan10	Scan16	1,000
Scan06	Scan12	0,798	Scan12	Scan16	0,701
Scan07	Scan12	0,089	Scan13	Scan16	0,511
Scan10	Scan12	0,976	Scan14	Scan16	0,909
Scan02	Scan13	0,962	Scan15	Scan16	0,240
Scan03	Scan13	0,863	Scan02	Scan17	0,308
Scan05	Scan13	0,517	Scan03	Scan17	0,785
Scan06	Scan13	0,914	Scan05	Scan17	1,000
Scan07	Scan13	0,898	Scan06	Scan17	0,995
Scan10	Scan13	0,905	Scan07	Scan17	0,972
Scan12	Scan13	0,713	Scan10	Scan17	0,470
Scan02	Scan14	0,829	Scan12	Scan17	0,827
Scan03	Scan14	0,975	Scan13	Scan17	0,830
Scan05	Scan14	0,406	Scan14	Scan17	0,804
Scan06	Scan14	0,717	Scan15	Scan17	0,442
Scan07	Scan14	0,873	Scan16	Scan17	0,680

6.3.5 Alleli nulli

La frequenza di alleli nulli è stata stimata statisticamente attraverso il metodo di Dempster et al. (1977). In Tabella 42 è riportata la frequenza di alleli nulli \hat{f} per ciascun locus.

Complessivamente i loci presentano una bassa frequenza di alleli nulli, con il massimo valore riportato per il locus Scan07 con $\hat{f} = 0.13$

Tabella 42. Frequenza di alleli nulli calcolato secondo l'algoritmo di Dempster et al. (1977) per locus per popolazioni

\hat{f}	SNW	SaN	SSE	SSW	MOR	ALG	SIC	ION	ADR	CYP	NoS	locus
Scan2				0,03			0,09		0,04			0,01
Scan3			0,05			0,02			0,04		0,09	0,02
Scan5		0,06		0,01		0,01		0,12				0,02
Scan6	0,04	0,01		0,01	0,04				0,20			0,03
Scan7	0,06	0,18		0,02	0,12	0,17	0,16	0,16	-	0,07	0,32	0,13
Scan10				0,03	0,20		0,37	0,09		0,04		0,07
Scan12		0,01		0,04		0,05	0,20			0,11		0,04
Scan13					0,05	0,07						0,01
Scan14	0,12	0,09		0,08					0,03	0,06	0,11	0,04
Scan15	0,05		0,10						0,05	0,02		0,02
Scan16	0,02		0,02			0,01			0,07	0,02		0,01
Scan17	0,03	0,06	0,02	0,06	0,04			0,09			0,06	0,03
Pop	0,03	0,04	0,02	0,02	0,04	0,03	0,07	0,04	0,04	0,03	0,05	

6.3.6 Indice di Inbreeding

Il coefficiente di inbreeding rappresentato dall'indice Fis è stato calcolato per l'intero *data set* con il software Fstat secondo Weir e Cockerham (1984).

I valori di Fis, indicati in Tabella 43 non risultano statisticamente significativi dopo la correzione per i test multipli. I valori medi sono tutti bassi, variando da un minimo di 0.01 per la Sardegna Sud orientale (SSE) ad un massimo di 0.18 per Adriatico (ADR).

Tabella 43. Valori dell'indice di inbreeding Fis per locus per popolazione calcolato con Fstat. I valori sottolineati non sono statisticamente significativi dopo la correzione di Bonferroni.

<i>Fis value</i>	SNW	SaN	SSE	SSW	MOR	ALG	SIC	ION	ADR	CYP	NoS
Scan02	-0,03	-0,01	-0,16	0,14	-0,09	-0,06	0,29	-0,03	0,13	-0,08	0,07
Scan03	-0,02	0,07	0,15	-0,02	0,04	0,02	0,06	0,11	0,24	0,01	0,29
Scan05	-0,01	0,18	0,01	0,05	-0,05	0,07	-0,14	0,45	-0,05	-0,08	0,06
Scan06	0,08	0,02	0,00	0,05	0,16	-0,02	-0,14	-0,38	0,63	-0,08	-0,20
Scan07	0,15	<u>0,44</u>	0,02	0,06	<u>0,29</u>	0,42	<u>0,60</u>	0,50	NA	<u>0,25</u>	1,00
Scan10	-0,09	-0,20	-0,06	0,06	0,45	-0,17	<u>1,00</u>	0,25	0,00	0,05	-0,33
Scan12	0,11	0,12	-0,15	0,13	-0,22	0,09	0,67	-0,33	-0,05	<u>0,31</u>	-0,03
Scan13	-0,05	-0,11	-0,04	0,04	0,24	0,23	-0,20	NA	0,02	-0,06	0,06
Scan14	<u>0,28</u>	0,22	0,03	<u>0,24</u>	0,05	0,00	-0,14	-0,20	0,17	0,11	0,33
Scan15	0,15	0,09	<u>0,26</u>	0,04	0,02	-0,04	-0,21	-0,28	0,23	0,02	0,11
Scan16	0,07	-0,08	0,10	-0,08	-0,01	0,09	0,25	-0,14	0,24	0,10	-0,14
Scan17	0,09	0,15	-0,01	0,14	0,14	-0,05	0,09	0,31	0,39	0,05	0,23
<i>Pop</i>	0,06	0,08	<u>0,01</u>	<u>0,07</u>	<u>0,10</u>	0,05	<u>0,17</u>	0,07	<u>0,18</u>	<u>0,06</u>	0,12

6.3.7 Analisi del differenziamento: F_{ST} e $Dest$

I Test di differenziamento genico sono stati eseguiti con il programma Arlequin e Demetics. L'ipotesi nulla di identica distribuzione allelica lungo tutte le popolazioni è stata testata attraverso il test di differenziamento fra coppie di popolazioni attraverso due indici: F_{ST} e $Dest$. In Tabella 44 sono illustrati i valori di F_{ST} e i relativi valori di P-value tra coppie di popolazioni e in Figura 26 la rappresentazione grafica ottenuta con Arlequin R.

Tabella 44. Valori di F_{ST} calcolato tra coppie di popolazioni (sotto la diagonale) e i relativi P-value corretti con FDR (sopra la diagonale). I valori sottolineati e in grassetto sono statisticamente significativi dopo la correzione FDR

Fst/P-value	SNW	SaN	SSE	SSW	MOR	ALG	SIC	ION	CYP	NoS
SNW	*	<u>0,034</u>	0,078	0,595	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
SaN	0,009	*	0,206	<u>0,034</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,002</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
SSE	0,006	0,004	*	0,093	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
SSW	0,000	0,009	0,005	*	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>
MOR	0,066	0,061	0,081	0,066	*	<u>0,001</u>	<u>0,005</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,005</u>
ALG	0,040	0,043	0,056	0,053	0,024	*	<u>0,024</u>	<u>0,000</u>	<u>0,000</u>	<u>0,001</u>
SIC	0,072	0,065	0,063	0,067	0,058	0,037	*	<u>0,019</u>	<u>0,016</u>	<u>0,013</u>
ION	0,078	0,073	0,065	0,079	0,094	0,073	0,109	*	<u>0,000</u>	<u>0,006</u>
CYP	0,056	0,058	0,056	0,056	0,049	0,042	0,043	0,077	*	<u>0,000</u>
NoS	0,104	0,099	0,117	0,105	0,052	0,059	0,106	0,104	0,100	*

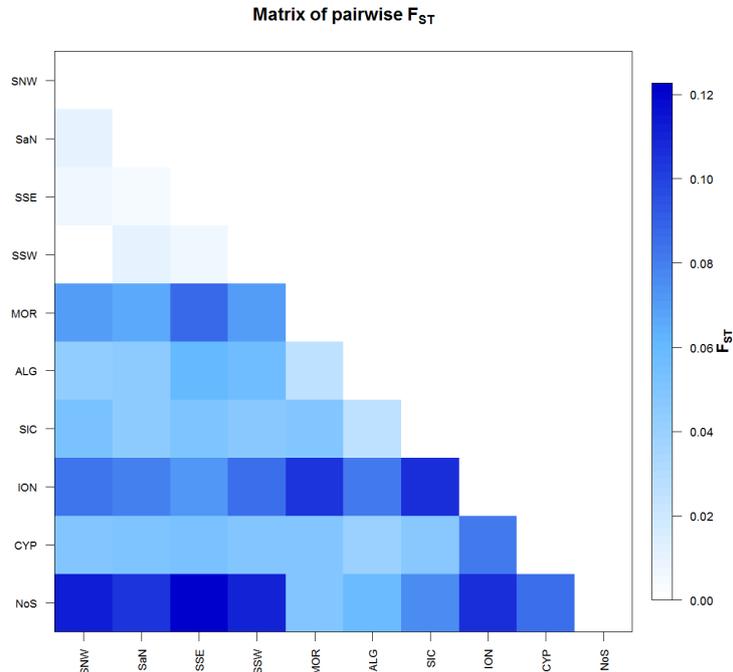


Figura 26. Matrice dei valori di F_{ST} a coppie

Osservando i valori di Fst si può notare che risultano molto bassi (Fst sempre minore di 0.13), indicando un debole differenziamento tra le popolazioni. I valori più alti di Fst si registrano per la popolazione del Mare del Nord (NoS) a confronto con tutte le altre con valore medio 0.094. All'interno del Mediterraneo i valori di Fst risultano più o meno omogenei e tutti statisticamente significativi. Le quattro popolazioni della Sardegna a confronto tra loro registrano i valori di Fst più bassi (media Fst pop Sardegna = 0.006).

Le coppie di popolazione sottoposte ad analisi di Dest (Tabella 45) mostrano valori di differenziamento più alti dei valori di Fst e statisticamente significativi (ad eccezione di due confronti tra campioni sardi). I valori rispecchiano l'andamento osservato per l'indice di Fst con maggiore differenziazione tra Atlantico e Mar Mediterraneo e bassissimo per le popolazioni sarde.

Tabella 45. Valori di Dest calcolato tra coppie di popolazioni (sotto la diagonale) e i relativi P-value corretti con FDR (sopra la diagonale). I valori sottolineati e in grassetto sono statisticamente significativi dopo la correzione FDR

Dest\P-value	SNW	SaN	SSE	SSW	MOR	ALG	SIC	ION	CYP	NoS
SNW	*	<u>0,016</u>	<u>0,024</u>	0,394	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,002</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>
SaN	0,029	*	0,070	<u>0,006</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>
SSE	0,016	0,015	*	0,069	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,004</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>
SSW	0,003	0,033	0,022	*	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>
MOR	0,124	0,128	0,166	0,145	*	<u>0,002</u>	<u>0,001</u>	<u>0,002</u>	<u>0,001</u>	<u>0,002</u>
ALG	0,085	0,099	0,126	0,124	0,057	*	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>
SIC	0,162	0,134	0,107	0,157	0,156	0,116	*	<u>0,001</u>	<u>0,006</u>	<u>0,001</u>
ION	0,138	0,148	0,139	0,160	0,166	0,136	0,207	*	<u>0,001</u>	<u>0,001</u>
CYP	0,106	0,126	0,110	0,112	0,135	0,124	0,101	0,147	*	<u>0,001</u>
NoS	0,230	0,251	0,276	0,273	0,142	0,146	0,251	0,226	0,272	*

6.3.8 Analisi delle coordinate principali: *Fst* e *Dest* a confronto.

I due grafici sottostanti mostrano l'analisi delle coordinate principali (PCoA) effettuata con i valori *Fst* (Figura 27.) e *Dest* (Figura 28.). Si può notare in maniera più intuitiva come le quattro popolazioni sarde siano geneticamente molto simili, mentre la differenziazione maggiore risulta tra il Mediterraneo e l'Atlantico.

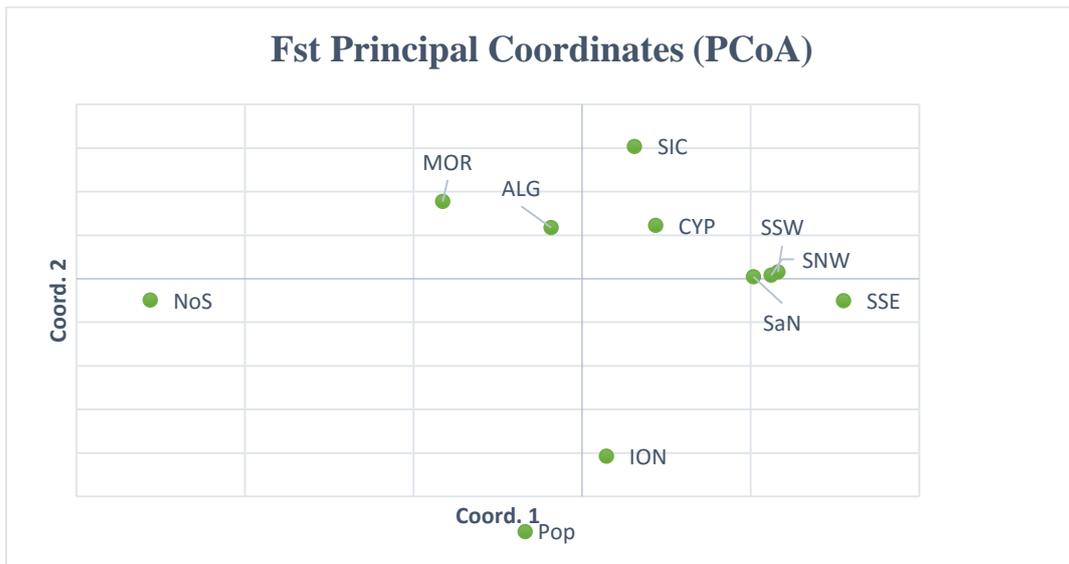


Figura 27. Grafico della PCoA ottenuta a partire dalla matrice di valori di *Fst* calcolati con Arlequin

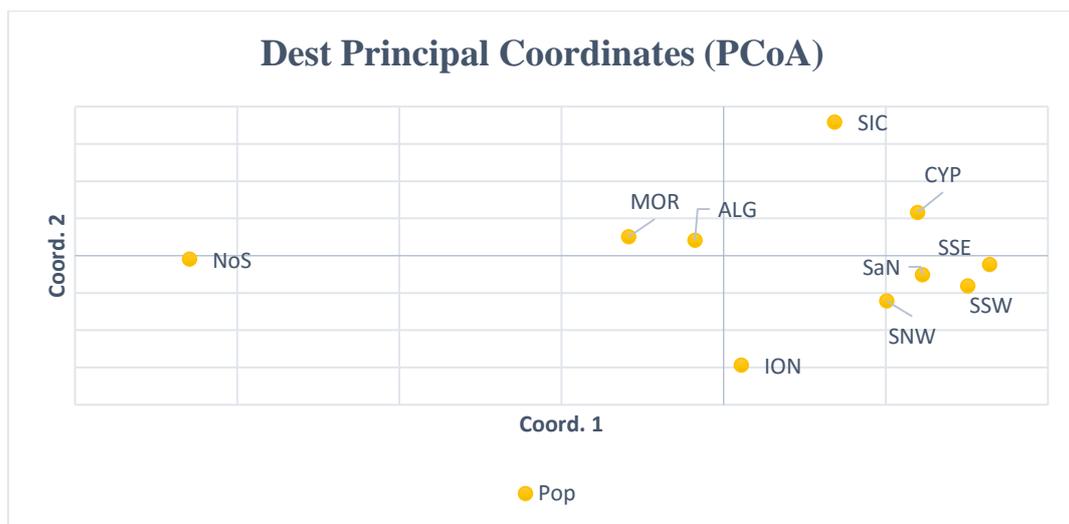


Figura 28. Grafico della PCoA ottenuta a partire dalla matrice di valori di *Dest* calcolati con Demetics

6.3.9 Indagine sulla struttura di popolazione: AMOVA

Con Arlequin è stato possibile testare le strutture genetiche a gruppi di popolazioni.

La tabella 46 mostra le strutture testate includendo le dieci popolazioni (ADR è stata esclusa dalle analisi in Arlequin). L'AMOVA globale, descrive una debole ma significativa differenziazione con una variazione percentuale tra le popolazioni del 4.45%, (Fct=0.045 P significativo), mentre la gran parte delle differenze si riscontrano tra gli individui entro le popolazioni con il 95.54%. Il confronto a due gruppi tra l'Atlantico e il Mediterraneo identifica strutturazione a gruppi di popolazioni con un alto indice di differenziazione statisticamente significativo (Fct= 0.066, P=0.001). La struttura che mostra il maggiore grado di variazione tra gruppi è quella che vede a confronto il Mediterraneo occidentale diviso in tre gruppi: i campioni sardi, l'Algeria e il Marocco, a confronto con il quarto gruppo rappresentato dal Mare del Nord, in cui la differenziazione Fct raggiunge lo 0.074 statisticamente significativo.

Tabella 46 Analisi dell'AMOVA calcolata per struttura globale e a gruppi per il confronto delle 10 popolazioni. La tabella riporta la percentuale della variazione da attribuire agli individui entro le popolazioni, tra popolazioni entro i gruppi e tra gruppi, i relativi indici di fissazione con il valore di probabilità

STRUTTURA	% VARIAZIONE	INDICE DI FISSAZIONE	P-VALUE
1 gruppo	SNW, SaN, SSE, SSW, MOR, ALG, SIC, ION, CYP, NoS		
Tra popolazioni	4,45	Fst =0,045	0,000
Entro popolazioni	95,54		
2 gruppi	Med/NoS		
Tra gruppi	6,57	Fct = 0,066	0,001
Tra pop. entro i gruppi	3,78	Fsc = 0,040	0,000
Entro le pop.	89,63	Fst = 0,104	0,000
5 gruppi	MOR /ALG/SNW, SaN, SSE, SSW/ CYP/NoS		
Tra gruppi	5,40	Fct = 0,054	0,000
Tra pop. entro i gruppi	0,53	Fsc = 0,006	0,019
Entro le pop.	94,06	Fst = 0,059	0,000
4 gruppi	SNW, SaN, SSE, SSW / MOR / ALG/NoS		
Tra gruppi	5,62	Fct = 0,056	0,000
Tra pop. entro i gruppi	0,53	Fsc = 0,005	0,017
Entro le pop.	93,85	Fst = 0,061	0,000
2 gruppi	SNW, SaN, SSE, SSW / MOR / ALG/NoS		
Tra gruppi	7,42	Fct = 0,074	0,000
Tra pop. entro i gruppi	2,79	Fsc = 0,030	0,000
Entro le pop.	89,78	Fst = 0,102	0,000

L'analisi della AMOVA condotta all'interno del Mediterraneo è mostrata in **Tabella 47**. Globalmente, esiste una variazione tra popolazioni del 4.06% con valore di indice di differenziazione F_{ts} significativo e pari a 0.41. Si è indagato inoltre in due strutture che comprendevano tre gruppi ciascuna. La prima prevedeva una divisione tra popolazioni in base alla geografia del Mediterraneo (occidentale, centrale, orientale) Nel secondo caso che è anche quello dove si osserva maggior strutturazione ($F_{ct}=0.049$, $P=0.000$), si è deciso di escludere il Mediterraneo centrale, data la bassa numerosità di individui dei due campioni.

Tabella 47. Analisi dell'AMOVA calcolata per struttura globale e a gruppi per il confronto interno al Mediterraneo. La tabella riporta la percentuale della variazione da attribuire agli individui entro le popolazioni, tra popolazioni entro i gruppi e tra gruppi, i relativi indici di fissazione con il valore di probabilità

STRUTTURA	% VARIAZIONE	INDICE DI FISSAZIONE	P-VALUE
1 gruppo	SNW, SaN, SSE, SSW, MOR, ALG, SIC, ION, CYP		
Tra popolazioni	4,06	$F_{st} = 0,041$	0,000
Entro popolazioni	95,94		
3 gruppi	SNW, SaN, SSE, SSW, MOR, ALG/ SIC, ION/ CYP		
Tra gruppi	2,08	$F_{ct} = 0,020$	0,001
Tra pop. entro i gruppi	3,24	$F_{sc} = 0,033$	0,000
Entro le pop.	94,68	$F_{st} = 0,053$	0,000
3 gruppi	SNW, SaN, SSE, SSW/ MOR/ALG/ CYP		
Tra gruppi	4,90	$F_{ct} = 0,049$	0,000
Tra pop. entro i gruppi	0,53	$F_{sc} = 0,005$	0,018
Entro le pop.	94,55	$F_{st} = 0,054$	0,000

6.3.10 *Analisi bayesiana dei cluster S. canicula*

L'analisi bayesiana è stata condotta sui 229 individui, con un numero massimo di raggruppamenti testati di 14, che corrisponde al numero di campioni testati più 3. Dal calcolo del Delta K emerge che il K più probabile $K = 2$, mentre il valore del Delta Fst più alto evidenzia una probabilità di suddivisione degli individui in 5 cluster ($K = 5$). (Figura 29)

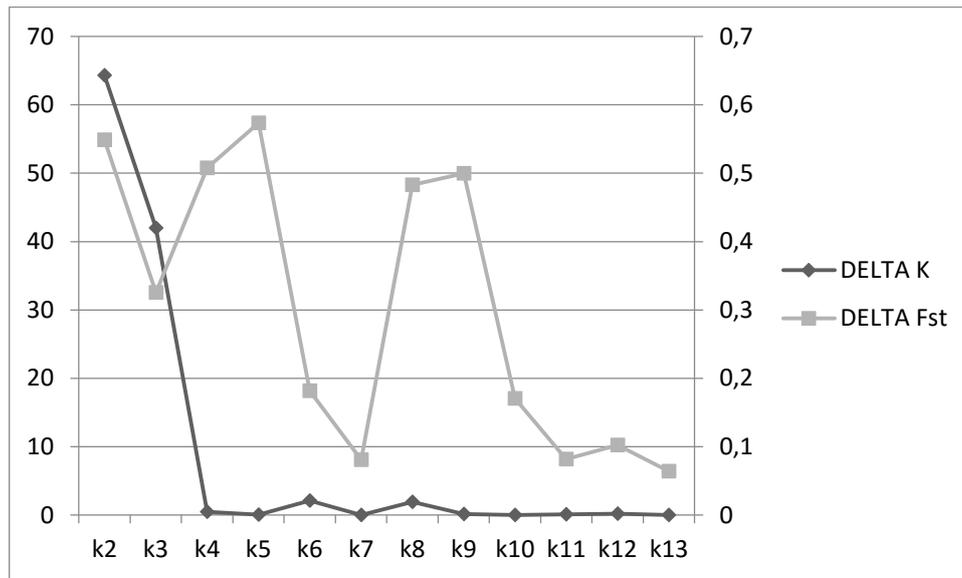


Figura 29. Grafico dei valori di ΔK (in grigio scuro) e ΔFST (in grigio chiaro) calcolati per i diversi K (K da 2 a 13).

Osservando il grafico in Figura 30 ($K=2$) si evince che le popolazioni della Sardegna presentano un'alta probabilità di appartenere allo stesso cluster (cluster 1 indicato in arancio) mentre le restanti popolazioni sembrano separate dalle sarde e appartenenti al secondo cluster (indicato in celeste).

La suddivisione in 5 cluster (Figura 31) conferma ulteriormente l'alta probabilità di appartenenza ad un cluster distinto per le quattro popolazioni sarde (colore giallo), inoltre risulta strutturazione anche osservando le popolazioni di Cipro (maggiore probabilità di appartenere al cluster "rosa"), Marocco (alta probabilità di appartenenza al cluster verde). Le popolazioni meno ristrutturate sembrano essere Sicilia (SIC), Ionio (ION), Adriatico (ADR), tuttavia dato il basso numero di individui che le compongono, si deve considerare il risultato con cautela.

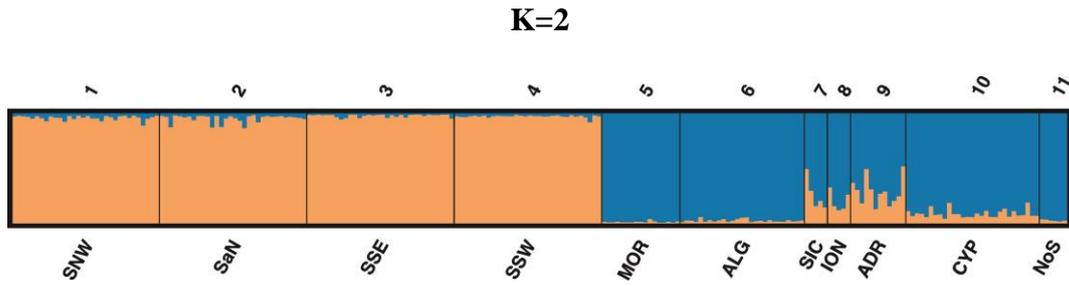


Figura 30. Ripartizione delle probabilità (Q) che ogni individuo delle undici popolazioni geografiche ha di appartenere ad uno dei due clusters individuati da STRUCTURE per $K = 2$. Istogramma ordinato per popolazioni geografiche.

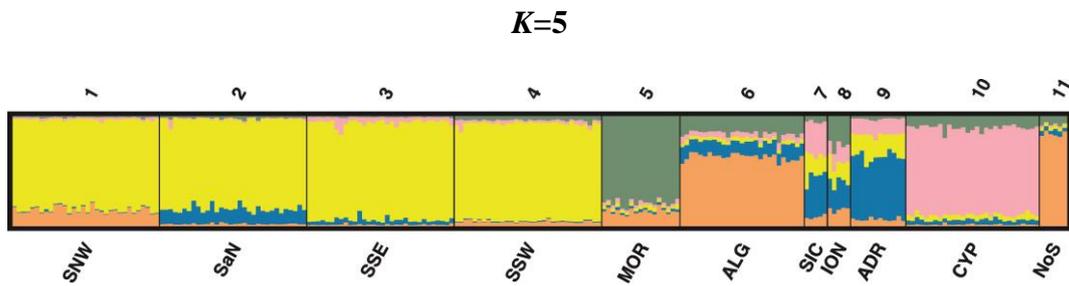


Figura 31. Ripartizione delle probabilità (Q) che ogni individuo delle undici popolazioni geografiche ha di appartenere ad uno dei due clusters individuati da STRUCTURE per $K = 5$. Istogramma ordinato per popolazioni geografiche.

6.3.11 Isolamento per distanza IBDW

L'isolamento per distanza è stato verificato tramite il Mantel test, testando la correlazione tra distanza genetica e geografica tra le 10 popolazioni (viene escluso ADR dalle analisi) e all'interno del Mediterraneo. Il primo test ha mostrato una correlazione positiva statisticamente significativa tra la distanza genetica e quella geografica ($r = 0.673$ $P = 0.008$) (Figura 32A).

All'interno del Mediterraneo tuttavia non è stata trovata alcuna associazione significativa tra distanza geografica e genetica ($r = 0.275$, $P = 0.166$) (Figura 32B).

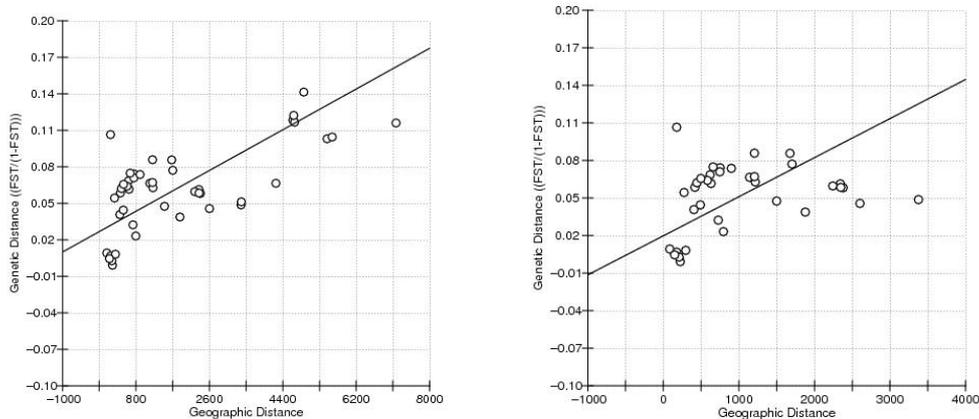


Figura 32. Grafico del Mantel Test per la valutazione della correlazione tra distanze genetiche $[FST/(1-FST)]$ e distanze geografiche espresse in km. A) Mantel test condotto con i campioni del Mediterraneo e dell'Atlantico (10 popolazioni); B) Mantel test condotto con i campioni all'interno del Mediterraneo (9 popolazioni)

6.3.12 Analisi demografica: bottleneck e espansione

Utilizzando l'intero dataset, si è potuta testare la possibilità che le popolazioni in esame abbiano subito oscillazioni demografiche recenti, ad esempio riducendo le proprie dimensioni effettive (N_e), come accade in un 'collo di bottiglia' o 'bottleneck', ipotizzando in quella condizione un eccesso di eterozigoti. Il programma ha calcolato l'eterozigosità osservata per popolazione e per locus, confrontandola con quella attesa in condizioni di equilibrio, con la condizione che i loci seguano il modello TPM (Two Phase model). Si osserva nella maggior parte dei campioni una eterozigosità osservata H_e maggiore dell'attesa H_{eq} . Il test statistico di Wilcoxon evidenzia un eccesso statisticamente significativo per la popolazione del Mare del Nord (NoS). Si ipotizza per quest'ultima un evento di collo di bottiglia (Tabella 48).

Tabella 48. Test del bottleneck sotto TPM. Sono riportate la diversità genica (H_e), la diversità genica attesa all'equilibrio (H_{eq}) e la probabilità di eccesso di eterozigoti secondo il Wilcoxon test.

TPM	SNW	SaN	SSE	SSW	MOR	ALG	SIC	ION	ADR	CYP	NoS
<i>mean H_e</i>	0,650	0,655	0,642	0,661	0,728	0,681	0,689	0,604	0,590	0,660	0,691
<i>mean H_{eq}</i>	0,257	0,640	0,620	0,631	0,690	0,661	0,647	0,661	0,647	0,652	0,647
<i>P excess H</i>	0,055	0,235	0,065	0,055	0,088	0,212	0,117	0,768	0,382	0,259	0,032

L'espansione delle popolazioni è stata testata attraverso il k test (Tabella 49). La macro di Excel restituisce i valori dei k per ciascun locus, dove valori negativi indicano un'espansione della popolazione. Come si può osservare in nessuna popolazione si registrano valori di k negativi per tutti i dodici loci, e la probabilità del test non risulta per nessuna popolazione statisticamente significativa. La significativa statistica del secondo test, il g test, è stata valutata consultando la tabella e non risulta mai significativa. L'ipotesi nulla secondo la quale la dimensione della popolazione è costante non può essere rifiutata, per cui le popolazioni si presentano stabili nel tempo.

Tabella 49. K -test per popolazione. In tabella sono riportati il numero di loci con k negativo (su 12 loci analizzati, ad eccezione di ADR per cui l'analisi è stata condotta escludendo Scan07), il valore di probabilità per il k test e valore del g test. La significatività statistica del g test è stata valutando consultando la tabella di Reich.

	SNW	SaN	SSE	SSW	MOR	ALG	SIC	ION	ADR	CYP	NoS
<i>loci con -k</i>	6	7	5	7	5	8	4	6	4	8	6
<i>k-test (p-value)</i>	0,572	0,347	0,776	0,347	0,776	0,166	0,911	0,572	0,866	0,166	0,572
<i>g-test (value)</i>	2,682	0,815	8,249	4,388	1,368	2,252	1,606	0,526	1,194	3,213	2,835

6.3.13 Dispersione differenziale legata al sesso

La dispersione differenziale legata al sesso (*Sex-biased dispersal*) è stata testata attraverso il calcolo dell'indice di assegnazione A_{ic} . I grafici in Figura 33 e Figura 34 mostrano i valori medi di A_{ic} rispetto al sesso per le popolazioni sarde e per tutte le popolazioni. I valori medi di A_{ic} risultano positivi per i maschi, e negativi per le femmine facendo ipotizzare che i primi sarebbero più stanziali mentre le femmine presenterebbero una maggiore capacità di dispersione. Tuttavia il test Wilcoxon implementato con Genalex ha restituito valori non statisticamente significativi: $Z=0,964$ ns (SARDE); $Z=-0,529$ ns (TUTTE)

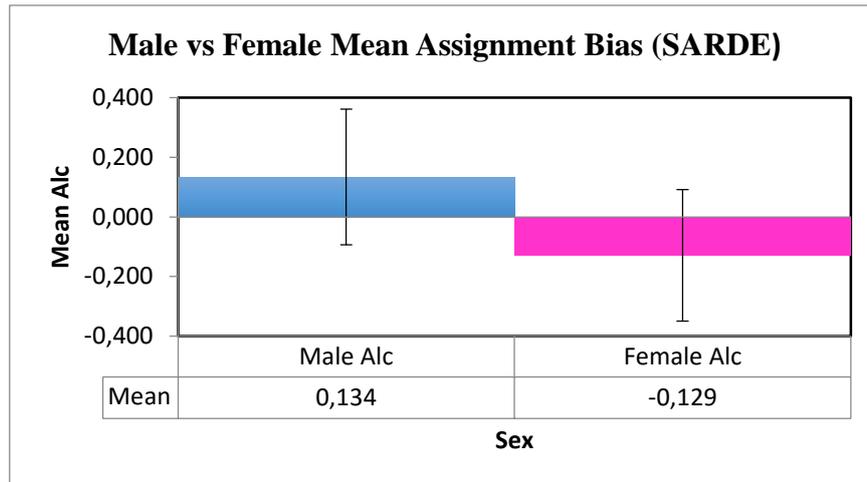


Figura 33. Valori medi di *Alc* per maschi e femmine calcolati con GenAlEx per le popolazioni sarde

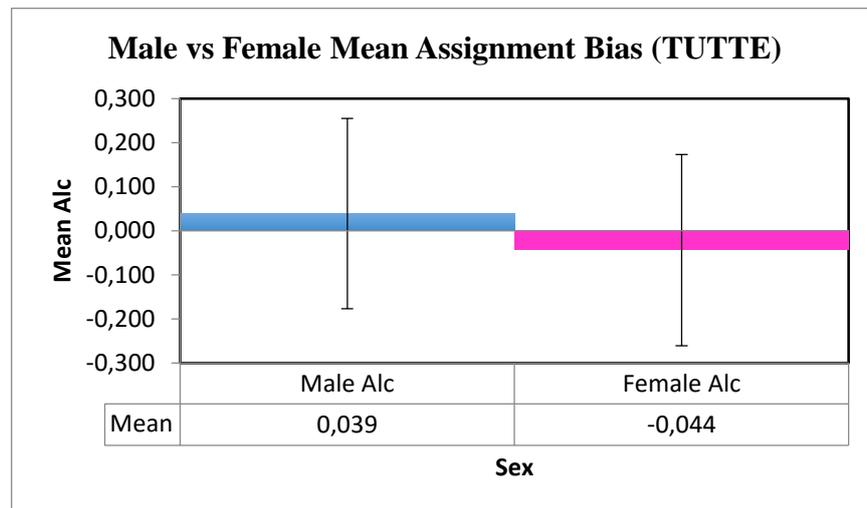


Figura 34. Valori medi di *Alc* per maschi e femmine calcolati con GenAlEx per tutte le popolazioni.

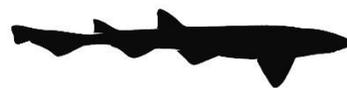
In Tabella 50 sono mostrati gli indici genetici F_{IS} , F_{ST} , media e varianza degli Indici di Assegnazione corretti (rispettivamente $mAlc$ e $vAlc$) e infine l'indice di parentela (relatedness) fra gli individui dello stesso sesso.

L'analisi dei dati microsatelliti ha mostrato l'assenza di differenze significative tra maschi e femmine relativamente ai valori di F_{IS} , F_{ST} , relatedness, $mAlc$ e $vAlc$, portando a rigettare l'ipotesi di dispersione distorta in base al sesso sia nel campione sardo che nel campione totale.

Tabella 50 Principali indici di differenziamento tra individui, separati in due gruppi in base al sesso, nel campione sardo e nel campione totale. Tra parentesi il numero di individui.

Sesso	F_{IS}	F_{ST}	relatedness	vA_{Ic}
Popolazioni sarde				
M (63)	0,032	0,009	0,019	13,046
F (65)	0,083	-0,002	-0,004	12,113
P-value	0,940	0,920	0,920	0,400
Tutte le popolazioni				
M (100)	0,046	0,041	0,075	12,291
F (91)	0,069	0,026	0,048	12,402
P-value	0,840	0,820	0,860	0,400

7. DISCUSSIONE – *Scyliorhinus canicula*



Le analisi di genetica di popolazione condotte in questo studio per la specie *S. canicula* hanno permesso di indagare la variabilità genetica e la connettività della specie, in undici popolazioni. Sono state prese in considerazione quattro aree intorno alla Sardegna, la zona nord occidentale (SNW), settentrionale (SaN), sud orientale (SSE) e sud occidentale (SSW); altre due zone del Mediterraneo occidentale, Marocco (MOR) e Algeria (ALG); nel Mediterraneo centrale sono state campionate l'area della Sicilia (SIC), dello Ionio (ION) e dell'Adriatico (ADR) e infine nella parte orientale del bacino, la popolazione di Cipro (CYP). Inoltre è stata individuata un'ulteriore popolazione nell'Atlantico settentrionale. I dodici loci microsatelliti utilizzati, precedentemente isolati e caratterizzati da (Griffiths *et al.* 2011) sulla stessa specie, per le loro caratteristiche di ipervariabilità ed elevato grado di polimorfismo, si sono rivelati un potente strumento per indagare la struttura di popolazione del gattuccio comune, come già confermato da studi precedenti gli studi (Gubili *et al.* 2014; Kousteni 2014). Tutti i loci per i campioni oggetto di analisi hanno rivelato un polimorfismo del 100%, con un numero massimo di alleli per i loci Scan07 e Scan17 ($N_a=14$), mostrando una variabilità allelica addirittura maggiore rispetto a quella individuata da (Griffiths *et al.* 2011) nello studio dell'isolamento e caratterizzazione degli stessi. Inoltre sono risultati indipendenti nel test del Linkage Disequilibrium e presentano una frequenza di alleli nulli bassa (\hat{f} massimo osservato per il locus Scan07 = 0.126).

Le popolazioni mostrano un grado di diversità genetica (intesa come eterozigosità attesa corretta), più alto rispetto a quello riscontrato per *S. canicula* nei precedenti studi (Gubili *et al.* 2014; Kousteni 2014) con un valore medio di uHe di 0.66 e valori massimi registrati per il campione del Marocco (MOR $uHe = 0.73$), il quale mostra anche la più alta ricchezza allelica (MOR, $Ar = 6.14$). Le popolazioni non presentano complessivamente un discostamento dall'equilibrio di Hardy Weinberg, come deficit di eterozigoti, che si presenta solo per alcuni loci in poche popolazioni. L'analisi per valutare il grado di inbreeding delle popolazioni, mediante l'indice di F_{is} , ha evidenziato come i campioni abbiano un accoppiamento casuale, osservato tramite valori di F_{is} molto bassi e non statisticamente significativi.

L'analisi del differenziamento calcolato a coppie di popolazioni attraverso gli indici di F_{st} e $Dest$ mostrano un differenziamento moderato con valori statisticamente significativi per quasi tutte le popolazioni. In particolare, gli indici F_{st} indicano la maggiore differenziazione nella popolazione del Mare del Nord a confronto con i campioni mediterranei con valori che variano da 0.052 per NoS e MOR a 0.117 tra il Mare del Nord e la Sardegna sud orientale (SSE). Si

ricontrano alti valori statisticamente anche per i campioni del Mediterraneo centrale SIC e ION, mentre i valori più bassi si ritrovano per le popolazioni sarde a confronto fra loro, addirittura con assenza di differenziazione tra la coppia Sardegna sud occidentale (SSW) e nord occidentale (SNW). I valori di *Dest* confermano la buona eterogeneità genetica tra le popolazioni, trovando la più alta differenziazione tra Atlantico e Mediterraneo e la minore per le popolazioni sarde.

Il risultato del Mantel test suggerisce l'esistenza di un modello di IBD Isolamento per distanza nell'analisi che include tutti i campioni, mentre non viene espressa una correlazione significativa considerando solo i campioni all'interno al bacino del Mediterraneo, confermando il risultato di Gubili *et al* (2014) che ha descritto un IBD per il complesso dei campioni e in Atlantico ma non in Mediterraneo.

L'analisi della varianza molecolare AMOVA ha messo in evidenza una significativa differenziazione tra il Mediterraneo e l'Atlantico con una variazione tra gruppi del 6.84% ($F_{ct}=0.068$ $P = 0.000$).

I risultati di differenziazione derivanti da questo studio concordano con lo studio di (Gubili *et al.* 2014). Le analisi sui marcatori nucleari e mitocondriali hanno evidenziato valori di F_{ST} e ϕ_{st} a coppie significativi tra l'area atlantica e mediterranea, l'AMOVA registra valori di differenziazione (F_{ct}) tra gruppi di 0.02, che aumenta a 0.12 nelle analisi con il marcatore mitocondriale (Gubili *et al.* 2014). Differenziamento simile tra Mediterraneo e Atlantico viene ritrovato da Kousteni (2014) sia coi marcatori nucleari che mitocondriali e da Barbieri *et al.* (2014) con il marcatore COI; tuttavia quest'ultimo propone risultati costranti rispetto agli altri studi non rilevando strutturazione all'interno del Mediterraneo nel confronto tra bacino occidentale e orientale.

Le popolazioni mediterranee mostrano differenze così marcate rispetto a quelle atlantiche in alcune caratteristiche del ciclo vitale che storicamente sono state proposte come appartenere a una diversa sottospecie (Giltay 1928; Compagno 1984)

All'interno del Mediterraneo, secondo l'AMOVA, i campioni sono differenziati (global $F_{st}=0.042$ $P = 0.000$), e si possono identificare tre cluster (occidentale, centrale, orientale) con indice $F_{ct} = 0.016$, basso ma significativo. I risultati di STRUCTURE hanno mostrato la massima probabilità con $K = 2$ in base ai valori di delta K dove si osserva un'alta probabilità delle popolazioni sarde di appartenere ad un cluster differente dalle altre popolazioni. Tuttavia

se si considerano i valori di delta Fst, la migliore stima per il numero di cluster genetici risulta con K=5, differenziando Sardegna, Marocco, Ionio + Sicilia + Adriatico, Cipro, Atlantico + Algeria.

Analogamente, dati mitocondriali e nucleari permetterebbero distinguere di almeno 4 stocks mediterranei: Baleari, Algeria, Ionio ed Egeo, che potrebbero essere considerati unita gestionali separate (Kousteni 2014). Nello studio di Gubili *et al* (2014) identificano clusters differenziati entro il Mediterraneo (Creta, Adriatico, Sardegna, e Mallorca), anche su piccola scala, come tra Baleari e Sardegna separate da meno di 500 km, mentre non identificano nessuna differenziazione significativa tra i campioni atlantici. Probabilmente le grandi dimensioni effettive di popolazione e l'alto flusso genico entro l'Atlantico minimizzano gli effetti della deriva genetica e portano a bassi livelli di struttura di popolazione che sono difficili da identificare (Gubili *et al* 2014).

La condizione di eterogeneità genetica significativa riscontrata tra le diverse aree in questo studio, che permette di rigettare l'ipotesi nulla di panmissia a livello globale tra le popolazioni, viene riscontrata comunemente tra squali costieri e demersali (Stow *et al.* 2006; Ovenden *et al.* 2009) e indica che il limitato potenziale di dispersione potrebbe giocare un ruolo importante nella limitazione al flusso genico. La strutturazione genetica rivelata per il gattuccio comune può essere attribuita al suo alto grado di fedeltà al sito (Rodriguez-Cabello *et al.* 2004), alla preferenza per gli habitat costieri e bentonici e all'assenza di stadi di sviluppo pelagici (Compagno 1984). Considerate queste caratteristiche si può presumere che i bacini profondi rappresentino una naturale barriera alla sua dispersione. La presenza di piattaforme di bassa-moderata profondità rappresenterebbe, invece un habitat relativamente continuo per la specie, garantendo movimenti e connessione tra popolazioni. Al contrario la differenziazione significativa tra popolazioni sarebbe dovuta a discontinuità d'habitat; ad esempio la significativa differenziazione tra campione delle Baleari e dell'Algeria, separati da meno di 300 km, tra Baleari e Sardegna potrebbe essere dovuta alla presenza della Piano Abissale delle Baleari (Kousteni 2014).

Se i bacini profondi rappresentano un forte ostacolo naturale nella connettività della specie, la loro posizione dovrebbe essere presa in considerazione nei futuri piani di gestione e conservazione, dato che popolazioni semi isolate, possono essere particolarmente vulnerabili al sovrasfruttamento e avere maggiori difficoltà di ripresa dopo un collasso (Kousteni 2014).

La struttura di popolazione descritta per *S. canicula* in questo studio non sarebbe influenzata da dispersione distorta tra i due sessi, sia nel campione totale che specificamente in Sardegna. Lo stesso risultato è stato ottenuto per l'altra specie oggetto di studio *R. clavata*. Questo risultato è in netto contrasto con quanto proposto da Gubili *et al* (2014) per il campione totale (su larga scala), in cui le femmine sono descritte fortemente filopatriche mentre i maschi si disperderebbero maggiormente, anche se non tutti i tests erano in realtà supportati da significatività statistica. Nello specifico lo studio di Gubili *et al* (2014) non ha mai testato la possibilità di sex-biased dispersal su scala locale (Sardegna) per mancanza di dati sul sesso degli individui genotipizzati.

Infine, il test di bottleneck ha evidenziato l'assenza di segni di recenti colli di bottiglia, ad eccezione della popolazione atlantica. I dati del test dell'espansione confermerebbero questo dato indicando stabilità demografica per tutte le popolazioni. La condizione di stabilità demografica è confermata per il campione sardo, caratterizzato da distribuzioni bimodale di mismatch distribution, anche da Gubili *et al.* (2014). Tuttavia le analisi BSP indicherebbero per la Sardegna un leggero declino di N_e (Gubili *et al* 2014). L'esiguità del campione analizzato con i marcatori mitocondriali e l'incertezza del tasso di mutazione mitocondriale utilizzato per il calcolo portano a valutare con molta cautela queste indicazioni.

I risultati del presente studio, con la presenza di differenziazione genetica tra popolazioni, confermano quanto già ipotizzato per la specie. Sulla base di studi sull'analisi della variazione spaziale in marcatori naturali, inclusi parassiti e concentrazioni di mercurio, e su studi di marcatura e ricattura è stata già suggerita l'esistenza di popolazioni differenziate localmente. Inoltre, sono descritte anche delle variazioni latitudinali dal Mediterraneo all'Atlantico in alcuni tratti del ciclo biologico, in particolare la dimensione corporea e la taglia di maturità, suggerendo la presenza di stock distinti in queste aree (Kousteni 2014 e referenze all'interno).

I marcatori microsatelliti, grazie ai vantaggi discussi nel secondo capitolo, si sono rivelati uno strumento potente per l'indagine sulla struttura di popolazione delle aree campionate. Questi marcatori nucleari hanno permesso di riscontrare differenziazione significativa non solo in ampia scala a livello del bacino del Mediterraneo, ma cogliendo differenze genetiche anche su piccola scala nel campionamento delle popolazioni di *S. canicula* intorno ai mari della Sardegna.

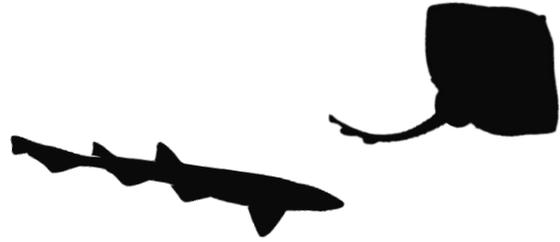
Rispetto agli obiettivi posti nel primo capitolo, si possono trarre le seguenti conclusioni:

I dati contenuti nella presente tesi hanno permesso di fare luce sui livelli di variabilità genetica delle popolazioni di *S. canicula* lungo le coste della Sardegna. Esse presentano complessivamente una buona variabilità genetica e alcune esprimono debole ma significativa differenziazione. Inoltre, presentano una forte differenziazione se confrontate con le altre popolazioni del Mediterraneo e del Mare del Nord.

Si registra una buona variabilità per tutte le popolazioni all'interno del Mediterraneo, inoltre una differenziazione significativa tra di esse, soprattutto nel confronto con l'Atlantico, con evidente correlazione positiva tra distanze genetiche e geografiche.

La misura della variabilità genetica, ha consentito inoltre di indagare la storia demografica delle popolazioni oggetto di studio, registrando per tutte una complessiva stabilità demografica; solo nel Mare del Nord si osserva un probabile evento di bottleneck.

Ulteriori studi, attraverso l'ampliamento del disegno di campionamento e l'utilizzo di marcatori molecolari mitocondriali potrà essere utile per approfondire l'indagine sulla strutturazione genetica di *S. canicula* e indagare la storia demografica nel passato. Sarebbe inoltre necessario, confrontare i dati genetici ottenuti con gli studi sulla biologia della pesca demersale, attraverso un progetto multidisciplinare, al fine di valutare complessivamente lo stato della risorsa nelle acque sarde e se necessario fornire un piano di gestione della pesca.



8. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha confermato l'efficacia dei marcatori nucleari nel comprendere la struttura e la connettività delle popolazioni ai fini gestionali. I risultati qui ottenuti, se confrontati con i dati della biologia della pesca demersale, possono fornire importanti dati al fine di pianificare misure di gestione per le due specie *Raja clavata* e *Scyliorhinus canicula* sia a livello locale per le popolazioni intorno ai mari della Sardegna, sia in scala spaziale più ampia nel bacino del Mediterraneo, garantendo la sostenibilità delle risorse.

La crescita della pesca su scala globale ha determinato un aumento del grado di minaccia di molte specie, tra cui i Condroititi che risentono fortemente dell'impatto della pressione antropica, a causa delle loro caratteristiche biologiche come crescita lenta, tarda maturità sessuale e bassa fecondità (Worm *et al.* 2013) hanno una limitata capacità di ripresa dopo il declino (Cailliet *et al.* 2005). Le due specie costituiscono parte del by catch delle specie demersali e solo in alcune zone rappresentano una pesca mirata e sono apprezzati come cibo. Per entrambe le specie è stato registrato un overfishing in alcune aree del Mediterraneo e dell'Atlantico nord orientale, mentre in altre zone i trend risultano stabili o in aumento (Gibson *et al.* 2006; Cavanagh e Gibson 2007; Bradai 2012; Follesa *et al.* 2013; Barausse *et al.* 2014).

Per la *Raja clavata*, come specie vicino alla minaccia e in declino in abbondanza, in conseguenza dell'overfishing osservato nell'Atlantico settentrionale, si sono recentemente istituite in Atlantico normative per protezione della specie attraverso la regolamentazione delle catture TACs (*total allowed catches*) e la proibizione della pesca in alcune zone (ICES 2015). Al contrario, in Mediterraneo non esistono normative in merito, perciò lo studio della specie della razza chiodata attraverso un approccio multidisciplinare può fornire un valido contributo per generare piani gestionali. L'approccio genetico alla pesca differisce da quello classico in quanto permette di valutare lo status della risorsa nel lungo periodo. A questo proposito, l'identificazione dei cambiamenti genetici all'interno di una popolazione e degli stock dal punto di vista genetico ("genetic stock"), che possono più o meno coincidere con gli stock da pesca ("fishery stock"), può essere utile per attuare strategie gestionali che garantiscono non solo un beneficio economico ma anche un sostegno continuo alle popolazioni naturali. E' vero, infatti, che popolazioni sufficientemente differenziate dal punto di vista genetico dovrebbero essere intese come unità di gestione separate.

E' stato utile fornire dati genetici per le due specie al fine di valutarne la diversità genetica e la connettività. Infatti per la specie *R. clavata* gli studio di genetica di popolazione risultavano limitati all'Atlantico, con uno studio ristretto a tre aree nel Mediterraneo e nel mar Nero. La

specie risulta inclusa nella lista rossa della IUCN come quasi minacciata (Near Threatened), per cui, risultava fondamentale l'approfondimento sullo status genetico della specie. Per *S. canicula* questo lavoro ha potuto fornire ulteriori dati genetici da confrontare con i lavori scientifici di genetica di popolazione per la specie prodotti negli ultimi anni, e inoltre fornire dettagli su un vasto campionamento intorno ai mari della Sardegna.

Ci si auspica che ulteriori studi futuri possano indagare più approfonditamente gli aspetti legati alla valutazione temporale dello stato delle due risorse, considerando il grado di minaccia che affligge i Cnidari soprattutto in un hotspot di biodiversità marina come il Mediterraneo, avvalendosi anche di marcatori mitocondriali in grado di cogliere più finemente aspetti della demografia storica delle popolazioni.

BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Muneer, P. M. M. (2014). Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management : Recent Advances in Population Structure Analysis. *Genetics* 2014, 11.
- Abella, A. J., and Serena, F. (2005). Comparison of Elasmobranch Catches from Research Trawl Surveys and Commercial Landings at Port of Viareggio, Italy, in the Last Decade. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 35, 345–356. doi:10.2960/J.v35.m526
- Allendorf, F. W., Ryman, N., and Utter, F. (1987). Genetics and fishery management: past, present, and future. *Population genetics and fishery management*, 1–19.
- Bachtrog, D., Weiss, S., Zangerl, B., Brem, G., and Schlötterer, C. (1999). Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Molecular Biology and Evolution* 16, 602–610.
- Barausse, A., Correale, V., Curkovic, A., and Licia Finotto, Emilio Riginella, Eleonora Visentin, and C. M. (2014). Marine Science. *ICES Journal of Marine Science (2014)* 71, 236–240.
- Barbieri, M., Maltagliati, F., Roldán, M. I., and Castelli, A. (2014). Molecular contribution to stock identification in the small-spotted catshark, *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes, Scyliorhinidae). *Fisheries Research* 154, 11–16. doi:10.1016/j.fishres.2014.01.021
- Beck, N. R., Double, M. C., and Cockburn, A. (2003). Microsatellite evolution at two hypervariable loci revealed by extensive avian pedigrees. *Molecular Biology and Evolution* 20, 54–61.
- Beckmann, J. S., and Weber, J. L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12, 627–631.
- Benjamini, Y., and Yekutieli, D. (2005). Quantitative trait Loci analysis using the false discovery rate. *Genetics* 171, 783–790. doi:10.1534/genetics.104.036699
- Bertrand, J., Gil de Sola, L., Papaconstantinou, C., Relini, G., and Souplet, A. (2000). Contribution on the distribution of elasmobranchs in the Mediterranean (from the MEDITS surveys). *Biologia Marina Mediterranea* 7, 385–399.
- Bianchi, C. N. (2004). Proposta di suddivisione dei mari italiani in settori biogeografici. *Notiziario SIBM* 46, 57–59.
- Bilgin, R. (2007). Kgtests: a simple Excel Macro program to detect signatures of population expansion using microsatellites. *Molecular Ecology Notes* 7, 416–417. doi:10.1111/j.1471-8286.2006.01671.x
- Bird, C. E., Karl, S. a, Smouse, P. E., and Toonen, R. J. (2011). Detecting and measuring genetic differentiation. *Crustacean Issues: Phylogeography and Population Genetics in Crustacea*, 31–73. doi:doi:10.1201/b11113-4\n10.1201/b11113-4
- Bonfil, R. (2000). The problem of incidental catches of sharks and rays, its likely consequences and some possible solutions. In ‘Sharks 2000 Conference, Hawaii’. pp. 24
- Bowen, W. D. (1997). Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series* 158, 74.
- Bradai M.N., S. B. and E. S. (2012). ‘Elasmobranchs of the Mediterranean and Black sea: status, ecology and biology. Bibliographic analysis’.
- Caillet, G., Musick, M. J. A., Simpfendorfer, C. A., and Stevens, J. D. (2005). Ecology and Life History Characteristics of Chondrichthyan Fish. In ‘Sharks, Rays and Chimaeras: The Status of the

- Chondrichthyan Fishes. Status Survey. IUCN/ SSC Shark Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK'. pp. 12–18
- Cailliet, G. M., Musick, J. A., Simpfendorfer, C. A., and Stevens, J. D. (2005). Ecology and life history characteristics of chondrichthyan fish. *Sharks, rays and chimaeras: the status of the chondrichthyan fishes*. IUCN SSC Shark Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Camhi, M. (1998). 'Sharks and their relatives: ecology and conservation'. (IUCN.)
- Campana, M. G., Hunt, H. V, Jones, H., and White, J. (2011). CorrSieve: software for summarizing and evaluating Structure output. *Molecular ecology resources* 11, 349–352. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02917.x
- Cannas, R., Follesa, M. C., Cabiddu, S., Porcu, C., Salvadori, S., Iglésias, S. P., Deiana, A. M., and Cau, A. (2010). Molecular and morphological evidence of the occurrence of the Norwegian skate *Dipturus nidarosiensis* (Storm, 1881) in the Mediterranean Sea. *Marine Biology Research* 6, 341–350.
- Capapé, C., Mnasri-Sioudi, N., El Kamel-Moutalibi, O., Boumaïza, M., Amor, M. M. Ben, and Reynaud, C. (2014). Production, maturity, reproductive cycle and fecundity of small-spotted catshark, *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) from the northern coast of Tunisia (Central Mediterranean). *Journal of Ichthyology* 54, 111–126. doi:10.1134/S0032945214010020
- Capapé, C., Reynaud, C., Vergne, Y., and Quignard, J. P. (2008). Biological observations on the smallspotted catshark *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) off the Languedocian coast (southern France, northern Mediterranean). *Pan Am J Aquat Sci* 3, 282–289.
- Caramelli, D. (2009). Il DNA antico. *Antropologia molecolare*, 1000–1028.
- Carvajal-Rodriguez, A., and de Uña-Alvarez, J. (2011). Assessing significance in High-Throughput experiments by sequential goodness of fit and Q-Value estimation. *PLoS ONE* 6. doi:10.1371/journal.pone.0024700
- Carvalho, G. R., and Hauser, L. (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4, 326–350. doi:10.1007/BF00042908
- Cavanagh, R. D., and Gibson, C. (2007). 'Overview of the conservation status of cartilaginous fishes (Chondrichthyans) in the Mediterranean Sea'. (Iucn.) doi:10.2305/IUCN.CH.2007.MRA.3.en
- Celona, A. (2000). 'First record of a Tiger shark *Galeocerdo cuvier* (Peron & le Seur, 1822) in the Italian waters'.
- Chapman, D. D., Corcoran, M. J., Harvey, G. M., Malan, S., and Shivji, M. S. (2003). Mating behavior of southern stingrays, *Dasyatis americana* (Dasyatidae). *Environmental Biology of Fishes* 68, 241–245.
- Chapuis, M.-P., and Estoup, A. (2006). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621–631. doi:10.1093/molbev/msl191
- Chevolot, M., Ellis, J. R., Hoarau, G., Rijnsdorp, A. D., Stam, W. T., and Olsen, J. L. (2006). Population structure of the thornback ray (*Raja clavata* L.) in British waters. *Journal of Sea Research* 56, 305–316. doi:10.1016/j.seares.2006.05.005
- Chevolot, M., Ellis, J. R., Rijnsdorp, a D., Stam, W. T., and Olsen, J. L. (2008). Temporal changes in allele frequencies but stable genetic diversity over the past 40 years in the Irish Sea population of thornback ray, *Raja clavata*. *Heredity* 101, 120–6. doi:10.1038/hdy.2008.36
- Chevolot, M., Ellis, J. R., Rijnsdorp, A. D., Stam, W. T., and Olsen, J. L. (2007). Multiple paternity

- analysis in the thornback ray *Raja clavata* L. *The Journal of heredity* 98, 712–5. doi:10.1093/jhered/esm077
- Chevolot, M., Hoarau, G., Rijnsdorp, A. D., Stam, W. T., and Olsen, J. L. (2006). Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). *Molecular ecology* 15, 3693–705. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03043.x
- Chevolot, M., Reusch, T. B. H., Boele-Bos, S., Stam, W. T., and Olsen, J. L. (2005). Characterization and isolation of DNA microsatellite primers in *Raja clavata* L. (thornback ray, Rajidae). *Molecular Ecology Notes* 5, 427–429. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.00951.x
- Çiftci, Y., and Okumuş, İ. (2002). Fish population genetics and applications of molecular markers to fisheries and aquaculture: I-basic principles of fish population genetics. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2, 145–155. Available at: http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Fish+Population+Genetics+and+Applications+of+Molecular+Markers+to+Fisheries+and+Aquaculture+:+I-Basic+Principles+of+Fish+Population+Genetics#1nhttp://www.trjfas.org/pdf/issue_2_2/145_155.pdf
- Coelho, H., Rodrigues, S., Ferreira, R., De Silva, R., Pendlebury, C., Walls, R., Mascarenhas, M., and Costa, H. (2012). First specific biodiversity assessment in the Portuguese Pilot Zone for marine renewables.
- Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Ben Rais Lasram, F., Aguzzi, J., Ballesteros, E., Bianchi, C. N., Corbera, J., Dailianis, T., Danovaro, R., Estrada, M., Frogliani, C., Galil, B. S., Gasol, J. M., Gertwagen, R., Gil, J., Guilhaumon, F., Kesner-Reyes, K., Kitsos, M.-S., Koukouras, A., Lampadariou, N., Laxamana, E., López-Fé de la Cuadra, C. M., Lotze, H. K., Martin, D., Mouillot, D., Oro, D., Raicevich, S., Rius-Barile, J., Saiz-Salinas, J. I., San Vicente, C., Somot, S., Templado, J., Turon, X., Vafidis, D., Villanueva, R., and Voultsiadou, E. (2010). The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns, and threats. *PloS one* 5, e11842. doi:10.1371/journal.pone.0011842
- Compagno, L. (1984). FAO species catalogue. Vol. 4. Sharks of the World. An annotated and illustrated catalogue of sharks species known to date. Part. 2. *Carcharhiniformes*. *FAO Fish. Synop.(125) Vol 4*.
- Compagno, L. J. V (2001). ‘Sharks of the world: an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date’. (Food & Agriculture Org.)
- Compagno, L. J. V. (1999). Checklist of living elasmobranchs. In ‘Sharks, skates and rays: the biology of elasmobranchs fishes’. (Ed W.C. Hamlett.) pp. 471–498. (John Hopkins University Press: Mariland.)
- Compagno, L. J. V., Didier, D. A., and Burgess, G. H. (2005). Classification of Chondrichthyan Fish. In ‘Sharks, rays and chimaeras: the status of the chondrichthyan fishes Status Survey. IUCN/ SSC Shark Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK’. pp. 4–11
- Cunha, P., Calvário, J., Marques, J. C., and Ré, P. (1986). Estudo comparativo dos regimes alimentares de *Raja brachyura*, 137–154.
- Dempster, A. P., Laird, N. M., and Rubin, D. B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society Series B Methodological* 39, 1–38. doi:10.2307/2984875
- Dent, F., and Clarke, S. (2015). State of the global market for shark products. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 590. , 187. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i4795e.pdf>
- DeWoody, J. A., and Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56, 461–473.

- Didier, D. A. (2004). Phylogeny and classification of Extant Holocephali. *Biology of sharks and their relatives*.
- Dulvy, N. K., Fowler, S. L., Musick, J. a, Cavanagh, R. D., Kyne, P. M., Harrison, L. R., Carlson, J. K., Davidson, L. N., Fordham, S. V, Francis, M. P., Pollock, C. M., Simpfendorfer, C. a, Burgess, G. H., Carpenter, K. E., Compagno, L. J., Ebert, D. a, Gibson, C., Heupel, M. R., Livingstone, S. R., Sanciangco, J. C., Stevens, J. D., Valenti, S., and White, W. T. (2014). Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *eLife* 3, e00590. doi:10.7554/eLife.00590
- Dulvy, N. K., and Reynolds, J. D. (2002). Predicting Extinction Vulnerability in Skates. *Conservation Biology* 16, 440–450. doi:10.1046/j.1523-1739.2002.00416.x
- Ebert, D. a., and Compagno, L. J. V. (2007). Biodiversity and systematics of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environmental Biology of Fishes* 80, 111–124. doi:10.1007/s10641-007-9247-0
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics* 5, 435–445.
- Ellis, J. R., and Shackley, S. E. (1995). Observations on egg-laying in the thornback ray. *Journal of Fish Biology* 46, 903–904.
- Ellis, J. R., and Shackley, S. E. (1997). The reproductive biology of *Scyliorhinus canicula* in the Bristol Channel, UK. *Journal of Fish Biology* 51, 361–372.
- Estoup, A., Jarne, P., and Cornuet, J. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular ecology* 11, 1591–1604.
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611–2620. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15969739>
- Excoffier, L., and Lischer, H. (2011). Arlequin 3.5: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Excoffier, L., Smouse, P. E., and Quattro, J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131, 479–491. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1205020&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodöhl, P. A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P., and Hynes, R. A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology* 47, 103–126.
- Field, D., and Wills, C. (1996). Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 263, 209–215.
- Fischer, W. (1973). Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer noire (Zone de pêche 37): Volume II.
- Flammang, B. E., Ebert, D. A., and Cailliet, G. M. (2008). Reproductive biology of deep-sea catsharks (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) in the eastern North Pacific. *Environmental Biology of Fishes* 81, 35–49.
- Follesa, M. C., Addis, P., Murenu, M., Saba, R., and Sabatini, A. (2003). Annotated checklist of the skates (Chondrichthyes, Rajidae) in the Sardinian seas. *Biologia Marina Mediterranea* 10, 828–833.
- Follesa, M., Cau, A., Cannas, R., Mulas, A., Pesci, P., Porcu, C., and Sabatini, A. (2013). STATUS

AND TRENDS OF DEMERSAL ELASMOBRANCHES IN SARDINIAN SEAS (CENTRAL WESTERN MEDITERRANEAN).

- Fowler, S. L., Cavanagh, R. D., Camhi, M., Burgess, G. H., Cailliet, G. M., Fordham, S. V, Simpfendorfer, C. a, and Musick, J. a (2005). 'Sharks, rays and chimaeras: the status of the chondrichthyan fishes'. doi:10.2305/IUCN.CH.2005.SSC-AP.9.en
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological conservation* 126, 131–140.
- Galarza, J. A., Boulay, R., Cerdá, X., Doums, C., Federici, P., Magalon, H., Monnin, T., and Rico, C. (2009). Development of single sequence repeat markers for the ant *Aphaenogaster senilis* and cross-species amplification in *A. iberica*, *A. gibbosa*, *A. subterranea* and *Messor maroccanus*. *Conservation genetics* 10, 519–521.
- Gall, G. A. E. (1987). Inbreeding. *Population genetics and fishery management*, 47–87.
- Gauldie, R. W. (1988). Tagging and genetically isolated stocks of fish: a test of one stock hypothesis and the development of another. *Journal of applied ichthyology* 4, 168–173.
- Gibson, C., Valenti, S. V., Fowler, S. L., and Fordham, S. V. (2006). 'The Conservation Status of Northeast Atlantic Chondrichthyans'.
- Giltay, L. (1928). A propos de *Scyliorhinus duhamelii* (Garman, 1913) et de *Scyliorhinus canicula* (L., 1758). *Ann. Soc. R. Zool. Bel.* 59, 13–19.
- Golani, D., Orsi-Relini, L., Massutí, E., and Quignard, J. P. 2002. CIESM Atlas of Exotic species in the Mediterranean. Vol. 1. Fishes (Briand F., ed.).
- Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L., and Feldman, M. W. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139, 463–471.
- Goldstein, D. B. S. (1999). 'Microsatellitesevolution and applications'.
- Goudet, J. (2001). FSTAT, version 2.9.3, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. *Lausanne University, Lausanne, Switzerland*.
- Griffiths, A. M., Casane, D., McHugh, M., Wearmouth, V. J., Sims, D. W., and Genner, M. J. (2011). Characterisation of polymorphic microsatellite loci in the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* L.). *Conservation Genetics Resources* 3, 705–709. doi:10.1007/s12686-011-9438-z
- Griffiths, A. M., Jacoby, D. M. P., Casane, D., McHugh, M., Croft, D. P., Genner, M. J., and Sims, D. W. (2012). First analysis of multiple paternity in an oviparous shark, the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* L.). *The Journal of heredity* 103, 166–73. doi:10.1093/jhered/esr112
- Griffiths, A. M., Sims, D. W., Cotterell, S. P., El Nagar, A., Ellis, J. R., Lynghammar, A., McHugh, M., Neat, F. C., Pade, N. G., Queiroz, N., Serra-Pereira, B., Rapp, T., Wearmouth, V. J., and Genner, M. J. (2010). Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturus batis*). *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 277, 1497–1503. doi:10.1098/rspb.2009.2111
- Gubili, C., Sims, D. W., Veríssimo, A., Domenici, P., Ellis, J., Grigoriou, P., Johnson, A. F., Mchugh, M., Satta, A., Scarcella, G., Soldo, A., Genner, M. J., and Griffiths, A. M. (2014). A tale of two seas : contrasting patterns of population structure in the small-spotted catshark across Europe Subject Areas : Author for correspondence :
- Guo, S. W., and Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 361–372.
- Gyllensten, U. (1985). The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. *Journal of*

Fish Biology 26, 691–699.

- Hartle, D. L., and Clark, A. G. (1989). Principles of population genetics. Sinauer Ass. Inc., Sunderland, MA.
- Hauser, L., and Carvalho, G. R. (2008). Paradigm shifts in marine fisheries genetics: Ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries* 9, 333–362. doi:10.1111/j.1467-2979.2008.00299.x
- Hauser, L., and Seeb, J. E. (2008). Advances in molecular technology and their impact on fisheries genetics. *Fish and Fisheries* 9, 473–486.
- Hauser, L., and Ward, R. D. (1998). Population identification in pelagic fish: the limits of molecular markers. *NATO ASI Series a Life Sciences* 306, 191–224.
- Heessen, H. (2004). Development of Elasmobranchs Assessment, DELASS DG Fish study contract 99/055. *Final report*.
- Heincke, D. F. (1889). ‘Die Untersuchungen von Hensen über die Produktion des Meeres an belebter Substanz’.
- Heist, E. J. (2005). Population and Reproductive Genetics in Chondrichthyes. *Fisheries and Illinois Aquaculture Center*, 27–44.
- Hjort, J. (1914). Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in the light of biological research. In (ICES.)
- Holden, M. J. (1974). Problems in the rational exploitation of elasmobranch populations and some suggested solutions. *Sea Fisheries Research*. John Wiley & Sons, New York.[Links].
- Holden, M. J. (1975). The fecundity of *Raja clavata* in British waters. *Journal du Conseil* 36, 110–118.
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., and Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters* 11, 609–623.
- Hunter, E., Buckley, A. A., Stewart, C., and Metcalfe, J. D. (2005a). Migratory behaviour of the thornback ray, *Raja clavata*, in the southern North Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85, 1095–1105.
- Hunter, E., Buckley, A. A., Stewart, C., and Metcalfe, J. D. (2005b). Repeated seasonal migration by a thornback ray in the southern North Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85, 1199–1200.
- ICES (2015). Report of the Working Group on Elasmobranch Fishes (WGEF) 17–23 June 2015. *ICES CM 2015/ACOM*, 711.
- Ihssen, P. E., Booke, H. E., Casselman, J. M., McGlade, J. M., Payne, N. R., and Utter, F. M. (1981). Stock identification: materials and methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 1838–1855.
- Jakobsson, M., and Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801–1806. doi:10.1093/bioinformatics/btm233
- Jamieson, A. (1974). Genetic tags for marine fish stocks. *Sea fisheries research*, 91–99.
- Jarne, P., and Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 424–429. doi:10.1016/0169-5347(96)10049-5
- Jensen, J. L., Bohonak, A. J., and Kelley, S. T. (2005). Isolation by distance, web service. *BMC genetics* 6, 13.

- Johnson, M. S., and Black, R. (1984). Pattern beneath the chaos: the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. *Evolution*, 1371–1383.
- Koop, J. H. (2005). Reproduction of captive Raja spp. in the Dolfinarium Harderwijk. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85, 1201–1202.
- Kormanik, G. A. (1993). Ionic and osmotic environment of developing elasmobranch embryos. In ‘The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes’. pp. 233–240. (Springer.)
- Kousteni (2014). Strong population genetic structure and contrasting demographic histories for the small spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) in the Mediterranean Sea.
- Levinson, G., and Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution* 4, 203–221.
- Ligas, A., Osio, G. C., Sartor, P., Sbrana, M., and De Ranieri, S. (2013). Long-term trajectory of some elasmobranch species off the Tuscany coasts (NW Mediterranean) from 50 years of catch data. *Scientia Marina* 77, 119–127. doi:10.3989/scimar.03654.21C
- Lippe, C., Dumont, P., and Bernatchez, L. (2006). High genetic diversity and no inbreeding in the endangered copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time. *Molecular Ecology* 15, 1769–1780.
- Luikart, G., Allendorf, F. W., Cornuet, J. M., and Sherwin, W. B. (1998). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89, 238–247.
- Mancusi, C., Cannas, R., Cariani, A., Follesa, M. C., Barone, M., Tinti, F., and Serena, F. (2010). Skates of the Mediterranean Sea. 263496, 263496.
- Marongiu, M. F. (2014). LA RIPRODUZIONE NEI CONDROITTI COME ELEMENTO CHIAVE PER LA LORO CONSERVAZIONE E GESTIONE NEL MEDITERRANEO CENTRO-OCCIDENTALE. PhD thesis.
- Martin, C. S., Vaz, S., Ernande, B., Ellis, J. R., Eastwood, P. D., Coppin, F., Harrop, S., Meaden, G. J., and Carpentier, A. (2005). Spatial distributions (1989–2004) and preferential habitats of thornback ray and lesser spotted dogfish in the eastern English Channel. *ICES J Mar Sci CM* 2005, N23.
- McDonald, D. B., and Potts, W. K. (1997). DNA microsatellites as genetic markers at several scales. *Avian molecular evolution and systematics. Academic Press, San Diego*, 29–49.
- McEachran, J. D., Dunn, K. A., and Miyake, T. (1996). Interrelationships of the batoid fishes (Chondrichthyes: Batoidea). *Interrelationships of fishes*, 63–84.
- Mellinger, J., Wisez, F., and Alluchon-Gerard, M.-J. (1986). Developmental biology of an oviparous shark, *Scyliorhinus canicula*. *Indo-Pacific Fish Biology. T. Uyeno, R. Arai, T. Taniuchi and K. Matsuura, eds. Ichthyological Society of Japan, Tokyo*, 310–332.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215. doi:10.1093/nar/16.3.1215
- Mytilineou, C., Politou, C.-Y., Papaconstantinou, C., Kavadas, S., D onghia, G., and Sion, L. (2005). Deep-water fish fauna in the Eastern Ionian Sea. *Belgian Journal of Zoology* 135, 229.
- El Nagar, A., McHugh, M., Rapp, T., Sims, D. W., and Genner, M. J. (2009). Characterisation of polymorphic microsatellite markers for skates (Elasmobranchii: Rajidae) from expressed sequence tags. *Conservation Genetics* 11, 1203–1206. doi:10.1007/s10592-009-9919-8
- Nei, M. (1987). ‘Molecular Evolutionary Genetics’. (Columbia University Press.) Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Molecular+Evolutionary+Genetics+Analysis#8>

- Neigel, J. E. (1997). A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 105–128.
- Nelson, K., and Soule, M. (1987). Genetical conservation of exploited fishes. *Population genetics and fishery management*. University of Washington Press, Seattle, 345–368.
- Nielsen, E. E., Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., Meldrup, D., and Grønkvær, P. (2003). Evidence of a hybrid-zone in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic and the Danish Belt Sea revealed by individual admixture analysis. *Molecular Ecology* 12, 1497–1508.
- Nieto, A., Ralph, G. M., Comeros-Raynal, M. T., Kemp, J., García Criado, M., Allen, D. J., Dulvy, N. K., Walls, R. H. L., Russell, B., Pollard, D., García, S., Craig, M., Collette, B. B., Pollom, R., Biscoito, M., Labbish Chao, N., Abella, A., Afonso, P., Álvarez, H., Carpenter, K. E., Clò, S., Cook, R., Costa, M. J., Delgado, J., Dureuil, M., Ellis, J. R., Farrell, E. D., Fernandes, P., Florin, A.-B., Fordham, S., Fowler, S., Gil de Sola, L., Gil Herrera, J., Goodpaster, A., Harvey, M., Heessen, H., Herler, J., Jung, A., Karmovskaya, E., Keskin, C., Knudsen, S. W., Kobylansky, S., Kovačić, M., Lawson, J. M., Lorange, P., McCully Phillips, S., Munroe, T., Nedreaas, K., Nielsen, J., Papaconstantinou, C., Polidoro, B., Pollock, C. M., Rijnsdorp, A. D., Sayer, C., Scott, J., Serena, F., Smith-Vaniz, W. F., Soldo, A., Stump, E., and Williams, J. T. (2015). ‘European Red List of Marine Fishes’. doi:10.2779/082723
- Notarbartolo di Sciara, G., and Bianchi, I. (1998). ‘Guida degli squali e delle razze del Mediterraneo’. (F. Muzzio; ARIES.)
- Nottage, A. S., and Perkins, E. J. (1983). Growth and maturation of roker Raja clavata L. in the Solway Firth. *Journal of Fish Biology* 23, 43–48.
- Olivereau, M., and Leloup, J. (1950). Variations in the relationship between liver and soma in the course of development and reproduction of *Scyllium canicula* L. *Vie et Milieu (Paris)* (1: 377.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., and Shipley, P. (2004). Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Ovenden, J. R. (1990). Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 41, 1990.
- Ovenden, J. R., Berry, O., Welch, D. J., Buckworth, R. C., and Dichmont, C. M. (2013). Ocean ’ s eleven : a critical evaluation of the role of population , evolutionary and molecular genetics in the management of wild fisheries. doi:10.1111/faf.12052
- Ovenden, J. R., Kashiwagi, T., Broderick, D., Giles, J., and Salini, J. (2009). The extent of population genetic subdivision differs among four co-distributed shark species in the Indo-Australian archipelago. *BMC evolutionary biology* 9, 40. doi:10.1186/1471-2148-9-40
- Paetkau, D., and Strobeck, C. (1995). The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular ecology* 4, 519–520.
- Pawson, M. G., and Jennings, S. (1996). A critique of methods for stock identification in marine capture fisheries. *Fisheries Research* 25, 203–217.
- Peakall, R., and Smouse, P. E. (2012). GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460
- Peakall, R., and Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288–295. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

- Piry, S., Luikart, G., and Cornuet, J.-M. (1999). BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. *Journal of Heredity* 90, 502–503.
- Poortvliet, M., and Hoarau, G. (2013). The complete mitochondrial genome of the Spinetail Devilray, *Mobula japanica*. *Mitochondrial dna* 24, 28–30.
- Primmer, C. R., and Merilä, J. (2002). A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics* 3, 445–449.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Psomadakis, P. N., Giustino, S., and Vacchi, M. (2012). Mediterranean fish biodiversity: an updated inventory with focus on the Ligurian and Tyrrhenian seas. *Zootaxa* 3263, 1–46.
- Rassmann, K., Schlötterer, C., and Tautz, D. (1991). Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12, 113–118.
- Reich, D. E., Feldman, M. W., and Goldstein, D. B. (1999). Statistical Properties of Two Tests that Use Multilocus Data Sets to Detect Population Expansions. *Molecular Biology* 4, 453–466.
- Reich, D. E., and Goldstein, D. B. (1998). Genetic evidence for a Paleolithic human population expansion in Africa Eds E. Tulving and W. Donaldson. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8119–8123. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20939&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Relini, G. (2010). ‘Checklist della flora e della fauna dei mari italiani’. (Erredi.)
- Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M., and Freimer, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 3166–3170. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43536&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rodríguez-Cabello, C., Sánchez, F., Fernández, a., and Olaso, I. (2004). Is the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) population from the Cantabrian Sea a unique stock? *Fisheries Research* 69, 57–71. doi:10.1016/j.fishres.2004.04.002
- Rodríguez-Cabello, C., Sánchez, F., Fernández, A., and Olaso, I. (2004). Is the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) population from the Cantabrian Sea a unique stock? *Fisheries research* 69, 57–71.
- Rondinini, C., Battistoni, a., Peronace, V., and Teofili, C. (2013). Lista rossa dei vertebrati italiani. *WWF Italia. Settore Diversità Biologica. Serie ...*, 56.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4, 137–138. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x
- Rousset, F. R. (1995). Testing Heterozygote Excess and Deficiency. *Genetics Society of America* 153.
- Rousset, F. (2008). genepop’007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources* 8, 103–106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Rousset, F., and Raymond, M. (1995). Testing Heterozygote Excess and Deficiency. *Genetics* 140, 1413–1419. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1206704&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ryland, J. S., and Ajayi, T. O. (1984). Growth and population dynamics of three Raja species (Batoidei)

- in Carmarthen Bay, British Isles. *Journal du Conseil* 41, 111–120.
- Sánchez, F., and Gil, J. (2000). Hydrographic mesoscale structures and Poleward Current as a determinant of hake (*Merluccius merluccius*) recruitment in southern Bay of Biscay. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 57, 152–170.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365–371.
- Selkoe, K. A., and Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9, 615–629. doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x
- Serena, F. (2005). Field identification guide to the sharks and rays of the Mediterranean and Black sea. *FAO Species identification guide for Fishery Purposes.*, 97.
- Serena, F., Barone, M., Mancusi, C., and Abella, A. J. (2005). REPRODUCTIVE BIOLOGY, GROWTH AND FEEDING HABITS OF RAJA ASTERIAS DELAROCHE, 1809, FROM THE NORTH TYRRHENIAN AND SOUTH LIGURIAN SEA (ITALY), WITH SOME NOTES ON TRENDS IN LANDINGS.
- SHARKLIFE (2014). PRODUCTION OF THE ITALIAN ACTION PLAN FOR THE MANAGEMENT AND CONSERVATION OF CARTILAGINOUS FISHES AND GUIDELINES TO DESIGN LEGISLATION AND REGULATIONS IN ITALY.
- Shaw, P. W., Turan, C., Wright, J. M., O'connell, M., and Carvalho, G. R. (1999). Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. *Heredity* 83, 490–499.
- Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., and Arnheim, N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:(CA/GT) n and (A/T) n microsatellites. *Nucleic acids research* 31, 974–980.
- Shirai, S. (1996). Phylogenetic interrelationships of neoselachians (Chondrichthyes: Euselachii). *Interrelationships of fishes* 2, 9–34.
- Sims, D. W., Genner, M. J., Southward, A. J., and Hawkins, S. J. (2001). Timing of squid migration reflects North Atlantic climate variability. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 268, 2607–2611.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457–462.
- Smith, P. J. (1990). Protein Electrophoresis for identification of Australasian fish stocks. *Marine and Freshwater Research* 41, 823–833.
- Spencer, C. C., Neigel, J. E., and Leberg, P. L. (2000). Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Molecular Ecology* 9, 1517–1528.
- Stehmann, M., and Bürkel, D. L. (1984). Rajidae. *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean* 1, 163–196.
- Stevens, J. D., Walker, T. I., Cook, S. F., and Fordham, S. V (2005). Threats faced by chondrichthyan fish.
- Storelli, M. M., and Marcotrigiano, G. O. (2005). Bioindicator organisms: heavy metal pollution evaluation in the Ionian Sea (Mediterranean Sea—Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* 102, 159–166.
- Stow, A., Zenger, K., Briscoe, D., Gillings, M., Peddemors, V., Otway, N., and Harcourt, R. (2006). Isolation and genetic diversity of endangered grey nurse shark (*Carcharias taurus*) populations.

Biology Letters 2, 308–311.

- Strand, M., Prolla, T. A., Liskay, R. M., and Petes, T. D. (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365, 274–276.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research* 17, 6463–6471.
- Templeton, A. R., Routman, E., and Phillips, C. A. (1995). Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140, 767–782.
- Thomason, J. C., Conn, W., Le Comte, E., and Davenport, J. (1996). Effect of temperature and photoperiod on the growth of the embryonic dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Journal of fish biology* 49, 739–742.
- Thomason, J. C., Davenport, J., and Rogerson, A. (1994). Antifouling performance of the embryo and eggcase of the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 74, 823–836.
- Tóth, G., Gáspári, Z., and Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research* 10, 967–981.
- Utter, F. M. (1991). Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *Journal of Fish Biology* 39, 1–20.
- Vacchi, M., and Serena, F. (2010). Chondrichthyes. *Biol. Mar. Mediterr.* 17 (suppl., 642–648.
- Walker, P. A., and Heessen, H. J. L. (1996). Long-term changes in ray populations in the North Sea. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 53, 1085–1093.
- Walker, P. A., and Hislop, J. R. G. (1998). Sensitive skates or resilient rays? Spatial and temporal shifts in ray species composition in the central and north-western North Sea between 1930 and the present day. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 55, 392–402.
- Walker, P., Cavanagh, R. D., Ducrocq, M., and Fowler, S. L. (2005). Chapter 7—regional overviews: Northeast Atlantic (including Mediterranean and Black sea). Fowler, SL, Cavanagh, RD, Camhi, M., Burgess, GH, Cailliet, GM, Fordham, SV, Simpfendorfer, CA and Musick, JA (comp. and eds). *Sharks, Rays and Chimaeras: The Status of the Chondrichthyan Fishes*. IUCN SSC Shark Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland a.
- Walker, P., Howlett, G., and Millner, R. (1997). Distribution, movement and stock structure of three ray species in the North Sea and eastern English Channel. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 54, 797–808.
- Wang, L., Juji, T., Tokunaga, K., Takahashi, K., Kuwata, S., Uchida, S., Tadokoro, K., and Takai, K. (1994). Polymorphic microsatellite markers for the diagnosis of graft-versus-host disease. *New England Journal of Medicine* 330, 398–401.
- Waples, R. S. (1987). A multispecies approach to the analysis of gene flow in marine shore fishes. *Evolution*, 385–400.
- Waples, R. S. (1998). Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity* 89, 438–450.
- Waples, R. S., and Gaggiotti, O. (2006). INVITED REVIEW: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular ecology* 15, 1419–1439.
- Waples, R. S., and Naish, K. A. (2009). Genetic and evolutionary considerations in fishery management:

- research needs for the future. In 'The future of fisheries science in North America'. pp. 427–451. (Springer.)
- Waples, R. S., Punt, A. E., and Cope, J. M. (2008). Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? *Fish and Fisheries* 9, 423–449.
- Ward, R. D., Elliott, N. G., and Grewe, P. M. (1995). Allozyme and mitochondrial DNA separation of Pacific northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus orientalis* (Temminck and Schlegel), from southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau). *Marine and freshwater research* 46, 921–930.
- Ward, R. D., Woodwark, M., and Skibinski, D. O. F. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of fish biology* 44, 213–232.
- Wattier, R., Engel, C. R., Saumitou-Laprade, P., and Valero, M. (1998). Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 7, 1569–1573.
- Weir, B., and Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure
Author (s): B . S . Weir and C . Clark Cockerham. *Evolution* 38, 1358–1370.
- Wheeler, A. C., Fraser, F. R., and Stebbing, P. (1978). 'Key to the fishes of northern Europe: a guide to the identification of more than 350 species'. (Warne.)
- Whitehead, P. J. P., Bauchot, M. L., Hureau, J. C., Nielsen, J., and Tortonese, E. (1986). Checklist of the fishes of the North-Eastern Atlantic and of the Mediterranean, Vol. III.
- Worm, B., Davis, B., Kettener, L., Ward-Paige, C. A., Chapman, D., Heithaus, M. R., Kessel, S. T., and Gruber, S. H. (2013). Global catches, exploitation rates, and rebuilding options for sharks. *Marine Policy* 40, 194–204.
- Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19, 395–420. doi:10.2307/2406450