

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

Analisi della struttura genetica del crostaceo cirripede *Chthamalus montagui* nell'area mediterranea

Relatori

Prof. Alberto CASTELLI

Dott. Ferruccio MALTAGLIATI

Dott. Federica Gabriella PANNACCIULLI (relatore ENEA)

Tesi ENEA n. 1519/2012

Candidato

Fabio PICCOLIN

Anno Accademico 2012 – 2013

RIASSUNTO

Chthamalus montagui (Southward) è un crostaceo cirripede comunemente presente nella fascia intertidale delle coste rocciose dell'area mediterraneo-atlantica. *C. montagui* è stato studiato in modo sistematico dal punto di vista dell'ecologia, della biologia riproduttiva, della dinamica di popolazione e della genetica di popolazione a partire dagli anni '50 circa del secolo scorso. La sua importanza come organismo in grado di segnalare i cambiamenti climatici sulla scala temporale delle decine di anni lungo le aree costiere è stata riconosciuta e documentata.

Nel presente lavoro di tesi, *C. montagui* viene studiato dal punto di vista della genetica di popolazione. La struttura genetica della specie viene analizzata all'interno del bacino del Mediterraneo utilizzando un set di sei marcatori microsatellitari specie-specifici altamente polimorfici. L'attività di laboratorio da me personalmente svolta è consistita nell'analisi di 120 individui provenienti da quattro località diverse. In laboratorio sono state effettuate le seguenti operazioni: 1) estrazione del DNA totale con metodo del Salting-Out, 2) verifica del DNA estratto tramite gel-elettroforesi, 3) diluizione del DNA, 4) amplificazione tramite PCR dei 6 loci microsatellitari, 5) verifica dell'amplificato tramite gel-elettroforesi, 6) analisi della dimensione dei frammenti mediante GeneScan effettuato su sequenziatore automatico, 7) interpretazione dei cromatogrammi risultanti.

I dati da me raccolti sono stati aggiunti a quelli preesistenti, prodotti nell'ambito di due precedenti lavori, una Tesi di Dottorato e una Tesi di Laurea Magistrale, che avevano analizzato la struttura genetica di *C. montagui* in Atlantico e in Mediterraneo utilizzando le stesse tecniche e gli stessi marcatori microsatellitari. Alle quattro località da me analizzate (120 individui) sono state aggiunte in totale altre sette località (235 individui). Il dataset complessivo è risultato così composto da 355 individui suddivisi in 11 località, di cui una localizzata lungo le coste atlantiche, nove all'interno del Mediterraneo ed una nel Mar Nero.

Si è quindi proceduto all'analisi statistica dei dati ottenuti, con lo scopo di mettere in evidenza le caratteristiche della struttura genetica della specie esaminata all'interno

dell'area geografica considerata. Le analisi statistiche che sono state effettuate sono: 1) test del linkage disequilibrium, 2) calcolo del numero di alleli, stima dell'eterozigotità osservata e attesa, stima della ricchezza allelica, 3) test dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, 4) stima delle frequenze alleliche, 5) calcolo del coefficiente di inbreeding (F_{is}) e del coefficiente di fissazione(F_{st}), 6) test dell'isolamento da distanza, 7) costruzione di grafici MDS, 8) analisi della varianza molecolare, 9) analisi Bayesiana di assegnazione individuale.

I risultati ottenuti hanno evidenziato per *C. montagui* l'esistenza di una strutturazione genetica significativa all'interno dell'area considerata. In particolare, i risultati ottenuti con l'analisi della varianza molecolare hanno permesso di evidenziare la presenza di una differenziazione genetica significativa fra le località analizzate in Mediterraneo occidentale, quelle analizzate in Mar Egeo-Mar Nero e quelle analizzate nel Mar Adriatico. L'esistenza di distinti cluster genetici all'interno del Mediterraneo è stata confermata anche attraverso l'analisi bayesiana di assegnazione individuale.

I risultati ottenuti sono stati discussi alla luce dei lavori presenti in letteratura sulla biogeografia del Mediterraneo e sulla struttura genetica di altri organismi marini, partendo dagli stessi Ctamali per estendersi poi anche ad altri invertebrati e vertebrati marini sia mediterranei che non.

INDICE

1. INTRODUZIONE	6
1.1 La diversità genetica	6
1.1.1 Introduzione al concetto di diversità genetica	6
1.1.2 I fenomeni evolutivi che regolano la variabilità genetica all'interno e fra le popolazioni.....	7
1.1.3 Il flusso genico e la separazione genetica delle popolazioni	8
1.1.4 Flusso genico fra popolazioni in ambiente marino	10
1.2 L'organismo modello: Chtamalus montagui	11
1.2.1 Inquadramento sistematico	11
1.2.2 Aspetti morfologici fondamentali	12
1.2.3 Riproduzione, dispersione larvale e sviluppo	13
1.2.4 Aspetti ecologici generali	14
1.3 I marcatori microsatellitari	17
OBIETTIVI.....	18
2. MATERIALI E METODI.....	19
2.1 Località analizzate e campionamenti	19
2.2 Estrazione del DNA.....	20
2.3 Amplificazione dei frammenti.....	21
2.4 Analisi dei frammenti.....	25
2.5 Analisi statistica dei dati	27
3. RISULTATI	30
3.1 Linkage disequilibrium, stime di diversità genetica ed equilibrio di Hardy-Weinberg.	30
3.2 Analisi della struttura genetica	33
4. DISCUSSIONE.....	40
CONCLUSIONI.....	50
SVILUPPI FUTURI	51
BIBLIOGRAFIA.....	53

APPENDICE A: protocollo di estrazione del DNA	64
APPENDICE B: tabelle delle frequenze alleliche	66
RINGRAZIAMENTI.....	75

1. INTRODUZIONE

1.1 La diversità genetica

1.1.1 Introduzione al concetto di diversità genetica

Dal punto di vista biologico, la diversità genetica è il prodotto della variabilità che caratterizza la struttura genetica degli organismi viventi (Hughes *et al.* 2008). In un individuo diploide in corrispondenza di ciascun locus sono presenti due alleli: questi alleli possono essere sia identici (condizione omozigote) che diversi (condizione eterozigote). La variabilità genetica risiede nella condizione eterozigote e nella diversità allelica. La diversità allelica non è un appannaggio esclusivo degli organismi diploidi: semplicemente, mentre negli organismi diploidi le diverse forme alleliche possono essere ricercate anche all'interno dello stesso individuo, negli organismi aploidi esse vanno ricercate solamente fra individui diversi.

In tempi recenti, in seguito alla diffusione delle tecniche di indagine molecolari, al concetto classico di eterozigosità è stato associato quello di polimorfismo. I polimorfismi sono le differenze che vengono osservate all'interno di due o più sequenze omologhe di DNA quando si mettono a confronto una per una le basi azotate di cui sono composte. I loci caratterizzati da sequenze polimorfiche vengono a loro volta definiti polimorfici. Eterozigosità e polimorfismi testimoniano entrambi la variabilità che caratterizza l'informazione genetica.

La variabilità genetica presente a livello individuale si distribuisce all'interno dei gruppi di individui interfecondi in modo non-omogeneo e questo può essere apprezzato attraverso l'analisi della struttura genetica delle popolazioni naturali. All'interno del suo areale di distribuzione ciascuna specie è suddivisa in un certo numero di popolazioni, che possono essere più o meno geograficamente delimitate. Quando esistono dei limiti geografici precisi non è difficile rendersi conto dell'esistenza di popolazioni separate e distinte. Quando invece i limiti geografici non sono ben definiti la separazione delle popolazioni potrebbe sembrare un'operazione povera di significato, ma non è così: l'identità di una popolazione naturale può essere definita su base genetica attraverso l'analisi della variabilità genetica, vedremo in seguito come.

Dal punto di vista evolutivo, la diversità genetica è una risorsa biologica fondamentale alla quale gli individui e le popolazioni possono attingere per rispondere agli stress ambientali in senso adattativo. La diversità genetica va quindi tutelata, laddove presente, ed i processi che la influenzano vanno studiati e mantenuti sotto controllo in un'ottica di gestione e di sfruttamento sostenibile delle risorse naturali.

1.1.2 I fenomeni evolutivi che regolano la variabilità genetica all'interno e fra le popolazioni

La variabilità genetica può essere suddivisa nella componente presente all'interno delle popolazioni ed in quella presente fra le popolazioni. Tramite l'analisi dei genotipi, ciascuna popolazione può essere descritta in termini di frequenze genotipiche e di frequenze alleliche e può essere confrontata con le altre popolazioni della stessa specie. Le frequenze alleliche variano da una popolazione all'altra, a causa di alcuni processi evolutivi fondamentali, in particolare la mutazione, la selezione naturale e la deriva genetica.

La mutazione consiste nel singolo evento che causa variazione all'interno del DNA e rappresenta perciò la fonte originale della diversità genetica. La mutazione è casuale e può colpire qualsiasi punto del genoma. La frequenza con la quale la mutazione si verifica può essere stimata con l'aiuto di modelli mutazionali: all'interno del genoma infatti sono presenti regioni più o meno soggette alla mutazione, che sono sottoposte a vincoli evolutivi più o meno costrittivi. In seguito ad una mutazione, un individuo può ottenere un vantaggio oppure uno svantaggio in termini adattativi. Se la mutazione è vantaggiosa, l'individuo risulta meglio adattato all'ambiente e aumenta la sua probabilità di riuscire a riprodursi. Se invece la mutazione è svantaggiosa l'individuo può avere dei problemi di adattamento e le sue probabilità di riprodursi con successo diminuiscono. La maggior parte delle mutazioni è però neutrale (Kimura, 1980), nel senso che non fornisce né un vantaggio né uno svantaggio in termini di adattamento e di successo riproduttivo. La mutazione influisce sulle frequenze alleliche poiché produce nuovi alleli.

La selezione naturale consiste nel contributo differenziale degli individui alle generazioni successive, dovuto alle differenze in termini di adattamento, sopravvivenza e successo riproduttivo. In questo senso, la variabilità casuale introdotta

all'interno delle popolazioni naturali attraverso i fenomeni mutazionali viene selezionata attraverso l'interazione con i fattori ambientali. A seconda delle pressioni esercitate sugli individui da parte dei fattori ambientali, la selezione naturale opera in modo differenziale contribuendo a creare, mantenere ed eliminare la diversità genetica. La selezione naturale influisce sulle frequenze alleliche perché causa l'eliminazione degli alleli svantaggiosi e promuove la diffusione di quelli vantaggiosi. Inoltre, se un individuo che presenta una mutazione svantaggiosa viene selezionato e non riesce a riprodursi, assieme all'allele svantaggioso vengono eliminati anche tutti gli altri alleli posseduti da quell'individuo.

La deriva genetica consiste nella variazione casuale che interessa le frequenze alleliche di una popolazione al passaggio da una generazione all'altra, dovuta alle dimensioni finite della popolazione stessa. All'interno delle popolazioni naturali i processi che regolano la riproduzione sono dotati di una componente stocastica intrinseca: quando le dimensioni della popolazione non sono sufficientemente grandi da attutire gli effetti di questa componente può accadere che il contributo differenziale degli individui alla generazione successiva venga determinato anche dalle fluttuazioni casuali. La deriva genetica influisce sulle frequenze alleliche causando l'eliminazione o la diffusione degli alleli in maniera del tutto casuale.

1.1.3 Il flusso genico e la separazione genetica delle popolazioni

La mutazione, la selezione naturale e la deriva genetica non sono sufficienti a spiegare come, a partire da una popolazione d'origine geneticamente omogenea, si possa arrivare ad avere due o più popolazioni geneticamente diversificate. La forza microevolutiva che controlla la distribuzione della diversità genetica fra le popolazioni è il flusso genico, che consiste nello scambio di informazione genetica che avviene tra le popolazioni in seguito ai fenomeni migratori (rientrano in questa categoria tutti quei processi che comportano lo scambio di materiale genetico da una popolazione ad un'altra). Il flusso genico tende ad aumentare la diversità genetica all'interno delle popolazioni, perché porta nuovi alleli da una popolazione all'altra, mentre riduce la diversità genetica fra popolazioni, perché gli alleli che vengono trasferiti vengono di fatto messi in condivisione, con tendenza all'omogeneizzazione delle frequenze alleliche. Tutte le condizioni che hanno come effetto la riduzione o l'eliminazione del

flusso genico fra popolazioni comportano quindi una diminuzione della diversità genetica entro-popolazione ed un aumento della diversità genetica fra popolazioni. Il flusso genico influisce sulle frequenze alleliche delle popolazioni in modo diverso a seconda della sua portata, della sua intensità, della sua durata e della sua direzionalità.

Se il flusso genico all'interno della popolazione d'origine non subisce alcun tipo di restrizione gli alleli sono liberi di distribuirsi in maniera omogenea; se invece esistono delle costrizioni al flusso genico la diversità genetica si distribuisce in maniera non-omogenea. Nel secondo caso, le normali variazioni delle frequenze alleliche generate dalla mutazione, dalla deriva genetica e dalla selezione naturale non sono libere di diffondersi all'interno della popolazione, ma restano confinate là dove si sono originate. Se le costrizioni che limitano il flusso genico si mantengono nel tempo, la separazione genetica tende ad aumentare, fino eventualmente a culminare in un evento di speciazione.

I fattori che limitano il flusso genico variano a seconda dei contesti ambientali e delle caratteristiche biologiche ed ecologiche degli organismi, ma esistono alcuni aspetti di carattere generale che possono essere presi in considerazione:

- 1) il flusso genico dipende dal potenziale di dispersione della specie considerata, intendendo come potenziale di dispersione sia la capacità di muoversi e di migrare degli individui adulti, sia la capacità di dispersione dei gameti e delle larve;
- 2) dato il potenziale di dispersione, il flusso genico dipende dalla distanza geografica fra la popolazione "sorgente" e quella di arrivo. In assenza degli effetti di altri fattori, il flusso genico diminuisce con la distanza a partire dal punto di origine per annullarsi in corrispondenza del limite massimo di dispersione;
- 3) dati il potenziale di dispersione e la distanza, il flusso genico dipende dal percorso che viene compiuto dai migranti e dal tipo di ostacoli che essi incontrano sul loro cammino; gli ostacoli possono essere di natura geografica, ambientale, ecologica e biologica.

Occorre comunque notare che la differenziazione genetica delle popolazioni non è il risultato solamente dell'insufficienza dei processi di trasferimento del materiale genetico. La selezione naturale può da sola promuovere la differenziazione delle popolazioni anche quando non sono presenti limitazioni al flusso genico, basta che ciascuna delle popolazioni sia sottoposta ad una pressione selettiva costante e caratteristica (Pinho & Hey, 2010). La direzionalità della selezione può in questo modo annullare l'effetto omogeneizzante del flusso genico e promuovere il differenziamento genetico delle popolazioni.

1.1.4 Flusso genico fra popolazioni in ambiente marino

I cicli riproduttivi di molte specie marine sia di vertebrati che di invertebrati, sia bentoniche che pelagiche, prevedono una fase pelagica di dispersione larvale che favorisce lo scambio di alleli fra popolazioni lontane (Palumbi, 1992, 1994; Kyle & Boulding, 2000). Rispetto alla terraferma, l'ambiente marino appare contraddistinto da una certa continuità geografica, che lascia supporre un'assenza di forti vincoli al flusso genico (Palumbi, 1992). Ci si potrebbe aspettare allora che in ambiente marino le popolazioni siano caratterizzate da una certa tendenza verso l'omogeneità genetica ed infatti numerose specie marine confermano questa tendenza (Graves, 1998; Waples, 1998; Benzie, 1999). Nonostante questo, però, non mancano casi in cui, fra popolazioni non molto lontane fra loro di organismi marini con buone capacità di dispersione, sono stati riscontrati livelli di differenziazione genetica significativi (Knowlton & Keller, 1986; Barber *et al.*, 2000; Sotka *et al.*, 2004; Cowen *et al.*, 2006). Per spiegare questa apparente contraddizione sono stati invocati diversi fattori fra cui la presenza all'interno delle popolazioni di tassi elevati di auto-reclutamento (Swearer *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1999), l'esistenza fra le popolazioni di rapporti di vicarianza storica (Lemaire *et al.*, 2005), la presenza di barriere oceanografiche in grado di porre dei vincoli alla dispersione delle larve e dei propaguli (Gaither *et al.*, 2010), la variabilità geografica della pressione esercitata sulle popolazioni dalla selezione naturale (Veliz *et al.*, 2004; Jorgensen *et al.*, 2005) e la discontinuità geografica degli habitat (Fontaine *et al.*, 2007). Tutti questi fattori interagiscono in varia misura all'interno dei diversi contesti promuovendo il differenziamento genetico in ambiente marino (Riginos *et al.*, 2001).

1.2 L'organismo modello: *Chthamalus montagui*

1.2.1 Inquadramento sistematico

La specie *Chthamalus montagui* (Fig. 1.1) appartiene alla famiglia degli ctamalidi, sotto-ordine dei balanomorfi, ordine dei toracici, sotto-classe dei cirripedi, classe dei maxillopodi, sub-phylum dei crostacei, phylum degli artropodi. La specie *C. montagui* è stata identificata solo in tempi relativamente recenti (Southward, 1976). Prima di allora *C. montagui* veniva classificato all'interno della specie *Chthamalus stellatus*, secondo la classificazione dei Cirripedi proposta da Darwin (1854).



Fig. 1.1: esemplari di *C. montagui* attaccati alla scogliera

I Cirripedi sono crostacei marini, quasi esclusivamente sessili allo stato adulto, che conducono uno stile di vita libero, anche se sono presenti alcuni gruppi a stile di vita parassitario ed epizoonte. Il corpo dei Cirripedi è normalmente suddiviso in 16 segmenti, ma la suddivisione è osservabile solo nelle forme giovanili poiché nel passaggio alla forma adulta la struttura subisce profonde trasformazioni. Lo stato adulto viene raggiunto attraverso una serie di stadi naupliari ed uno stadio cipridiforme provvisto di carapace bivalente. Allo stadio cipridiforme l'animale si fissa al substrato secernendo una sostanza adesiva detta cemento. Dopo essersi fissato, l'animale subisce una serie di metamorfosi fino alla forma adulta. Le forme adulte sono provviste di carapace e spesso secernono piastre calcaree che formano uno scheletro esterno caratteristico. Gli arti toracici sono presenti in numero di 6 paia, costituiti ciascuno da un peduncolo basale che porta in genere due rami allungati dotati di setole fini: tali arti, detti "cirri" (da qui il nome del gruppo), esplicano funzioni alimentari e respiratorie. Le antenne sono sempre assenti (Fig.1.2).

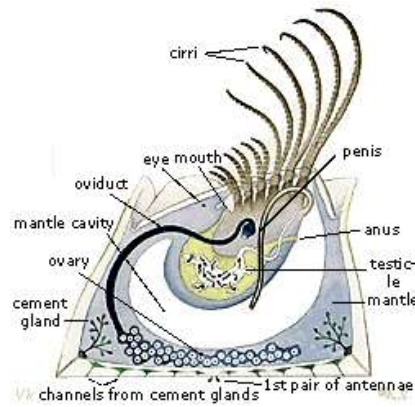


Fig. 1.2 Anatomia interna di un Cirripede adulto, sezione trasversale. Si apprezza la presenza degli arti toracici (qui in numero di 3, essendo il corpo diviso a metà) che recano i cirri che si protendono verso l'esterno.

1.2.2 Aspetti morfologici fondamentali

La morfologia di *C. montagui* presenta le caratteristiche tipiche dei cirripedi toracici balanomorfi: il corpo è racchiuso all'interno di un carapace rinforzato da piastre calcaree, fissato alla base al substrato; le placche calcaree, in numero di 6, circondano il corpo formando una "muraglia" a tronco di cono, chiusa in alto da un apparato opercolare costituito da 4 placche mobili che consentono la fuoriuscita dei cirri (Fig. 1.3).



Fig. 1.3. Rappresentazione schematica di un cirripede ideale.

A causa dell'elevata somiglianza morfologica, *C. montagui* può essere confuso con *C. stellatus* (Fig. 1.4). I tratti morfologici che permettono di distinguere *C. montagui* da *C. stellatus* sono la forma dell'opercolo e delle placche opercolari, il colore delle membrane tergo-scutali e la conformazione delle setole dei cirri minori (Southward, 1976).

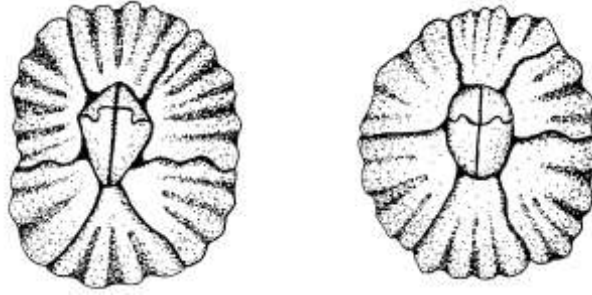


Fig. 1.4. *Chthamalus montagui* (a sinistra) e *Chthamalus stellatus* (a destra) a confronto visti dall'alto. Si apprezza chiaramente la differenza nella forma dell'opercolo.

L'opercolo di *C. montagui* possiede una forma "ad aquilone", mentre quello di *C. stellatus* possiede una forma ovale o subcircolare. In *C. montagui* l'intersezione fra le terga e gli scuta (le diverse parti che compongono l'opercolo) si trova a meno di un terzo della distanza fra la carena ed il rostro (le due estremità longitudinali del corpo) e diventa concava in prossimità del rostro, mentre in *C. stellatus* l'intersezione si trova a più di un terzo della distanza fra carena e rostro e diventa convessa in prossimità di quest'ultimo. In *C. montagui* la membrana tergo-scutale è di colore azzurro-blu con margini marroni e neri, mentre in *C. stellatus* è di un blu brillante con margini neri ed una macchia centrale arancione. Alla base del cirro I in *C. stellatus* sono presenti delle spine coniche, che sono invece assenti in *C. montagui*. Su entrambi i rami del cirro II in *C. montagui* sono presenti setole "pettinate", mentre in *C. stellatus* gli stessi rami sono dentati.

1.2.3 Riproduzione, dispersione larvale e sviluppo

Altri fattori coinvolti nella determinazione della distribuzione di *C. montagui* sono quelli legati alle modalità riproduttive, alla dispersione larvale ed allo sviluppo. *C. montagui* è un organismo ermafrodita, che si riproduce per fecondazione interna in seguito a copulazione (Klepal, 1990), capace sia di fecondazione incrociata che di auto-fecondazione (Pannacciulli, 1995). Il numero di cicli riproduttivi all'anno varia da uno a due o più (Burrows *et al.*, 1992), a seconda della temperatura, dell'altezza sulla linea di costa e della classe d'età (O'Riordan *et al.*, 1992). Il numero di uova prodotto in corrispondenza di ciascun ciclo riproduttivo dipende dalla disponibilità di nutrimento (Burrows *et al.*, 1992). Anche il rilascio delle larve dipende dalla disponibilità di cibo: la ripresa dell'attività di nutrimento dopo la scarsità di cibo invernale stimola la secrezione di una particolare sostanza che regola il rilascio delle larve (Crisp, 1956;

Clare *et al.*, 1985). I nauplii attraversano una fase planctonica, compiono la metamorfosi in cipride, si insediano su un substrato solido ed attraverso un'ulteriore metamorfosi assumono la forma giovanile. La durata dello sviluppo larvale è influenzata dalla temperatura: in condizioni di eccesso di cibo a 19°C, Burrows (1988) ha stimato che lo sviluppo larvale di *C. montagui* dura circa 14 giorni. La durata dello sviluppo larvale determina il raggio di dispersione che potenzialmente le larve possono raggiungere. Il numero di larve prodotte, la capacità di dispersione, la topografia e l'idrografia dei tratti costieri influenzano l'insediamento ed il reclutamento nelle varie aree. Numerosi studi sono stati condotti sugli effetti della variabilità spaziale e temporale dell'insediamento e del reclutamento nella determinazione della distribuzione di *C. montagui* (Southward, 1991; Power *et al.*, 2006; O'Riordan *et al.*, 2004), ma risulta difficile, tuttavia, trarre conclusioni di tipo generale.

1.2.4 Aspetti ecologici generali

La distribuzione geografica di *C. montagui* si estende lungo le coste orientali dell'Oceano Atlantico, a partire dalle isole britanniche (limite settentrionale, Crisp *et al.*, 1981) scendendo lungo le coste dell'Inghilterra, dell'Irlanda, della Francia, della Spagna e del Portogallo (Crisp *et al.*, 1981) fino almeno ad arrivare a Dakar in Africa (probabile limite meridionale, Shemesh *et al.*, 2009). *C. montagui* è generalmente presente lungo le coste europee del Mediterraneo (Crisp *et al.*, 1981; Pannacciulli *et al.*, 1997; Shemesh *et al.*, 2009) ma è assente lungo le coste nord africane, a partire dalla Tunisia andando verso Israele risalendo fino alla Turchia. La presenza di *C. montagui* lungo le coste dell'Algeria resta da stabilire, mentre lungo le coste mediterranee del Marocco è presente almeno fino ad Hal Hoceima (Shemesh *et al.*, 2009). *C. montagui* è presente in Mar Nero (Pannacciulli *et al.*, 1997; Shemesh *et al.*, 2009), mentre risulta molto raro o assente sulle isole, ad esempio l'Elba, Creta, Khios e Siros (Crisp *et al.*, 1981; Pannacciulli *et al.*, 1997; Shemesh *et al.*, 2009). È assente anche a Madeira, alle Azzorre ed alle Canarie (Crisp *et al.*, 1981; Shemesh *et al.*, 2009). È invece presente a Malta (Dando, 1987) (Fig.1.5).

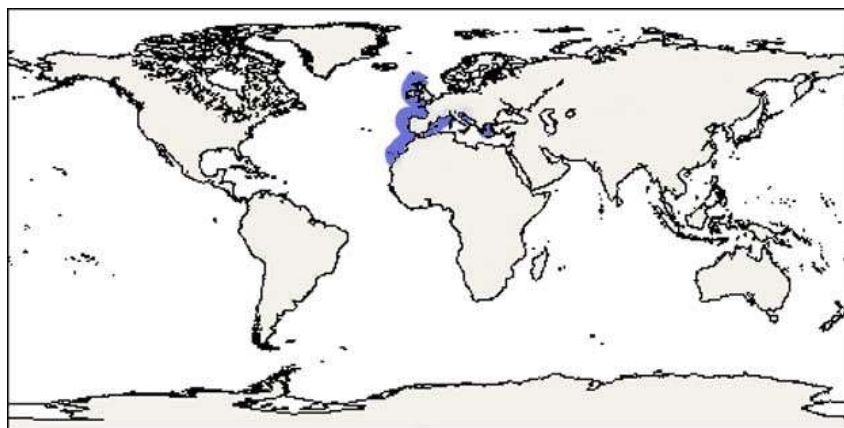


Fig.1.5. Distribuzione geografica di *C. montagui* (in blu).

Laddove presente, *C. montagui* occupa la fascia intertidale delle coste rocciose, con preferenza per le posizioni più elevate e per i tratti meno esposti al moto ondoso. I fattori che determinano la distribuzione di *C. montagui* sono stati oggetto di numerosi studi (Southward, 1976; Crisp *et al.*, 1981; Burrows, 1988; Pannacciulli, 1995, 1997), revisionati di recente da O’Riordan (2010). Lungo le coste orientali dell’Atlantico, i limiti settentrionale e meridionale della distribuzione di *C. montagui* sembrano essere controllati in larga misura dai fattori abiotici, in particolare dall’esposizione della costa al moto ondoso e dalla temperatura. In corrispondenza del limite settentrionale della distribuzione, Delanyl *et al.* (2003) e Power *et al.* (2006) hanno osservato in tre diverse località esposte al moto ondoso la presenza di forme giovanili di *C. montagui* che non sono state in grado di completare il loro sviluppo nella forma adulta. Non sempre però il moto ondoso risulta negativamente correlato con la presenza o con l’abbondanza di *C. montagui*: lungo le coste esposte della penisola iberica *C. montagui* risulta presente ed abbondante in corrispondenza di tutte le altezze sulla linea di costa (Sousa *et al.*, 2000; Range & Paula, 2001; Cruz *et al.*, 2005; Suarez & Arrontes, 2008) probabilmente a causa di un’interazione positiva fra il moto ondoso e la temperatura che crea i presupposti ambientali favorevoli all’insediamento ed allo sviluppo di *C. montagui*. Questa specie risulta infatti favorita negli ambienti meno umidi: la capacità di resistere bene all’essiccamento potrebbe essere dovuta alla particolare morfologia delle placche opercolari (Foster, 1971a). Sembra inoltre che le forme giovanili di *C. montagui* richiedano un certo stress da essiccamento per portare a termine il consolidamento delle placche del guscio (Burrows, 1988), il che si troverebbe in accordo con le osservazioni precedentemente riportate di Delanyl *et al.* (2003) e Power *et al.* (2006).

L'interazione positiva con lo stress da essiccamento favorisce probabilmente la distribuzione di *C. montagui* lungo le coste atlantiche del Nord Africa (Power *et al.*, 2001). Non sono stati comunque ancora effettuati studi più approfonditi riguardo ai fattori che determinano il limite meridionale della distribuzione, limite che peraltro rimane ancora senza una precisa definizione.

L'assenza di *C. montagui* dalle isole (però, come abbiamo visto, non da tutte) viene messa in relazione con la capacità di dispersione larvale: in un modo o nell'altro, la dispersione larvale potrebbe essere insufficiente a consentire la colonizzazione dei sistemi isolati (Crisp *et al.*, 1981; Burrows, 1988; Pannacciulli *et al.*, 1997; Burrows *et al.*, 1999). Una spiegazione più specifica potrebbe essere che tali isole sono troppo esposte al moto ondoso e che, se la temperatura non è sufficientemente elevata, le forme giovanili non trovano le condizioni adatte per svilupparsi (Power *et al.*, 2001). L'assenza di *C. montagui* dalle coste mediterranee del Nord Africa e del bacino Levantino, nonché dalle coste greche del Mar Ionio e del Mar Egeo, rimane invece a tutt'oggi scarsamente considerata.

La distribuzione di *C. montagui* alle diverse scale spaziali viene controllata anche da fattori biotici, in particolare dai rapporti di competizione, predazione e facilitazione che vengono contratti e mantenuti dalle specie all'interno delle comunità. Le interazioni biotiche che intercorrono fra un organismo ed un altro avvengono di norma alle scale spaziali minori (O'Riordan *et al.*, 2010), ma il loro effetto si ripercuote anche a quelle superiori. Ad esempio, i rapporti di tipo competitivo messi in atto a livello di microhabitat possono riflettersi nei pattern di zonazione verticale che vengono osservati lungo interi tratti di costa.

Lungo le coste atlantiche, la competizione con *Semibalanus balanoides* potrebbe influire in alcuni casi sulla distribuzione di *C. montagui* (Connell, 1961) limitandola alle posizioni più elevate sulla linea di costa, ma le modalità di questa interazione restano da chiarire.

Sempre lungo le coste atlantiche, il predatore neogasteropode *Nucella lapillus* preda in prevalenza *S. balanoides* invece che *C. montagui* (Connell, 1961, 1970; Burrows, 1988). La selezione differenziale è stata attribuita alla minore taglia del corpo degli individui adulti di *C. montagui* rispetto a *S. balanoides* (Paine, 1981). In generale lungo le coste

atlantiche i predatori sembrano non avere un grande effetto sulle popolazioni di *C. montagui* (Connell, 1961; Ortega, 1981).

L'interazione fra *Chthamalus* spp., erbivori ed alghe può avere degli effetti sia positivi che negativi sull'abbondanza di *Chthamalus* e l'interazione può essere sia diretta che indiretta (O'Riordan *et al.*, 2010). Le alghe competono con *Chthamalus* per il substrato (Dungan, 1986; Benedetti-Cecchi, 2000), di conseguenza l'attività degli erbivori può facilitare *Chthamalus* creando spazio libero per la colonizzazione (Zabin & Altieri, 2007). Quando *Chthamalus* è molto abbondante, l'elevata densità del popolamento può ostacolare le attività degli erbivori (Farrell, 1991; Benedetti-Cecchi, 2000). In questo caso, gli erbivori subiscono un decremento e, di conseguenza, aumentano le alghe, con effetto negativo indiretto su *Chthamalus*. L'effetto di "facilitazione" (*sensu* Connell & Slatyer, 1977) esercitato dagli erbivori nei confronti di *Chthamalus* sembra essere in definitiva dipendente dalla densità relativa dei popolamenti coinvolti (alghe, ctamali, erbivori) (Benedetti-Cecchi, 2000; Zabin & Altieri, 2007).

1.3 I marcatori microsatellitari

Per analizzare la variabilità genetica vengono utilizzati i marcatori molecolari. Un marcatore molecolare è una sequenza di DNA che può essere isolata, amplificata ed analizzata. La sequenza deve essere presente all'interno del DNA di ciascun individuo del gruppo che si intende analizzare e deve poter essere identificata in modo specifico grazie all'applicazione di sonde molecolari che si legano a monte e a valle della sequenza bersaglio. Grazie all'applicazione delle sonde (primer) la sequenza viene amplificata tramite PCR. I prodotti di amplificazione vengono quindi confrontati fra loro e le differenze vengono messe in evidenza. Esistono vari tipi di marcatori molecolari, revisionati ampiamente da Avise (2004). In particolare in questo lavoro sono stati utilizzati marcatori microsatellitari.

I marcatori microsatellitari (Ellegren, 2004) sono composti da sequenze di DNA microsatellite. Il DNA microsatellite è costituito da sequenze non-codificanti, intersperse all'interno del genoma nucleare delle varie specie. Ciascun locus microsatellitare è costituito da un motivo di 2-10 paia di basi ripetuto in tandem un certo numero di volte, delimitato a monte e a valle da due regioni non-codificanti conservate. Disegnando specifiche sonde che si legano a monte e a valle del

microsatellite è possibile amplificare il locus e predisporlo per l'analisi. In vivo, durante la replicazione del DNA microsatellite, la polimerasi può compiere degli errori di scivolamento che comportano l'aggiunta o la sottrazione di una o più ripetizioni, quindi i loci microsatellitari sono caratterizzati da un tasso elevato di mutazione. Inoltre, le sequenze di DNA microsatellite non sono codificanti e non sono quindi sottoposte ai vincoli della selezione naturale. Per questi motivi, i loci microsatellitari sono caratterizzati da un alto grado di polimorfismo, e sono particolarmente indicati per la valutazione della variabilità genetica su piccola scala, sia temporale che spaziale. La variabilità dei marcatori microsatellitari viene valutata in base alla variabilità nel numero di ripetizioni che compongono la loro sequenza.

OBIETTIVI

Il presente lavoro di tesi si propone di analizzare la struttura genetica del crostaceo cirripede *Chthamalus montagui* all'interno del Mediterraneo, utilizzando 6 marcatori molecolari microsatellitari specie-specifici.

L'esistenza di differenziazione genetica significativa in *C. montagui* è già stata verificata in altri lavori, in particolar modo fra le località atlantiche e quelle mediterranee e fra le località mediterranee e quelle del Mare Egeo e del Mar Nero.

L'obiettivo principale di questo lavoro consiste nel verificare se esiste o meno una differenziazione genetica significativa fra le località situate nel Mediterraneo occidentale, quelle situate nel Mar Egeo-Mar Nero e quelle situate nel Mare Adriatico.

In particolare, la struttura genetica di *C. montagui* viene analizzata in corrispondenza di tre aree geografiche, che sono state segnalate in letteratura come potenziali regioni di discontinuità biogeografia all'interno del Mediterraneo: l'area del Canale di Sicilia, l'area del Canale d'Otranto e l'area dell'Arco Ellenico.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Località analizzate e campionamenti

Per analizzare la struttura genetica di *C. montagui* nell'area atlantico-mediterranea sono state considerate 11 località: Biarritz (Francia), Palma de Mallorca (Spagna), Baia Blu (Italia, Liguria), Cala Sinzias (Italia, Sardegna), Malta, Portonovo (Italia, Marche), Zaton (Croazia), Grado (Italia, Friuli-Venezia-Giulia), Volos (Grecia), Büyükada (Turchia) e Sozopol (Bulgaria) (Fig. 2.1; Tab. 2.1).



Fig.2.1. Mappa delle località di campionamento considerate nello studio della struttura genetica di *C. montagui*, le località rappresentate in rosso sono state analizzate in laboratorio da me, quelle rappresentate in verde da Fontani e quelle rappresentate in rosso da Maracci. Le sigle sono spiegate in tab. 2.1.

Di queste 11 località, 4 sono state analizzate in laboratorio da me personalmente (Biarritz, Cala Sinzias, Malta e Zaton). Le popolazioni di Palma de Mallorca, Volos, Büyükada e Sozopol sono state analizzate nello stesso laboratorio in un recente lavoro di Tesi di Laurea Magistrale (Maracci, 2013), mentre le popolazioni di Baia Blu, Portonovo e Grado sono state analizzate nell'ambito di una Tesi Dottorale (Fontani, 2008).

Tab 2.1. Località campionate, sigle di riferimento, numero di individui campionati, date di campionamento e coordinate geografiche di riferimento espresse in gradi, minuti e secondi (n.d.=non disponibile).

Località	Sigla	N	Data di campionamento	Latitudine	Longitudine
Biarritz	BRZ	37	n.d.	43°28'48"N	1°34'12"W
Palma de Mallorca	PAL	47	Aprile 2010	39°27'0"N	2°44'24"E
Baia Blu	BBL	32	Luglio 2003	44°4'48"N	9°53'24"E
Cala Sinzias	CSZ	37	Agosto 2013	39°11'24"N	9°34'12"E
Malta	MLT	40	Luglio 2013	35°53'60"N	14°30'36"E
Portonovo	PNO	32	Ottobre 2003	43°34'12"N	13°35'60"E
Zaton	ZAT	37	Agosto 2013	42°41'24"N	18°2'24"E
Grado	GRD	32	Ottobre 2003	45°40'12"N	13°23'24"E
Volos	VOL	32	n.d.	39°20'24"N	22°56'24"E
Büyükada	BUY	31	Ottobre 2003	40°50'24"N	29°6'36"E
Sozopol	SOZ	31	Maggio 2005	42°25'12N	27°42'0"E

Per ciascuna località gli individui sono stati prelevati utilizzando un temperino dalla zona di massima densità di ctamali all'interno di un'area di campionamento di pochi metri quadrati. La scala spaziale dei campionamenti (decina di metri) risulta appropriata all'analisi della variabilità genetica in *C. montagui*, secondo quanto osservato da Fontani (2008). Gli individui sono stati rimossi dal substrato ed immediatamente fissati in etanolo al 96%, quindi trasportati in laboratorio e conservati a -20°C.

2.2 Estrazione del DNA.

Per estrarre il DNA, gli individui sono stati privati della muraglia e dell'opercolo calcarei. Laddove presenti, le uova sono state rimosse, assieme all'eventuale detrito e ad altri accumuli di sostanza organica presenti. Il DNA totale è stato estratto a partire dal tessuto molle dell'individuo intero secondo il metodo del Salting Out (Aljanabi & Martinez, 1997) (Appendice A). Il DNA estratto è stato sospeso in tampone Tris-EDTA e conservato a -20°C.

Per verificare che l'estrazione del DNA fosse avvenuta con successo, 3 µl del prodotto estratto da ciascun individuo sono stati analizzati tramite gel-elettroforesi su gel di agarosio all'1%, utilizzando bromuro di etidio come marcatore fluorescente

intercalante del DNA. Le corse sono state condotte a 100mV per 30 minuti. I gel sono stati visualizzati e fotografati al trans-illuminatore (Fig. 2.2).

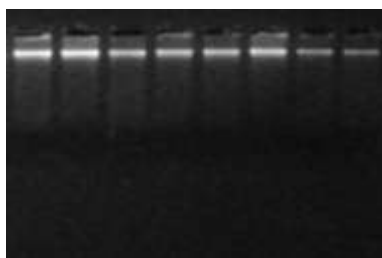


Fig. 2.2. Esempio di corsa elettroforetica utilizzata per verificare l'estrazione del DNA. Le bande fluorescenti indicano la presenza di DNA, mentre l'intensità e lo spessore delle bande sono indicativi della concentrazione di DNA presente.

2.3 Amplificazione dei frammenti

Per ciascun individuo sono stati analizzati 6 loci microsatellitari (Tab. 2.2). I primer utilizzati per amplificare ciascun locus, sviluppati da Pannacciulli *et al.* (2005), sono specie-specifici nonché altamente polimorfici.

Tab. 2.2. Primer utilizzati per l'amplificazione dei 6 loci microsatellitari analizzati. Per i loci CM4/3 e CM4/5 vedi anche Tab. 2.3. Per ciascun locus sono riportati la denominazione, il motivo ripetuto, la sequenza dei primer utilizzati, la temperatura di melting di ciascun primer ed il codice di riferimento sotto il quale le sequenze dei primer sono state depositate in GenBank

Locus	Ripetizione	Primer (5'-3')	T _m (°C)	GeneBank n°
CM2/15	(CA) _n	F: GTACGAGTGGCTTCGCTTG	54.5	AY847005
		R: ATGTTTGCCATGATGTAGGC	52.1	
CM4/3	(GT) _n AT(GT) _n	F: TGCTCACAACCATGACTGG	54.0	AY847006
		R: ACGCTAAAGAGGCACATTCG	54.4	
CM4/5	(AC) _n TCGC(AC) _n	F: TGATTGTCGGTTTAGCAACG	52.5	AY847007
		R: TCACTGTGAAGTCTGACATGG	53.5	
CM5/18	(TG) _n TA(TG) _n TT(TG) _n	F: GGGATGACTGCTCGATTAGG	53.2	AY847009
		R: GCATGTACACGTCAAACACG	53.9	
CM5/23	(AC) _n (GC) _n (AC) _n	F: CGCTCTCCCTCAAACTCC	53.3	AY847010
		R: ACCGTGAGTAACAGCATACG	53.5	
CM9/11	(GT) _n AG(GT) _n	F: ACAAGCCTTCGCCTCATTCC	56.3	AY847012
		R: CCCACTTATCAACGCTTCTGC	55.6	

Nel corso delle analisi, l'amplificazione del locus CM4/3 e del locus CM4/5 sono risultate problematiche: in particolare per alcune delle popolazioni analizzate, le coppie di primer utilizzate non hanno fornito risultati soddisfacenti. Per superare

queste difficoltà sono state disegnate un'ulteriore coppia di primer per il locus CM4/3 e due ulteriori coppie per il locus CM4/5 (Tab. 2.3).

Tab. 2.3. Primer aggiuntivi disegnati appositamente per l'amplificazione dei loci CM4/3 e CM4/5.

Locus	Sequenze primer (5'-3')	T _m (°C)
CM4/3	AF: GTGCAGTCTGCTCACAAACC	63.6
	AR: GAAAGCTGGTCAAGCTAACG	61.6
CM4/5	AF: GTTTTGCCAGGTCGAGGC	65.9
	AR: TGAAGTCTGACATGGACGAAAG	64.2
	BR: AAGCTGGAGAGACCGACTG	62.3

Per il locus CM4/3 è stata disegnata una nuova coppia di primer, rispettivamente denominati CM4/3AF (forward) e CM4/3AR (reverse), mentre per il locus CM4/5 sono stati disegnati tre primer, che possono essere assortiti in modo tale da formare due possibili coppie, rispettivamente CM4/5AF-CM4/5AR e CM4/5AF-CM4/5BR (Tab. 2.3). I frammenti amplificati con la coppia di primer CM4/3AF-AR sono sistematicamente più corti (-24bp) rispetto a quelli amplificati con i primer disegnati da Pannacciulli *et al.* (2005), mentre quelli amplificati con la coppia CM4/5AF-AR sono sistematicamente più lunghi (+28bp), come quelli amplificati con la coppia CM4/5AF-BR (+36bp). Ai frammenti amplificati con queste coppie di primer sono state quindi aggiunte o sottratte, a seconda della necessità, le paia di basi in difetto o in eccesso, in modo tale da rendere perfettamente confrontabili tra loro i risultati ottenuti con i primer disegnati da Pannacciulli *et al.* (2005) e quelli ottenuti con i primer di nuovo disegno. Le amplificazioni condotte con le nuove coppie di primer hanno dato risultati soddisfacenti, permettendo di portare a termine le analisi sui loci CM4/3 e CM4/5. Sia nelle analisi condotte da me che in quelle condotte da Maracci (2013), per l'amplificazione dei loci CM4/3 e CM4/5 sono stati utilizzati sia i primer sviluppati da Pannacciulli *et al.* (2005) (Tab.2.2) che quelli aggiuntivi (Tab. 2.3). Le analisi condotte da Fontani (2008) sono state realizzate utilizzando esclusivamente i primer sviluppati da Pannacciulli *et al.* (2005).

L'amplificazione dei frammenti è stata condotta con un termociclatore MJ Research, modello PTC-200. La mix di reazione è stata la stessa per tutti i loci amplificati (Tab. 2.4).

Tab. 2.4. Composizione della mix di reazione utilizzata per amplificare i loci analizzati. CI: concentrazione iniziale; CF: concentrazione finale; V: volume; VF: volume finale.

	CI	CF	V
Buffer (senza MgCl₂)	10 x	1 x	1.5 µl
MgCl₂	25 mM	1.5 mM	0.9 µl
Q solution (Qiagen)	5 x	1 x	3.0 µl
dNTPs	2.5 µM	0.2 µM	1.2 µl
Primer F	10 µM	1 µM	1.5 µl
Primer R	10 µM	1 µM	1.5 µl
H₂O	/	/	3.75 µl
JumpStart Taq DNA Polimerase (Sigma)	5 U/µl	0.05 U/µl	0.15 µl
DNA templatato	30 ng/µl	3 ng/µl	1.5 µl
	VF		15 µl

Per ciascuna reazione di amplificazione è stato predisposto uno step iniziale di denaturazione a 95°C per 15', seguito da 31 cicli ripetuti di tre step ciascuno: 1) denaturazione a 95°C per 30"; 2) appaiamento ad una temperatura specifica per ciascun locus (Tab 2.5), di durata variabile come specificato di seguito; 3) estensione a 72°C per 30". Al termine dei 31 cicli è stato predisposto un ultimo step di allungamento a 72°C per 10'. La fase di appaiamento (fase 2) utilizzata ha avuto una durata iniziale di 1'32", ma è stata abbreviata di 2" a ciascun ciclo, per tutti i 30 cicli successivi, fino ad arrivare ad una durata di 32". Questa strategia, particolarmente indicata quando si utilizzano primer marcati con fluorescenza, permette di lavorare con temperature di appaiamento elevate, che garantiscono un'amplificazione specifica e stringente (Yu *et al.*, 2010). Mettendo a confronto la qualità dell'amplificato ottenuto con temperature di appaiamento differenti, utilizzando PCR a gradiente termico, è stato possibile selezionare per ciascuna coppia di primer una temperatura di appaiamento ottimale (Tab.2.5).

Tab. 2.5. Temperature di appaiamento ottimali per ciascun locus analizzato.

Locus	T_{appaiamento} (°C)
CM2/15	56.0
CM4/3	53.1
CM4/3AF-AR	62.0
CM4/5	45.4
CM4/5AF-AR	62.0
CM4/5AF-BR	62.0
CM5/18	45.4
CM5/23	53.8
CM9/11	57.6

Tutti i primer forward utilizzati nello studio sono stati marcati all'estremità 5' con sonde fluorescenti, per rendere possibile la lettura della taglia dei frammenti sul sequenziatore in fase di analisi dei prodotti di amplificazione. Le fluorescenze utilizzate sono di tre tipi diversi, denominate rispettivamente 6-FAM, HEX e NED. I primer forward utilizzati per i loci CM2/15 e CM5/23 sono stati marcati con 6-FAM, quelli utilizzati per i loci CM5/18 e CM9/11 sono stati marcati con NED e quelli utilizzati per i loci CM4/3 e CM4/5 sono stati marcati con HEX.

Per verificare il risultato delle reazioni di amplificazione, 7 µl di ciascun prodotto amplificato sono stati separati tramite gel-elettroforesi su gel di agarosio al 2%, utilizzando bromuro di etidio come marcatore fluorescente intercalante del DNA ed uno standard di riferimento per la valutazione della taglia dei frammenti amplificati (100 bp ladder, NewEngland BioLabs). Le corse sono state condotte a 80mV per 1h 15min. I gel sono stati visualizzati e fotografati al trans-illuminatore (Fig. 2.3).

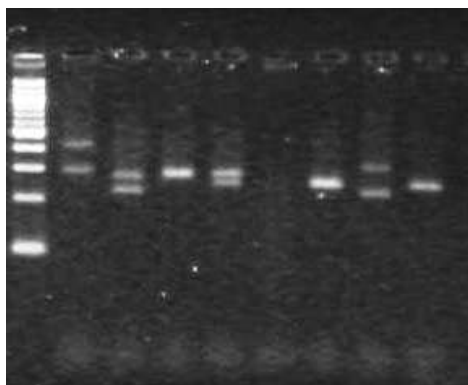


Fig. 2.3. Risultato di corsa elettroforetica di prodotti di amplificazione del locus CM2/15. Nella prima colonna a sinistra, standard di riferimento (100 bp); nelle altre colonne, bande relative ai prodotti di amplificazione. Le bande confermano la presenza del prodotto amplificato. In colonna 6 da sinistra, assenza di prodotti amplificati.

2.4 Analisi dei frammenti

I prodotti amplificati sono stati inviati per l'analisi tramite elettroforesi capillare ad una ditta estera (Molecular Cloning Laboratories o MACLAB, San Francisco, USA). Per le spedizioni sono state utilizzate piastre a 96 pozzetti. In ciascun pozzetto sono stati caricati 9.0 μ l di prodotto amplificato, di cui 3.0 μ l per ciascuna delle tre fluorescenze utilizzate (6-FAM, HEX e NED), in questo modo, all'interno di ciascun pozzetto sono stati caricati prodotti provenienti da tre loci diversi. In ciascuna piastra inviata è stato inserito un controllo positivo per rendere confrontabili i risultati provenienti da piastre differenti. I controlli positivi utilizzati non sono a sequenza nota. È stato in alcuni casi osservato che soprattutto nel caso di microsatelliti composti, come quelli utilizzati nel presente studio, non è possibile escludere l'evenienza che due frammenti delle stesse dimensioni abbiano due sequenze diverse. Per questo motivo, potrebbe sembrare più opportuno utilizzare controlli positivi a sequenza nota. Pensandoci meglio però, la sicurezza della corrispondenza univoca fra taglia e sequenza potrebbe essere raggiunta solamente sequenziando direttamente ciascun frammento. Il sequenziamento diretto di ciascun frammento risulta però molto dispendioso, e la quantità di informazione che potrebbe essere ottenuta appare non proporzionata allo sforzo richiesto per ottenerla. Per questo motivo non sono stati utilizzati controlli positivi a sequenza nota. Per escludere l'ipotesi che l'eventuale diversità riscontrata tra le località fosse dovuta a differenze nei processi di analisi piuttosto che a reali divergenze genetiche, in ciascuna piastra sono stati inseriti prodotti amplificati di individui appartenenti a località diverse.

I risultati dell'elettroforesi capillare sono stati visualizzati e analizzati con il software PeakScanner 1.0 (Applied Biosystems). I singoli picchi sono stati misurati direttamente, mentre in presenza di *stutter bands* è stato considerato solamente il picco più alto. I picchi singoli possono anche rappresentare degli artefatti legati alla tecnica utilizzata, dovuti soprattutto alla sovrapposizione del segnale causata dalla presenza all'interno del medesimo pozzetto di fluorescenze di tipo diverso. I picchi singoli legati alla presenza di un allele e quelli legati ad artefatti possono essere distinti osservando la conformazione alla base del picco, che tende ad essere allargata nel primo caso e più stretta nel secondo. Un ulteriore controllo per escludere gli artefatti consiste nel visualizzare all'interno degli elettroferogrammi tutte le fluorescenze contemporaneamente, in modo da individuare eventuali picchi sovrapposti. In caso di picchi sovrapposti è stato letto solamente il picco più evidente.

In seguito alla fase di lettura dei picchi, ai frammenti amplificati sono state assegnate le rispettive dimensioni in numero di basi, a due cifre decimali (es: 152.84 bp). Quindi per ciascun locus i dati relativi alle dimensioni dei frammenti sono stati raggruppati in classi di taglia di ampiezza 0.1 bp. Le numerosità osservate all'interno di ciascuna classe di taglia sono state messe a confronto all'interno di grafici taglia-frequenza. Nei casi in cui una classe di taglia presentasse un unico frammento, si è proceduto a ricontrollare i cromatogrammi per verificare la reale esistenza dell'allele raro. Le classi di taglia sono state quindi raggruppate all'interno di classi alleliche di ampiezza 2bp (si tratta infatti di loci microsatellitari composti da ripetizioni di 2bp), in modo tale da minimizzare la varianza della distribuzione di frequenza delle classi di taglia all'interno di ciascuna classe allelica. A ciascuna classe allelica è stata assegnata una denominazione distintiva, e tutti i frammenti amplificati assegnati all'interno della medesima classe allelica sono stati trattati come se fossero il medesimo allele, denominato secondo la classe allelica di appartenenza. I dati relativi a tutti i loci e a tutti gli individui analizzati sono infine stati raccolti ed organizzati all'interno di un dataset.

Poiché i dati utilizzati per condurre le analisi statistiche presentate in questo lavoro sono stati prodotti da tre diversi sperimentatori in tre momenti separati, è stata condotta un'operazione di unificazione delle assegnazioni degli alleli all'interno delle

classi alleliche. I dati prodotti da ciascuno dei tre sperimentatori sono stati riuniti all'interno di grafici di taglia-frequenza complessivi e le assegnazioni di ciascun frammento all'interno della corrispondente classe allelica è stata ri-effettuata sulla base di questi nuovi grafici. In questo modo, grazie al maggior numero di frammenti presenti nel dataset complessivo, è stato possibile perfezionarne l'assegnazione all'interno delle rispettive classi alleliche.

2.5 Analisi statistica dei dati

Le analisi statistiche sono state svolte su un dataset composto da un totale di 355 individui, suddivisi in 11 località, analizzati per 6 loci microsatellitari.

L'indipendenza della segregazione di ciascun locus rispetto agli altri (linkage disequilibrium) è stata verificata tramite un test di permutazione con 10000 repliche fra coppie di loci, realizzato utilizzando il software GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995).

Per ciascun locus e per ciascuna popolazione sono stati calcolati: il numero medio di individui analizzati, il numero totale di alleli rilevati ed il numero di alleli privati. Le frequenze alleliche sono state calcolate per ciascun locus e per ciascuna popolazione utilizzando il software GENEPOP (Appendice B).

Sulla base delle frequenze alleliche, le località sono state sottoposte ad un test di permutazione (10000 repliche) per verificare l'equilibrio di Hardy-Weinberg (HW) relativo a ciascun locus. Anche questo test statistico è stato realizzato con il software GENEPOP. Ai valori di probabilità ottenuti è stata successivamente applicata la correzione sequenziale di Bonferroni (Hochberg, 1988).

Per ciascuna località sono stati calcolati i seguenti stimatori di diversità genetica: numero medio di alleli (N_a), eterozigosità media osservata (H_o), eterozigosità media attesa (H_e) e ricchezza allelica media (R_a). Il calcolo della ricchezza allelica media è stato basato su una procedura di rarefazione dei campioni. Anche questi stimatori sono stati calcolati utilizzando il software GENEPOP. In seguito ad opportuna trasformazione in $\arcsen(\sqrt{x})$, i valori medi dell'eterozigosità osservata rilevati nei campioni locali sono stati confrontati tramite t-test e le significatività sono state corrette con il metodo sequenziale di Bonferroni.

La struttura genetica è stata analizzata con la F -statistica di Weir & Cockerham (1984). Gli indici di fissazione e di inbreeding, rispettivamente F_{st} ed F_{is} , sono stati calcolati mediante i software GENETIX (Belkhir *et al.*, 2001) ed FSTAT (Goudet, 2001). La stima della varianza ad essi associata (deviazione standard) è stata ottenuta mediante la tecnica di ricampionamento statistico del jackknifing (Efron, 1979). Le significatività dei valori di F_{is} ed F_{st} sono state testate tramite procedura di permutazione con 10000 repliche. Il flusso genico tra popolazioni è stato stimato secondo la seguente relazione (Wright, 1943):

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

dove Nm = numero di migranti efficaci (cioè che si riproducono nella popolazione di destinazione) per generazione. Il flusso genico è stato stimato anche mediante il metodo degli alleli privati (Slatkin, 1985), secondo la seguente relazione:

$$\ln [p(1)] = a \ln (Nm) + b$$

dove $p(1)$ è la frequenza degli alleli privati mentre a e b sono costanti che dipendono dalla taglia del campione (Slatkin, 1985). Le stime di flusso genico basate sui valori di F_{ST} sono state calcolate con il software GENETIX, mentre quelle basate sul metodo degli alleli privati sono state ottenute tramite il software GENEPOP. I parametri calcolati tramite la F -statistica sono stati utilizzati unitamente ai dati relativi alle distanze minime nautiche fra le località considerate, stimate con Google Earth, per testare l'ipotesi dell'isolamento da distanza: il coefficiente di Mantel (Z) ed il valore di probabilità associata (P) sono stati ottenuti mediante test di permutazione con 10000 repliche (software utilizzato: Ibd on the web).

Sulla matrice delle distanze genetiche di Cavalli-Sforza & Edwards (1967) fra località è stato applicato il multidimensional scaling (MDS) (Lessa, 1990). Sono state effettuate due analisi: la prima con tutte le località analizzate, la seconda escludendo la località atlantica di Biarritz. I grafici MDS sono stati prodotti utilizzando il software PRIMER-E (Clarke & Warwick, 2001). L'attendibilità dell'ordinamento MDS è stata valutata mediante l'indice di stress secondo i suggerimenti di Sturrock & Rocha (2000).

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA) è stata eseguita con il software ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005). Sono state condotte cinque analisi separate. Nella prima sono state incluse tutte le località tranne Biarritz e la varianza molecolare è stata ripartita all'interno di due componenti: 1) entro-località e 2) fra località. Nella seconda sono state incluse tutte le località tranne Biarritz e Malta e le località sono state suddivise in tre gruppi geografici: il gruppo del Mediterraneo Occidentale (Palma de Mallorca, Baia Blu e Cala Sinzias), il gruppo del Mare Adriatico (Portonovo, Zaton e Grado) ed il gruppo del Mare Egeo-Mar Nero (Volos, Büyükada e Sozopol). In questa analisi la varianza molecolare è stata ripartita in 3 componenti: 1) entro-località, 2) fra località entro-gruppi e 3) fra gruppi. Lo stesso schema di ripartizione dei gruppi è stato mantenuto nelle successive tre analisi, ma è stata aggiunta Malta, prima nel gruppo del Mediterraneo occidentale (analisi n°3), poi nel gruppo dell'Adriatico (analisi n°4) ed infine nel gruppo dell'Egeo-M.Nero (analisi n°5). La varianza molecolare è stata ripartita sempre nelle componenti 1) entro-località, 2) fra località entro gruppi e 3) fra gruppi.

Attraverso l'approccio statistico di tipo Bayesiano del software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), è stata inferita la struttura genetica presente all'interno del dataset. Gli individui sono stati assegnati all'interno di differenti cluster genetici sulla base dei loro genotipi. Il numero massimo di cluster genetici (K_{max}) all'interno dei quali gli individui devono essere assegnati viene stabilito a priori dallo sperimentatore; di solito vengono considerati valori di K da 1 a $n+3$, dove n è il numero di campioni locali (Evanno *et al.* 2005). Il programma lavora in modo iterativo, ripetendo il procedimento di assegnazione per ciascun valore di K compreso fra 1 e K_{max} , quindi calcola la probabilità a posteriori per ciascuna di queste ripetizioni. Le probabilità a posteriori associate alle varie ripetizioni vengono infine confrontate fra loro per determinare il valore di K che ha ricevuto il maggiore supporto statistico. In questo studio sono state condotte due analisi di questo tipo, una sul dataset completo, l'altra escludendo la località di Biarritz. Per ciascun valore di K sono state effettuate cinque repliche (*burnin*: 100000; iterazioni: 900000). Per stabilire il valore di K da accettare è stato utilizzato il metodo di Evanno *et al.* (2005) impiegando il programma online STRUCTURE HARVESTER (Earl e vonHoldt, 2012).

3. RISULTATI

3.1 Linkage disequilibrium, stime di diversità genetica ed equilibrio di Hardy-Weinberg.

La diversità genetica di *Chthamalus montagui* nell'area di studio è stata stimata analizzando 6 loci microsatellitari in 355 individui suddivisi in 11 località. L'analisi del linkage disequilibrium sui loci presi a coppie non ha restituito nessun risultato significativo. I 6 loci, quindi, possono essere trattati come marcatori genetici indipendenti.

Il locus che ha mostrato il numero maggiore di alleli è CM5/23, con 73 alleli campionati, mentre quello che ne ha mostrato il numero minore è CM2/15, con 29. La località con il maggior numero complessivo di alleli campionati è Büyükada, con 109 alleli (di cui 12 privati), mentre quella con il minor numero è Baia Blu, con 69 (di cui 3 privati). La località con il maggior numero di alleli privati è Biarritz (17), mentre quelle che ne presentano il minor numero sono Baia Blu e Grado (3) (Tab. 3.1).

Tab. 3.1. Numero di alleli rilevati per locus e per località; gli alleli privati sono riportati tra parentesi. Sigle delle località come in Tab. 2.1..

	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ	TOT.
CM2/15	2	9 (1)	9	12 (1)	14 (3)	10	11 (1)	10 (1)	9 (2)	13	14	29 (9)
CM4/3	20 (8)	13 (1)	9 (1)	12 (1)	7	10 (2)	12 (2)	8	13 (2)	13 (1)	13 (2)	39 (20)
CM4/5	22 (3)	16 (1)	11 (1)	13 (1)	11 (1)	14 (1)	16 (2)	15	8 (1)	13 (5)	8 (2)	49 (18)
CM5/18	12 (5)	8 (1)	9	10	13 (4)	8 (2)	10	11 (2)	8 (1)	12 (1)	11	34 (16)
CM5/23	9	27	14	40 (5)	31	30	38	30	33 (3)	33 (2)	32	73 (10)
CM9/11	18 (1)	19 (1)	17 (1)	18 (1)	18 (1)	12	21	12	30 (5)	25 (3)	26 (2)	52 (15)
Tot	83 (17)	92 (5)	69 (3)	105 (9)	94 (9)	84 (5)	108 (5)	86 (3)	101 (14)	109 (12)	104 (6)	

Non è possibile attribuire a questi risultati un'interpretazione immediata, poiché il numero di individui analizzati per locus e per località varia leggermente da un campione all'altro (Tab. 3.2).

Tab. 3.2. Numero di individui analizzati per ciascun locus e ciascuna località.

	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ
CM 2/15	34	30	23	36	40	30	36	29	30	30	30
CM 4/3	33	30	25	37	40	22	37	25	30	30	30
CM 4/5	30	27	24	30	24	28	28	27	26	29	28
CM 5/18	32	30	25	35	39	23	34	25	30	30	29
CM 5/23	35	30	24	37	39	29	37	27	30	30	30
CM 9/11	32	30	24	35	40	22	35	25	30	30	30
Media	32.67	29.50	24.17	35.00	37.00	25.67	34.50	26.33	29.33	29.83	29.50
dev. st.	1.75	1.22	0.73	2.61	6.39	3.72	3.39	1.63	1.63	0.41	0.84

Il numero medio di alleli maggiore è stato rilevato a Büyükada, mentre quello minore a Baia Blu. Il valore massimo di eterozigosità media, sia attesa che osservata, è stato registrato a Sozopol, mentre il valore minimo di eterozigosità media attesa è stato registrato a Biarritz ed il valore minimo di eterozigosità media osservata è stato registrato a Malta. La ricchezza allelica media maggiore è stata rilevata a Büyükada, mentre quella minore è stata rilevata a Baia Blu (Tab. 3.3).

Tab. 3.3. Stime di diversità genetica rilevate nelle località analizzate; *Na*: numero medio di alleli rilevati; *He*: eterozigosità media attesa secondo Hardy-Weinberg; *Ho*: eterozigosità media osservata; *Ra*: ricchezza allelica media.

	<i>Na</i>		<i>He</i>		<i>Ho</i>		<i>Ra</i> *	
	media	dev. st.	media	dev. st.	Media	dev. st.	media	dev. st.
BRZ	13.833	7.600	0.720	0.282	0.409	0.150	12.058	6.783
PAL	15.333	7.062	0.815	0.127	0.533	0.249	13.730	6.128
BBL	11.500	3.332	0.759	0.129	0.524	0.255	11.088	3.189
CSZ	17.500	11.345	0.775	0.191	0.502	0.251	13.991	7.999
MLT	15.667	8.335	0.760	0.131	0.383	0.166	12.609	6.137
PNO	14.000	8.099	0.784	0.150	0.415	0.147	13.101	6.653
ZAT	18.000	10.602	0.784	0.138	0.447	0.210	14.665	7.533
GRD	14.333	8.017	0.785	0.122	0.405	0.147	13.239	6.979
VOL	16.833	11.548	0.810	0.154	0.526	0.261	14.677	9.380
BUY	18.167	8.773	0.819	0.127	0.535	0.226	15.688	7.053
SOZ	17.333	9.459	0.839	0.104	0.574	0.215	15.297	7.800

*Stime ottenute in seguito a procedura di rarefazione dei campioni ($N=22$).

Tutte le località sono risultate significativamente fuori dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HW) per almeno 3 dei loci analizzati. Malta e Grado sono risultate deviare

dall'equilibrio per tutti i loci considerati. Applicando la correzione sequenziale di Bonferroni, la significatività dei test è rimasta invariata (Tab. 3.4).

Tab. 3.4. Risultati dei test per la valutazione dell'equilibrio di Hardy-Weinberg. Valori di probabilità ottenuti con test di permutazione (10000 repliche). In grassetto i valori risultati significativi.

	CM2/15	CM4/3	CM4/5	CM5/18	CM5/23	CM9/11
BRZ	0.2897	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1789	<0.0001
PAL	0.0054	0.0014	<0.0001	<0.0001	0.0001	0.2303
BBL	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0750	0.1188	0.8613
CSZ	0.0043	0.0004	<0.0001	0.1864	0.0035	0.0006
MLT	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0123
PNO	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0303	<0.0001	0.1356
ZAT	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0961
GRD	0.0400	<0.0001	<0.0001	0.0074	<0.0001	<0.0001
VOL	0.0017	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0015
BUY	0.0106	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0046
SOZ	0.1059	<0.0001	0.0007	<0.0001	<0.0001	0.0010

All'interno di tutte le località analizzate l'eterozigosità media osservata è risultata minore rispetto a quella attesa (Fig. 3.1). Il deficit di individui eterozigoti osservati, rispetto agli attesi, è in accordo con le numerose deviazioni dall'equilibrio di HW rilevate.

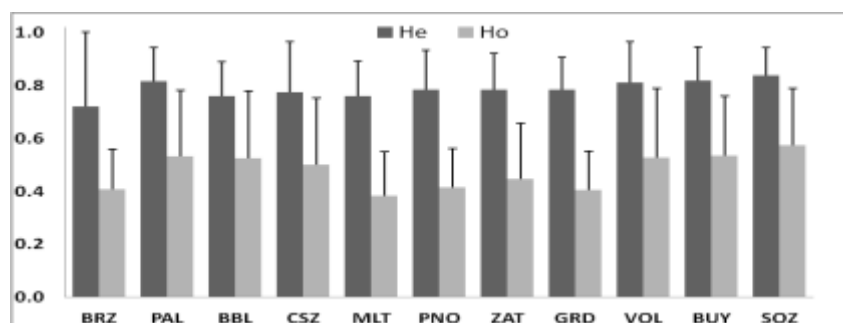


Fig. 3.1. Istogramma delle eterozigosità medie attese (H_e) ed osservate (H_o) nelle località analizzate con relative deviazioni standard.

Poiché le località sono risultate tutte fuori dall'equilibrio di HW per almeno 3 dei loci analizzati, per confrontare tra loro i valori medi di eterozigosità sono stati utilizzati i dati relativi alle eterozigosità medie osservate (Archie, 1985). In seguito al t-test effettuato per verificare la significatività delle differenze dei valori medi di

eterozigosità osservata fra coppie di località, sono risultati statisticamente significativi i confronti fra Malta e Cala Sinzias, Malta e Büyükada, Cala Sinzias e Büyükada, Portonovo e Sozopol. Tuttavia, applicando la correzione sequenziale di Bonferroni la significatività di questi test è stata invalidata.

Non è stata osservata alcuna tendenza geografica nella distribuzione della ricchezza allelica media (Fig 3.2).

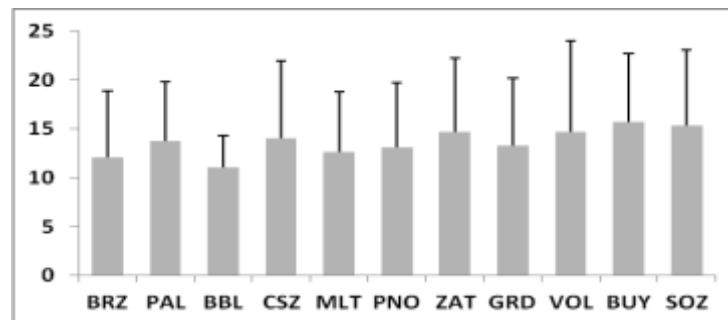


Fig. 3.2. Istogramma della ricchezza allelica media nelle località analizzate, ordinate in senso longitudinale da Ovest verso Est, con relative deviazioni standard. I valori sono stati ottenuti mediante procedura di rarefazione dei campioni ($N=22$).

3.2 Analisi della struttura genetica

I valori della F -statistica di Weir & Cockerham (1984) sono stati calcolati sia separatamente per ciascun locus che sul totale dei loci (Tab. 3.5).

Tab. 3.5. Valori della F -statistica di Weir & Cockerham (1984) per locus ed in totale

	F_{is}		F_{st}	
	media	dev. st.	media	dev. st.
CM2/15	0.342	0.047	0.072	0.057
CM4/3	0.487	0.042	0.047	0.02
CM4/5	0.685	0.045	0.093	0.022
CM5/18	0.452	0.037	0.025	0.011
CM5/23	0.262	0.036	0.051	0.032
CM9/11	0.237	0.05	0.075	0.026
tot.	0.406*	0.074	0.062*	0.009

*statisticamente significativo al test di permutazione con 10000 repliche

I valori di F_{is} calcolati per ciascun locus sono risultati compresi fra 0.237 ± 0.05 (CM9/11) e 0.685 ± 0.045 (CM4/5); il valore del coefficiente di inbreeding, calcolato sul totale dei loci, è risultato pari a $F_{is} = 0.406 \pm 0.074$, statisticamente significativo. I valori dell'indice di fissazione calcolati per ciascun locus sono risultati compresi fra $F_{st} = 0.025$

± 0.011 (CM5/18) e $F_{st} = 0.093 \pm 0.022$ (CM4/5); il valore calcolato sul totale dei loci è risultato invece pari a $F_{st} = 0.062 \pm 0.009$, statisticamente significativo.

I valori dell'indice di fissazione fra coppie di località sono risultati compresi fra $F_{st} = 0.0003$ (Büyükada-Volos) e $F_{st} = 0.1500$ (Biarritz-Malta) (Tab. 3.6).

Tab. 3.6. Distanze nautiche minime misurate in Km fra località (sopra la diagonale); valori di F_{st} calcolati per coppie di località (sotto la diagonale). In grassetto sono riportati i valori risultati non-significativi ($P > 0.05$) al test di permutazione con 10000 repliche.

	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ
BRZ	0	2560	3360	3130	3520	4630	4370	4900	4770	5190	5400
PAL	0.1302	0	770	600	1050	2180	1900	2380	2310	2610	2820
BBL	0.1293	0.0418	0	540	1000	2140	1850	2330	2260	2550	2760
CSZ	0.1437	0.0037	0.0495	0	540	1660	1400	1850	1810	2100	2300
MLT	0.1500	0.0489	0.0736	0.0579	0	1170	890	1360	1280	1610	1810
PNO	0.1256	0.0452	0.0300	0.0478	0.0759	0	390	230	1690	1990	2190
ZAT	0.1098	0.0285	0.0542	0.0309	0.0688	0.0554	0	570	1380	1690	1900
GRD	0.1073	0.0483	0.0401	0.0632	0.0880	0.0041	0.0458	0	1880	2180	1380
VOL	0.1030	0.0310	0.0520	0.0359	0.0587	0.0453	0.0441	0.0522	0	550	750
BUY	0.1301	0.0479	0.0727	0.0578	0.0692	0.0617	0.0696	0.0741	0.0003	0	230
SOZ	0.1133	0.0221	0.0508	0.0291	0.0457	0.0462	0.0427	0.0544	0.0004	0.0060	0

I confronti a coppie risultati non-significativi al test di permutazione sono quello fra Büyükada e Volos ($F_{st}=0.0003$), quello fra Volos e Sozopol ($F_{st}=0.0004$), quello fra Palma de Mallorca e Cala Sinzias ($F_{st}=0.0037$), quello fra Portonovo e Grado ($F_{st}=0.0041$) e quello fra Büyükada e Sozopol ($F_{st}=0.006$). Le distanze nautiche minime fra località misurate in Km vanno da 230 Km (Portonovo-Grado e Büyükada-Sozopol) a 5400 Km (Biarritz-Sozopol).

Il flusso genico calcolato per coppie di località sulla base della F -statistica varia fra $Nm=1.42$ (Biarritz-Malta) e $Nm=767.17$ (Volos-Büyükada) (Tab. 3.7). Il valore medio di flusso genico fra località è pari a $Nm=3.78$.

Tab. 3.7. Stime di flusso genico (Nm) fra coppie di località basate su F_{st} (Weir e Cockerham, 1984).

	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY
PAL	1.67									
BBL	1.68	5.73								
CSZ	1.49	67.10	4.80							
MLT	1.42	4.86	3.15	4.07						
PNO	1.74	5.28	8.09	4.98	3.04					
ZAT	2.03	8.53	4.36	7.83	3.38	4.26				
GRD	2.08	4.92	5.98	3.71	2.59	60.89	5.21			
VOL	2.18	7.80	4.55	6.72	4.01	5.27	5.42	4.54		
BUY	1.67	4.97	3.19	4.08	3.37	3.80	3.34	3.12	767.17	
SOZ	1.96	11.06	4.67	8.35	5.22	5.16	5.60	4.34	633.62	41.16

Il valore medio di flusso genico fra località è stato stimato anche con il metodo degli alleli privati di Slatkin (1985) ed è risultato in questo caso pari a $Nm = 6.22$.

Per quanto riguarda il test per la verifica della presenza di isolamento da distanza, la relazione tra F_{st} e distanza geografica per coppie di località, valutata sul dataset totale e testata tramite test di Mantel, è risultata statisticamente significativa (Fig. 3.3, a sinistra). In seguito alla rimozione di Biarritz dal dataset la relazione è risultata non-significativa, pur rimanendo molto vicina al limite di significatività (Fig. 3.3, a destra).

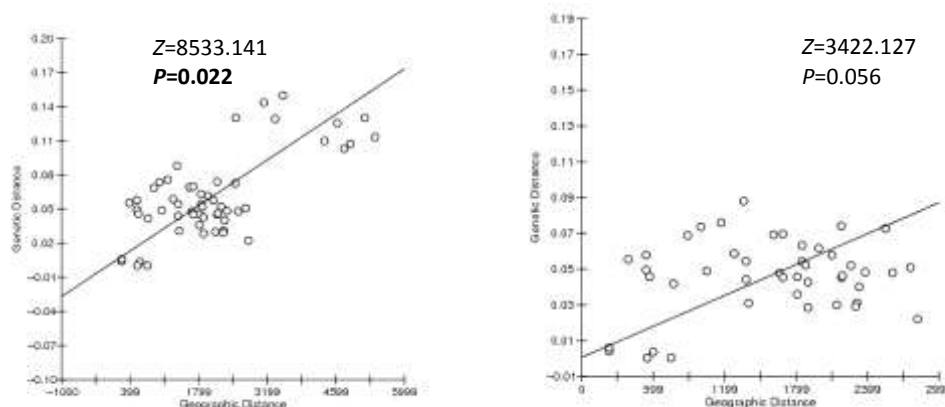


Fig. 3.3. Diagrammi della relazione tra F_{st} e distanze geografiche fra coppie di località: a sinistra, risultati ottenuti con dataset completo; a destra, risultati ottenuti escludendo la località di Biarritz. Z (coefficiente di Mantel) e P ottenuti mediante test di permutazione con 10000 repliche. In grassetto i valori risultati statisticamente significativi.

Sulla base dei valori della distanza genetica di Cavalli-Sforza & Edwards (1967) (Tab.3.8) sono stati effettuati due ordinamenti spaziali mediante multidimensional

scaling (MDS), uno con il dataset completo (Fig. 3.4, a sinistra), l'altro escludendo Biarritz dall'analisi (Fig. 3.4, a destra).

Tab. 3.8. Distanze genetiche di Cavalli-Sforza & Edwards (D) fra coppie di località.

	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ
BRZ	0										
PAL	0.052	0									
BBL	0.047	0.033	0								
CSZ	0.05	0.019	0.034	0							
MLT	0.053	0.029	0.036	0.03	0						
PNO	0.051	0.032	0.025	0.03	0.037	0					
ZAT	0.046	0.025	0.033	0.024	0.031	0.029	0				
GRD	0.049	0.032	0.027	0.033	0.035	0.023	0.027	0			
VOL	0.048	0.027	0.031	0.027	0.034	0.031	0.03	0.034	0		
BUY	0.057	0.032	0.039	0.036	0.034	0.033	0.035	0.04	0.021	0	
SOZ	0.051	0.026	0.034	0.025	0.031	0.03	0.026	0.035	0.019	0.021	0

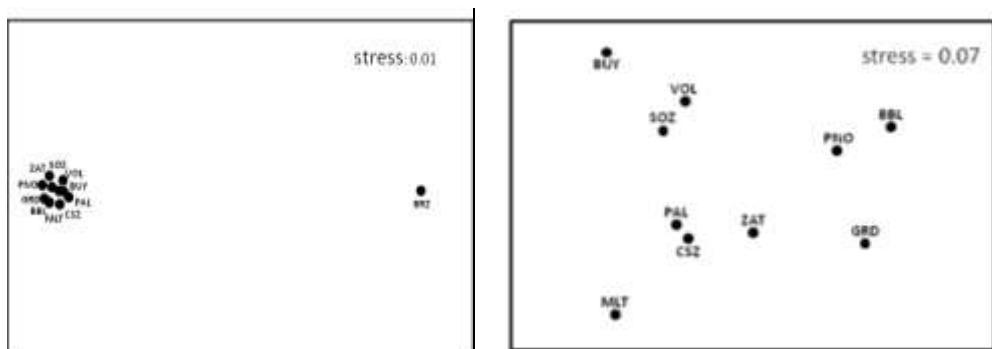


Fig. 3.4. Grafici MDS basati sui valori di distanza genetica di Cavalli-Sforza & Edwards. A sinistra, dataset completo; a destra, località di Biarritz esclusa.

Il grafico MDS costruito sull'intero dataset mette in evidenza la netta separazione fra Biarritz, unica località campionata in Atlantico, ed il resto delle località, tutte campionate in Mediterraneo, mentre quello costruito escludendo Biarritz dall'analisi mette in evidenza la separazione fra le località mediterranee. In questo grafico non si evidenziano particolari pattern geografici, fatta eccezione per i tre campioni più orientali che sono distribuiti nella parte in alto a sinistra del grafico. In entrambe le analisi i valori dell'indice di stress sono molto bassi, ad indicare che la rappresentazione grafica rispecchia fedelmente le relazioni tra le località presenti nelle matrici di distanza genetica originarie.

Per quanto riguarda le analisi della varianza molecolare (Tab.3.9), nella prima analisi (Tab.3.9-1), condotta in seguito all'esclusione di Biarritz dal dataset, le differenze tra località spiegano il 4.26% della varianza totale ($P<0.001$), mentre quelle tra individui all'interno delle località spiegano il restante 95.74%. Nella seconda analisi (Tab.3.9-2) condotta in seguito all'esclusione di Biarritz e di Malta e la suddivisione delle altre località all'interno di 3 gruppi geografici distinti (Mediterraneo occidentale, Egeo-M.Nero e Mare Adriatico), le differenze tra località entro gruppi spiegano il 2.28% della varianza totale ($P<0.001$), quelle tra i gruppi spiegano il 2.01% ($P<0.001$), ed il restante 95.71% è spiegato dalle differenze tra individui entro località ($P<0.001$). Inserendo Malta all'interno del gruppo del Mediterraneo occidentale (Tab.3.9-3), la componente entro gruppi sale a 2.98% ($P<0.001$) e quella tra gruppi scende a 1.73% ($P=0.003$); inserendo Malta all'interno dell'Egeo-M.Nero (Tab.3.9-4) la componente entro gruppi sale ancora a 3.17% ($P<0.001$) e quella tra gruppi scende a 1.47% ($P=0.008$); infine, inserendo Malta all'interno dell'Adriatico (Tab.3.9-5), le differenze entro gruppi aumentano a 3.22 ($P<0.001$) e quelle tra gruppi scendono a 1.42% ($P=0.01$).

Tab 3.9. Risultati delle cinque analisi AMOVA. I raggruppamenti geografici effettuati nella seconda analisi sono: Mediterraneo occidentale (Palma de Mallorca, Baia Blu e Cala Sinzias), Egeo-M.Nero (Volos, Büyükada e Sozopol), Mare Adriatico (Zaton, Portonovo, Grado).

fonte di variazione	gradi di libertà	componenti della varianza	percentuale di variazione	P-value
1.TRA LOCALITA' ALL'INTERNO DEL MEDITERRANEO				
fra località	9	0.09622	4.26	<0.000
entro località	630	2.16032	95.74	<0.000
2.TRA GRUPPI: MEDITERRANEO OCCIDENTALE, EGEO-M.NERO, ADRIATICO (MALTA ESCLUSA)				
fra gruppi	2	0.04583	2.01	<0.000
fra località entro gruppi	6	0.05192	2.28	<0.000
entro località	551	2.18317	95.71	<0.000
3.MALTA IN MEDITERRANEO OCCIDENTALE				
fra gruppi	2	0.03932	1.73	0.003
fra località entro gruppi	7	0.06746	2.98	<0.000
entro località	630	2.16032	95.29	<0.000
4.MALTA IN ADRIATICO				

fra gruppi	2	0.03213	1.42	0.01
fra località entro gruppi	7	0.07289	3.22	<0.000
entro località	630	2.16032	95.36	<0.000
5.MALTA IN EGEO-M.NERO				
fra gruppi	2	0.03329	1.47	0.008
fra località entro gruppi	7	0.07181	3.17	<0.000
entro località	630	2.16032	95.36	<0.000

L'analisi di assegnazione Bayesiana ha permesso di rilevare tre cluster genetici all'interno del dataset (Fig. 3.5). I livelli di probabilità associati ai diversi valori di K mostrano un andamento facilmente interpretabile, con valore modale pari a K=3 (Fig. 3.5, a destra). Le 5 repliche condotte in corrispondenza di ciascun valore di K hanno dato risultati fra loro concordi (Fig. 3.5, a sinistra).

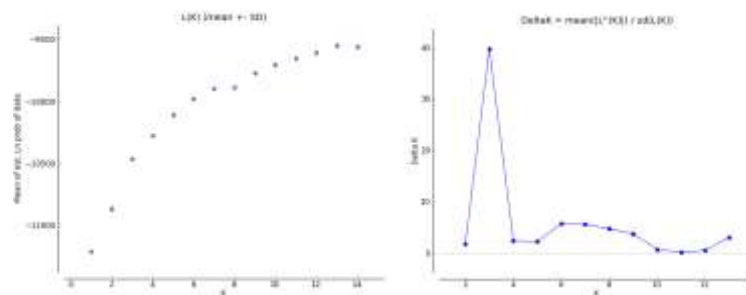


Fig. 3.5. Grafici relativi ai risultati della statistica Bayesiana. A sinistra, andamento della probabilità a posteriori all'aumentare di K. A destra, supporto statistico al variare di K, il valore modale di questa distribuzione rappresenta il valore di K (numero di clusters genetici) maggiormente supportato (Evanno *et al*, 2005).

La località di Biarritz risulta quasi totalmente assegnata all'interno del cluster A (Fig. 3.6 e Fig. 3.7). Solo una minima parte delle assegnazioni che interessano la località di Biarritz cadono all'interno degli altri due cluster. Le località di Buyukada e Sozopol risultano assegnate per più del 75% all'interno del cluster C. Le località di Volos, Zaton e Malta risultano assegnate all'interno del cluster C per un valore che supera il 50% ma resta al di sotto del 75%. La località di Baia Blu risulta assegnata all'interno del cluster B per più del 75%. Le località di Palma de Mallorca e di Cala Sinzias risultano assegnate circa a metà fra il cluster B ed il cluster C. le località di Portonovo e Grado risultano assegnate al cluster B per circa il 75%.

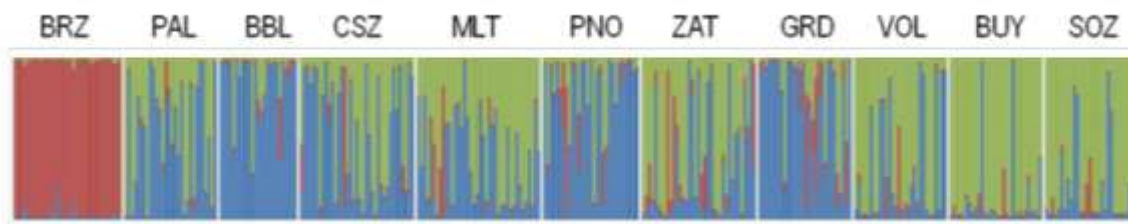


Fig. 3.6. Assegnazione dei livelli di appartenenza dei genotipi individuali all'interno dei tre cluster genetici rilevati. I blocchi rappresentano le località, mentre le barre verticali rappresentano i genotipi individuali.



Fig. 3.7. Rappresentazione grafica dell'assegnazione Bayesiana degli individui ai rispettivi cluster genetici all'interno delle varie località. I tre cluster genetici sono rappresentati con tre colori diversi (cluster A: rosso; cluster B: blu; cluster C: verde).

4. DISCUSSIONE

I campionamenti condotti per prelevare gli individui analizzati in questo studio hanno fornito spunti per effettuare alcune osservazioni riguardanti la distribuzione di *C. montagui* nel bacino del Mediterraneo. Per quel che riguarda i campionamenti condotti nel Mare Adriatico (Zaton) e a Malta, il ritrovamento di *C. montagui* all'interno di queste regioni non aggiunge nulla di nuovo alle precedenti conoscenze riguardanti la distribuzione della specie (Dando *et al.*, 1979; Crisp *et al.*, 1981; Dando, 1987; Pannacciulli *et al.*, 1997, Fontani, 2008; Shemesh *et al.*, 2009). Per quel che riguarda invece il campionamento condotto in Sardegna (Cala Sinzias), il ritrovamento di *C. montagui* in questa località rappresenta un dato nuovo riguardo alla distribuzione di *C. montagui* nel Mediterraneo.

I 6 loci microsatellitari utilizzati in questo studio hanno dimostrato di essere dei marcatori molecolari efficaci per analizzare la struttura genetica di *C. montagui* all'interno dell'area di studio. Tutti i test effettuati per il linkage disequilibrium sulle coppie di loci hanno restituito risultati negativi, quindi i loci possono essere trattati come indipendenti tra loro. Inoltre, il numero di alleli rilevati in corrispondenza di ciascun locus è molto elevato e consente di evidenziare efficacemente gli eventuali polimorfismi. Il numero di alleli molto elevato osservato soprattutto in corrispondenza del locus CM5/23 potrebbe essere dovuto a errori di lettura dei dati, come ad esempio l'erronea interpretazione di picchi cosiddetti "artefatti" come se fossero picchi allelici effettivi. Questa evenienza appare però poco probabile, dal momento che il numero elevato di alleli per il locus CM5/23 viene registrato sistematicamente all'interno di località analizzate da sperimentatori diversi. Gli individui analizzati da Fontani (2008), inoltre, sono stati tutti analizzati due volte per minimizzare l'impatto degli artefatti di lettura e, nonostante questo, il numero di alleli al locus CM5/23 risulta comunque molto elevato. Sembra dunque che il locus in questione sia effettivamente caratterizzato da una variabilità molto elevata.

Tutte le località analizzate sono risultate fuori dall'equilibrio di HW per almeno tre dei loci considerati. Questo risultato è in contrasto con quello ottenuto mediante l'uso di

marcatori alloenzimatici da Pannacciulli *et al.* (1997), ma è in accordo con i risultati ottenuti da Fontani (2008) e da Maracci (2013) utilizzando i medesimi loci microsatellitari del presente studio. La deviazione rispetto all'equilibrio di HW è stata già osservata in altre specie di invertebrati marini (Zouros & Foltz, 1984; Gaffney 1994; David *et al.* 1997; Ayre & Hughes, 2000; Ridgway *et al.* 2001; Addison & Hart 2004; Andrade & Solferini, 2007; Costantini *et al.*, 2007) compresi i cirripedi (Veliz *et al.*, 2006; York *et al.*, 2008).

Il deficit di individui eterozigoti osservato può essere dovuto alla presenza all'interno del dataset di cosiddetti "drop" allelici o di alleli nulli, ovvero di alleli che per diversi motivi non sono stati amplificati con successo nel corso delle reazioni di amplificazione (Peijnenburg *et al.*, 2006; Puebla *et al.*, 2008; Palero *et al.*, 2011). Simili errori di amplificazione possono essere ricondotti all'applicazione di una procedura poco accurata in fase di disegno dei primer. Se i primer vengono sviluppati in corrispondenza di tratti di sequenza poco conservati, all'interno delle regioni di appaiamento possono verificarsi delle mutazioni. In condizioni simili le reazioni di amplificazione possono risultare effettivamente meno efficaci. Una simile evenienza può essere evitata sviluppando i primer sulla base di un pool di sequenze provenienti da individui prelevati all'interno di contesti geografici differenti, in modo tale da poter evidenziare a monte e a valle del locus bersaglio le regioni maggiormente condivise (quindi le più conservate) sulle quali andare a sviluppare primer consistenti. I primer utilizzati nel presente lavoro sono stati sviluppati seguendo queste raccomandazioni (Pannacciulli *et al.* 2005). L'ipotesi della perdita di informazione dovuta a drop allelici e ad alleli nulli appare quindi poco probabile. Inoltre, il deficit di genotipi eterozigoti risulta esteso in egual maniera a tutti i loci impiegati in questo studio. Affinché questa osservazione potesse essere interpretata in termini di drop allelici e/o di alleli nulli, i primer utilizzati avrebbero dovuto tutti produrre una quantità di errori simile, il che appare di nuovo poco probabile.

Fontani (2008) proponeva che il deficit di individui eterozigoti fosse da imputare principalmente a fattori biologici legati alle strategie riproduttive messe in atto dalla specie considerata: *C. montagui* è infatti una specie ermafrodita a fecondazione incrociata capace, in condizioni di isolamento, di compiere autofecondazione (Barnes

& Barnes, 1958; Barnes, 1989). Questo si può verificare quando l'insediamento avviene all'interno di un'area priva di conspecifici vicini con i quali compiere la fecondazione incrociata, oppure quando l'adulto viene privato della presenza di conspecifici vicini a causa di eventi esterni quali ad esempio le mareggiate. Inoltre, considerato che *C. montagui* tende ad occupare la parte più alta all'interno della fascia intertidale all'interno di aree caratterizzate da moto ondoso moderato, come ad esempio baie ed estuari, può accadere che *C. montagui* sia sottoposto periodicamente a condizioni ambientali sfavorevoli, soprattutto per quel che riguarda la disponibilità di acqua, che potrebbero rendere poco praticabile la fecondazione incrociata esterna e promuovere l'autofecondazione.

Un altro aspetto da considerare, sempre riportato da Fontani (2008), è la possibile presenza di un effetto Wahlund: nel caso di *C. montagui*, sappiamo che al succedersi di ogni generazione le larve vengono rilasciate nella colonna d'acqua e sono libere di andare ad insediarsi all'interno di una località diversa da quella di origine. La dispersione larvale potrebbe contribuire a confondere la struttura genetica locale rendendo difficile ottenere delle stime efficaci della variabilità genetica.

A prescindere da queste osservazioni riguardanti la biologia riproduttiva di *C. montagui*, il fatto che le frequenze genotipiche dei campioni locali non soddisfino le condizioni di equilibrio di HW non dovrebbe dopotutto lasciarci troppo sorpresi. Le attese secondo HW risultano soddisfatte solo quando le forze evolutive in atto sono trascurabili. Soprattutto nel caso dei microsatelliti è stato più volte ipotizzato che i tassi di mutazione in corrispondenza dei vari loci, già di per sé elevati, possano subire delle accelerazioni mano a mano che la sequenza ripetuta diventa più lunga. Se ciò fosse vero, una delle assunzioni di HW, quella che dice che non ci devono essere differenze all'interno dei loci nei tassi di mutazione fra alleli diversi, potrebbe risultare sistematicamente violata.

Osservando come si distribuiscono le frequenze alleliche (Appendice B) in corrispondenza dei vari loci, si può notare come in generale per ogni locus ci siano un gran numero di classi alleliche con frequenze molto basse. Una simile distorsione dello spettro delle frequenze alleliche potrebbe essere messa in relazione con l'alternarsi nel corso della storia demografica di *C. montagui* all'interno del Mediterraneo di fasi

successive di espansione e di contrazione. La storia del Mediterraneo è caratterizzata da un susseguirsi di eventi catastrofici (Bianchi & Morri, 2000): primo fra tutti, la crisi salina del Messiniano, cui fece seguito l'estinzione della maggior parte della fauna marina mediterranea; quindi la riapertura dello Stretto di Gibilterra, cui fece seguito la ri-colonizzazione del Mediterraneo da parte delle specie atlantiche; infine il susseguirsi dei cicli glaciali ed interglaciali del Quaternario, che causarono un ciclico alternarsi di fasi di estinzione e di ricolonizzazione a livello locale all'interno del Mediterraneo. Tutti questi avvenimenti lasciano supporre che la storia di *C. montagui* all'interno del Mediterraneo potrebbe essere stata caratterizzata da cicli successivi di espansione e di contrazione, che potrebbero aver lasciato una traccia nella distribuzione delle frequenze alleliche, soprattutto in corrispondenza di loci neutrali come i marcatori microsatellitari.

Il valore dell'indice di fissazione (F_{st}) calcolato sul totale dei loci analizzati è minore di 0.1, in linea con quanto osservato da Maracci (2013). Tale valore, pur essendo relativamente contenuto, è risultato significativamente diverso da zero. La significatività rilevata con la F -statistica conferma la presenza di strutturazione genetica per *C. montagui* all'interno dell'area di studio. La differenziazione genetica è presente comunque a livelli bassi, in accordo con le buone capacità di dispersione presentate dalla specie analizzata. *C. montagui* possiede una fase larvale planctonica della durata approssimativa di due settimane, variabile a seconda delle condizioni ambientali (Burrows, 1988). La presenza, all'interno del ciclo vitale di *C. montagui*, di una fase larvale di tale durata, conferisce a questa specie un elevato potenziale per la dispersione.

I valori di F_{st} calcolati fra coppie di località sono risultati statisticamente significativi nella maggior parte dei casi, indicando l'esistenza di una differenziazione genetica fra coppie di località. Come già riscontrato in studi precedenti (Pannacciulli *et al.*, 1997; Shemesh *et al.*, 2009), la località atlantica (Biarritz) si distingue dalle località mediterranee in modo netto. I valori di F_{st} calcolati fra Biarritz e le altre località prese singolarmente sono tutti molto elevati e statisticamente significativi. Questo dato va quindi ad aggiungersi agli altri presenti in letteratura (Pannacciulli *et al.*, 1997; Fontani,

2008; Shemesh *et al.*, 2009) e a confermare l'esistenza di una differenziazione significativa fra le popolazioni atlantiche e quelle mediterranee.

Per quel che riguarda invece i confronti a coppie fra popolazioni mediterranee, è interessante osservare come solamente cinque dei 55 confronti effettuati non siano risultati statisticamente significativi, quelli fra Palma de Mallorca e Cala Sinzias, Portonovo e Grado, Volos e Büyükada, Volos e Sozopol e Büyükada e Sozopol. La non-significatività di questi confronti indica una sostanziale omogeneità genetica fra queste coppie di località. Esprimendo questo dato sotto forma di stime di flusso genico (Nm), si osserva infatti come fra queste coppie di località lo scambio di migranti sia molto elevato. Il flusso genico medio fra località, stimato tramite la F -statistica ($Nm=3.78$), indica che la connettività fra le varie località è comunque sempre presente e conserva il suo significato biologico all'interno dell'intera area geografica considerata. La stima del flusso genico medio basata sul metodo degli alleli privati (Slatkin, 1985) restituisce un valore ancora più elevato ($Nm=6.22$), ma è statisticamente meno affidabile a causa dell'elevata sensibilità di questo metodo nei confronti degli errori in fase di interpretazione dei dati (Slatkin, 1994). Sia il valore di flusso genico calcolato sulla base della F -statistica, che quello calcolato con gli alleli privati sono risultati in linea con i risultati di Maracci (2013).

Sia i test compiuti per verificare l'esistenza di isolamento da distanza, che i risultati ottenuti costruendo i due grafici MDS confermano ulteriormente la distinzione netta fra Biarritz, in Atlantico, ed il resto delle località, in Mediterraneo. L'isolamento da distanza risulta significativo solo se Biarritz viene inclusa all'interno del dataset, mentre non lo è più se Biarritz viene rimossa (Fig. 3.3). È comunque interessante notare che in seguito alla rimozione della località di Biarritz dal dataset il valore di probabilità associato al test statistico rimane comunque molto vicino al limite di significatività ($P=0.057$), pur non essendo più statisticamente significativo. È da notare che per rilevare l'isolamento da distanza nelle specie ad ampia dispersione è opportuno utilizzare un disegno di campionamento a grande scala spaziale, perché l'isolamento da distanza (se presente) può essere individuato solo se la scala spaziale considerata è 2-5 volte più ampia rispetto alla distanza di dispersione media della specie (Palumbi, 2003). Inoltre, anche se presente, l'isolamento da distanza può non essere rilevato, in

quanto dovrebbe essere adottata la “distanza geografica effettiva”, cioè la distanza che tiene conto delle correnti superficiali, delle barriere al flusso genico non apparenti, del comportamento larvale, ecc. (Maltagliati *et al.*, 2010).

Le analisi AMOVA a due fattori condotte sia includendo che escludendo Biarritz dal dataset hanno messo in evidenza la grande variabilità che caratterizza *C. montagui* all'interno delle località. Questa osservazione viene messa in relazione con le buone capacità di dispersione della specie analizzata. Gli individui che vengono campionati all'interno di una località provengono probabilmente da località diverse fra loro, il che contribuisce ad aumentare la diversità genetica a livello locale. Nonostante le buone capacità di dispersione però, le differenze fra località sono risultate significative. L'analisi condotta suddividendo le località mediterranee all'interno di tre gruppi geografici distinti (Mediterraneo occidentale, Egeo-M.Nero e Mare Adriatico) ha messo in evidenza fra questi gruppi la presenza di una differenziazione genetica significativa. Inoltre, anche le differenze all'interno dei gruppi sono risultate significative. La presenza di differenziazione genetica fra gruppi non è troppo sorprendente, dato che questi risultano separati tra loro dal bacino del Mediterraneo centrale.

Andando ad inserire Malta alternativamente all'interno di ciascun gruppo, si osserva come le differenze tra gruppi tendano generalmente a diminuire in favore delle differenze all'interno dei gruppi. In tutti e tre i casi quindi, Malta apporta eterogeneità all'interno del gruppo in cui viene inserita. Questo indica che Malta, come era già stato messo in evidenza da Pannacciulli *et al.* (1997), si differenzia geneticamente rispetto alle altre località del Mediterraneo. Nel corso delle attività di campionamento svolte durante questo lavoro di tesi, *C. montagui* è stato ricercato senza successo lungo le coste meridionali della Sicilia, lungo le coste ioniche della Calabria e della Puglia e a Creta. L'eventuale assenza di *C. montagui* da gran parte delle coste che si affacciano sul Mediterraneo centrale potrebbe contribuire alla differenziazione della località di Malta rispetto al resto del Mediterraneo. Inoltre, la differenziazione genetica di Malta può essere messa in relazione con le particolari caratteristiche idrografiche ed oceanografiche del Canale di Sicilia (Pannacciulli *et al.*, 1997) (Fig. 4.1).

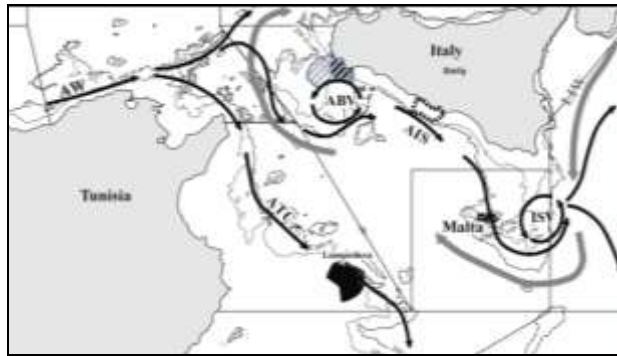


Fig. 4.1. Principali caratteristiche della circolazione superficiale all'interno del Canale di Sicilia

All'interno di questa regione infatti le masse d'acqua del Mediterraneo occidentale si incontrano con quelle del Mediterraneo orientale. Queste masse d'acqua sono caratterizzate da valori di salinità significativamente diversi, ed i fenomeni di mescolamento che derivano dal loro incontro possono essere molto intensi, tali da creare delle barriere oceanografiche che potrebbero impedire alla località di Malta di scambiare liberamente le larve con le altre località del Mediterraneo. Purtroppo in questo lavoro di tesi non è stato possibile analizzare ulteriori località all'interno del Mediterraneo centrale poiché non disponibili ma, qualora in futuro si reperissero esemplari anche da queste aree, si potrebbero fornire maggiori informazioni riguardo alla collocazione di Malta rispetto ai gruppi analizzati ed al ruolo rivestito dal Mediterraneo centrale nella distribuzione della variabilità genetica di *C. montagui* all'interno del Mediterraneo.

I risultati ottenuti in seguito all'analisi AMOVA sulle località suddivise in gruppi sembrerebbero indicare sia per il Canale di Sicilia, che per il Canale d'Otranto, che per l'Arco delle Isole Cretesi un qualche ruolo nella strutturazione genetica di *C. montagui* all'interno del Mediterraneo. Per quel che riguarda l'Arco Ellenico, risultati simili sono stati ottenuti analizzando la struttura genetica di *C. montagui* con marcatori molecolari mitocondriali (COI) da Shemesh *et al.* (2009), che hanno messo in evidenza la differenziazione fra le località del Mare Egeo e del Mar Nero e quelle del resto del Mediterraneo. Per quel che riguarda il Canale di Sicilia ed il Canale d'Otranto, risultati simili sono stati ottenuti analizzando la struttura genetica di altre specie con buone capacità di dispersione all'interno del Mediterraneo (Maltagliati *et al.*, 2002, 2010; Fernandez *et al.*, 2011).

L'analisi di assegnazione Bayesiana ha permesso di analizzare più nel dettaglio la struttura genetica di *C. montagui* all'interno del Mediterraneo e di ottenere alcune indicazioni interessanti per quel che riguarda la struttura genetica di *C. montagui* in corrispondenza delle potenziali zone di discontinuità prese in esame (Canale di Sicilia, Canale d'Otranto e Arco Cretese).

Per quel che riguarda il Canale di Sicilia, i livelli di assegnazione individuali registrati nelle due località situate a cavallo del Canale, ovvero la località di Cala Sinzias in Sardegna e quella di Malta, sono diversi fra loro, soprattutto per quel che riguarda la proporzione delle assegnazioni all'interno del cluster verde (Fig. 3.6). Se a questo aggiungiamo che invece fra Palma de Mallorca e Cala Sinzias, che sono separate da una distanza geografica paragonabile a quella che separa Cala Sinzias da Malta, i livelli di assegnazione sono pressoché identici (Fig. 3.6), otteniamo un'indicazione riguardo alla possibile presenza di qualche meccanismo in grado di limitare lo scambio di larve fra Cala Sinzias e Malta. Le particolari condizioni idrografiche ed oceanografiche presenti all'interno del Canale di Sicilia (Fig. 4.1) vengono nuovamente indicate come possibili fattori responsabili di questa limitazione nella comunicazione larvale.

Per quel che riguarda il Canale d'Otranto, i livelli di assegnazione registrati nelle due località di Malta e di Zaton, a cavallo della zona di transizione fra Mar Ionio e Mare Adriatico, sono fra loro praticamente identici (Fig. 3.6). Le altre due località adriatiche, Portonovo e Grado, che sono molto più vicine a Zaton rispetto a Malta, sono assegnate invece in modo molto diverso rispetto a Zaton (Fig. 3.6). Queste osservazioni, unitamente ai risultati ottenuti per l'*Fst* calcolato a coppie (il confronto fra Grado e Portonovo risulta non significativo) e con l'AMOVA a tre fattori (Malta assegnata al Mare Adriatico comporta l'abbassamento massimo della componente tra gruppi a favore di quella entro-gruppi), indicano la possibile esistenza di una zona di discontinuità fra l'Adriatico ed il resto del Mediterraneo, che potrebbe essere collocata un po' più a nord rispetto al Canale d'Otranto. La presenza di correnti provenienti dal Mar Ionio che entrano in Adriatico lungo le coste orientali (Fig. 4.3), potrebbe essere in relazione con la capacità delle larve di *C. montagui* di oltrepassare la regione del Canale d'Otranto e di risalire lungo le coste Croate.

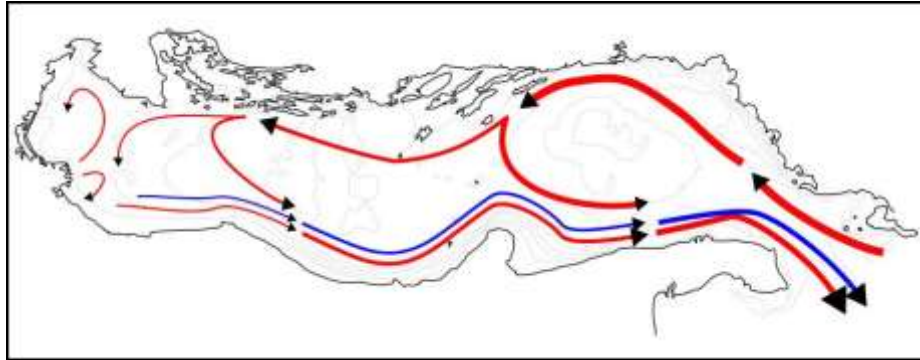


Fig. 4.3. Principali caratteristiche della circolazione superficiale in Adriatico

La presenza, più o meno all'altezza di Dubrovnik, di un giro di correnti primaverile-estivo che porta gran parte del flusso superficiale che sale lungo le coste croate ad invertire il suo corso, attraversando l'Adriatico e ridiscendendo infine verso lo Ionio lungo le coste italiane, potrebbe essere messa in relazione con l'incapacità delle larve provenienti da sud di disperdersi all'interno dell'Adriatico fino al settore più settentrionale.

Per quel che riguarda la regione dell'Arco Cretese, come abbiamo già ricordato, essa è stata indicata da Shemesh *et al* (2009) come la zona dove si verifica la discontinuità fra le località dell'Egeo e del Mar Nero e quelle del resto del Mediterraneo. Secondo i risultati ottenuti in questo lavoro, i confronti fra coppie di località (*Fst*) indicano che Volos (Egeo), Buyukada (Mar di Marmara) e Sozopol (Mar Nero) sono fra loro geneticamente omogenee. L'analisi AMOVA condotta sui gruppi indica che il gruppo dell'Egeo-M.Nero si differenzia significativamente rispetto al resto del Mediterraneo. Questi due risultati quindi avvalorano la presenza di una discontinuità fra Egeo-M.Nero e resto del Mediterraneo. L'analisi Bayesiana invece ha restituito dei risultati leggermente contrastanti, in quanto la località di Volos, in Egeo, appare più simile a Malta che non a Buyukada e Sozopol (Fig. 3.6). Questo risultato indicherebbe quindi che la discontinuità osservata complessivamente fra Egeo-M.Nero e resto del Mediterraneo non dovrebbe essere localizzata ad ovest rispetto all'Arco Ellenico, bensì piuttosto all'interno dell'Egeo stesso. La differenziazione fra Mar Nero, Egeo e resto del Mediterraneo potrebbe cioè aumentare progressivamente da est verso ovest, risultando però statisticamente significativa solo al di là dell'Arco delle Isole Cretesi.

L'ultimo aspetto che merita di essere discusso relativamente ai risultati dell'analisi Bayesiana, è la differenza evidente che è emersa fra le tre località più settentrionali, rispettivamente Baia Blu in Mar Ligure e Portonovo e Grado in Mar Adriatico, e quelle a loro immediatamente adiacenti (Cala Sinzias e Palma de Mallorca nel caso di Baia Blu, Zaton nel caso di Portonovo e Grado) (Fig. 3.6). Per quel che riguarda questa osservazione, occorre precisare che le località di Baia Blu, Portonovo e Grado sono state analizzate da Fontani (2008), mentre le altre sono state analizzate da Maracci (2013) e da me. Le differenze osservate fra queste tre località ed il resto del Mediterraneo potrebbero quindi essere dovute ad un effetto dello sperimentatore. Confrontando fra loro però i risultati ottenuti per queste località con quelli ottenuti per le altre località, relativamente ai test per il linkage disequilibrium, per l'equilibrio di HW e per il calcolo della ricchezza allelica, non è stato possibile registrare delle anomalie particolari, anche perché le procedure di lettura degli elettroferogrammi e di assegnazione dei frammenti all'interno delle classi alleliche di appartenenza sono state condotte in modo identico da tutti e tre gli sperimentatori. Per questi motivi, l'effetto dello sperimentatore appare poco probabile. Piuttosto, un effetto dei fattori ambientali legati alla temperatura potrebbe essere messo in relazione con le differenze osservate (Fig. 4.4).

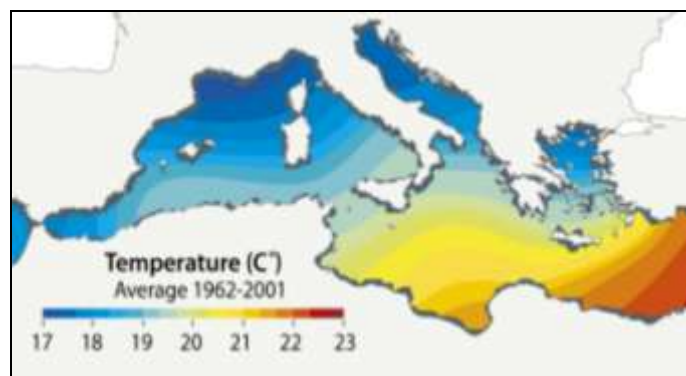


Fig. 4.4. Rappresentazione grafica delle temperature superficiali registrate in Mediterraneo, mediate su un arco di tempo di 40 anni (1962-2001).

Le zone del Mar Ligure e quelle dell'alto Mare Adriatico sono fra le più fredde del Mediterraneo e non è possibile escludere un effetto della temperatura sulla capacità di dispersione delle larve, o anche piuttosto sulla selezione di determinati alleli e sulla riduzione della variabilità genetica all'interno delle località più settentrionali.

Le località di Baia Blu, Portonovo e Grado potrebbero rappresentare i resti di una composizione genetica che in passato era maggiormente diffusa all'interno del Mediterraneo e sulla quale è andata successivamente a sovrainporsi una composizione genetica più recente. Come avevamo notato in precedenza a proposito della distorsione dello spettro delle frequenze alleliche, la storia demografica di *C. montagui* all'interno del Mediterraneo potrebbe essere stata caratterizzata da un susseguirsi di eventi di espansione e di contrazione, quindi non è da escludere che per quel che riguarda la struttura genetica di *C. montagui* si siano susseguite all'interno del Mediterraneo composizioni genetiche diverse, e che fra queste alcune abbiano preso il sopravvento sulle altre, a causa di un'interazione favorevole fra fattori genetici e fattori ambientali.

CONCLUSIONI

Le analisi condotte sulla struttura genetica di *Chthamalus montagui*, utilizzando 6 marcatori microsatellitari, consentono di concludere che:

- 1) i marcatori molecolari utilizzati sono efficaci per lo studio della diversità genetica in *C. montagui*;
- 2) la variabilità genetica rilevata è risultata generalmente elevata;
- 3) i livelli di strutturazione genetica presenti fra località all'interno del Mediterraneo sono generalmente bassi ma significativi;
- 4) le maggiori differenze sono state osservate fra individui a livello locale;
- 5) il gruppo delle località del Mediterraneo occidentale, quello del Mar Adriatico e quello del Mar Egeo-Mar Nero sono significativamente differenziati tra di loro; i tre gruppi risultano inoltre significativamente differenziati anche al loro interno;
- 6) non è stato possibile assegnare Malta all'interno di uno dei tre gruppi (vedi punto 5); è stata osservata una debole indicazione a favore di un'affinità di Malta con il gruppo del Mediterraneo occidentale;
- 7) per quel che riguarda la zona del Canale di Sicilia sono state ottenute delle indicazioni riguardo ad un possibile effetto limitante, esercitato dai fattori idrografici ed oceanografici presenti all'interno di quest'area, sulla capacità di dispersione delle larve di *C. montagui*;

- 8) per quel che riguarda la zona del Canale d'Otranto, le osservazioni condotte sembrano indicare che la discontinuità fra Adriatico e resto del Mediterraneo sia presente, ma che non sia localizzata all'interno di quest'area. Le correnti superficiali provenienti dallo Ionio potrebbero promuovere il trasporto delle larve di *C. montagui* oltre la zona del Canale d'Otranto lungo le coste orientali dell'Adriatico;
- 9) per quel che riguarda la zona dell'Arco Ellenico, è stata rilevata una discontinuità fra il gruppo dell'Egeo-M.Nero ed il resto del Mediterraneo, ma le osservazioni condotte indicano che la zona di discontinuità, piuttosto che essere localizzata in corrispondenza dell'Arco Ellenico, potrebbe svilupparsi progressivamente all'interno del Mar Egeo secondo un gradiente longitudinale;
- 10) sono infine state ottenute indicazioni riguardo la presenza di un'ulteriore zona di discontinuità, localizzata fra le località più settentrionali di Baia Blu, nel Mar Ligure, e di Portonovo e Grado, nel Mare Adriatico, ed il resto del Mediterraneo. Queste località, che si trovano all'interno delle regioni più fredde del Mediterraneo, potrebbero differenziarsi dalle altre per effetto della temperatura.

SVILUPPI FUTURI

In futuro, sarebbe interessante analizzare con marcatori mitocondriali (ad es. la Citocromo Ossidasi I) gli stessi individui analizzati in questo studio con marcatori microsatellitari. In questo modo, sarebbe possibile mettere a confronto i risultati ottenuti con i due tipi diversi di marcatori molecolari. L'analisi mitocondriale inoltre permetterebbe di valutare i rapporti filogenetici presenti fra gli individui delle località analizzate.

Per quel che riguarda invece le conclusioni ottenute nel presente lavoro, esse potranno essere verificate e rese più precise aumentando lo sforzo di campionamento soprattutto in corrispondenza delle zone di discontinuità osservate.

Infine, in futuro si renderanno disponibili tecniche automatiche, basate su software specifici sviluppati *ad hoc* nell'ambito degli studi su *C. montagui*, per la lettura degli elettroferogrammi e per l'assegnazione dei frammenti all'interno delle rispettive classi alleliche di appartenenza. L'automatizzazione di queste procedure ridurrà l'impatto

dello sperimentatore sulle operazioni di lettura ed interpretazione dei genotipi, che rappresenta un aspetto delicato dell'analisi genetica basata sui marcatori microsatellitari.

BIBLIOGRAFIA

- Addison JA & Hart MW, 2004. Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites. *Marine Biology*, **144**: 243-251.
- Aljanabi SM & Martinez I, 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4692-4693.
- Andrade SCS & Solferini VN, 2007. Fine-scale genetic structure overrides macro-scale structure in a marine snail: nonrandom recruitment, demographic events or selection? *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**: 23-36.
- Archie JW, 1985. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. *Evolution*, **39**: 623-637.
- Avise JC, 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. (2nd ed.). Sinauer Associates, Sunderland, MA, 684 pp.
- Ayre DJ & Hughes TP, 2000. Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the Great Barrier Reef, Australia. *Ecology*, **54**: 1590-1605.
- Barber PH, Palumbi SR, Erdmann MV & Moosa MK, 2000. Biogeography: a marine Wallace's line? *Nature*, **406**: 692-693.
- Barnes H & Barnes M, 1958. Further observations on self-fertilisation in *Chthamalus* sp. *Ecology*, **39**: 550.
- Barnes M, 1989. Egg production in Cirripedia. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, **27**: 91-166.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N & Bonhomme F, 2000. Genetix, A Windows™ Based Software for Population Genetic Analyses. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

- Benedetti-Cecchi L, Acunto S, Bulleri F & Cinelli F, 2000. Population ecology of the barnacle *Chthamalus stellatus* in the northwest Mediterranean. Marine Ecology Progress Series, **198**: 157-170.
- Benzie JAH, 1999. Genetic structure of coral reef organisms: ghosts of dispersal past. American Zoologist, **39**: 131-145.
- Bianchi C & Morri C, 2000. Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. Marine Pollution Bulletin, **40**(5): 367-376.
- Burrows MT, 1988. The comparative biology of *Chthamalus stellatus* (Poli) and *Chthamalus montagui* Southward. Ph.D. Thesis, University of Manchester.
- Burrows MT, Hawkins SJ & Southward AJ, 1992. A comparison of reproduction in co-occurring chthamalid barnacles *Chthamalus stellatus*(Poli) and *Chthamalus montagui* Southward. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **160**(2): 229-249.
- Burrows MT, Hawkins SJ & Southward AJ, 1999. Larval development of the intertidal barnacles *Chthamalus stellatus* and *Chthamalus montagui*. Journal of the Marine Biological Association of the UK, **79**(1): 93-101.
- Cavalli-Sforza LL & Edwards AWF, 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Evolution, **21**: 550-570.
- Clare AS, Walker G, Holland DL & Crisp DJ, 1985. The hatching substance of the barnacle, *Balanus balanoides* (L.). Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences, **224**(1235): 131-147.
- Clarke KR & Warwick RM, 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition. PRIMER-E, Plymouth.
- Cockerham CC & Weir BS, 1993. Estimation of gene flow from *F*-statistics. Evolution, **47**: 855-863.
- Connell JH, 1961. The influence of interspecific competition and other factors on the distribution of the barnacle *Chthamalus stellatus*. Ecology, **42**(4): 710-723.

- Connell JH, 1970. A predator-prey system in the marine intertidal region. I. *Balanus glandula* and several predatory species of *Thais*. Ecological Monographs, **40**(1): 49-78.
- Connell JH & Slatyer RO, 1977. Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. American Naturalist, **11**(982): 1119-1144.
- Costantini F, Fauvelot C & Abbiati M, 2007. Genetic structuring of the temperate gorgonian coral (*Corallium rubrum*) across the western Mediterranean Sea revealed by microsatellites and nuclear sequences. Molecular Ecology, **16**: 5168-5182.
- Cowen RK, Paris CB & Srinivasan A, 2006. Scaling of connectivity in marine populations. Science, **311**: 522-527.
- Crisp DJ, 1956. A substance promoting hatching and liberation of young in cirripedes. Letters to Nature, **178**: 263.
- Crisp DJ, Southward AJ & Southward EC, 1981. On the distribution of the intertidal barnacles *Chthamalus stellatus*, *Chthamalus montagui* and *Euraphia depressa*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, **61**(02): 359-380.
- Cruz T, Castro JJ, Delany J, McGrath D, Myers AA, O'Riordan RM & Hawkins SJ (2005). Tidal rates of settlement of the intertidal barnacles *Chthamalus stellatus* and *Chthamalus montagui* in western Europe: the influence of the night/day cycle. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **318**(1): 51-60.
- Dando PR, Southward AJ & Crisp DJ, 1979. Enzyme variation in *Chthamalus stellatus* and *Chthamalus montagui* (Crustacea: Cirripedia): evidence for the presence of *C. montagui* in the Adriatic. Journal of the Marine Biological Association of the UK, **59**: 307-320.
- Dando PR, 1987. Biochemical genetics of barnacles and their taxonomy. In: Crustacean Issues 5, Barnacle Biology, Southward AJ (ed.), AA Balkema, Rotterdam, pp 73-87.
- Darwin C, 1854. A monograph on the sub-class Cirripedia with figures of all the species. The Balanidae, the Verrucidae, etc. Ray Society, London, 684 pp.

- David P, Perdieu MA, Pernot AF & Jarne P, 1997. Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution*, **51**: 1318-1322.
- Delany J, Myers AA, McGrath D, O'Riordan RM & Power AM, 2003. Role of post-settlement mortality and 'supply-side' ecology in setting patterns of intertidal distribution in the chthamalid barnacles *Chthamalus montagui* and *C. stellatus*. *Marine Ecology Progress Series*, **249**: 207-214.
- Dungan ML, 1986. Three-way interactions: barnacles, limpets, and algae in a Sonoran Desert rocky intertidal zone. *The American Naturalist*, **127**(3): 292-316.
- Earl DA, vonHoldt BM, 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, **4**: 359-361.
- Efron B, 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *The Annals of Statistics*, **7**: 1-26.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, **5**(6): 435-445.
- Evanno G, Regnaut S & Goudet J, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**(8): 2611-2620.
- Excoffier L, Smouse P & Quattro J, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**: 479-491.
- Farrell TM, 1991. Models and mechanisms of succession: an example from a rocky intertidal community. *Ecological Monographs*, **61**(1): 95-113.
- Fernández M, Heras S, Maltagliati F, Turco A & Roldan M, 2011. Genetic structure in the blue and red shrimp *Aristeus antennatus* and the role played by hydrographical and oceanographical barriers. *Marine Ecology Progress Series*, **421**: 163-171.

- Fontaine MC, Baird SJ, Piry S, Ray N, Tolley KA, Duke S & Michaux JR, 2007. Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. *BMC Biology*, **5**(1): 30.
- Fontani S, 2008. Genetic biodiversity of the European barnacle *Chthamalus montagui*. Ph.D. Thesis (Not Published Data), University of Plymouth, UK.
- Foster BA, 1971. Desiccation as a factor in the intertidal zonation of barnacles. *Marine Biology*, **8**: 12-29.
- Gaffney PM, 1994. Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light?. In: Genetics and evolution of aquatic organisms, Beaumont AR (ed.), Chapman & Hall, London, 146-153 pp.
- Gaither MR, Toonen RJ, Robertson DR, Planes S & Bowen BW, 2010. Genetic evaluation of marine biogeographical barriers: perspectives from two widespread Indo-Pacific snappers (*Lutjanus kasmira* and *Lutjanus fulvus*). *Journal of Biogeography*, **37**(1): 133-147.
- Goudet J, 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Lausanne: University of Lausanne.
- Graves JE, 1998. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *Journal of Heredity*, **89**: 427-437.
- Hedgecock D, 1986. Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates?. *Bulletin of Marine Science*, **39**(2): 550-564.
- Hochberg Y, 1988. A sharp Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika*, **75**: 800-802.
- Hughes RA, Inouye BD, Johnson MTJ, Underwood N & Vellend M, 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, **11**: 609-623.
- Jones GP, Milicich MJ, Emslie MJ & Lunow C, 1999. Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature*, **402**: 802-804.

- Jørgensen HB, Hansen MM, Bekkevold D, Ruzzante DE & Loeschcke V, 2005. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, **14**(10): 3219-3234.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111-120.
- Klepal W, 1990. The fundamentals of insemination in cirripedes. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, **28**: 353-379.
- Knowlton N & Keller BD, 1986. Larvae which fall far short of their potential: highly localized recruitment in an alpheid shrimp with extended larval development. *Bulletin of Marine Science*, **39**(2): 213-223.
- Kyle CG & Boulding EG, 2000. Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology*, **137**: 835-845.
- Lemaire C, Versini JJ & Bonhomme F, 2005. Maintenance of genetic differentiation across a transition zone in the sea: discordance between nuclear and cytoplasmic markers. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**(1): 70-80.
- Lessa EP, 1990. Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Systematic Zoology*, **39**: 242-252.
- Maltagliati F, Belcari P, Casu D, Casu M, Sartor P, Vargiu G & Castelli A, 2002. Allozyme genetic variability and gene flow in *Octopus vulgaris* (Cephalopoda, Octopodidae) from the Mediterranean Sea. *Bulletin of Marine Science*, **71**(1): 473-486.
- Maltagliati F, Di Giuseppe G, Barbieri M, Castelli A & Dini F, 2010. Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Biological Journal of Linnean Society*, **100**: 910-923.

- Maracci G., 2013. L'influenza di barriere biogeografiche sulla struttura genetica di *Chthamalus montagui* (Crustacea, Cirripedia). Tesi di Laurea Magistrale in Biologia Marina, Università di Pisa.
- O'Riordan RM, Arenas F, Arrontes J, Castro JJ, Cruz T, Delany J & Silva T, 2004. Spatial variation in the recruitment of the intertidal barnacles *Chthamalus montagui* Southward and *Chthamalus stellatus*(Poli)(Crustacea: Cirripedia) over an European scale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **304**(2): 243-264.
- O'Riordan RM, Myers AA & Cross TF, 1992. Brooding in the intertidal barnacles *Chthamalus stellatus*(Poli) and *Chthalamus montagui* Southward in south-western Ireland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **164**(1): 135-145.
- O'Riordan RM, Myers AA & Cross TF, 1995. The reproductive cycles of *Chthamalus stellatus*(Poli) and *C. montagui* Southward in south-western Ireland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **190**(1): 17-38.
- O'Riordan RM, Myers AA, McGrath D, Delany J & Power AM, 1999. The sizes at settlement in natural populations of the cyprids of *Chthamalus montagui* and *C. stellatus*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **79**(2): 365-366.
- O'Riordan RM, Power AM & Myers AA, 2010. Factors, at different scales, affecting the distribution of species of the genus *Chthamalus* Ranzani (Cirripedia, Balanomorpha, Chthamaloidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **392**(1): 46-64.
- Ortega S, 1981. Environmental stress, competition and dominance of *Crassostrea virginica* near Beaufort, North Carolina, USA. *Marine Biology*, **62**(1): 47-56.
- Paine RT, 1981. Barnacle Ecology: Is Competition Important? The Forgotten Roles of Disturbance and Predation. *Paleobiology*, **7**(4): 553-560.
- Palero F, Pascual M & Beaumont M, 2011. Effect of oceanographic barriers and overfishing on the population genetic structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*): influence of current oceanographical features and historical processes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **48**: 708-717.

- Palumbi SR, 1992. Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology & Evolution*, **7**: 114-118.
- Palumbi SR, 1994. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **25**: 547-572.
- Palumbi SR, 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, **13**: 146-158.
- Pannacciulli FG, 1995. Population ecology and genetics of European species of intertidal barnacles. Ph.D. Thesis, University of Liverpool.
- Pannacciulli FG, Bishop JDD & Hawkins SJ, 1997. Genetic structure of populations of two species of *Chthamalus* (Crustacea: Cirripedia) in the north-east Atlantic and Mediterranean. *Marine Biology*, **128**(1): 73-82.
- Pannacciulli FG & Relini G, 2000. The vertical distribution of *Chthamalus montagui* and *Chthamalus stellatus* (Crustacea, Cirripedia) in two areas of the NW Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, **426**(1): 105-112.
- Pannacciulli FG, Piyapattanakorn S, Bishop JD, Hawkins SJ & Maclean N, 2005. Isolation of highly polymorphic microsatellite markers from the intertidal barnacle *Chthamalus montagui* Southward. *Molecular Ecology Notes*, **5**(3): 641-643.
- Peijnenburg KTCA, Fauvelot C, Breeuwer JAJ & Menken SBJ, 2006. Spatial and temporal genetic structure of the planktonic *Sagitta setosa* (Chaetognatha) in the European seas as revealed by mitochondrial and nuclear DNA markers. *Molecular Ecology*, **15**: 3319-3338.
- Pinho C & Hey J, 2010. Divergence with gene flow: models and data. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **41**: 215-230.
- Power AM, Delany J, McGrath D, Myers AA & O'Riordan RM, 2006. Patterns of adult abundance in *Chthamalus stellatus*(Poli) and *C. montagui* Southward (Crustacea: Cirripedia) emerge during late recruitment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **332**(2): 151-165.

- Power AM, Myers AA, O'Riordan RM, McGrath D & Delany J, 2001. An investigation into Rock Surface Wetness as a Parameter Contributing to the Distribution of the Intertidal Barnacles *Chthamalus stellatus* and *Chthamalus montagui*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **52**(3): 349-356.
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945-959.
- Puebla O, Sevigny JM, Sainte-Marie B, Brethes JC, Burmeister A, Dawe EG & Moriyasu M, 2008. Population genetic structure of the snow crab (*Chionoecetes opilio*) at the Northwest Atlantic scale. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **3**: 425-436.
- Range P & Paula J, 2001. Distribution, abundance and recruitment of *Chthamalus* (Crustacea: Cirripedia) populations along the central coast of Portugal. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **81**(03): 461-468.
- Raymond M & Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249.
- Ridgway T, Hoegh-Guldberg O & Ayre DJ, 2001. Panmixia in *Pocillopora verrucosa* from South Africa. *Marine Biology*, **139**: 175-181.
- Riginos C & Nachman MW, 2001. Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Molecular Ecology*, **10**(6): 1439-1453.
- Shemesh E, Huchon D, Simon-Blecher N & Achituv Y, 2009. The distribution and molecular diversity of the Eastern Atlantic and Mediterranean chthamalids (Crustacea, Cirripedia). *Zoologica Scripta*, **38**(4): 365-378.
- Slatkin M, 1985. Rare alleles as indicators of gene flows. *Evolution*, **39**(1): 53-65.
- Slatkin M, 1994. Gene flow and population structure . In: *Ecological genetics*, L.A. Real (ed.), Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp.3-17.

- Sotka EE, Wares JP, Barth JA, Grosberg RK & Palumbi S, 2004. Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Molecular Ecology*, **13**(8): 2143-2156.
- Sousa EB, Cruz T & Castro JJ, 2000. Distribution and abundance of co-occurring chthamalid barnacles *Chthamalus montagui* and *Chthamalus stellatus* (Crustacea, Cirripedia) on the southwest coast of Portugal. *Hydrobiologia*, **440**(1-3): 339-345.
- Southward AJ, 1976. On the taxonomic status and distribution of *Chthamalus stellatus* (Cirripedia) in the north-east Atlantic region: with a key to the common intertidal barnacles of Britain. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **56**(04): 1007-1028.
- Southward AJ, 1991. Forty years of changes in species composition and population density of barnacles on a rocky shore near Plymouth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **71**(03): 495-513.
- Sturrock K & Rocha J, 2000. A multidimensional scaling stress evaluation table. *Field Methods*, **12**: 49-60.
- Suárez R & Arrontes J, 2008. Population dynamics of the barnacle *Chthamalus montagui* at two spatial and temporal scales in northern Spain. *Marine Biology*, **155**(4): 363-374.
- Swearer SE, Caselle JE, Lea DW & Warner RR, 1999. Larval retention and recruitment in an island population of a coral-reef fish. *Nature*, **402**: 799-802.
- Véliz D, Bourget E & Bernatchez L, 2004. Regional variation in the spatial scale of selection at MPI* and GPI* in the acorn barnacle *Semibalanus balanoides* (Crustacea). *Journal of Evolutionary Biology*, **17**(5): 953-966.
- Veliz D, Duchesne P, Bouget E & Bernatchez L, 2006. Genetic evidence for kin aggregation in the intertidal acorn barnacle (*Semibalanus balanoides*). *Molecular Ecology*, **15**: 4193-4202.
- Waples RS, 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*, **89**: 438-450.

- Weir BS & Cockerham CC, 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.
- Wright S, 1943. Isolation by distance. *Genetics*, **28**: 114-138.
- York KL, Blacket MJ & Appleton BR, 2008. The Bassian Isthmus and the major ocean currents of southern Australia influence the phylogeography and population structure of a southern Australian intertidal barnacle *Catomerus polymerus* (Darwin). *Molecular Ecology*, **17**: 1948-1961.
- Yu SL, Tang YQ, Li Y, Zhang H & Wu XL, 2010. Gradient decrement of annealing time can improve PCR with fluorescent-labeled primer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **110**(4): 500-504.
- Zabin CJ & Altieri A, 2007. A Hawaiian limpet facilitates recruitment of a competitively dominant invasive barnacle. *Marine Ecology Progress Series*, **337**: 175-185.
- Zouros E & Foltz DW, 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia*, **25**: 583-591.

APPENDICE A: protocollo di estrazione del DNA

1) Lisi delle membrane e denaturazione delle proteine:

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

2) Precipitazione proteine e lipidi:

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

3) Precipitazione del DNA:

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

- asciugare il pellet all'aria o nel blocco termostato a 37°C lasciando aperto il coperchio della provetta;

4) Idratazione e conservazione del DNA:

- risospendere il pellet in 30 μ l di TE (Tris-EDTA) buffer. Agitare velocemente e centrifugare brevemente;
- conservare il DNA in soluzione in freezer a -20°C .

APPENDICE B: tabelle delle frequenze alleliche

Di seguito vengono riportate le frequenze alleliche stimate per locus per località. Le località sono indicate con le sigle riportate in Tab. 2.1 nella sezione “Materiali e Metodi”. In grassetto sono riportate le frequenze degli alleli privati.

LOCUS	LOCALITA'											
	CM2/15	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ
ALLELI												
142	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-	-
146	-	0.017	-	-	-	-	-	-	-	0.033	0.017	
148	-	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
150	0.103	-	0.044	-	-	0.083	0.028	-	0.033	0.033	0.050	
152	0.897	0.217	0.283	0.194	0.300	0.317	0.403	0.431	0.367	0.267	0.250	
154	-	0.450	0.348	0.514	0.150	0.250	0.333	0.155	0.200	0.233	0.183	
156	-	0.167	0.087	0.097	0.188	0.100	0.083	0.138	0.150	0.100	0.117	
158	-	0.067	0.130	0.069	0.050	0.100	0.042	0.069	0.133	0.117	0.083	
160	-	-	0.044	0.014	0.125	0.033	0.014	0.052	0.050	0.033	0.050	
162	-	0.017	-	-	0.025	0.033	0.028	0.017	-	0.083	-	
164	-	0.033	-	0.028	-	-	0.014	0.052	-	-	-	
166	-	-	-	0.014	0.025	0.017	-	0.035	-	0.017	0.033	
168	-	0.017	-	0.014	0.013	0.050	-	-	0.033	0.033	0.033	
170	-	-	0.022	0.014	-	-	-	-	-	-	0.017	
172	-	-	0.022	-	-	-	-	0.035	-	-	-	
174	-	-	-	-	-	-	0.014	-	-	-	-	
178	-	-	-	-	0.025	-	0.014	-	-	-	-	
180	-	-	-	-	-	0.017	0.028	-	-	-	0.067	
182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	0.017	
184	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	0.050	
188	-	-	-	-	0.038	-	-	-	-	0.017	0.033	
196	-	-	0.022	0.014	-	-	-	-	-	-	-	

200	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
216	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
222	-	-	-	-	0.025	-	-	-	-	-	-
226	-	-	-	0.014	0.013	-	-	-	-	-	-
228	-	-	-	-	0.013	-	-	-	-	-	-
230	-	-	-	-	0.013	-	-	-	-	-	-
234	-	-	-	0.014	-	-	-	-	-	-	-

LOCUS	LOCALITA'											
	CM4/3	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ
ALLELI												
76	-	-	-	0.014	-	-	-	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-	0.023	-	-	-	-	-	-
130	-	-	-	-	-	0.068	-	-	-	0.017	-	-
134	-	-	-	-	-	-	0.014	-	-	-	-	-
148	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033	-	-	-
164	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
166	-	0.033	-	-	-	-	-	-	0.017	0.050	-	-
170	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	0.050	-	-
174	0.106	0.250	0.320	0.203	0.063	0.136	0.311	0.380	0.117	0.100	0.183	-
176	0.242	-	0.020	-	0.013	-	0.014	-	-	0.067	-	-
178	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-	-
180	0.030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033
184	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017
186	-	0.033	-	0.014	-	-	-	-	0.017	0.033	0.033	-
188	-	0.117	0.140	0.108	-	0.114	0.068	0.040	0.183	0.100	0.033	-
190	0.030	0.100	0.060	0.054	0.175	0.046	0.095	0.020	0.100	0.100	0.067	-
192	-	0.250	0.180	0.338	0.488	0.227	0.041	0.060	0.217	0.283	0.367	-
194	0.015	0.083	0.080	0.081	0.150	0.159	0.068	0.140	0.167	0.117	0.117	-
196	0.091	0.017	0.160	0.041	0.088	0.023	0.108	0.100	0.050	-	0.050	-
198	0.030	0.033	-	0.081	-	0.159	0.149	0.220	0.050	0.050	0.033	-
200	0.015	-	-	-	-	-	0.068	-	-	-	0.017	-
202	0.076	0.017	-	0.027	0.025	-	-	-	0.017	0.017	-	-

204	0.030	-	-	-	-	-	0.054	0.040	-	-	-
206	-	0.017	0.020	0.027	-	-	-	-	-	-	-
208	0.015	0.033	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033
210	0.061	-	-	0.014	-	-	-	-	-	-	-
212	0.030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
214	-	-	-	-	-	0.046	-	-	-	-	-
216	-	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-
218	0.015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
220	0.030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
222	0.046	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017
224	-	-	0.020	-	-	-	-	-	-	-	-
238	0.061	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
240	-	-	-	-	-	-	0.014	-	-	-	-
242	0.015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
246	0.030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	0.030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LOCUS	LOCALITA'										
CM4/5	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ
ALLELI											
74	0.017	-	0.250	-	-	0.321	-	0.259	-	-	-
76	-	0.037	0.042	-	0.083	-	-	-	0.404	0.552	0.321
78	-	-	0.021	-	-	-	-	0.019	-	-	-
80	-	0.019	-	-	-	0.054	-	-	-	0.035	-
82	-	-	0.063	-	-	-	-	-	-	0.017	-
84	-	0.037	-	-	-	-	-	-	0.039	-	-
96	-	0.037	0.125	-	-	0.054	-	0.111	-	-	-
98	-	-	-	-	-	0.036	0.107	0.037	-	-	-
100	0.033	0.074	-	0.067	0.021	-	0.054	0.019	-	-	0.036
102	0.067	0.074	-	0.067	-	0.036	-	0.019	0.173	0.017	0.071
104	0.133	0.037	0.188	0.050	0.208	0.125	0.036	0.019	0.115	0.138	0.214
106	0.117	0.259	0.083	0.183	-	0.036	0.054	0.148	0.096	0.035	0.196
108	0.100	0.074	-	0.150	-	-	0.429	-	0.096	-	0.125
110	-	0.037	-	0.067	-	0.054	0.036	-	0.039	-	-

112	0.050	0.019	0.125	-	0.104	0.036	0.036	0.093	-	-	-
114	0.050	0.093	-	0.017	0.313	-	-	0.111	-	-	-
116	0.050	0.093	-	0.217	-	0.107	-	-	-	-	-
118	-	-	0.021	-	-	-	0.018	0.037	-	-	-
120	0.033	-	-	-	-	-	0.018	0.074	-	-	-
122	0.033	0.037	0.042	-	0.063	-	0.036	0.019	-	-	-
124	0.017	-	-	0.033	0.063	0.071	-	-	-	-	-
126	0.033	-	-	0.067	0.042	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	0.018	0.019	-	-	-
130	0.050	-	-	-	-	-	0.071	-	-	-	-
132	-	-	-	0.033	0.042	-	0.018	-	-	-	-
134	-	-	-	-	-	-	0.018	-	-	-	-
136	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
138	0.033	-	-	-	-	-	-	0.019	-	-	-
140	0.050	0.019	-	-	-	0.018	-	-	-	-	-
142	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	0.017	-	-	0.017	0.021	-	-	-	-	-	-
148	-	-	-	0.033	-	-	-	-	-	-	-
150	-	0.056	-	-	-	-	-	-	-	-	-
154	-	-	0.042	-	-	-	-	-	-	-	-
158	-	-	-	-	-	0.036	-	-	-	-	-
162	-	-	-	-	-	-	0.018	-	-	-	-
166	0.033	-	-	-	-	-	0.036	-	-	-	-
172	0.033	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.035	-
176	-	-	-	-	-	0.018	-	-	-	0.035	-
178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-
184	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.035	-
190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.035	-
192	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	0.035	-
198	-	-	-	-	0.042	-	-	-	-	-	-
206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.018
208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.018
212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-
220	-	-	-	-	-	-	-	-	0.039	-	-

LOCUS	LOCALITA'											
	CM5/18	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ
ALLELI												
70	-	-	-	-	-	-	-	-	0.020	-	-	-
76	-	-	0.040	-	-	-	-	-	-	0.050	0.017	0.017
78	-	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	0.031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	0.031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	0.031	-	-	-	-	-	-	0.029	0.040	-	-	-
100	-	0.033	0.060	-	0.115	-	0.015	-	-	-	0.033	-
102	-	0.033	-	-	0.039	-	-	0.020	0.050	0.017	0.035	-
104	-	0.017	0.040	0.086	0.013	0.065	0.029	0.080	0.167	0.217	0.138	-
106	-	0.050	-	0.014	-	0.022	0.118	0.020	0.033	0.050	0.052	-
108	0.031	-	0.020	0.029	-	-	-	-	-	-	-	0.017
110	0.016	-	0.020	0.029	0.026	-	-	0.020	-	-	-	-
112	-	-	0.020	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
114	-	-	-	-	-	-	0.015	-	-	0.017	-	-
116	-	-	-	-	0.026	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	0.020	0.014	-	-	-	-	-	-	-	-
122	-	-	-	-	0.026	-	-	-	-	0.017	-	-
126	-	0.250	0.100	0.043	-	0.109	0.074	0.100	-	-	0.017	-
128	0.469	0.567	0.680	0.743	0.590	0.674	0.647	0.620	0.650	0.533	0.535	-
130	0.094	0.033	-	0.014	0.026	0.022	0.044	-	-	0.050	0.103	-
132	-	-	-	-	0.013	-	-	0.040	-	-	-	-
134	-	-	-	-	0.013	-	-	-	-	-	-	-
138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
150	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-	-
174	-	-	-	-	-	0.044	-	-	-	-	-	-
178	0.234	-	-	-	0.077	-	-	0.020	0.017	-	-	-
179	0.016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180	0.016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
182	0.016	-	-	0.014	-	0.044	0.015	0.020	-	-	0.017	-
184	0.016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
206	-	-	-	-	-	0.022	-	-	-	-	-	-
208	-	-	-	0.014	0.026	-	0.015	-	-	-	0.017	-

232	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	0.017	0.052
252	-	-	-	-	0.013	-	-	-	-	-	-

LOCUS	LOCALITA'											
	CM5/23	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ
ALLELI												
154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033	-
160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
170	0.014	-	-	0.027	-	-	-	-	-	0.017	-	-
172	0.029	-	-	-	-	-	-	-	0.037	-	-	-
174	0.014	-	0.479	-	-	0.069	-	-	-	-	-	-
176	0.429	-	0.167	-	-	-	0.014	-	0.033	-	-	-
178	0.329	-	-	-	-	0.035	-	0.056	0.017	-	-	-
180	0.114	-	-	0.027	0.026	0.017	-	-	0.017	-	0.033	-
182	-	-	-	-	-	0.017	-	0.019	-	-	-	-
184	0.043	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
186	0.014	0.033	-	0.027	-	-	-	-	-	0.017	-	-
188	-	-	0.021	0.027	-	-	0.014	0.019	0.017	-	-	-
190	-	0.017	-	-	-	0.069	0.014	-	-	-	0.017	-
192	-	-	-	-	-	0.017	0.014	-	0.017	0.050	0.017	-
194	-	-	-	-	-	-	-	0.019	-	0.017	-	-
196	-	-	0.042	-	-	-	-	0.019	0.050	0.017	-	-
198	-	-	-	-	0.013	-	-	0.056	-	-	-	-
200	-	0.017	-	-	0.013	0.017	0.027	-	0.033	0.033	0.033	-
202	-	-	0.021	0.014	0.013	0.035	0.041	0.019	0.017	-	-	-
204	-	0.033	-	0.027	-	-	0.027	0.037	0.017	-	0.017	-
206	0.014	0.017	-	0.014	-	-	-	0.037	0.033	0.033	0.033	-
208	-	-	-	-	-	0.017	-	0.019	-	0.017	0.017	-
210	-	-	-	0.014	-	0.017	0.041	-	0.033	0.083	0.033	-
212	-	-	0.063	0.027	-	0.035	0.041	-	0.033	0.017	0.033	-
214	-	0.033	0.021	-	-	0.017	-	0.056	0.050	-	-	-
216	-	0.133	0.021	-	0.077	0.035	0.014	-	-	0.017	0.050	-
218	-	0.067	-	-	0.026	-	0.041	-	0.017	-	0.033	-

220	-	0.067	0.021	0.014	0.026	-	0.014	-	0.050	-	0.083
222	-	-	0.042	-	-	0.017	0.014	0.093	0.033	0.017	0.017
224	-	0.017	-	-	0.026	0.035	0.068	0.019	0.067	0.067	0.017
226	-	0.050	-	0.068	0.064	-	0.014	0.037	0.067	0.017	0.050
228	-	0.033	-	0.041	0.051	0.069	0.041	-	0.050	0.017	0.033
230	-	-	0.042	-	0.013	0.069	0.041	0.037	0.033	0.033	0.033
232	-	-	0.021	0.054	-	0.017	-	0.019	0.033	0.017	0.117
234	-	0.017	-	0.027	-	0.017	0.014	0.037	-	0.033	0.017
236	-	-	-	0.014	0.026	0.017	0.027	0.019	0.017	0.017	0.017
238	-	0.033	-	0.014	-	-	0.041	-	-	-	-
240	-	-	-	0.014	0.013	-	0.027	0.074	-	-	0.017
242	-	0.067	0.021	-	0.013	0.035	0.014	-	-	0.067	-
244	-	-	-	-	0.013	0.017	-	-	-	0.050	0.033
246	-	-	-	0.014	-	0.017	0.014	-	0.067	0.067	0.017
248	-	0.017	-	-	-	-	-	0.019	-	0.050	0.033
250	-	-	-	0.014	0.103	-	-	0.037	-	0.017	-
252	-	0.017	-	0.054	-	0.052	0.014	0.037	0.033	0.033	-
254	-	0.033	-	0.041	-	-	-	0.037	-	-	0.017
256	-	0.067	-	0.014	0.026	0.035	0.095	0.019	-	0.033	0.033
258	-	-	-	0.054	-	0.035	-	0.056	-	-	0.033
260	-	0.017	-	0.041	0.013	-	0.027	-	-	-	-
262	-	0.017	-	0.054	0.026	0.035	-	-	0.033	0.017	-
264	-	0.050	-	0.014	0.051	-	0.027	0.019	-	-	-
266	-	-	-	0.014	0.039	0.069	0.054	0.019	0.017	0.017	0.033
268	-	-	-	0.014	0.026	-	-	-	-	-	-
270	-	0.017	-	-	0.026	-	0.014	-	-	-	-
272	-	0.050	-	0.027	0.077	0.017	0.027	0.019	0.017	-	0.017
274	-	-	-	0.014	0.051	-	0.027	-	-	0.017	0.033
276	-	0.017	0.021	0.014	0.039	-	0.014	0.019	-	-	-
278	-	-	-	-	0.013	-	-	-	0.017	-	0.017
280	-	-	-	0.014	-	-	-	-	-	-	-
282	-	0.033	-	-	0.026	-	0.014	-	-	-	-
284	-	-	-	0.014	0.026	-	-	-	0.017	-	-
288	-	-	-	-	-	0.052	-	-	-	-	0.017
290	-	-	-	0.041	-	-	0.014	-	-	0.033	-

292	-	0.033	-	-	0.026	-	0.027	-	-	-	-
294	-	-	-	-	0.026	-	0.014	-	-	-	-
296	-	-	-	0.014	-	-	0.014	-	-	0.017	-
304	-	-	-	0.014	-	-	-	-	-	-	-
306	-	-	-	0.014	-	-	0.014	-	-	-	-
308	-	-	-	0.027	-	-	-	-	-	-	-
316	-	-	-	0.014	-	-	-	-	-	-	-
318	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
352	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-
384	-	-	-	0.027	-	-	-	-	-	-	-

LOCUS	LOCALITA'											
	CM9/11	BRZ	PAL	BBL	CSZ	MLT	PNO	ZAT	GRD	VOL	BUY	SOZ
ALLELI												
74	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033	-	-	-
88	-	-	0.021	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	0.050	-	-	-	-	-	-	0.017	0.017	-	-
92	-	0.017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	0.017	0.167	-	0.025	0.500	0.029	0.440	0.017	0.017	-	-
96	-	0.250	0.271	0.243	0.600	0.136	0.357	0.100	0.117	0.083	0.133	-
97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017
98	0.016	0.083	0.021	0.157	0.075	-	0.086	0.060	-	0.017	0.033	-
100	-	-	-	0.029	-	-	0.043	-	-	-	0.017	-
102	0.031	-	0.063	-	-	0.023	-	0.020	-	0.017	0.033	-
104	0.016	0.100	0.021	0.086	0.025	-	-	-	0.033	0.017	0.017	-
106	0.047	0.050	-	-	-	-	-	-	0.017	0.133	0.033	-
108	0.109	0.083	0.042	0.114	-	-	0.014	-	0.067	0.033	0.017	-
110	0.094	0.050	-	-	-	-	-	-	0.100	0.033	-	-
112	0.063	-	-	-	-	0.023	-	-	-	-	0.033	-
114	0.125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	0.031	0.017	0.021	0.014	0.050	-	-	-	0.017	-	-	-
118	0.188	-	0.021	-	-	0.023	0.029	-	-	-	-	-
120	0.094	-	-	-	0.013	-	0.014	-	0.033	-	-	-
122	-	-	0.021	-	-	-	-	-	0.017	-	-	-

124	0.063	-	0.063	-	-	0.023	0.014	0.020	0.050	0.017	0.017
126	-	0.017	-	0.014	0.050	0.023	0.029	-	0.017	0.083	0.033
128	0.031	0.033	-	0.014	0.013	-	0.014	-	-	-	0.017
130	0.016	-	-	0.043	0.013	0.023	0.071	0.020	0.033	0.083	0.017
132	0.031	-	0.042	0.014	0.013	0.114	0.071	0.120	0.017	0.017	0.050
134	-	0.017	0.063	0.057	0.013	0.046	0.029	0.040	0.067	-	0.050
136	-	0.050	-	0.014	0.025	-	0.043	0.060	0.067	0.150	0.050
138	0.016	0.050	0.042	0.071	-	0.046	0.029	0.020	0.017	-	0.067
140	0.016	0.050	0.063	0.043	-	0.023	0.014	-	0.033	-	0.100
142	-	0.017	0.021	0.014	0.013	-	-	-	0.017	-	-
144	-	0.017	-	0.029	0.013	-	0.029	-	-	0.033	0.017
146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017
148	-	-	0.042	-	0.025	-	0.029	0.080	0.033	0.017	0.033
150	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033	0.017	0.100
152	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	0.033	-
154	-	-	-	-	-	-	0.029	0.020	-	0.017	-
156	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	0.033
158	-	-	-	0.014	-	-	-	-	-	-	-
162	0.016	-	-	-	-	-	0.014	-	-	-	-
166	-	0.033	-	0.029	-	-	-	-	-	-	-
168	-	-	-	-	0.013	-	-	-	-	-	-
170	-	-	-	-	0.013	-	0.014	-	0.017	0.033	0.033
172	-	-	-	-	0.013	-	-	-	-	-	0.017
176	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033	0.017	-
178	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	0.017
180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.033	-
182	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.050	-
204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-
216	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
218	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-
224	-	-	-	-	-	-	-	-	0.017	-	-

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio l'ENEA per avermi offerto l'opportunità di svolgere l'internato di tesi presso la struttura di Pozzuolo di Lerici (La Spezia) e per aver messo a mia disposizione i suoi locali ed i suoi servizi.

Ringrazio la dott.ssa Pannacciulli per la disponibilità, l'attenzione e la cura che ha dimostrato nei miei confronti e nei confronti dello svolgimento di questo lavoro di tesi: la sua esperienza scientifica e le sue qualità personali mi sono state di grande aiuto, soprattutto in fase di stesura e di revisione dell'elaborato finale.

Ringrazio il dott. Maltagliati per il sostegno e l'esperta consulenza che mi ha saputo offrire durante la fase di elaborazione statistica dei dati: la sua pazienza e la sua affabilità hanno reso più leggere le difficoltà che ho dovuto affrontare per ottenere i risultati necessari alla stesura di questa tesi.

Ringrazio il prof. Castelli per la sua gentilezza nell'aver acconsentito a fare da relatore interno per questa tesi magistrale e per avermi aiutato ad affrontare le insidie burocratiche che minacciano lo studente nel suo percorso di studi, soprattutto durante la fase conclusiva.

Ringrazio anche il prof. Achituv, della Bar Ilan University di Tel Aviv (Israele), per aver contribuito al finanziamento delle analisi condotte in questo lavoro di tesi e per aver fornito i campioni provenienti da Biarritz.

Ringrazio il dott. Bulleri ed il dott. Tofanelli per i preziosi consigli e le utili osservazioni che mi hanno fornito durante il colloquio di valutazione del mio lavoro di tesi.

Ringrazio Gemma per avermi mostrato come applicare i protocolli sperimentali utilizzati e per avermi fornito consigli e suggerimenti utili riguardo a come organizzare in maniera efficace le mie attività di laboratorio. La ringrazio anche per aver contribuito alla raccolta dei campioni, in particolare per quel che riguarda la località di Cala Sinzias, in Sardegna.

Ringrazio Luca, per aver cercato, purtroppo senza successo, di campionare *C. montagui* lungo le coste della Puglia. Ringrazio anche i ragazzi del centro IAMC-CNR di Capo Granitola, per aver cercato anche loro, ed anche loro purtroppo senza successo, di campionare *C. montagui* nella zona di Mazara del Vallo, in Sicilia.

Ringrazio tutte le persone che ho conosciuto all'ENEA durante il mio internato di tesi, per la cordialità e la simpatia con la quale mi hanno accolto nel loro ambiente di lavoro. In particolare ringrazio Antonio, per la piacevole compagnia che mi ha offerto durante i lunghi viaggi in treno da Pisa a Sarzana, sempre alle prime luci dell'alba.

Ringrazio i miei compagni di corso, che hanno condiviso con me lo stress e la fatica di preparare un esame dopo l'altro: durante questi due anni di laurea magistrale ci siamo davvero dati una mano a vicenda.

Infine ringrazio la mia famiglia, i miei genitori in particolare, che mi hanno sostenuto economicamente e moralmente durante tutti questi anni di università. Grazie di cuore, senza di voi non avrei potuto fare nulla di tutto ciò che ho fatto finora, un abbraccio.