

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche
(DEB)

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA *ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE* XXVII CICLO

Relazioni genotipo-ambiente, dinamiche microevolutive e *habitat choice* in
Aphanius fasciatus (Cyprinodontidae)
(s.s.d. BIO/07)

Tesi di dottorato di:

Dott. Claudia Sebbio

Coordinatore del corso

Prof. Daniele Canestrelli

Tutore

Prof. Dario Angeletti

Co-tutore

Prof. Claudio Carere

26 Giugno 2015

...un altro passo verso i mille!

Alle uniche due persone che, in questi tre anni, mi hanno dimostrato il loro lato umano in un momento di ostilità nei miei confronti, talvolta sottile e subdola, talvolta evidente ed esplicita, incoraggiandomi a non abbandonare questo percorso.

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO	5
CAPITOLO 2: FORZE EVOLUTIVE, INTERAZIONI GENOTIPO-AMBIENTE E <i>HABITAT CHOICE</i>	10
• 2.1 Forze evolutive e variabilità genetica	10
• 2.2 Ruolo del fenomeno dell' <i>'habitat choice</i> nella determinazione dei <i>patterns</i> genetici di variabilità	16
• 2.3 <i>Aphanius fasciatus</i> come modello studio delle interazioni tra le forze evolutive e del fenomeno dell' <i>'habitat choice</i>	19
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	24
• 3.1 Area di studio	24
• 3.2 <i>Aphanius fasciatus</i> come modello di studio	26
• 3.3 Analisi della struttura genetica della popolazione naturale di <i>Aphanius fasciatus</i>	29
• 3.4 Esperimenti etologici in condizioni controllate	31
• 3.5 Elettroforesi del sistema gene-enzima (multilocus)	35
• 3.6 Analisi statistica	37
- 3.6.1 <i>Struttura genetica</i>	37
- 3.6.2 <i>Test comportamentali</i>	37
CAPITOLO 4: RISULTATI	39
• 4.1 Analisi della struttura genetica della popolazione naturale di <i>Aphanius fasciatus</i>	39

• 4.2 Esperimenti etologici in condizioni controllate	47
- 4.2.1 <i>Test di scelta dell'habitat</i>	47
- 4.2.2 <i>Test comportamentali individuali</i>	56
CAPITOLO 5: DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	61
BIBLIOGRAFIA	71
RINGRAZIAMENTI	86

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

La variabilità genetica delle popolazioni naturali è il risultato dell'azione delle forze evolutive che agiscono direttamente sul pool genico delle stesse, modificando nel tempo le frequenze alleliche e plasmando così la loro struttura genetica. Le forze evolutive possono sia provocare mutamenti nelle frequenze alleliche delle popolazioni attraverso eventi casuali, sia contribuire all'adattamento degli organismi nell'ambiente (Bullini *et al.*, 1998), migliorando la loro sopravvivenza e il successo riproduttivo. Nel primo caso entrano in gioco le *mutazioni*, ossia alterazioni casuali ed ereditarie del corredo cromosomico, che comportano la modificazione o la comparsa di nuovi alleli e rappresentano la fonte primaria della variabilità genetica; il *flusso genico*, connesso con il processo di migrazione degli individui tra popolazioni della stessa specie, può portare nuovi alleli all'interno di una popolazione mutandone le frequenze alleliche e facendole convergere a uno stesso valore; la *deriva genetica*, un processo stocastico che consiste in un fenomeno di fluttuazione casuale delle frequenze alleliche che può provocare nelle generazioni, la fissazione di alcuni alleli e la perdita di altri (Bullini *et al.*, 1998). Come forza evolutiva la deriva ha un ruolo tanto più importante nel modificare le frequenze alleliche quanto più piccole sono le dimensioni delle popolazioni. La forza evolutiva che invece promuove l'adattamento delle popolazioni nell'ambiente è la *selezione naturale*, dove individui che possiedono la combinazione genica più efficiente relativamente ad un certo ambiente (cioè sono più adatti), hanno maggiori probabilità di sopravvivere e di riprodursi, trasmettendo le loro caratteristiche genetiche alle generazioni successive. Nonostante l'attenzione dei ricercatori sia classicamente concentrata su queste quattro forze, esistono altri processi che possono contribuire a originare i *patterns* genetici di variabilità. Tra questi vi è il fenomeno *habitat choice*, che consiste nella distribuzione non casuale e preferenziale degli individui in differenti microhabitat, in relazione al proprio genotipo. L'*habitat choice* rappresenta una prima risposta adattativa individuale (Richardson *et al.*, 2014), che consente agli organismi di far fronte, con risposte comportamentali, alla variabilità delle condizioni ambientali scegliendo attivamente un determinato microhabitat al quale sono più adatti, in funzione del loro genotipo (Bullini *et al.*, 1998). Alcuni autori fanno rientrare questo fenomeno nella selezione distruttiva (Bullini *et al.*, 1998), mentre altri lo collocano nella selezione direzionale (Mayr, 1982); in ogni caso il fenomeno dell'*habitat choice* e la componente comportamentale ad esso associata, rappresenta uno dei meccanismi principali che possono determinare delle divergenze adattative (Richardson *et al.*, 2014), promuovere o

mantenere il polimorfismo genetico (Webster *et al.*, 2012), l'adattamento locale (Richardson *et al.*, 2014), e di conseguenza contribuire a plasmare la struttura genetica delle popolazioni naturali.

L'intensità dell'azione di questi fattori evolutivi è determinata dalle interazioni degli organismi con l'ambiente (Lewontin, 1983; Odling-Smee *et al.*, 2003) e dalla velocità del cambiamento di quest'ultimo (Barton & Partridge, 2000); le alterazioni e le pressioni ambientali possono sia causare effetti negativi ai sistemi biologici, sia promuovere rapidi cambiamenti evolutivi (Parsons, 2005; Nevo, 2011), e pertanto sono spesso alla base delle dinamiche microevolutive (Hoffman & Hercus, 2000; Nevo, 2001; 2011). Pressioni ambientali periodiche possono favorire il superamento della stasi evolutiva aumentando per esempio i tassi di mutazione e di ricombinazione (Lamb *et al.*, 1998), imponendo l'azione della selezione naturale (Hoffmann & Hercus, 2000; Dvornyk & Jahan, 2012; Le Corre & Kremer, 2012; Chapman *et al.*, 2013; Richardson *et al.*, 2014) e promuovendo il mantenimento dell'eterogeneità genetica e l'evoluzione in diversi ambienti (Bijlsma & Loeschcke, 2005). Di base però le popolazioni devono avere una variabilità genetica o genotipica sufficiente per far fronte ad uno stress ambientale, altrimenti potrebbero essere costrette ad emigrare o addirittura estinguersi, o se le condizioni estreme dovessero persistere, la dimensione effettiva di popolazione potrebbe ridursi e con essa anche i livelli di variabilità genetica attraverso la deriva, compromettendo così il mantenimento della "materia prima" per l'adattamento (Hoffmann & Hercus., 2000). Quindi, lo stress ambientale può teoricamente rafforzare l'effetto delle forze evolutive, esercitando però effetti contrastanti sul patrimonio genetico delle popolazioni, rendendo di conseguenza il ruolo delle pressioni ambientali sulle forze di difficile distinzione (Joseph *et al.*, 2012) e di conseguenza i *patterns* genetici osservati nelle popolazioni naturali di difficile interpretazione.

Molto si sa sul ruolo e l'azione di ogni singola forza, ma poco ancora si conosce sul loro peso relativo nel determinare la struttura genetica delle popolazioni e sulle loro interazioni, soprattutto in ambienti eterogenei o in condizioni di stress. Per molto tempo si è dibattuto su quali fossero le forze dominanti, e recentemente tale dibattito sta sostenendo che sia le forze deterministiche (selezione naturale), sia quelle casuali (mutazione, deriva e flusso genico), svolgono il proprio ruolo nell'evoluzione molecolare (Riginos *et al.*, 2002; Wagner, 2008). Tuttavia una questione ancora non chiara è, a quale scala e a quali condizioni ambientali, le forze promuovono una divergenza genetica tale da superare l'effetto del flusso genico, che risulta essere la forza dominante soprattutto su piccole scale spaziali (Whitehead *et al.*, 2011;

Richardson *et al.*, 2014). Ci sono degli studi che suggeriscono che in condizioni di stress ambientale la selezione naturale può accelerare le variazioni genotipiche e fenotipiche rispetto ai tassi desunti dalle documentazioni paleontologiche (Gingerich, 1983; Weber & Diggins, 1990; Reznick *et al.*, 1997), che il tasso dei cambiamenti evolutivi differisce tra gli ambienti, e che i nuovi taxa spesso si sono originati in ambienti disturbati (Parsons, 1993). Altri studi riportano anche un adattamento genetico agli attuali cambiamenti climatici (Stockwell, 2003; Umina *et al.*, 2005; Balanyà *et al.*, 2006; Gienapp *et al.*, 2008; Hoffmann & Willi, 2008; Bell & Gonzales, 2009).

Il ruolo centrale delle pressioni ambientali è stato quindi ampiamente suggerito da predizioni teoriche e da numerosi studi empirici (Nevo 2001; Hoffmann & Hercus., 2000; Nevo, 2011; Whitehead *et al.*, 2013), ma le interazioni tra le forze evolutive sotto pressioni ambientali e le scale spaziali, in cui la divergenza genetica naturale può prevalere rispetto agli effetti di omogeneizzazione del flusso genico, sono ancora problematiche aperte e parzialmente inesplorate (Richardson *et al.*, 2014). Infatti, nonostante ci siano molti lavori che contribuiscono alla conoscenza delle dinamiche evolutive, vi è ancora una carenza di studi su piccole scale temporali e spaziali (Kingsolver *et al.*, 2001; Richardson *et al.*, 2014), che potrebbero essere una buona base per la comprensione delle dinamiche che avvengono su scale spaziali più ampie. Per chiarire il contributo delle forze evolutive nel determinare i modelli genetici e la misura in cui le condizioni di stress contribuiscono ai cambiamenti evolutivi, sono necessari studi temporali e spaziali sulle dinamiche microevolutive in condizioni ambientali variabili (Kawecki & Ebert, 2004). Un'altra questione ancora aperta, riguarda la verifica empirica dell'*habitat choice*: questo fenomeno è stato da tempo teorizzato (Mayr, 1982; Holt, 1987; Bullini *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 2012), spigato attraverso modelli matematici (Holt, 1987; Morris, 2011) e citato in alcuni studi per interpretare i *patterns* genetici osservati in natura, per esempio sui gasteropodi *Tegula funebris* e *Bythinella* (Byers, 1980, 1983; Szarowska *et al.*, 1998), ma mai approfondito o dimostrato attraverso degli approcci sperimentali, che sono fondamentali per la comprensione degli scenari osservati in natura e delle correlazioni tra genotipo e ambiente (Bijlsma & Loeschcke, 2005; Webster, 2012).

Un contributo per la comprensione dell'azione delle forze evolutive su piccole scale spaziali e temporali è lo studio degli effetti dei cambiamenti ambientali sulla struttura genetica della popolazione naturale del killifish *Aphanius fasciatus*. Le indagini sono state condotte in un piccolo ambiente di salina (Saline di Tarquinia), caratterizzato da un gradiente di salinità e

d'ipossia, dove i parametri chimico-fisici diventano più estremi verso le zone a Sud della salina, e nel quale le condizioni ambientali hanno subito notevoli variazioni temporali, caratterizzate da una profonda eutrofizzazione (2003-2005) e da un successivo recupero delle condizioni ambientali (2008) (Cimmaruta *et al.*, 2010; Bellisario *et al.*, 2013). Sulla base di alcune caratteristiche di questa specie, come popolazioni locali altamente isolate, l'alto tasso di riproduzione e un rapido turnover di popolazione (Leonardos & Sinis., 1998; Maltagliati & Camilli, 2000; Angeletti *et al.*, 2010), è stato supposto che lo stress ambientale potesse rapidamente spostare le frequenze alleliche dei sub-demi, a causa della deriva genetica e della selezione naturale. Pertanto sono state valutate le possibili interazioni tra le forze evolutive e verificata l'ipotesi che la divergenza genetica, guidata dalla selezione e dalla deriva, potesse superare l'effetto di omogeneizzazione del flusso genico interno. Inoltre, è stato verificato l'effetto delle condizioni di stress sulle forze stocastiche e deterministiche (Angeletti *et al.*, submitted).

I dati hanno evidenziato un ruolo principale per la selezione naturale e la deriva genetica, entrambe guidate dalle pressioni ambientali e contrastanti il flusso genico su una piccola scala spaziale (circa 2 km). Nel dettaglio, i risultati ottenuti in diversi studi (Cimmaruta *et al.*, 2003; 2010; Angeletti *et al.*, 2010), hanno mostrato che durante l'eutrofizzazione (2003-2005), la struttura genetica della popolazione ha presentato segni evidenti dell'effetto di una pressione ambientale intensa, presentando una divisione in sub-demi caratterizzati da una notevole eterogeneità genetica e disequilibri di Hardy-Weinberg (HW). L'analisi mediante i marcatori allozimici ha suggerito un ruolo della selezione naturale nel plasmare la struttura genetica della popolazione in condizioni di stress, in particolare per il locus ADA (adenosina deaminasi) (Angeletti *et al.*, 2009; 2010), che ha presentato un'eterogeneità allelica e genotipica oltre a deficit significativi di eterozigoti nella zona a Nord (zona in cui le pressioni ambientali sono meno estreme). E' stata trovata anche una correlazione significativa tra le frequenze alleliche e genotipiche di questo locus e l'ossigeno disciolto, e una distribuzione clinale di tali frequenze in relazione al gradiente ambientale delle vasche della salina, in cui l'allele *ADA*¹⁰⁰ aumentava verso le zone a Sud della salina, dove le concentrazioni di ossigeno sono minori. Nel 2003 e nel 2005, anche altri loci hanno mostrato frequenze eterogenee e deficit di eterozigoti nelle zone a Nord. Questi deficit sono stati spiegati come conseguenza di un effetto Whalund locale, dato dagli shift delle frequenze alleliche a Sud (per selezione e deriva), e la migrazione degli individui verso Nord (presumibilmente per sfuggire a condizioni estreme). Dopo le azioni di recupero delle Saline (2006), l'intensità delle forze

evolutive è sembrata divenire meno incisiva. Infatti, nei campionamenti del 2008, non sono stati rilevati scostamenti dall'equilibrio di HW, le frequenze alleliche e genotipiche risultavano omogenee, e ADA presentava frequenze simili lungo tutta la salina, non risultando così più sotto selezione direzionale (Angeletti *et al.*, submitted). Pertanto il flusso genico emergeva come principale forza, ristabilendo l'equilibrio di HW e rendendo omogenea la struttura genetica in poche generazioni.

Sebbene la divergenza genetica osservata per questa popolazione sia riconducibile all'azione delle forze evolutive, in particolare alla selezione e alla deriva genetica, la cui intensità viene rafforzata sotto le pressioni ambientali, come possibile causa corresponsabile di una parte del *pattern* genetico osservato è stato ipotizzato il fenomeno dell'*habitat choice*. Pertanto, sulla base di quanto è stato osservato e supposto mediante studi su campo sulla popolazione di *Aphanius* delle Saline di Tarquinia, due sono le ipotesi principali da verificare e che rappresentano lo scopo di questo lavoro: i) dal momento che le Saline stanno subendo un nuovo peggioramento delle condizioni ambientali ci si aspetta, e quindi si vuole verificare, la presenza nella popolazione di un'eterogeneità genetica, deviazioni dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, un andamento clinale delle frequenze alleliche e, se è vero che il fattore di selezione per il locus ADA è l'ossigeno, l'affermazione dell'allele ADA^{100} tra gli individui durante fenomeni di ipossia; ii) se è vera l'ipotesi del fenomeno dell'*habitat choice* nel determinare la struttura genetica di questa popolazione, e quindi che l'andamento delle frequenze alleliche di alcuni loci è il risultato di una scelta non casuale di determinate condizioni da parte degli individui in funzione del loro genotipo, questo potrebbe essere studiato e verificato con esperimenti di laboratorio, attraverso l'osservazione, in condizioni controllate, dei profili comportamentali degli individui in relazione con i loro tratti genetici. Per verificare tali ipotesi è stato condotto uno studio sulla struttura genetica della popolazione naturale di *Aphanius fasciatus* delle Saline Tarquinia, con campionamenti negli anni 2012 e 2013 e parallelamente, sono stati condotti dei test comportamentali in acquario, associati a successive analisi genetiche, su individui sottoposti a differenti condizioni di ossigenazione dell'acqua, ritenendo che la carenza di ossigeno sia il principale fattore di stress per questa popolazione, dati i costanti fenomeni di eutrofizzazione che avvengono in natura.

CAPITOLO 2: FORZE EVOLUTIVE, INTERAZIONI GENOTIPO-AMBIENTE E *HABITAT CHOICE*

2.1 Forze evolutive e variabilità genetica

I fattori che modificano la struttura genetica di una popolazione sono le cosiddette forze evolutive: *mutazione*, *deriva genetica*, *flusso genico* e *selezione naturale*. Tali fattori possono interagire variamente fra loro e con i fattori ambientali (Bullini *et al.*, 1998), determinando i *patterns* di variabilità genetica che si riscontrano in natura.

Le *mutazioni* sono alterazioni casuali ed ereditarie del corredo genetico che comportano la modificazione o la comparsa di nuovi alleli, e rappresentano la fonte primaria della variabilità genetica. Le mutazioni possono essere indotte da agenti mutageni, ma esistono anche mutazioni cosiddette "spontanee" che avvengono senza che sia possibile evidenziare gli agenti fisici o chimici che le hanno indotte. Il verificarsi delle mutazioni provoca una variazione delle frequenze geniche, ma poiché i tassi di mutazione sono sempre molto bassi (10^{-4} - 10^{-6} per cellula per generazione), tali variazioni risultano trascurabili (Bullini *et al.*, 1998). Si è visto però che ogni nuovo individuo è portatore di nuove mutazioni, perciò, anche se l'incidenza delle mutazioni è molto bassa, il numero di nuove mutazioni per generazione nel pool genico è piuttosto elevato.

Il *flusso genico* è connesso con il processo di migrazione di individui riproduttivi tra popolazioni della stessa specie. Si verifica quando individui o cellule riproduttive (gameti o polline) passano da una popolazione all'altra per dispersione attiva o passiva, e le frequenze alleliche dei migranti sono diverse da quelle dei residenti. Il flusso genico può quindi portare nuovi alleli all'interno di una popolazione o può mutarne le frequenze alleliche.

La *deriva genetica* o *genetic drift* è una variazione della frequenza allelica dovuta al caso; è un processo stocastico che consiste in un fenomeno di fluttuazione casuale delle frequenze alleliche e può provocare nelle generazioni, la fissazione di alcuni alleli e la perdita di altri. La deriva ha dunque un ruolo importante nel modificare le frequenze alleliche, soprattutto quanto più piccole sono le dimensioni della popolazione e quanto più piccolo è il numero di individui riproduttori (Bullini *et al.*, 1998). Quindi, più piccolo è un campione (o la popolazione considerata), maggiori sono le probabilità che esso risenta di fluttuazioni statistiche casuali e non sia pertanto rappresentativo della popolazione di origine. Le conseguenze della deriva genetica sono un cambiamento casuale delle frequenze alleliche ed una riduzione della

variabilità genetica. Un caso estremo di deriva genetica è “l’effetto fondatore” che si produce quando un piccolo numero di individui si separa da una popolazione per andare a formare una nuova colonia. In questo caso è probabile che il pool genico di questo piccolo gruppo non sia rappresentativo del pool genico della popolazione di origine. In altre parole esso non è un campione statisticamente rappresentativo. Cambiamenti stocastici delle frequenze alleliche, simili a quelli causati dall’effetto del fondatore, si possono verificare quando una popolazione va incontro a un “collo di bottiglia”, il cui effetto si produce quando una popolazione viene decimata da un evento catastrofico. Il collo di bottiglia può avere rilevanti conseguenze genetiche quali la riduzione di eterozigosità, la riduzione del numero di alleli e della percentuale di loci polimorfi (Massa & Ingegnoli, 1999). A seguito del collo di bottiglia la popolazione può recuperare e crescere rapidamente e in questo caso le conseguenze genetiche saranno limitate; se invece la popolazione rimane piccola per molte generazioni, la perdita di variabilità genetica sarà molto più importante. Quando una popolazione esce da un collo di bottiglia è molto probabile che il suo pool genico sia diverso da quello originario e sicuramente con una variabilità inferiore.

Le forze sopra descritte sono dette stocastiche o casuali, poiché provocano mutamenti nelle frequenze alleliche delle popolazioni, ma non contribuiscono ad adattare gli organismi all’ambiente (Bullini *et al.*, 1998). Invece la forza che promuove l’adattamento, ovvero cambiamenti negli organismi, i quali acquisiscono delle caratteristiche (morfologiche, fisiologiche, comportamentali) che migliorano la loro sopravvivenza e il successo riproduttivo in un particolare ambiente, è la *selezione naturale*, che è pertanto l’unica forza evolutiva deterministica. La *selezione naturale* è definita come la sopravvivenza e la riproduzione differenziale di varianti genetiche alternative dove, alcune di queste, aumentano il successo riproduttivo dei portatori rispetto ai portatori di altre varianti. Il risultato di questa competizione è che gli individui che possiedono la combinazione genica più efficiente relativamente ad un certo ambiente (cioè sono più adatti) hanno maggiori probabilità di sopravvivere e di riprodursi, trasmettendo le loro caratteristiche genetiche alle generazioni successive. Da un punto di vista generale si possono distinguere tre modalità attraverso le quali agisce la selezione naturale: selezione direzionale, distruttiva e stabilizzante. Ciascuno di questi tre tipi di selezione agisce modificando la distribuzione di frequenza di un determinato carattere all’interno di una popolazione. Si parla di selezione direzionale quando la selezione naturale favorisce gli individui che si trovano ad uno dei due estremi dell’intervallo di variabilità del carattere (individui rari). Questi individui che prima erano

poco frequenti nella popolazione, iniziano a godere di un vantaggio adattativo e diventano più numerosi. Alcuni genotipi prima svantaggiati risultano favoriti, aumentando quindi di frequenza. Quando la selezione naturale favorisce entrambe le forme estreme dell'intervallo di variabilità, si parla di selezione distruttiva, che opera in maniera opposta alla selezione stabilizzante. Si parla infine di selezione stabilizzante quando vengono favoriti gli individui con genotipi intermedi, mentre vengono sfavoriti gli estremi (Bullini *et al.*, 1998).

L'intensità dell'azione di queste forze è determinata dalle interazioni degli organismi con l'ambiente (Lewontin, 1983; Odling-Smee *et al.*, 2003) e dalla velocità del cambiamento di quest'ultimo (Barton & Partridge, 2000); le alterazioni e le pressioni ambientali possono sia causare effetti negativi ai sistemi biologici, favorendo l'azione della deriva e di conseguenza l'erosione genetica, sia promuovere rapidi cambiamenti evolutivi (Parsons, 2005; Nevo, 2011), ricoprendo così un ruolo importante nelle dinamiche microevolutive (Hoffman & Hercus 2000; Nevo 2001; 2011). Pressioni ambientali periodiche possono favorire il superamento della stasi evolutiva aumentando per esempio i tassi di mutazione e di ricombinazione (Lamb *et al.*, 1998), imponendo l'azione della selezione naturale (Hoffmann & Hercus, 2000; Dvornyk & Jahan, 2012; Le Corre & Kremer, 2012; Chapman *et al.*, 2013; Richardson *et al.*, 2014) e promuovendo il mantenimento dell'eterogeneità genetica (Bijlsma & Loeschcke, 2005). Di base però le popolazioni devono avere una variabilità genetica o genotipica sufficiente per far fronte ad uno stress ambientale, altrimenti potrebbero essere costrette ad emigrare o addirittura ad estinguersi, o se le condizioni estreme dovessero persistere, la dimensione effettiva di popolazione potrebbe ridursi e con essa anche i livelli di variabilità genetica attraverso la deriva, e così compromettere così il mantenimento della "materia prima" per l'adattamento (Hoffmann & Hercus., 2000). Quindi, lo stress ambientale può teoricamente rafforzare l'effetto delle forze evolutive, esercitando però effetti contrastanti sul patrimonio genetico delle popolazioni, rendendo di conseguenza il ruolo delle pressioni ambientali sulle forze di difficile distinzione (Joseph *et al.*, 2012) e quindi i *patterns* genetici osservati nelle popolazioni naturali di difficile interpretazione.

Prove convincenti per la comprensione dell'azione delle forze evolutive, in particolare della selezione, sono le variazioni genetiche clinali lungo i gradienti ambientali (Endler, 1986). Le variazioni clinali sono particolarmente interessanti perché forniscono informazioni sulle relazioni tra specifici fattori ambientali e tratti fenotipici o genetici, e questo può aiutare ad esaminare questioni relative al ruolo della variabilità genetica nell'adattamento all'eterogeneità ambientale (Schmidt *et al.*, 2008). Infatti, diversi studi mostrano l'azione della

selezione, quando gli alleli di un dato locus co-variano con un particolare fattore ambientale lungo una linea geografica o lungo un gradiente ambientale (Schmidt *et al.*, 2011). I gradienti ambientali possono verificarsi su più scale, da quella più ampia (es. la latitudine) a quella più piccola (es. zone intertidali); se i cambiamenti nelle frequenze alleliche sono guidate dalla selezione attraverso gradienti ambientali, allora gli stessi modelli dovrebbero essere osservati più volte e in regioni geografiche distinte. L'esistenza di clini nella distribuzione delle varianti genetiche non neutre, per esempio gli allozimi, lungo gradienti ambientali possono indicare un effetto della selezione (Powers *et al.*, 1991). L'utilizzo di marcatori allozimici, ha rivelato il ruolo della selezione naturale nel mantenimento del polimorfismo genetico: il polimorfismo allozimico è stato ampiamente utilizzato in passato come marcatore neutrale negli studi di genetica di popolazione. Tuttavia, molti di questi enzimi sono tutt'altro neutrali perché servono importanti funzioni catalitiche centrali per il metabolismo della maggior parte degli organismi (Eanes, 1999). Inoltre, il mantenimento dei polimorfismi in alcuni loci allozimici è stato correlato a fenomeni di selezione naturale divergente attraverso gradienti ambientali (Watt, 1977; Eanes, 1999; Galindo *et al.*, 2009).

L'incidenza dei cambiamenti ambientali sulle popolazioni è stata ben studiata nei sistemi marini (Somero, 2005); l'analisi dei modelli multilocus delle variazioni associate ai gradienti latitudinali nelle comunità marine, fornisce un quadro in cui esaminare la selezione e deriva genetica su larga scala geografica. Un esempio di tale approccio (Burnett *et al.*, 2007) è il killifish, *Fundulus heteroclitus*, un teleosteo di estuario con un ampio range geografico nel settore nord occidentale dell'Atlantico. La popolazione presenta un'elevata eterozigosità, e 13 di 16 loci allozimici polimorfici esibiscono un cline latitudinale tra le popolazioni campionate (Powers & Place 1978; Ropson *et al.*, 1990) indicando che la selezione e forse anche la deriva genetica possono giocare un ruolo nel mantenimento di questi clini specifici (Ropson *et al.*, 1990). Inoltre, per *F. heteroclitus*, è stata ben documentata l'associazione tra la temperatura dell'acqua e la frequenza allelica del locus LDH-B (Mitton & Koehn, 1975; Crawford & Powers, 1989; 1992).

Un altro studio allozimico, condotto da Cimmaruta *et al.* (2005), ha analizzato i rapporti tra la struttura genetica del nasello (*Merluccius merluccius*) e l'andamento delle principali caratteristiche ambientali (salinità e temperatura) nel suo areale di distribuzione. Le popolazioni dell'Atlantico e del Mediterraneo sono risultate geneticamente differenziate. Due loci in particolare, GAPDH e GPI-2 hanno mostrato una variazione clinale delle frequenze alleliche in senso longitudinale, dove gli alleli di entrambi i loci che presentano una completa

inversione tra i campioni atlantici e quelli del Mediterraneo orientale. Il cline delle frequenze alleliche è risultato significativamente correlato alla variazione di due parametri ambientali: temperatura e salinità lungo un gradiente Est- Ovest, suggerendo un plausibile ruolo dei meccanismi della selezione su questi loci.

Anche nel salmone dell'Atlantico, *Salmo salar*, sono stati osservati diversi polimorfismi allozimici (Torrisen *et al.*, 1993; 1994; 1995; Verspoor 1986; 1994; Verspoor *et al.*, 2005), ma il locus MEP-2, fornisce la miglior prova a sostegno della selezione. Le popolazioni di salmone dell'Atlantico che abitano fiumi più caldi mostrano alte frequenze dell'allele *MEP-2*¹⁰⁰, mentre le popolazioni che vivono nei fiumi freddi mostrano elevate frequenze dell'allele *MEP-2*¹²⁵, formando così un cline latitudinale in Europa e nel Nord l'America (Verspoor & Jordan, 1989). Inoltre, esistono significative differenze nelle frequenze di MEP-2 anche tra le popolazioni all'interno dei sistemi fluviali (Verspoor & Jordan, 1989; Verspoor *et al.*, 1991), che sembrano essere mantenute dalla selezione naturale (Verspoor *et al.*, 1991; Jordan *et al.*, 1997), in relazione alla crescita giovanile (Jordan & Youngson, 1991; Gilbey *et al.*, 1999) e alla maturità sessuale (Jordan *et al.*, 1990; Consuegra *et al.*, 2005a). Questo suggerisce che la variabilità genetica al locus MEP-2, o in qualche gene strettamente collegato, è probabilmente adattativa e che le differenze osservate tra le popolazioni di salmoni possono riflettere adattamenti locali a diversi regimi termici.

In alternativa, i gradienti ambientali possono avere maggiore impatto sulla fitness delle popolazioni a scale spaziali più piccole rispetto ad un gradiente latitudinale. Un esempio calzante è il polimorfismo dei loci MPI e GPI nel crostaceo *Semibalanus balanoides*. Una ricerca svolta da Dufresne *et al.* (2002) ha permesso di evidenziare il ruolo della selezione sulla definizione della struttura genetica del cirripede *Semibalanus balanoides*. Questo cirripede è tipico dell'ambiente intertidale, una zona di confine fra ambiente terrestre e marino, ciclicamente interessata dal flusso di marea. Le comunità di questa zona sono di conseguenza soggette a drastiche variazioni giornaliere di disponibilità di acqua ed a forti variazioni di temperatura (Campbell, 1995). L'analisi degli allozimi (Holm & Bourget, 1994) in popolazioni della costa atlantica del Canada ha evidenziato una variazione geografica nelle frequenze alleliche di due loci (MPI e GPI). E' stato così ipotizzato che la temperatura svolge una pressione selettiva sulla capacità di sopravvivenza di questi organismi così come in altre specie sessili (Bertness & Gaines, 1993).

Le variazioni clinali associate ai gradienti ambientali, diventano più marcate su piccole scale spaziali (Schmidt *et al.*, 2008), dove in una distanza di pochi metri, un cambiamento

ambientale estremo come uno stress termico, richiede alcune risposte fisiologiche per la sopravvivenza (Sanford *et al.*, 2003). Un esempio di andamento clinale su piccole scale spaziali, è il mollusco *Littorina saxatilis*: campioni intercotidali sono stati raccolti lungo transetti verticali in cinque diverse località geografiche dell'Europa occidentale. L'analisi elettroforetica ha evidenziato cinque loci polimorfici di cui uno, AAT, ha mostrato variazioni clinali nelle frequenze alleliche in pochi metri di ogni transetto suggerendo che questo locus, o un locus ad esso associato, è sotto la selezione, poiché l'allele AAT^{120} è più frequente nelle zone più alte, mentre l'allele AAT^{100} è più comune nelle zone più basse (Johannesson & Johannesson, 1989). Il locus AAT offre diversi esempi di variazioni clinali non neutrali evidenziando così l'azione della selezione naturale. In primo luogo, di cinque loci enzimi esaminati (Johannesson *et al.*, 1995), solo AAT ha mostrato una variazione clinale nella zona intertidale. Inoltre, ci sono popolazioni, per esempio sulla costa atlantica della Spagna (Galizia), che mostrano un cline invertito dove AAT^{120} è più comune nella zona più bassa (Johannesson *et al.*, 1993). Questo fornisce un esempio di un modello alternativo, suggerendo che il cline AAT è soggetto agli effetti dell'interazione genotipo-ambiente. Gli esempi riportati, e in generale gli studi sulle variazioni clinali associate ai gradienti ambientali, rappresentano ottimi "test critici" per valutare le dinamiche evolutive genetiche e fenotipiche, e per valutare l'importanza relativa delle forze evolutive che causano variabilità genetica (Nevo, 1995b).

Nonostante si sappia molto sul ruolo e l'azione di ogni singola forza, si conosce ancora poco sul loro peso relativo nel determinare la struttura genetica delle popolazioni e sulle loro interazioni, soprattutto in ambienti eterogenei o in condizioni di stress. Per molto tempo si è dibattuto sul quali fossero le forze dominanti, e recentemente il dibattito tra neutralismo e selezione, sembra pervenire alla conclusione che sia le forze deterministiche (selezione naturale), sia quelle casuali (mutazione, deriva e flusso genico), sono entrambi aspetti importanti e svolgono il proprio ruolo nell'evoluzione molecolare (Riginos *et al.*, 2002; Wagner, 2008). Tuttavia una questione ancora poco chiara è, a quale scala e a quali condizioni ambientali, le forze promuovono una divergenza genetica tale da superare l'effetto del flusso genico, che risulta essere la forza dominante soprattutto su piccole scale spaziali (Whitehead *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2014). Infatti, nonostante ci siano molti lavori che contribuiscono alla conoscenza delle dinamiche evolutive, vi è ancora una carenza di studi su piccole scale temporali e spaziali (Kingsolver *et al.*, 2001; Richardson *et al.*, 2014), che potrebbero essere una buona base per la comprensione delle dinamiche che avvengono su

scale spaziali più ampie. Inoltre, nonostante l'attenzione dei ricercatori si sia concentrata su queste quattro forze, in particolare sulla selezione naturale, esiste un altro fattore che potrebbe contribuire a generare i *patterns* naturali di variabilità genetica. Tale fenomeno, detto *habitat choice*, è una distribuzione preferenziale dei genotipi in micro-habitat confacenti ai genotipi stessi e può promuovere il mantenimento in una popolazione di genotipi differenti, favoriti quindi in diverse tessere ambientali in cui la popolazione vive, differenziando geneticamente subpopolazioni contigue o comunque vicine l'una all'altra (Bullini *et al.*, 1998).

2.2 Ruolo del fenomeno dell'*habitat choice* nella determinazione dei *patterns* genetici di variabilità

Il fenomeno dell'*habitat choice*, come precedentemente accennato, consiste nella distribuzione non casuale e preferenziale degli individui in microhabitat diversi in relazione al proprio genotipo, e rappresenta una prima risposta adattativa individuale all'eterogeneità ambientale (Richardson *et al.*, 2014). Questo meccanismo consente agli organismi di far fronte, con risposte comportamentali, alla variabilità delle condizioni ambientali distribuendosi in funzione del loro genotipo e scegliendo attivamente un determinato microhabitat al quale sono geneticamente più adattati (Bullini *et al.*, 1998). Altri autori (Webster, 2012) definiscono l'*habitat choice* come qualsiasi comportamento che induce un individuo a passare più tempo in un tipo di habitat rispetto ad altri (Futuyma, 2001), e questo può avvenire attraverso per esempio, un movimento attivo in un habitat preferito, una dispersione ridotta nell'habitat preferenziale rispetto ad habitat non preferenziali oppure ai cambiamenti nei tempi di dispersione che influenzano la probabilità di arrivare in habitat diversi. Gli habitat possono essere spazialmente separati su diverse scale, per esempio anche parti diverse della stessa pianta ospitante (Denno *et al.*, 1995). Alcuni autori fanno rientrare questo fenomeno nella selezione distruttiva (Bullini *et al.*, 1998), mentre altri lo collocano nella selezione direzionale (Mayr, 1982). In ogni caso tale fenomeno e la componente comportamentale ad esso associata, rappresenta uno dei meccanismi principali che possono determinare delle divergenze adattative (Richardson *et al.*, 2014), promuovere o mantenere il polimorfismo genetico (Webster *et al.*, 2012), l'adattamento locale (Richardson *et al.*, 2014), e in casi estremi, portare anche alla speciazione simpatica (Maynard Smith, 1966; Bullini *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 2012).

L'*habitat choice* rappresenta uno dei più importanti meccanismi che promuove l'adattamento microgeografico (Ravigné *et al.*, 2009; 2004), ossia l'adattamento locale di una popolazione all'interno della zona di dispersione degli organismi (Richardson *et al.*, 2014). Quando genotipi si distribuiscono non casualmente nello spazio, una differenziazione su piccola scala può sorgere rapidamente e non essere ostacolata dal flusso genico (Bolnick *et al.*, 2013). Se questa segregazione spaziale coinvolge fenotipi o genotipi corrispondenti agli habitat che conferiscono maggiore fitness, il risultato è un adattamento microgeografico. Tale segregazione spaziale è possibile solo all'interno di un range di dispersione, poichè gli individui devono "testare" habitat diversi e scegliere quello che conferisce una maggiore fitness. Esempi di divergenza adattativa attraverso l'*habitat choice* si ritrovano soprattutto negli insetti fitofagi, dove i diversi genotipi corrispondono a specie vegetali diverse, promuovendo la divergenza genetica, l'adattamento locale, e forse la speciazione (Dres & Mallet, 2002).

L'*habitat choice*, oltre a promuovere e mantenere l'adattamento locale, ricopre un ruolo nei livelli di polimorfismo, nell'isolamento riproduttivo e nella speciazione, concetti che tutt'oggi sono ancora trascurati. In generale, il mantenimento della variabilità genetica all'interno delle popolazioni in ambienti eterogenei è stato ampiamente discusso in passato, dai modelli teorici agli studi sperimentali (Hedrick, 1986). Uno dei primi modelli proposti (Levene, 1953), ha mostrato che il mantenimento del polimorfismo in un ambiente con due habitat è possibile. Questo modello si basa sulla migrazione casuale di individui negli habitat, dove la selezione favorisce uno dei genotipi in ogni habitat e dove un numero costante di individui contribuisce alla generazione successiva. Questo modello è stato la base del concetto di speciazione simpatica (Maynard Smith, 1966), e quindi del concetto di *habitat choice*, dove in un primo momento, in un ambiente ecologicamente eterogeneo, una popolazione evolve un polimorfismo genetico stabile che determina preferenze per habitat diversi, con una fitness correlata all'habitat, mentre nel secondo momento, tra le forme che occupano tali habitat (per scelta) si instaurano barriere di isolamento riproduttivo. In questo modo il fenomeno dell'*habitat choice* può influenzare il grado d'isolamento riproduttivo e di conseguenza la probabilità di speciazione, o aumentando la gamma di caratteristiche alle quali in un ambiente eterogeneo può essere mantenuto un polimorfismo stabile attraverso la selezione (Ravigne *et al.*, 2009), oppure può causare l'accoppiamento assortativo favorendo la selezione contro ibridi e costituendo quindi una forma di rinforzo (Servidio *et al.*, 2003). Pertanto, se la scelta dell'habitat aiuta a mantenere il polimorfismo e se il polimorfismo rafforza l'adattamento

locale, aumenta anche la probabilità di speciazione e se la scelta di habitat genera anche accoppiamento assortativo, il suo contributo alla speciazione sarà maggiore.

Il concetto di *habitat choice*, nonostante sia stato da tempo teorizzato (Mayr, 1982; Holt, 1987; Bullini *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 2012) e spiegato attraverso modelli matematici (Holt, 1987; Morris, 2011; Ravigne, 2013) per le importanti conseguenze che può comportare nelle dinamiche evolutive, è stato per lo più citato in pochi studi per spiegare i *patterns* di variabilità genetica (Byers, 1980, 1983; Szarowska *et al.*, 1998). Un esempio di *habitat choice* è quello dalla lumaca di mare *Tegula funebris*. Questa specie vive nella zona intertidale, caratterizzata da improvvise e marcate fluttuazioni ambientali. Byers (1983) ha condotto uno studio su individui di *T. funebris* in due località della costa Pacifica del Nord America: Cape Arago, nell'Oregon, e Mukkaw Bay, a Washington. Per evidenziare le preferenze di habitat delle singole lumache è stata considerata la disposizione da loro assunta nelle pozze permanenti, misurata come altezza media rispetto al livello dell'acqua contenuta all'interno di pozze. Le dimensioni della lumaca, il sesso, e il genotipo nei due loci più polimorfici, (LAP e GPI) sono stati messi in correlazione con la scelta dell'habitat. A Cape Arago si è evidenziata una correlazione fra altezza intertidale media, dimensione della lumaca e la presenza di un allele al locus LAP; mentre a Mukkaw Bay la correlazione interessava altezza media, dimensioni, e presenza di un allele al locus GPI. L'associazione statisticamente significativa tra i genotipi ai due loci polimorfici e le misure sulla preferenza dell'habitat in *T. funebris* permettono di avvalorare l'ipotesi che una parte della variazione genetica a questi loci, o ad altri strettamente associati, sia correlata alla fitness negli ambienti intertidali eterogenei. La variazione genetica al locus GPI ed il probabile comportamento ad essa correlato sembrerebbero in relazione con un adattamento termico. La distribuzione delle popolazioni di *T. funebris* nella zona intertidale, infatti, è influenzata dal gradiente di temperatura (Byers, 1980). Nei giorni assolati e caldi le lumache si muovono verso il basso della zona intertidale e restringono il loro range di distribuzione in altezza rispetto ai giorni più freddi e con cielo coperto. Poiché sia il gradiente termico che i genotipi della GPI risultano associati con la distribuzione delle lumache lungo la colonna intertidale, viene ipotizzato un possibile effetto della GPI sulla fisiologia di *T. funebris*.

Uno studio sul gasteropode *Bythinella* (Szarowska *et al.*, 1998) ha evidenziato l'esistenza di una possibile correlazione fra il locus GPI e l'adattamento degli organismi all'ambiente. Durante il periodo estivo fra il 1994 e il 1995, esemplari di *Bythinella* sono stati campionati in ognuna delle 20 località dell'Europa centrale. Una parte di questi è stata utilizzata per ricavare

un coefficiente multivariato di variabilità considerando i caratteri morfologici degli individui, mentre la parte restante è stata sottoposta ad elettroforesi multilocus per una caratterizzazione di tipo genetico. La GPI è risultata polimorfica in 13 delle 20 popolazioni. Inoltre è apparso evidente che in condizioni sfavorevoli, causate da stress ambientali come temperature più elevate e ridotta concentrazione di ossigeno o salinità elevata, esista una correlazione diretta nelle frequenze alleliche della GPI e scelta dell'habitat.

Dal momento in cui, sono pochi i casi naturali per la valutazione del ruolo dell'*habitat choice* nel mantenimento del polimorfismo nelle popolazioni (Webster, 2012), e pochi i dati riguardanti l'effetto di tale fenomeno nel ridurre il flusso genico, contribuire all'adattamento locale e all'isolamento riproduttivo e infine alla speciazione, questo fenomeno resta un argomento che necessita di approfondimenti attraverso approcci sperimentali, che prevedono l'analisi di profili comportamentali per l'osservazione di eventuali relazioni tra la scelta non casuale di un habitat e il genotipo (Bijlsma & Loeschcke, 2005; Edelaar *et al.*, 2008; Webster, 2012), e quindi per la comprensione degli scenari osservati in natura.

2.3 *Aphanius fasciatus* come modello studio delle interazioni tra le forze evolutive e del fenomeno dell'*habitat choice*

Un contributo per la comprensione dell'azione delle forze evolutive su piccole scale spaziali e temporali è lo studio degli effetti dei cambiamenti ambientali sulla struttura genetica della popolazione naturale del killifish *Aphanius fasciatus*. Le indagini sono state condotte in un piccolo ambiente di salina (Saline di Tarquinia), caratterizzato sia da un gradiente di salinità e d'ipossia, dove i parametri chimico-fisici diventano più estremi verso le zone a sud della salina stessa, che da condizioni ambientali che hanno subito notevoli variazioni temporali, caratterizzate da una profonda eutrofizzazione (2003-2005) e da un successivo recupero delle condizioni ambientali (2007-2008) (Cimmaruta *et al.*, 2010; Bellisario *et al.*, 2013).

Sulla base di alcune caratteristiche di questa specie, come popolazioni locali altamente isolate, l'alto tasso di riproduzione e un rapido turnover di popolazione (Leonardos & Sinis, 1998; Maltagliati & Camilli, 2000; Angeletti *et al.*, 2010), è stato supposto che lo stress ambientale potesse rapidamente spostare le frequenze alleliche di sub-demi, a causa della deriva genetica e della selezione naturale. Pertanto sono state valutate le possibili interazioni tra le forze evolutive e verificata l'ipotesi che la divergenza genetica, guidata dalla selezione e dalla deriva, potesse superare l'effetto di omogeneizzazione del flusso genico interno. Inoltre, è

stato verificato l'effetto delle condizioni di stress sull'incisività delle forze stocastiche e deterministiche (Angeletti *et al.*, submitted). Il metodo utilizzato per l'analisi della struttura genetica di popolazione è stato quello dello studio degli allozimi tramite elettroforesi multilocus (Cimmaruta *et al.*, 2003).

I primi campionamenti e analisi della struttura genica di *A. fasciatus* risalgono al 1998, dove vennero prese in considerazione la popolazione delle saline insieme ad altre 9 popolazioni del bacino del Mediterraneo, al fine di evidenziare la correlazione fra livello di variabilità genetica e stress ambientale, confrontando i campioni raccolti in habitat caratterizzati da un diverso tipo di disturbo. Tra le 10 popolazioni studiate, particolarmente significativo risultò il confronto tra la popolazione delle Saline di Tarquinia e quella della laguna di Orbetello. La popolazione delle Saline di Tarquinia vive in un ambiente in cui lo stress è soprattutto di origine naturale, cioè provocato dall'instabilità stagionale dei parametri chimico-fisici quali temperatura e salinità; la popolazione di Orbetello, invece, è sottoposta a una forte pressione antropica dovuta a cause quali la pesca, l'inquinamento da scarichi urbani e agricoli, l'acquacoltura etc. Le due popolazioni, pur essendo geograficamente e geneticamente vicine, sono risultate molto differenti in termini di variabilità genetica. I dati raccolti infatti, evidenziavano un minor livello di variabilità genetica (in termini di numero di alleli, di eterozigosi media osservata e attesa) per i campioni della laguna di Orbetello. La popolazione di Tarquinia, che subisce un impatto esclusivamente di tipo naturale ed occupa un ambiente abbastanza integro, presentava valori doppi.

Un altro studio della popolazione delle Saline di Tarquinia è stato condotto nel 2003 (Cardillo, 2003; Angeletti, 2006) in considerazione del calo di biodiversità specifica evidenziato dall'analisi della comunità macrozoobenthonica, attribuito al peggioramento delle condizioni ambientali delle vasche (Bramucci, 2001), in seguito alla dismissione dell'impianto per la raccolta del sale. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare, se tale peggioramento potesse provocare un effetto simile, a livello genetico, nella popolazione locale di *Aphanius*, partendo dal presupposto che lo stress ambientale può avere degli effetti sulla struttura genetica della popolazione, accelerando l'azione della deriva genetica e della selezione naturale.

L'analisi comparata delle frequenze alleliche del 2003 e quelle del 1998 ha messo in evidenza una diminuzione del numero totale di alleli e perdita di varianti alleliche rare. Tutto questo era accompagnato da un abbassamento della percentuale di loci polimorfici e da un calo dell'eterozigosi media attesa e osservata. Quindi, con l'instaurarsi di condizioni di maggiore

stress, la dimensione effettiva della popolazione ha evidentemente subito una notevole riduzione, favorendo l'innescò dei fenomeni di deriva genetica, ed evidenziando così un significativo parallelismo tra il calo di biodiversità a livello di specie e di popolazione in conseguenza di un aumento della pressione ambientale.

Inoltre, sono stati confrontati i pool genici di individui campionati in siti con diversa salinità e diversa concentrazione di ossigeno disciolto, al fine di rilevare eventuali disomogeneità genetiche tra i diversi gruppi (sub-demi). Per alcuni dei loci analizzati, si era riscontrata una netta differenza tra le frequenze alleliche dei gruppi raccolti a più elevata salinità (zone a Sud) e basse concentrazioni di ossigeno disciolto rispetto a quelli campionati in siti caratterizzati da condizioni meno estreme (zone a Nord). Questo, unito al fatto che gli individui raccolti nelle vasche a Sud erano pochi, aveva fatto ipotizzare che le condizioni estreme potessero operare una controselezione sugli individui meno adatti. In particolare l'allele *GPI-1*¹⁰⁰ aveva mostrato un aumento progressivo della propria frequenza all'aumentare della salinità e al diminuire dell'ossigeno disciolto (Angeletti *et al.*, submitted).

Nel 2005, sono stati studiati nel dettaglio i 5 loci polimorfici (ADA, MPI, GPI-1, GPI-3, PGM-1) che nello studio precedente, avevano mostrato frequenze alleliche eterogenee correlate in alcuni casi alla salinità, o scostamenti significativi dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, indice di possibili pressioni selettive in atto sui loci studiati (o su altri ad essi "linked") (Polesi, 2005; Angeletti *et al.*, 2009).

L'obiettivo, era quello di comprendere come le variazioni dei parametri ambientali più importanti, quali la salinità, la temperatura e l'ossigeno disciolto, influenzassero la struttura genetica di *A. fasciatus*. I risultati hanno mostrato che le condizioni ambientali eterogenee dei diversi bacini determinano la suddivisione in sub-demi della popolazione, essendo risultata un'eterogeneità genetica in termini di frequenze alleliche e genotipiche dei campioni studiati. In molti casi, tali differenze erano risultate statisticamente significative, su quattro dei cinque loci studiati (exact probability test: $P\text{-value} \leq 0,05$). Inoltre, i *pattern* di frequenze alleliche e genotipiche di alcuni loci presentavano correlazioni con l'andamento dei valori dei parametri registrati nei bacini. In particolare le percentuali dell'allele *ADA*¹⁰⁰ e dei genotipi omozigoti *ADA*^{100/100} apparvero correlate negativamente ai valori di ossigeno disciolto ($p\text{-value} < 0,001$); le frequenze dei genotipi eterozigoti *ADA*^{100/108} avevano presentato poi una correlazione diretta con i valori del medesimo parametro ambientale ($p\text{-value} < 0,005$). Nello stesso studio, la distribuzione disomogenea delle frequenze aveva riguardato anche gruppi campionati in zone limitrofe e in comunicazione diretta, tra le quali gli individui erano teoricamente in

grado di distribuirsi liberamente (Angeletti *et al.*, 2009). Questo dato aveva permesso di ipotizzare una scelta selettiva dell'habitat da parte degli individui, correlata al loro genotipo (*habitat choice*). Tale ipotesi evidentemente non escludeva che sul pool genico della popolazione potessero agire anche pressioni di tipo selettivo, la cui incidenza avrebbe dovuto teoricamente seguire il *pattern* di confinamento dei bacini rispetto all'afflusso di acqua marina, con effetti più evidenti procedendo da Nord verso Sud, dove le condizioni si fanno più estreme. In effetti, per il locus ADA si osservò un aumento della frequenza dell'allele ADA^{100} (ovvero della variante correlata con condizioni di scarsa ossigenazione) negli anni 1998, 2003 e 2005, parallelamente all'inasprirsi delle condizioni ambientali (0,596 - 0,691 - 0,715 rispettivamente); inoltre la distribuzione di questo allele seguiva, per ogni singolo anno, un andamento clinale nelle tre zone dell'impianto, Nord, Centro e Sud, effettivamente parallelo al *pattern* di confinamento dei bacini, con differenze significative tra le frequenze alleliche ($p\text{-value} < 0,01$). I dati suggerivano quindi l'azione di una pressione selettiva leggera (*soft selection*) in favore della variante ADA^{100} in condizioni di anossia la quale, su scale spaziali e temporali ridotte, si esprimerebbe come scelta selettiva dell'habitat da parte degli individui, in relazione al proprio genotipo. Questi studi hanno rappresentato un primo tentativo di spiegare i fenomeni adattativi di *A. fasciatus*.

Nel 2007-2008, dopo il ripristino ecologico del sito (2006), i dati raccolti indicavano un'attenuazione dei fattori che avevano disegnato la struttura genetica della popolazione del ciprinodontide e che avevano causato, dapprima la perdita di variabilità (Cardillo, 2003) e poi la frammentazione della popolazione in sub-demi con frequenze alleliche eterogenee e geneticamente distinti in relazione alle condizioni ambientali (Polesi, 2005; Angeletti, 2006). Considerati nel loro insieme, i dati sembrano indicare che negli anni 2007-2008, siano intervenuti elementi ambientali che hanno favorito il flusso genico e la panmissia della popolazione a scapito della strutturazione in sub-demi riscontrata in passato, e che hanno determinato condizioni di maggiore stabilità ed omogeneità in tutto l'impianto. Questa conclusione è basata sul confronto tra i dati ottenuti negli anni 1998-2003-2005-2007: le frequenze alleliche a 9 dei 18 loci polimorfici sono cambiate significativamente dal 1998 rispetto agli anni seguenti. Tale cambiamento è andato affievolendosi fino a sparire dopo l'implementazione del progetto LIFE, che ha permesso il recupero ecologico delle Saline ed una conseguente omogeneizzazione delle condizioni ambientali nelle diverse aree che le compongono (Angeletti *et al.*, 2010; submitted).

In conclusione, le dinamiche subite dalla popolazione di *Aphanius* in circa dieci anni di studi, possono essere riassunte come segue: negli anni che vanno dal 1998 al 2005, contemporaneamente all'abbandono dell'impianto, al calo di biodiversità della comunità macrozoobentonica (Cimmaruta *et al.*, 2010; Bellisario *et al.*, 2010, 2013) e all'estremizzazione delle condizioni ambientali, si registra per la popolazione un'erosione della variabilità genetica con deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, eterogeneità delle frequenze alleliche e genotipiche, correlazione tra frequenze alleliche e genotipiche e parametri chimico-fisici (concentrazione di ossigeno disciolto, salinità) ed andamenti clinali delle frequenze alleliche in ADA e GPI-1. Questi dati hanno evidenziato un ruolo principale della selezione naturale e della deriva genetica, entrambe guidate dalle pressioni ambientali e contrastanti il flusso genico su una piccola scala spaziale (circa 2 km) (Angeletti *et al.*, submitted). Dopo gli interventi di recupero ambientale e la mitigazione delle condizioni ambientali si arresta l'erosione genetica, non si osservano deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, le frequenze alleliche e genotipiche sono omogenee per effetto del flusso genico, che risulta quindi la forza dominante, e non si presentano né andamenti clinali né correlazioni con i parametri ambientali (Angeletti *et al.*, submitted).

Sebbene la divergenza genetica osservata per questa popolazione sia riconducibile all'azione delle forze evolutive, in particolare alla selezione e alla deriva genetica, la cui intensità viene rafforzata sotto le pressioni ambientali, è stato anche ipotizzato il fenomeno dell'*habitat choice* come un possibile causa responsabile di una parte del *pattern* genetico osservato. Pertanto questa ipotesi necessita di ulteriori approfondimenti, attraverso esperimenti di laboratorio parallelamente agli studi effettuati su campo.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1 Area di studio

Le Saline di Tarquinia (Fig. 3.1) sono un habitat costiero iperalino situato lungo le coste tirreniche del Lazio settentrionale ($42^{\circ} 12' N$, $11^{\circ} 43' E$). Si tratta di un ecosistema con condizioni variabili, semi-artificiale composto di circa 100 bacini poco profondi estesi lungo la costa per circa 2500 metri, e copre una superficie di 135 ettari. L'ingresso dell'acqua avviene mediante due pompe connesse con il mare che si trova nella zona nord della salina; i bacini, che diventano progressivamente meno profondi man mano che ci si allontana dal canale di collegamento con il mare (verso la zona sud), sono collegati tra loro direttamente oppure da un sistema di canali. Il gradiente di salinità può variare da 35 ‰ nelle vasche a nord fino a 250 ‰ in quelle meridionali, valori che influenzano sia i parametri abiotici sia le comunità biologiche di plankton e benthos (Cimmaruta *et al.*, 2010).



Figura 3.1: Riserva Naturale Saline di Tarquinia

In questo ecosistema, la comunità bentonica, utilizzata come indicatore della qualità delle acque negli ecosistemi lagunari costieri (Lardicci *et al.*, 2001), è abbastanza semplificata con una ricchezza di specie che si riduce da Nord a Sud, costituita dalle specie più resistenti alle condizioni ipossiche ed iperaline, come le larve di Chironomidi (Bellisario *et al.*, 2010; 2013). Diversi studi hanno evidenziato alterazioni significative dell'ambiente acquatico negli ultimi quattordici anni a causa di cambiamenti nella gestione del sito. Infatti, dopo la dismissione dell'impianto per la produzione del sale nel 1997, con la conseguente mancanza di attività di manutenzione ed uno scarso afflusso di acqua, l'habitat ha subito un cambiamento progressivo con un aumento della sedimentazione di materiale organico, che ha portato a condizioni di eutrofizzazione e di ipossia tra il 2003 e il 2005 (Cimmaruta *et al.*, 2010; Bellisario *et al.*, 2010; 2013). In particolare, i dati della comunità macrobentonica ed ambientali, hanno dimostrato come durante l'eutrofizzazione, il gradiente preesistente di crescente salinità e ipossia diventasse più marcato, limitando la presenza di specie meno tolleranti nei bacini a Nord (Bellisario *et al.*, 2010; 2013). Nel 2006 la situazione ha subito dei cambiamenti dovuti agli interventi effettuati nell'ambito di un progetto europeo realizzato per il recupero dell'habitat (LIFE02NAT / IT / 8523). Lo scopo del progetto era il ripristino del volume dell'acqua e della sua circolazione attraverso la rimozione della materia organica e del fango e la riparazione delle pompe idrovore e del canale di collegamento al mare (Cimmaruta *et al.*, 2010). La mitigazione delle condizioni ambientali generali e l'aumento dei livelli di ossigeno medio dell'acqua (Cimmaruta *et al.*, 2010; Bellisario *et al.*, 2010; 2013) hanno portato, fino al 2010, a un recupero completo di ricchezza, struttura e distribuzione della comunità macrobentonica. Dal 2010 in poi si è verificata una nuova tendenza ad una diminuzione della biodiversità ed all'insediamento delle specie indicatrici di condizioni anossiche (Principe, 2012). I dati raccolti hanno confermato una netta semplificazione della comunità bentonica dovuta al nuovo peggioramento delle condizioni ambientali, correlata all'aumento di specie opportuniste/generaliste come i Chironomidi, le cui larve sono in grado di sopravvivere e proliferare in condizioni ambientali estremamente variabili e degradate (Bellisario *et al.*, 2010; 2013). Dati più recenti (2012/2013), hanno mostrato di nuovo una marcata riduzione del numero dei taxa a soli tre phyla: molluschi, artropodi e anellidi. Tre taxa risultano estremamente dominanti: *Hydrobia spp.*, larve di Chironomidi e *Monocorophium insidiosum*. Quindi, i ridotti livelli di biodiversità, misurata in termini di numero di specie, unitamente alla graduale omogeneizzazione delle comunità, possono essere interpretati come un ritorno a

condizioni ambientali poco favorevoli alla strutturazione di comunità ben differenziate (Valiente, 2014).

A tali cambiamenti ambientali sono corrisposti cambiamenti profondi anche nella struttura genetica della popolazione locale di *Aphanius fasciatus* che hanno dato l'opportunità di studiare l'azione delle forze e delle dinamiche microevolutive sulla struttura genetica di questo organismo (Angeletti *et al.*, 2010) e che costituiscono l'argomento principale di questa tesi.

3.2 *Aphanius fasciatus* come modello di studio

Aphanius fasciatus è un piccolo ciprinodontide che vive in acque salmastre e lagunari, distribuito nelle zone costiere del Mar Mediterraneo centrale e orientale (Cimmaruta *et al.*, 2003). Questa specie presenta un elevato dimorfismo sessuale (Fig. 3.2): le femmine sono più grandi dei maschi, ma mostrano pinne caudali, anali e dorsali meno sviluppate e meno colorate.



a)



b)



c)

Figura 3.2: *Aphanius fasciatus*. a) dimorfismo sessuale; b) esemplare maschile; c) esemplare femminile

La riproduzione avviene tra marzo e giugno (Mazza, 1901), ed è caratterizzata da una forte competizione tra i maschi attraverso elaborati rituali di corteggiamento ed interazioni aggressive (Gandolfi *et al.*, 1991; Malavasi *et al.*, 2009; Cavraro *et al.*, 2013). Le uova vengono deposte tra la vegetazione del fondale e si sviluppano in 10-15 giorni (Cavicchioli, 1962). Leonardos e Sinis (1998) sostengono che alcuni individui nati all'inizio del periodo riproduttivo riescono a raggiungere la maturità sessuale e a riprodursi entro pochi mesi. La loro biologia riproduttiva è quindi caratterizzata da brevi periodi d'incubazione, elevato tasso di schiusa delle uova ed elevato tasso di sopravvivenza dei nuovi nati fino a maturità sessuale (Leonardos & Sinis, 1997b). Questa specie presenta una *sex ratio* secondaria di 1:3 a favore delle femmine, e durante il periodo riproduttivo la percentuale degli individui maschili diminuisce, mentre dopo la riproduzione aumenta (Leonardos & Sinis, 1997; 1998). Questa *sex ratio* sbilanciata è probabilmente dovuta alla predazione, dovuta alla cospicua colorazione maschile, soprattutto durante il periodo dell'accoppiamento (Leonardos & Sinis, 1999). Inoltre, è stato ipotizzato che le femmine abbiano un maggior tasso di sopravvivenza rispetto ai maschi, soprattutto in condizioni ambientali estreme (Leonardos & Sinis, 1999). La strategia di questa specie in termini di *sex-ratio*, sembrerebbe essere quindi l'investimento negli individui femminili (Leonardos & Sinis, 1999).

La specie è onnivora, e si nutre principalmente di piccoli invertebrati bentonici (Leonardos, 2008); presenta un sistema sociale altamente gregario con gli individui che si aggregano in numero elevato, in acque poco profonde e soggette a forti fluttuazioni dei parametri chimico-fisici (Gandolfi *et al.*, 1991) riuscendo a vivere in acque soggette a forti escursioni di salinità, di temperatura e di concentrazione di ossigeno disciolto (Cottiglia, 1980) e con concentrazioni saline fino a quattro volte superiori a quelle delle acque marine (Bianco, 1988). Le alte temperature, ma soprattutto condizioni di elevata salinità, hanno effetti sulla fecondità riducendola, e inibendo la maturazione delle uova; in queste condizioni si verifica l'interruzione dei processi riproduttivi e si ha nelle femmine il riassorbimento delle uova ed il successivo utilizzo di questa risorsa per la propria crescita e per la regolazione osmotica (Leonardos & Sinis, 1998).

La distribuzione della specie è discontinua per una serie di motivi: frammentazione dell'habitat (Cimmaruta *et al.*, 2003; Tigano *et al.*, 2006), sedentarietà degli adulti, uova bentoniche e assenza di stadi larvali di dispersione (Leonardos & Sinis, 1998; Angeletti *et al.*, 2010). Di conseguenza la specie presenta un elevato livello di variabilità genetica tra le

popolazioni e un basso livello di variabilità all'interno di ogni singola popolazione locale (Maltagliati, 1999).

In Italia è presente, ma senza continuità, nelle regioni costiere dell'alto Adriatico, dell'alto e medio Tirreno, in Sardegna, in Sicilia e in Puglia. I siti più importanti sono il Lago di Lesina, il Lago di Varano (Gargano), le lagune costiere del Circeo, di Orbetello, le Saline di Tarquinia (Lazio) e quelle più estese di Margherita di Savoia in Puglia (<http://www.iucn.it>). Nella lista IUCN è stata classificata come specie “A minor preoccupazione” (Least Concern), per la sua ampia distribuzione, per la popolazione presumibilmente grande, per la tolleranza a una vasta varietà di habitat: si sospetta un declino della popolazione ma non sufficientemente ampio per classificare la popolazione italiana in una categoria di minaccia (<http://www.iucn.it>). La specie è elencata in appendice II della direttiva Habitat 92/43/CEE e in appendice II e III della Convenzione di Berna ed è inclusa nel piano d'azione generale per la conservazione dei pesci d'acqua dolce italiani (Zerunian, 2003).

Data la sua estrema adattabilità a condizioni ambientali eterogenee e la sua tolleranza a condizioni di cattività, questa specie è stata utilizzata in studi di genetica ecologica, di etologia, di ecotossicologia, e di biologia della conservazione di ambienti lagunari costieri. È stato osservato che alcuni fattori ambientali, quali la predazione e la produttività dell'habitat, influenzano le strategie di sopravvivenza e la struttura demografica delle popolazioni. Infatti, popolazioni che vivono in ambienti con un elevato tasso di predazione, sono costituite da individui di dimensioni più piccole e con una maggior produzione di uova, mentre in ambienti con bassi livelli di predazione sono stati trovati individui più grandi e con un investimento riproduttivo minore. Inoltre la ricchezza di risorse è correlata positivamente alla densità di popolazione, ma negativamente al tasso di crescita (Cavraro *et al.*, 2014). Altri studi hanno mostrato come in condizioni di bassa salinità, *Aphanius* sia in competizione con *Gambusia*, la quale risulta essere dominante; man mano che la salinità aumenta, questa competizione diminuisce per un miglior adattamento di *Aphanius* a condizioni ambientali più estreme (Alcaraz *et al.*, 2008). Inoltre, in considerazione del fatto che rappresenta spesso l'unica specie ittica esclusivamente legata alle acque salmastre durante l'intero ciclo biologico (Franco *et al.*, 2006b; Franzoi *et al.*, 2010; Cavraro *et al.*, 2011), è considerata una specie *target* per il biomonitoraggio di tali ambienti (Maltagliati, 2002; Angeletti *et al.*, 2012; Sebbio *et al.*, 2014).

3.3 Analisi della struttura genetica della popolazione naturale di *Aphanius fasciatus*

Per l'analisi della struttura genetica di popolazione, gli individui sono stati catturati mediante nasse da pesca con maglie di dimensione 5x5 mm, trasportati in laboratorio mediante borse refrigerate, dove sono stati messi singolarmente in provette di tipo Eppendorf e conservati ad una temperatura di circa -80°C.

Sono stati catturati un totale di 665 individui, di cui 168 campionati all'inizio dell'autunno 2012, 295 alla fine della stagione primaverile 2013, e 202 all'inizio dell'autunno 2012 durante un episodio di crisi ipossica avvenuto in un canale di collegamento del sistema di circolazione dell'acqua intorno alle vasche dell'impianto. I campionamenti sono stati eseguiti nelle tre zone principali delle saline Nord, Centro e Sud. Questi siti sono caratterizzati da una situazione ambientale differente: la zona Nord, in prossimità della foce di Ponente, riceve un apporto continuo di acqua dal mare e quindi risente meno delle fluttuazioni dei parametri chimico/fisici. La zona Sud, distante dal mare, è costituita da vasche solitamente poco profonde è quella in cui si raggiungono più frequentemente condizioni ambientali estreme. La zona centrale presenta caratteristiche intermedie (Fig. 3.3). Durante l'episodio di ipossia, sono stati effettuati campionamenti di individui ancora vivi, mediante retino, nei due giorni (101 individui per ogni giorno) in cui le concentrazioni di ossigeno disciolto erano al di sotto di 1 mg/L. I dettagli del numero degli individui per ogni sito, anno e dei parametri ambientali registrati durante i campionamenti sono riportati in Tabella 3.1. Gli individui una volta campionati sono stati identificati per sesso e sottoposti alle analisi elettroforetiche.

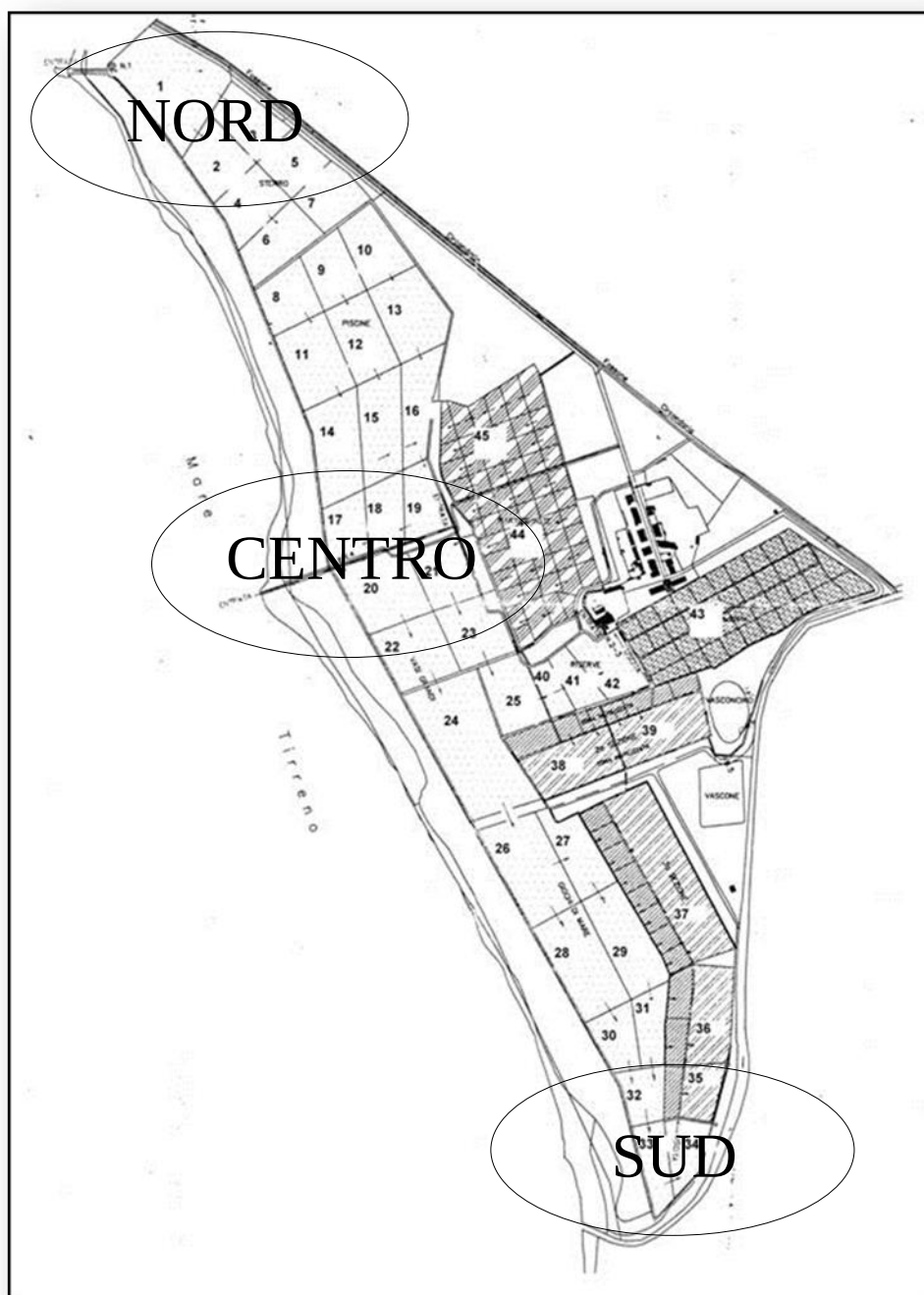


Figura 3.3: Siti di campionamento nelle tre zone principali delle Saline, Nord-Centro-Sud.

	2012	2013
NORD	70	100
CENTRO	50	100
SUD	48	95
FENOMENO IPOSSICO	202	-
N Totale	370	295

		SALINITA' ‰	OSSIGENO mg/l - ‰	TEMPERATURA °C
2012	NORD	46	7,8-128	23,2
	CENTRO	55	6,3-103	23,8
	SUD	108	0,8-15	25,7
2013	NORD	33	7,5-118	28,4
	CENTRO	51	4,5-78	29,5
	SUD	78	2-36	28,9

Tabella 3.1: Numero di individui campionati per ogni stazione e per ogni anno, nell'ambito dello studio della popolazione naturale; valori dei parametri ambientali registrati durante i campionamenti per ogni sito e per ogni anno.

3.4 Esperimenti comportamentali in condizioni controllate

Per studiare il fenomeno dell'*habitat choice*, sono stati condotti esperimenti di laboratorio attraverso l'osservazione dei profili comportamentali degli individui in relazione ai tratti genetici. Pertanto sono stati condotti due test su un totale di 375 individui provenienti dalla zona Sud (inverno/primavera) e dalla zona Nord (primavera) della Salina: (i) *test di scelta dell'habitat*, ossia la possibilità di evitare una condizione ipossica avendo la possibilità di spostarsi in una condizione di normossia; (ii) *test comportamentale* su individui esposti a condizioni di normossia e di ipossia. I dettagli sul numero degli individui utilizzati per ogni esperimento, sono riportati in Tabella 3.2.

	TEST di SCELTA dell'HABITAT	TEST COMPORTAMENTALI INDIVIDUALI
SUD inverno	131	31
SUD primavera	123	43
NORD primavera	121	55
N Totale	375	129

Tabella 3.2: Numero di individui utilizzati per gli esperimenti di laboratorio

Sono stati utilizzati due acquari (120x40x50cm), entrambi separati da un setto con al centro un foro (diametro 5 cm) regolato da un tappo per collegare le due parti. In una metà, detta *lato normossico N*, le concentrazioni di ossigeno sono stante mantenute tra i 5-6 mg/l e 80% di saturazione, mentre nell'altra metà, detta *lato ipossico I* tra i 0,5-1 mg/l e 10-15 % di saturazione. In entrambi le metà, la salinità è stata mantenuta a 42 ± 1 ‰ e la temperatura a 23 ± 1 °C.

Un acquario è stato utilizzato per il *test di scelta dell'habitat* e l'altro per gli *esperimenti comportamentali individuali*. Quest'ultimo è stato a sua volta suddiviso (entrambe le metà) con due setti di plexiglas, al fine di ridurre ulteriormente gli spazi per aver un buon campo di ripresa (Fig. 3.4 a,b,c,d,e). Sono stati utilizzati ossigenatori con porose per mantenere la condizione normossica, bombole di azoto compresso ad uso alimentare AligalTM 1-Airliquide Italia con riduttore di pressione Airliquide per abbassare la concentrazione di ossigeno disciolto e di conseguenza rendere le condizioni ipossiche, due ossimetri digitali WTW Oxi 330/set per monitorare le condizioni, un rifrattometro Optech K71322, termometri, telecamere per effettuare le riprese, una bilancia ($\pm 0,01$ g) e un calibro ($\pm 0,01$ mm) per pesare e misurare gli animali (Fig. 3.4 f, g).



a)



b)



c)



d)



e)



f)



g)

Figura 3.4: (a) sistema di due acquari: in primo piano l'acquario utilizzato per il test di scelta dell'habitat; (b) acquario utilizzato per il test individuale; (d) dettaglio "lato normossico" per il test individuale; (e) dettaglio "lato ipossico" per il test individuale; (f) bilancia per la misura del peso; (g) esemplare maschile durante il riconoscimento e la misurazione delle dimensioni.

Per il *test scelta dell'habitat*, ogni gruppo (Tab. 3.2) è stato lasciato per una notte in acquario con il foro aperto per la fase di abituazione e il giorno dopo è stato effettuato il test: prima del test gli individui sono stati confinati tutti in un lato e il foro è stato chiuso. A questo punto in questo lato è stato erogato l'azoto con un sistema di diffusione mediante una porosa per abbassare la concentrazione di ossigeno disciolto. Quando l'ossigeno ha raggiunto valori di circa 0,5 mg/l, è stato aperto il foro per permettere il passaggio degli individui verso il *lato normossico N*, dove era presente un ossigenatore. Il test ha avuto una durata di 4 ore, tempo nel quale è stato fornito costantemente azoto per mantenere le condizioni ipossiche costanti. Dopo le 4 ore, il foro è stato chiuso ed è stata osservata la distribuzione del gruppo nei due ambienti, prelevato un sottocampione per il secondo test, quindi contati gli individui, identificati per sesso, peso e dimensioni, e conservati a -80°. Per i test comportamentali individuali sono stati utilizzati 129 individui, di cui 64 provenienti dal lato normossico (N) e 65 provenienti dal lato ipossico (I). Per i dettagli vedere Tab. 3.3.

TEST COMPORTAMENTALI INDIVIDUALI		
	LATO NORMOSSICO (N)	LATO IPOSSICO (I)
SUD inverno	17	14
SUD primavera	20	23
NORD primavera	27	28
N Totale	64	65

Tabella 3.3: Numero di individui, provenienti dal gruppo normossico e gruppo ipossico, utilizzati nei test singoli.

Questo secondo test prevedeva un'esposizione individuale prima in condizioni normossiche e poi in condizioni ipossiche, ognuno di durata di 13 minuti e monitorata con apposite telecamere. A fine esperimento ogni individuo è stato identificato per sesso, peso, dimensione (lunghezza e larghezza in cm) e conservato a - 80°. Tutti i campioni di entrambi gli esperimenti sono stati poi analizzati mediante elettroforesi multilocus.

3.5 Elettroforesi del sistema gene-enzima (multilocus)

L'elettroforesi orizzontale su gel di amido è stata effettuata a 5 ° C a 7-9 V/cm per 4-6 ore secondo le procedure utilizzate per altri pesci marini e standardizzate per *A. fasciatus* (Cimmaruta *et al.*, 2003; 2008). Sono stati analizzati quattro sistemi enzimatici corrispondenti a sei loci attivi nel muscolo scheletrico: ADA (Adenosina Deaminasi, E.C. 3.5.4.4), MPI (Mannosio-6-fosfato Isomerasi, E.C. 5.3.1.8); GPI-1, GPI-3 (Glucosio-6-fosfato Isomerasi, E.C. 5.3.1.9), PGM-1, PGM-2 (Fosfoglucomutasi, E.C. 5.4.2.2) (Tab. 3.4). Questi sei loci sono stati scelti in quanto negli studi precedenti erano risultati sottoposti all'azione di dinamiche microevolutive (Par. 3.2) (Angeletti *et al.*, submitted). Gli isoenzimi (enzimi che hanno la stessa funzione enzimatica ma sono codificati da loci diversi), sono stati numerati in ordine decrescente a partire da quello più anodico (ad esempio per l'enzima GPI si distinguono 2 loci: GPI-1, GPI-3). Gli allozimi (le varianti proteiche codificate da alleli diversi dello stesso locus), sono stati nominati in base alla loro mobilità, misurata in mm, rispetto all'allele più frequente nella popolazione e cioè il "100" (si ha ad esempio GPI-1⁸⁵, GPI-1¹⁰⁰).

ENZIMA	CODICE ENZIMA	LOCUS	MIGRAZIONE	SISTEMA TAMPONE *	V/cm	TEMPO DI CORSA (ORE)	STRUTTURA QUATERNARIA
Adenosina Deaminsi	3.5.4.4	ADA	+	2	8	5	Monomero
Fosfoglucomutasi	5.4.2.2	PGM 1	+	4	8	5 ½	Monomero
		PGM 2					
Glucosio-6-fosfato Isomersai	5.3.1.9	GPI-1	+	6	8	6	Dimero
		GPI-3					
Mannosio-6-fosfato Isomerasi	5.3.1.8	MPI	+	2,3	8	4 ½	Monomero

Tabella 3.4: Loci enzimatici analizzati mediante elettroforesi, applicando procedure standard per *Aphanius fasciatus*.

*I sistemi tampone usati sono i seguenti: 1) Tris/citrato discontinuo (POULIK, 1957); 2) Tris/citrato continuo (SELANDER *et al.*, 1971); 3) Tris/versene/borato (BREWER e SING, 1970); 4) Tris/versene/maleato (BREWER e SING, 1970); 5) Litio/borato discontinuo (SOLTIS *et al.*, 1983).

Per evidenziare il *pattern* enzimatico è stata effettuata una colorazione specifica per ogni locus secondo il protocollo riportato in Tabella 3.5¹. La soluzione colorante è composta da un substrato su cui agisce l'enzima, un coenzima (NAD o NADPH) ed un colorante che si lega al prodotto di reazione. Le soluzioni coloranti vengono rese solide con agar allo 0.8% in soluzione tampone tris HCl 0,05 M (pH 8). Il metodo di colorazione qui utilizzato è quello "per trasferimento di elettroni" in cui è impiegata una sostanza come l'MTT (metiltiazoltetrazolio), un trasportatore di elettroni che reagendo con un donatore viene ridotto a formazano insolubile, un prodotto che si colora intensamente. Il protocollo prevede l'aggiunta alla soluzione di fenazina metasolfato (PMS) un catalizzatore intermedio che serve ad accelerare la reazione.

Isozimi	Substrato	Coenzimi	MTT	PMS	Sale	Sostanze	Enzimi	Tamponi
Mpi	M-6-P 25mg	NADP 12mg	15mg	3mg	MgCl ₂ 10mg		+Agar G6PD- 0,02mg PGI-0,02mg	TCII-PHI
Phi	F-6-P 10mg	NADP 10mg	10mg	3mg	MgCl ₂ 10mg		+Agar G6PD- 0,02mg	PHI POULIK ACPH
Pgm	G-1-P 80mg	NADP 10mg	10mg	5mg	MgCl ₂ 10mg	Glucosio 1,6 difosfato	+Agar G6PD- 0,02mg	PGM TCII
Ada	Adenosina 20mg		15mg	PMS 3mg			+ Agar NP-0,05 XO-0,05	ACPH TCII

Tabella 3.5: Tecniche di colorazione specifiche per ogni locus

1 Fonti bibliografiche tecniche di colorazione:

BREWER e SING (1970); SHAW e PRASAD (1970); SELANDER et al.(1971); AYALA et al. (1972); HARRIS e HOPKINSON (1976); RICHARDSON et al. (1986).

3.6 Analisi statistica

3.6.1 Struttura genetica

Per il calcolo delle frequenze alleliche e genotipiche dei campioni del 2012 e del 2013, e per stimare la significatività statistica delle deviazioni delle frequenze genotipiche osservate rispetto alle attese in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg, applicando il test statistico del χ^2 (Sokal & Rohlf, 1969), è stato utilizzato il programma BYOSIS (Swafford & Selander, 1981). Per testare l'eterogeneità nella distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche all'interno dei sub-campioni spaziali (Nord, Centro e Sud) del 2012 e 2013 è stato applicato il Fisher's exact Probability Test: sono stati fatti i confronti a coppia tra i sub-campioni spaziali e tra i sessi dei sub-campioni spaziali per ciascun locus utilizzando il programma GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset, 1995; <http://www.cefe.cnrs-mop.fr>).

Inoltre è stata calcolata la significatività del rapporto tra i maschi e femmine dei campioni applicando il test statistico del χ^2 .

3.6.2 Test comportamentali

Per il test di *scelta dell'habitat*, ai fini di determinare la distribuzione degli alleli e genotipi tra i gruppi del lato ipossico e del lato normossico e tra i due sessi, sono state effettuate l'analisi delle frequenze alleliche e l'analisi delle differenze geniche e genotipiche tra i due gruppi utilizzando le procedure descritte nel paragrafo 3.6.1. Inoltre, per determinare l'effetto del sesso nella scelta dell'habitat e determinare quindi eventuali differenze significative nella distribuzione dei maschi e delle femmine nelle due condizioni, è stato applicato il test del χ^2 . Dai dati biometrici (dimensioni e peso) è stato estratto un indice di condizione applicando l'analisi delle componenti principali a peso, lunghezza e larghezza; tale indice è stato messo in relazione con il sesso, provenienza degli individui (Nord e Sud) e genotipo attraverso l'analisi dell'ANOVA ad una via per valutare un eventuale effetto di queste tre variabili sulla condizione.

Per quanto riguarda i *test comportamentali singoli* la raccolta dei dati comportamentali è stata effettuata mediante il *software* Observer 2.0 (Noldus, 1991), quantificando la frequenza e la durata (in secondi) dei seguenti parametri:

- Parametri descrittivi:

- *Attività*: attività locomotoria dell'animale, implicante uno spostamento in una qualsiasi direzione nella colonna d'acqua;
- *Surface*: attività respiratoria dell'animale nell'interfaccia aria-acqua.

- Parametri di posizione:

- *Top*: posizione dell'animale nella fascia superiore dell'acquario;
- *Middle*: posizione dell'animale nella fascia centrale della vasca;
- *Ground*: posizione dell'animale nella vasca che implica un contatto con il fondo.

- Parametri di postura:

- *Normale*: il capo e la pinna caudale dell'individuo si trovano sulla stessa linea orizzontale;
- *Verticale o Upright*: il capo dell'individuo si trova in una quota più alta nella colonna d'acqua rispetto alla pinna caudale.

- Parametri di stress:

- “C”: nuoto circolare ripetitivo, con raggio più o meno ampio; sia verticalmente che orizzontalmente;
- *Touch*: movimenti a scatto succeduti da colpi del capo contro le pareti della vasca, la superficie o il fondo.

E' stato effettuato un confronto delle frequenze alleliche e genotipiche del sottocampione con l'intero campione utilizzato nel test di scelta dell'habitat, secondo le procedure descritte nel paragrafo 3.6.1, ai fini di verificare se i 129 individui del sottocampione fossero rappresentativi dei 375 individui dell'intero campione.

Allo scopo di individuare eventuali relazioni tra le variabili comportamentali e genetiche è stato valutato l'effetto del sesso, del gruppo di provenienza del test di scelta dell'habitat (gruppo ipossico o normossico) sui parametri comportamentali e la loro relazione con i singoli loci, attraverso un'ANOVA per misure ripetute. Infine è stata effettuata una ANOVA ad una via (seguita da Fisher's PSD) per valutare la relazione del genotipo di ogni singolo locus (omozigoti ed eterozigoti) con i comportamenti presi in considerazione. Per le analisi è stato utilizzato il software Statview II (Abacus Concepts, CA, USA) con un livello di significatività $p < 0.05$.

CAPITOLO 4: RISULTATI

4.1 Analisi della struttura genetica della popolazione naturale di *Aphanius fasciatus*

Nel 2012 le analisi sono state eseguite su un totale di 168 individui, di cui 98 femmine e 70 maschi (Tabella 4.1).

	♀	♂	Totale
NORD	41 (58%)	29 (42%)	70
CENTRO	36 (72%)	14 (28%)	50
SUD	21 (44%)	27 (56%)	48
Totale	98 (58%)	70 (42%)	168

Tabella 4.1: Numero totale di individui femminili e maschili, analizzati nel campione dell'autunno 2012

Sull'intero campione risulta esserci una percentuale maggiore di femmine (58% vs 42%; $p\text{-value}=0,03$).

Di seguito viene riportata la tabella con le frequenze alleliche dei tre campioni (Tabella 4.2).

LOCUS		POPULATION		
		NORD	CENTRO	SUD
Gpi-1	(N)	70	50	48
85		0,379	0,39	0,385
100		0,621	0,61	0,615
Gpi-3	(N)	70	50	48
100		0,957*	0,93	0,865*
108		0,043	0,07	0,135
Ada	(N)	70	50	48
100		0,664	0,69	0,719
108		0,336	0,31	0,281
Mpi	(N)	46	50	48
100		0,533	0,47	0,562
104		0,467	0,53	0,438
Pgm-1	(N)	50	49	48
90		0,2	0,214	0,198
94		0,3	0,337	0,302
100		0,488	0,449	0,49
104		0,012	0	0,01
Pgm-2	(N)	70	50	48
95		0,007	0,02	0,052
100		0,993	0,98	0,948

Tabella 4.2: Frequenze alleliche dei tre gruppi del campionamento autunno 2012. In grassetto il cline per i loci ADA (allele ADA^{100}) e GPI-3 (allele $GPI-3^{100}$). Confronti a coppia * $p \leq 0,05$

Il campione a Nord presenta un deficit di eterozigoti per il locus GPI-3 ($p\text{-value}= 0,01$) e per il locus PGM-1 ($p\text{-value}= 0,027$). Dall'analisi emerge un'eterogeneità genetica per il locus GPI-3: nei confronti a coppie tra Nord e Sud presenta differenze significative sia nelle frequenze alleliche ($p\text{-value}= 0,015$), che genotipiche ($p\text{-value}=0,02$), dove l'allele $GPI-3^{100}$ ha una frequenza maggiore a Nord; inoltre, considerando l'insieme dei tre campioni e tra tutti il loci, risultano differenze significative a livello di frequenze alleliche ($p\text{-value}=0,035$) e

prossimi alla significatività a livello genotipico ($p\text{-value}=0,059$). I dati suggeriscono una distribuzione clinale per i loci, GPI-3 ed ADA, con frequenze alleliche significativamente eterogenee per il primo dei due loci.

In Tabella 4.3, sono riportate le frequenze alleliche dei maschi e delle femmine suddivise nei tre campioni, Nord-Centro-Sud.

LOCUS	GRUPPI						
	♀	♀	♀	♂	♂	♂	
	Nord	Centro	Sud	Nord	Centro	Sud	
Gpi-1	(N)	41	36	21	29	14	27
85		0,31	0,36	0,33	0,48	0,46	0,43
100		0,69	0,64	0,67	0,52	0,54	0,57
Gpi-3	(N)	41	36	21	29	14	27
100		0,94	0,96	0,86	0,98	0,86	0,87
108		0,06	0,04	0,14	0,02	0,14	0,13
Ada	(N)	41	36	21	29	14	27
100		0,61	0,72	0,79	0,74	0,61	0,63
108		0,39	0,28	0,21	0,26	0,39	0,37
Mpi	(N)	30	36	21	16	14	27
100		0,58	0,47	0,69	0,44	0,46	0,46
104		0,42	0,53	0,31	0,56	0,54	0,54
Pgm-1	(N)	24	35	21	16	14	27
90		0,25	0,27	0,26	0,12	0,07	0,15
94		0,17	0,27	0,33	0,5	0,5	0,28
100		0,56	0,46	0,4	0,38	0,43	0,55
104		0,02	0	0	0	0	0,02
Pgm-2	(N)	41	36	21	29	14	27
95		0	0	0,12	0,02	0,07	0
100		1	1	0,88	0,98	0,93	1

Tabella 4.3: Frequenze alleliche dei maschi e delle femmine del campionamento autunno 2012. In grassetto il cline per il locus ADA (allele ADA^{100}).

Da notare l'andamento clinale dell'allele ADA^{100} , che aumenta da Nord a Sud nelle femmine, mentre nei maschi lo stesso allele è più frequente a Nord.

Inoltre, nei confronti a coppia (tra maschi e femmine) emergono delle differenze in alcuni loci: a Nord si osservano differenze significative in GPI-1 (allelliche $p\text{-value}= 0,03$; genotipiche $p\text{-value}= 0,04$) e in PGM-1 (allelliche $p\text{-value}= 0,01$; genotipiche $p\text{-value}= 0,02$), al Centro in PGM-1 (allelliche $p\text{-value}= 0,03$; genotipiche $p\text{-value}= 0,04$), a Sud per quanto riguarda MPI (allelliche $p\text{-value}= 0,04$; genotipiche $p\text{-value}= 0,04$); considerando invece tutti i loci, emergono differenze significative tra maschi e femmine, a Nord (allelliche $p\text{-value}= 0,008$; genotipiche $p\text{-value}= 0,01$), al Centro $p\text{-value}= 0,05$; genotipiche $p\text{-value}= 0,05$), e a Sud ($p\text{-value}= 0,036$; genotipiche $p\text{-value}= 0,04$).

Mentre all'interno di ciascun sesso, nei confronti a coppia emergono differenze significative nelle femmine tra Centro e Sud per MPI (allelliche $p\text{-value}= 0,03$; genotipiche $p\text{-value}= 0,04$) e considerando tutti i loci tra Centro e Sud (allelliche $p\text{-value}= 0,016$; genotipiche $p\text{-value}= 0,02$) e tra Nord e Sud (allelliche $p\text{-value}= 0,01$; genotipiche $p\text{-value}= 0,02$); nei maschi per GPI-3 tra Nord e Sud (allelliche $p\text{-value}= 0,027$; genotipiche $p\text{-value}= 0,03$), e tra Nord e Centro (allelliche $p\text{-value}= 0,035$; genotipiche $p\text{-value}= 0,04$).

Nel 2013 sono stati analizzati un totale di 295 individui, di cui 222 femmine e 73 maschi (Tabella 4.4).

	♀	♂	Totale
NORD	68 (68%)	32 (32%)	100
CENTRO	87 (87%)	13 (13%)	100
SUD	67 (71%)	28 (29%)	95
Totale	222 (75%)	73 (25%)	295

Tabella 4.4: Numero totale di individui femminili e maschili, analizzati nel campione della primavera 2013

Sull'intero campione risulta esserci una percentuale statisticamente maggiore di femmine di circa il 75% contro il 25% di maschi ($p\text{-value}< 0,001$).

Di seguito viene riportata la tabella con le frequenze alleliche dei tre campioni (Tabella 4.5).

LOCUS	POPULATION			
		NORD	CENTRO	SUD
Gpi-1	(N)	99	100	93
85		0,444	0,375	0,382
100		0,556	0,625	0,618
Gpi-3	(N)	98	99	90
100		0,923	0,934	0,917
108		0,077	0,066	0,083
Ada	(N)	99	100	95
100		0,727	0,665*	0,768*
108		0,273	0,335	0,232
Mpi	(N)	100	100	95
100		0,605**	0,475**	0,563
104		0,395	0,525	0,437
Pgm-1	(N)	92	68	94
90		0,19	0,125	0,202
94		0,31	0,338	0,293
100		0,5	0,537	0,505
Pgm-2	(N)	100	100	95
95		0,02	0,025	0,011
100		0,98	0,975	0,989

Tabella 4.5: Frequenze alleliche dei tre gruppi del campionamento della primavera 2013.

Confronti a coppia: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Il campione a Sud presenta un deficit di eterozigoti per il locus GPI-3 ($p\text{-value} = 0,058$) ed un eccesso di eterozigoti per il locus GPI-1 ($p\text{-value} = 0,038$), mentre il campione al Centro presenta un eccesso di eterozigoti per il locus MPI ($p\text{-value} = 0,01$). Dall'analisi emerge un'eterogeneità genetica per i loci ADA e MPI: nei confronti a coppie tra Centro e Sud, ADA presenta differenze significative sia nelle frequenze alleliche ($p\text{-value} = 0,02$), che genotipiche

(p -value=0,015) e, tra Centro e Nord, MPI presenta differenze altamente significative nelle frequenze alleliche (p -value= 0,01), e significative in quelle genotipiche (p -value=0,02).

Considerando l'insieme dei tre campioni, ADA ha dei valori prossimi alla significatività a livello di frequenze alleliche (p -value=0,08) e genotipiche (p -value=0,054), mentre MPI ha dei valori significativi nelle frequenze alleliche (p -value=0,028) e prossimi alla significatività a livello genotipico (p -value=0,052). L'analisi di campo non mostra la distribuzione clinale del locus ADA e in GPI-3 osservata nei campioni dell'anno precedente.

In Tabella 4.6 vengono riportate le frequenze alleliche dei maschi e delle femmine suddivise nei tre campioni, Nord-Centro-Sud.

LOCUS	GRUPPI					
	♀ Nord	♀ Centro	♀ Sud	♂ Nord	♂ Centro	♂ Sud
Gpi-1	(N) 67	87	66	32	13	27
85	0,45	0,97	0,37	0,44	0,42	0,41
100	0,55	0,63	0,63	0,56	0,58	0,59
Gpi-3	(N) 67	86	64	31	13	26
100	0,94	0,94	0,91	0,59	0,92	0,92
108	0,04	0,06	0,09	0,11	0,08	0,08
Ada	(N) 67	87	67	32	13	28
100	0,68	0,65	0,8	0,83	0,77	0,68
108	0,32	0,35	0,2	0,17	0,23	0,32
Mpi	(N) 68	87	67	32	13	28
100	0,62	0,48	0,53	0,58	0,42	0,55
104	0,38	0,52	0,43	0,42	0,58	0,45
Pgm-1	(N) 60	54	0,2	32	9	28
90	0,2	0,14	0,28	0,14	0,06	0,2
94	0,34	0,36	0,52	0,28	0,16	0,34
100	0,46	0,5	0	0,58	0,78	0,46
Pgm-2	(N) 68	87	67	32	13	28
95	0,99	0,02	0,01	0,03	0,04	0,02
100	0,01	0,98	0,99	0,97	0,96	0,98

Tabella 4.6: Frequenze alleliche dei maschi e delle femmine del campionamento primavera 2013. In evidenza la frequenza del locus ADA, dove ADA¹⁰⁰ nelle femmine è più frequente a Sud, mentre nei maschi a Nord .

Anche se l'allele ADA^{100} non presenta l'andamento clinale come mostrato in precedenza, nelle femmine la sua frequenza continua ad essere più alta a Sud, mentre nei maschi è più frequente a Nord. Infatti, nei confronti a coppia (tra maschi e femmine), per ADA, emergono delle differenze significative a Nord (allelliche $p\text{-value}= 0,03$; genotipiche $p\text{-value}= 0,01$) e differenze prossime alla significatività a Sud (allelliche $p\text{-value}= 0,06$; genotipiche $p\text{-value}= 0,06$).

Mentre all'interno di ciascun sesso, nei confronti a coppia emergono differenze altamente significative nelle femmine per ADA tra Centro e Sud (allelliche $p\text{-value}= 0,003$; genotipiche $p\text{-value}= 0,001$) e significative tra Nord e Sud (allelliche $p\text{-value}= 0,02$; genotipiche $p\text{-value}= 0,01$); per MPI tra Centro e Nord (allelliche $p\text{-value}= 0,02$; genotipiche $p\text{-value}= 0,03$); considerando tutti i loci tra Centro e Sud (allelliche $p\text{-value}= 0,04$; genotipiche $p\text{-value}= 0,024$).

In Tabella 4.7 vengono riportate le frequenze alleliche dei due campionamenti effettuati durante l'episodio di ipossia verificatosi in natura nell'autunno 2012.

LOCUS		GRUPPI	
		A	B
Gpi-1	(N)	101	101
85		0,47	0,446
100		0,53	0,554
Gpi-3	(N)	101	101
100		0,931	0,965
108		0,069	0,035
Ada	(N)	101	101
100		0,703*	0,807*
108		0,297	0,193
Mpi	(N)	101	101
100		0,525	0,55
104		0,475	0,45
Pgm-1	(N)	101	76
90		0,149	0,164
94		0,337	0,329
100		0,515	0,5
104		0	0,007
Pgm-2	(N)	101	101
95		0,02	0,005
100		0,98	0,995

Tabella 4.7: Frequenze alleliche relativi agli individui sopravvissuti alle condizioni ipossiche. Gruppo A: campione giorno 1; Gruppo B. campione giorno 2. In evidenza l'aumento dell'allele ADA^{100} nel gruppo B. Confronti a coppia: * $p \leq 0,05$.

E' da notare che con il progredire della mortalità degli individui nel campionamento del secondo giorno si assiste ad un aumento del 10% circa delle frequenze dell'allele ADA^{100} tra i sopravvissuti; questo aumento risulta statisticamente significativo sia nelle frequenze alleliche ($p\text{-value}= 0,02$), che genotipiche ($p\text{-value}= 0,02$) . Si noti inoltre, che ADA è l'unico locus a presentare uno shift delle frequenze, mentre gli altri loci presentano frequenze omogenee nei due giorni di campionamento.

4.2 Esperimenti etologici in condizioni controllate

4.2.1 Test di scelta dell'habitat

Analisi genetiche

Sono stati testati un totale di 375 individui, di cui 131 provenienti da Sud campionati durante la stagione invernale, 123 da Sud campionati durante la stagione primaverile e 121 provenienti da Nord campionati durante la stagione primaverile.

La distribuzione degli individui al termine del test è riportata nella seguente Tabella (Tab. 4.8).

	LATO NORMOSSICO	LATO IPOSSICO	Totale
SUD inverno	80	51	131
SUD primavera	61	62	123
NORD primavera	78	43	121
Totale	219	156	375

Tabella 4.8: Distribuzione degli individui nella condizione ipossica e normossica

La maggior parte degli individui si sposta verso le condizioni normossiche, sia considerando il numero totale ($p\text{-value}= 0,001$), sia il numero di individui per ogni campione fatta eccezione per il campione sud primavera (sud inverno: $p\text{-value}= 0,01$; nord primavera: $p\text{-value}= 0,001$).

Di seguito (Tab. 4.9) vengono riportate le frequenze alleliche di partenza dei tre campioni, ai fini di verificare che non ci siano differenze nelle frequenze alleliche tra i campioni prima della distribuzione.

LOCUS	GRUPPI			
		SUDi	SUDp	NORD
Gpi-1	(N)	121	131	123
85		0,405	0,424	0,423
100		0,595	0,576	0,577
Gpi-3	(N)	121	131	123
100		0,938	0,954	0,947
108		0,062	0,046	0,053
Ada	(N)	121	131	119
100		0,702	0,741	0,697
108		0,298	0,259	0,303
Mpi	(N)	121	130	123
100		0,587	0,55	0,52
104		0,413	0,45	0,48
Pgm-1	(N)	121	128	123
90		0,186	0,152	0,195
94		0,355	0,36	0,329
100		0,459	0,488	0,476
Pgm-2	(N)	121	131	123
95		0,004	0,01	0,03
100		0,996	0,99	0,97

Tabella 4.9: Frequenze alleliche di partenza dei tre gruppi campionati per il test di scelta dell'habitat.

Dal confronto tra i campioni non emergono differenze significative nelle frequenze alleliche e genotipiche.

In Tabella 4.10 vengono riportate le frequenze alleliche degli individui dei tre campioni in relazione alla distribuzione nel lato normossico (N) e in quello ipossico (I).

LOCUS		GRUPPI					
		SUD i		SUD p		NORD p	
		N	I	N	I	N	I
Gpi-1	(N)	80	51	61	62	78	43
85		0,469	0,353	0,451	0,395	0,423	0,372
100		0,531	0,647	0,549	0,605	0,577	0,628
Gpi-3	(N)	80	51	61	62	78	43
100		0,963	0,941	0,943	0,952	0,942	0,93
108		0,037	0,059	0,057	0,048	0,058	0,07
Ada	(N)	80	51	57	62	78	43
100		0,737	0,745	0,719	0,677	0,711	0,686
108		0,263	0,255	0,281	0,323	0,289	0,314
Mpi	(N)	79	51	61	62	78	43
100		0,557	0,539	0,516	0,524	0,551	0,651
104		0,443	0,461	0,484	0,476	0,449	0,349
Pgm-1	(N)	79	49	61	62	78	43
90		0,158	0,143	0,197	0,193	0,186	0,186
94		0,348	0,377	0,352	0,307	0,353	0,361
100		0,494	0,48	0,451	0,5	0,461	0,453
Pgm-2	(N)	80	51	61	62	78	43
95		0,02	0	0,02	0,03	0	0,01
100		0,98	1	0,98	0,97	1	0,99

Tabella 4.10: Frequenze alleliche relative alla distribuzione nelle condizioni normossiche ed ipossiche dei tre gruppi sottoposti al test di scelta dell'habitat.

Nel confronto tra i gruppi distribuiti in condizioni di normossia ed ipossia all'interno dei tre campioni non emergono differenze significative ne alleliche ne genotipiche. Tuttavia la GPI-1 del campione Sud inverno presenta delle differenze geniche e genotipiche prossime alla significatività ($p\text{-value} = 0,07$; $p\text{-value} = 0,06$) e comunque una maggiore incidenza dell'allele $GPI-1^{100}$ in ipossia al termine di tutti e tre i test. Inoltre non ci sono differenze nei confronti a coppia tra i tre gruppi delle condizioni ipossiche e tra i tre gruppi delle condizioni normossiche.

E' stato dunque deciso di accorpare i tre campioni per eliminare la variabile provenienza e aumentare la dimensione del campione.

Di seguito (Tab. 4.11) vengono riportate sia le frequenze alleliche di partenza, che dei gruppi normossici ed ipossici dell'intero campione.

LOCUS	GRUPPI			
		Tot	N	I
Gpi-1	(N)	375	219	156
85		0,417	0,447	0,375
100		0,583	0,553	0,625*
Gpi-3	(N)	375	219	156
100		0,947	0,95	0,942
108		0,053	0,05	0,058
Ada	(N)	31	215	156
100		0,714	0,723	0,702
108		0,286	0,277	0,298
Mpi	(N)	374	218	156
100		0,552	0,544	0,564
104		0,448	0,456	0,436
Pgm-1	(N)	372	218	154
90		0,177	0,179	0,175
94		0,348	0,351	0,344
100		0,475	0,47	0,481
Pgm-2	(N)	375	219	158
95		0,014	0,01	0,01
100		0,985	0,99	0,99

Tabella 4.11: Frequenze alleliche di partenza (gruppo Tot.) e relative alla distribuzione nelle condizioni normossiche ed ipossiche dei tre gruppi campionati considerati come unico campione. In evidenza la frequenza dell'allele $GPI-1^{100}$, che risulta essere maggiore in condizioni ipossiche. Confronti a coppia: * $p \leq 0,05$.

Dal confronto tra il gruppo normossico ed ipossico dell'intero campione emergono differenze alleliche e genotipiche per il locus GPI-1 ($p\text{-value} = 0,04$; $p\text{-value} = 0,05$), dove l'allele $GPI-1^{100}$ ha una frequenza maggiore in condizioni di ipossia (anche rispetto alle frequenze alleliche di partenza), e viceversa l'allele $GPI-1^{85}$ ha una frequenza maggiore in condizioni di normossia. Inoltre, se si va ad analizzare la distribuzione dei tre genotipi ($GPI-1^{100/100}$, $GPI-1^{85/100}$, $GPI-1^{85/85}$), risulta che:

- il 55% degli omozigoti $GPI-1^{100/100}$, pari a 71 individui su 130, passano dalle condizioni ipossiche a quelle normossiche;
- il 57% degli eterozigoti $GPI-1^{85/100}$, pari a 100 individui su 177, passano dalle condizioni ipossiche a quelle normossiche;
- il 71% degli omozigoti $GPI-1^{85/85}$, pari a 48 individui su 68, passano dalle condizioni ipossiche a quelle normossiche e la frequenza di questo genotipo nelle condizioni ipossiche e normossiche è rispettivamente di 0,12 e 0,21.

Questo comportamento evidenzia una maggiore tendenza degli omozigoti $GPI-1^{85/85}$ a spostarsi verso le condizioni normossiche. Infatti in condizioni di normossia c'è una maggior percentuale di omozigoti $GPI-1^{85/85}$ (Fig. 4.1a), mentre in condizioni ipossiche c'è una maggior percentuale di omozigoti $GPI-1^{100/100}$ (Fig. 4.1b).

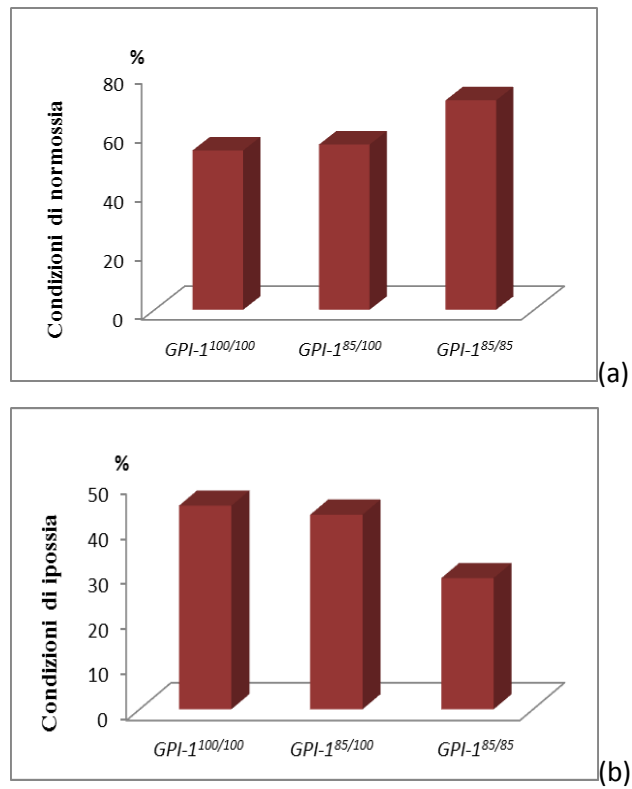


Fig. 4.1: Frequenza dei tre genotipi, $GPI-1^{100/100}$, $GPI-1^{85/100}$, $GPI-1^{85/85}$, che hanno scelto condizioni normossiche o ipossiche. (a) il genotipo omozigote $GPI-1^{85/85}$ è più frequente in normossia; (b) il genotipo omozigote $GPI-1^{100/100}$ è maggiormente presente in ipossia.

Analisi della sex ratio

Dell'intero campione è stato analizzato il rapporto tra i maschi e femmine e la loro rispettiva distribuzione, per verificare se dopo il test si fosse mantenuta la *sex ratio* di partenza (Tab. 4.12).

	♀	♂
Totale	257 (68,5%)	118 (31,5%)
Lato Normossico	154 (70%)	65 (30%)
Lato Ipossico	103 (66%)	53 (34%)

Tabella 4.12: Distribuzione degli individui femminili e maschili nelle condizioni ipossiche e normossiche, prima e dopo i test di scelta dell'habitat.

Dal test del χ^2 emergono differenze significative nella distribuzione dei maschi e delle femmine nelle due condizioni ($p\text{-value} = 0,0007$). La *sex ratio* di partenza sbilanciata ($p\text{-value} < 0,0001$) viene mantenuta anche dopo la distribuzione sia nel lato ipossico ($p\text{-value} < 0,0001$), sia nel lato normossico ($p\text{-value} < 0,0001$).

Nella tabella che segue (Tab. 4.13) sono riportate le frequenze alleliche sia del numero totale delle femmine e dei maschi (frequenze alleliche di partenza), sia quelle registrate al termine del *test di scelta dell'habitat*.

LOCUS	GRUPPI						
		♀ Tot	♂ Tot	♀ N	♀ I	♂ N	♂ I
Gpi-1	(N)	257	118	154	103	65	53
85		0,416	0,419	0,442	0,379	0,461	0,368
100		0,584	0,581	0,558	0,621	0,539	0,632
Gpi-3	(N)	257	118	154	103	65	53
100		0,945	0,949	0,942	0,952	0,969	0,925
108		0,055	0,051	0,058	0,048	0,031	0,075
Ada	(N)	254	117	151	103	64	53
100		0,716	0,719	0,705	0,733	0,766*	0,641*
108		0,284	0,291	0,295	0,267	0,234	0,359
Mpi	(N)	256	118	153	103	65	53
100		0,555	0,547	0,536	0,582	0,561	0,528
104		0,445	0,453	0,464	0,418	0,439	0,472
Pgm-1	(N)	256	116	153	103	65	51
90		0,19	0,151	0,19	0,189	0,154	0,147
94		0,345	0,353	0,343	0,35	0,369	0,333
100		0,465	0,496	0,467	0,461	0,477	0,52
Pgm-2	(N)	257	118	154	103	65	53
95		0,016	0,013	0,016	0,015	0,008	0,019
100		0,984	0,987	0,984	0,985	0,992	0,981

Tabella 4.13: Frequenze alleliche di partenza (Tot.) e relative alla distribuzione nelle condizioni normossiche ed ipossiche delle femmine e dei maschi. In grassetto la frequenza dell'allele *GPI-1*¹⁰⁰, che risulta essere maggiore in condizioni ipossiche. Confronti a coppia: * $p \leq 0,05$.

Considerando il numero totale e quindi le frequenze alleliche di partenza dei maschi e delle femmine, non emergono differenze significative, sia alleliche che genotipiche, tra i due gruppi. Dopo la distribuzione, il locus ADA presenta delle differenze alleliche ($p\text{-value} = 0,04$) e genotipiche ($p\text{-value} = 0,04$) tra i due gruppi dei maschi.

Da notare, in accordo con quanto detto prima, che l'allele *GPI-1*¹⁰⁰, anche se non in modo significativo, risulta più frequente in condizioni di ipossia, sia nei maschi che nelle femmine (anche rispetto alle frequenze alleliche di partenza).

Analisi dei dati morfologici

Con i dati morfologici (peso-lunghezza-larghezza) è stato estratto tramite analisi delle componenti principali un indice di condizione per ogni individuo, per valutare un possibile effetto del fenotipo sulla scelta della condizione normossica ed ipossica e sulle altre variabili quali, sesso, provenienza (Nord e Sud) e genotipo. Con l'analisi dell'ANOVA ad una via, si evince che la provenienza (Nord o Sud), non ha un effetto sul fenotipo (pertanto è stato possibile unire i campioni in un unico gruppo); non si osserva un effetto dell'indice di condizione sulla distribuzione durante il test di scelta; la morfologia è influenzata significativamente dal sesso ($F_{1,127} = 13,41$, $p\text{-value} = 0,0004$), come atteso (e.g. Leonardo & Sinis, 1998): le femmine sono più grandi dei maschi. Per quanto riguarda l'effetto del fenotipo sul genotipo, non è emersa nessuna relazione tra l'indice di condizione e le frequenze dei singoli loci. Anche l'effetto del sesso sui singoli loci è negativo (confermato dall'andamento delle frequenze alleliche sopra riportate). Pertanto la distribuzione degli individui, e di conseguenza dei genotipi, che è differente solo per il locus GPI-1, non è influenzata dal fenotipo morfologico e ne dalla provenienza.

4.2.2 Test comportamentali individuali

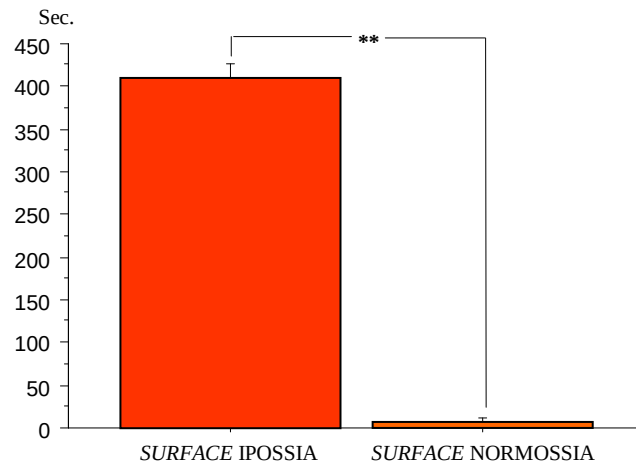
I test comportamentali sono stati eseguiti su un sottocampione di 129 individui precedentemente analizzati nel test di scelta dell'habitat, di cui 64 provenienti dal gruppo di individui che si è spostato in condizioni di normossia e 65 provenienti da quelli che sono rimasti in condizioni di ipossia. Il sottocampione analizzato nei test individuali risulta rappresentativo del campione analizzato nel test precedente, poichè con il Fisher's exact test non risultano differenze significative tra le frequenze alleliche del campione e del sottocampione ($p\text{-value} = 0,75$).

L'ANOVA per misure ripetute, non mostra nessun effetto significativo del sesso e del gruppo di provenienza (gruppi che si sono distribuiti durante il test di scelta dell'habitat) sui tratti comportamentali osservati sia nel test in normossia sia nel test in ipossia. Non si osserva un effetto della relazione tra il sesso e i genotipi dei singoli loci sui parametri comportamentali. Differenze significative invece emergono tra le variabili comportamentali nelle due differenti condizioni (Tab. 4.14).

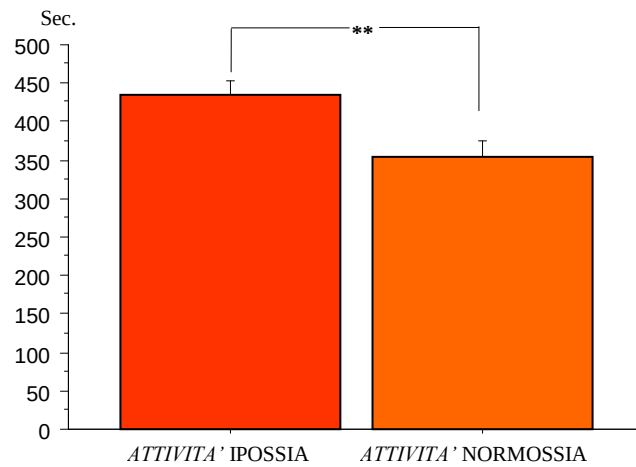
	NORMOSSIA	IPOSSIA
<i>SURFACE</i>	8,13 ± 3,7	411 ± 15,14
<i>ATTIVITA'</i>	354,4 ± 19,54	435,63 ± 16,64
<i>TOP</i>	122,32 ± 10,28	75,82 ± 4,65
<i>MIDDLE</i>	276,45 ± 14,26	119,71 ± 9,78
<i>GROUND</i>	302,87 ± 19,82	114,38 ± 9,94
<i>NORMAL</i>	667,39 ± 10,37	276,23 ± 15,11
<i>UPRIGHT</i>	43,27 ± 9,1	432,13 ± 15,94

Tabella 4.14: Quadro descrittivo dei parametri comportamentali osservati in condizioni di ipossia e normossia. Tutti i parametri presentano delle differenze statisticamente significative tra le due condizioni ($p\text{-value} < 0,0001$). Per ciascun parametro sono riportate le medie e gli errori standard dei valori in secondi.

In particolare, in ipossia gli individui passano più tempo a respirare in superficie ($F_{1,128}=672,68$, $p\text{-value}<0,0001$) e mostrano una maggiore attività locomotoria ($F_{1,128}=20,00$, $p\text{-value}<0,0001$) rispetto alle condizioni di normossia (Fig. 4.2).



(a)



(b)

Figura 4.2: Comportamenti “surface” (a) e “attività” (b) registrati sia in condizioni di ipossia sia di normossia individui provenienti dai gruppi di distribuzione (ipossico/normossico) del test di scelta dell’habitat. Maschi e femmine sono stati accorpati in quanto non c’era alcun effetto della variabile sesso. ** $p \leq 0,01$

Quest'analisi è stata effettuata anche per valutare una possibile relazione tra il comportamento e il genotipo dei singoli loci GPI-1, GPI-3, ADA, MPI e PGM 1. Per il locus GPI-1 risulta un effetto significativo sul comportamento “surface” ($F_{2,126} = 3,53$, $p\text{-value} = 0,03$) (Fig. 4.3).

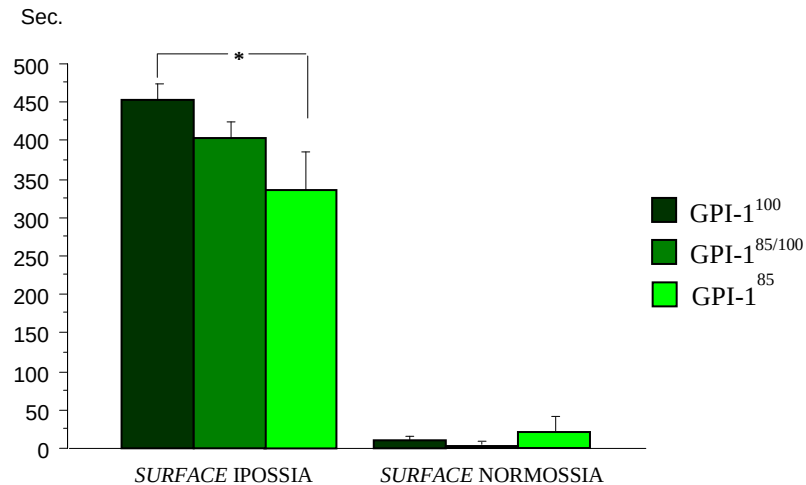


Figura 4.3: Effetto del locus GPI-1 sul comportamento “surface”. * $p \leq 0,05$

In condizioni d’ipossia, gli individui omozigoti per l’allele $GPI-1^{100}$ trascorrono più tempo in superficie rispetto agli individui omozigoti per l’allele $GPI-1^{85}$.

Questa significatività è confermata dai risultati ottenuti mediante l’ANOVA ad una via, dove nella condizione ipossica, emerge una differenza significativa tra gli omozigoti $GPI-1^{100}$ e gli omozigoti $GPI-1^{85}$ ($p\text{-value} = 0,016$) (Fig. 4.4).

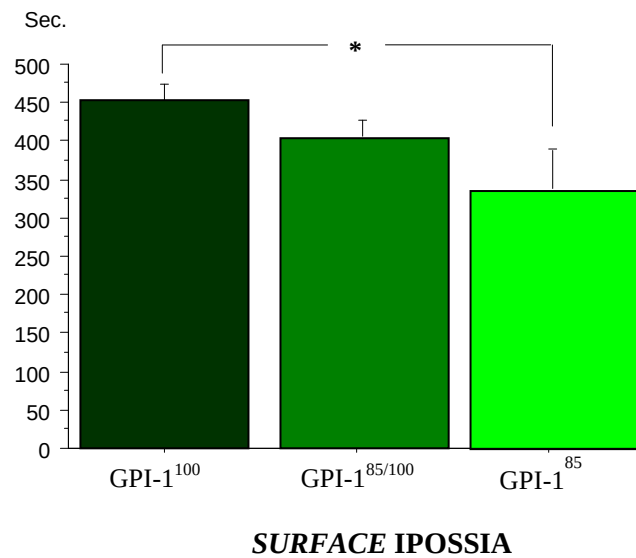


Figura 4.4: Effetto del locus GPI-1 sul comportamento “*surface*” in condizioni di ipossia. * $p \leq 0,05$

Questa differenza si evidenzia anche per il comportamento “*upright*”, dove gli omozigoti *GPI-1*¹⁰⁰, in ipossia passano più tempo in assetto verticale rispetto agli omozigoti *GPI-1*⁸⁵ (p -value= 0,02) (Fig. 4.5). In condizioni di normossia queste differenze, in entrambi i comportamenti non sono significative.

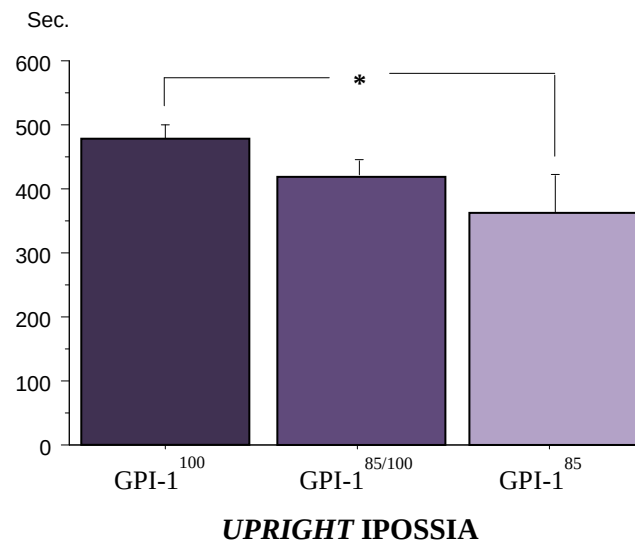


Figura 4.5: Effetto del locus GPI-1 sul tratto comportamentale “*upright*” in condizioni di ipossia. * $p \leq 0,05$

Questi due comportamenti risultano fortemente correlati tra loro (coefficiente di Spearman $rs = 0,811$, $p\text{-value} < 0,0001$), ovvero in ipossia, gli individui omozigoti $GPI-1^{100}$ tendono a passare più tempo in superficie con un assetto verticale. Questa correlazione si mantiene anche in normossia (coefficiente di Spearman $rs = 0,482$, $p\text{-value} < 0,0001$), dove però gli individui passano meno tempo a respirare in superficie e meno tempo in assetto verticale.

CAPITOLO 5: DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Il ruolo delle forze evolutive e la loro intensità di azione nel mantenimento della variabilità genetica delle popolazioni naturali sono temi centrali in genetica ecologica (Riginos *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2008); tuttavia, il peso relativo di ogni singola forza, le loro interazioni e il ruolo delle componenti ambientali nel modularne l'azione, sono questioni ancora aperte e poco discusse. Per esempio non è ancora noto a quale scala spaziale e temporale, tali forze possono causare divergenza genetica a dispetto dell'effetto omogeneizzante del flusso genico (Richardson *et al.*, 2014; Whitehead *et al.*, 2011). Inoltre, per quanto ipotizzato, non è noto quanto tale divergenza genetica, in ambienti eterogenei e sottoposti a forti pressioni ambientali, possa dipendere dall'*habitat choice*, ovvero da una scelta selettiva dell'*habitat* legata al genotipo degli individui (Mayr, 1982; Holt, 1987; Bullini *et al.*, 1998; Morris, 2011; Webster *et al.*, 2012). In questo lavoro abbiamo voluto verificare le seguenti ipotesi: *i*) che le forze evolutive che promuovono la divergenza possano agire su scale temporali e spaziali anche molto limitate *ii*) che parte di tale divergenza possa originarsi dall'*habitat choice*.

I risultati ottenuti in questo lavoro supportano l'ipotesi che la struttura genetica della popolazione di *Aphanius fasciatus* delle Saline di Tarquinia in condizioni di stress ambientale sia sottoposta all'azione combinata delle forze evolutive, in particolare selezione naturale e deriva genetica, le quali determinano una divergenza genetica in tempi e spazi limitati a dispetto del continuo flusso genico. Infatti, è stato confermato il *pattern* genetico osservato in passato, ossia deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg ed eterogeneità nelle frequenze alleliche e genotipiche, in occasione di una nuova estremizzazione delle condizioni ambientali, come mostrato dagli ultimi studi sulla comunità macrozoobentonica (Valiente, 2014). Inoltre, i risultati ottenuti in condizioni controllate, hanno permesso di definire una relazione tra l'andamento delle frequenze alleliche e la scelta (non casuale) di determinate condizioni dell'ambiente create sperimentalmente, e di identificare dei tratti comportamentali legati al genotipo degli individui, mostrando come l'*habitat choice* possa avere un ruolo determinante nell'origine dei *patterns* genetici osservati per *Aphanius*.

I dati ottenuti dall'analisi della struttura genetica della popolazione naturale confermano le ipotesi avanzate in passato (Angeletti *et al.*, 2010), ossia l'esistenza di una stretta relazione tra il *pattern* di distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche e le condizioni ambientali. Con gli studi effettuati prima del progetto LIFE nel 2003/2005 sulla popolazione locale di *Aphanius fasciatus*, sono state osservate in alcuni loci, deviazioni dall'equilibrio di Hardy-

Weinberg ed eterogeneità delle frequenze alleliche. Inoltre per alcuni loci la popolazione è risultata frammentata in sub-demi geneticamente distinti e presumibilmente adattati ai diversi microhabitat, correlati con i valori di ossigeno disciolto e salinità registrati nelle vasche delle saline (Angeletti *et al.*, 2009). Invece negli studi effettuati nel 2007, dopo il progetto LIFE, e quindi con il ripristino ecologico della salina e con l'attenuarsi delle pressioni ambientali, il flusso genico era risultato la forza dominante e di conseguenza era stata osservata un'omogeneizzazione delle frequenze alleliche e genotipiche che ritornano nuovamente in equilibrio di H-W (Angeletti *et al.*, submitted). I dati raccolti in questo studio (2012-2013) indicano che, insieme all'impoverimento e all'omogeneizzazione della comunità macrozoobentonica, misurata in termini di numero di specie e semplificazione della comunità (Valiente, 2014), anche la struttura genetica della popolazione di *Aphanius fasciatus* sta risentendo del peggioramento delle condizioni ambientali, presentando nuovamente un'eterogeneità nelle frequenze alleliche (ADA, GPI-3, MPI) lungo tutta l'area di studio e deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (GPI-1, GPI-3, MPI, PGM-1). Infatti, l'attuale peggioramento delle condizioni ambientali sembrerebbe incidere sulla distribuzione spaziale di diversi alleli, in particolare ADA e GPI-3, che presentano un'eterogeneità nelle frequenze alleliche e genotipiche tra i tre siti di campionamento (Tab. 4.2; 4.5). Nel dettaglio GPI-3 presenta deviazioni dall'equilibrio di H-W, con un deficit di eterozigoti altamente significativo a Nord nel 2012. Questa deviazione era stata già osservata a Nord nel campionamento del 2003 (pre-LIFE). Come già ipotizzato nei precedenti lavori (Angeletti *et al.*, 2010; submitted), l'eterogeneità genetica potrebbe essere mantenuta dall'azione della selezione naturale e della deriva genetica, il cui effetto sarebbe rafforzato sotto le pressioni ambientali; i deficit di eterozigoti a Nord potrebbero essere un effetto secondario dell'eterogeneità delle frequenze alleliche che originerebbe un effetto Wahlund, dato dagli *shift* di tali frequenze a Sud (per selezione e deriva), e dalla contemporanea o successiva migrazione degli individui verso Nord, presumibilmente per sfuggire alle condizioni estreme (Leonardos & Sinis, 1998). Per quanto riguarda il locus ADA, risultati precedenti hanno permesso di ipotizzare come la selezione naturale rappresenti la forza principale che darebbe origine all'eterogeneità allelica e genotipica negli anni 2003 e 2005, determinando deficit significativi di eterozigoti, correlazioni tra le frequenze alleliche e genotipiche e le concentrazioni di ossigeno disciolto (Angeletti *et al.*, 2009; 2010), generando una distribuzione clinale dell'allele *ADA*¹⁰⁰ in accordo con il gradiente di estremizzazione delle condizioni ambientali. Quest'andamento è stato osservato, oltre che per ADA anche per GPI-

3 (Tab. 4.2) nell'autunno 2012, in cui le condizioni ambientali hanno risentito delle estremizzazioni dei parametri durante la stagione estiva (Tab. 3.1). La frequenza dell'allele più comune per *ADA*¹⁰⁰ e dell'allele più raro *GPI-3*¹⁰⁸, aumenta verso le zone a Sud, dove le condizioni ambientali sono più estreme. Sebbene non si sia osservato più questo cline nel campionamento del giugno 2013 (Tab. 4.5), si sono registrate differenze significative per *ADA* tra i campioni di Centro e di Sud. Questi dati suggeriscono che la struttura genetica di questa popolazione è influenzata, sia dall'attuale peggioramento delle condizioni ambientali sia dalle normali variazioni stagionali; all'inizio dell'estate la zona a Sud è la prima a risentire dei fattori di stress mentre, dopo l'estate, l'estremizzazione dei parametri ambientali interessa pressochè l'intera salina (Tab. 3.1). In aggiunta, i risultati ottenuti dall'analisi degli individui sopravvissuti durante il fenomeno ipossico (Tab. 4.7), sono stati rilevanti per la comprensione del comportamento del locus *ADA* in tali condizioni. Infatti, la variazione della frequenza dell'allele *ADA*¹⁰⁰, che è aumentato del 10% circa tra gli individui sopravvissuti, supporta l'ipotesi che in condizioni di ipossia, la selezione favorisce questo allele (Angeletti *et al.*, submitted). De Innocentis *et al.* (2001) hanno evocato la selezione per spiegare la distribuzione clinale delle frequenze alleliche di *ADA* nella cernia bruna (*Epinephelus marginatus*); questo locus ha una funzione di regolazione nelle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che può essere collegato ai livelli di ossigeno della cellula e allo stress ossidativo (Clanton, 2007; Kalvegren, 2010). Quindi, una connessione tra una differente funzionalità dei genotipi per *ADA* in ipossia potrebbe essere possibile, anche se in realtà la selezione potrebbe interessare uno o più loci *linked* ad *ADA*.

L'analisi della *sex-ratio* mostra un rapporto sbilanciato a favore delle femmine, come già riportato in letteratura per questa specie (Leonardos & Sinis, 1999). Infatti, in entrambi i campionamenti, i maschi sono sempre in minoranza, con una percentuale nel 2012 del 42% contro il 58% delle femmine e nel 2013 del 25% contro il 75% (Tab. 4.1; 4.4). Ancora non è chiaro il motivo di questa *sex-ratio* sbilanciata ma, secondo fonti bibliografiche, potrebbe dipendere dalla competizione maschile nel corteggiamento e dalla maggiore vulnerabilità alla predazione data la loro colorazione più accentuata, soprattutto nel periodo riproduttivo (vedi dati 2013) (Leonardos & Sinis, 1999). Queste dinamiche, pertanto, potrebbero influenzare l'andamento e la distribuzione delle frequenze alleliche nella popolazione: infatti, in entrambi i campionamenti, maschi e femmine presentano delle differenze (Tab. 4.3; 4.6) in diversi loci (*GPI-1*, *PGM-1*, *MPI*, *ADA*), e queste differenze emergono anche all'interno dello stesso sesso tra i diversi siti di campionamento. Particolare attenzione merita nuovamente il locus

ADA in cui, sia per il 2012 sia per il 2013, l'allele ADA^{100} presenta una frequenza invertita, ossia nelle femmine è più alta a sud (0,79 nel 2012; 0,8 nel 2013), mentre nei maschi è maggiore a nord (0,74 nel 2012; 0,83 nel 2013). Inoltre nel 2012, ADA presenta un andamento clinale nelle femmine, mentre nel 2013 il cline è presente nei maschi ed ha un andamento opposto. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che le femmine, per necessità di riprodursi, si spostano verso Nord, in quanto in condizioni di elevata salinità (Sud), i processi riproduttivi vengono interrotti con il riassorbimento delle uova (Leonardos e Sinis, 1998). Differenze significative nelle frequenze alleliche associate al sesso sono state trovate nel ciprinodontide *Fundulus heteroclitus* (Mitton & Koehn, 1974), che mostra un marcato dimorfismo sessuale con accoppiamento poliginico, cioè il maschio si accoppia con più femmine: i maschi competono tra di loro durante la deposizione delle uova e di conseguenza presentano una mortalità maggiore (Newman, 1907). In quest'organismo sono state trovate differenze nelle frequenze alleliche tra i sessi: i maschi presentano differenze geniche rispetto alle femmine in quattro di dodici loci analizzati, indicando differenze sessuali nella struttura genica. La strategia di accoppiamento e la conseguente elevata mortalità dei maschi, affermano gli Autori, potrebbero spiegare l'eterogeneità genetica per questa specie (Giesel, 1972). Pertanto si potrebbe ipotizzare che, anche per *Aphanius*, una parte delle differenze genetiche siano la conseguenza del fatto che i maschi hanno, rispetto alle femmine, un tasso di mortalità maggiore (Penaz & Zaki, 1985) e sono quindi numericamente inferiori, soprattutto durante il periodo riproduttivo (Leonardos & Sinis, 1999); tuttavia queste dinamiche restano delle questioni aperte e le ipotesi avanzate meritano ulteriori approfondimenti attraverso studi mirati.

Clini geografici all'interno di popolazioni naturali sono stati ampiamente considerati una prova della selezione (Gysels *et al.*, 2004; Umina *et al.*, 2005; González-Wangüemert *et al.*, 2011), anche se nella maggior parte dei casi sono stati osservati *patterns* simili su scale spaziali molto più ampi (De Innocentis *et al.*, 2005; Cimmaruta *et al.*, 2005), dove non è da escludere che le grandi distanze geografiche possano aver avuto un importante ruolo nell'origine e nel loro mantenimento (per deriva e per un flusso genico limitato). Le osservazioni fatte per questa popolazione (Angeletti *et al.*, submitted), sostengono l'idea che la selezione in condizioni di stress, sembra essere il fattore principale del mantenimento del cline nel locus ADA, data la piccola scala geografica.

L'approccio sperimentale per lo studio dell'*habitat choice*, ha permesso di chiarire alcune osservazioni fatte in precedenza e di definire una relazione tra l'andamento delle frequenze

alleliche e la “scelta comportamentale” (non casuale) di determinate condizioni dell’ambiente, osservando così dei tratti comportamentali che potrebbero influire nella determinazione dei *patterns* osservati in natura, sia che questi siano indipendenti dal genotipo (vedi “attività”), sia che siano legati al genotipo (vedi “*surface*”). Con il *test di scelta* dell’habitat è stato possibile valutare una preferenza da parte di un gruppo d’individui tra i due tipi di condizioni, quella normale e quella ipossica. Il protocollo sperimentale e le modalità con cui è stato eseguito il test, sono risultate idonee, in quanto si è verificato un passaggio statisticamente significativo di più della metà d’individui dalle condizioni ipossiche a quelle normossiche (Tab. 4.8), a supporto del fatto che in natura, sotto le pressioni ambientali, una parte degli individui potrebbero spostarsi verso la zona Nord, generando così gli effetti Wahlund osservati nello studio di campo. La valutazione della scelta dell’habitat in base al fenotipo degli individui (peso, dimensioni) non ha mostrato alcuna relazione, mentre a livello di genotipo, per i sei loci analizzati, è stata osservata una relazione tra la scelta e il locus GPI-1 (Tab. 4.11). Rispetto alle frequenze di partenza (0,417 per l’allele *GPI-1*⁸⁵ e 0,583 per l’allele *GPI-1*¹⁰⁰), gli individui portatori dell’allele *GPI-1*¹⁰⁰ tendevano a rimanere in condizioni ipossiche (frequenza 0,625), mentre i portatori dell’allele *GPI-1*⁸⁵ si spostavano verso la zona normossica (frequenza 0,447). Tale andamento è stato riscontrato sia nei maschi sia nelle femmine, ossia entrambi i sessi hanno mostrato maggiori frequenze dell’allele *GPI-1*¹⁰⁰ in condizioni ipossiche (Tab. 4.13). Per questo locus quindi potrebbe esistere una relazione tra genotipo e scelta dell’habitat: infatti se si va ad analizzare il comportamento all’interno di ogni genotipo risulta che, ben il 71% degli omozigoti *GPI-1*^{85/85} passa dalle condizioni ipossiche a quelle normossiche (Fig. 4.1). Nel 2003 gli alleli di questo locus, hanno mostrato un andamento clinale in relazione alla salinità (parametro che è strettamente correlato alle concentrazioni di ossigeno disciolto) (Angeletti, 2006); l’allele *GPI-1*¹⁰⁰ era maggiormente presente a Sud in condizioni di salinità più elevate, e i test sperimentali mostrano che in effetti sono gli individui omozigoti *GPI-1*^{85/85} tendono a spostarsi verso le condizioni ottimali, giustificando così quanto osservato sul campo. Altre valutazioni possono essere fatte per il locus ADA, quello che in passato aveva mostrato delle relazioni tra i genotipi di questo locus e le concentrazioni di ossigeno disciolto (Angeletti *et al.*, 2009). Poiché, non è emersa nessuna relazione con la scelta dell’habitat, tali risultati sostengono ancora una volta l’ipotesi dell’azione della selezione naturale, come origine della distribuzione delle frequenze in natura, la quale in condizioni estreme favorirebbe individui portatori dell’allele *ADA*¹⁰⁰ determinandone l’aumento delle frequenze in condizioni estreme. Pertanto, attraverso questo

esperimento si evince che, in condizioni di stress sia la selezione naturale e sia l'*habitat choice* agiscono contemporaneamente su diversi loci.

I *test comportamentali* sui singoli individui hanno permesso invece di osservare e approfondire nel dettaglio le risposte comportamentali alle due condizioni, e di stabilire una possibile relazione tra queste risposte e il genotipo. Il protocollo metodologico adottato ha evidenziato delle marcate differenze negli stessi individui, tra i comportamenti espressi in condizioni normossiche e ipossiche (Tab. 4.14). Tutti gli individui tendono ad avere lo stesso atteggiamento in normossia e in ipossia (che è comunque diverso dalla normossia), poiché il sesso e la distribuzione ottenuta dal test precedente, non hanno avuto alcun effetto sui comportamenti individuali analizzati. In condizioni di stress ipossico gli individui hanno mostrato una maggior *attività* locomotoria, indicando presumibilmente una tendenza a voler sfuggire a tali condizioni (Fig. 4.2b). Questo risultato è in accordo con ciò che è stato osservato nel test precedente, ossia che la maggior parte degli individui si spostano dalla condizione ipossica a quella normossica; questo potrebbe essere un fattore fondamentale per la distribuzione degli individui negli habitat naturali e di conseguenza per il *pattern* di distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche che si osserva su campo. Inoltre, per GPI-1 c'è un effetto del genotipo legato al parametro comportamentale "*surface*" (Fig. 4.3): in ipossia tutti gli individui passano più tempo a respirare in superficie, ma per gli omozigoti $GPI-1^{100/100}$, questo comportamento è significativamente più frequente rispetto agli omozigoti $GPI-1^{85/85}$ (Fig. 4.4). Queste osservazioni concordano con quelle fatte per il *test di scelta* dell'*habitat*, ossia che gli individui portatori dell'allele $GPI-1^{100}$ tendono a rimanere in condizioni ipossiche. Infatti, nel *test di scelta*, i gruppi di individui venivano messi in condizioni ipossiche, dando loro la possibilità di spostarsi verso le condizioni normossiche attraverso il passaggio aperto, ma probabilmente, la maggior parte dei portatori dell'allele $GPI-1^{100}$, andava a respirare in superficie piuttosto che cercare una via per sfuggire a tale condizione; questo può scaturire dal fatto che passando più tempo in superficie, avrebbero avuto meno opportunità di trovare (più o meno casualmente) la via di passaggio verso le condizioni normossiche, oppure potrebbero effettivamente essere più resistenti a tali condizioni o manifestare una risposta comportamentale più efficiente per resistere tali condizioni (respirazione *surface*). Questi esperimenti individuali hanno permesso di identificare alcuni tratti comportamentali legati al genotipo, e sono stati fondamentali per definire un quadro piuttosto complesso, confermando che il fenomeno dell'*habitat choice* per

GPI-1, insieme alla selezione naturale per ADA, potrebbero dare origine ad una parte del *pattern* genetico eterogeneo riscontrato in natura.

Sebbene le relazioni tra parametri ambientali e frequenze alleliche, siano state osservate in natura in altri organismi quali, *Mytilus edulis* per il locus LAP e la salinità (Koehn & Hilish, 1987), *Tegula funebris* per il locus GPI e il gradiente termico (Byers, 1983), *Fundulus heteroclitus* per il locus LDH-B e la temperatura dell'acqua (Crawford & Powers, 1992), *Pomatoschistus lozanoi* dove la frequenza dell'allele *GPI-A*¹⁰⁰ è correlata positivamente con la salinità (Gyseyes *et al.*, 2004), solo in alcuni casi viene evocata una possibile correlazione del comportamento ai tratti genetici (Byers, 1983), come componente importante per la scelta dell'habitat (Wcislo, 1989), e inoltre, in letteratura, non sono molti gli studi mirati a chiarire il fenomeno dell'*habitat choice* attraverso approcci sperimentali. In alcuni studi sono state approfondite le relazioni tra fenotipo e scelta preferenziale dell'habitat, piuttosto che la relazione tra genotipo e "scelta comportamentale" di un ambiente. Per esempio sono state studiate le variazioni individuali nel comportamento di foraggiamento del pesce persico (*Lepomis macrochirus*) in condizioni di laboratorio, ricreando negli acquari tipi diversi di habitat (con e senza vegetazione) (Ehlinger, 1990). Sono state osservate delle marcate differenze tra gli individui sia nella scelta dell'habitat, sia nell'utilizzo di differenti tattiche di foraggiamento ed è stata osservata una correlazione tra le differenze comportamentali di foraggiamento e la dimensione delle pinne pettorali. Questi risultati indicano che la variazione comportamentale e morfologica tra gli individui può influenzare la scelta dell'habitat e l'efficienza di alimentazione. Altri esperimenti di laboratorio sono stati condotti per esempio per determinare le preferenze comportamentali di *Gambusia affinis* per diversi tipi di habitat (Casterlin & Reynolds, 1977). Gli individui hanno preferito ambienti con acqua calma, substrati di colore scuro e vegetazione. In condizioni di laboratorio, queste scelte corrispondono alla distribuzione di *G. affinis* in natura nei diversi microhabitat e indicano, per questa specie, la presenza di una scelta attiva dell'habitat anziché una semplice correlazione con l'habitat, ovvero una forma passiva di scelta (dovuta per esempio ad una sopravvivenza differenziale). Johannesson & Johannesson (1996), hanno invece osservato le differenze morfologiche e comportamentali in *Littorina saxatilis*, tra gruppi presenti in habitat diversi, e hanno allevato le generazioni successive in laboratorio per vedere se tali differenze persistevano. *Littorina saxatilis* si può trovare in molti habitat intertidali, e le chioccioline appartenenti a diversi habitat hanno morfologie e comportamenti diversi, probabilmente dovuti a fenomeni di adattamento ed è stato ipotizzato che le differenti forme sono causate da

una differenziazione genetica. Gli individui di *Littorina saxatilis* di tutti e tre i gruppi presentano differenze morfologiche e comportamentali, che persistono anche negli individui allevati in laboratorio. A differenza di altri casi, tra cui quelli riportati, l'approccio sperimentale per questo studio, ha individuato una relazione tra l'andamento delle frequenze alleliche e la scelta (non casuale) da parte degli organismi di determinate condizioni dell'ambiente, identificando dei tratti comportamentali legati al genotipo degli individui. I risultati ottenuti con il *test di scelta dell'habitat* e con i *test comportamentali* sui singoli individui sono inoltre in accordo tra loro, evidenziando delle relazioni tra la scelta dell'habitat o della condizione, componente comportamentale e genotipo, essendo in gran parte, gli omozigoti *GPI-1*^{85/85} a spostarsi verso le condizioni normossiche nel primo test, e a respirare meno in superficie nei test individuali. In altre parole, quanto osservato nel *test di scelta dell'habitat* è risultato giustificato e coerente con quanto osservato nei *test comportamentali* individuali. Tali risultati supportano l'ipotesi del ruolo dell'*habitat choice* nella definizione del *pattern* genetico osservato in *Aphanius*, che si è dimostrato un ottimo modello per gli studi di genetica ecologica (Angeletti *et al.*, submitted), e data la facilità di mantenimento e manipolazione in laboratorio, per gli studi in condizioni controllate (Malvasi *et al.*, 2010; Cavraro *et al.*, 2011; 2013).

Questo lavoro, basato sulle osservazioni fatte in precedenza (Angeletti *et al.*, submitted), rappresenta un contributo alla comprensione delle dinamiche microevolutive e all'adattamento microgeografico su piccola scala (Richardson *et al.*, 2014), evidenziando come lo stress ambientale possa accelerare la selezione naturale e la deriva, promuovendo più velocemente i cambiamenti evolutivi (Hoffmann & Hercus, 2000; Nevo 2001; 2011; Kingsolver *et al.*, 2001). Inoltre, le forze evolutive registrate hanno rivelato delle interazioni complesse di difficile interpretazione, lasciando aperta l'ipotesi che altri fenomeni, in questo caso l'*habitat choice*, possono intervenire nella determinazione dei *patterns* genetici naturali. L'approccio sperimentale ha permesso di osservare alcuni tratti comportamentali, sia indipendenti dal genotipo (ADA) sia legati al genotipo (GPI-1), che potrebbero avere un'influenza nella definizione dei *patterns* osservati in natura. Quindi, a causa della sovrapposizione e dell'interazione dei diversi fenomeni, il quadro in natura rimane piuttosto complesso: dal momento in cui, alcune distribuzioni osservate in questo studio sono legate al genotipo (GPI-1) e altre alla selezione naturale (ADA), si delinea una situazione in cui, la condizione di stress stimolerebbe gli individui a spostarsi verso condizioni migliori in relazione al proprio genotipo (*habitat choice*), e contemporaneamente promuoverebbe

l'azione della selezione naturale, la deriva genetica e il flusso genico (inducendoli a spostarsi verso condizioni meno estreme).

E' da tempo che si cerca di comprendere il ruolo complesso dell'*habitat choice* nelle dinamiche di popolazione, nei processi evolutivi, nell'origine e nel mantenimento della biodiversità e nella speciazione (Holt, 1987; Morris, 2003; Edeelar, 2008; Ravigne, 2009; Webster, 2012). E' stato suggerito che l'*habitat choice* potrebbe aumentare il livello di adattamento locale (Richardson *et al.*, 2014), stabilizzare la dinamica delle popolazioni, conservare la variabilità genetica (Webster *et al.*, 2012), e persino portare alla speciazione (Bullini *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 2012). Di base l'*habitat choice* rappresenta uno dei più importanti meccanismi che promuove l'adattamento microgeografico (Ravignè *et al.*, 2004; 2009), con una distribuzione non casuale dei genotipi nello spazio, contribuendo alla microevoluzione e da qui, attraverso il suo effetto sulle dinamiche di popolazione, può influenzare indirettamente le forze principali dell'evoluzione: la selezione naturale, la deriva genetica e il flusso genico (Holt, 1987). Attualmente l'attenzione si è maggiormente concentrata sul fatto che, questo fenomeno, potrebbe contribuire alla speciazione (Webster *et al.*, 2012): Rosenzweig (1974; 1985) ha sostenuto l'ipotesi che l'*habitat choice* può portare ad una rapida speciazione senza la separazione geografica delle popolazioni, influenzando così anche i modelli macro-evolutivi (Edeelar *et al.*, 2008). Sebbene le osservazioni temporali e spaziali in natura di tali modelli, siano importanti per la comprensione di queste dinamiche, non sono sufficienti per dare una giusta interpretazione e definire il peso relativo di ogni forza o fenomeno che contribuisce alla definizione di questi *patterns*. Pertanto sono necessari approcci sperimentali, soprattutto per popolazioni locali che vivono in ambienti eterogenei e di piccola scala (Edelaar *et al.*, 2008), che a loro volta potrebbero rappresentare un buon punto di partenza per la comprensione dei fenomeni che avvengono su ampia scala. Quindi l'approfondimento e la dimostrazione del fenomeno dell'*habitat choice*, oltre a spiegare i *patterns* di variabilità genetica sotto un altro punto di vista, potrebbe dare una chiave interpretativa per quei *taxa* che nel tempo si sono differenziati ed evoluti e potrebbe avere un importante ruolo nell'attuale cambiamento climatico globale, influenzando la distribuzione degli organismi spinti a spostarsi verso habitat ai quali sono meglio adattati (Edeelar *et al.*, 2008).

Questo studio sottolinea l'importanza di approfondire le relazioni tra le componenti comportamentali, ecologiche e genetiche per la comprensione delle dinamiche di popolazione, e costituisce un buon punto di partenza per lo studio sperimentale del fenomeno dell'*habitat*

choice. Tuttavia ci sono ancora delle questioni ancora aperte per quanto riguarda *Aphanius*, che richiedono ulteriori studi, soprattutto comportamentali. Interessante sarebbe cercare di capire quanto il rapporto dei sessi possa influire sulla distribuzione delle frequenze alleliche e genotipiche per questa specie; inoltre, non è chiaro quali sono gli individui più adattati o più resistenti alle condizioni ipossiche, ossia sono più resistenti gli individui omozigoti *GPI-1*¹⁰⁰, che tendono ad andare a respirare in superficie ma non fuggono dalle condizioni d'ipossia, oppure, gli omozigoti *GPI-1*⁸⁵ che invece tendono a sfuggire da tali condizioni? A tale scopo sarebbe opportuno: approfondire la connessione tra una possibile differente funzionalità dei genotipi per il locus GPI-1 in ipossia e la sua relazione con la componente comportamentale; affinare l'approccio sperimentale e osservare nel dettaglio i profili comportamentali e le loro relazioni con i tratti genetici, utilizzando per esempio anche altri marcatori molecolari; testare il comportamento degli individui rispetto ad altre variabili ambientali.

BIBLIOGRAFIA

Alcaraz C, Bisazza A, Berthou EG, 2008. Salinity mediates the competitive interactions between invasive mosquitofish and an endangered fish. *Oecologia* 155: 205-213.

Angeletti D, 2006. Erosione genetica e relazioni genotipoambiente nella popolazione delle Saline di Tarquinia di *Aphanius fasciatus* (Teleostea). Tesi di Dottorato di Ricerca (Phd Thesis) XVIII ciclo, Dip. DECOS, Università degli Studi della Tuscia, (<http://dspace.unitus.it/handle/2067/82>).

Angeletti D, Cimmaruta R, Nascetti G. 2009. Effetti dei cambiamenti ambientali spaziali e temporali delle Saline di Tarquinia sulla struttura genetica di *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae). *Atti Accademia Nazionale Lincei* 250: 113-122.

Angeletti D, Cimmaruta R, Nascetti G. 2010. Genetic diversity of the killifish *Aphanius fasciatus* paralleling the environmental changes of Tarquinia salterns habitat. *Genetica* 138: 1011-1021.

Angeletti D, Cimmaruta R, Sebbio C, Carere C, Nascetti G,. Does microgeographic genetic divergence enhanced by environmental pressures prevail with respect to gene flow? A study on a local population of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus*. Submitted to *Evolutionary Ecology*.

Ayala F, Powell JR, Tracey ML, Mourau CA, Perez-Salas S, 1972. Enzyme variability in *Drosophila willistoni* group IV. Genetic variation in natural population of *Drosophila willistoni*. *Genetics*. 70: 113-139.

Balanyà J, Oller JM, Huey RB, Gilchrist GW, Serra L, 2006. Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*. *Science* 313: 1773-1775.

Barton N, Partridge L, 2000. Limit to natural selection. *BioEssays* 22:1075-1084.

Bell G, Gonzales A, 2009. Evolutionary rescue can prevent extinction following environmental change. *Ecology Letters* 12: 942-948.

- Bellisario B, Novelli C, Cerfolli F, Angeletti D, Cimmaruta R, Nascetti G. 2010. The ecological restoration of the Tarquinia Salterns drives the temporal changes in the benthic community. *Transitional Waters Bulletin* 4: 105-114.
- Bellisario B, Carere C, Cerfolli F, Angeletti D, Nascetti G, Cimmaruta R. 2013. Infaunal macrobenthic community in a manipulated hyperhaline ecosystem: a long-term study. *Aquatic Biosystems* 9: 20.
- Bertness MD, Gaines SD, 1993. Larval dispersal and local adaptation in acorn barnacles. *Evolution* 47: 316-320.
- Bianco PG, 1988. I pesci d'acqua dolce d'Italia: note su un recente contributo. *Atti Soc. ital. sci. nat. Museo civ. stor. nat. Milano* 129: 146-158.
- Bjilisma R, Loeschcke V, 2005. Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *Journal Evolutionary Biology* 18: 744-749.
- Bolnick DI, Snowberg LK, Patenia C, Stutz WE, Ingram T, Lau OL. 2009. Phenotype-dependent native habitat preference facilitates divergence between parapatric lake and stream stickleback. *Evolution* 63: 2004-2016.
- Bolnick DI, Otto SP, 2013. The magnitude of local adaptation under genotype-dependent dispersal. *Ecology and Evolution*, 3: 4722-4735.
- Bramucci S, 2002. Caratterizzazione ecologica di un s.i.c. (sito importanza comunitaria): Saline di Tarquinia. analisi spaziale della comunità macrozoobenthonica a cinque anni dall'interruzione delle attività produttive. Univ. della Tuscia di Viterbo, Fac. di Scienze MM.FF.NN., Tesi di laurea A.A. 1997-1998.
- Brewer GJ, Sing CF, 1970. An introduction to isozyme techniques. New York & London, Academic press, XII: 186.
- Bullini L, Pignatti S, Virzo De Santo A, 1998. *Ecologia generale* – UTET
- Burnett K, et al. 2007. *Fundulus* as the premier teleost model in environmental biology: opportunities for new insights using genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D. Genomics and Proteomics* 2:257-286.

Byers BA, 1983. Enzyme polymorphism associated with Habitat Choice in the intertidal snail *Tegula funebris*. Behaviour Genetics 131: 65-75.

Byers BA, 1980. The Ecological Behavioural Genetics of Habitat Selection in an intertidal snail, *Tegula funebris*. Ph.D. Thesis. University of Colorado, Boulder.

Campbell NA, 1995. Biologia – Zanichelli

Cardillo A, 2003. Analisi della struttura genetica della popolazione di *Aphanius fasciatus* (Teleostea) della Riserva Naturale delle Saline di Tarquinia in relazione alle attività antropiche. Univ. della Tuscia di Viterbo, Fac. di Scienze MM.FF.NN., Tesi di laurea A.A. 2002-2003.

Casterlin ME, Reynolds WW, 1977. Aspects of habitat selection in the mosquitos fish *Gambusia affinis*. Hdrobiologia 55: 125-127.

Cavicchioli G, 1962. Considerazioni bio-ecologiche su *Aphanius Fasciatus* Valenciennes (Cyprinodontidae). Bollettino di Zoologia 29: 713-720.

Cavraro F, Fiorin R, Riccato F, Zucchetta M, Franzoi P, Torricelli P, Malavasi S, 2011. Distribution and habitat of *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) in the Venice lagoon. Bollettino del Museo Civico di Storia Naturale di Venezia 62: 125-134.

Cavraro F, Torricelli P, Franzoi P, Malavasi S, 2013. Productivity in natural and artificial habitats in brackish water systems: an example from *Aphanius fasciatus* populations. Transitional Waters Bulletin 1: 23-31.

Cavraro F, Torricelli P, Malavasi S, 2013. Quantitative ethogram of male reproductive behavior in the south european toothcarp *Aphanius fasciatus*. Biological Bulletin 225: 71-78.

Cavraro F, Daouti I, Leonardos I, Torricelli P, Malavasi S, 2014. Linking habitat structure to life history strategy: Insights from a Mediterranean killifish. Journal of Sea Research 85: 205-213.

Cimmaruta R, Scialanca F, Luccioli F, Nascetti G. 2003. Genetic diversity and environmental stress in Italian population of the cyprinodont fish *Aphanius fasciatus*. Oceanologica Acta 26: 101-110.

- Cimmaruta R, Bondanelli P, Nascetti G, 2005. Genetic structure and environmental heterogeneity in the European hake (*Merluccius merluccius*). *Molecular Ecology* 14: 2577-2591.
- Cimmaruta R, Bondanelli P, Ruggi A, Nascetti G, 2008 Genetic structure and temporal stability in the horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Fish Reserach* 89:114-121.
- Cimmaruta R, Blasi S, Angeletti D, Nascetti G, 2010. The recent History of Tarquinia Salterns offers the opportunity to investigate parallel changes at the habitat and biodiversity levels. *Transitional Waters Bulletin* 4: 53-59.
- Chapman MA, Hiscock SJ, Filatov DA, 2013. Genomic divergence during speciation driven by adaptation to altitude. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2553-2567.
- Clanton TL, 2007. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 102: 2379-2388.
- Consuegra S, Garcia De Leaniz C, Serdio A, Verspoor E, 2005a. Selective exploitation of early running fish may induce genetic and phenotypic changes in Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology (Suppl. A)* 67:130-146.
- Cottiglia M, 1980. Pesci lagunari. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane. Vol.1 ed. CNR: 141.
- Crawford DL, Powers DA, 1989. Molecular basis of evolutionary adaptation at the lactate dehydrogenase-B locus in the fish *Fundulus heteroclitus*. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 86: 9365-9369.
- Crawford DL, Powers DA, 1992. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Molecular Biology and Evolution* 9: 806-813.
- De Innocentiis S, Sola L, Cataudella S, Bentzen P, 2001. Allozyme and microsatellite loci provided discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 10: 2163-2175.
- Denno RF, McClure MS, Ott JR, 1995. Interspecific interactions in phytophagous insects: competition reexamined and resurrected. *Annual Review of Entomology*, vol. 40: 297-331.

- Dres M, Mallet J, 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological* 357: 471-472.
- Dufresne F, Bourget E, Bernatchez L, 2002. Differential patterns of spatial divergence in microsatellite and allozyme alleles: further evidence for locus-specific selection in the acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*? *Molecular Ecology* 11: 113-123.
- Dvornyk V, Jahan AS, 2012. Extreme conservation and non-neutral evolution of the *cpmA* circadian locus in a globally distributed *Chroococcidiopsis* sp. from naturally stressful habitats. *Molecular Biology and Evolution* 29: 3899-3907.
- Eanes WF, 1999. Analysis of selection on enzyme polymorphisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 301-326.
- Edelaar P, Siepielski AM, Clobert J, 2008. Matching habitat choice causes directed gene flow: a neglected dimension in evolution and ecology. *Evolution* 62: 2462-2472.
- Ehlinger TJ, 1990. Habitat choice and phenotype-limited feeding efficiency in bluegill: individual differences and trophic polymorphism. *Ecology* 71: 886-896
- Endler JA, 1986. *Natural Selection in the wild*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Franco A, Franzoi P, Malavasi S, Riccato F, Torricelli P, 2006. Fish assemblages in different shallow water habitats of the Venice Lagoon. *Hydrobiologia* 555: 159-174.
- Franzoi P, Franco A, Torricelli P, 2010. Fish assemblage diversity and dynamics in the Venice lagoon. *Rendiconti Lincei: Scienze Fisiche e Naturali* 21: 269-281.
- Futuyma DJ, 2001. Ecological specialization and generalization in *Evolutionary Ecology*, C. W. Fox, D. A. Roff, and D. J. Fairbairn, Eds., 177-189, Oxford University Press, New York, NY, USA.
- Galindo J, Morán P, Rolán-Álvarez E, 2009. Comparing geographical genetic differentiation between candidate and noncandidate loci for adaptation strengthens support for parallel ecological divergence in the marine snail *Littorina saxatilis*. *Molecular Ecology* 18: 919-930.
- Gandolfi G, Zerunian S, Torricelli P, Marconato A, 1991. *Aphanius fasciatus*, nono. In: I

pesci delle acque interne italiane. Italy: Ministero dell'ambiente – Servizio Conservazione Natura, Unione Zoologica Italiana, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato. 361-363.

Giesel JT, 1972. Sex ratio, rate of evolution and environmental heterogeneity. *The American Naturalist* 106: 380-387.

Gienapp P, Teplitsky C, Alho JS, Mills JA, Merilä J, 2008. Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology* 17: 167-178.

Gilbey J, Verspoor E, Summers D, 1999. Size and MEP-2* variation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the River North Esk, Scotland. *Aquatic Living Resources* 12: 1-5.

Gingerich PD, 1983. Rates of evolution: Effects of time and temporal scaling. *Science* 222: 159-161.

González-Wangüemert M, Pérez-Ruzafa Á, 2011. In two waters: contemporary evolution of lagoonal and marine white seabream populations. *Marine Ecology* 33: 337-349.

Gysels ES, Leentjes V, Volckaert FAM, 2004. Small-scale clinal variation, genetic diversity and environmental heterogeneity in the marine gobies *Pomatoschistus minutus* and *P. lozanoi* (Gobiidae, Teleostei). *Heredity* 93: 208-214.

Hedrick PW, 1986. Genetic-polymorphism in heterogeneous environments: a decade later. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 535-566.

Hoffmann AA, Willi Y, 2008. Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Reviews Genetics* 9: 421-432.

Hoffmann AA, Hercus MJ, 2000. Environmental stress as an evolutionary force. *BioScience* 50: 217-226.

Holm ER, Bourget E, 1994. Selection and population genetic structure of the barnacle *Semibalanus balanoides* in the northwest Atlantic and Gulf of St. Lawrence. *Marine Ecology Progress Series* 113: 247-256.

Holt RD, 1997. Population dynamics and evolutionary processes: the manifold roles of habitat selection. *Evolutionary ecology* 1: 331-347.

Johannesson K, Johannesson B, 1989. Differences in allele frequencies of aat between high-rocky and mid-rocky shore populations of *Littorina saxatilis* (Olivi) suggest selection in this enzyme locus. *Genetical Research* 54: 7-11.

Johannesson K, Johannesson B, Rolan-Alvarez E, 1993. Morphological differentiation and genetic cohesiveness over a microenvironmental gradient in the marine snail *Littorina saxatilis*. *Evolution* 47: 1770-1787.

Johannesson K, Johannesson B, Lundgren U, 1995. Strong natural selection causes microscale allozyme variation in a marine snail. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 92: 2602-2606.

Johannesson K, Johannesson B, 1996. Population differences in behaviour and morphology in the snail *Littorina saxatilis*: phenotypic plasticity or genetic differentiation? *Journal of Zoology* 240: 475-193.

Jordan WC, Verspoor E, Youngson A F, 1997. The effect of natural selection on estimates of genetic divergence among populations of the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 51: 546-560.

Jordan WC, Youngson AF, 1991. Genetic protein variation and natural selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Journal of Fish Biology* 39: 185-192.

Jordan WC, Youngson A F, Webb JH , 1990. Genetic variation in the malic enzyme-2 locus and age at maturity in sea-run Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47: 1672-1677.

Joseph SJ, Didelot X, Rothschild J, de Vries HJC, Morré SA, Read TD, Dean D, 2012. Population genomics of *Chlamydia trachomatis*: Insights on drift, selection, recombination and population structure. *Molecular Biology and Evolution* 29: 3933-3946.

Kälvegren H, Fridfeldt J, Bengtsson T, 2010. The role of plasma adenosine deaminase in chemoattractant-stimulated oxygen radical production in neutrophils. *European Journal of Cell Biology* 89: 462-467.

Kawecki TJ, Ebert D, 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7: 1225-1241.

- Kingsolver JG, Gomulkiewicz R, Carter PA. 2001. The strength of phenotypic selection in natural populations. *The American Naturalist* 157: 245-261.
- Koehn RK, Hilbish TJ, 1987. The adaptive importance of genetic variation. *American Scientist* 75: 134-141.
- Koehn RK, Milkman R, Mitton JB, 1976. Population genetics of marine pelecypods. IV. Selection, migration, and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution* 30: 2-30.
- Koehn R K, Newell RI, Immermann F, 1980. Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 77: 5385-5389.
- Lamb BC, Saleem M, Scott W, Thapa N, Nevo E., 1998. Inherited and environmentally induced differences in mutation frequencies between wild strains of *Sordaria fimicola* from "Evolution Canyon". *Genetics* 149: 87-99.
- Lardicci C, Como S, Corti S, Rossi F. 2001. Recovery of the macrozoobenthic community after severe dystrophic crises in a mediterranean coastal lagoon (Orbetello, Italy). *Marine Pollution Bulletin* 42: 202-214.
- Le Corre V, Kremer A, 2012. The genetic differentiation at quantitative trait loci under local adaptation. *Molecular Ecology* 21: 1548-1566.
- Leonardos I, Sinis A, 1997b. Early development of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces, Cyprinodontidae) in the Mesolongi lagoon (in Greece). *Proceedings of the Fifth Hel. Symp. Oceanography Ana Fish* 2: 237-240.
- Leonardos I, Sinis A, 1998. Reproductive strategy of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces, Cyprinodontidae) in the Mesolongi and Etolikon lagoons (W. Greece). *Fisheries Research* 35: 171-181.
- Leonardos I, Sinis A, 1999. Population age and structure of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces, Cyprinodontidae) in the Mesolongi and Etolikon lagoons (W. Greece). *Fisheries Research* 40: 227-235.

- Levene H, 1953. Genetic equilibrium when more than one ecological niche is available. *American Naturalist* 87: 331-333.
- Lewontin RC, 1983. Gene, organism and environment. In D. S. Bendall (Ed.), *Evolution from Molecules to Men*, 273-285. Cambridge: Cambridge University Press.
- Maltagliati F, 1999. Genetic divergence in natural populations of the Mediterranean brackish-water killifish *Aphanius fasciatus*. *Marine Ecology* 179: 155-162.
- Maltagliati F, 2002. Genetic monitoring of brackish-water populations: the Mediterranean toothcarp *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) as a model. *Marine Ecology* 235: 257-262.
- Maltagliati F, Camilli L. 2000. Temporal genetic variation in a population of *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) from a brackish-water habitat at Elba Island (Italy). *Environmental Biology Fishes* 57: 107-112.
- Malavasi S, Georgalas V, Cavraro F, Torricelli P, 2010. Relationships between relative size of sexual traits and male mating success in the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 43: 157-167.
- Massa R., Ingegnoli V. a cura di 1999. *Biodiversità, Estinzione e Conservazione* –UTET
- Maynard Smith J, Sympatric speciation, 1996. *American Naturalist*, 100: 637-650.
- Mayr E, 1982. Processes of speciation in animals in: *Mechanisms of speciation*, Barigozzi C, Alan R, Liss Inc, New York 1-19.
- Mazza F, 1901. Sulla prima differenziazione delle gonadi e sulla maturazione delle uova nella *Lesbias Calaritana*. *Monitore zoologico italiano* 12: 235-237.
- Mitton JB, Koehn RK, 1975. Genetic organization and adaptive response of allozymes to ecological variables in *Fundulus heteroclitus*. *Genetics* 79: 97-111.
- Morris DW, 2011. Adaptation and habitat selection in the eco-evolutionary process. *Proceedings of the Royal Society B: Biological* 278: 2401-2411.
- Mosesso P, Angeletti D, Pepe G, Pretti C, Nascetti G et al., 2012. The use of cyprinodont fish, *Aphanius fasciatus*, as a sentinel organism to detect complex genotoxic mixtures in the coastal

lagoon ecosystem. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 742: 31-36.

Nevo E. 1995b. Asian, African and European biota meet at “Evolution Canyon”, Israel: local tests of global biodiversity and genetic diversity patterns. Proceedings of the Royal Society B: Biological 262: 149-155.

Nevo E. 2001. Evolution of genome–phenome diversity under environmental stress. Proceedings of the National Academy of Sciences 98: 6233-6240.

Nevo E, 2011. Evolution under environmental stress at macro- and microscale. Genome Biology and Evolution 3: 1039-1052.

Newman P, 1907. Spawning behavior and sexual dimorphism in *Fundulus heteroclitus* and allied fish. Biol. Bull. 12: 314-348.

Noldus LPJJ, 1991. The Observer: A software system for collection and analysis of observational data. Behavior Research Methods, Instruments, & Computers 23: 415-429.

Odling-Smee F J, Laland KN, Feldman MW, 2003. Niche construction: the neglected process in evolution. Princeton (New Jersey): Princeton University Press.

Parsons PA, 2005. Environments and evolution: interactions between stress, resource inadequacy, and energetic efficiency. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society Cambridge Philosophical Society 80: 589-610.

Parsons PA, 1993. Stress, extinctions and evolutionary change: From living organisms to fossils. Biological Reviews 68: 313-333.

Penaz M, Zaki M, 1985. Cyprinodont fishes of lake Mariut, Egypt. Folia Zoologica 34: 373-384.

Polesi P, 2005. Influenza delle fluttuazioni ambientali sulla struttura genetica di *Aphanius fasciatus* delle Saline di Tarquinia: dati preliminari Univ. della Tuscia di Viterbo, Fac. di Scienze MM.FF.NN., Tesi di Laurea Sperimentale Anno Accademico 2004-2005.

Poulik MD, 1957. Starch gel electrophoresis in discontinuous system of buffer. Nature, 180: 1477.

Powers DA, Place AR, 1978. Biochemical genetics of *Fundulus heterolitus* (L.). Temporal and spatial variation in gene frequencies of Ldh-B, Mdh-A, Gpi-B, and Pgm-A. *Biochemical Genetics* 16: 593-607.

Powers DA, Lauerman T, Crawford D, Di Michele L, 1991. Genetic mechanisms for adapting to a changing environment. *Annual Review of Genetics* 25:629-659.

Principe A. 2012. Analisi temporale della comunitàmacrozoobentonica in un ambiente acquatico iperalino: le Saline di Tarquinia. Tesi di Laurea. Università degli Studi della Tuscia. A.A: 2011-2012.

Ravigne´ V, Olivieri I, Dieckmann U. 2004. Implications of habitat choice for protected polymorphisms. *Evolutionary Ecology Research* 6: 125-145.

Ravigne´ V, Dieckmann U, Olivieri I, 2009. Live where you thrive: joint evolution of habitat choice and local adaptation facilitates specialization and promotes diversity. *American Naturalist* 174: 141-169

Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetic software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.

Reznick DN, Shaw FH, Rodd FH, Shaw RG, 1997. Evaluation of the rate of evolution in natural populations of Guppies (*Poecilia reticulata*). *Science* 275: 1934-1937.

Richardson JL, Urban MC, Bolnick DI, Skelly DK, 2014. Microgeographic adaptation and the spatial scale of evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 165-176.

Richardson BJ, Baverstock PR, Adams M, 1986. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematic and population studies. Academy Press, San Diego, California.

Riginos C, Sukhdeo K, Cunningham CW, 2002. Evidence for selection at multiple allozyme loci across a mussel hybrid zone. *Molecular Biology and Evolution* 19: 347-351.

Ropson J, Brown DC, Powers DA, 1990. Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* (L.). VI. Geographical variation in the gene frequencies of 15 loci. *Evolution* 44: 16-26.

Rosenzweig ML, 1974. On the evolution of habitat selection. Pe. *First Internat. Cong. Ecol.* 401-404.

Rosenzweig ML, 1985. Some theoretical aspects of habitat selection. In *Habitat selection in Birds* (M. Cody, ed) 517-540, Academic Press, New York.

Sanford E, Roth MS, Johns GC, Wares JP, Somero GN, 2003. Local selection and latitudinal variation in a marine predator–prey interaction. *Science* 300: 1135-1137.

Schmidt PS, Rand DM, 2001. Adaptive maintenance of genetic polymorphism in an intertidal barnacle: habitat- and life-stage-specific survivorship of *Mpi* genotypes. *Evolution* 55: 1336-1344.

Schmidt PS, Serrao EA, Pearson GA, Riginos C, Rawson PD, et al. 2008. Ecological genetics in the North Atlantic: environmental gradients and adaptation at specific loci. *Ecology* 89: 91-107.

Sebbio C, Carere C, Nascetti G, Bellisario B, Mosesso P, Cimmaruta R, Angeletti D, 2014. Interspecies variation in DNA damage induced by pollution. *Current Zoology* 60: 308-321.

Selander RK, Smith MH, Yang SY, Johnson WE, Gentry JB, 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionotus*). Univ. Tex. Publ. (Stud. Genet. 6)103: 49-69.

Servidio MR, Noor MAF, 2003. The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 339-364.

Shaw CR, Prasad R, 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochemical Genetics* 4: 297-320.

Sokal RR, Rohlf FJ, 1969. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco.

Soltis DE, Hafler CH, Darrow DC, Gastony GJ, 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffer, gel and electrode buffer, and staining schedules. *American Fern Journal* 73: 9-27.

Somero GN, 2005. Linking biogeography to physiology: evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. *Frontiers of Zoology* 2:1.

Stockwell CA, Hendry AP, Kinnison MT, 2003. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 94-101.

Statview SE+Graphics ,1988. Macintosh, Feldman, D. S., jr, Gagnon, J., Abacus Concepts, Inc.1984 Boniüt Ave., Berkeley, CA

Swofford DL, Selander RB, 1981. Biosys-1: a fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. Journal of Heredity, 72: 281-283.

Szarowska M, Falniowski A, Mazan K, Fialkowski W, 1998. Adaptative significance of glucose phosphate isomerase (GPI) allozymes in the spring snail *Bythinella*? Journal of Molluscan Studies, 64: 257-261.

Tigano C, Canapa A, Ferrito V, Barucca M, Arcidiacono I, Deidun A, Schembri PJ, Olmo E, 2006. A study of osteological and molecular differences in populations of *Aphanius fasciatus* Nardo 1827, from the central Mediterranean (Teleostei, Cyprinodontidae). Marine Biology 149: 1539-1550.

Torrissen KR, Lied E, Espe M, 1994. Differences in digestion and absorption of dietary-protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. Journal of Fish Biology 45: 1087–1104.

Torrissen KR, Lied E, Espe M, 1995. Differences in amino acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) with genetically different trypsin isozymes. Aquaculture 137: 191-192.

Torrissen KR, Male R, Naevdal G, 1993. Trypsin isozymes in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: Studies of heredity, egg quality and effect on growth of three different populations. Aquaculture and Fisheries Management 24: 407-415.

Umina PA, Weeks AR, Kearney MR, McKechnie SW, Hoffmann AA, 2005. A rapid shift in a classic clinal pattern in *Drosophila* reflecting climate change. Science 308: 691-693.

Valiente MVF, 2014. Lo studio della comunità macrozoobentonica delle Saline di Tarquinia come strumento di monitoraggio per la gestione. Tesi sperimentale. Università degli Studi della Tuscia. A.A. 2012-2013.

Verspoor E. 1986. Spatial correlation of transferrin allele frequencies in Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations from North America. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic

Sciences 43: 1074-1078.

Verspoor E, 1994. The evolution of genetic divergence at protein coding loci among anadromous and non-anadromous populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). In Genetics and Evolution of Aquatic Organisms (Beaumont, A. R., ed), 52-67.

Verspoor E, Beardmore JA, Consuegra S, Garcia De Leaniz C, Hindar K, Jordan WC, et al., 2005. Genetic protein variation in the Atlantic salmon: population insights gained from 40 years of research. Journal of Fish Biology 67: 3-54.

Verspoor E, Fraser NHC, Youngson AF, 1991. Protein polymorphisms in the Atlantic salmon within a Scottish river: evidence for selection and estimates of gene flow between tributaries. Aquaculture 98: 217-230.

Verspoor E, Jordan WC, 1989. Genetic variation at the Me-2 locus in the Atlantic salmon within and between rivers: evidence for its selective maintenance. Journal of Fish Biology (Suppl. A), 35: 205-213.

Watt WB, 1977. Adaptation at specific loci. I. Natural selection on phosphoglucose isomerase of *Colias* butterflies: biochemical and population aspects. Genetics 87: 177-194.

Wagner A, 2008. Neutralism and selectionism: a network-based reconciliation. Nature Reviews Genetics 9: 965-974.

Wcislo WT, 1989. Behavioral environments and evolutionary change. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 20: 137-169.

Weber K, Diggins LT, 1990. Increased selection responses in larger populations. II. Selection for ethanol vapor resistance in *Drosophila melanogaster* at two population sizes. Genetics: 125: 585-597.

Webster SE, Galindo J, Grahme JW, Butlin RK, 2012. Habitat choice and speciation. Intern. Journal of Ecology. Article ID 154686

Whitehead A, Roach JL, Zhang S, Galvez F, 2011. Genomic mechanism of evolved physiological plasticity in killifish distributed along an environmental salinity gradient. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 108: 6193-6198.

Zerunian S, 2003. Piano d'azione generale per la conservazione dei pesci d'acqua dolce italiani. Quaderni per la Conservazione della Natura 17, Min. Ambiente—Ist. Naz. Fauna Selvatica

SITOGRAFIA

<http://www.iucn.it>

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento va al Dott. Alessandro Carlini per il prezioso aiuto nell'allestimento del sistema di acquari per lo svolgimento degli esperimenti comportamentali.

Gli esperimenti e la raccolta dei dati comportamentali sono stati eseguiti in collaborazione con la studentessa Claudia Strinati, in adempimento alla tesi triennale “Risposte individuali a condizioni di ipossia in *Aphanius fasciatus*”.