



Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche (DEB)

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

**“Studio della Produzione Primaria di *Posidonia oceanica*
(L.) Delile, (1813), nel Lazio settentrionale ”**

Settore Disciplinare – BIO/07

TESI DI DOTTORATO DI

Dott.ssa Selvaggia Cognetti de Martiis

Firma: *Selvaggia Cognetti de Martiis*

COORDINATORE DEL CORSO

Prof. Daniele Canestrelli

Firma: *Daniele Canestrelli*

TUTOR SCIENTIFICO

Prof. Marco Marcelli

Firma: *Marco Marcelli*

DATA DISCUSSIONE:

17 - 06 - 2016

Riassunto

“Studio della Produzione Primaria di *Posidonia oceanica* (L.) Delile, (1813) nel Lazio settentrionale”

In questo studio sono state analizzate quali-quantitativamente le praterie di *Posidonia oceanica* comprese tra Tarquinia Lido e Santa Severa (Italia, Lazio, Mar Tirreno).

In 18 stazioni sono stati stimati i descrittori strutturali e funzionali e compiute analisi genetiche attraverso la tecnica dei RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA).

Nel 50% delle stazioni sono state inoltre effettuate stime del contenuto di clorofilla e della produzione primaria fogliare ed ipogea e sono stati misurati i parametri fotosintetici attraverso l'utilizzo del fluorimetro PAM (Pulse Amplitude Modulation).

Uno degli obiettivi principali di questo progetto è di costruire, a partire da modelli disegnati per il fito-plancton, un modello matematico che permetta la stima dei valori di produzione fogliare utilizzando la PAR (Photosynthetic Active Radiation), l'efficienza fotosintetica, il contenuto di clorofilla e alcune variabili fotosintetiche.

Integrando le informazioni ottenute dall'analisi di un totale di 972 campioni vegetali, sono stati conseguiti risultati interessanti, sia sulla distribuzione e sullo stato di qualità delle praterie esaminate, che sul possibile utilizzo del modello matematico applicato.

A livello genetico, le stazioni di campionamento sono raggruppate in 3 popolazioni, una a nord del porto di Civitavecchia, una tra il porto e Capo Linaro, e l'altra a sud di Capo Linaro.

Per quanto riguarda la struttura, le praterie sono risultate essere frammentate, con alcune semi-praterie.

I valori di produzione fogliare ottenuti tramite lepidocronologia oscillano tra 56.74 g/m²/anno e 308.59 g/m²/anno e i valori di produzione ottenuti con i due diversi metodi hanno mostrato una correlazione di 0.65-0.70.

L'approccio innovativo del modello consente di evitare il campionamento distruttivo dell'intera pianta, richiedendo il solo taglio di una singola foglia intermedia, e ha i requisiti per divenire uno strumento utile per la conoscenza completa dello stato produttivo delle praterie.

Abstract

“Primary Production study on *Posidonia oceanica* (L.) Delile, (1813) in the Northern Latium”

In this study *Posidonia oceanica* meadows from Tarquinia Lido to Santa Severa (Italy, Latium, Tyrrhenian Sea) were analyzed.

Structural and functional descriptors were estimated and genetic analysis have been performed, through RAPD technique (Random Amplification of Polymorphic DNA) in 18 sampling stations.

Furthermore, on 50 % of these stations, *chl* content, leaf and rhizome production were estimated and photosynthetic parameters were measured by PAM fluorometer (Pulse Amplitude Modulation).

The main aim of this project is to create, on the basis of already designed phyto-plancton models, a mathematical model that allows for the estimation of primary foliar production, from PAR (Photosynthetic Active Radiation), photosynthetic efficiency, chlorophyll content and some photosynthetic variables.

Integrating information acquired from the analysis of 972 plants, interesting results were obtained, both concerning the distribution and the quality state of observed meadows, and regarding the potential use of the mathematical model built.

At a genetic level, sampling stations were clustered into three main groups: the first population is to the North of Civitavecchia harbour, the second is on the coast from the port and Capo Linaro and the last is to the South of Capo Linaro.

As regards the structural parameters, most meadows were found to be fragmented or with very low densities.

Foliar Production values resulting from lepidochronological analysis ranged from 56.74 g/m²/year to 308.59 g/m²/year and the values resulting from model showed with them a correlation of 0.65-0.7.

This new mathematical approach allows for the avoidance of destructive sampling of the whole plant, requiring only the cutting of the older intermediate leaf, and it has the necessary characteristic to become a useful tool for the complete knowledge of the productive state of meadows.

Premessa

1_INTRODUZIONE	1
1.1_Ruolo delle praterie di <i>Posidonia oceanica</i> nei sistemi costieri mediterranei.....	1
1.2_ Il limite inferiore delle praterie di <i>Posidonia oceanica</i>	3
1.3_Produzione primaria in <i>Posidonia oceanica</i>	3
1.4_Variabilità genetica delle praterie di <i>Posidonia oceanica</i>	4
1.5_Aspetti normativi.....	5
2_OBIETTIVI DEL LAVORO	6
3_MATERIALI E METODI	8
3.1_Area di studio e metodologie campionamento.....	8
3.1.1_Area di studio.....	8
3.1.2_Metodo di campionamento.....	10
3.2_Studio delle praterie di <i>Posidonia oceanica</i>	13
3.2.1_Descrittori fisici.....	13
3.2.2_Descrittori fisiografici.....	13
3.2.3_Descrittori strutturali: densità e copertura.....	14
3.2.4_Descrittori funzionali: fenologia e biomassa.....	16
3.2.5_Descrittori funzionali: produzione e produttività.....	16
3.2.6_Indagini genetiche: protocollo di estrazione e metodo dei RAPD.....	17
3.3_Studio del limite inferiore delle praterie.....	18
3.4_Analisi fenologiche e lepidocronologiche per il calcolo della produzione epigea ed ipogea.....	23
3.4.1_Analisi fenologiche.....	23
3.4.2_Analisi lepidocronologiche.....	24
3.4.3_Produzione epigea ed ipogea.....	25
3.5_Misura delle dinamiche fotodintetiche tramite PAM (Pulse amplitude modulated).....	26

3.6_Contenuto di clorofilla in <i>Posidonia oceanica</i>.....	32
3.7_Modello matematico per il calcolo della produzione primaria tramite l'efficienza fotosintetica.....	33
<u>3.7.1_Prime versioni del modello matematico per il calcolo della produzione primaria fitoplanctonica</u>	
<u>3.7.2_Modifiche del modello matematico per il calcolo della produzione primaria fitoplanctonica</u>	
<u>3.7.3_Modello matematico per il calcolo della produzione primaria della <i>Posidonia oceanica</i></u>	
<u>3.7.4_Analisi della variazione stagionale e giornaliera dei parametri fotosintetici</u>	
3.8_Trattamento statistico dei dati.....	36
<u>3.8.1_Analisi univariata.....</u>	<u>37</u>
<u>3.8.2_Pca.....</u>	<u>37</u>
<u>3.8.3_Correlazione.....</u>	<u>37</u>
<u>3.8.4_Anova.....</u>	<u>37</u>
<u>3.8.5_UPGMA clustering.....</u>	<u>38</u>
<u>3.8.6_Test di Mantel.....</u>	<u>38</u>
<u>3.8.7_Amova.....</u>	<u>39</u>
<u>3.8.8_PcoA.....</u>	<u>39</u>
4_RISULTATI.....	41
4.1_Area di studio: distribuzione spaziale e temporale dei dati.....	41
4.2_Studio delle praterie di <i>Posidonia oceanica</i>: fase di caratterizzazione delle stazioni prese in esame.....	44
<u>4.2.1 RAPD: risultati genetici.....</u>	<u>44</u>
<u>4.2.2 Analisi dei parametri strutturali.....</u>	<u>46</u>
<u>4.2.3 Analisi dei parametri strutturali nei 3 range batimetrici.....</u>	<u>56</u>
<u>4.2.4 Analisi dei parametri strutturali nelle 3 tipologie di substrato.....</u>	<u>58</u>
<u>4.2.5 Analisi dei parametri strutturali nelle 3 popolazioni identificate.....</u>	<u>60</u>

4.3_Studio del limite inferiore delle praterie.....	63
4.4_Analisi della produzione primaria tramite metodo lepidocronologico e dati fenologici.....	67
4.4.1 Campionamento di Maggio 2013.....	67
4.4.2 Campionamento di Novembre 2014.....	78
4.5_Analisi delle dinamiche fotosintetiche.....	87
4.6_Contenuto di clorofilla a e b in <i>Posidonia oceanica</i>.....	93
4.7_Variazione giornaliera dei parametri fotosintetici.....	94
4.7.1 Stazione fissa H24 (11-12 Dicembre 2014).....	94
4.7.2 Stazione fissa H24 (11-12 Giugno 2015).....	101
4.8_Valori di produzione ottenuti tramite modello matematico (senza considerare la variazione all'interno delle 24 ore).....	107
4.9_Valori di produzione ottenuti tramite modello matematico (considerando la variazione all'interno delle 24 ore).....	108
4.10_Confronto tra valori di produzione primaria ottenuti tramite analisi lepidocronologiche e tramite modello matematico.....	110
5_DISCUSSIONE.....	113
6_CONCLUSIONI.....	118
<i>Ringraziamenti</i>	121
Bibliografia.....	123

PREMESSA

Le diverse specie di fanerogame marine ricoprono una superficie pari a 0.1,0.2 % dei fondali marini globali (l'1-2% dell'intero piano infralitorale), sono distribuite in tutto il mondo, (ad eccezione dell'Antartide) e rappresentano uno degli ecosistemi bentonici più produttivi della zona costiera (Gera, 2005).

Negli ultimi decenni la scienza si è occupata intensamente dello studio delle fanerogame marine, della loro importanza ecologica e dei processi fotosintetici ad esse legati. Per quanto riguarda il Mar Mediterraneo, una specie molto studiata e utilizzata come bio-indicatore è la *Posidonia oceanica* (Augier, 1985; Pergent, 1991; Pergent et al., 1995), con interesse particolare alla ricerca delle cause dell' arretramento del suo limite inferiore (Leriche *et al.*, 2005). Molte ricerche recenti sono quindi indirizzate alla comprensione delle dinamiche di produzione e fotosintesi di questa pianta e all'evoluzione di approcci e metodi che ne limitino il più possibile il prelievo distruttivo.

Lo sviluppo delle attività umane ha portato ad un repentino aumento della CO₂ (e di altri gas nell'atmosfera come vapore acqueo, clorofluorocarburi, ossido di azoto e metano), che ha determinato un effetto sul clima. I gas serra, trattenendo la radiazione infrarossa riemessa dal pianeta permettono ad esso di non perdere tutto il calore proveniente dalla radiazione solare. La variazione stagionale del clima è una caratteristica fondamentale per il corretto svolgimento di tutti i processi legati alla presenza della vita sul nostro pianeta e questi squilibri hanno effetti sugli ecosistemi e sulla loro produttività (Stefani, 2014).

La produzione primaria (PP) operata dalle fanerogame marine, ovvero il tasso di carbonio assimilato attraverso i processi fotoautotrofi, svolge un ruolo chiave nei sistemi costieri ed è per questo che le ricerche ecologiche si concentrano molto sulla sua determinazione. Recenti sviluppi in questo senso si sono avuti grazie alla tecnica della fluorimetria PAM (Pulse Amplitude Modulation), condotta con strumenti di laboratorio che permettono di effettuare misure dei parametri fotosintetici, basate sulla fluorescenza della clorofilla. Tale tecnica, applicata nel presente studio, ha permesso la formulazione della prima versione di un modello matematico che

condurre alla stima della produzione primaria della *Posidonia oceanica* a partire dai parametri forniti tramite PAM, dal contenuto di clorofilla misurato con metodo spettrofotometrico e dall'analisi dei parametri fisici che influenzano “il sistema prateria”. (I dati finali sono poi confrontati con i valori di produzione primaria ottenuti tramite un'altra tecnica di laboratorio, detta lepidocronologia, e con la bibliografia).

I risultati ottenuti dalla caratterizzazione quali-quantitativa delle praterie comprese nell'area di studio, i risultati genetici ed infine quelli ottenuti tramite i due metodi della tecnica lepidocronologica e fluorimetrica, oltre a fornire una dettagliata descrizione dello stato ecologico della specie studiata, suggeriscono nuovi approcci di indagine delle praterie e forniscono le basi per un innovativo modello matematico di stima della produzione primaria.

1_INTRODUZIONE

1.1_Ruolo delle praterie di *Posidonia oceanica* nei sistemi costieri mediterranei

La *Posidonia oceanica* è una pianta fanerogama endemica del Mar Mediterraneo (Procaccini *et al.*, 2007), appartenente alla famiglia delle Posidoniaceae (Angiosperme Monocotiledoni), in grado di formare vere e proprie praterie sottomarine e di costituire una “comunità climax”, che rappresenta il grado più elevato di sviluppo e di complessità di un ecosistema (Bianchi *et al.*, 1989). Nell'intero Mar Mediterraneo è stata stimata una copertura di 37000 km², equivalente all'1-2% dell'intera superficie del piano infralitorale (Boudouresque *et al.*, 2006). Le praterie costituite da fanerogame marine sono quindi annoverate tra gli ecosistemi marini costieri più importanti, sia per la loro ecologia, che per la grande biodiversità ad essi associata (Boudouresque *et al.*, 2013). Infatti, la *Posidonia oceanica*, oltre ad effettuare fotosintesi e favorire l'ossigenazione delle acque costiere (ogni metro² di prateria produce da 4 a 20 litri di ossigeno al giorno), (Boudouresque e Meinesz, 1982), svolge una funzione ecologica fondamentale nel sistema marino poichè costituisce un grande quantità di biomassa. Sono stati stimati valori medi di biomassa pari a 40000 Kg/ha per una prateria in buone condizioni (Boudouresque e Meinesz, 1982), ed è stato calcolato che ogni anno un metro quadro di prateria con 1000 fasci fogliari produce fino a 3 kg in peso secco di tessuto fogliare e 100 g di rizoma, pari a 31 tonnellate per ettaro (Dolce, 2010).

Le praterie sono inoltre importanti siti di fissazione biologica del carbonio ed alimentano direttamente o indirettamente sia gli erbivori, che costituiscono il primo anello dei consumatori nella “catena del pascolo”, sia i detritivori, che sono i consumatori di primo livello nella “catena del detrito”. Queste due catene formano reti molto complesse, che si sovrappongono in un insieme di relazioni trofiche nelle quali sono coinvolti organismi della prateria e delle biocenosi limitrofe, con le quali avviene un continuo scambio di sostanza organica (Dolce, 2010). Oltre a questo, la prateria offre superfici diversificate ed ottimali per la colonizzazione da parte di organismi epifiti (lamina fogliare, base dei fasci e rizomi), assumendo sia la funzione di supporto fisico e trofico per le comunità animali e vegetali associate, che il ruolo di *nursery* ed habitat permanente per numerose specie (Mazzella *et al.*, 1995). Le praterie sono strutture altamente sensibili alle variazioni ambientali e possiedono una serie di caratteristiche (l'elevata longevità, l'ampia distribuzione in tutto il Mediterraneo, la capacità di accumulare metalli pesanti, le risposte alle variazioni fisiche) che costituiscono i

requisiti essenziali per considerarle come indicatori biologici. Rappresentano, in sintesi, degli utilissimi descrittori della qualità delle acque litorali (Augier, 1985; Pergent, 1991; Pergent *et al.*, 1995). La *Posidonia oceanica* è quindi un buon bio-indicatore (Augier, 1985; Pergent, 1991; Pergent-Martini e Pergent, 2000; Pergent-Martini *et al.*, 2005), per tre motivi principali: l'elevata sensibilità ai disturbi, come dimostrato dalla regressione delle praterie in risposta a cause di varia natura (Delgado *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2001; Ruiz e Romero, 2003); la sua ampia distribuzione lungo le coste mediterranee (Pasqualini *et al.*, 1998; Procaccini *et al.*, 2003) e la buona conoscenza delle risposte della pianta a specifiche variazioni ambientali (Romero *et al.*, 2005).

In termini fisici la *Posidonia oceanica* gioca un ruolo fondamentale nella protezione delle coste dall'erosione operata dal mare (Jeudy de Grissac e Boudouresque, 1985), non solo grazie alle dense strutture che è in grado di costruire nella cosiddetta zona fotica, ma anche formando *banquettes* (terrazzamenti creati dall'accumulo, a riva, di foglie e rizomi morti della pianta), che fungono da barriere naturali contro i movimenti delle masse d'acqua che incidono sulla costa (De Falco *et al.*, 2006). La presenza di praterie nella fascia costiera favorisce anche l'incremento del rateo di sedimentazione, producendo un rallentamento delle masse d'acqua e favorendo la deposizione del particolato sospeso; inoltre le piante, intrappolando sabbia, detriti e sostanza organica vegetale tra le loro radici, creano una struttura, detta *matte*, che contribuisce al consolidamento dei fondali (Borg, 2006).

Alla luce di quanto affermato, è facile comprendere lo stretto legame tra la funzione ecologica di questa specie e il suo corrispettivo valore economico; è stato infatti calcolato che il sistema “posidonieto” (*Posidonietum oceanicae* FUNK) abbia un valore, in termini economici, circa dieci volte superiore ad un sistema di foresta tropicale e circa tre rispetto ad una barriera corallina (Costanza *et al.*, 1997). La coesistenza di numerose attività urbane e commerciali lungo le coste ha distrutto la stabilità degli ecosistemi litorali (UNEP, 2006); la crescente regressione delle praterie, registrata negli ultimi decenni, fornisce un ottimo esempio di questo fenomeno (Leriche *et al.*, 2005). Le cause di questo declino sono state attribuite a diversi fattori, come l'aumento globale della temperatura (Blanc e Jeudy de Grissac, 1984; Bourcier, 1989), i numerosi disturbi antropici, rappresentati soprattutto dalla costruzione di opere costiere (Nybakken, 2001), la pesca a strascico, l'inquinamento e l'eutrofizzazione (Burkholder *et al.*, 2007), l'acquacultura (Pergent-Martini *et al.*, 2006; Apostolaki *et al.*, 2009) e gli ancoraggi (Montefalcone *et al.*, 2008). Un crescente numero di studi riporta questa perdita di

biomassa in molti paesi, con un declino globale del 2-5% (Rotini *et al.*, 2013).

1.2_ Il limite inferiore delle praterie di *Posidonia oceanica*

Uno strumento utile per monitorare a livello spaziale e temporale la dinamica delle praterie è il monitoraggio dei limiti: il limite superiore è la batimetria più superficiale (anche 0 m per praterie affioranti) alla quale inizia la prateria e il limite inferiore (fino, al massimo, a 40-50 m circa) quella più profonda alla quale essa si spinge. Generalmente si sottopone a monitoraggio il limite inferiore della prateria, il quale, essendo ecologicamente più fragile di quello superiore, testimonia sinteticamente la dinamica dell'intera prateria e l'evoluzione del suo stato di salute (APAT-ICRAM-SIBM, 2003). Sono state definite 4 diverse tipologie di limite inferiore (Pergent *et al.*, 1995):

- 1- limite progressivo: caratterizzato da un'alta percentuale di rizomi plagiotropi, disposti parallelamente secondo la direzione della pendenza e dalla mancanza di *matte*. In questo caso la progressione batimetrica della prateria non è influenzata dalla graduale diminuzione della luce;
- 2- limite netto: caratterizzato da una brusca interruzione della prateria, dalla presenza di rizomi, sia ortotropi che plagiotropi e dalla mancanza di *matte*; in questo caso l'intensità luminosa è un fattore limitante;
- 3- limite erosivo: caratterizzato dalla presenza di un netto gradino di *matte* esposta con prevalenza di rizomi ortotropi. L'idrodinamismo, in questo caso, sembra essere il fattore che limita l'avanzamento della prateria;
- 4- limite regressivo: caratterizzato dalla presenza di *matte* morta su cui persistono isolati ciuffi vivi. Un limite di questo tipo indica una regressione della prateria dovuta ad un aumento della torbidità.

La notevole sensibilità della pianta alle perturbazioni naturali e/o artificiali, ha spinto le autorità nazionali, europee ed internazionali ad azioni volte alla sua protezione, (Buia *et al.*, 2003).

1.3_Produzione primaria in *Posidonia oceanica*

La *Posidonia oceanica* ed i suoi epifiti giocano quindi un ruolo principale nella produzione primaria bentonica del Mar Mediterraneo (Romero, 1989). La produzione primaria nelle fanerogame marine è generalmente misurata in laboratorio, attraverso differenti metodi: la marcatura delle foglie, basata sull'incremento della biomassa (Zieman *et al.*, 1979), la determinazione della fotosintesi tramite misure di ossigeno

(Ott, 1980) e ^{14}C (McRoy e McMillan, 1977) e tramite metodo lepidocronologico. Nell'ambito di questo progetto la produzione primaria è stata stimata attraverso la tecnica lepidocronologica, poichè non limita la misura della produzione al comparto epigeo (fogliare), ma permette anche il calcolo della produzione dovuta al comparto ipogeo (rizomi), che spesso ha valori non trascurabili; inoltre non circoscrive la misura al momento del campionamento, perchè considera la pianta anche nei suoi anni passati (Pergent-Martini *et al.*, 1994).

La produzione fogliare in *Posidonia oceanica* varia mediamente da 300 a 2000 g/m²/anno (Pergent, 1991).

Come nella maggior parte degli ecosistemi basati sulle fanerogame marine, solo una piccola parte della produzione fogliare totale è consumata direttamente da macro-invertebrati (echinodermi, crostacei) e pesci (catena del pascolo); il maggior consumo avviene attraverso l'azione di crostacei, gasteropodi e microrganismi sul suolo (catena del detrito). Il flusso di materia organica segue due vie principali:

- quando la foglia cade, il lembo contribuisce ad alimentare il detrito andando incontro a decomposizione;
- la base resta invece attaccata al rizoma all'interno della *matte*, dove il processo di decadimento è più lento (Pergent-Martini, 1994).

La biomassa sepolta sotto la *matte* si decompone molto lentamente, poichè il tessuto di rizomi e lamine fogliari resiste alla putrefazione e può restare per migliaia di anni all'interno della *matte* (Boudouresque *et al.*, 1980).

1.4_Variabilità genetica delle praterie di *Posidonia oceanica*

La diversità genetica è una delle tre forme di biodiversità riconosciute dalla IUCN (International Union for Conservation of Nature) insieme alle specie e agli ecosistemi; all'interno di una prateria di *Posidonia oceanica* si trovano tutti e tre i livelli. Gli effetti del flusso genico, della deriva genetica, delle mutazioni associate alla filogeografia, alla demografia e all'isolamento, determinano la sua diversità genetica e la sua distribuzione; simultaneamente, la selezione agisce sui diversi fenotipi, determinando adattamenti ecologici attraverso cambiamenti strutturali e regolatori in alcuni geni specifici (Procaccini *et al.*, 2007). Teorie proposte nell'ambito della genetica di popolazioni affermano che le popolazioni divengono geneticamente depauperate, attraverso deriva genetica, quando isolate dalle popolazioni circostanti, (Allendorf e Luikart, 2007). E' anche per tale motivo che queste piante sono altamente sensibili alla degradazione

ambientale locale, intesa come cambiamento dell'idrodinamismo, della salinità, della temperatura e della penetrazione della luce (Procaccini *et al.*, 2007). I cambiamenti fisiologici che avvengono in risposta ai fattori di stress ai quali la pianta è sottoposta, sono evidenti a livello genetico (Micheli *et al.*, 2010a).

1.5_Aspetti normativi

La gestione delle praterie di *Posidonia oceanica* è una priorità crescente, alla luce del ruolo fondamentale che essa svolge dal punto di vista ecologico, sedimentario ed economico (Kuo e Kirkman, 1996; Leriche *et al.*, 2005). Le misure di conservazione più dirette sono quelle rivolte alla salvaguardia dell'habitat (Dolce, 2010).

P. oceanica è stata inclusa nel 1990 nella Lista Rossa delle specie marine del Mar Mediterraneo a rischio di estinzione, (Boudouresque *et al.*, 1990); è citata nell'Annesso I (specie rigorosamente protette) della Convenzione di Berna e nell'Annesso II (specie minacciate) del Protocollo delle Aree Specialmente Protette della Convenzione di Barcellona; inoltre, nel "Piano d'Azione per la conservazione della vegetazione marina in Mediterraneo", adottato dai paesi mediterranei nell'ambito della Convenzione di Barcellona (1999), le nazioni aderenti si sono impegnate a condurre mappature e monitoraggi delle praterie di *P. oceanica* presenti lungo le loro coste. Le praterie di *P. oceanica* sono inserite anche tra gli habitat prioritari nell'Allegato I della Direttiva EC 92/43/EEC del 21 maggio 1992 relativa alla Conservazione degli Habitat Naturali e della Fauna e della Flora Selvatiche. In Italia il D.P.R. 357/97 recepisce la Direttiva Habitat 92/43/CE e prevede che le Regioni individuino i siti di interesse comunitario ed effettuino una valutazione periodica per proporre al Ministero dell'Ambiente una lista dei siti sempre aggiornata: i SIC marini individuati rappresentano fondali colonizzati da praterie di *Posidonia oceanica*.

L'Allegato V della Direttiva Quadro per le Acque (WFD) 2000/60/EC dichiara che le fanerogame marine sono da considerarsi gli elementi biologici di qualità che devono essere usati negli studi di monitoraggio ambientale per definire lo stato ecologico delle acque costiere, poiché sono altamente sensibili ai disturbi antropici.

2_OBIETTIVI DEL LAVORO

In questo studio le praterie prese in esame e i loro corrispettivi limiti inferiori sono caratterizzati dal punto di vista spaziale e temporale e valutati in termini di produzione, genetica e dinamiche fotosintetiche.

Uno degli obiettivi principali di questo progetto è quello di quantificare la produzione primaria delle praterie di *Posidonia oceanica* nel tratto di costa tra Tarquinia Lido e Santa Severa (Lazio, Italia), per ottenere informazioni sul loro stato di salute e sulla loro distribuzione, in base ai principali parametri abiotici e per conoscere le loro risposte agli impatti naturali ed antropici che insistono su queste coste. Al fine di migliorare le misure di gestione, è necessario lo studio delle dinamiche delle praterie, soprattutto in relazione alla presenza di impatti dovuti alle attività antropiche (Leriche *et al.*, 2005).

Un altro importante obiettivo è la modifica e l'applicazione del modello matematico Phyto-VFP (Marcelli *et al.*, 1997), il quale permette di stimare il valore di produzione primaria a partire da altri parametri, sia ambientali (dati meteo e PAR_z), che biologici (tasso di trasporto elettronico, contenuto di clorofilla, efficienza fotosintetica).

Il calcolo dei valori di produzione primaria attraverso due tecniche differenti (lepidocronologia e PAM), permette un confronto metodologico e un riscontro sulle effettive dinamiche fotosintetiche delle praterie. Calcolare la produzione primaria attraverso il metodo della lepidocronologia e il metodo di misura dell'efficienza fotosintetica tramite il fluorimetro PAM 101-102-103 (Pulse Amplitude Modulated, Heinz Walz GmbH, 1985), permette inoltre di indagare le relazioni tra la risposta della pianta alle condizioni ambientali e le condizioni ambientali stesse (ad esempio, la profondità, la tipologia di substrato o la vicinanza ad una certa fonte di impatto), (Gera *et al.*, 2012). A tale scopo, lo studio della variabilità genetica e delle variazioni intra e inter-popolazione permette di approfondire le dinamiche di popolazione di queste praterie e di arricchire la conoscenza sui fenomeni di adattamento della specie. Indagare le reazioni della pianta (in termini di produzione) alle diverse fonti di disturbo e comprenderne la base genetica e le capacità fotosintetiche, permette quindi di spiegare l'attuale distribuzione della *Posidonia oceanica* e le sue risposte in un ambiente frammentato ed eterogeneo.

Inoltre, da ormai qualche decennio, le praterie lungo le coste di molte regioni italiane stanno subendo un forte fenomeno di regressione, ampiamente indagato e studiato (Ardizzone e Pelusi, 1984; Blanc e Jeudy de Grissac, 1984; Sanchez- Lizaso *et al.* 1990; Rotini *et al.*, 2013). Ampliare la conoscenza sui meccanismi genetici, sulle dinamiche di

popolazione e sulla distribuzione della *Posidonia oceanica* in relazione ai fattori abiotici, potrà condurre alla comprensione delle principali cause di questo declino e al miglioramento dei piani di gestione e conservazione riguardanti questo importante ecosistema costiero (Lee *et al.*, 2007).

3_MATERIALI E METODI

3.1_Area di studio e metodologie di campionamento

3.1.1_Area di studio

In 350 Km di costa laziale sono presenti 19 praterie (popolazioni naturali) di *Posidonia oceanica*, in differenti condizioni, per un'area totale di 200 km² (Diviacco *et al.*, 2001).

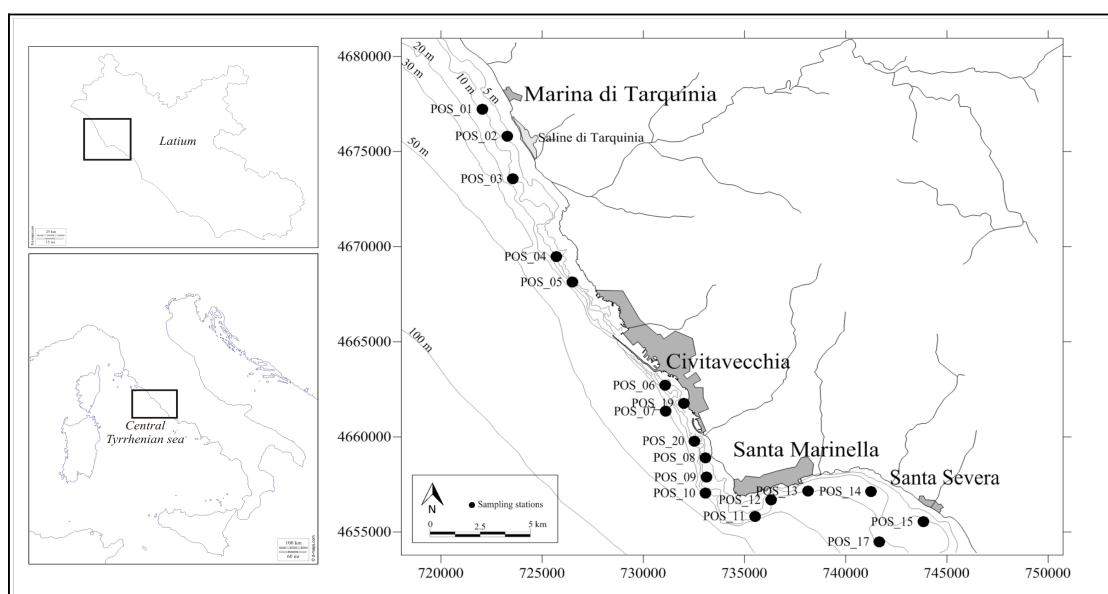


Fig.1_Piano di campionamento per la fase di caratterizzazione dell'area di studio tra Tarquinia Lido e Santa Severa (Mar Mediterraneo, Lazio, Italia).

L'area presa in esame in questo studio (Fig.1) è il tratto di costa compreso tra Tarquinia Lido e Santa Severa (Lazio, Italia), lungo circa 40 km. Sulla base degli aspetti morfologici e delle attività umane che vi insistono, questa area presenta un'elevata eterogeneità ambientale, che si riflette sulla porzione biotica degli ecosistemi (Paticchio *et al.*, 2012). I campionamenti si sono svolti a Maggio-Giugno 2013 (campagna di caratterizzazione dell'area di studio e delle praterie, analisi con il metodo dei RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) e determinazione della produzione primaria estiva, tramite lepidocronologia, in 9/18 stazioni), ad Agosto 2014 (campagna di monitoraggio del limite inferiore in 4 stazioni), a Novembre-Dicembre 2014 (campagna di misura con il fluorimetro PAM, analisi del contenuto di clorofilla e determinazione della produzione primaria invernale, tramite lepidocronologia, in 9/18 stazioni) ed infine l'11 Dicembre 2014 e l'11 Giugno 2015 (campagne giornaliere per l'analisi delle variazioni dei parametri fotosintetici nell'arco delle 24 ore).

Su ciascuna delle 18 stazioni selezionate, per la caratterizzazione delle praterie sono stati prelevati ed analizzati:

- dati di macroripartizione (densità, copertura e caratteristiche qualitative), nel 2013;
- 3 campioni vegetali per l'analisi della variabilità genetica, attraverso i RAPD, nel 2013;
- 18 campioni vegetali per le analisi fenologiche; 18 nel 2013 e 18 nel 2014;
- 12 campioni vegetali per le analisi lepidocronologiche; 12 nel 2013 e 12 nel 2014;

Su ciascuna delle 9 stazioni (selezionate tra le 18 totali) sono stati prelevati ed analizzati:

- 5 campioni vegetali per l'analisi del contenuto di clorofilla nella pianta, nel 2014;
- 2-5 campioni per l'analisi delle dinamiche fotosintetiche attraverso l'uso del PAM, nel 2014.

In Tabella 1 sono riportati i 18 siti di campionamento, con le relative coordinate geografiche, la profondità di campionamento (profondità media tra le tre sottoaree) il range batimetrico di appartenenza, la tipologia di substrato e la “popolazione” di riferimento (risultato dalle analisi genetiche, di cui si discuterà nel capitolo “Risultati”).

Codice stazione	Latitudine	Longitudine	Profondità (m)	Range batimetrico (m)	Tipologia di substrato	Popolazione di appartenenza
POS_01	42.217036997	11.690363799	9.97	9-12	RS	N
POS_02	42.204033853	11.704386751	9.5	9-12	SM	N
POS_03	42.179982407	11.710420885	13.35	13-16	RS	N
POS_04	42.146667261	11.727673300	10.27	9-12	R	N
POS_05	42.134598992	11.740421527	5	5-8	R	N
POS_06	42.084705818	11.793675214	5	5-8	R	C
POS_07	42.070858311	11.801782521	12	9-12	R	C
POS_08	42.049781412	11.816060439	10.30	9-12	R	C
POS_09	42.039922844	11.816400393	11	9-12	R	C
POS_10	42.034483629	11.816400393	14.80	13-16	RS	C
POS_11	42.021055595	11.844786252	10.93	9-12	R	S
POS_12	42.028364506	11.854644818	10	9-12	RS	S
POS_13	42.032443904	11.876741577	13.03	13-16	SM	S
POS_14	42.029724323	11.912946329	13.20	13-16	SM	S
POS_15	42.015956334	11.944901655	9.37	9-12	SM	S
POS_17	42.006729922	11.916852647	13.40	13-16	RS	S
POS_19	42.080245497	11.797316309	7.50	5-8	SM	C
POS_20	42.055544329	11.812754616	10	9-12	R	C

Tab.1_Principali fattori abiotici relativi a ciascuna stazione: coordinate geografiche (sferiche, gradi decimali), profondità, range batimetrico di appartenenza, tipologia di substrato e settore geografico rispetto al porto di Civitavecchia (che si trova nella zona centrale dell'area di studio). Le 18 stazioni, riportate in ordine numerico, si trovano a profondità comprese tra 5 e 16 metri, su substrati sabbiosi, rocciosi o misti a *matte*, e a diverse distanze da sorgenti di impatto naturale (foci dei fiumi) o antropiche (porti, centrali, impianto di acquacultura). Sono state quindi suddivise a seconda delle categorie di appartenenza a: un determinato range batimetrico (5-8 m; 9-12 m; 13-16 m), una tipologia di substrato (roccia=R; roccia con catini sabbiosi=RS; sabbia e *matte*=SM) ed un settore geografico di appartenenza (nord centro e sud), scelto sulla base delle analisi genetiche.

3.1.2 Metodo di campionamento

La densità delle praterie (numero di fasci fogliari al m²) è stata stimata usando un quadrato di dimensioni 40x40cm (Fig.2). Dopo aver contato tutti i fasci fogliari che ricadono all'interno del quadrato, si rapporta il valore al m².

La percentuale di ricoprimento è stata stimata usando un quadrato di 1x1m, suddiviso a sua volta in 16 sub-quadrati, e contando il numero dei sub-quadrati all'interno dei quali si osserva la presenza della *P. oceanica*; i sedicesimi si convertono poi in decimi o in percentuale (Fig.3).

Per il campionamento è stato utilizzato il metodo APAT-ICRAM (Buia *et al.*, 2003): la coordinata del sito di campionamento rappresenta il centro di un'area di 20x20m (400 m²), nella quale si identificano 3 sottoaree (A,B,C), alla distanza di 10 m l'una dall'altra (ove possibile). In ciascuna sottoarea sono state eseguite: 3 misure di densità assoluta, 3 misure di copertura, 10 prelievi di fasci fogliari (6 per la fenologia e 4 per la lepidocronologia) e riportate le stime qualitative (presenza di macroalghe, tipologia del substrato, profondità, presenza di oggetti di origine antropica). Per le misure di copertura, si effettua un rilievo fotografico al quadrato 1x1m, adagiato sul fondo; in laboratorio si effettua quindi la conta dei subquadrati con presenza di *Posidonia oceanica*.

La fase di caratterizzazione, effettuata nel periodo di Maggio-Giugno 2013, ha messo in evidenza l'ampia eterogeneità ambientale presente nell'area di studio, sia dal punto di vista geo-morfologico, che per quanto riguarda la conseguente distribuzione delle praterie di *Posidonia oceanica*. Per avere una descrizione completa dell'area di studio, a questi aspetti va sommato l'elevato numero di sorgenti di disturbo presenti in questo tratto di costa: gli impatti di origine naturale sono rappresentati principalmente dalle foci fluviali (Mignone, Marangone, Rio Fiume e Marta) mentre gli impatti di natura antropica sono rappresentati da porti (Santa Marinella, Riva di Traiano, Civitavecchia), centrali elettriche (Enel e Tirreno Power) e un impianto di acquacultura. In questa prima fase del progetto è stata effettuata una caratterizzazione dell'intera area di studio, in 18 stazioni, distribuite tra Marina di Tarquinia e Santa Severa. Sono stati stimati i principali parametri descrittivi delle praterie prese in esame (densità e copertura) e compiute analisi fenologiche e lepidocronologiche sui campioni prelevati (rispettivamente, su 324 e 216 fasci fogliari). Su tutte le stazioni è stata inoltre indagata la variabilità genetica tramite la tecnica dei RAPD (Rotini *et al.*, 2013) e su 9 delle 18 stazioni sono state stimate la produzione epigea ed ipogea attraverso la tecnica analitica della lepidocronologia (Pergent *et al.*, 1994).

Ciò ha permesso di ottenere un quadro sinottico dell'area di studio e della distribuzione delle praterie, ma anche di identificare le stazioni sulle quali effettuare ulteriori approfondimenti ed indagini, soprattutto per quanto riguarda l'analisi della produzione primaria e delle dinamiche fotosintetiche. Nel corso dei mesi Novembre-Dicembre del 2014 sono infatti stati acquisiti dati aggiuntivi sulle 9 stazioni scelte.

Le 18 stazioni si trovano a profondità comprese tra 5 e 16 metri, su substrati sabbiosi, rocciosi o misti a *matte*, e a diverse distanze da sorgenti di impatto naturale (foci dei

fiumi) o antropiche (porti, centrali, impianto di acquacultura). Sono state quindi suddivise a seconda delle categorie di appartenenza a: un determinato *range* batimetrico (5-8 m; 9-12 m; 13-16 m), una tipologia di substrato (roccia=R; roccia con catini sabbiosi=RS; sabbia e *matte*=SM) e la “popolazione” di appartenenza individuata tramite RAPD (definita Nord, Centro o Sud).



Fig.2_Quadrato 40x40cm, utilizzato per la stima dei fasci fogliari al m² (densità assoluta).

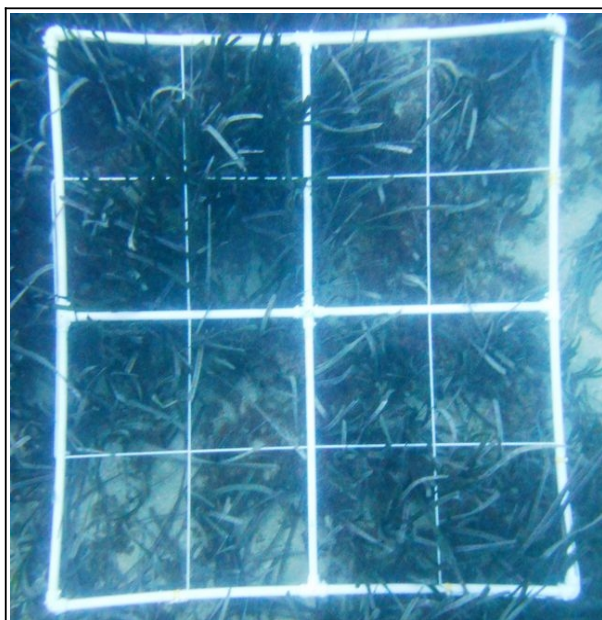


Fig.3_Quadrato 1x1m, utilizzato per la stima della copertura percentuale del fondale da parte di *P. oceanica*.

3.2_Studio delle praterie di *Posidonia oceanica*

Per quanto riguarda la trattazione dei descrittori fisici, fisiografici, strutturali e funzionali, si fa riferimento al “Manuale di metodologie di campionamento e studio del Benthos marino mediterraneo” (Gambi e Dappiano, 2003).

3.2.1 Descrittori fisici

Le proprietà dell'ambiente fisico che ospita le praterie di *Posidonia oceanica*, contribuiscono in modo diretto a determinarne la crescita. Lo studio delle praterie deve quindi comprendere l'analisi di alcune importanti caratteristiche ambientali:

- geomorfologia e profilo della costa,
- estensione batimetrica,
- geomorfologia del fondale,
- litologia e sedimentologia,
- regime idrodinamico locale.

3.2.2 Descrittori fisiografici

Le fanerogame marine possono dare luogo a differenti tipologie di praterie, principalmente a seconda delle specie caratterizzanti e delle caratteristiche fisiche del sito in cui si trovano.

Sulla base della prima tipologia, definita dalla natura del substrato sul quale si trovano le praterie, si possono distinguere: praterie su sabbia (Molinier e Picard, 1952); praterie su roccia o coralligeno (Boudouresque e Bianconi, 1986), praterie impiantate su strutture biogeniche “autocostruite”, costituite dall'intreccio di rizomi, radici e sedimento: “matte” per *Posidonia* (Molinier e Picard, 1953) e “turf” per *Cymodocea* e *Nanozostera* (Buia *et al.*, 1985).

La seconda tipologia è definita dal numero di fanerogame che compongono un sistema; la prateria si dice “pura” quando è formata da una sola specie, e “mista” quando è composta da due o più specie (Scarton *et al.*, 1995; Buia e Marzocchi, 1995).

La terza tipologia è legata alla distribuzione della pianta sul fondale: la prateria è detta “omogenea” quando la distribuzione è uniforme su tutta la sua estensione, mentre viene definita “disomogenea” quando è difforme. La seconda e la terza tipologia, se integrate, permettono di distinguere 4 categorie: pura-omogenea, pura-disomogenea, mista-omogenea, mista-disomogenea (Caniglia *et al.*, 1990).

Un quarta tipologia definisce la distribuzione della pianta in relazione alla natura del

fondo: la prateria è detta continua, discontinua e discreta, a seconda che il fondo sia, rispettivamente, completamente colonizzato dalla pianta, interrotto dalla presenza di canali o radure o, infine, se la distribuzione è a macchie.

3.2.3 Descrittori strutturali: densità e copertura

La densità della prateria indica il numero di fasci fogliari per unità di superficie. Questo parametro rappresenta uno dei descrittori più importanti ai fini della valutazione dello stato di una prateria.

Per le praterie di *P. oceanica* è stata proposta una scala di valutazione (Giraud, 1977), che permette di distinguere 6 tipi di praterie. In seguito questa classificazione è stata ridotta a 5 tipi (Pergent *et al.*, 1995), in considerazione del fatto che quando il numero dei fasci per metro quadrato è inferiore a 50, si ritiene che la densità non rispetti la condizione minima a definire una prateria (Tab.2).

Più recentemente (Pergent *et al.*, 1995; Pergent-Martini e Pergent, 1996), sulla base di dati di letteratura, è stata formulata una nuova classificazione delle praterie, in cui la densità è messa in relazione alla profondità e ad altri fattori ambientali, quali torbidità, disturbo antropico, *etc.* Si distinguono così “praterie in equilibrio”, in cui la densità è nella norma (DN) o eccezionale (DE), da “praterie disturbate” o “molto disturbate”, in cui la densità, limitata da più fattori, è bassa (DB) o anormale (Tab.3).

Tipo	Densità (fasci/m²)	Valutazione
I	>700	Prateria molto densa
II	700-400	Prateria densa
III	400-300	Prateria rada
IV	300-150	Prateria molto rada
V	150-50	Semi-prateria

Tab.2_ Classificazione delle praterie di *P. oceanica* secondo Giraud (1977), (da Pergent *et al.*, 1995, modificata).

Prateria molto disturbata		Prateria disturbata		Prateria in equilibrio			
Prof (m)	DA		DB		DN		DE
1	<	822	◇	934	◇	1158	>
2	<	646	◇	758	◇	982	>
3	<	543	◇	655	◇	879	>
4	<	470	◇	582	◇	806	>
5	<	413	◇	525	◇	749	>
6	<	367	◇	479	◇	703	>
7	<	327	◇	439	◇	663	>
8	<	294	◇	406	◇	630	>
9	<	264	◇	376	◇	600	>
10	<	237	◇	34	◇	573	>
11	<	213	◇	325	◇	549	>
12	<	191	◇	303	◇	527	>
13	<	170	◇	282	◇	506	>
14	<	151	◇	263	◇	487	>
15	<	134	◇	246	◇	470	>
16	<	117	◇	229	◇	453	>
17	<	102	◇	214	◇	438	>
18	<	88	◇	200	◇	424	>
19	<	74	◇	186	◇	410	>
20	<	61	◇	173	◇	397	>
21	<	48	◇	160	◇	384	>
22	<	37	◇	149	◇	373	>
23	<	25	◇	137	◇	361	>
24	<	14	◇	126	◇	350	>
25	<	4	◇	116	◇	340	>
26			◇	106	◇	330	>
27			◇	96	◇	320	>
28			◇	87	◇	311	>
29			◇	78	◇	302	>
30			◇	70	◇	294	>
31			◇	61	◇	285	>
32			◇	53	◇	277	>
33			◇	46	◇	270	>
34			◇	38	◇	262	>
35			◇	31	◇	255	>
36			◇	23	◇	247	>
37			◇	16	◇	240	>
38			◇	10	◇	234	>
39			◇	3	◇	227	>
40			◇		◇	221	>

Tab.3_ Classificazione delle praterie di *P. oceanica* secondo Pergent *et al.*,(1995, modificata).

Un' ulteriore parametro che integra le stime di densità per completare la descrizione strutturale di una prateria è rappresentato dalla copertura, espressa in percentuale di fondale ricoperto dalle piante rispetto al substrato totale, costituito da sabbia, roccia o *matte*.

3.2.4 Descrittori funzionali: fenologia e biomassa

Il singolo fascio fogliare rappresenta l'unità funzionale più utile per descrivere una prateria. Le variazioni nella biometria dei fasci fogliari sono frequentemente analizzate a questo fine.

In generale, la struttura dei fasci è caratterizzata dalla disposizione distica ed alterna delle foglie, con quelle più giovani al centro e quelle più vecchie all'esterno. Seguendo la classificazione di Giraud (1977) per *P. oceanica*, si distinguono 3 diverse categorie di foglie (o ranghi fogliari):

- foglie giovanili di lunghezza inferiore a 5 cm, senza base;
- foglie intermedie di lunghezza superiore a 5 cm, senza base;
- foglie adulte di lunghezza superiore a 5 cm, con base.

La linea di demarcazione tra base e lembo prende il nome di “ligula”. Solamente in *P. oceanica*, tra le fanerogame mediterranee, la base persiste sul rizoma per molti anni dopo la caduta del lembo fogliare e prende il nome di “scaglia”.

3.2.5 Descrittori funzionali: produzione e produttività

Con “produzione” si intende il tasso dell'incremento di quantità (espressa in peso, lunghezza o superficie), quindi la velocità con cui l'incremento avviene nel tempo. La crescita delle fanerogame marine dipende dalla quantità e dalla qualità della luce disponibile per i processi fotosintetici (Zieman e Wetzel, 1980; Lee *et al.*, 2007). Per “produttività” si intende il rapporto tra la produzione (riferita all'unità di tempo) e l'abbondanza al tempo iniziale (turnover rate), (Buia *et al.*, 2003). Le fanerogame marine contribuiscono significativamente alla produttività delle aree costiere in acque sia temperate che tropicali (Phillips e McRoy, 1980). La produttività, in *Posidonia oceanica* come nelle altre fanerogame marine, è principalmente regolata dalla quantità di luce che penetra nella colonna d'acqua, dalla temperatura e dalla disponibilità di nutrienti (Denninson *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2007). I tassi fotosintetici, la crescita, la sopravvivenza e la distribuzione ad una data profondità sono variabili e direttamente connessi all'irradianza (Cabello-Pasini *et al.*, 2003). La regressione globale delle praterie di fanerogame è causata principalmente dalla ridotta penetrazione della luce (Short and Wyllie-Echeverria, 1996; Lee *et al.*, 2007), la quale può essere attribuita ad accumuli di epifiti ed alghe planctoniche dovute ad eccessi di nutrienti o a variazioni del rateo sedimentario e risospensione dei sedimenti (Onuf, 1994; Lee *et al.*, 2007).

Un metodo diretto per stimare la produzione primaria netta in *Thalassia testudinum* (poi esteso alle fanerogame marine) è stato proposto da Zieman (1974); il principio di base è la marcatura delle foglie al di sopra del meristema basale e lo studio dello spostamento del marcatore nel tempo (Buia *et al.*, 2003). Questo metodo, però, non tiene conto né dell'allungamento basale delle foglie, né delle loro variazioni di larghezza e di spessore, fattori che non possono essere trascurati (Dolce, 2010). I metodi proposti da Ott, (1980) e da Mc Roy, (1974) si basano sulla misura dei prodotti fotosintetici della pianta. L'analisi della concentrazione di diossido di carbonio (CO²) o di ossigeno (O²) nell'acqua di mare o l'introduzione di carbonio marcato (metodo del C¹⁴), però, non misurano realmente la produzione, ma forniscono solo i valori dei tassi di fotosintesi e spesso includono anche la produzione degli epifiti, (Dolce, 2010). La tecnica lepidocronologica per la stima della produzione primaria considera l'intera pianta e presenta il vantaggio di stimare non solo la produzione annuale, ma anche quella passata, oltre ad avere il vantaggio ulteriore di essere veloce ed applicabile a piante di qualsiasi profondità (Pergent *et al.*, 1989; Pergent-Martini e Pergent, 1994).

3.2.6 Indagini genetiche: protocollo di estrazione e metodo dei RAPD

Le analisi genetiche sono state condotte su 3-5 fasci fogliari per ciascuna delle 18 stazioni di campionamento esaminate a Maggio-Giugno 2013. In accordo con Micheli *et al.*, (2005), dopo le misure fenologiche, le foglie più giovani delle piante sono state lavate in acqua distillata, conservate in azoto liquido e lasciate a -80°C. Il DNA è stato estratto e poi amplificato con Taq Polimerasi e la PCR è stata effettuata tramite l'uso di 10 diversi primer (Tab.4).

L'estrazione del DNA è stata effettuata tramite il protocollo suggerito da Della Porta *et al.*, (1983).

Il tessuto fogliare si conserva in azoto liquido. Al momento dell'estrazione si preleva il tessuto e si tritura finemente con un pestello, per rimetterlo in 30 ml di azoto liquido in un Oak. Si aggiungono 15 ml di EB1 (Extraction Buffer= 100 mM tris pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM di mercaptoetanol). Successivamente si aggiunge 1.0 ml di SDS al 20%, si miscela efficacemente e si incuba in tubi a 65°C per 10 min. Si procede con l'aggiunta di acetato di potassio, si miscela e si incuba a 0°C per 20 min. Molte proteine e polisaccaridi vengono rimossi per precipitazione come un complesso insolubile con il potassio dodecil solfato. Si ripone in centrifuga a 25000 rpm per 25 minuti. Si sposta il sovrantante in tubi da 30 ml contenenti 10 ml di isopropanolo. Si

miscela nuovamente e si incuba a -20°C per 60 minuti. Il pellet di DNA si inserisce in centrifuga per 15 minuti a 20000 rpm. Si rimuove gentilmente il sovrnatante e si asciugano i pellet, invertendo le provette su carta assorbente sterile per 10 minuti.

Si dissolvono i pellet in EB2 (0.7 ml di Tris, 10 mM di EDTA), si trasferisce la soluzione in una Eppendorf. Si centrifuga a 10000 rpm per rimuovere il detrito insolubile e si trasferisce il sovrnatante in una nuova Eppendorf, nella quale si aggiungono 75 μ l di acetato di sodio 3M e 500 μ l di isopropanolo. Si miscela e poi si fa coagulare il pellet in centrifuga per 60 secondi. Si lava poi il pellet con etanolo 80%, si asciuga e si ridissolve in EB3 (100 μ l di Tris 10 mM, 1 mM di EDTA pH 8).

I prodotti di amplificazione vengono separati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio (1.4%), colorati con bromuro di etidio, visualizzati con lampada UV e fotografati. Quindi si verifica e registra la presenza/assenza delle bande.

In Tabella 4 sono riportati i 10 primer utilizzati per l'analisi con i RAPD.

PRIMER	SEQUENZA	RANGE DI AMPLIFICAZIONE
BY11	5'-ATCCACTGCA-3'	0.3 – 2.4 kb
BY12	5'-GGTCGCAGGC-3'	0.3 – 3.8 kb
BY13	5'-CCTTGACGCA-3'	0.5 – 3.8 kb
BY15	5'-CTCACCGTCC-3'	0.73 – 2.8 kb
DN4	5'-GTCGTGCTAT-3'	0.5 – 2.4 kb
DN5	5'-CCGACGGCAA-3'	0.3 – 1.75 kb
DN6	5'-TGGACCGGTG-3'	0.5 – 3.0 kb
UB24	5'-GGGTGAACCG-3'	0.75 – 2.25 kb
UB26	5'-CGCCCCCAGT-3'	0.73 – 2.75 kb
UB28	5'-GCTGGGCCGA-3'	0.5 – 1.85 kb

Tab.4_Primer utilizzati per l'indagine genetica tramite RAPD.

3.3_Studio del limite inferiore delle praterie

Si utilizza come metodo il protocollo adottato dal *Reseau de Surveillance Posidonies* (Bertrand *et al.*, 1986). Questo protocollo prevede l'uso di corpi morti (*balises*) da collocare sul fondo (APAT-ICRAM, 2001-2003).

Ciascun corpo morto è munito di un anello centrale per l'installazione di un galleggiante

che riporta il relativo codice identificativo e la data di impianto.

In ciascun sito vengono installati i corpi morti, secondo la procedura di seguito descritta:

- identificazione del limite inferiore della prateria;
- marcatura con un picchetto del punto centrale scelto;
- posizionamento geografico del punto centrale con la migliore precisione possibile.

I corpi morti vengono disposti a 5 metri di distanza l'uno dall'altro e a stretto contatto con il limite inferiore.

Per essere individuate più facilmente nelle successive immersioni di controllo, le aste metalliche sporgono dal fondo di circa 50-60.

Le riprese fotografiche vengono effettuate a 1,5 metri da ciascun corpo morto, a valle rispetto al limite della prateria. Queste ultime sono realizzate in tre fasi, una centrata sul corpo morto e altre due rispettivamente a destra e a sinistra di questo.

Le riprese si effettuano in orizzontale, ad un'altezza di 0,5 metri rispetto al fondo con obiettivo da 35 mm.

In ogni sito, in una banda di 10 metri di larghezza a monte del limite lungo la linea dei corpi morti, vengono rilevati i seguenti dati:

- profondità;
- tipo di limite (netto, progressivo, erosivo, regressivo);
- verifica dello stato di continuità della prateria a monte del limite;
- stima del ricoprimento della prateria;
- stima della densità dei fasci fogliari;
- portamento predominante dei rizomi (% rizomi plagiotropi);
- stima della percentuale di scalzamento della prateria;
- valutazione litologica della natura del fondale a valle dei corpi morti (roccia, ghiaia, sabbia, fango);
- prelievo dei campioni di *Posidonia oceanica* per le analisi biologiche.

In corrispondenza di uno o due corpi morti si esegue poi il prelievo di sedimento per le analisi granulometriche.

Su ciascun sito vengono compiute osservazioni regolari.

Sul limite inferiore indagato, la strategia di campionamento è stata realizzata lungo un transetto orizzontale, in corrispondenza dei *balises*, (i.e. transetto di 10m).

Sono stati effettuati:

- 6 repliche per le misure di densità,

- 6 repliche di copertura,
- 6 prelievi di fasci ortotropi per le analisi fenologiche,
- 1 campione di sedimento per le analisi granulometriche.

Le repliche sono casuali lungo il transetto e distanziate tra loro minimo 1m. Vengono anche in questo caso valutate: la percentuale di ricoprimento della *P. oceanica*, il tipo di substrato, la continuità della prateria, la percentuale di matte morta, la percentuale di *Caulerpa racemosa*, la percentuale di *Cymodocea nodosa*, lungo la totalità del transetto. Durante il monitoraggio del limite inferiore delle praterie verranno effettuate stime di densità assoluta e di copertura del substrato.

Alla luce di quanto riportato dai risultati della caratterizzazione, dagli studi preliminari presenti in bibliografia e dalla cartografia disponibile, sono stati identificati 4 siti per le attività di *balisage* (Tab.5, Fig.4).

Stazione	Località	Latitudine; Longitudine (UTM)	Profondità
PB0	“Sant'Agostino”	0724751; 4670889	~ 19.5
PB1	“La Frasca”	0725442; 4669547	~ 21m
PB2	Capo Linaro	0733056; 4657809	~ 20 m
PB3	Santa Marinella	0735966; 4656473	~ 13 m

Tab.5 _Località, Coordinate UTM e profondità dei 4 siti individuati per il monitoraggio del limite inferiore delle praterie di *Posidonia oceanica* presenti nell'area di studio.

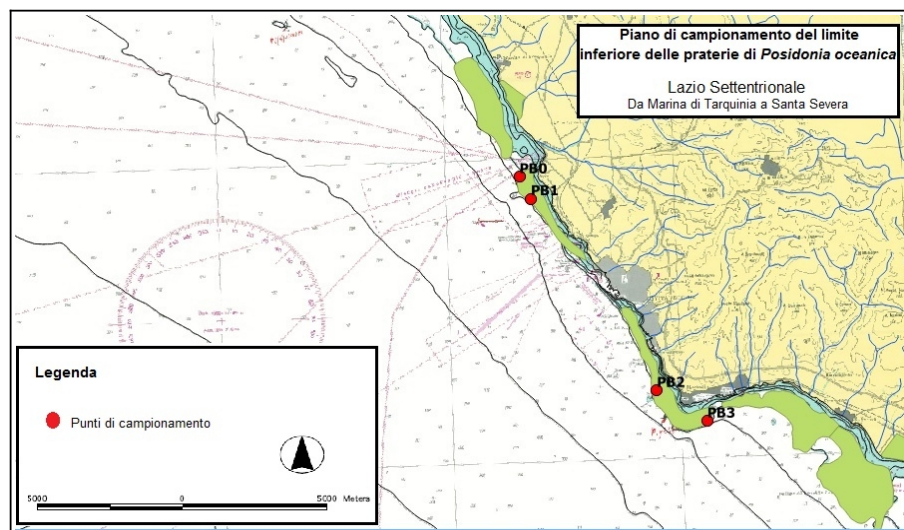


Fig. 4 _Carta rappresentante i SIC compresi nell'area di studio e le 4 stazioni esaminate.

In corrispondenza di ognuna di queste praterie, (Maggio 2014) sono stati posizionati i picchetti per il monitoraggio del limite inferiore (Agosto 2014), (Fig.5 e 6). Le coordinate dei punti di posizionamento di ciascuna asta metallica, appositamente munita di galleggiante sommerso di riconoscimento (pedagno), sono state registrate tramite GPS per l'individuazione.

Sono stati posizionati, per ciascuna stazione, 3 picchetti, a distanza di 5 m l'uno dall'altro.

Per ciascuna delle quattro grandi praterie di *Posidonia oceanica* identificate, viene controllato annualmente l'eventuale arretramento del limite inferiore mediante la tecnica del *balisage*, come previsto dal DLGS 3 aprile 2006 n° 152 e sue modifiche apportate con Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del territorio e del Mare 14 aprile 2009 n° 56, per i metodi di campionamento degli elementi di qualità biologica si fa riferimento al manuale APAT 46/2007, ai manuali ISPRA ed ICRAM per le acque marino-costiere e di transizione e alle "Metodologie Analitiche di Riferimento (Programma di Monitoraggio per il controllo dell'Ambiente marino costiero (Triennio 2001- 2003)" Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, ICRAM, Roma 2001 e successivi aggiornamenti).



Fig.5_Picchetti posti in prossimità del limite inferiore, (PB1).



Fig.6_Picchetti posti in prossimità del limite inferiore, (PB3).

Profondità limite inferiore	Valutazione
<15 m	Acque torbide
> 15 m e > 25 m	Acque poco trasparenti
> 25 m e < 35 m	Acque trasparenti
>35 m	Acque molto trasparenti

Tab.6_Scala di valutazione della trasparenza dell'acqua in funzione della profondità media del limite inferiore di *P. oceanica*.

3.4_Analisi fenologiche e lepidocronologiche per il calcolo della produzione epigea ed ipogea

3.4.1_Analisi fenologiche

Per la valutazione delle variabili fenologiche sono stati analizzati 324 campioni nel 2013 e 162 nel 2014 (18 per ciascuna stazione di campionamento).

Per questo tipo di analisi, i fasci fogliari vengono delicatamente aperti, procedendo dalla foglia più esterna a quelle più interne, alternativamente a destra e sinistra e disponendo le foglie in successione di classe decrescente sul banco di lavoro (Fig.7). Da questa prima operazione si ricava il numero di foglie, sia totale che relativo ad ogni rango fogliare (giovani, intermedie, adulte). Le misure biometriche vengono poi rilevate manualmente con un righello.

La lunghezza della base fogliare viene misurata dal suo punto di inserzione sul rizoma fino alla concavità della ligula; la lunghezza del lembo fogliare viene misurata dalla ligula o dall'inserzione sul rizoma sino all'apice; il tessuto fogliare è sua volta distinto in verde (fotosinteticamente attivo) e bruno (inattivo); si distingue inoltre l'apice integro da quello eroso per ottenere il coefficiente a (la percentuale degli apici erosi sul totale delle foglie); la larghezza della foglia viene infine misurata a circa metà lunghezza del lembo fogliare.

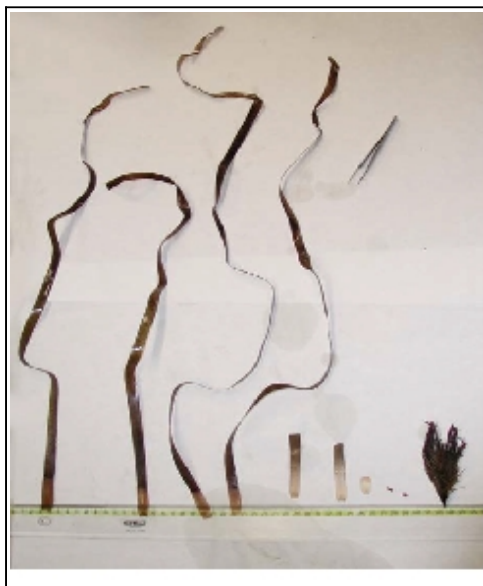


Fig.7_Suddivisione del fascio fogliare in singole foglie per le analisi fenologiche.

3.4.2 Analisi lepidocronologiche

Per le analisi lepidocronologiche sono stati analizzati 216 campioni nel 2013 e 108 nel 2014 (12 per ciascuna stazione di campionamento).

La lepidocronologia è una tecnica di retrodatazione tramite la quale è possibile ottenere importanti informazioni sulle dinamiche di crescita della pianta. E' applicabile solo alla specie *Posidonia oceanica*, perchè è l'unica fanerogama mediterranea in cui la base delle foglie persiste sul rizoma, anche quando la foglia cade (Pergent, 1990; Pergent-Martini e Pergent, 1994; Guidetti e Fabiano, 2000). Dopo la caduta della foglia, la base prende il nome di “scaglia” per distinguerla dalla base viva ed intatta delle foglie. In *P. oceanica* lo spessore delle scaglie varia ciclicamente da un minimo invernale ad un massimo estivo. Dalla scaglia identificata come minima, alla scaglia precedente alla minima successiva, si conta un “ciclo lepidocronologico”, che corrisponde ad un anno effettivo di età (Fig.8 e 9). Partendo dalla data di campionamento è possibile retrodatare il rizoma e valutare la sua produzione negli anni lepidocronologici.

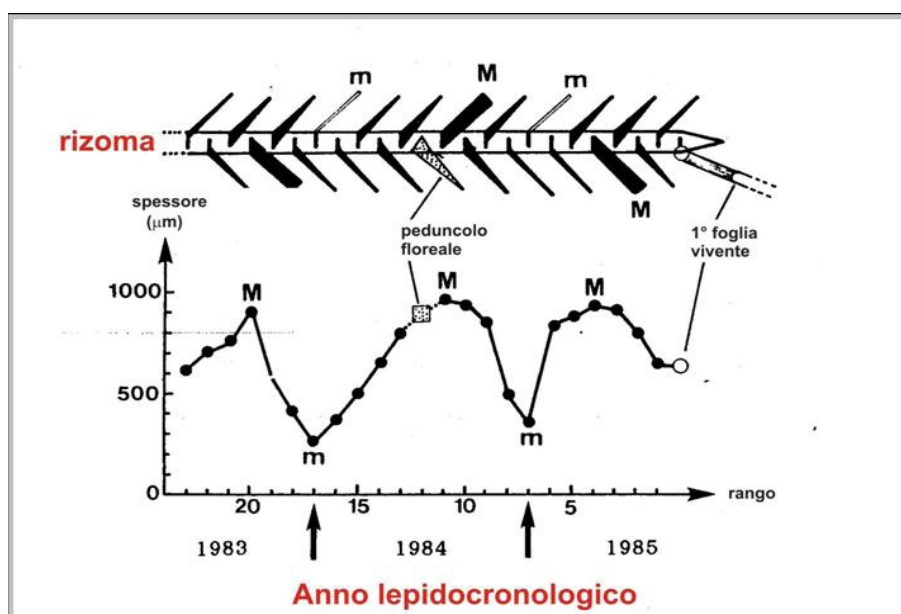


Fig.8_Schematizzazione del metodo lepidocronologico per *P. oceanica*.



Fig.9_Metodo lepidocronologico applicato in laboratorio.

3.4.3 Produzione epigea ed ipogea

Per le praterie di *Posidonia oceanica*, uno dei parametri maggiormente investigati è la produzione primaria, che permette di ottenere importanti informazioni sullo stato qualitativo della prateria stessa (Pergent, 1991; Pergent *et al.*, 1994; Guidetti e Fabiano, 2000). Attraverso l'analisi lepidocronologica è possibile stimare la produzione primaria delle piante, considerando il loro rateo di crescita negli anni passati (Pergent, 1987; Pergent *et al.*, 1989); attraverso la misura ottenuta con il PAM si ottiene invece il valore di efficienza fotosintetica relativa all'intensità della luce attinica, che viene modulata dallo strumento stesso.

Dopo aver ricavato i parametri temporali della pianta dalle analisi lepidocronologiche, si procede al calcolo della produzione fogliare.

La tecnica lepidocronologica usata per stimare la produzione primaria (Pergent, 1987; Pergent *et al.*, 1989) mostra numerosi vantaggi: considera l'intera pianta, è rapida ed applicabile ad ogni profondità (dalla superficie al limite inferiore di distribuzione della specie, circa 30-40m) e soprattutto permette la stima non solo della produzione attuale, ma anche della produzione degli anni precedenti. La presenza di correlazioni morfometriche tra la lunghezza della base fogliare e la lunghezza totale della foglia più adulta permette il calcolo della biomassa fogliare prodotta dalla pianta.

La produzione primaria per fascio fogliare (P) viene calcolata con la seguente formula:

$$P = N * L * D$$

in cui:

N = numero medio di foglie/fascio/anno, ottenuto tramite la media del numero di scaglie/ciclo,

L = lunghezza media annuale delle foglie, ottenuta tramite la correlazione tra la lunghezza media del lembo fogliare e la lunghezza media della base (si considera la foglia più adulta, con apici ancora integri),

D = densità del tessuto fogliare; densità media annua del tessuto della foglia più vecchia (mg/cm o g/m), corrispondente al rapporto tra il peso secco della foglia più adulta e la sua lunghezza. La produzione fogliare è espressa in grammi o milligrammi di peso secco/anno. Se si moltiplica il valore ottenuto per la densità media dei fasci fogliari della prateria in esame (numero di fasci fogliari/m²), la produzione ottenuta sarà in grammi o milligrammi di peso secco/m²/anno.

Nel Maggio-Giugno 2013 e nel Novembre-Dicembre 2014 sono state effettuate misure di produzione primaria tramite analisi lepidocronologiche, eseguite in laboratorio. La tecnica implica la condizione in cui la foglia più adulta presenti ancora l'apice integro. Il campionamento distruttivo dei fasci fogliari è stato randomico (campionamento casuale), di conseguenza è stato possibile effettuare il calcolo su 9 delle 18 stazioni totali (il 50%).

La produzione media del rizoma, espressa in grammi o milligrammi di peso secco/m²/anno, equivale direttamente alla media dei valori di peso secco dei segmenti di rizoma prodotti in ogni singolo ciclo lepidocronologico.

3.5_Misura delle dinamiche fotosintetiche tramite PAM (Pulse amplitude modulated)

L'assorbimento della luce da parte di una molecola di pigmento fotosintetico provoca un passaggio della molecola da uno stato iniziale ad uno stato eccitato. Dai complessi fotoattivi periferici l'energia di eccitazione passa ai complessi dei recettori dei centri di reazione, dove viene usata nelle prime reazioni fotosintetiche. Una parte delle molecole eccitate perde energia sotto forma di calore o di quanti di fluorescenza. Fluorescenza, reazioni fotochimiche ed emissione di calore competono per l'uso dell'energia assorbita dai sistemi antenna dell'apparato fotosintetico. La diminuzione di fluorescenza è detta *quenching* ed il *quencher* è la molecola di plastochinone accettrice di elettroni nella catena di trasporto plastidiale. La fluorescenza dipende dallo stato di ossidazione del *quencher*; infatti, quando il plastochinone è in forma ossidata, il centro di reazione

aperto assorbe un fotone, e poi si ossida cedendo un elettrone al *quencher*. Il centro di reazione è ora chiuso, non è più in grado di accettare elettroni, dunque l'energia in eccesso è emessa in fluorescenza (Falkowsky e Raven, 1997; Lazzara *et al.*, 2010).

L'adattamento del campione al buio, o ad una radiazione nel rosso lontano, apre tutti i centri di reazione, così è molto probabile che una luce di bassa intensità luminosa ($<1-2 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tale da non attivare i processi fotochimici (*measuring light*) determini un'emissione di fluorescenza minima, F_0 , detta fluorescenza iniziale. Per determinare un'emissione di fluorescenza massima, F_m si invia al campione un impulso saturante, ovvero una luce molto intensa ($800-1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ma di durata molto breve (circa 0.8 secondi), capace di saturare tutti i fotosistemi, senza modificare la dissipazione di energia in calore, né produrre reazioni irreversibili. La differenza tra F_m e F_0 è la fluorescenza variabile massima, detta F_v (Krause e Weis, 1991; Lazzara *et al.*, 2010).

L'efficienza fotosintetica viene calcolata come F_v/F_m e rappresenta l'efficienza potenziale massima di cattura della luce da parte del PSII; è quindi legata allo stato funzionale dell'apparato fotosintetico (Krause e Weis, 1991; Lazzara *et al.*, 2010).

Al buio una luce attinica costante (fotosinteticamente attiva e non saturante) determina un aumento immediato di fluorescenza (Kautsky e Platt, 1960; Lazzara *et al.*, 2010). Quando la luce saturante ha chiuso i centri di reazione, la fluorescenza diviene costante (F_t), per il valore corrispondente di luce attinica (Geider e Osborne, 1992; Lazzara *et al.*, 2010).

In un campione adattato alla luce, inviando un impulso saturante, la fluorescenza aumenta fino al valore massimo di F_m' per poi decadere nuovamente verso F_t (Maxwell e Johnson, 2000; Lazzara *et al.*, 2010). Il rendimento quantico di trasporto elettronico al PSII, o *yield*, è calcolato come $F_m' - F_t / F_m'$.

I fluorimetri ad impulsi modulati misurano i parametri F_0, F_m, F_t, F_m' e consentono di calcolare i parametri di fluorescenza, quindi i parametri fotosintetici. Il fluorimetro PAM-101/102/103 (Walz, Pulse Amplitude Modulation) è uno dei primi fluorimetri ad impulsi di luce modulati. Possiede un diodo (L450, L590 o L655) che emette una luce di eccitazione pulsata (*measuring light*, con frequenza da 1.6 a 100 KHz) ed un rivelatore (ED 101-US) che rileva ed amplifica, selettivamente, solo il segnale pulsato di fluorescenza. L'unità PAM-101 controlla l'intensità della *measuring light* e l'intensità, la frequenza e la durata dell'impulso saturante; rileva e amplifica il segnale di fluorescenza e lo invia all'unità digitalizzatrice PDA-100. La terminazione delle fibre ottiche convoglia la luce attinica proveniente da una sorgente esterna (illuminatore KL-1500) e la luce di

saturazione proveniente da una seconda sorgente esterna (KL-1500 o HPLC con cono di diodi). Tutte le funzioni possono essere gestite manualmente dall'unità centrale dello strumento oppure tramite controllo remoto, grazie al collegamento con il software Win-Control (Heinz Walz GmbH, 2000).

In Figura 10 è riportato lo schema di montaggio dello strumento.

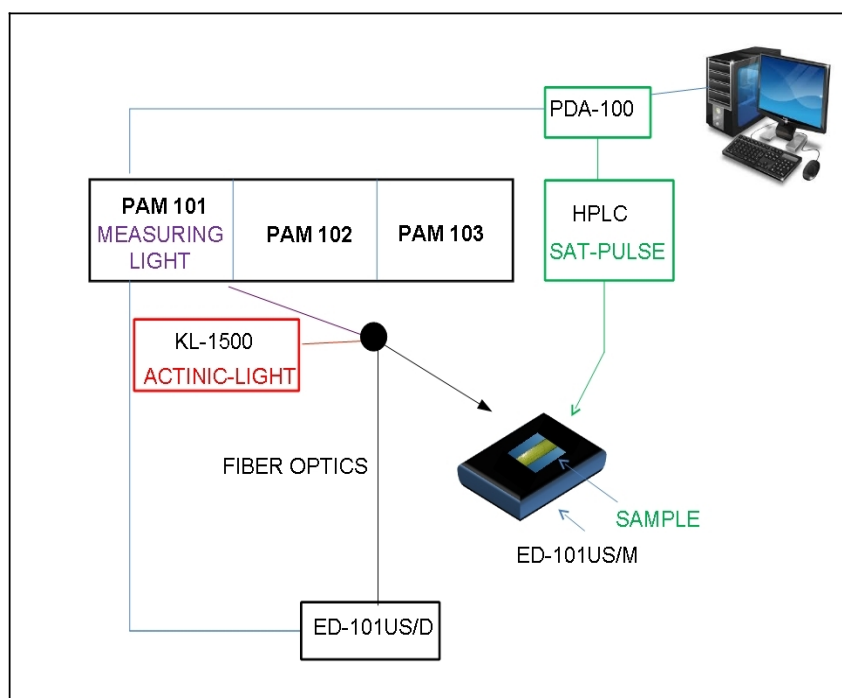


Fig.10_Schema di montaggio del PAM.

Il PDA-100 è il collegamento tra il fluorimetro e il software informatico. L'HPLC (High Power Lamp Control) controlla il cono di diodi (impulso saturante). Il KL-1500 è la sorgente di luce attinica. L'ED-101US/M è la camera in cui viene inserito il campione. L'101US/D è l'emitter-detector del segnale di luce. Le fibre ottiche inviano la luce al campione e la convogliano al detector.

Measuring e actinic light giungono al campione tramite la stessa fibra ottica, mentre la luce saturante viene pulsata attraverso un cono di diodi controllato separatamente dall'HPLC. Al detector (ED-101US/D) viene convogliata la luce dopo essere passata attraverso il campione e inviata tramite il PAM-101 al PDA-100 e al software (WinControl).

I campioni analizzati in questo studio sono stati mantenuti al buio fino al momento della misura, mai oltre gli 80 minuti dal momento del prelevamento. Infatti, come si può osservare in Figura 11, il segnale di misura dell'efficienza fotosintetica decade fortemente dopo circa 80 min dal campionamento). Per ciascuna delle 9 stazioni di indagine sono stati analizzati 5 campioni, per un totale di 45 campioni.

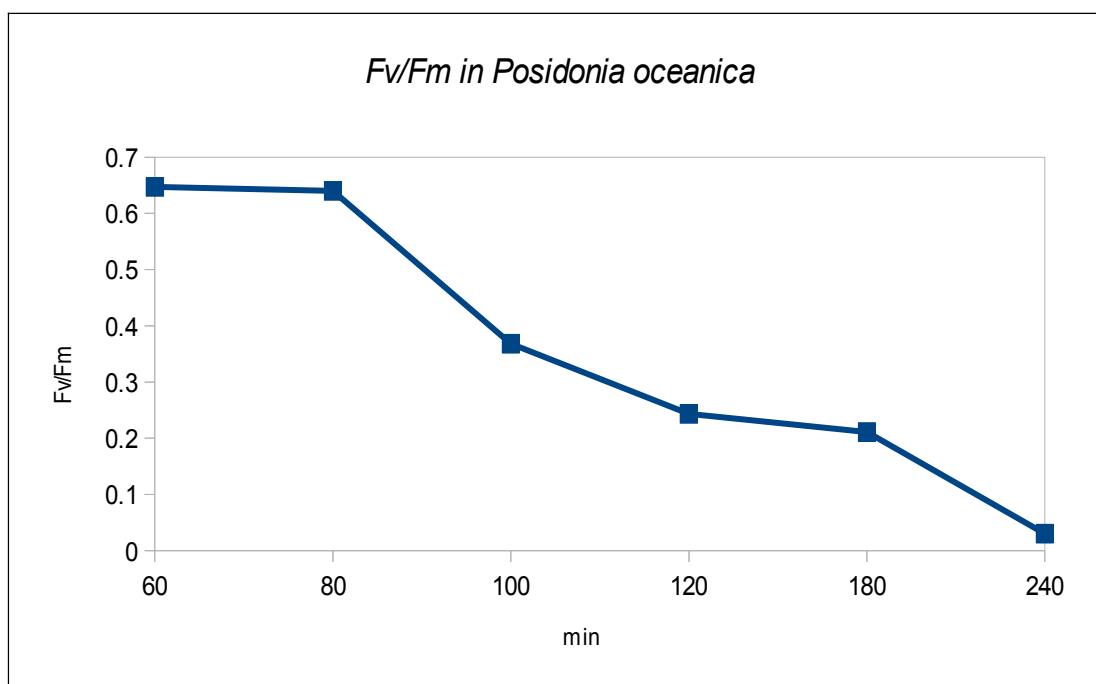


Fig.11 _Andamento del segnale di efficienza fotosintetica (F_v/F_m) lungo il tempo.

Dopo aver mantenuto al buio il campione, si avvia la *measuring light*, di intensità $<1 \mu E m^{-2} s^{-1}$. Non appena il segnale di fluorescenza istantanea (F^*) si stabilizza (entro pochi secondi), si misura l' F_0 ; viene quindi inviato il primo impulso saturante e misurata l' F_m (fluorescenza massima in un campione adattato al buio). Si sottopongono quindi i campioni a serie crescenti di intensità di luce attinica (ciascuna intensità per 180 secondi e sempre seguita da un impulso saturante) e si misurano l' F_m' (fluorescenza massima in un campione adattato alla luce), la PAR, l'ETR (la velocità di trasporto elettronico) e gli altri parametri fotosintetici e di *quenching* (diminuzione della fluorescenza) per l'intero gradiente luminoso previsto.

I valori di ETR misurati ad una serie di 6-10 PAR di intensità crescente comprese generalmente tra 0 e $2000 \mu E m^{-2} s^{-1}$ consentono la costruzione di curve ETR/PAR.

Per verificare l'attendibilità delle prime misure ottenute, oltre ad effettuare confronti bibliografici, sono stati effettuati confronti tra *Padina pavonica*, una foglia giovanile di *P.o.* ed una foglia adulta di *P.o.*, per il parametro F_v/F_m . Il risultato ha confermato un gradiente decrescente di efficienza fotosintetica dalla foglia giovanile di *P.o.* alla feoficea, come mostrato in Fig.12. L'efficienza fotosintetica delle diverse specie varia infatti in base alla composizione pigmentaria; nella stessa specie può variare anche in base all'età della foglia (Alcoverro *et al.*, 1998).

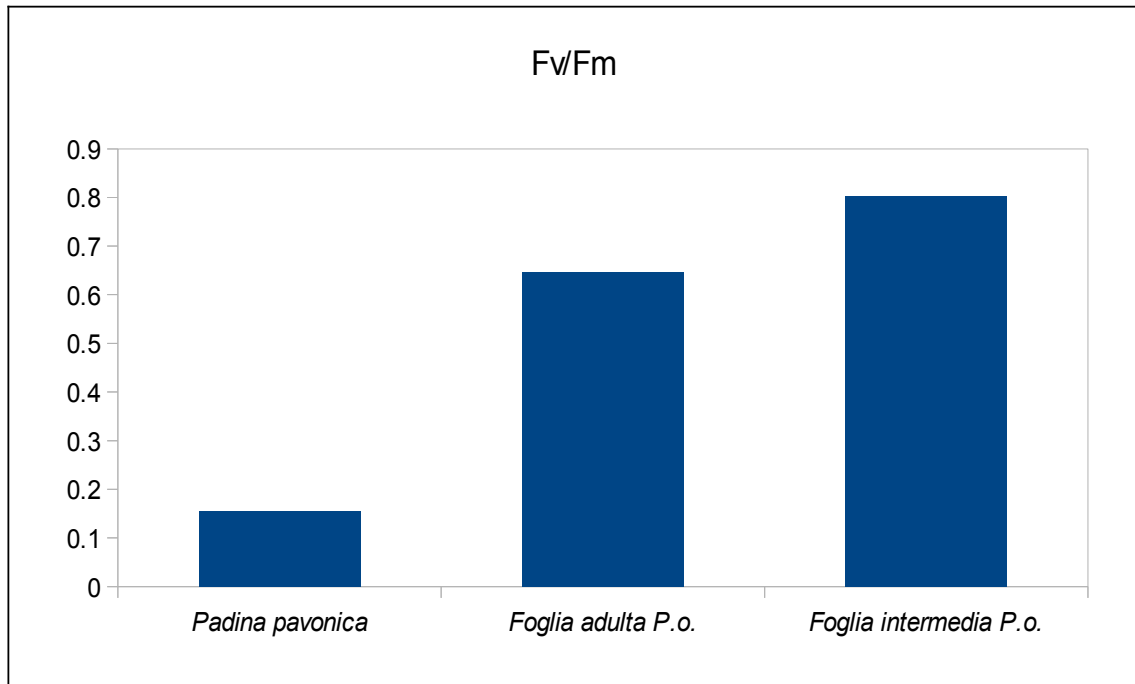


Fig.12_Valori di efficienza fotosintetica (F_v/F_m) per *P. pavonica*, per una foglia giovanile di *P.o.* e per una foglia adulta di *P.o.*

Oltre a valutare i principali parametri descrittivi delle dinamiche fotosintetiche della pianta, rappresentati principalmente dall'efficienza fotosintetica (F_v/F_m , cioè l'efficienza potenziale della pianta), dallo yield (Y, cioè l'effettivo rendimento quantico) e dall'ETR (il tasso di trasporto elettronico), è stato eseguito un fit dei dati sperimentali con la curva di Platt *et al.*, (1980), i cui parametri sono stati stimati attraverso l'uso di MathCad 7-Professional.

L'equazione che descrive le curve in Fig. 13, è:

$$ETR = ETR_s [1 - \exp(-\alpha E / ETR_s)] \exp(-\beta E / ETR_s) \quad [1]$$

dove:

- ETR = tasso di trasporto elettronico,
- ETR_s = tasso di trasporto elettronico teorico in assenza di fotoinibizione,
- E = irradianza,
- α = coefficiente angolare della porzione lineare (regione fotolimitata) della curva,
- β = coefficiente angolare negativo della retta ad alta irradianza.

Se si deriva l'equazione [1] rispetto all'irradianza, si ottiene:

$$\partial ETR / \partial E = (\alpha + \beta) \exp(-\alpha E / ETR_s + \beta E / ETR_s) - \beta \exp(-\beta E / ETR_s) \quad [2]$$

per $E \rightarrow 0$, $ETR / \partial E \rightarrow \alpha$ è una costante.

Ponendo $\partial ETR/\partial E = 0$, si ottiene E_m , il valore di irradianza al quale il trasporto elettronico è massimo:

$$E_m = ETR_s / \alpha \log_e [(\alpha + \beta)/\beta] \quad [3]$$

Sostituendo l'equazione 3 nella 1, si ottiene l'equazione:

$$ETR_{max} = ETR_s (\alpha / \alpha + \beta) (\beta / \alpha + \beta)^{\beta / \alpha} \quad [4]$$

dove per $\beta \rightarrow 0$, $ETR_{max} \rightarrow ETR_s$, quindi ETR_{max} e ETR_s coincidono se non c'è inibizione della fotosintesi. Per $\beta > 0$, $ETR_s > ETR_{max}$ e quindi ETR_s è il tasso massimo di fissazione del carbonio a luce saturante e in assenza di fotoinibizione, (Fig.13-14).

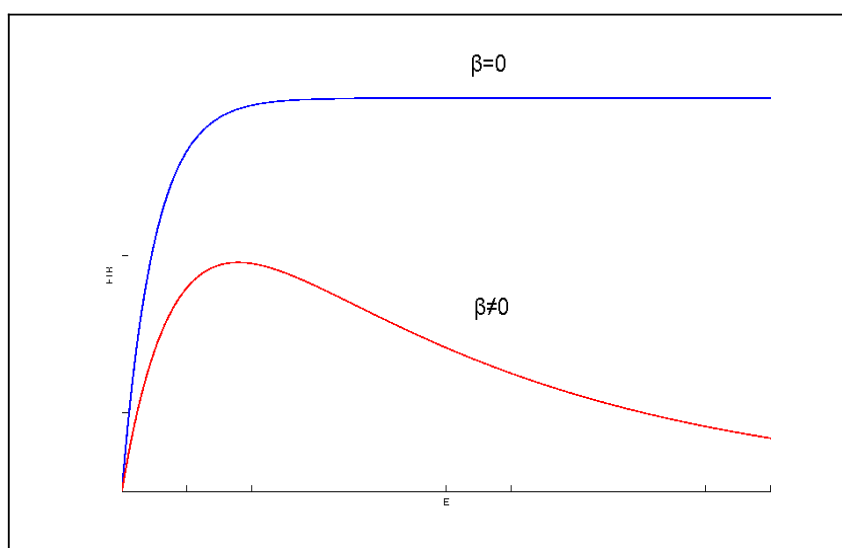


Fig.13_Forma generica della funzione descritta dall'equazione di Platt, 1980. In ascissa sono rappresentati i valori di intensità luminosa (in μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), in ordinata sono rappresentati i valori di ETR (in $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

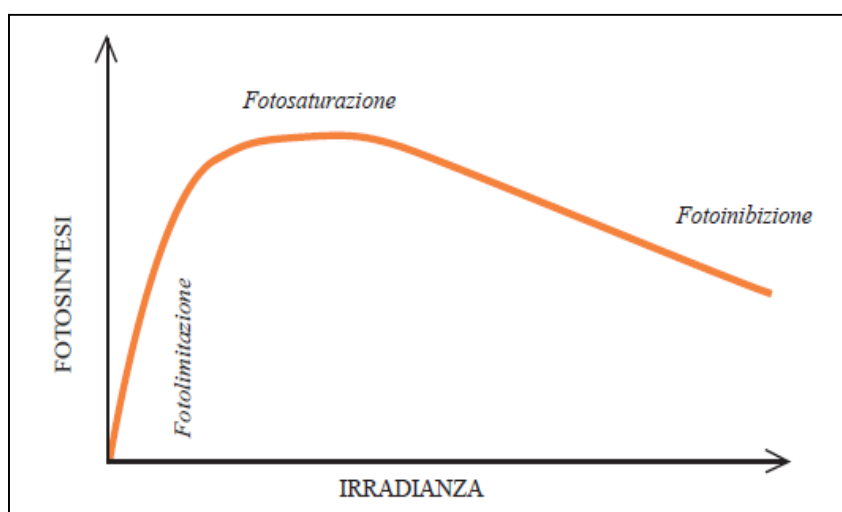


Fig.14_Andamento della fotosintesi con l'irradianza (curva P vs E). La funzione passa attraverso l'origine

perchè non considera le perdite dovute alla respirazione cellulare, (Saggiomo *et al.*, 2010).

Il *fit* è stato eseguito attraverso l'algoritmo Levenberg-Maquardt, (Levenberg, 1944; Marquardt, 1963) e i parametri stimati sono:

- ETR_s = trasporto elettronico massimo (in assenza di fotoinibizione),
- α = pendenza iniziale della curva di luce,
- β = indice di fotoinibizione.

Analizzando l'andamento di questa curva, si può notare che per bassi livelli di luce i tassi fotosintetici sono linearmente proporzionali all'irradianza, in quanto è il tasso di assorbimento dei fotoni a determinare il tasso fotosintetico (regione limitata dalla luce). L'efficienza fotosintetica α rappresenta quindi la capacità di utilizzazione dell'energia fotonica a basse irradianze ed è funzione dei processi fotochimici, quindi dipende dalla resa quantica e dall'abilità delle cellule di catturare la luce incidente. E' possibile derivare il valore di ETR_{max} (trasporto elettronico massimo) dai 3 parametri stimati. L'intersezione tra la retta con pendenza α ed ETR_{max} individua analiticamente E_k ($\mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$), l'indice di fotoadattamento, definito come limite tra fotolimitazione e fotosaturazione.

3.6_Contenuto di clorofilla in *Posidonia oceanica*

Il contenuto di clorofilla *a* permette di effettuare confronti di produttività potenziale tra le diverse stazioni e all'interno di ciascuna di esse. Nell'ambito di questo studio, il calcolo di questa concentrazione (su 5 campioni per ciascuno dei 9 siti, per un totale di 45 campioni), ha permesso inoltre l'applicazione del modello matematico utilizzato per stimare la produzione primaria a partire dall'efficienza fotosintetica. Le Fanerogame, come altre piante superiori, contengono clorofilla *a* e *b* e non contengono clorofilla *c*.

Per questa analisi si è fatto riferimento al protocollo proposto da Denninson, 1990.

Si preleva da ciascun campione 1 cm² di tessuto fogliare da una foglia intermedia e si priva degli epifiti tramite l'utilizzo di una lametta metallica. La porzione di tessuto viene quindi misurata, pesata e riposta in una provetta alla quale vengono aggiunti 1.5 ml di acetone 100%. Si conserva al buio, in un refrigeratore ad una temperatura di -20°C. Si sposta quindi il tessuto in un piccolo contenitore contenente 1 ml di acetone 100% e si procede a sminuzzarlo finemente, usando un bisturi. Si spostano quindi il tessuto tritato e l'acetone nella provetta originale. Si porta il volume a 4 ml con acetone 100% ed infine si aggiunge 1 ml di acqua distillata, per raggiungere un volume finale della

soluzione di 5 ml. Si centrifuga a bassa velocità per 10 minuti oppure si ripone in refrigeratore per 24 ore al massimo. Con l'utilizzo dello spettrofotometro si registrano quindi i valori di assorbanza a 725, 663 e 645 nm e si procede all'applicazione delle seguenti formule:

$$\text{chl } a \text{ (ug/ml)} = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$\text{chl } b \text{ (ug/ml)} = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

$$\text{chl } a+b \text{ (ug/ml)} = 8.02 \times A_{663} - 20.2 \times A_{645}$$

dove A_{663} è il valore di torbidità corretto per l'assorbanza a 663 nm ($A_{663} - A_{725}$) e A_{645} è il valore di torbidità corretto per l'assorbanza a 645 nm ($A_{645} - A_{725}$). Il contenuto di clorofilla di ciascun campione è poi moltiplicato per il volume di estratto (in ml) e per il cammino ottico dello spettrofotometro, (Dennison, 1990).

3.7_Modello matematico per il calcolo della produzione primaria tramite l'efficienza fotosintetica

3.7.1 Prime versioni del modello matematico per il calcolo della produzione primaria fitoplanctonica

Il modello PhytoVFP (Phytoplankton Variable Fluorescence Production model) è un modello matematico sviluppato da Marcelli *et al.*, (1997) e successivamente modificato da Marcelli *et al.*, (2003) e Piermattei *et al.*, (2006).

Il modello calcola la produzione primaria fitoplanctonica puntuale ed integrata nella colonna d'acqua e nel tempo, in acque di caso I (Morel e Prieur, 1977), a partire dai principali fattori che regolano il processo fotosintetico, come la disponibilità di luce in superficie e lungo la colonna d'acqua, la concentrazione e la distribuzione della biomassa fitoplanctonica, l'efficienza del processo fotosintetico, nonché i processi di fotoacclimatazione che coinvolgono il popolamento fitoplanctonico. Questo scopo è raggiunto considerando da una parte le formulazioni teoriche che legano la fotosintesi all'irradianza tramite i parametri fotosintetici, dall'altra le misure di fluorescenza variabile per determinare l'effettivo numero di fotosistemi attivi e la loro efficienza di conversione della luce in energia.

La prima versione del modello PhytoVFP è stata sviluppata (Marcelli *et al.*, 1997; Marcelli *et al.*, 2003) al fine di integrare nella stima della PP fitoplanctonica i dati di efficienza fotosintetica raccolti con la sonda Primprod 1.08 che utilizza (come il fluorimetro PAM) il metodo della fluorescenza variabile.

Il calcolo della PP era basato sulla scomposizione della curva PE in tre regioni a seconda del valore di PAR subacquea (zona di fotolimitazione, fotosaturazione e fotoinibizione) alle diverse profondità (z).

1) Zona di fotolimitazione

$$PP(z)=0.1*PAR(z)*F_v/F_m(z)*Chla(z)$$

2) Zona di fotosaturazione

$$PP(z)=0.1*E_k(z)*F_v/F_m(z)*Chla(z)$$

3) Zona di fotoinibizione

$$PP(z)=[0.1*E_d(z)*F_v/F_m(z)*Chla(z)] / PAR(z)$$

E_k = intensità di PAR per la quale la relazione PE passa da fotolimitata a fotosaturata;

E_d =valore di PAR a cui si attribuisce il massimo valore del tasso fotosintetico (P);

$PP(z)$ =produzione primaria (mgC/m³h) alla profondità z;

$F_v/F_m(z)$ = efficienza fotosintetica alla profondità z;

$Chla$ =concentrazione di clorofilla *a* stimata con metodo fluorimetrico (mg/m³);

0.1=efficienza di trasferimento degli elettroni da H₂O a CO₂ ;

PAR= Photosynthetic Active Radiation, radiazione disponibile per la fotosintesi (μE/m²s).

I valori di E_k ed E_d variavano a seconda che il popolamento oggetto di studio fosse considerato sciafilo ($E_k=197 \mu E/m^2$, $E_d=300 \mu E/m^2$) oppure eliofilo ($E_k=300 \mu E/m^2$, $E_d=600 \mu E/m^2$).

3.7.2 Modifiche del modello matematico per il calcolo della produzione primaria fitoplanctonica

I moduli sviluppati ed integrati nel modello PhytoVFP (Bonamano, 2013) hanno apportato delle modifiche alla nuova versione del modello.

L'architettura del modello è basata su quattro componenti:

- 1 . modulo di stima della PAR superficiale e della PAR subacquea;
- 2 . modulo di fotofisiologia del fitoplancton;
- 3 . modulo di calcolo del tasso fotosintetico;
- 4 . modulo di calcolo della produzione primaria puntuale ed integrata.

3.7.3 Modello matematico per il calcolo della produzione primaria della *Posidonia oceanica*

A partire dai parametri fotosintetici misurati con il fluorimetro PAM sui campioni di *Posidonia oceanica*, e con le dovute correzioni richieste dalla diversa ecologia delle piante marine rispetto al fitoplancton, è stata applicata la seguente formula:

$$PP = \phi * [Chl a] * ETR * F_v/F_m \quad [5]$$

- $\phi = 0.1$ (coefficiente adimensionale);
- $[Chl a]$ = contenuto di clorofilla *a* (mgChl*a*/cm²) - in questo caso invece che un volume di acqua, si considera la superficie fogliare verde (in cm²);
- ETR = tasso di trasporto elettronico (Electron Transport Rate), calcolato in funzione della PAR tramite l'equazione che descrive la curva di Platt ([1]);
- F_v/F_m = efficienza fotosintetica di un campione adattato al buio.

- Il contenuto di clorofilla *a*, misurato in mgChl*a*/cm² è stato moltiplicato per il valore medio (in cm²) di tessuto verde misurato in ciascuna stazione di campionamento. Si ottiene così il contenuto di clorofilla medio di ciascun sito.

- L'ETR è stato stimato tramite l'equazione di Platt *et al.*, (1980) descritta nell'equazione [1], a partire dai parametri fotosintetici (α , β ed ETRs) stimati attraverso le misure con il fluorimetro PAM. Il tasso di trasporto elettronico varia al variare della PAR incidente sui pigmenti fotosintetici e in funzione del tempo. Al fine di ottenere i valori di PAR_z (alla profondità desiderata) per ciascuna stazione di campionamento è stata integrata una serie temporale (ultimi 12 anni) di dati satellitari giornalieri (GlobColour) di PAR₀ (luce incidente in superficie; Maritorena and Siegel, 2005) e K_d_{PAR} (coefficiente di attenuazione della luce). Applicando la legge di Lambert-Beer ($I_z = I_0 * e^{-K_d z}$) sono stati così ottenuti i valori di PAR incidenti sulle 9 stazioni analizzate.

Le lacune dei dati satellitari (GlobColour) sono state colmate attraverso l'analisi dei parametri di pioggia (misure effettuate da 9 pluviometri dell'ufficio idrografico distribuiti all'interno dell'area di studio), vento (anemometro situato all'interno del porto di Civitavecchia) e moto ondoso (ondametro dell'autorità portuale situato di fronte al porto di Civitavecchia), tramite la regressione lineare tra il K_d e i dati meteorologici, sono stati così ottenuti per interpolazione i valori di K_d nei giorni mancanti.

-Il parametro F_v/F_m , l'efficienza fotosintetica di una pianta adattata al buio, è stato misurato direttamente dallo strumento ed elaborato per ciascuna stazione di campionamento.

3.7.4 Analisi della variazione stagionale e nelle 24 ore dei parametri fotosintetici

Ai fini di inserire nel calcolo matematico il fattore temporale delle dinamiche fotosintetiche, la stazione fissa è stata analizzata nei giorni 11 Dicembre 2014 e 11 Giugno 2015 (variazione stagionale) e nell'arco delle 24 ore (variazione entro le 24 ore).

Per quanto riguarda l'analisi, il test Anova One-Way mostra, in entrambi i casi, significatività statistica delle differenze tra le varianze di ciascun parametro analizzato (α , β , ETR, F_v/F_m), nei differenti orari del giorno; per quanto riguarda invece le differenze nelle varianze dello stesso parametro, allo stesso orario, ma per i due diversi data set (11 Dicembre/11Giugno), il test Anova non mostra alcuna significatività, tranne che per il valore F_v/F_m . Alla luce di questa analisi, all'interno del calcolo matematico è stato inserito un valore medio tra estate ed inverno per i parametri α , β ed ETR ed è stata invece considerata la variazione stagionale per il parametro F_v/F_m . Il modello è stato successivamente esteso tenendo in considerazione la variazione all'interno delle 24 ore della PAR e dei parametri fotosintetici. La variazione di questi parametri è stata calcolata eseguendo un *fit* tramite una combinazione di coseni:

$$f(t) = (a_0 + a_1 \cdot \cos(2 \cdot \pi / 24 \cdot t + b_1) + a_2 \cdot \cos(2 \cdot \pi / 12 \cdot t + b_2) + a_3 \cdot \cos(2 \cdot \pi / 6 \cdot t + b_3)) \quad [6]$$

Questa funzione è stata scelta perchè tiene conto delle periodicità tipiche all'interno del giorno (6 ore-12 ore-24 ore). Il contenuto di clorofilla, stimato in laboratorio come $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, è stato convertito in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e poi moltiplicato per la superficie fogliare verde (solo la porzione contenente clorofilla e potenzialmente fotosintetizzante), estiva ed invernale, in cm^2 . Moltiplicando infine per la densità media della prateria corrispondente (fasci/m^2), si ottiene il contenuto di clorofilla al m^2 (in questo caso convertito in grammi).

3.8 Trattamento statistico dei dati

I dati di macroripartizione, produzione e genetica relativi alle praterie indagate, sono stati statisticamente analizzati tramite l'utilizzo di alcuni software: per l'elaborazione dei dati ecologici e di produzione sono stati utilizzati i programmi statistici PAST ver. 1.91 (Hammer *et al.*, 2001) e R-environment (R development core team, 2008); per

l'elaborazione dei dati genetici è stato utilizzato il software NT-SYS ver. 2.0 (Rohlf, 1993); per l'elaborazione del modello è stato utilizzato il software Matlab 7.

3.8.1 Analisi univariata

A tutti valori medi calcolati è stata associata la variabilità della misura stessa, calcolata come deviazione standard (s):

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2 - \bar{x}^2}$$

3.8.2 Pca

La distribuzione dei dati di macroripartizione (densità assoluta, copertura e densità relativa) e di alcuni parametri fenologici (LAI, coefficiente a, numero medio annuo di foglie, larghezza e lunghezza media totale) e lepidocronologici (età) è stata indagata attraverso la PCA (Analisi delle Componenti Principali). Questa analisi, che rientra nella statistica multivariata, permette di comprendere le relazioni esistenti tra le variabili e di sintetizzare l'informazione di un elevato numero di parametri. La riduzione del numero di variabili avviene attraverso l'analisi della varianza, e quindi del contributo che ciascuna di esse fornisce all'intero data-set. Per n variabili, la PCA calcola n autovettori ed n autovalori che forniscono informazione sulle dimensioni di un set di dati in uno spazio n -dimensionale (McKillup e Darby Dyar, 2010).

3.8.3 Correlazione

Per quanto riguarda i dati di produzione primaria, la presenza di correlazioni morfometriche tra la lunghezza della base fogliare e la lunghezza del lembo fogliare è stata analizzata, per ciascuna stazione e per l'intera area di studio, tramite l'RMA. L'Asse Maggiore Ridotto è un metodo statistico che consente di descrivere la relazione lineare tra due variabili che “covariano”, quindi tra variabili statisticamente dipendenti. L'asse maggiore minimizza la somma dei quadrati delle proiezioni dei punti sull'asse maggiore. Il coefficiente di correlazione di Bravais-Pearson, compreso tra -1 e 1, è strettamente legato alla covarianza ed esprime l'intensità della relazione lineare che lega due descrittori; indica una forte correlazione negativa se tende a -1 ed una forte correlazione positiva se tende ad 1.

3.8.4 Anova

Il test One-way ANOVA (Analysis of variance) è stato applicato per verificare la significatività della varianza della densità assoluta e della copertura, lungo i 3 parametri abiotici considerati in questo studio (profondità, substrato e settore geografico). Si usa per testare l'ipotesi nulla che due o più gruppi di dati abbiano valori medi identici. Per $p < 0.05$, le differenze tra i set di dati sono da considerarsi significative.

3.8.5 UPGMA clustering

La costruzione dell'albero filogenetico è stata effettuata tramite l'utilizzo del metodo di *clustering* UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). E' un semplice metodo gerarchico di *clustering*, basato sulla similarità a coppie (pairwise similarity) e fondato sull'assunto che il rateo evolutivo sia costante. L'algoritmo conduce alla costruzione di un dendrogramma (albero filogenetico "rooted") che riflette la struttura presente in una matrice di similarità. Ad ogni passaggio, i due *cluster* più vicini A e B sono combinati in un *cluster* e la distanza tra essi è considerata essere la media di tutte le distanze tra coppie di oggetti x in A e y in B (Nei e Li, 1979).

3.8.6 Test di Mantel

Per testare la significatività del *clustering* è stata applicata una correlazione cofenetica tra le matrici di distanza a coppie (distanze Euclidee), tramite l'utilizzo del test di Mantel.

Il Test di Mantel è un confronto tra dati multivariati che consente di ottenere una misura del grado di correlazione esistente fra due matrici di distanza (ad esempio geografica) o di similarità (Mantel, 1967). L'ipotesi nulla che viene testata è quella di indipendenza fra le due matrici analizzate, mentre il livello di probabilità relativo al valore della statistica viene calcolato sulla base di una procedura iterativa. La statistica Z di Mantel, che esprime il grado di correlazione fra la struttura delle due matrici, si calcola come la somma dei prodotti degli elementi corrispondenti delle due matrici di distanza, esclusi quelli presenti sulla diagonale. Se gli elementi di ciascuna delle due matrici vengono preventivamente centrati e standardizzati, la statistica di Mantel (indicata in questo caso come R) assume lo stesso significato e lo stesso intervallo di variazione di un coefficiente di correlazione di Bravais-Pearson. Il livello di probabilità associato al valore della statistica di Mantel si calcola sulla base di una procedura iterativa che prevede la permutazione casuale delle righe e delle colonne di una delle due matrici ed

il ricalcolo della statistica di Mantel per un numero sufficientemente alto di volte. Il valore della statistica ottenuto per le matrici originali viene confrontato con la distribuzione empirica dei valori ottenuti ripetendo il calcolo su matrici permutate aleatoriamente; la percentuale delle iterazioni in cui si è ottenuto un valore inferiore a quello originale corrisponde al livello di probabilità di quest'ultimo. Si rifiuta l'ipotesi nulla di indipendenza fra le matrici se almeno il 95% o il 99% dei valori ottenuti per le matrici permutate è inferiore (o superiore) a quello originale.

3.8.7 Amova

Successivamente, ai dati molecolari è stato applicato anche il test statistico AMOVA, che permette l'analisi della varianza molecolare all'interno della popolazione e tra le popolazioni, fornendo l'indice di fissazione, una misura di significatività di questa differenziazione (Excoffier *et al.*, 1992).

Dato un aplotipo, questo viene rappresentato attraverso il vettore $p^t = (p_1, p_2, \dots, p_s)$ i cui elementi sono 1 o 0 a seconda che siano state riscontrate delle differenze rispetto ad un aplotipo base, scelto come riferimento, o meno. La differenza tra l'individuo j e l'individuo k viene definita come:

$$(p_j - p_k) = [(p_{1j} - p_{1k}); (p_{2j} - p_{2k}); \dots; (p_{sj} - p_{sk})],$$

per arrivare al calcolo della distanza Euclidea:

$$\delta_{jk} = (p_j - p_k)^t (p_j - p_k), \text{ che in questo caso conta i siti in cui è stata osservata una differenza.}$$

A partire dalla matrice delle distanze viene stimata la varianza totale, sia all'interno delle popolazioni che tra le popolazioni, sfruttando la relazione:

$$\sum_i (x_i - \bar{x})^2 = \frac{\sum_i \sum_j (x_i - x_j)^2}{2n}$$

Stimate le diverse componenti della varianza, viene costruita una statistica F simile alla classica statistica F dell'ANOVA.

Mancando l'assunzione di un modello Normale, la distribuzione della statistica F sotto l'ipotesi nulla H_0 viene generata attraverso metodi di permutazione. Per ciascuna delle permutazioni ottenute si calcola il valore della statistica F .

3.8.8 PcoA

Successivamente, la distribuzione dei dati genetici sulla base della distanza genetica è

stata indagata tramite la PcoA, Tramite questa analisi, le distanze nello spazio originale sono approssimate al meglio dalle distanze euclidee nello spazio ridotto (ordinamento). La PcoA è metrica, in quanto l'ordinamento risultante preserva le distanze metriche tra gli oggetti, come avviene nella PCA.

4_RISULTATI

4.1_Area di studio: distribuzione spaziale e temporale dei dati

La fase di caratterizzazione quali-quantitativa delle praterie, effettuata a Maggio 2013, ha interessato 18 siti di campionamento (Fig.15).

Per ciascuna di queste stazioni sono state ottenute informazioni relative a:

- qualità (tipo di substrato, profondità, tipologia di prateria),
- densità e copertura,
- dati fenologici,
- dati lepidocronologici,
- dati genetici.

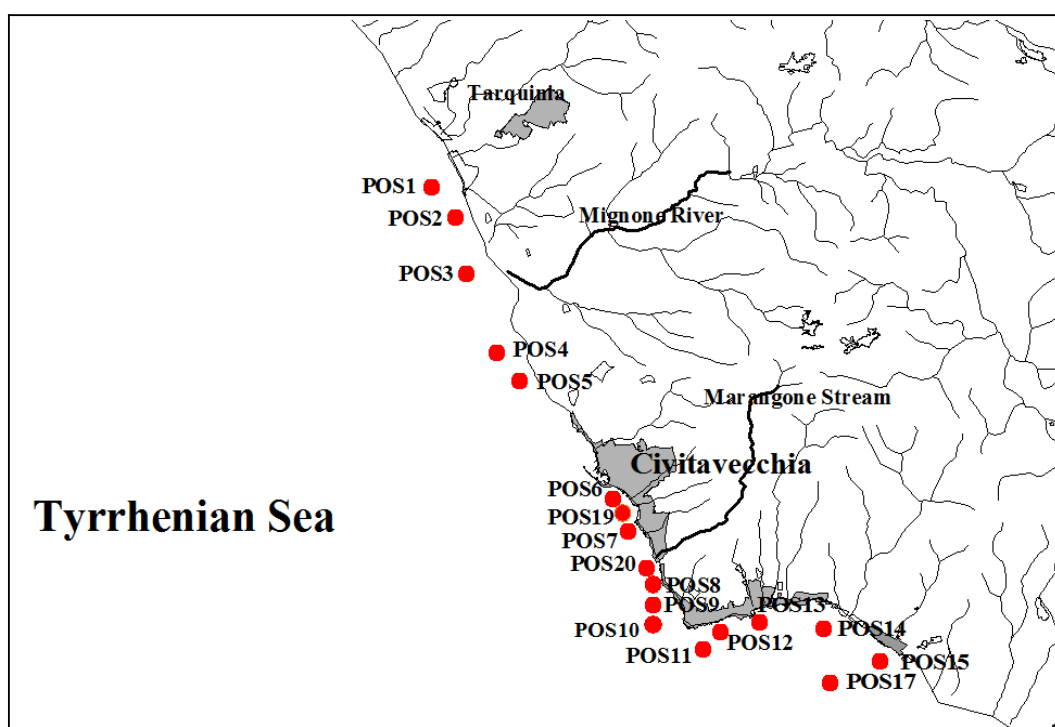


Fig.15_Siti di campionamento individuati per la fase di caratterizzazione quali-quantitativa delle praterie, (Maggio 2013).

In 9 di queste 18 stazioni (Fig.16) è stato possibile calcolare i valori di produzione primaria sia fogliare che epigea, a partire dalle analisi lepidocronologiche.

A Novembre 2014 è stato effettuato un secondo campionamento sulle stesse 9 stazioni, finalizzato alle misure di produzione tramite lepidocronologia (si ha così un confronto temporale tra la produzione di Maggio 2013 e quella di Novembre 2014) e tramite il fluorimetro PAM (Pulse Amplitude Modulated). Sono state inoltre effettuate misure di con-

centrazione di clorofilla nelle piante.

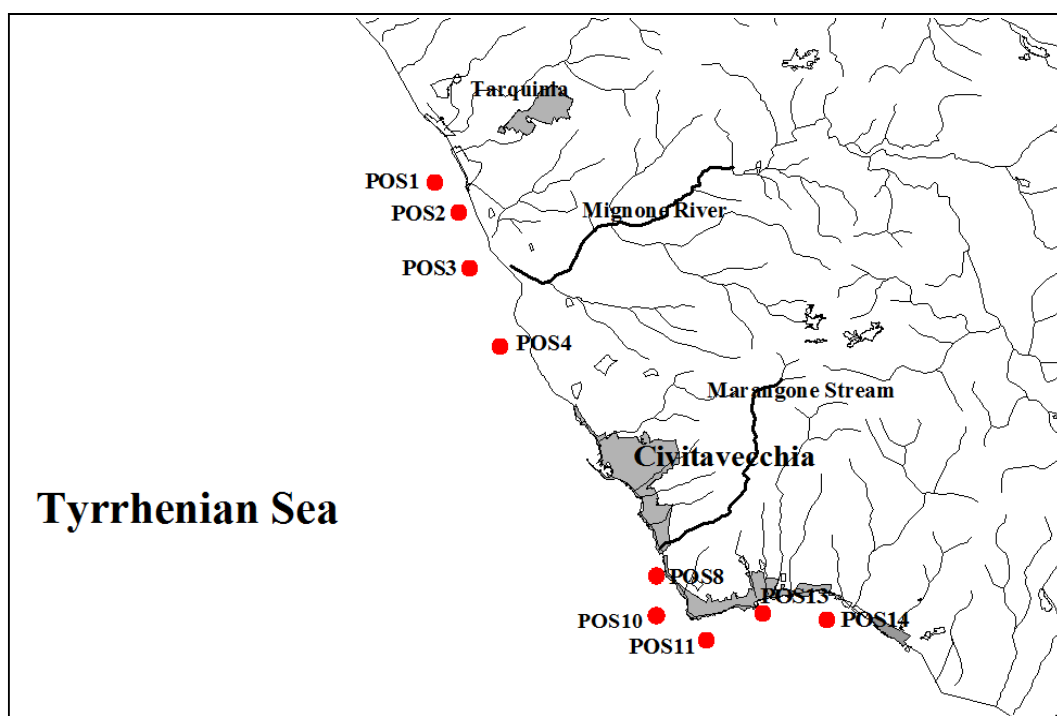


Fig.16_Siti di campionamento in cui sono stati prelevati dati di produzione primaria (tramite lepidocronologia e PAM e contenuto di clorofilla).

Per completare la conoscenza sulle condizioni delle praterie presenti nell'area di studio, ad Agosto 2014 sono stati predisposti, in 4 stazioni (Fig.17), i picchetti per il *Balisage*, poi monitorati dopo un anno.

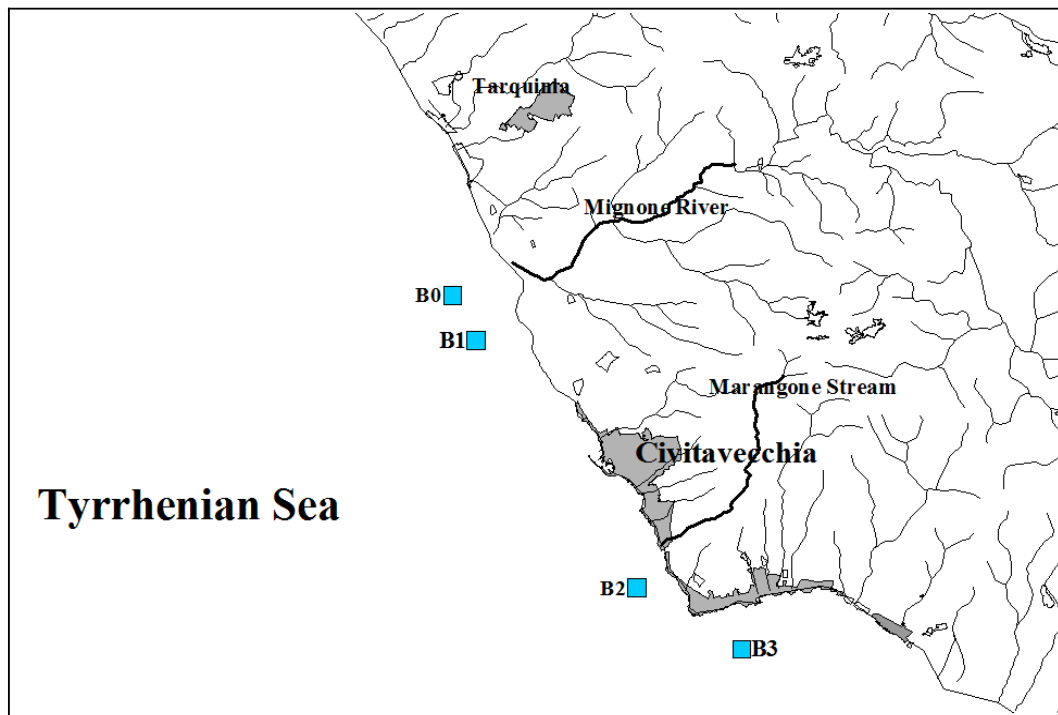


Fig.17_Siti di campionamento per il monitoraggio del limite inferiore, (*balisage*).

La stazione POS.0 (Fig.18) è stata utilizzata per monitorare le dinamiche fotosintetiche della pianta (tramite PAM) nell'arco delle 24 ore (11 Dicembre 2014 e 11 Giugno 2015), ai fini di calibrare il modello di stima della produzione primaria a partire dall'efficienza fotosintetica.

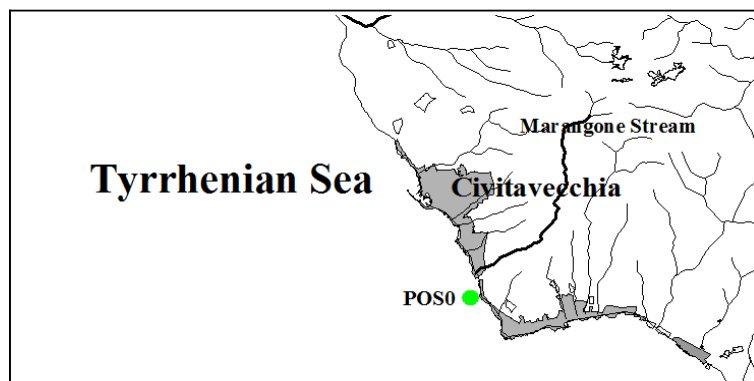


Fig.18_POS.0 (stazione di controllo per le indagini fotosintetiche)

4.2_Studio delle praterie di *Posidonia oceanica*: fase di caratterizzazione delle stazioni prese in esame

4.2.1 RAPD: risultati genetici

La fase di caratterizzazione dell'area di studio ha messo in evidenza una così ampia eterogeneità dei parametri strutturali e funzionali delle piante (trattati nel paragrafo successivo), da rendere necessaria un'analisi genetica, al fine di comprendere l'effettiva distribuzione delle popolazioni esistenti nell'area di studio.

Le analisi genetiche sono state condotte su 72 fasci fogliari nelle 18 stazioni di campionamento esaminate a Maggio-Giugno 2013.

I primer hanno generato un totale di 140 bande, con dimensioni dei frammenti tra 0.3 e 3.8 kb. L'analisi della distanza genetica a coppie (pairwise distance) ha generato un raggruppamento in cluster UPGMA delle popolazioni (Fig. tot). Il coefficiente di similarità (Nei's index) tra i campioni è risultato essere di 0.63 ± 0.01 .

I risultati del Mantel test relativi al confronto tra il coefficiente di similarità (Nei's distance) e le matrici cofenetiche, è risultato essere statisticamente significativo, ($r=0.95$).

I risultati dell' AMOVA rivelano variazioni in bande randomicamente amplificate, sia all'interno che tra i diversi siti di campionamento, ($P < 0.00001$). La maggior parte della varianza (57%) è stata osservata tra le popolazioni e non al loro interno.

Nelle Figure 19 e 20 l'albero filogenetico e la PcoA mostrano che individui campionati lungo l'intera area di studio, si associano a formare 3 cluster ben distinti.

Il potere di discriminazione è stato applicato alla distanza genetica tra gli individui e i primi due assi hanno mostrato il 59,46% di variazione: l'asse 1 il 41,56 % della variazione e l'asse 2 il 17,9%.

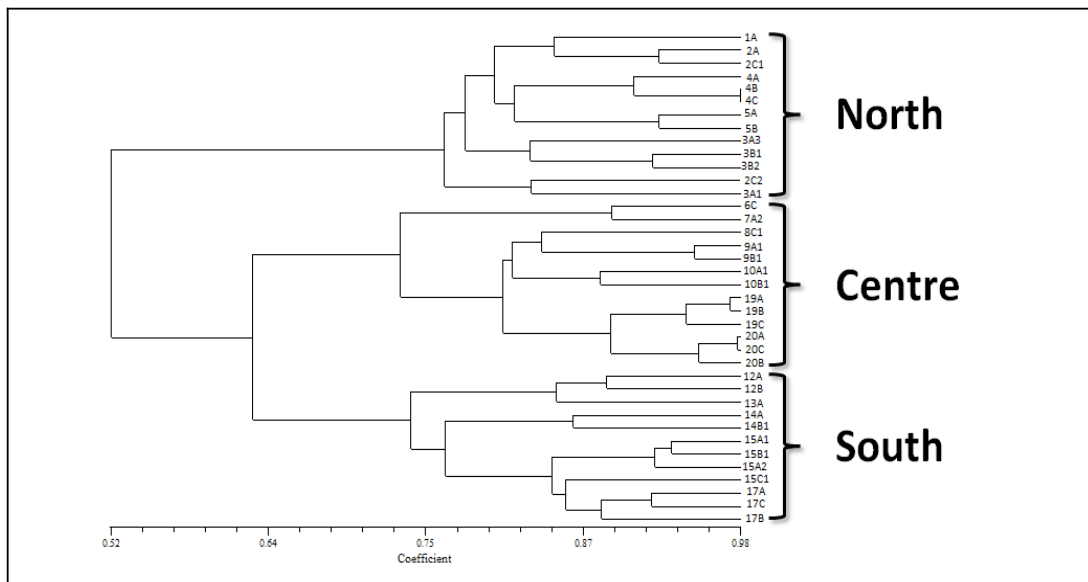


Fig.19_Albero filogenetico.

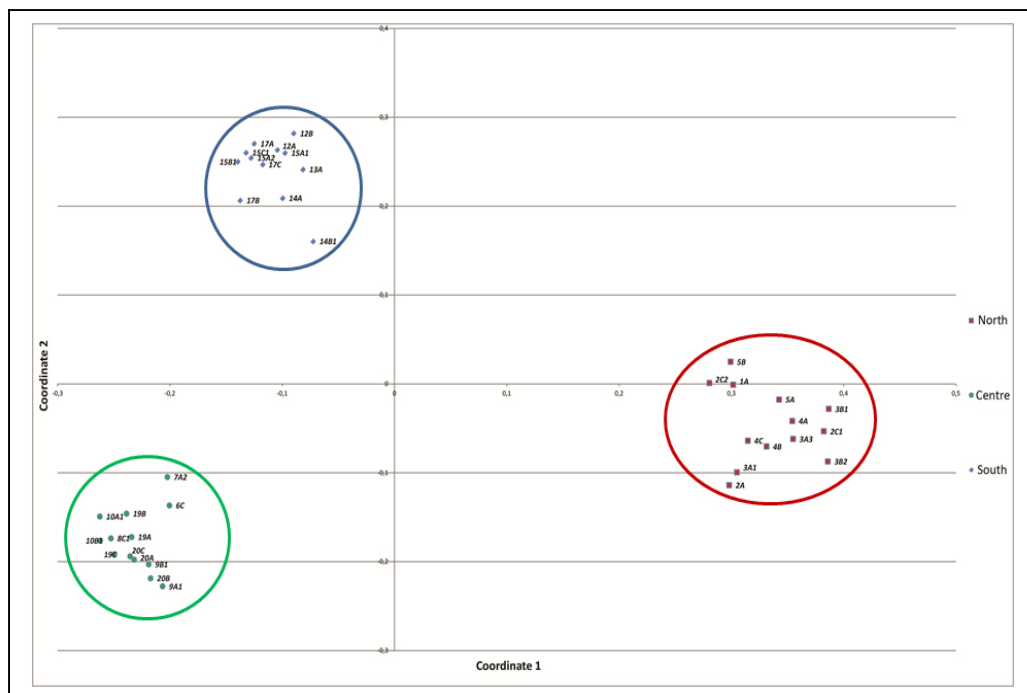


Fig.20_PcoA. Analisi delle coordinate principali, (Blu: Sud; rosso: Nord; verde: centro).

4.2.2 Analisi dei parametri strutturali

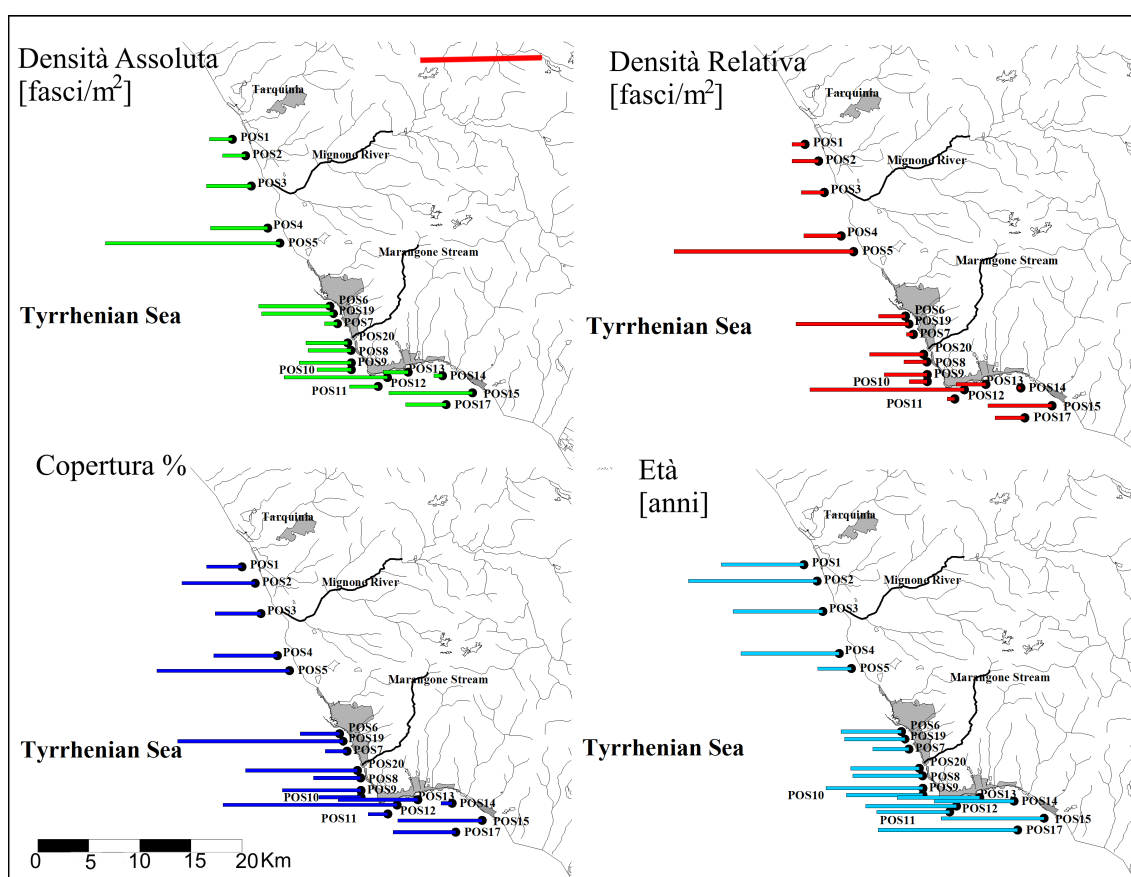


Fig.21_Carte di densità, copertura, densità relativa ed età per l'intera area di studio, (Map viewer. Golden Software).

Per la valutazione delle variabili fenologiche sono stati analizzati 324 campioni nel 2013 e 162 nel 2014 (18 per ciascuna stazione di campionamento). Per le analisi lepidocronologiche sono stati analizzati 216 campioni nel 2013 e 108 nel 2014 (12 per ciascuna stazione di campionamento).

Dal primo monitoraggio, effettuato nel Maggio-Giugno 2013, è emerso che le praterie situate tra Marina di Tarquinia e Santa Severa (costa laziale settentrionale) presentano una distribuzione discontinua ed eterogenea (Fig.21), riflettendo le condizioni ambientali alle quali sono soggette (geomorfologia del fondale, profondità, presenza di impatti costieri naturali ed antropici).

Nelle Figure 22, 23, 24 e 25 vengono riportati i valori medi dei parametri strutturali di ciascuna stazione (rispettivamente, densità assoluta, copertura, densità relativa ed età); ai valori medi calcolati è stata associata la variabilità della misura stessa, o variazione di campo, calcolata come deviazione standard.

I valori assoluti di densità, in tutta l'area di studio, variano da un minimo di 75 fasci/m² ad un massimo di 875 fasci/m², misurati rispettivamente nelle stazioni POS.07 (in rosso) e POS.05 (in verde); per quanto riguarda i valori medi di densità assoluta, rappresentativi dei siti di campionamento, la stazione POS.14 presenta il valore più basso dell'intera area di studio, con 127.1 fasci/m², mentre la stazione POS.05, situata in prossimità di Torre Valdaliga, presenta il valore più alto, con 653.5 fasci/m² (Fig. 22).

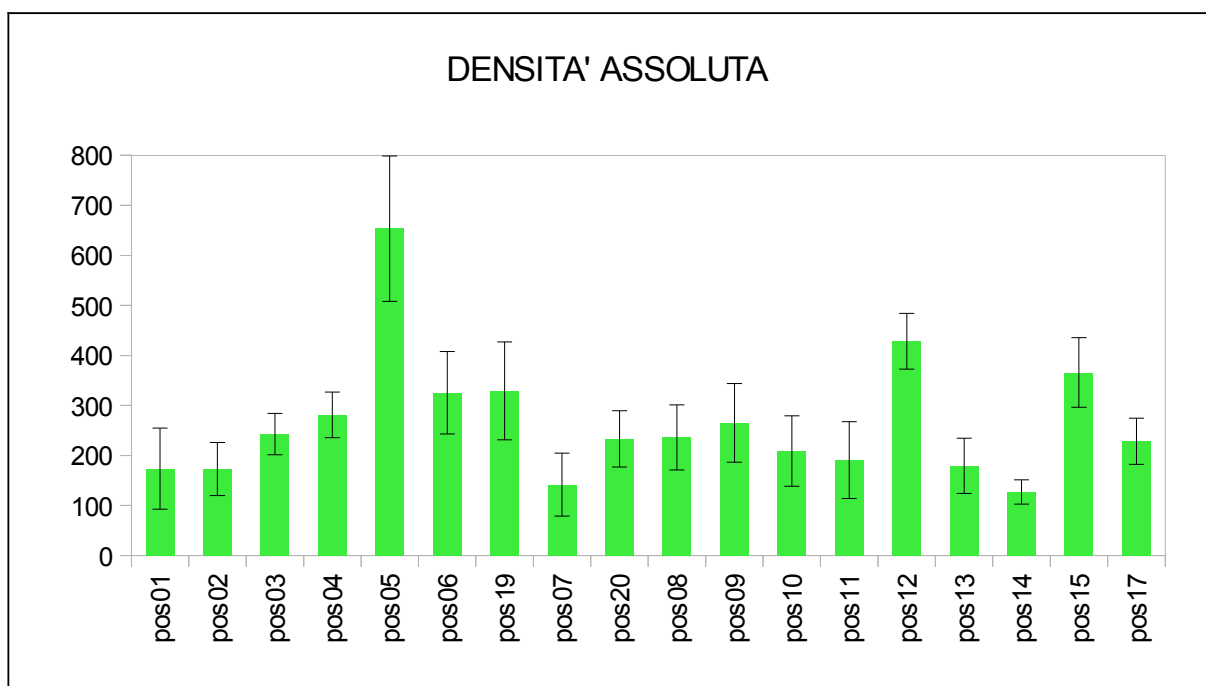


Fig.22_Istogramma a barre: valori medi di densità assoluta (fasci/m²) e variazione di campo (deviazione standard) in ciascuna stazione di campionamento, (le stazioni sono ordinate geograficamente da nord a sud).

Per quanto riguarda la copertura percentuale (Fig.23), i valori medi variano tra il 6 % (POS.14, in rosso) e il 98 % (POS.12, in verde). La stazione POS.14 risulta quindi, in assoluto, il sito con i valori più bassi di macroripartizione.

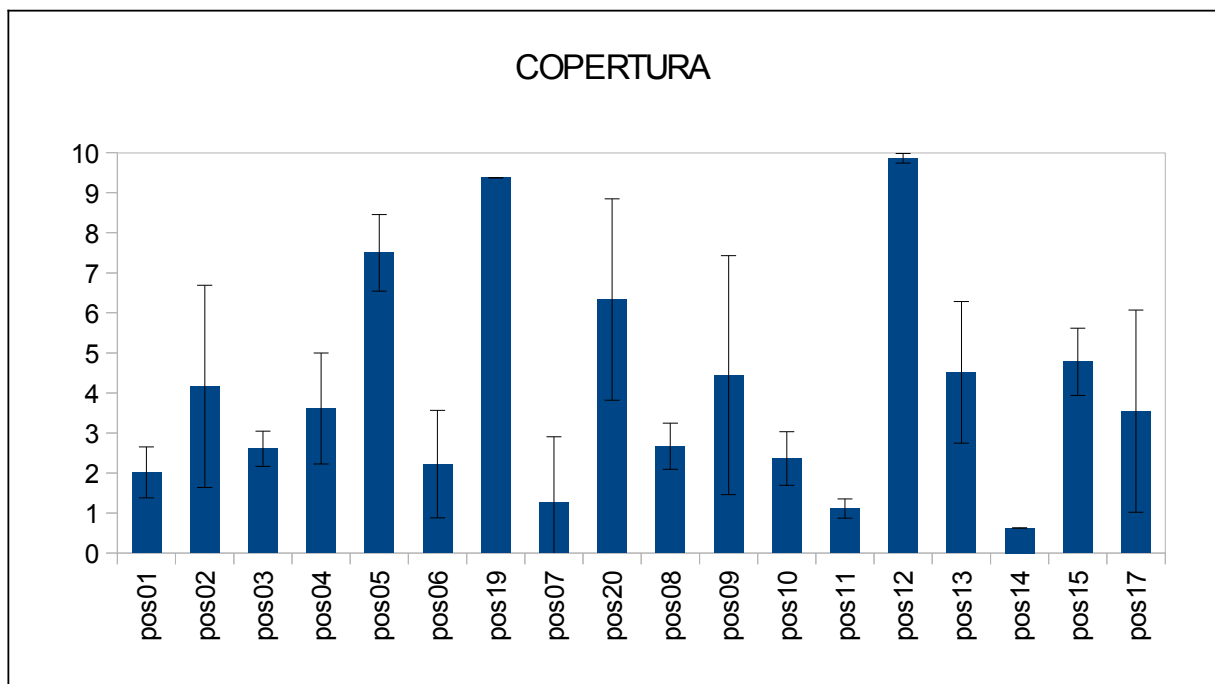


Fig.23_Istogramma a barre: valori medi di copertura (in decimetri) e variazione di campo (deviazione standard) in ciascuna stazione di campionamento (le stazioni sono ordinate geograficamente da nord a sud).

Un parametro che integra i valori di densità assoluta con le percentuali di copertura è rappresentato dalla densità relativa (Fig.24). Le stazioni POS.05 (in verde) e POS.14 (in rosso) mostrano, ancora una volta, rispettivamente il valore più alto e più basso di densità relativa. In condizioni di distribuzione così disomogenee, la densità relativa è un parametro che riflette la situazione esistente in natura, poichè, integrando la densità assoluta con il valore di ricoprimento percentuale, rappresenta il valore di densità, “spalmato” sulla superficie di riferimento. I posidonieti presi in considerazione in questo studio, avendo una distribuzione prevalentemente “a macchie”, mostrano basse percentuali di copertura (tranne alcune stazioni); questo spiega l’“abbattimento” dei valori di densità relativa (il valore medio per l’intera area di studio è di 129.3 fasci/m²) rispetto a quelli di densità assoluta (il valore medio per l’intera area di studio è di 265.8 fasci/m²).

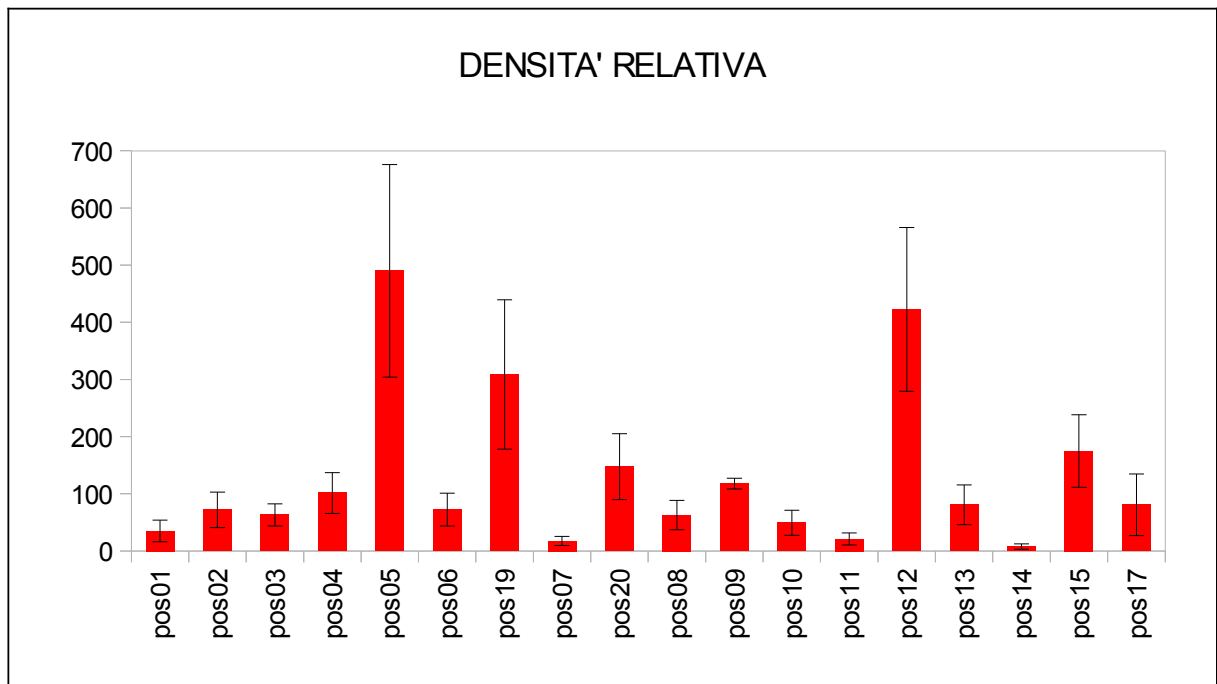


Fig.24_Istogramma a barre: valori medi di densità relativa (fasci/m²) e variazione di campo (deviazione standard) in ciascuna stazione di campionamento (le stazioni sono ordinate geograficamente da nord a sud).

In Fig.25 si rappresenta l'età media delle piante, per ciascun sito di campionamento. Questo valore oscilla tra 2,75 anni (POS.05, in prossimità della centrale di Torre Valdaliga, in rosso) e 11.5 anni (POS.17, la stazione più meridionale dell'area di studio, in verde).

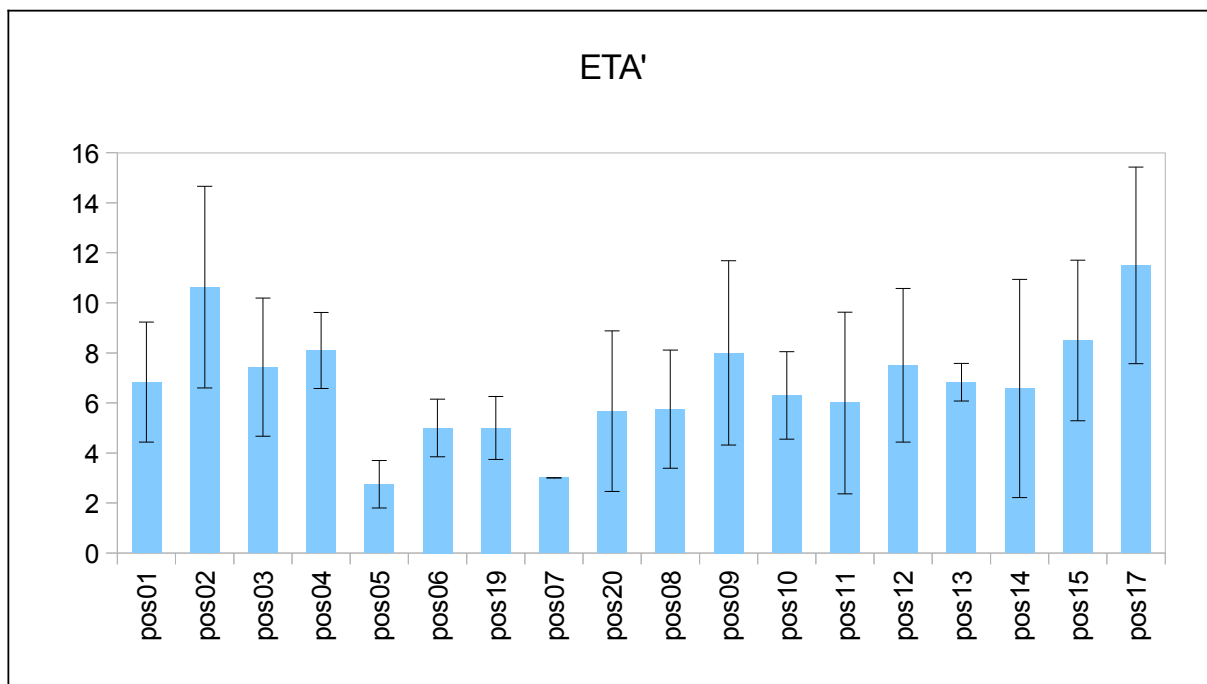


Fig.25_Istogramma a barre: età media e variazione di campo (deviazione standard) in ciascuna stazione di campionamento, (le stazioni sono ordinate geograficamente da nord a sud).

In Tab.7 sono stati riassunti i valori medi ($\pm$ deviazione standard) di macroripartizione e di età di ciascuna stazione di campionamento. E' inoltre riportata la scala di valutazione secondo Giraud (1977) e Pergent *et al.*, (1995).

STAZIONE	DENSITA' ASSOLUTA	COPERTURA (DECIMI)	DENSITA' RELATIVA	ETA'	Classi Giraud/Pergent
Pos.01	173.61 ± 81.056	2.01 ± 0.64	34.96 ± 18.95	6.83 ± 2.4	Molto rada e molto disturbata
Pos.02	172.92 ± 53.125	4.17 ± 2.52	72.05 ± 30.89	10.63 ± 4.03	Molto rada e molto disturbata
Pos.03	242.7 ± 41.34	2.60 ± 0.44	63.20 ± 19.51	7.43 ± 2.76	Molto rada e disturbata
Pos.04	281.25 ± 45.39	3.61 ± 1.39	101.56 ± 35.64	8.1 ± 1.52	Molto rada e disturbata
Pos.05	653.47 ± 145.39	7.5 ± 0.95	490.10 ± 185.92	2.75 ± 0.95	Densa e in equilibrio
Pos.06	325.69 ± 82.29	2.22 ± 1.34	72.38 ± 28.65	5 ± 1.15	Rada e molto disturbata
Pos.07	141.67 ± 62.91	1.25 ± 1.65	17.71 ± 7.86	3 ± 0	Semi-prateria e molto disturbata
Pos.08	236.11 ± 65.08	2.67 ± 0.58	62.96 ± 25.77	5.75 ± 2.36	Molto rada e molto disturbata
Pos.09	265.28 ± 78.82	4.44 ± 2.99	117.90 ± 9.211	8 ± 3.68	Molto rada e disturbata
Pos.10	209.03 ± 70.51	2.36 ± 0.67	49.35 ± 22.13	6.3 ± 1.75	Molto rada e disturbata
Pos.11	190.97 ± 76.68	1.11 ± 0.24	21.22 ± 10.62	6 ± 3.63	Molto rada e molto disturbata
Pos.12	428.47 ± 55.65	9.86 ± 0.12	422.52 ± 142.28	7.5 ± 3.07	Densa e in equilibrio
Pos.13	179.17 ± 55.20	4.51 ± 1.77	80.87 ± 34.72	6.83 ± 0.75	Molto rada e disturbata
Pos.14	127.08 ± 24.21	0.62 ± 0.3	7.94 ± 4.62	6.58 ± 4.36	Semi-prateria e molto disturbata
Pos.15	365.97 ± 69.60	4.78 ± 0.84	174.85 ± 63.56	8.5 ± 3.21	Rada e in equilibrio
Pos.17	228.47 ± 45.94	3.54 ± 2.52	80.92 ± 53.88	11.5 ± 3.93	Molto rada e disturbata
Pos.19	329.17 ± 98.07	9.37 ± 0.5	308.59 ± 130.53	5 ± 1.26	Rada e disturbata
Pos.20	233.33 ± 56.34	6.33 ± 2.52	147.78 ± 57.58	5.67 ± 3.21	Molto rada e molto disturbata

Tab.7 _Tabella riassuntiva dei parametri principali che caratterizzano le praterie di *Posidonia oceanica*.

Al fine di comprendere come alcuni parametri siano legati tra loro, è stata applicata una PCA (Principal Component Analysis) ai principali descrittori della pianta e delle

praterie: profondità, densità assoluta, copertura, età, lunghezza e larghezza media delle foglie, coeff a , LAI medio e numero di foglie per fascio fogliare. In Figura 26 si può osservare il *bi-plot* della distribuzione delle stazioni in relazione ai principali parametri biologici della pianta e alla profondità; nella Tabella 8 invece, si riportano i contributi, in termini di percentuale di varianza, delle relative componenti indagate.

E' risultato che le prime 3 componenti spiegano circa il 70% della varianza.

Analizzando le prime due componenti, si può osservare quanto segue: sulla base della seconda componente, i parametri che hanno un maggior peso sono quelli che riguardano le dimensioni fogliari e il livello di accrescimento (lunghezza, larghezza media della foglia ed età della pianta); alla prima componente contribuiscono invece i parametri di macroripartizione delle praterie, (densità, copertura, densità relativa), il numero di foglie e il LAI medio. E' interessante notare che il parametro della profondità contribuisce in modo diverso nei due gruppi; in modo positivo rispetto ai parametri dimensionali della foglia, in modo negativo rispetto ai parametri strutturali della prateria; la profondità, inoltre, è inversamente proporzionale al coefficiente a .

Le stazioni, quindi, si distribuiscono soprattutto sulla base dei parametri di macroripartizione: POS.14 rimane isolata perchè, come già mostrato, presenta i valori medi di densità e copertura più bassi dell' intera area di studio. POS.05 si posiziona sul lato opposto in quanto mostra i valori più elevati di densità assoluta e copertura; è inoltre opposta al vettore "età", avendo l'età media più bassa tra tutte le praterie indagate (2,75 anni). POS.05 e POS.06 si posizionano sul lato opposto rispetto alla profondità, essendo le stazioni più superficiali (5 m).

La stazione POS.12 ha i valori più alti di copertura percentuale, (circa 9.8), rimane infatti isolata rispetto alle altre nello stesso quadrante del parametro della copertura. Altri valori di copertura percentuale sono stati registrati anche nelle stazioni POS.15, POS.19 e POS.20, che infatti si trovano nello stesso quadrante.

Nelle Tabelle 9 e 10 sono riportati i valori corrispondenti alle posizioni delle stazioni e dei parametri sugli assi e nelle Figure 27 e 28, le PCA tra componenti 1-3 e 2-3, rispettivamente.

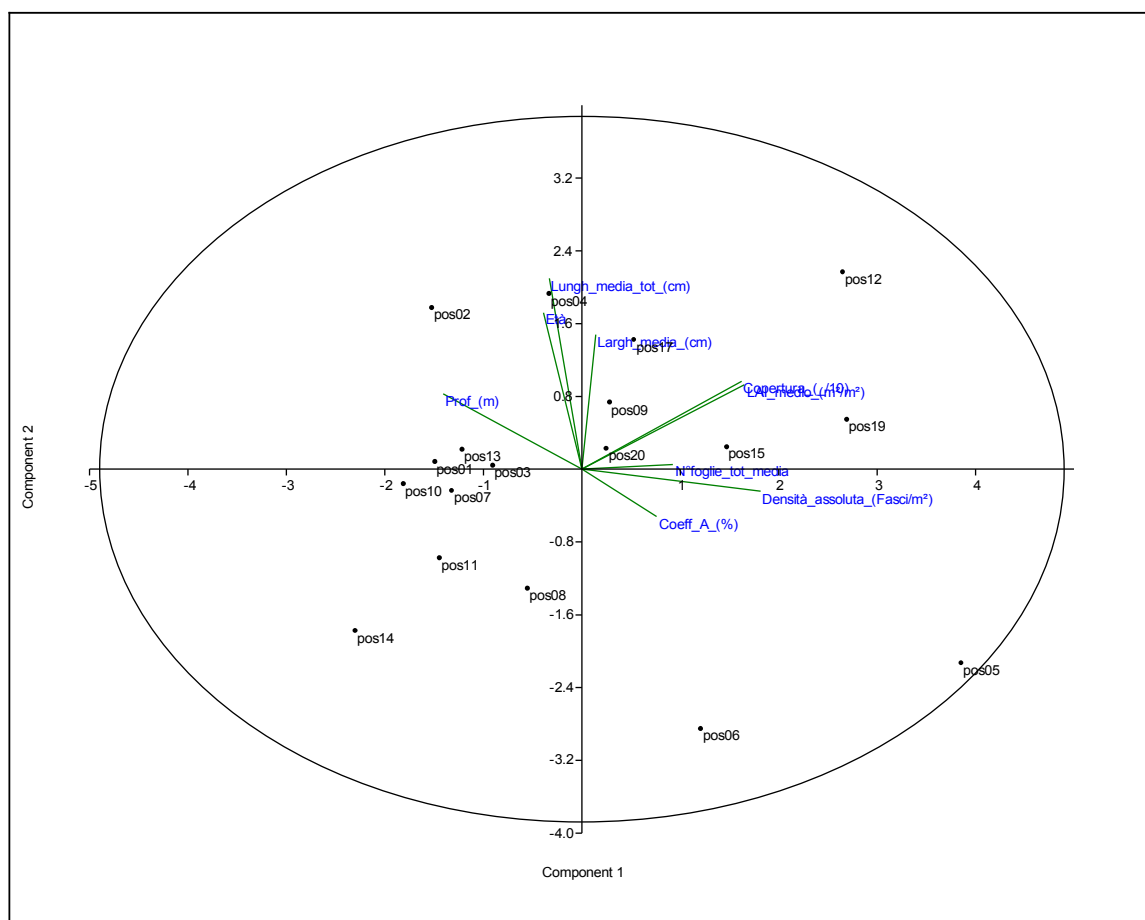


Fig.26_PCA (Principal component analysis). PCA-biplot su 18 stazioni, (assi 1-2).

	Autovalori	% di varianza
1	3.10793	34.533
2	1.95123	21.68
3	1.34659	14.962
4	0.729796	8.1088
5	0.625538	6.9504
6	0.587835	6.5315
7	0.486947	5.4105
8	0.091959	1.0218
9	0.072175	0.80194

Tab.8_Autovalori e % di varianza.

	Asse 1	Asse 2	Asse 3	Asse 4	Asse 5	Asse 6	Asse 7	Asse 8	Asse 9
Pos_1	-1.4565	0.10109	-0.21425	-0.50276	-0.96084	0.21707	-0.20475	0.33228	-0.35788
Pos_2	-1.6397	2.1768	-1.3991	-0.81605	-1.5659	0.94449	-0.38977	-0.026313	0.35677
Pos_3	-0.89144	0.27278	-0.3908	1.0677	1.1773	1.4767	1.0074	0.338	0.27352
Pos_4	-0.064075	0.72743	-0.34584	-0.18715	-0.12505	-0.25456	-0.50226	0.11785	-0.16717
Pos_5	3.8395	-2.0629	-1.553	-1.0077	-0.53743	-0.87104	0.3755	0.15381	0.43122
Pos_6	1.3459	-2.827	0.31852	0.94892	0.00026819	1.1868	-1.0636	-0.023316	-0.061262
Pos_7	-1.1307	-0.75121	0.26529	-2.4767	1.2856	0.10996	0.29531	0.26607	-0.34241
Pos_8	-0.47828	-1.2152	-0.91248	0.30119	-0.22975	-0.01371	0.42993	-0.17259	-0.23441
Pos_9	0.25226	0.8406	0.17711	-0.1755	0.60381	-0.038566	-0.41594	-0.1157	0.074553
Pos_10	-1.7907	-0.30726	1.6002	0.31793	0.16229	-1.2439	-0.009589	0.38729	0.4531
Pos_11	-1.349	-1.1833	1.355	0.35331	-0.12714	-0.15718	-0.71554	0.3568	0.083453
Pos_12	2.5419	2.2633	1.5029	0.85648	-0.75636	-0.64594	0.435	0.34335	-0.36218
Pos_13	-1.6733	0.18568	1.2589	-0.38499	0.043539	-0.40004	0.075116	-0.92636	0.13653
Pos_14	-2.2322	-1.6401	-1.1242	1.0788	-0.44716	-0.87627	0.57419	-0.31725	-0.21661
Pos_15	1.4024	0.63029	-1.3568	0.3972	0.48077	-0.018215	-0.23775	-0.18753	-0.27845
Pos_17	0.31247	2.1023	-1.6399	0.61345	1.4135	-0.73171	-0.55057	-0.031981	0.11262
Pos_19	2.7245	0.45169	1.8692	-0.4744	0.18427	0.6125	0.053323	-0.45263	0.050075
Pos_20	0.28697	0.23488	0.58925	0.090254	-0.60167	0.70356	0.84395	-0.041776	0.048517

Tab.9_Posizioni delle stazioni lungo gli assi.

	Asse 1	Asse 2	Asse 3	Asse 4	Asse 5	Asse 6	Asse 7	Asse 8	Asse 9
PROFONDITA'	-0.4106	0.2259	0.07897	0.1677	0.4878	-0.4503	0.4908	0.08658	0.2384
DENS_ASS.	0.5119	-0.03851	-0.2139	0.06176	-0.07691	-0.3143	-0.07879	0.6115	0.4495
COPERTURA	0.4485	0.2852	0.2089	-0.05892	-0.2907	-0.03766	0.4089	-0.5411	0.3529
ETA'	-0.1454	0.5293	-0.2812	0.431	0.008879	0.01269	-0.5503	-0.2453	0.2656
N_FOGLIE	0.266	0.06083	-0.5193	-0.3077	0.6096	0.3906	0.1236	-0.1289	0.07186
LUNGHEZZA	-0.1059	0.6044	-0.02894	-0.02358	-0.2763	0.4379	0.3199	0.4731	-0.1668
LARGHEZZA	0.03236	0.3394	0.5363	-0.582	0.2545	-0.07337	-0.4063	0.1057	0.1047
COEFF_A	0.2237	-0.1464	0.5164	0.5433	0.3409	0.4686	-0.008093	0.1137	0.1137
LAI_MEDIO	0.4626	0.2835	0.02066	0.2227	0.2064	0.3572	-0.01206	-0.03239	-0.6959

Tab.10_Posizioni dei parametri lungo gli assi.

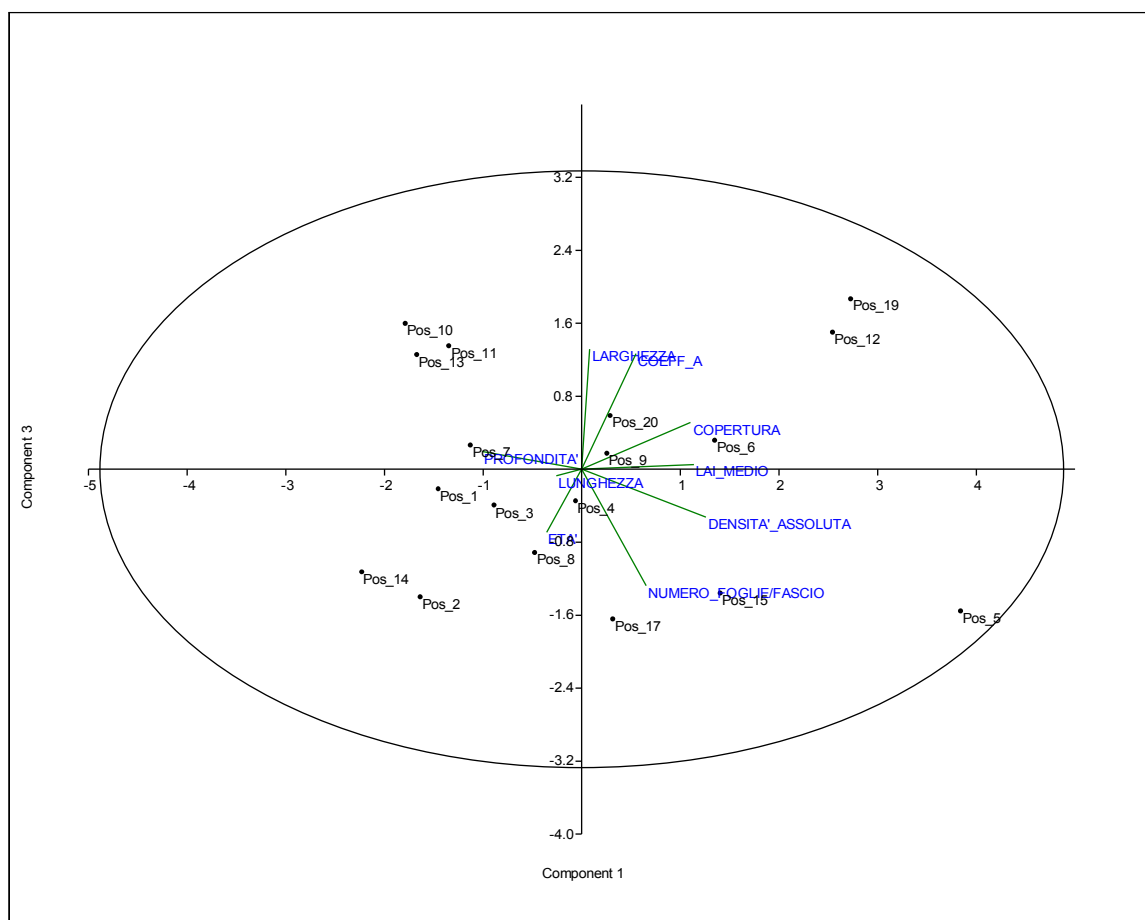


Fig.27_PCA (Principal component analysis). PCA-biplot su 18 stazioni, (assi 1-3).

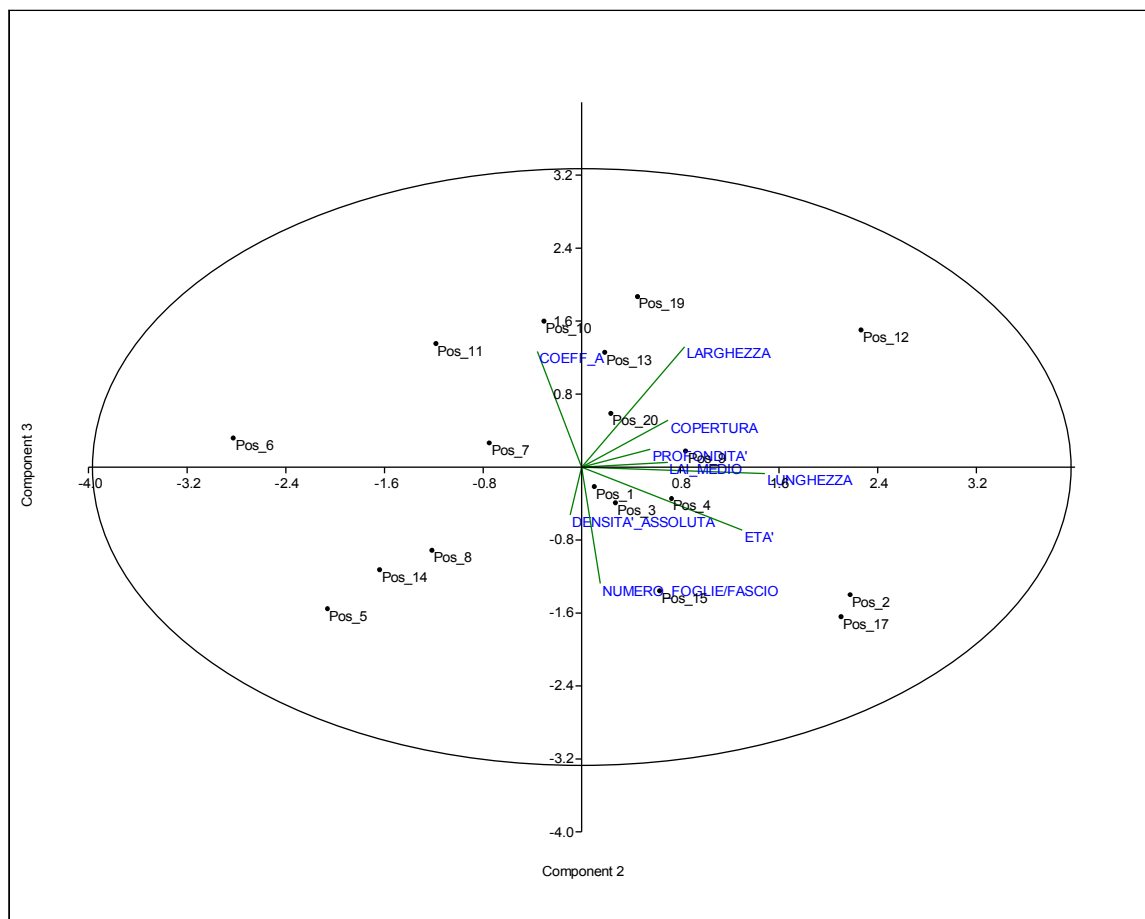


Fig.28_PCA (Principal component analysis). PCA-biplot su 18 stazioni, (assi 2-3).

4.2.3 Analisi dei parametri strutturali nei 3 range batimetrici

Per verificare l'effettivo andamento negativo della densità assoluta con la profondità, le stazioni sono state raggruppate in tre range batimetrici (5-8 m, 9-12 m, 13-16 m); nel box plot (Fig.29), si può osservare l'andamento negativo della densità dei fasci fogliari lungo il gradiente di profondità, con valori medi e mediani riportati in Tabella 11.

La significatività delle differenze nella varianza della densità assoluta è stata analizzata con il test statistico One-way ANOVA, dal quale è risultata una $p=1.353 \cdot 10^{-5}$ (l'ipotesi nulla viene quindi rifiutata e le differenze sono da considerarsi statisticamente significative, per $p<0.05$).

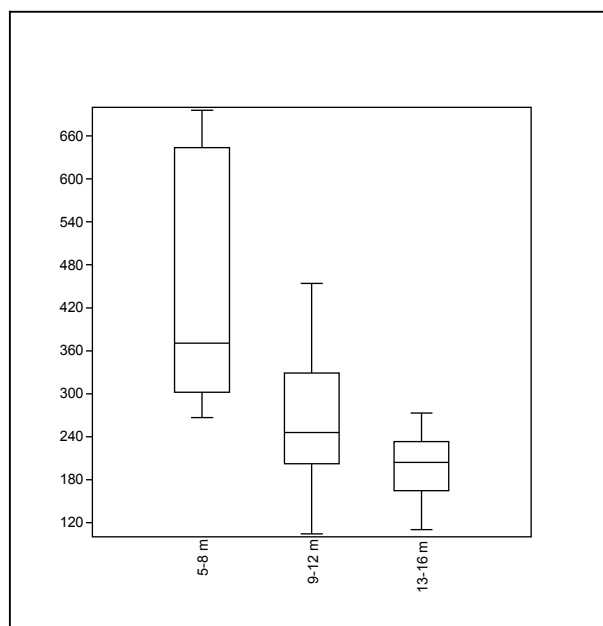


Fig.29_Box-plot: valori di densità assoluta nei 3 range batimetrici.

Densità assoluta per ciascun intervallo di profondità	5-8 m	9-12 m	13-16 m
Valore medio	436.11±182.25	248.96±86	197.28±45.9
Valore mediano	329.17	234.72	209.03

Tab.11_Valori di densità assoluta medi (con variazione di campo) e mediani per ciascun intervallo batimetrico.

Lo stesso trend negativo si verifica per il parametro della copertura percentuale (Fig.30), che decresce all'aumentare della profondità, con valori medi e mediani riportati in Tabella 12. Anche in questo caso l'ANOVA ha mostrato differenze significative nella varianza del parametro di copertura, con l'ipotesi H_0 rifiutata e $p=0.0117$.

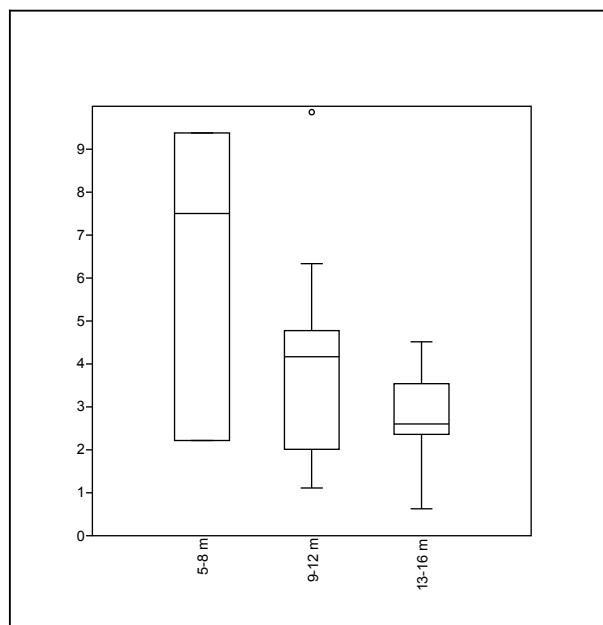


Fig.30_Box-plot: copertura, in decimi, nei 3 intervalli batimetrici.

Copertura per ciascun intervallo di profondità	5-8 m	9-12 m	13-16 m
Valore medio	6.4±3.7	4±2.6	2.73±1.4
Valore mediano	7.5	3.8	2.6

Tab.12_Valori di copertura medi (con variazione di campo) e mediani per ciascun intervallo batimetrico.

4.2.4 Analisi dei parametri strutturali nelle 3 tipologie di substrato

Le stazioni sono state poi suddivise in 3 *cluster* in base alla tipologia di substrato (roccia, roccia e sabbia, sabbia e *matte*). Come si può osservare nella Figura 31, la densità assoluta presenta il valore massimo per il substrato roccioso e valori più bassi per substrati misti (Tab.13). L'ANOVA ha calcolato valori di $p=0.0257$, mostrando significatività nelle differenze tra le medie della densità assoluta nelle 3 diverse tipologie di substrato.

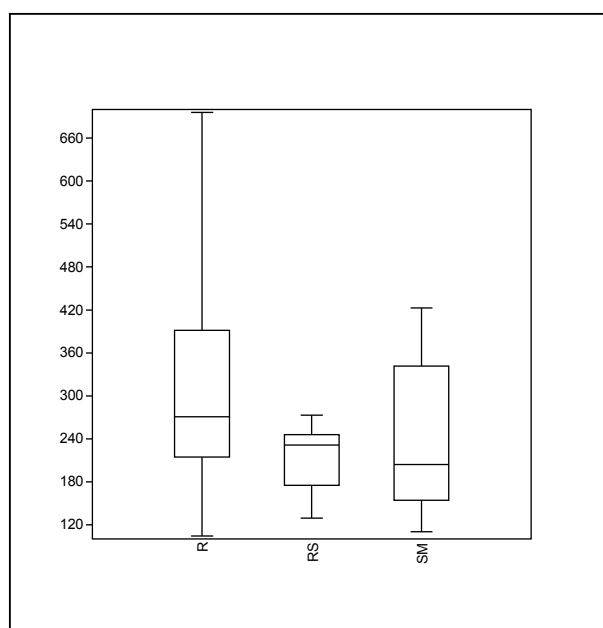


Fig.31_Box-plot: densità assoluta per ciascuna tipologia di substrato (R=roccia; RS=roccia e sabbia; SM=sabbia e *matte*).

Densità assoluta per ciascuna tipologia di substrato	Roccia	Roccia e sabbia	Sabbia e <i>matte</i>
Valore medio	306.25±153.6	213.45±29.9	234.86±105.64
Valore mediano	265.3	218.75	179.17

Tab.13_Valori di densità assoluta medi (con variazione di campo)e mediani per ciascuna tipologia di substrato.

Tuttavia, indagando i valori di copertura percentuale del fondale (Fig.32, Tab.14), si osserva un andamento diverso; la colonizzazione del substrato da parte delle piante risulta maggiore su substrati di “sabbia e *matte*” (46.9%) rispetto a substrati rocciosi e substrati misti di “roccia e sabbia”(rispettivamente 45.8% e 26.3%); tuttavia, le differenze nella varianza del parametro di copertura, testate con ANOVA (One-way) non sono risultate essere statisticamente significative ($p = 0.134$).

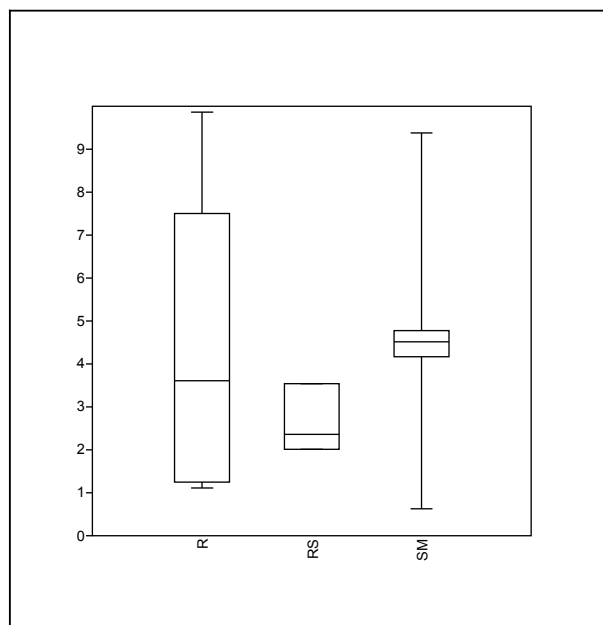


Fig.32_Box-plot: valore medio di copertura per ciascuna tipologia di substrato.

Copertura per ciascuna tipologia di substrato	Roccia	Roccia e sabbia	Sabbia e matre
Valore medio	3.64±2.36	2.63±0.65	4.67±3.6
Valore mediano	3.6	2.5	4.52

Tab.14_Valori di copertura medi (con variazione di campo)e mediani per ciascuna tipologia di substrato.

4.2.5 Analisi dei parametri strutturali nelle 3 popolazioni identificate

Alla luce dei risultati genetici, un terzo raggruppamento delle stazioni è stato effettuato sulla base della popolazione (di dati) di appartenenza (nominate NORD, CENTRO e SUD, dal momento che seguono un andamento filogeografico).

La zona settentrionale (POS.01, POS.02, POS.03, POS.04, POS.05), coincidente con il tratto di costa compreso tra Marina di Tarquinia e Torre Valdaliga, è caratterizzata dalla presenza delle foci del fiume Marta e Mignone e dalle attività dovute alle due centrali elettriche (Enel e Tirreno Power) e ad un impianto di acquacultura.

Nell'area centrale (POS.06, POS.19, POS.07, POS.20, POS.08, POS.09, POS.10), da Torre Valdaliga a Capo Linaro, ricade la foce del fiume Marangone e le opere antropiche più importanti sono rappresentate dal porto di Civitavecchia e da due porti turistici.

Nell'area meridionale (POS.11, POS.12, POS.13, POS.14, POS.15, POS.17), da Capo Linaro a Santa Severa, oltre all'elevato turismo estivo, alla nautica da diporto e alle attività amatoriali che caratterizzano l'intera area, si trova la foce del Rio Fiume, situata

in prossimità della stazione POS.14.

In Figura 33 è possibile osservare la distribuzione dei valori medi di densità assoluta e copertura percentuale lungo il gradiente geografico da nord a sud.

Per quanto riguarda la densità assoluta, la zona meridionale e la zona centrale mostrano i valori più bassi (Tab.15), mentre il settore settentrionale mostra il valore più elevato.

Le differenze nella varianza della densità assoluta (One-way ANOVA) non sono statisticamente significative ($p=0.435$).

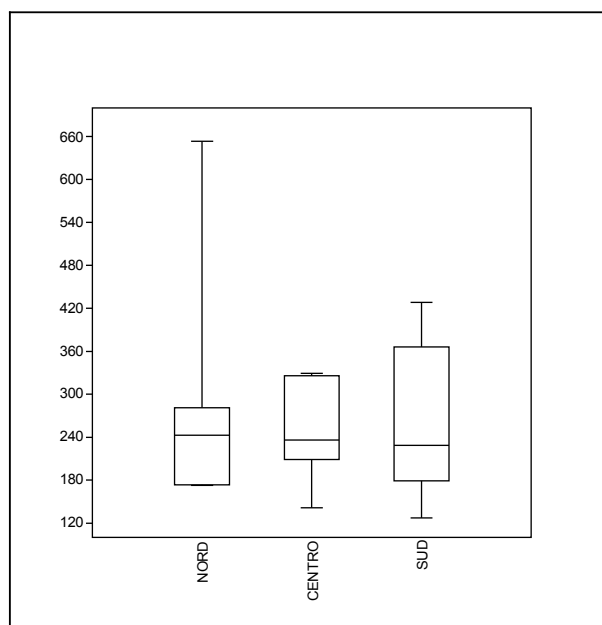


Fig.33_Box-plot: densità assoluta per ciascuna popolazione identificata.

Densità assoluta per ciascun settore geografico	Nord	Centro	Sud
Valore medio	304.8±200	248.61±66	253.35±117.73
Valore mediano	242.7	236.11	209.72

Tab.15_Valori di densità assoluta medi (con variazione di campo)e mediani per ciascuna popolazione identificata.

La copertura percentuale del fondale risulta invece maggiore per il settore Sud (con differenze statistiche non significative per $p=0.155$) (Fig.34, Tab.16): il settore meridionale è caratterizzato da substrati prevalentemente sabbiosi (Fig.35), mentre nel settore centrale le praterie prese in esame si trovano principalmente su roccia; questo spiega la distribuzione dei valori di copertura nelle 3 popolazioni.

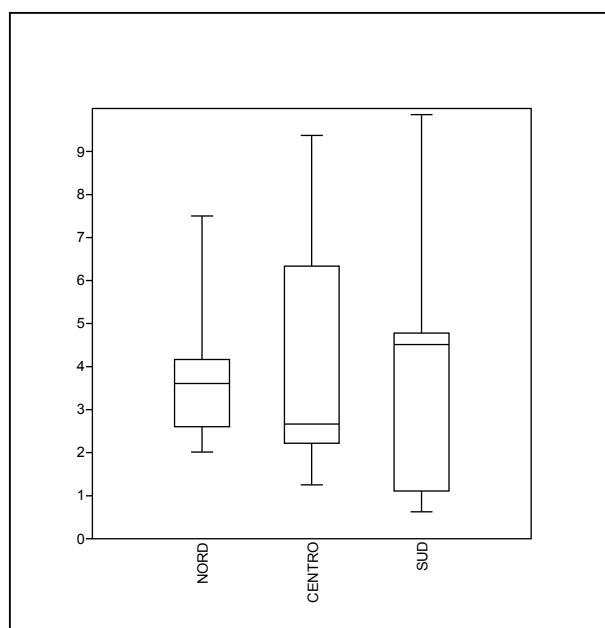


Fig.34_Istogramma a barre: copertura per ciascuna popolazione identificata.

Copertura per ciascun settore geografico	Nord	Centro	Sud
Valore medio	3.98±2.14	4.1±2.88	4.07±3.32
Valore mediano	3.6	2.66	4.03

Tab.16_Valori di copertura medi (con variazione di campo)e mediani per ciascun settore geografico.

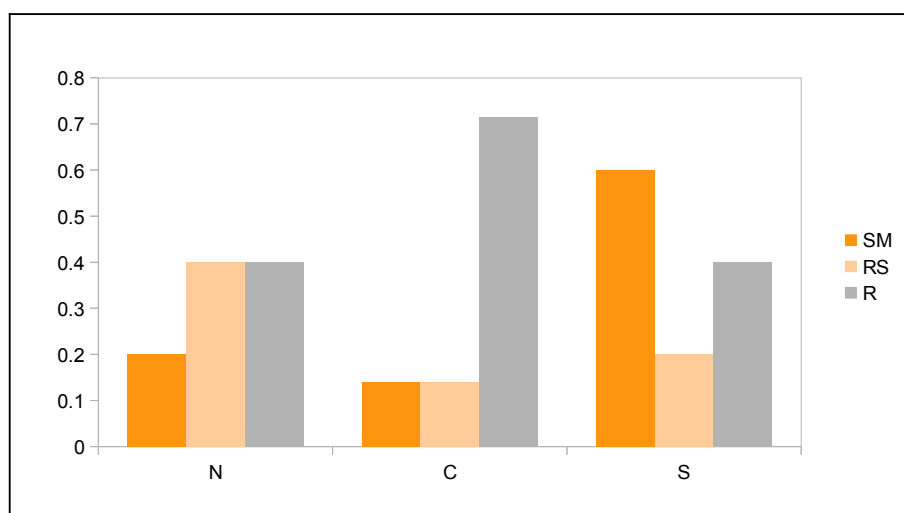


Fig.35_Frequenze relative dei diversi substrati nelle 3 popolazioni identificate.

La copertura percentuale risulta più elevata per substrati composti da “sabbia e *matte*” e per il settore Sud; osservando la Figura 35 si può infatti notare che l'area meridionale è prevalentemente caratterizzata da stazioni situate su sabbia e *matte*.

Il valore di densità assoluta è più basso per sabbia e *matte* e più elevato per substrati rocciosi; infatti per il settore sud, caratterizzato da SM, i valori sono bassi e invece per i settori di Nord e centro, rappresentati prevalentemente da substrati rocciosi, i valori sono più elevati.

4.3_Studio del limite inferiore delle praterie

In Tabella 17 si riportano la profondità, la tipologia di substrato ed i valori medi ($\pm$ deviazione standard) dei principali parametri di macroripartizione (densità e copertura) delle quattro praterie prese in esame in questo studio, in prossimità del limite inferiore. Il valore medio della densità assoluta varia da 133.3 fasci/m² (stazione PB1) a 271.9 fasci/m² (stazione PB3).

Raggruppando le stazioni per settore geografico (Nord= settore a Nord del porto; Centro=settore compreso tra la parte Sud del porto di Civitavecchia e Capo Linaro; Sud= a Sud di Capo Linaro), si nota che il valore medio di densità assoluta è maggiore per le stazioni a Sud del porto, rispetto a quelle a Nord, con valori rispettivamente di 137 fasci/m² e 235 fasci/m².

Va sottolineato che le differenze nella densità delle piante di *Posidonia oceanica* in prossimità del limite inferiore, non dipendono solamente dalle differenze nello stato di salute della prateria stessa, ma anche dalla tipologia di limite; infatti, in praterie che presentano un limite inferiore di tipo netto o erosivo, la densità dei fasci fogliari si interrompe bruscamente, quindi si registrano valori simili a quelli interni alla prateria. Di contro, in praterie con limite inferiore di tipo progressivo o erosivo, si ha un andamento rispettivamente crescente e decrescente verso le batimetrie più elevate, quindi, campionando le piante in prossimità del limite, si possono registrare densità minori rispetto a quelle interne alla prateria. I valori medi di copertura percentuale sono invece risultati maggiori per le stazioni meridionali rispetto a quelle settentrionali, rispettivamente con 5.73 e 2.66 %.

Stazione	Profondità	Substrato	Densità assoluta ($\pm$ dev. st.)	Copertura ($\pm$ dev. st.)
PB0	19.5	SABBIA E MATTE	140.62 $\pm$ 29.77	2.16 $\pm$ 1.69
PB1	21	SABBIA E MATTE	133.33 $\pm$ 19.23	3.16 $\pm$ 1.94
PB2	20	SABBIA	198.96 $\pm$ 26.04	6.83 $\pm$ 0.75
PB3	13	SABBIA, ROCCIA E MATTE	271.87 $\pm$ 34.63	4.66 $\pm$ 1.63

Tab.17_Parametri ambientali e strutturali relativi alle 4 praterie esaminate.

Nella Tabella 18 sono riportati i parametri relativi alla tipologia di limite in ciascuna stazione, alla tipologia di prateria, al rapporto tra fasci ortotropi e plagiotropi, alla percentuale della *matte*, allo scalzamento dei rizomi plagiotropi ed ortotropi e allo scalzamento percentuale della prateria.

Nelle due stazioni a Nord del Porto di Civitavecchia il limite inferiore delle praterie è di tipo progressivo (infatti c'è una bassa percentuale di *matte* morta, 10-20%), la prateria è pura, il rapporto tra fasci ortotropi e plagiotropi è di circa 30-70 e lo scalzamento totale della prateria è di circa il 30 %.

In PB0 lo scalzamento medio dei rizomi ortotropi e di quelli plagiotropi è rispettivamente di 5.02 e 4.16 cm.

In PB1 lo scalzamento medio dei rizomi ortotropi e di quelli plagiotropi è rispettivamente di 6.2 e 3.68 cm.

La stazione PB2 presenta un limite inferiore di tipo netto (caratterizzato dalla totale assenza di *matte*), una prateria pura, un rapporto 50-50 tra fasci ortotropi e plagiotropi ed uno scalzamento della prateria del 50%. Lo scalzamento dei rizomi ortotropi e plagiotropi è rispettivamente di 4.68 e 5.04 cm.

Infine, la stazione PB3 presenta un limite di tipo regressivo, (caratterizzato dalla presenza di *matte* morta sulla quale persistono isolati ciuffi vivi), una prateria mista (con circa il 5% di *Cymodocea nodosa*), una percentuale di *matte* del 50%, un rapporto tra rizomi ortotropi e plagiotropi di 50-50 ed uno scalzamento della prateria del 100%. Lo scalzamento dei rizomi ortotropi e plagiotropi è rispettivamente di 7.24 e 6 cm.

Stazione	Tipologia limite	Tipologia prateria	Ortotropi/plagitropi	Matte (%)	Scalzamento medio rizomi ortotropi (cm)	Scalzamento medio rizomi plagitropi (cm)	Scalzamento medio prateria (%)
PB0	Progressivo	Pura	30-70	20	5.02	4.16	30
PB1	Progressivo	Pura	30-70	10	6.2	3.68	30
PB2	Netto	Pura	50-50	0	4.68	5.04	50
PB3	Regressivo	Mista	50-50	50	7.24	6	100

Tab. 18_Principali parametri descrittivi del limite inferiore di *Posidonia oceanica* per le 4 stazioni esaminate.

Nelle Tabelle 15, 16 e 17 sono riportati i valori dei parametri stimati dalle analisi fenologiche dei fasci fogliari.

In Tabella 19 si possono osservare le i valori relativi al numero di foglie medio per fascio fogliare e al numero di foglie relativo a ciascuno dei 3 ranghi fogliari (giovani, intermedie ed adulte). Non sono state registrate differenze significative tra le stazioni (Anova One-Way con $p>0.05$) per nessuno dei 4 parametri esaminati.

Stazione	N medio foglie/fascio	N foglie giovani	N foglie intermedie	N foglie adulte
PB0	5.6	0	4.2	1.4
PB1	6.3	0.3	4.3	1.6
PB2	5.7	0.5	3.8	1.4
PB3	5.2	0.8	3	1.4

Tab.19_Numero di foglie medio, per fascio e per rango fogliare (giovani, intermedie, adulte) nelle 4 stazioni esaminate.

In Tabella 20 sono invece rappresentate le dimensioni fogliari (lunghezza e larghezza) per ciascuno dei 3 ranghi fogliari e le dimensioni di base e lembo fogliare per quanto riguarda la foglia più adulta.

Non ci sono differenze da rilevare nella lunghezza e nella larghezza delle foglie giovani, né nella lunghezza della base della foglia più adulta, né nella larghezza delle foglie appartenenti a ciascun rango fogliare. La lunghezza delle foglie intermedie varia invece da 15.6 cm (PB3) a 22.4 cm (PB0). Le foglie intermedie delle due stazioni del settore Nord sono mediamente più lunghe di quelle del settore Sud, rispettivamente con valori di 21.5 e 16.15 cm.

Stazione	Lunghezza- larghezza foglie giovani	Lunghezza- larghezza foglie intermedie	Lunghezza- larghezza foglie adulte	Lunghezza base (foglia adulta)	Lunghezza lembo (foglia adulta)
PB0	-	22.4 - 0.9	13.6 - 1	3.9	9.7
PB1	2.7 - 0.9	20.6 - 1	15.5 - 1	3.5	12.1
PB2	2.4 - 1	16.7 - 1	10.4 - 1	3.8	6.6
PB3	2.5 - 0.9	15.6 - 1	13.4 - 1	3.8	9.7

Tab.20_ Valori medi di lunghezza e larghezza delle foglie nelle 4 stazioni esaminate.

Anche l'indice di superficie fogliare, o LAI (cm²/fascio) è risultato essere maggiore nelle stazioni a Nord de Porto di Civitavecchia, rispetto a quelle più meridionali, rispettivamente con valori medi di 106.4 e 78.45 cm²/fascio fogliare, (Tab.21).

Il valore di coefficiente a presenta valori compresi tra 11.05 % (stazione PB3) e 22.2 % nella stazione PB2.

La biomassa media del comparto epigeo (fogliare) ha mostrato il valore minimo nella stazione PB3 (0.2023 g) e il valore massimo nella stazione PB0 (0.3446 g).

Stazione	LAI medio (cm ² /fascio)	Coefficiente a (%)	Biomassa fogliare (g)
PB0	102.8	14.3	0.3446
PB1	110	13.8	0.3192
PB2	79.6	22.2	0.3211
PB3	77.3	11.05	0.2023

Tab.21_ Valori medi della superficie fogliare, del coefficiente a e della biomassa fogliare nelle 4 stazioni esaminate.

Secondo la scala di valutazione di Giraud ci troviamo in “acque torbide” in prossimità della stazione PB3 e in “acque poco trasparenti” nelle altre 3 stazioni.

In Figura 36 si riportano le curve di frequenza cumulata nei campioni di sedimento prelevati in ciascuna delle 4 stazioni, le quali mostrano una forte prevalenza della componente sabbiosa grossolana.

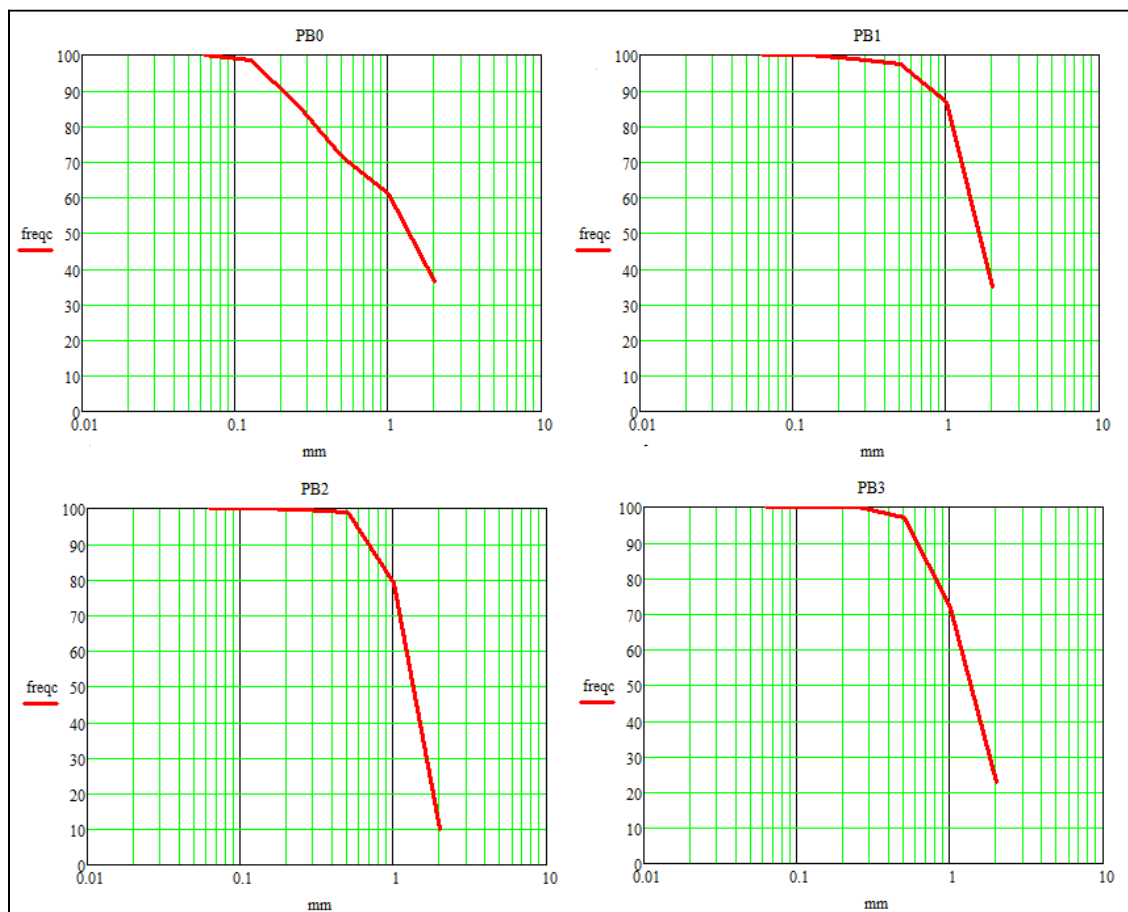


Fig. 36_Curve granulometriche nei quattro siti di campionamento.

4.4_Analisi della produzione primaria tramite metodo lepidocronologico e dati fenologici

4.4.1 Campionamento di Maggio 2013

Calcolare la produzione primaria sulla metà delle stazioni ha fornito le informazioni preliminari (Maggio 2013), da approfondire nel corso della seconda campagna di monitoraggio, tenutasi nel Novembre 2014. Nella seconda fase è stato quindi possibile ripetere alcune analisi ed integrare queste misure con i valori di efficienza fotosintetica ottenuti tramite il fluorimetro PAM (Pulse Amplitude Modulation).

Per quanto riguarda il campionamento effettuato nel 2013 in ciascuna delle 9 stazioni, il numero medio annuo di foglie prodotte varia da 6.06 a 7.8; la lunghezza media delle foglie più adulte tra i campioni analizzati varia da 8 a 62.6 cm; la densità assoluta media dei fasci fogliari ha un range di valori medi compreso tra 127.08 e 281.25 fasci/m².

I valori medi di produzione fogliare presentano variazioni comprese tra 56.74 g m⁻² anno⁻¹ (POS.14) e 308.58 g m⁻² anno⁻¹ (POS.08) e i valori di produzione rizomica da 5.35

$\text{g m}^{-2} \text{ anno}^{-1}$ (POS.11) a $11.86 \text{ g m}^{-2} \text{ anno}^{-1}$ (POS.04).

I parametri presi in considerazione in questa fase del progetto sono: produzione fogliare (sia assoluta che in relazione alla densità), produzione del rizoma (sia assoluta che in relazione alla densità) e produzione totale, per ciascun sito di campionamento (Tab.22).

Stazione	Produzione fogliare (g/anno)	Produzione fogliare (g/m ² /anno)	Produzione del rizoma (g/anno)	Produzione del rizoma (g/m ² /anno)	Produzione TOT (g/m ² /anno)
POS01	0.64	111.549	0.034	6.014	117.564
POS02	0.81	140.046	0.045	7.835	147.881
POS03	0.71	173.489	0.039	9.706	136.025
POS04	0.46	129.701	0.042	11.863	141.564
POS08	1.31	308.586	0.032	7.673	316.259
POS10	0.66	137.217	0.048	10.064	147.281
POS11	0.38	73.288	0.028	5.347	78.635
POS13	1.11	199.610	0.045	8.131	207.741
POS14	0.36	56.742	0.042	6.681	63.424

Tab.22_Valori di produzione fogliare, produzione del rizoma e produzione totale nelle 9 stazioni esaminate.

Le correlazioni lineari (RMA, Asse maggiore Ridotto) tra la lunghezza del lembo fogliare e la lunghezza della base, che hanno permesso di ricavare le equazioni di regressione tramite le quali effettuare il calcolo della produzione fogliare, sono risultate essere positive sia per le 9 stazioni, che per l'intera area di studio (Fig.37-45 e Fig.48).

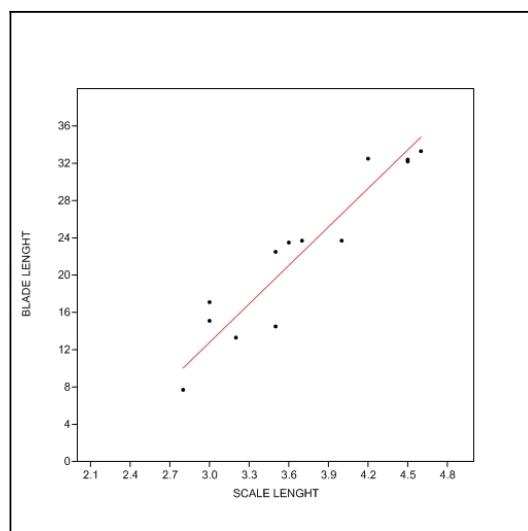


Fig.37_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_1
($r = 0.942$; $r^2 = 0.887$; $y = 13.766x - 28.511$).

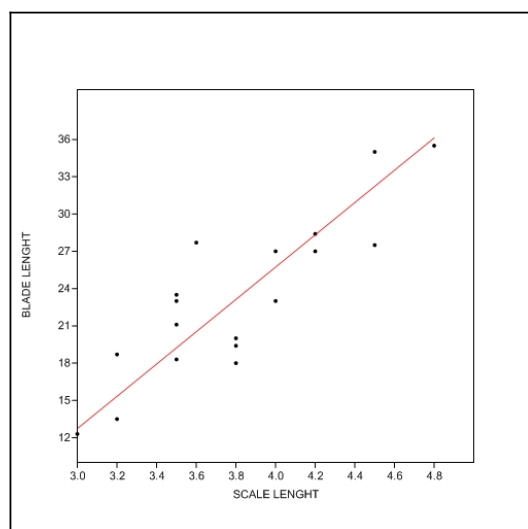


Fig.38_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_2
($r = 0.860$; $r^2 = 0.741$; $y = 12.993x - 26.246$).

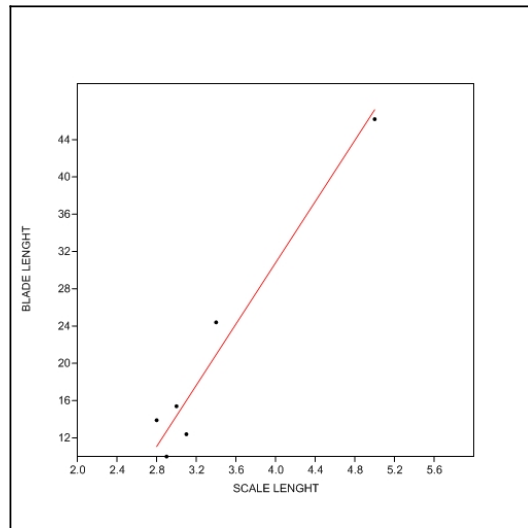


Fig.39_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_3
($r=0.976$; $r^2=0.954$; $y=16.427x-34.920$).

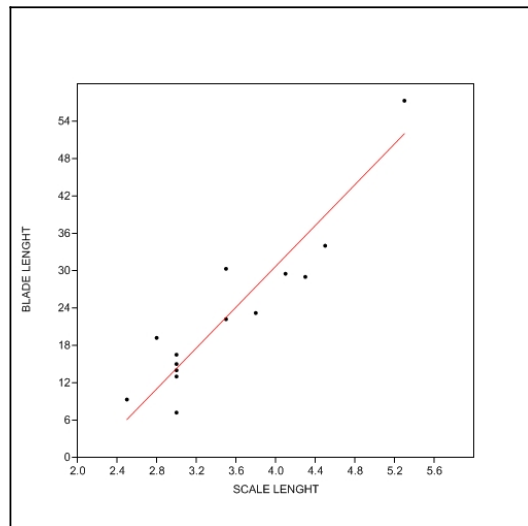


Fig.40_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_4
($r=0.927$; $r^2=0.859$; $y=16.398x-34.910$).

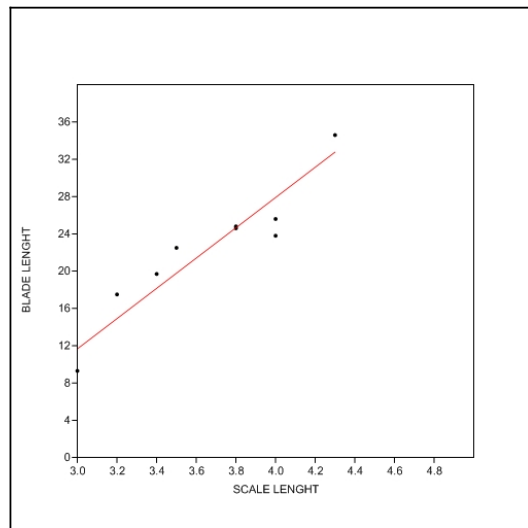


Fig.41_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_8
($r=0.904$; $r^2=0.818$; $y=12.937x-24.958$).

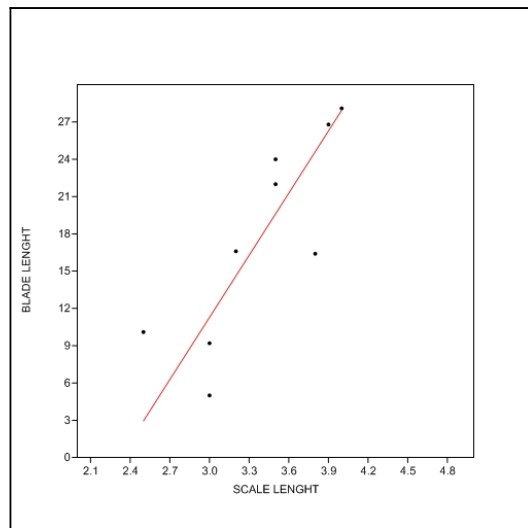


Fig.42_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_10
($r=0.823$; $r^2=0.678$; $y=16.667x-38.719$).

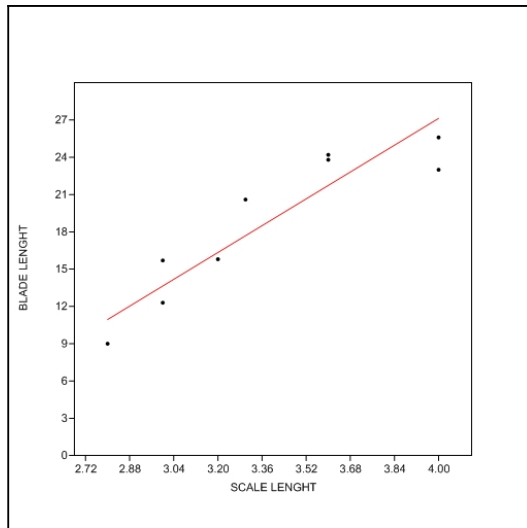


Fig.43_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_11
($r=0.913$; $r^2=0.833$; $y=13.487x-26.817$).

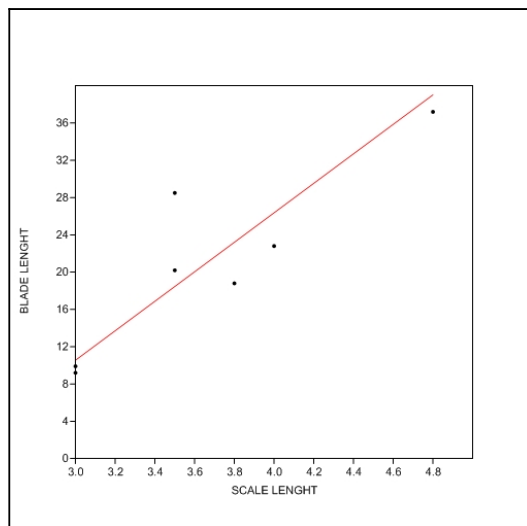


Fig.44_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_13
($r=0.880$; $r^2=0.774$; $y=15.819x-36.909$).

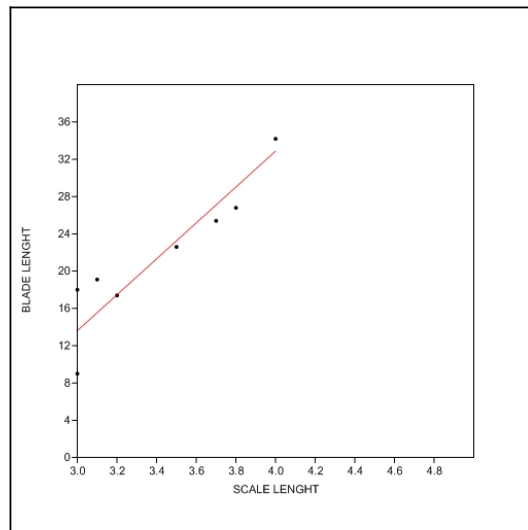


Fig.45_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_14
($r=0.920$; $r^2=0.847$; $y=19.269x-44.194$).

L'analisi delle Componenti Principali (PCA, Fig.46) è stata applicata al data-set, sulla base di 5 parametri: la superficie fogliare, la produzione del rizoma, la produzione fogliare, la densità assoluta e il numero medio annuo di foglie. Le prime due componenti, ottenute dal bi-plot, spiegano circa il 65% della varianza e le prime 3 più dell'80%, sintetizzando le relazioni tra le variabili (Tab.23).

La prima componente principale (C1) considera l'intero set delle 5 variabili esaminate, che risultano essere distribuite sullo stesso lato del PCA-biplot, sintetizzando l'informazione. La seconda componente (C2), invece, mostra le differenze tra le variabili (Fig.46); infatti, produzione epigea ed ipogea e densità assoluta, sono i parametri che spiegano maggiormente la distribuzione di questo data-set, distanziandosi l'uno dall'altro e mostrando segno opposto. Osservando la distribuzione delle variabili è possibile notare che la linea della produzione del rizoma, unico parametro riferito al comparto ipogeo, è isolato dagli altri 4 parametri, che sono invece strettamente legati al comparto fogliare.

Sulla base di C2, le stazioni si distribuiscono in 4 cluster:

- la stazione POS.14 è isolata dalle altre, poichè mostra il valore di densità assoluta più basso dell'intera area, con 127.1 fasci/m² (Fig.47). Si trova infatti nel quadrante opposto al parametro della densità assoluta.
- Di contro, POS.03, POS.04 e POS.08, rispettivamente a Nord e a Sud del porto di Civitavecchia, presentano i valori più elevati di densità assoluta, e POS.04 è più vicina alla linea “densità assoluta”, poichè è la stazione che ha il valore di densità assoluta più

alto dell'intero data-set.

- POS.02, POS.10 e POS.13 sono vicine tra di loro perchè mostrano i valori più elevati di produzione del rizoma; sono infatti nello stesso quadrante del parametro “P. ipogea”. E' interessante notare che questi 3 siti di campionamento si trovano tutti su substrati misti (sabbia e *matte* per POS.02 e POS.13, e sabbia e roccia per POS.10). Infatti, su questa tipologia di substrato, le piante sono in grado di produrre, attraverso le radici, una maggiore biomassa rispetto a piante situate su substrati totalmente rocciosi.
- POS.01 e POS.11 formano un cluster sulla base del parametro “N”, infatti mostrano entrambi un basso numero medio di foglie/fascio fogliare. Sono anche le stazioni che mostrano il più basso valore di produzione del rizoma, infatti si trovano nel quadrante opposto rispetto alla linea della produzione ipogea.

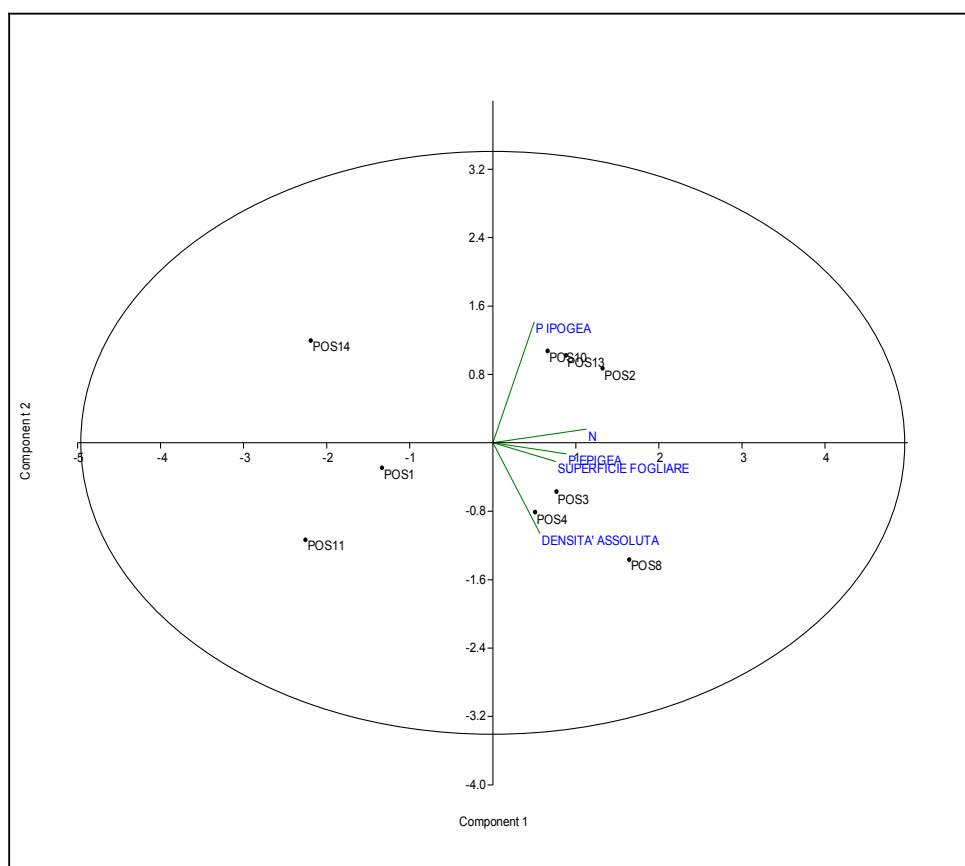


Fig.46_PCA-biplot in 9 stazioni (A=superficie fogliare, B=produzione ipogea; C=produzione epigea, D=densità assoluta, E=numero medio di foglie/anno).

PC	Autovalori	% variance
1	2.2734	45.468
2	1.07654	21.531
3	0.875397	17.508
4	0.711409	14.228
5	0.0632532	1.2651

Tab.23_PCA (Principal Components Analysis): autovalori e % di varianza.

	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5
POS1	-1.335	-0.29145	-0.74678	0.73971	0.32552
POS2	1.3226	0.87331	-0.50297	1.698	-0.20023
POS3	0.76657	-0.56934	0.58248	0.23547	0.028393
POS4	0.50977	-0.81018	1.83	0.20801	0.23365
POS8	1.643	-1.3645	-1.0716	-0.88617	-0.055526
POS10	0.66056	1.0754	0.79049	-0.73208	-0.32478
POS11	-2.2565	-1.1338	-0.2756	0.0037816	-0.34484
POS13	0.88097	1.0237	-0.78854	-0.77228	0.26899
POS14	-2.1919	1.1969	0.18246	-0.49444	0.068816

Tab.24_Posizioni delle stazioni lungo gli assi.

0	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5
SUP_FOGLIARE	0.4248	-0.1226	-0.08711	0.8927	7.209E-05
P_rizoma_(mg)	0.2777	0.7885	0.4094	0.0161	0.3651
P_fogliare_(mg)	0.4959	-0.07156	-0.6342	-0.3077	0.5021
dens_ass	0.3172	-0.5917	0.6481	-0.169	0.3174
N	0.6292	0.08947	0.05123	-0.282	-0.7169

Tab.25_Posizioni dei parametri lungo gli assi.

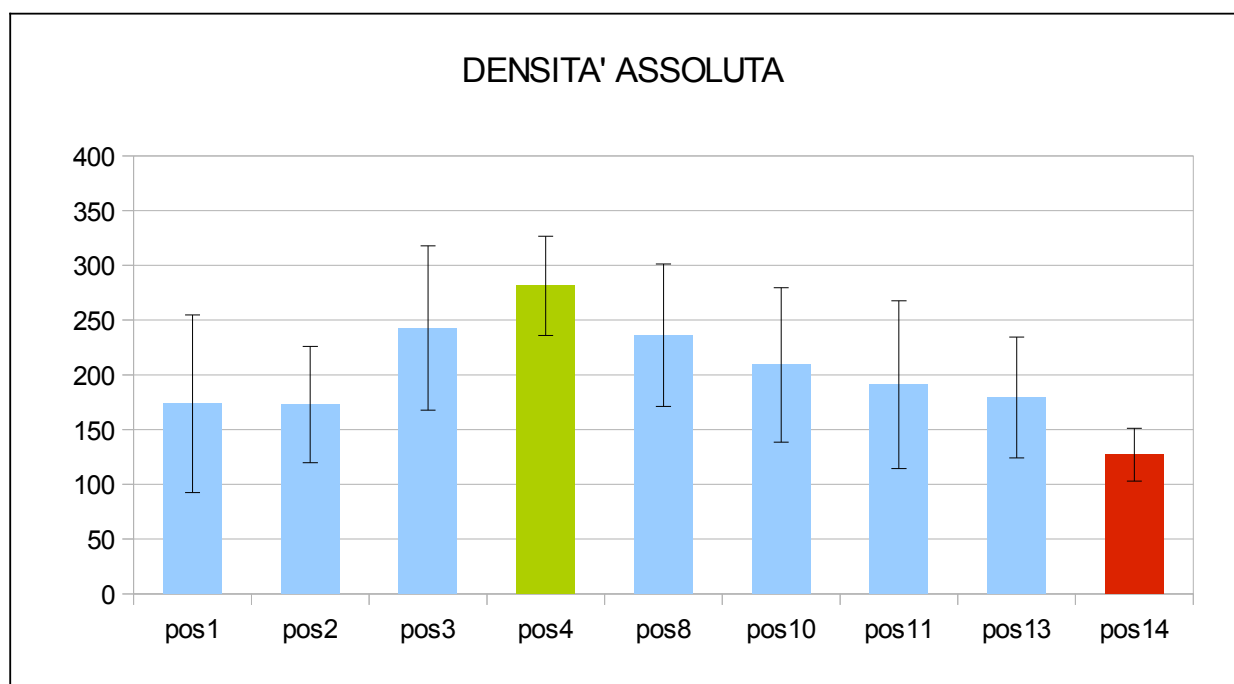


Fig.47_Istogramma a barre: densità assoluta e variazione di campo delle 9 stazioni in cui è stata calcolata la produzione primaria.

La produzione primaria, sia fogliare che ipogea, è stata calcolata anche per l'intera area di studio (verificando la correlazione tra base e lembo fogliare per tutte le stazioni dell'area di studio). La correlazione lineare tra lunghezza della base e lunghezza del lembo è risultata essere positiva (Fig.48). I valori di produzione totali, calcolati per l'intera area di studio, sono: 0.69 g anno^{-1} per la produzione fogliare, $135.67 \text{ g m}^{-2} \text{ anno}^{-1}$ per la produzione fogliare al m^2 , 0.04 g anno^{-1} per la produzione del rizoma, $7.88 \text{ g m}^{-2} \text{ anno}^{-1}$ per la produzione del rizoma al m^2 , 0.73 g anno^{-1} per la produzione totale, $143.56 \text{ g m}^{-2} \text{ anno}^{-1}$ per la produzione totale al m^2 .

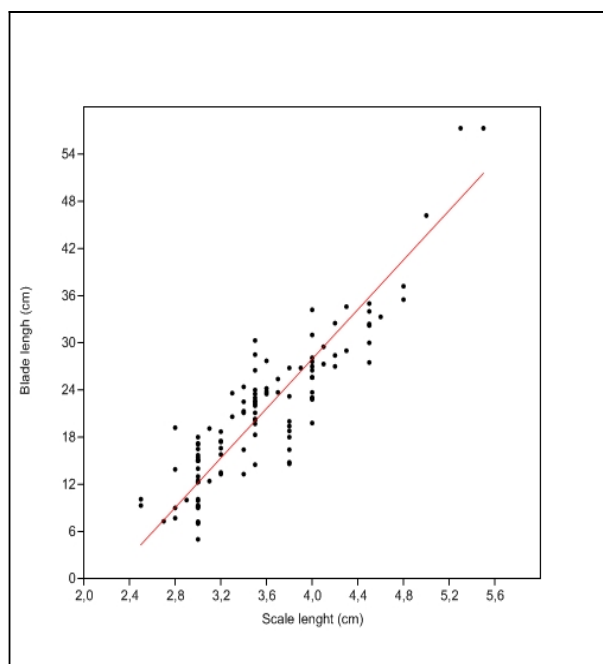


Fig.48_RMA tra lunghezza del lembo fogliare e lunghezza della base fogliare, calcolate per l'intera area di studio.

4.4.2 Campionamento di Novembre 2014

Durante la seconda campagna di campionamento è stato possibile effettuare nuovamente il calcolo della produzione (da metodo lepidocronologico) sulle 9 stazioni precedentemente analizzate, in modo da acquisire un maggior numero di dati su ciascun sito. I risultati e gli andamenti dei parametri di produzione lungo l'area di studio, ottenuti nel 2014, confermano le condizioni già osservate nel 2013 e precedentemente descritte. Anche in questo caso le rette di regressione tra la base ed il lembo fogliare della foglia più adulta hanno mostrato coefficienti di determinazione altamente significativi (sempre >0.85) per le 9 stazioni. Queste correlazioni lineari (RMA=Asse Maggiore Ridotto), che hanno permesso di ricavare le equazioni di regressione tramite le quali effettuare il calcolo della produzione fogliare, sono riportate da Figura 49 a Figura 57.

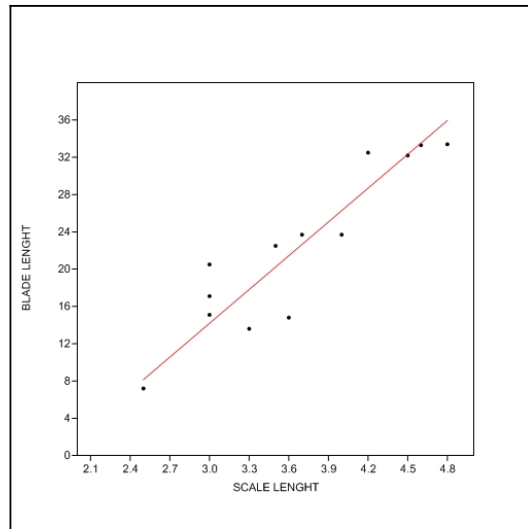


Fig.49_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_1
($r=0.91$; $r^2=0.84$; $y=12.087x-22.072$).

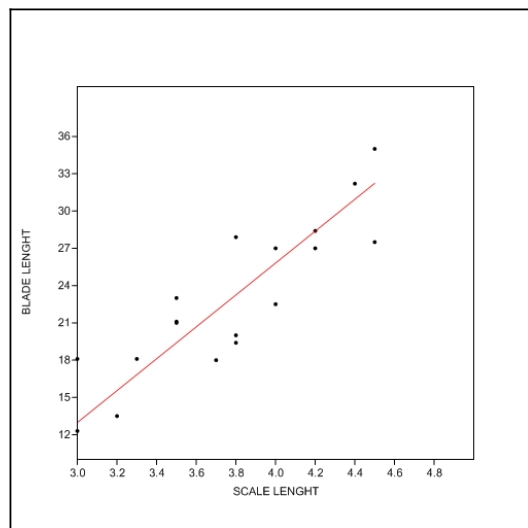


Fig.50_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_2
($r=0.87$; $r^2=0.76$; $y=12.831x-25.512$)

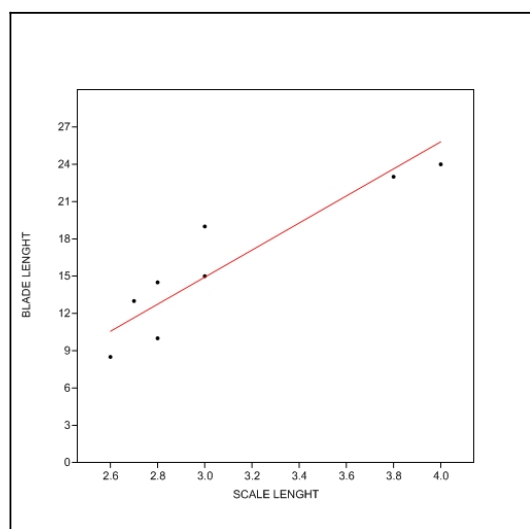


Fig.51_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_3
($r=0.91$; $r^2=0.84$; $y=10x-15$).

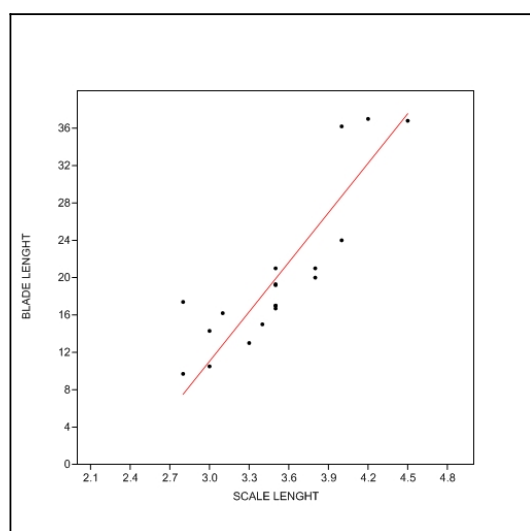


Fig.52_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_4
($r=0.86$; $r^2=0.75$; $y=15.328X-33.74$).

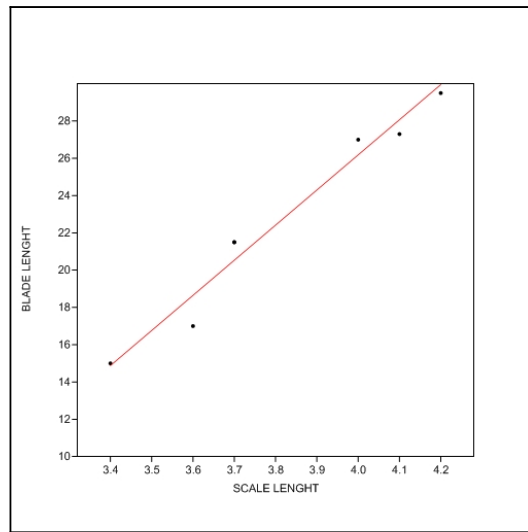


Fig.53_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_8
($r=0.9832$; $r^2=0.967$; $y=18.525x-47.975$).

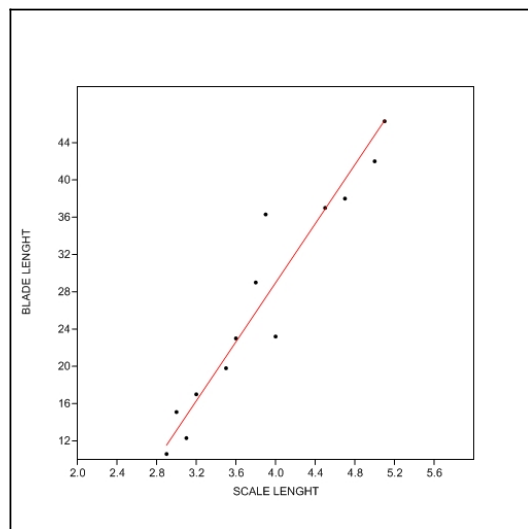


Fig.54_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_10
($r=0.96$; $r^2=0.92$; $y=15.156x-31.75$).

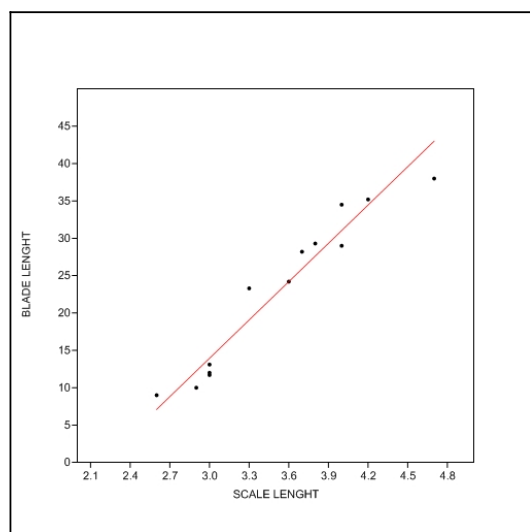


Fig.55_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_11
($r=0.97$; $r^2=0.93$; $y=18.37x-41.31$).

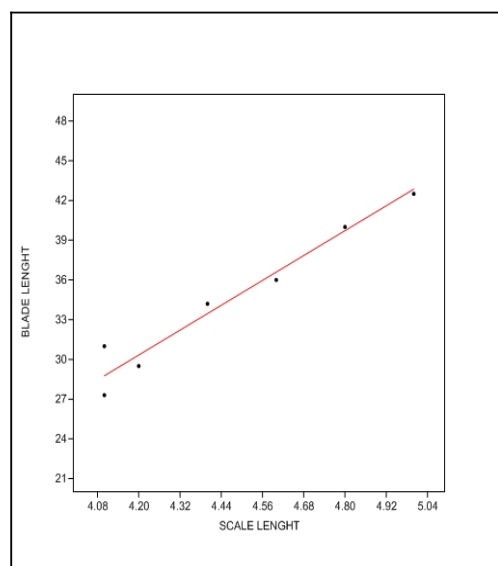


Fig.56_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_13
($r=0.975$; $r^2=0.952$; $y=12.979x-22.706$).

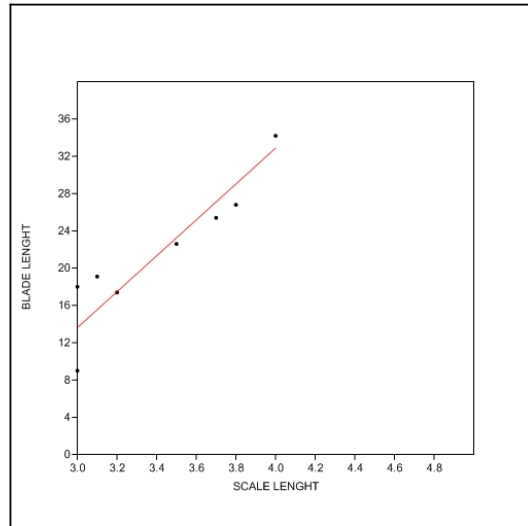


Fig.57_RMA tra lunghezza della base fogliare e lunghezza del lembo fogliare, nella stazione POS_14
($r=0.990$; $r^2=0.981$; $y=15.390x-34.889$).

In Tab.26 si riportano i valori di produzione relativi alla campagna effettuata a Novembre 2014.

I valori medi di produzione fogliare presentano variazioni comprese tra $63.99 \text{ g m}^{-2} \text{ anno}^{-1}$ (POS.14) e $414.34 \text{ g m}^2 \text{ anno}^{-1}$ (POS.08) e i valori di produzione rizomica da $6.32 \text{ g m}^{-2} \text{ anno}^{-1}$ (POS.14) a $16.82 \text{ g m}^{-2} \text{ anno}^{-1}$ (POS.04).

Stazione	Produzione fogliare (g/anno)	Produzione fogliare (g/m²/anno)	Produzione del rizoma (g/anno)	Produzione del rizoma (g/m²/anno)	Produzione TOT (g/m²/anno)
POS01	0.58	101.24	0.044	7.69	108.96
POS02	0.81	139.57	0.051	8.82	148.39
POS03	0.96	232.678	0.053	12.96	245.64
POS04	0.87	244.359	0.059	16.82	261.18
POS08	1.75	414.34	0.043	10.17	424.50
POS10	0.97	203.52	0.059	12.51	216.03
POS11	0.60	114.78	0.049	9.47	124.25
POS13	1.33	237.98	0.047	8.45	246.43
POS14	0.50	63.99	0.049	6.32	70.31

Tab.26_Valori di produzione fogliare, produzione del rizoma, e produzione totale nelle 9 stazioni esaminate.

In Tabella 27 si riporta il confronto tra i valori di produzione, epigea ed ipogea, nelle due campagne di campionamento (2013/2014).

Stazione	Produzione fogliare maggio 2013 (g/anno)	Produzione fogliare novembre 2014 (g/anno)	Produzione del rizoma maggio 2013 (g/anno)	Produzione del rizoma novembre 2014 (g/anno)
POS01	0.64	0.58	0.034	0.044
POS02	0.81	0.81	0.045	0.051
POS03	0.71	0.96	0.039	0.053
POS04	0.46	0.87	0.042	0.059
POS08	1.31	1.75	0.032	0.043
POS10	0.66	0.97	0.048	0.059
POS11	0.38	0.60	0.028	0.049
POS13	1.11	1.33	0.045	0.047
POS14	0.36	0.50	0.042	0.049

Tab.27_ Valori di produzione fogliare, produzione del rizoma, e produzione totale nelle 9 stazioni esaminate.

Nelle Fig. 58 e 59 sono riportati gli istogrammi della produzione fogliare e rizomica nelle nove stazioni esaminate e in Tab.28 la retta di regressione (correlazione lineare) tra i valori di produzione stimati tramite metodo lepidocronologico a Maggio 2013 e Novembre 2014, sulle medesime nove stazioni ($r=0.93$; $r^2=0.87$).

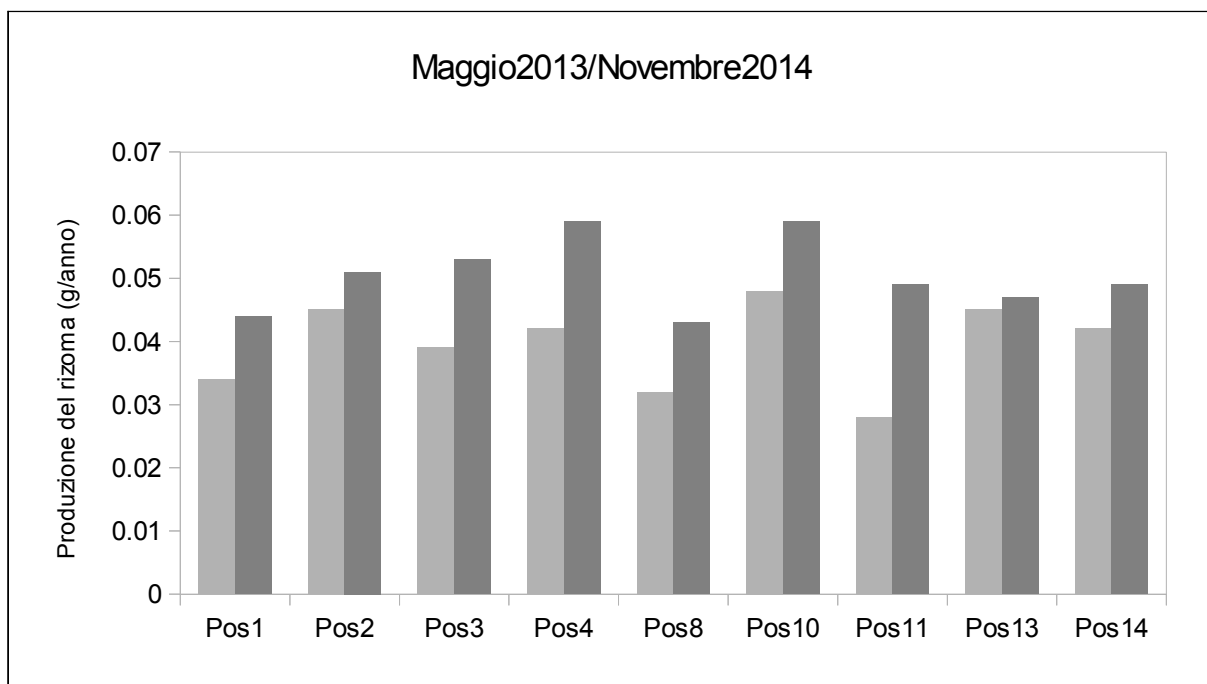
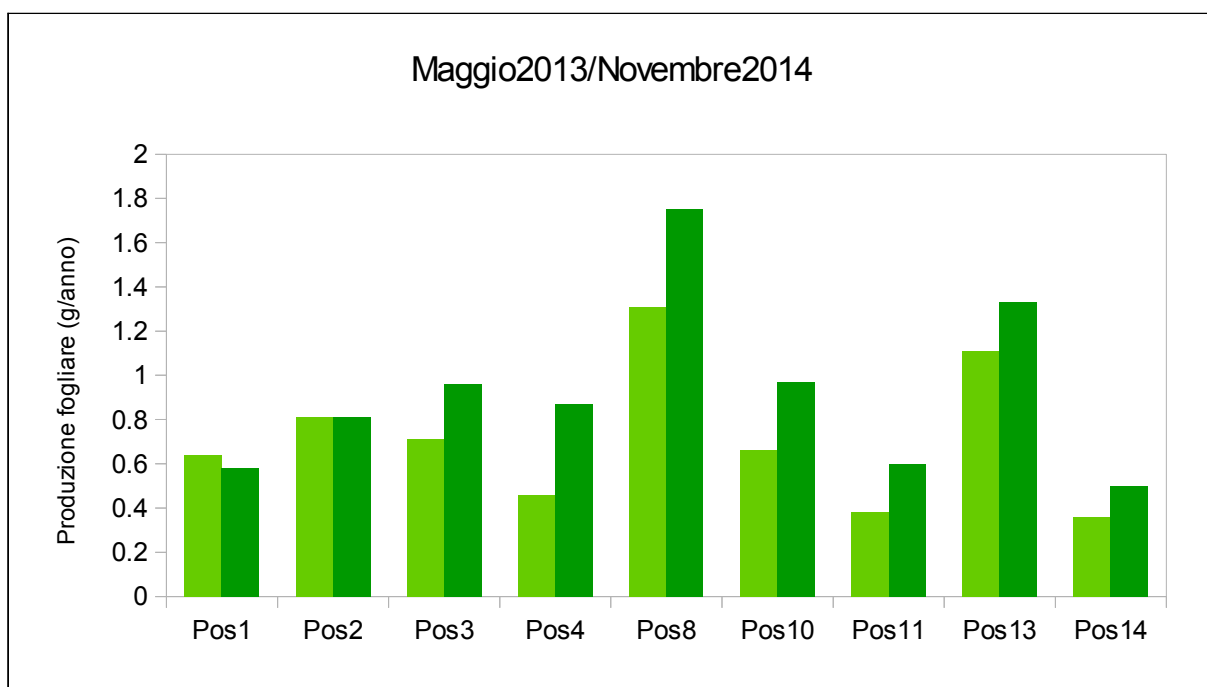
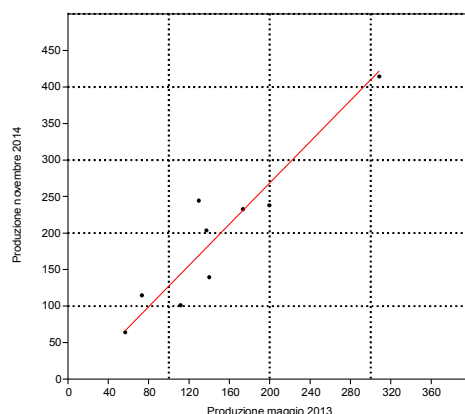


Fig.59_Valori di Produzione del rizoma (in grigio chiaro: Maggio2013; in grigio scuro: Novembre2014) nelle 9 stazioni esaminate.



Tab.28_Retta di regressione (correlazione lineare) tra i valori di produzione (tramite metodo lepidocronologico) stimati a Maggio 2013 e a Novembre 2014, sulle medesime 9 stazioni, ($r=0.93$; $r^2=0.87$).

4.5_Analisi delle dinamiche fotosintetiche

In Tabella 29 si riportano i valori di E_k , α , β , $ETR_{\max}$ e F_v/F_m per i 9 siti di campionamento esaminati.

Stazione	Prof.	E_k	α	β	ETR_s	$ETR_{\max}$	F_v/F_m
POS.01	10	172.95±96.4	0.17±0.005	0.011±0.008	29.16±15.5	22.85	0.68±0.125
POS.02	9.5	114.51±1.86	0.41±0.15	0.02±0.015	46.73±17.1	38.36	0.61±0.125
POS.03	13.3	147.12±66.2	0.13±0.07	0.005±0.002	16.68±6.2	14.15	0.60±0.176
POS.04	10.3	135.6±78.6	0.22±0.11	0.014±0.015	27.21±16.7	21.38	0.713±0.086
POS.08	10.3	151.31±85.1	0.15±0.04	0	21.81±9.3	21.81	0.62±0.039
POS.10	14.8	87.68±43.9	0.23±0.09	0.007±0.0008	19.77±9.3	17.23	0.623±0.08
POS.11	10.9	174.56±50.6	0.19±0.12	0.01±0.005	31.27±16.6	25.45	0.588±0.05
POS.13	13	76.39±22.1	0.14±0.05	0.0018±0.0007	9.88±3.9	9.22	0.49±0.07
POS.14	13.2	74.15±24.6	0.11±0.07	0.0019±0.0009	8.44±6.3	7.73	0.36±0.15

Tab.29_Valori dei principali parametri fotosintetici nelle 9 stazioni esaminate. (ETR_s = ETR massimo, in assenza di fotoinibizione, $ETR_{\max}$ = ETR massimo con fotoinibizione).

E_k , che rappresenta l'indice di fotoadattamento (quindi il limite tra fotolimitazione e fotosaturazione), ha mostrato valori variabili tra 74.15 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 174.56 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mentre $ETR_{\max}$, che rappresenta il massimo rateo di trasporto elettronico, ha mostrato valori compresi tra 7.73 μmol di $e^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 38.36 μmol di $e^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

In accordo con Dattolo *et al.*, (2014), i valori di E_k e di ETR_{max} sono mediamente più bassi per stazioni situate a maggiore profondità. In Figura 60 vengono infatti confrontati i valori medi di E_k (in verde) ed ETR (in rosso) per le stazioni ad una profondità inferiore e superiore ad 11m. E' in effetti risultato che le praterie situate a profondità maggiori, presentano indici di fotoadattamento e tassi fotosintetici minori. In particolare, le stazioni a profondità ≤ 11 m mostrano valori medi di E_k di $149.67 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e valori medi di ETR di $31.23 \mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e le stazioni situate a profondità >11 m mostrano valori di E_k di $96.33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e valori di ETR di $13.69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I valori di E_k sono in accordo con i range riportati per *Posidonia oceanica* in Alcoverro *et al.*, 1998 ($36\text{-}354 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

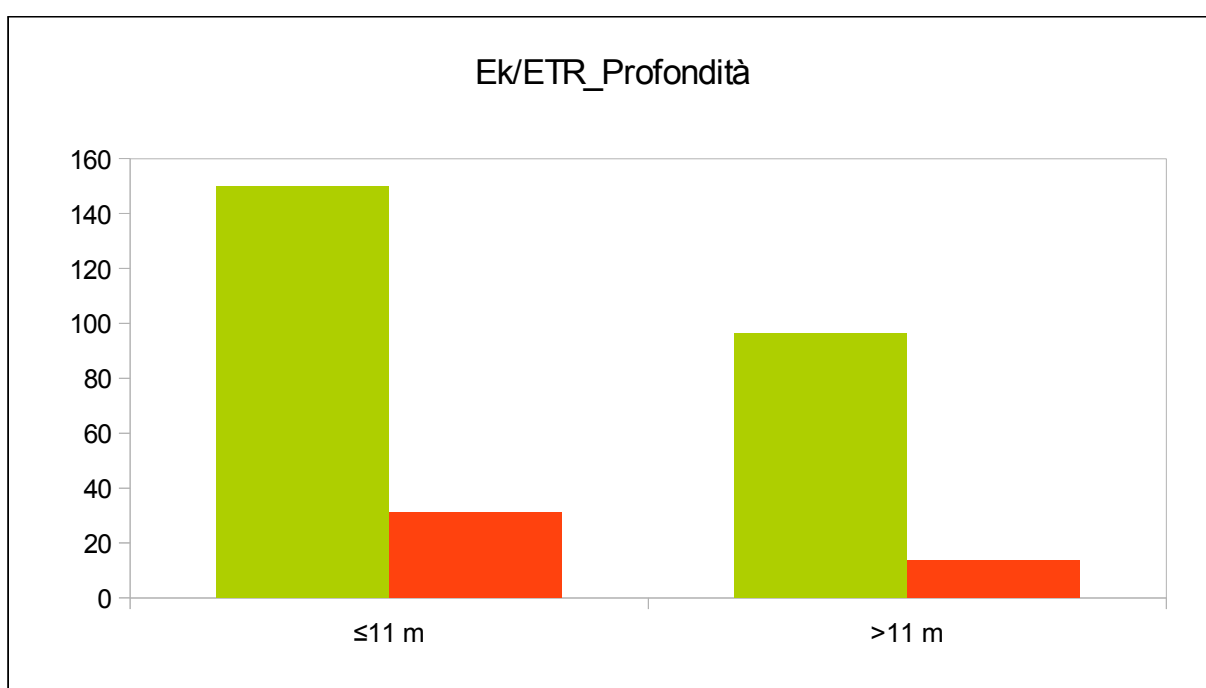


Fig.60_ E_k (verde) ed ETR (rosso) per stazioni profonde e superficiali.

Nelle Figure da 61 a 69 sono riportate le curve ETR/E rappresentative di ciascun sito di campionamento. Una linea verde ed una linea arancione dividono le curve in zona fotolimitata, zona fotosaturata e zona fotoinibita.

E_k , che rappresenta la PAR in corrispondenza della quale il sistema passa dalla regione fotolimitata alla regione fotosaturata ed E_d , che rappresenta la PAR in corrispondenza della quale il sistema passa dalla regione fotosaturata alla regione fotolimitata, sono riportati per ciascuna curva.

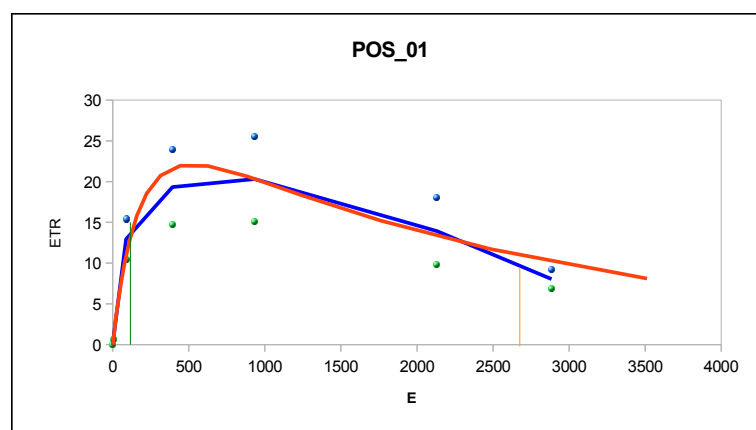


Fig.61_Curva ETR/E per il sito di campionamento POS.01,

($E_k=172.95 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$; $E_d=2650 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni; linea verde: transizione tra fotolimitazione e fotosaturazione; linea arancione: transizione tra fotosaturazione e fotoinibizione).

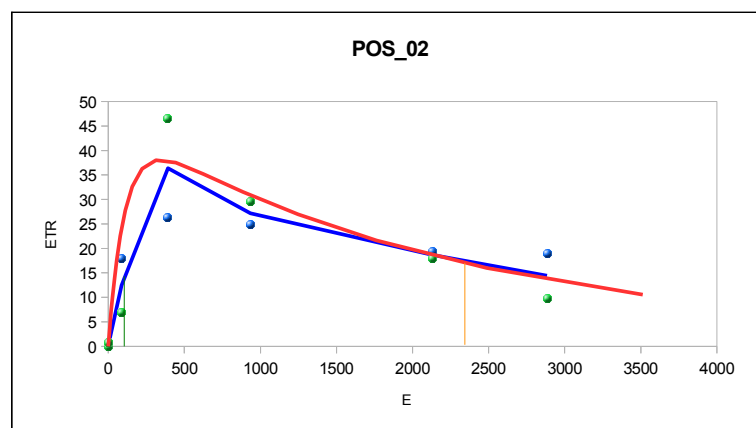


Fig.62_Curva ETR/E per il sito di campionamento POS.02,

($E_k=114.51 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$; $E_d=2336 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni; linea verde: transizione tra fotolimitazione e fotosaturazione; linea arancione: transizione tra fotosaturazione e fotoinibizione).

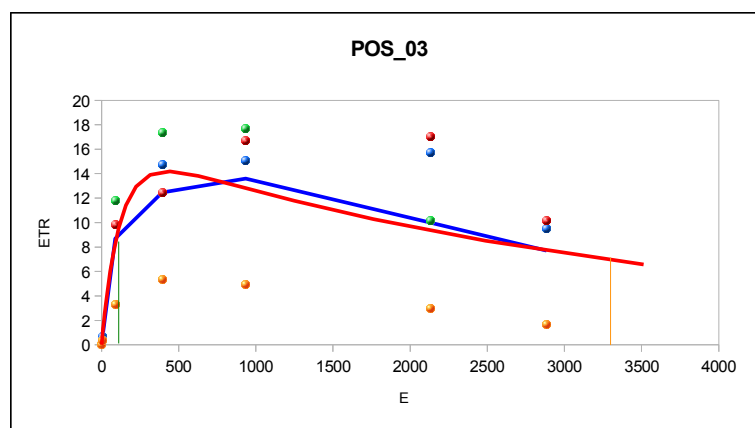


Fig.63_Curva ETR/E per il sito di campionamento POS.03.

($E_k=147.12 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; $E_d=3336 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni; linea verde: transizione tra fotolimitazione e fotosaturazione; linea arancione: transizione tra fotosaturazione e fotoinibizione).

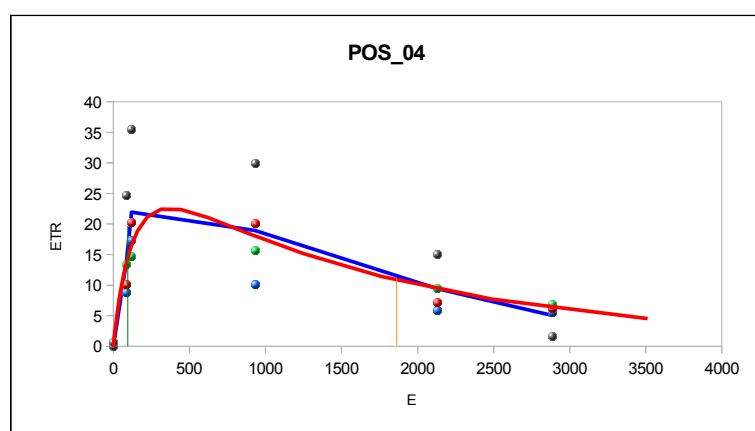


Fig.64_Curva ETR/E per il sito di campionamento POS.04.

($E_k=135.6 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; $E_d=1943.57 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni; linea verde: transizione tra fotolimitazione e fotosaturazione; linea arancione: transizione tra fotosaturazione e fotoinibizione).

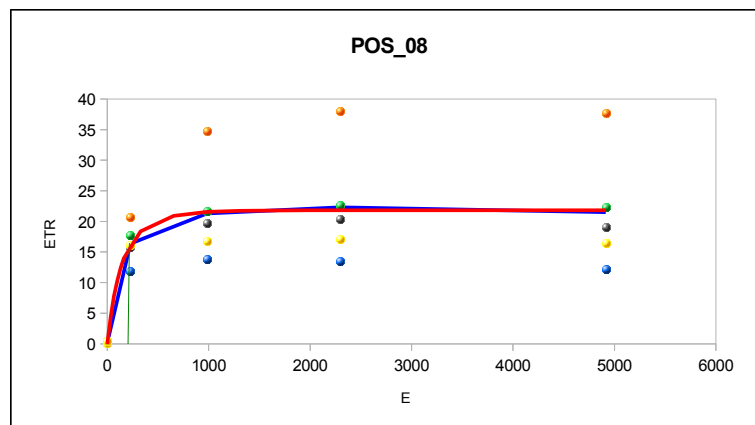


Fig.65_Curva ETR/E per il sito di campionamento POS.08.

($E_k=151.31 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni; linea verde: transizione da fotolimitazione a fotosaturazione).

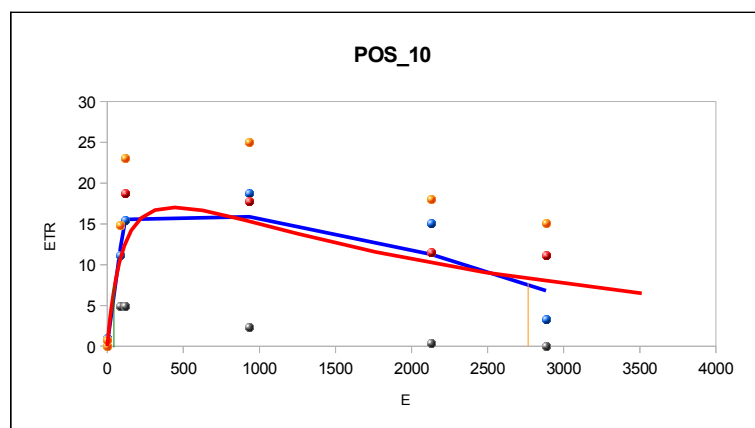


Fig.66_Curva ETR/E per il sito di campionamento POS.10.

($E_k=87.68 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; $E_d=2824.28 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni; linea verde: transizione tra fotolimitazione e fotosaturazione; linea arancione: transizione tra fotosaturazione e fotoinibizione).

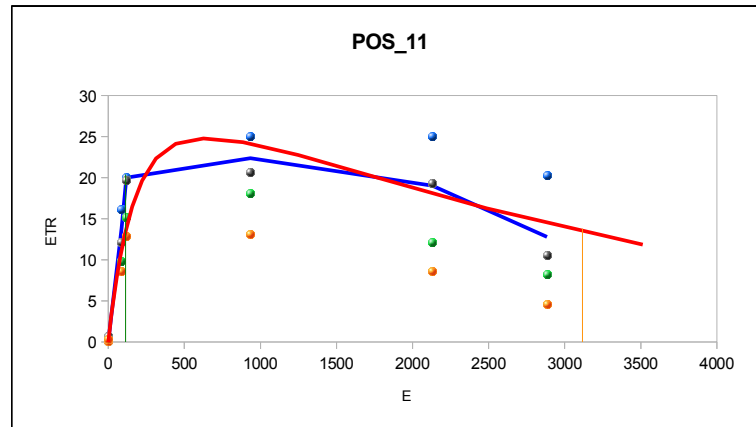


Fig.67_Esempio di curva ETR/E per il sito di campionamento POS.11.

($E_k=174.56 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; $E_d=3127 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni; linea verde: transizione tra fotolimitazione e fotosaturazione; linea arancione: transizione tra fotosaturazione e fotoinibizione).

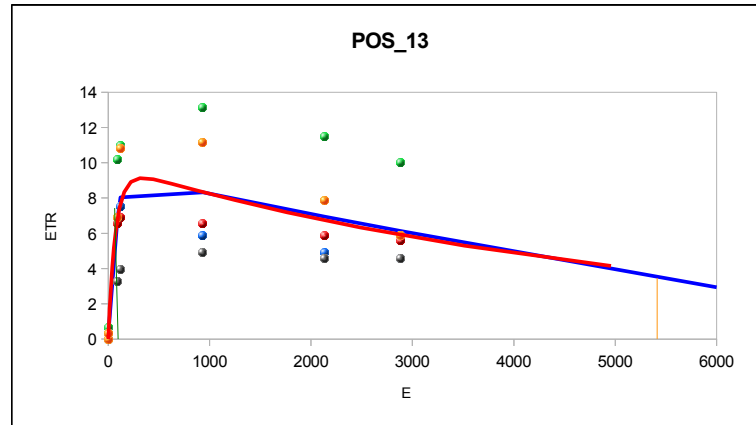


Fig.68_Esempio di curva ETR/E per il sito di campionamento POS.13.

($E_k=76.39 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; $E_d=5488 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni; linea verde: transizione tra fotolimitazione e fotosaturazione; linea arancione: transizione tra fotosaturazione e fotoinibizione).

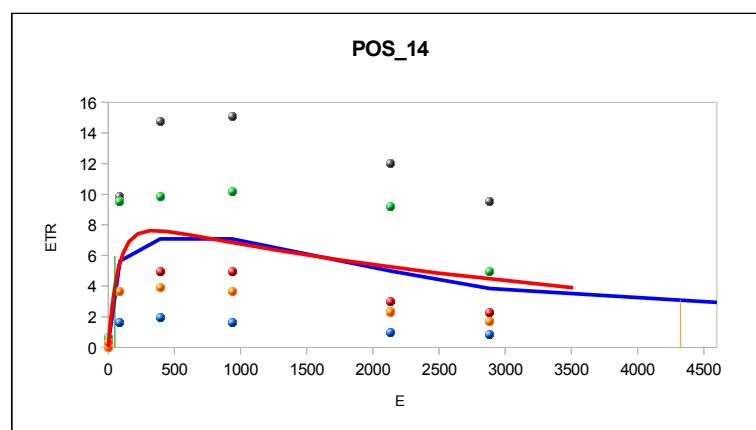


Fig.69_Esempio di curva ETR/E per il sito di campionamento POS.14.

($E_k=74.15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; $E_d=4442.1 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni; linea verde: transizione tra fotolimitazione e fotosaturazione; linea arancione: transizione tra fotosaturazione e fotoinibizione).

4.6_Contenuto di clorofilla a e b in *Posidonia oceanica*

STAZIONI	CHL a CONTENT ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	CHL b CONTENT ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	CHL a+b CONTENT ($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	Biomassa fogliare (g)	Biomassa epifita (g)
POS.01	0.61 ± 0.18	0.67 ± 0.26	1.28 ± 0.44	0.32 ± 0.09	0.002 ± 0.004
POS.02	0.59 ± 0.16	0.60 ± 0.35	1.19 ± 0.49	0.38 ± 0.08	0.05 ± 0.007
POS.03	0.51 ± 0.15	0.63 ± 0.35	1.14 ± 0.50	0.23 ± 0.08	0.022 ± 0.014
POS.04	0.83 ± 0.14	0.53 ± 0.09	1.36 ± 0.23	0.21 ± 0.07	0.006 ± 0.008
POS.08	0.95 ± 0.39	0.47 ± 0.32	1.42 ± 0.65	0.46 ± 0.16	0.08 ± 0.04
POS.10	0.82 ± 0.23	0.48 ± 0.12	1.32 ± 0.36	0.26 ± 0.12	0.006 ± 0.006
POS.11	0.83 ± 0.18	0.63 ± 0.13	1.49 ± 0.32	0.39 ± 0.15	0.008 ± 0.006
POS.13	0.83 ± 0.21	0.76 ± 0.30	1.59 ± 0.43	0.44 ± 0.19	0.12 ± 0.01
POS.14	0.45 ± 0.21	0.55 ± 0.35	1.01 ± 0.30	0.32 ± 0.11	0.011 ± 0.012

Tab.30_Contenuto di clorofilla a, b, totale, biomassa fogliare e biomassa epifita, nelle 9 stazioni esaminate.

I valori di clorofilla a+b oscillano tra $1.01 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ (stazione POS.14) e $1.59 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ (stazione POS.13).

La biomassa fogliare varia tra 0.21 g (POS.04) a 0.46 g (POS.08), mentre la biomassa

epifita, molto variabile in base al sito in cui si trova la prateria, varia tra 0.002 g (POS.01) e 0.12 g/fascio fogliare (POS.13).

4.7_Variazione giornaliera dei parametri fotosintetici

Per conoscere l'andamento giornaliero dei parametri fotosintetici, sia a Dicembre 2014 che a Giugno 2015 è stata monitorata per 24 ore una prateria di controllo situata poco a sud del porto di Civitavecchia. Di seguito si riportano i risultati di entrambi i campionamenti.

4.7.1 Stazione fissa H24 (11-12 Dicembre 2014)

ORA (GMT+1)	α	β	ETRmax	Ek	Fv/Fm
10:00	0.29±0.05	0.0051±0.002	25.7±8.7	84.4±17.4	0.64±0.08
13:00	0.12±0.03	0.0039±0.0017	12.16±4.6	112.4±12.1	0.51±0.13
16:00	0.28±0.03	0.021±0.013	36.4±5.6	130.8±21.9	0.68±0.023
21:00	0.18±0.01	0.004±0.001	25.8±4.5	140.25±17.9	0.64±0.039
2:00	0.28±0.03	0.025±0.016	61.7±6.7	223.1±4.03	0.54±0.05
7:00	0.38±0.05	0.04±0.03	63.405±3.1	170±14.4	0.58±0.06
10:00	0.26±0.03	0.008±0.002	30.1±0.8	114.3±12.2	0.664±0.05

Tab.31_Parametri fotosintetici lungo le 24 ore (stagione invernale).

Il parametro F_v/F_m medio, indicatore dell'efficienza potenziale massima di cattura della luce da parte dei fotosistemi PSII, risulta alto al mattino (alle ore 10 ha un valore compreso tra 0.638 e 0.664), diminuisce durante il corso della mattinata fino al minimo osservato alle ore 13 (0.507) e raggiunge il massimo al tramonto, quando il valore di PAR è minimo, per diminuire nuovamente durante le ore notturne (PAR=0 μmol). Alle 7 del mattino aumenta per poi raggiungere valori elevati alle h 10 del giorno successivo (Fig.70).

In ciascun orario del ciclo giornaliero stabilito sono stati prelevati n=5 campioni. Il valore F_v/F_m risultante è quindi un valore medio ($\pm$ deviazione standard). Per testare la significatività della differenza tra le varianze del parametro F_v/F_m in campioni raccolti alla stessa ora, è stato applicato il test One-way Anova (p=0.046), il quale ha confermato

che le differenze di questo parametro nei vari orari di campionamento sono statisticamente attendibili.

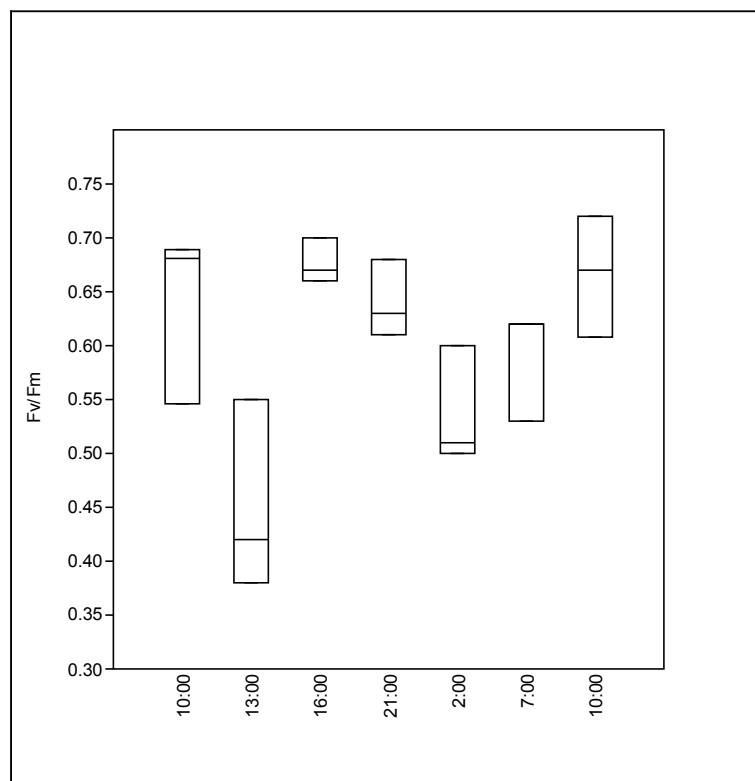


Fig.70_Box-plot dell'andamento giornaliero del parametro F_v/F_m .

Anche l'andamento giornaliero del parametro alpha (Fig.71) è facilmente individuabile, nonostante l'intervallo di variazione risulti stretto: dai massimi del mattino (h 7), scende a $0.1 \mu\text{mol}$ durante le ore di massima irradianza, infine diminuisce ancora verso le ore serali e notturne. Il parametro beta (Fig.72) risulta massimo al tramonto (h16) e minimo la sera (h 21) μmol . Il test Anova One-Way ha mostrato differenze statisticamente significative tra le varianze sia per il parametro alpha che per il parametro beta ($p < 0.05$).

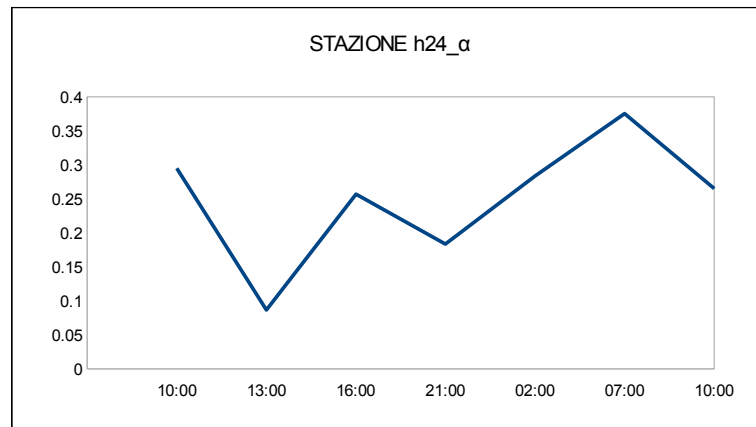


Fig.71_Andamento giornaliero del parametro alpha.

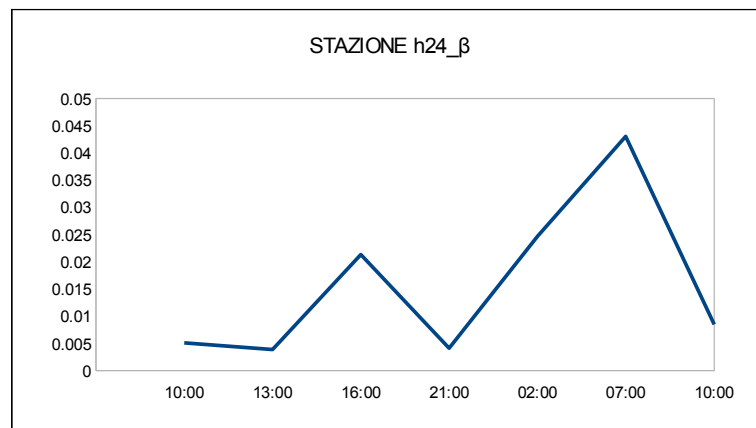


Fig.72_Andamento giornaliero del parametro beta.

Il tasso di foto-saturazione ETR_{max} (Fig 73) risulta massimo la mattina presto (h 7) e diminuisce durante l'arco della mattinata per raggiungere i valori minimi alle h13. Le differenze statistiche tra le varianze di ETR_{max} sono risultate essere altamente significative, con $p < 0.05$. Il picco notturno osservato alle h 2 è probabilmente dovuto al fatto che la pianta, la quale viene prelevata in un orario di totale assenza di PAR, viene sottoposta, in laboratorio, a intensità luminose molto forti (oltre $2000 \mu\text{mol}$), rispondendo con un picco di fluorescenza.

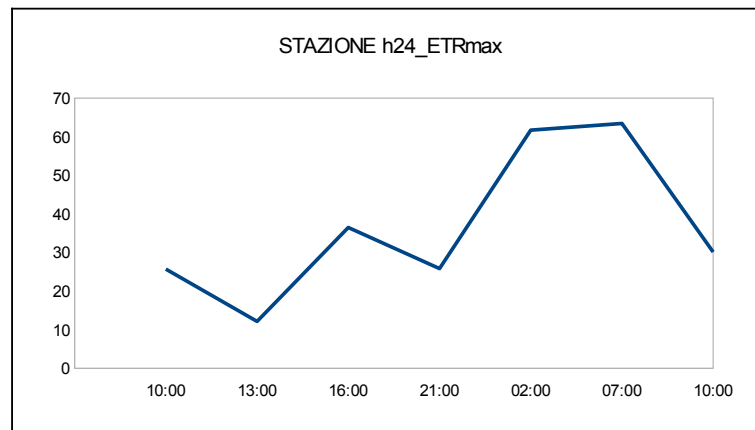


Fig.73_Andamento giornaliero dei parametri ETR_{max}.

Infine il parametro E_k segue un andamento simile a quello di ETR_{max} (Fig.74): è massimo di mattina (h 7) escludendo il picco notturno delle h 2, e diminuisce durante la mattinata per aumentare verso tramonto. E_k è definito come il rapporto tra ETR_{max} e alpha, il quale segue un andamento definito ma varia in un intervallo ristretto, quindi le variazioni di E_k sono principalmente dovute a quelle di ETR_{max}.

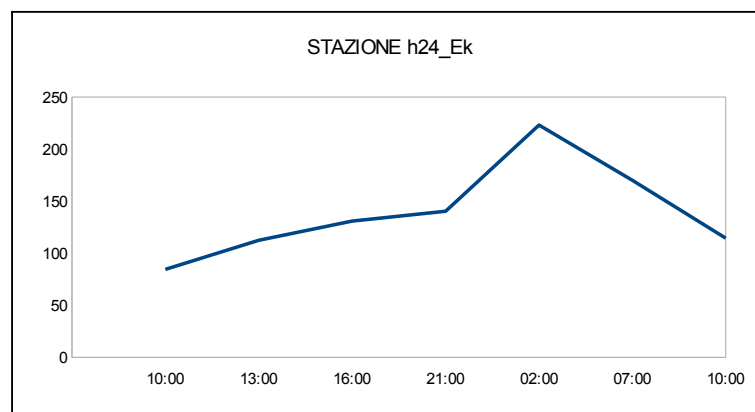


Fig.74_Andamento giornaliero del parametro E_k .

Di seguito sono riportate le curve ETR/E in ciascuna delle 9 stazioni di campionamento (Fig.75-81).

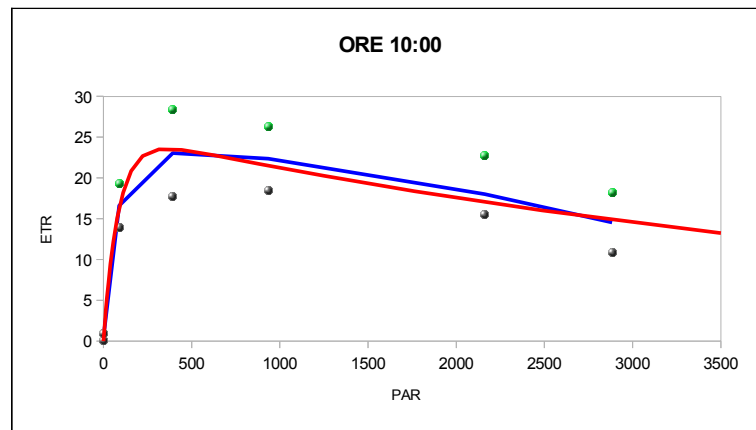


Fig.75_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 10:00 (11:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

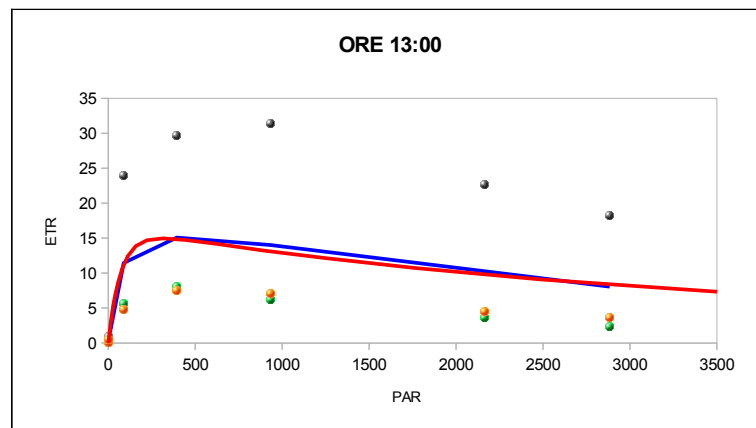


Fig.76_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 13:00 (14:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

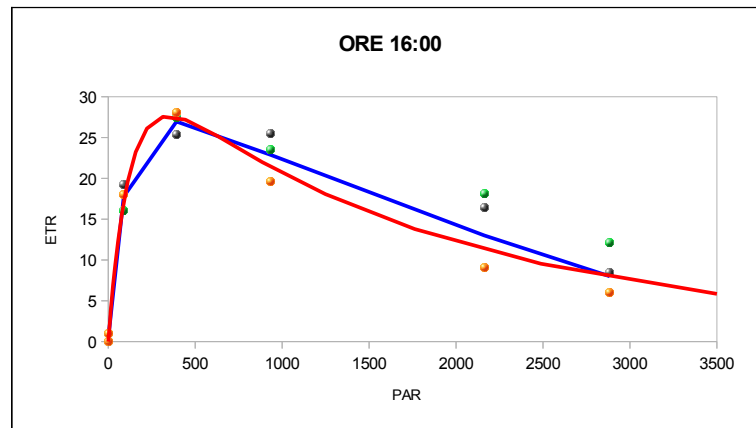


Fig.77_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 16:00 (17:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

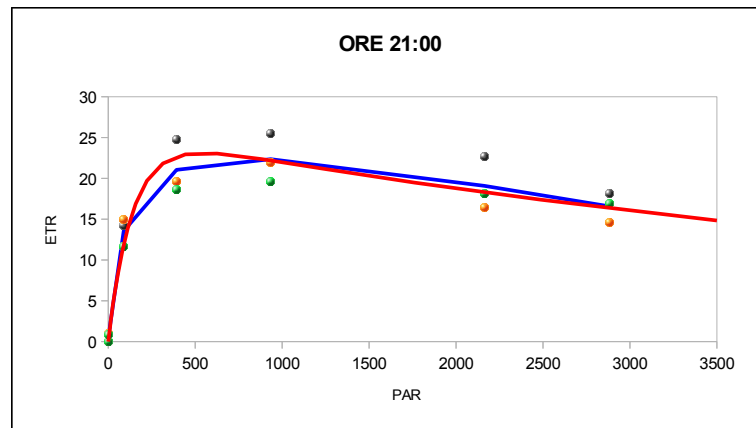


Fig.78_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 21:00 (22:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

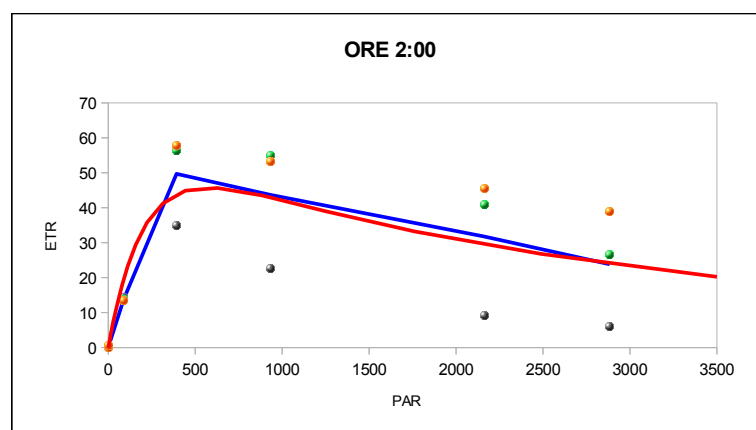


Fig.79_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 2:00 (3:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

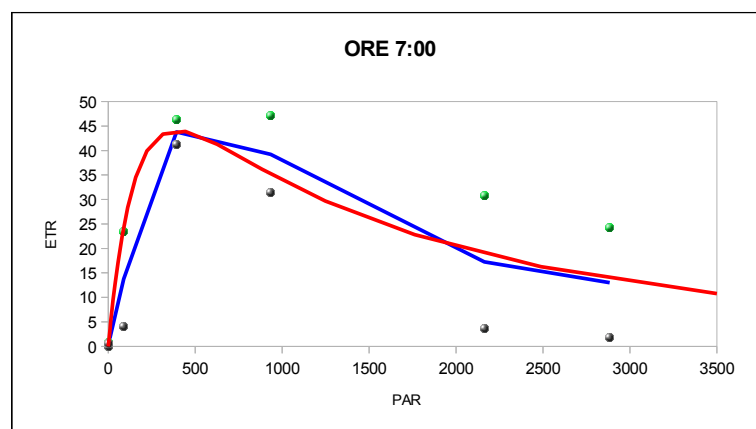


Fig.80_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 7:00 (8:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

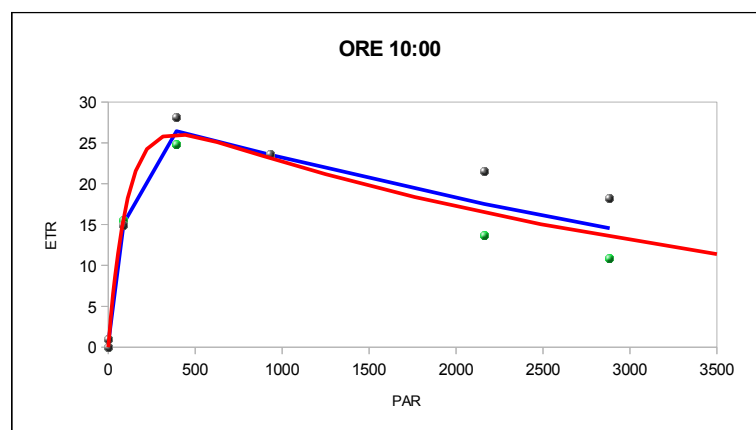


Fig.81_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 10:00 (11:00 UTC).

(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

4.7.2 Stazione fissa H24 (11-12 Giugno 2015)

ORA (GMT+2)	α	β	ETRmax	Ek	Fv/Fm
11:00	0.5±0.08	0.02±0.001	35.15±3.6	70.31±15.3	0.54±0.05
14:00	0.1±0	0.0025±0.007	9.825±0.89	98.25±8.9	0.41±0.018
17:00	0.29±0.028	0.01±0	29.57±7.55	101.2±16.17	0.592±0.16
20:00	0.25±0.21	0.0215±0.016	40.56±34.4	162.78±1	0.554±0.06
1:00	0.18±0.02	0.062±0.05	70.24±42.1	395.3±272	0.48±0.13
6:00	0.25±0.21	0.07±0.08	59.85±56.7	223.5±37.4	0.58±0.06
11:00	0.33±0.1	0.009±0.001	24.98±0.32	80.35±26.14	0.56±0.03

Tab.32_Parametri fotosintetici lungo le 24 ore (stagione estiva).

In Figura 82 si riporta l'andamento giornaliero dell'efficienza fotosintetica nei diversi orari della giornata.

Il parametro F_v/F_m medio, indicatore dell'efficienza potenziale massima di cattura della luce da parte dei fotosistemi PSII, risulta alto al mattino (alle ore 11 ha un valore compreso tra 0.54 e 0.56), diminuisce durante il corso della mattinata fino al minimo osservato alle ore 14 (0.41) e raggiunge il massimo al tramonto, quando il valore di PAR è minimo, per diminuire nuovamente durante le ore notturne (PAR=0 μmol). Alle 6 del mattino aumenta (0.58) per poi raggiungere valori elevati alle ore 11 del

giorno successivo (Fig.82).

In ciascun orario del ciclo giornaliero stabilito sono stati prelevati $n=2-3$ campioni. Il valore F_v/F_m risultante è quindi un valore medio ($\pm$ deviazione standard). Per testare la significatività della differenza tra le varianze del parametro F_v/F_m in campioni raccolti alla stessa ora, è stato applicato il test One-way Anova ($p=0.032$), il quale ha confermato che le differenze di questo parametro nei vari orari di campionamento sono statisticamente attendibili.

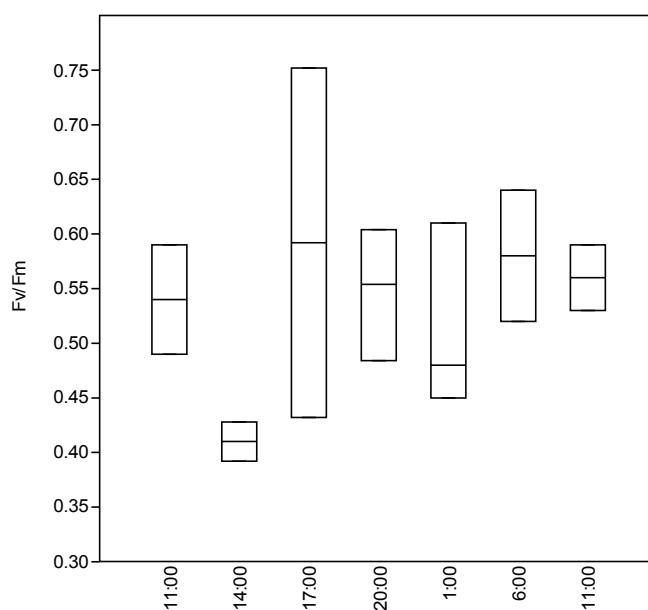


Fig.82_Box-plot dell'andamento giornaliero del parametro F_v/F_m .

Di seguito sono riportate le curve ETR/E in ciascuna delle 9 stazioni di campionamento (Fig.83-89).

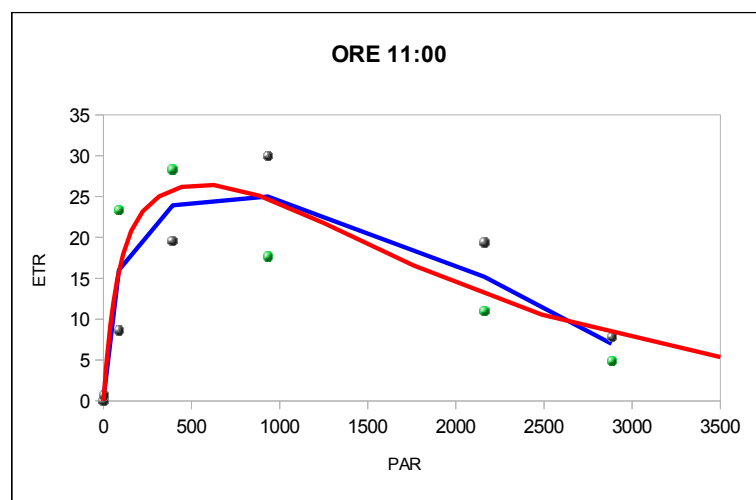


Fig.83_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 11:00 (13:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

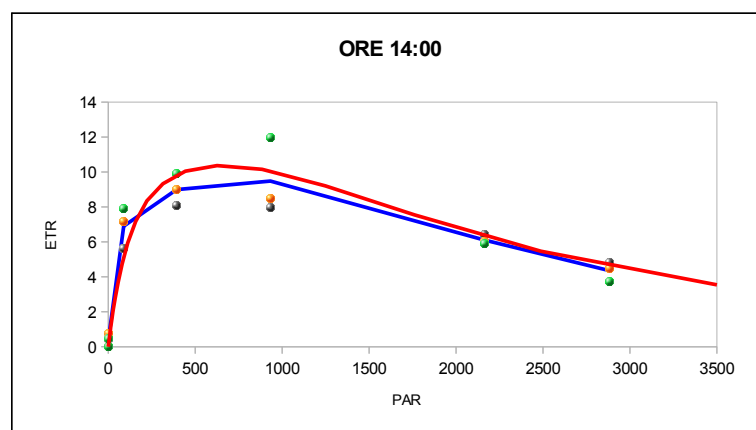


Fig.84_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 14:00 (16:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

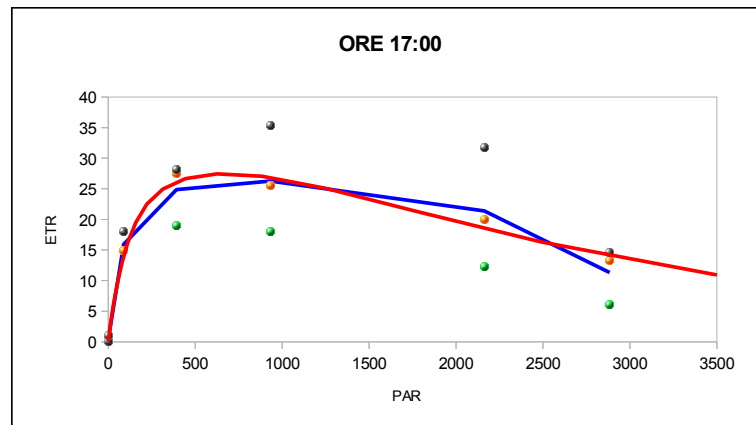


Fig.85_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 17:00 (19:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

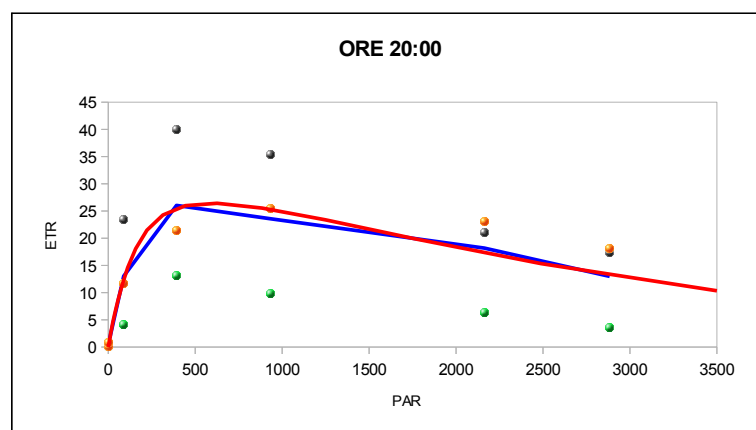


Fig.86_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 20:00 (22:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

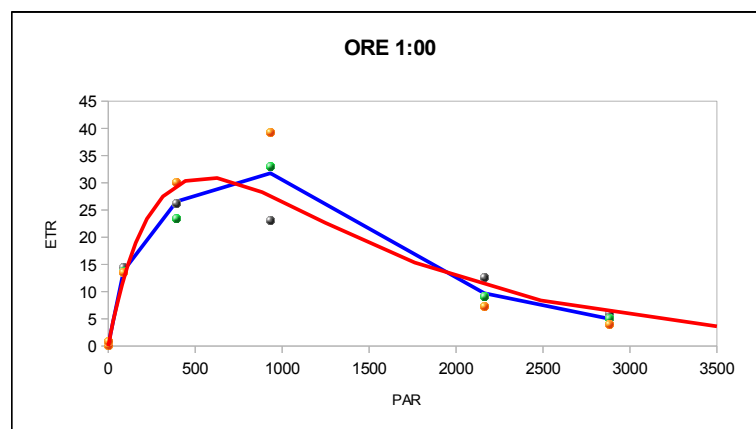


Fig.87_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 1:00 (3:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

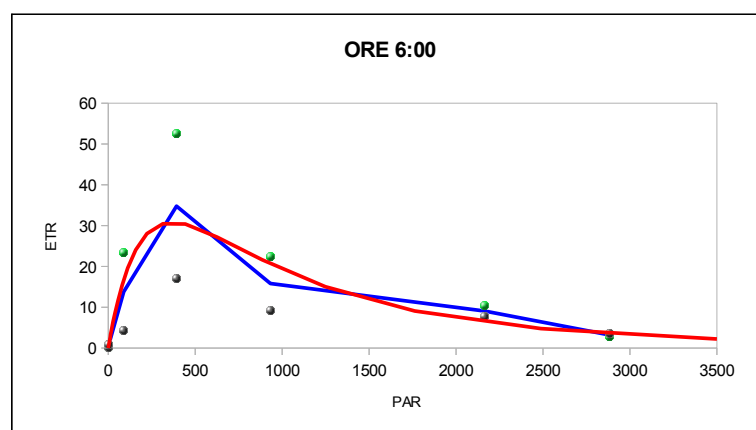


Fig.88_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 6:00 (8:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

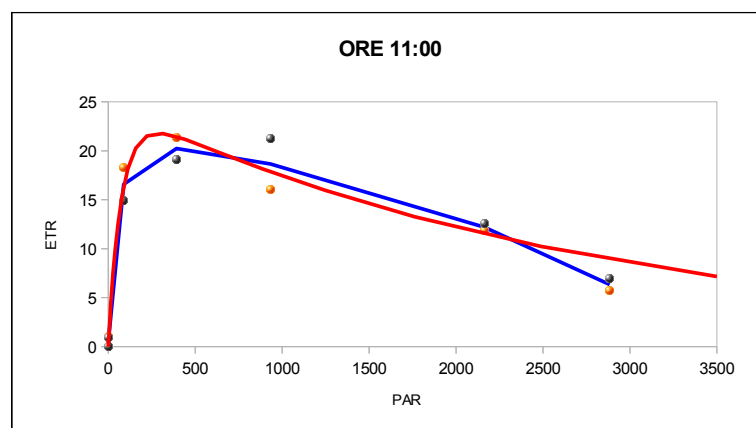


Fig.89_Curva ETR/E per piante prelevate alle ore 11:00 (13:00 UTC).
(Linea in rosso: curva di Platt; linea in blu: curva sperimentale media; sfere: dati sperimentali relativi ai singoli campioni).

4.8_Valori di produzione ottenuti tramite modello matematico, (senza considerare la variazione all'interno delle 24 ore)

Di seguito (Tab.33) si riportano i valori medi del contenuto di clorofilla in mgChl/m². Questo valore è stato ottenuto moltiplicando il valore di clorofilla in $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ per la superficie fogliare in mm² (solo la porzione verde del tessuto fogliare). I μg di clorofilla per ciascun fascio fogliare, sono stati poi convertiti in mg e moltiplicati per la densità assoluta stazione-specifica, ottenendo così un valore di clorofilla in mg/m².

Data la non-significatività statistica delle differenze tra le medie estive e invernali nel valore della superficie fogliare verde, è stato considerato un valore medio tra il campionamento estivo ed invernale.

Sito di campionamento	Contenuto di clorofilla mg/m ²
POS.01	147.68
POS.02	160.11
POS.03	623.57
POS.04	341.65
POS.08	448.07
POS.10	337.88
POS.11	318.54
POS.13	388.63
POS.14	112.43

Tab.33_Contenuto di clorofilla (mg/m²) per ciascuna stazione.

E' stato quindi applicato il modello Phyto.VFP (3.Materiali e metodi) per calcolare la produzione primaria fogliare in ciascuna stazione. In questo calcolo è stata considerata esclusivamente la variazione all'interno del giorno della luce, (quindi dei parametri fotosintetici) misurata attraverso il campionamento della stazione fissa lungo le 24 ore.

I risultati di produzione primaria calcolata attraverso il modello sono riportati in Tabella 35.

Il test Anova One-Way ($p=0.55$) ha mostrato in questo caso che le differenze nei valori di produzione tra i due diversi metodi (modello senza variazione nelle 24 ore e lepidocronologia) non sono significative; il coefficiente di correlazione tra i valori è di 0.65 e l'errore quadratico medio è di circa 81.78 g/m²/anno.

4.9_Valori di produzione ottenuti tramite modello matematico, (considerando la variazione all'interno delle 24 ore)

Nel modello esteso con la variazione dei parametri fotosintetici nell'arco delle 24 ore, sono stati inseriti i valori dei parametri alpha, beta ed ETRs, calcolati con il *fit* descritto in equazione [6], (3_Materiali e metodi). I parametri stimati del *fit* vengono riportati in Tabella 34.

Nelle Figure 90, 91 e 92 sono riportati i grafici che mostrano la corrispondenza tra i valori misurati e gli andamenti orari stimati. Le curve di andamento così ottenute sono state ricalibrate, per confronto, con la misura effettuata alle ore 12 su ciascuna stazione.

	Alpha	Beta	ETRs
a0	0.22	0.02	38.33
a1	-0.08	0.02	-15.6
a2	-0.09	-0.008	10.46
a3	-0.03	-0.0007	-2.25
b1	0.78	-0.5	15.19
b2	0.21	1.2	-2.38
b3	0.35	1.74	0.61

Tab.34_ Coefficienti stimati del *fit*.

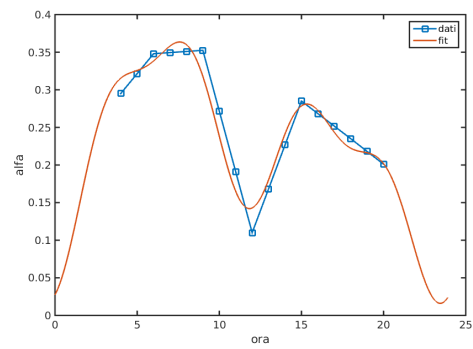


Fig.90_ Fit dell'andamento di Alpha lungo le 24 ore.

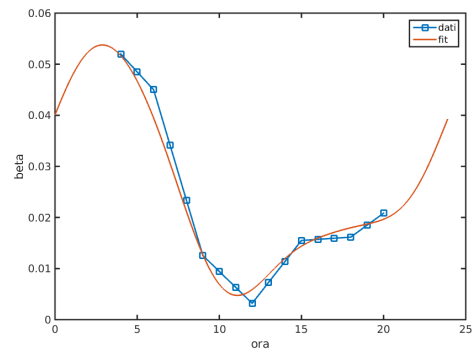


Fig.91_ Fit dell'andamento di Beta lungo le 24 ore.

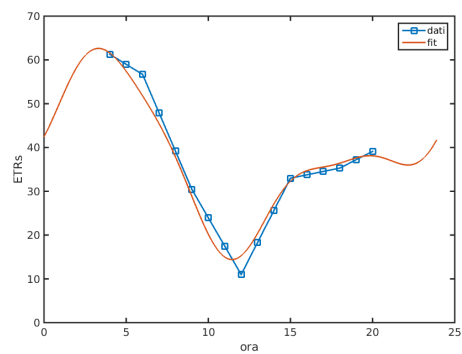


Fig.92_ Fit dell'andamento di ETRs lungo le 24 ore.

4.10_Confronto tra valori di produzione primaria ottenuti tramite analisi lepidocronologiche e tramite modello matematico

In Tabella 35 si possono osservare, a confronto, i valori di produzione primaria ottenuti tramite il modello (versione con e senza variazione all'interno delle 24 ore) e quelli ottenuti tramite il metodo lepidocronologico (con errore associato alla misura). Per quanto concerne il valore ottenuto tramite metodo lepidocronologico in laboratorio, non essendo emersa nessuna differenza statisticamente significativa per i valori di produzione nelle due stagioni osservate (Maggio 2013, Novembre 2014), è stato riportato il valore medio per le due stagioni per entrambi i valori di produzione.

Si può notare che la stazione POS.14, caratterizzata da una semi-prateria molto disturbata e da valori di clorofilla molto bassi, mostra, con entrambi i metodi, mostra i valori di produzione più bassi tra le praterie analizzate.

I valori più elevati sono invece associati alle stazioni POS.08 e POS.04.

Stazione	Produzione (laboratorio) g/m²/anno	Produzione (modello) g/m²/anno	Produzione (modello) g/m²/anno
POS.01	106.39 ± 25.3	131.00 ± 85.0	157.18 ± 102.0
POS.02	139.81 ± 32.4	250.41 ± 124.9	282.69 ± 141.0
POS.03	203.08 ± 43.6	197.67 ± 79.4	251.56 ± 101.0
POS.04	187.03 ± 65.9	335.75 ± 105.9	408.37 ± 128.7
POS.08	361.46 ± 72.1	324.04 ± 121.7	390.07 ± 146.5
POS.10	170.37 ± 39.0	212.14 ± 105.3	260.00 ± 129.1
POS.11	94.03 ± 34.1	213.14 ± 114.1	248.97 ± 134.3
POS.13	218.79 ± 42.7	105.93 ± 49.1	147.77 ± 39.70
POS.14	63.99 ± 12.4	18.20 ± 8.7	26.49 ± 12.60

Tab.35_Confronto tra risultati di produzione fogliare ottenuti tramite metodo di laboratorio proposto da Pergent, 1987, tramite modello matematico senza variazione entro il giorno e tramite modello matematico con variazione entro il giorno.

L'errore associato alla misura è stato calcolato tramite la formula *deviazione standard/media/√n repliche* (Mean root square error).

In Figura 93 vengono rappresentati i valori di produzione ottenuti con i due diversi metodi (in rosso il metodo lepidocronologico, in blu il modello che non tiene conto della variazione nelle 24 ore) con le relative barre di errore. I test statistici rivelano che la variabilità genetica si è rivelata molto utile nel confermare l'ipotesi di partenza che, data l'estrema frammentazione dell'habitat e le numerose attività costiere naturali ed antropiche, le praterie, anch'esse frammentate, rispondessero “localmente” alle variabili ambientali alle quali sono sottoposte, soprattutto in termini di densità, copertura, età, produzione, genetica. In effetti, nonostante l'elevata eterogeneità riscontrata nell'area di studio, le differenze nei parametri analizzati tra i siti sono maggiori delle differenze all'interno di ciascun sito. La variabilità genetica inter-popolazione è quindi risultata essere maggiore di quella intra-popolazione e le risposte da parte delle piante in termini genetici sono “sito-specifiche” e confermano la particolare correlazione tra i due data-set è di 0.65 le differenze delle varianze non sono statisticamente significative (Anova One-Way) e l'errore quadratico medio è di 81.7821 g/m²/anno.

In Figura 94, invece, vengono rappresentati i valori di produzione ottenuti con i due diversi metodi (in rosso il metodo lepidocronologico, in verde il modello che tiene conto della variazione nelle 24 ore) con le relative barre di errore. Nonostante sia stata presa in considerazione la variazione all'interno del giorno della PAR (quindi dei parametri fotosintetici) sia estiva che invernale, non si osservano rilevanti cambiamenti nei risultati di produzione primaria fogliare, ad eccezione del fatto che è risultato un leggero miglioramento della correlazione tra i valori di produzione ottenuti dal modello e quelli ottenuti dalla lepidocronologia, dal 0.65 a 0.7. Lo scarto quadratico medio è invece aumentato da 81.78 g/m²/anno. a 95.6 g/m²/anno (Fig.94).

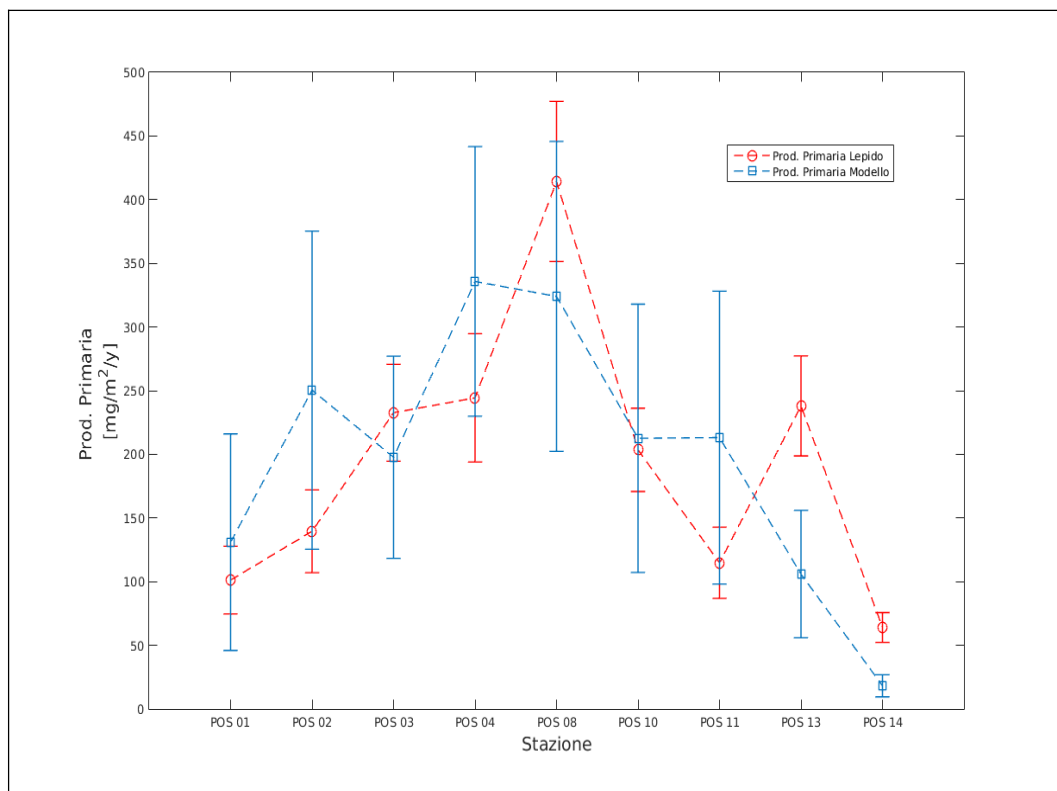


Fig.93_ Produzione fogliare ottenuta tramite modello matematico (versione che non tiene conto della variazione nelle 24 ore, in blu) a confronto con produzione fogliare ottenuta tramite metodo di laboratorio proposto da Pergent, 1987, (in rosso).

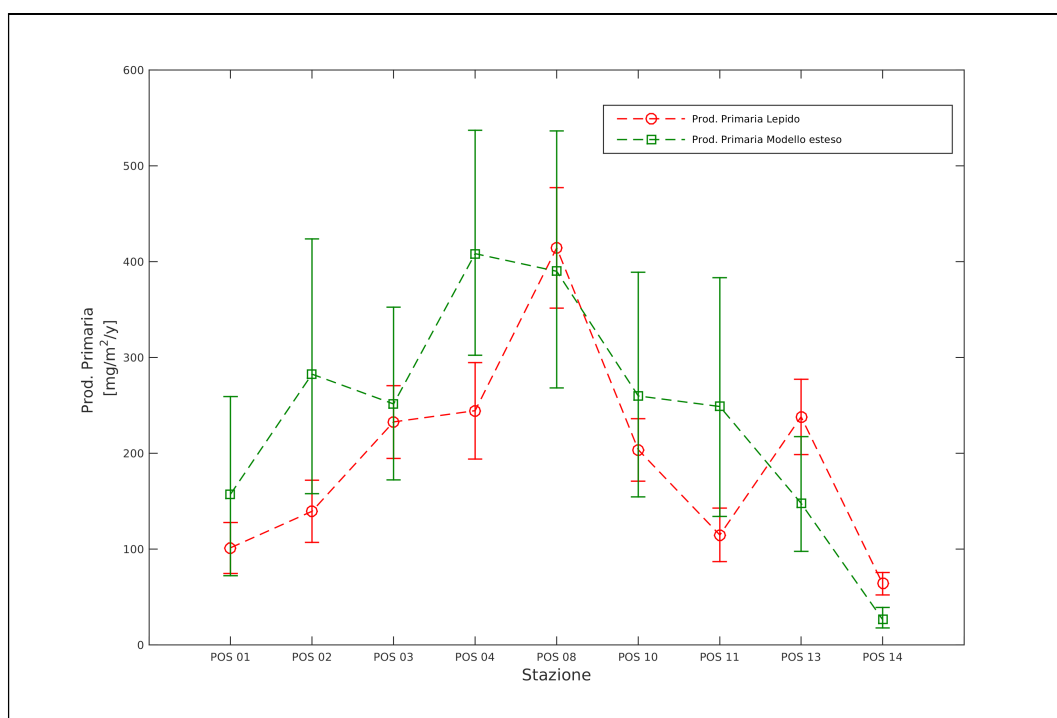


Fig.94_ Produzione fogliare ottenuta tramite modello matematico (versione che tiene conto della variazione nelle 24 ore, in verde) a confronto con produzione fogliare ottenuta tramite metodo di laboratorio proposto da Pergent, 1987, (in rosso).

5_DISCUSSIONE

Le praterie di *Posidonia oceanica* tra Tarquinia e Santa Severa (Lazio settentrionale, Mar Tirreno centrale, Italia) sono state indagate attraverso la combinazione di: analisi dei descrittori fisici, fisiografici, strutturali e funzionali (comunemente studiati nei programmi di monitoraggio delle praterie di *P.o.*), analisi della produzione primaria (ipogea ed epigea) con l'utilizzo di due differenti metodi di misura e analisi genetiche (tramite la tecnica dei RAPD).

La prima fase del lavoro (Maggio 2013), riguardante lo studio della distribuzione dei parametri di macroripartizione delle praterie di *P. oceanica* in 18 stazioni, ha messo in evidenza l'elevata eterogeneità ambientale che caratterizza l'area di studio. La densità media dell'area di studio è di 265.79 fasci fogliari e la copertura media del 40%. L'età media delle piante è di 6.74 anni. Ad esclusione della POS.04 e della POS.12, le praterie risultano rade e molto rade.

I grafici di densità e copertura lungo il gradiente batimetrico hanno confermato l'andamento negativo di queste due variabili con la profondità; la luce infatti è uno dei principali fattori limitanti per la *Posidonia oceanica* (Ralph *et al.*, 2007).

Per quanto concerne il substrato, i valori più elevati di densità assoluta sono stati registrati per praterie su “roccia”, mentre i valori più elevati di copertura, per praterie su “sabbia e matte”. E' quindi possibile che, su substrati misti a sabbia come RS e SM, in prossimità dei quali si assiste ad una risospensione del sedimento, si possa verificare una condizione di maggior limitazione della penetrazione della luce (Paticchio *et al.*, 2012), rispetto a substrati duri come R, soprattutto in un'area in cui il limite inferiore delle praterie si registra ad una profondità massima di soli 21 m. Su roccia, infatti, si insediano *patches* molto dense ma con coperture intermedie. Un substrato di sabbia e *matte*, invece, permette una buona penetrazione delle radici nel substrato (offrendo una superficie più omogenea e idonea all'attecchimento di rizomi), quindi buoni valori di copertura ma con densità intermedie. Il substrato RS, infine, offrendo superfici molto eterogenee, ha mostrato i valori di densità e copertura più bassi.

Dall'analisi dei parametri strutturali nelle 3 diverse popolazioni (individuate tramite analisi genetiche), è emerso che i valori medi di copertura percentuale sono tra loro simili, ma leggermente maggiori per il settore meridionale e leggermente minori per quello centrale. Per i valori medi di densità assoluta si può invece notare un leggero gradiente decrescente dal settore settentrionale al settore meridionale. Si evidenzia che le stazioni del settore centrale si trovano prevalentemente su roccia, le stazioni del

settore settentrionale sono prevalentemente su “roccia” e “roccia e sabbia” mentre quelle del settore meridionale sono prevalentemente su “sabbia e *matte*”. La distribuzione di questi parametri lungo le 3 popolazioni è quindi condizionata dalla tipologia di substrato; la copertura risulta infatti maggiore per substrati sabbiosi e per il settore di sud, mentre la densità assoluta risulta maggiore per substrati rocciosi o di “roccia e sabbia”, quindi per i settori di nord e centro.

Il test della significatività (One-way ANOVA) è stato applicato per la densità assoluta sui 3 set di dati ed ha mostrato una buona significatività per i parametri “profondità” e “substrato”; per quanto riguarda la copertura, invece, la significatività è statisticamente confermata solo per la profondità.

Dalla PCA, eseguita con i principali descrittori delle praterie sono emerse considerazioni interessanti sulla distribuzione delle 18 praterie rispetto ai parametri esaminati: le stazioni POS.12, POS.14, POS.05 e POS.06 si trovano distanziate dalle altre, rimanendo “isolate” rispetto al data set; sono infatti, rispettivamente, la stazione con densità assoluta più alta, la stazione con densità assoluta più bassa (quest'ultima risulta anche geneticamente isolata) e le due stazioni più superficiali, (che corrispondono anche a quelle con la lunghezza fogliare totale media più bassa). La stazione POS.05 risulta particolare perchè mostra una densità molto elevata ma l'età più bassa rispetto alla totalità delle stazioni. Le stazioni POS.17 e POS.02 mostrano l'età media più elevata. I parametri di macroripartizione, in particolare la densità assoluta, pesano maggiormente sulla prima componente e spiegano meglio degli altri questa distribuzione di dati. La profondità si trova in posizione opposta rispetto ai parametri di macroripartizione; è inoltre interessante notare il suo andamento inverso rispetto al coefficiente a ; infatti il coeff a (che rappresenta la percentuale di apici erosi) aumenta al diminuire della profondità e viceversa, essendo generalmente considerato un indicatore dell'idrodinamismo locale (al netto della % di erbivoria, già esclusa dal calcolo).

Anche nella PCA in cui sono stati inseriti i soli valori di produzione, la stazione POS.14 si distanzia dalle altre. E' infatti la stazione con densità assoluta e copertura più basse dell'intero data-set. Si può inoltre osservare la separazione netta tra l'unico parametro relativo esclusivamente al rizoma e i parametri legati al comparto fogliare. Il substrato mediamente più produttivo è risultato essere quello caratterizzato da “sabbia e *matte*”; la *Posidonia oceanica* infatti assimila nutrienti dai sedimenti attraverso i rizomi e dalla colonna d'acqua attraverso le foglie (Lee *et al.*, 2007) e la *matte* è ricca di nutrienti e di materia organica.

I dati strutturali, come già detto più volte, hanno confermato l'elevata frammentazione delle praterie (Paticchio *et al.*, 2012), ma i dati genetici hanno fornito dettaglio a questa informazione: è emerso che le praterie mostrano adattamenti locali a particolari condizioni ambientali; ciò è confermato dagli elevati livelli di polimorfismo individuati in tali praterie. Tramite i RAPD, infatti, è stata registrata un'elevata variabilità genetica sia all'interno delle popolazioni, che tra le popolazioni. Dalla PcoA è risultato che le 18 praterie esaminate si dispongono in 3 popolazioni diverse, secondo un gradiente filo-geografico: nord, centro e sud. La distanza genetica è inoltre il parametro che ha più peso su questa distribuzione, spiegando il 59,6% della varianza. Come si può notare dalla PcoA e dall'albero filogenetico, i settori centrale e meridionale sono molto più simili tra loro rispetto al settore settentrionale e distanziati geneticamente da esso. La barriera al flusso genico tra il settore settentrionale e quello centrale potrebbe essere rappresentata dall'effettiva distanza geografica tra la stazione POS.05 e POS.06 (circa 2 miglia, cioè le due stazioni più distanti nell'area di studio), mentre la barriera sessuale tra il settore centrale e quello meridionale è rappresentata da Capo Linaro, coincidente con il confine tra due diverse unità fisiografiche (Argentario-Capo Linaro/Capo Linaro-Capo Anzio).

Il test AMOVA ha permesso di registrare una variabilità genetica intra-popolazione del 43.05% e una distanza genetica inter-popolazione di 56.95%, con un indice di fissazione $F=0.57$.

I valori più elevati di variabilità genetica corrispondono alle praterie del settore centrale, che comprende la presenza del porto di Civitavecchia ed è caratterizzato da un'elevata eterogeneità geo-morfologica; in accordo con Procaccini *et al.*, (2007), le piante che maggiormente competono per luce e nutrienti, aumentano la loro resistenza e la loro resilienza. La variabilità genetica è quindi una risposta dell'abilità della pianta a superare lo stress (Procaccini *et al.*, 2007).

Infine, un fattore che indica un possibile stato di stress di queste praterie è individuabile nei valori di efficienza fotosintetica, (Gera ed Alcoverro, 2012), che sono mediamente più bassi dei valori riportati in bibliografia; le praterie prese in esame sono infatti frammentate o “a macchie”, fattori che possono contribuire ad un decremento di questo parametro (Durako e Kunzelman, 2002); in una prateria frammentata infatti, sono maggiori le piante che, essendo situate alla periferia della prateria, sono esposte a predazione, idrodinamismo e lesioni fogliari, rispetto ad una prateria densa in cui le piante centrali sono protette da quelle periferiche. Questo è il motivo per cui l'efficienza

fotosintetica media è maggiore in praterie dense e continue.

Per quanto riguarda i parametri descrittivi delle dinamiche fotosintetiche, stazioni profonde dovrebbero mostrare F_v/F_m maggiori, in quanto devono avere maggiore capacità di captare la minor quantità di luce disponibile, rispetto a piante che si trovano in superficie (Lee, 2007), ma nello stesso tempo praterie molto frammentate sono soggette ad una perdita di efficienza fotosintetica (Durako, 2002) probabilmente attribuibile al maggiore stress idrodinamico sulle piante periferiche rispetto a quelle interne ad una prateria ben strutturata. In questo caso la scarsa densità dei fasci fogliari ha influito maggiormente della profondità sulle dinamiche di efficienza fotosintetica (POS 14 e 13). Inoltre, alti valori di efficienza fotosintetica, associati ad alti contenuti di chl, sono stati osservati in fanerogame situate in prossimità dei porti, dove la disponibilità di luce è più ridotta dall'elevata torbidità rispetto a stazioni distanti da essi (Ruiz e Romero, 2003; Lee *et al.*, 2007). Nell'area presa in considerazione in questo studio, infatti, i valori più elevati di efficienza sono stati misurati nella stazione POS.04 (con 0.713), POS.01 (con 0.680) e POS.08 e POS.10 (con 0.62); POS.04 e POS.08 sono le stazioni più vicine al porto di Civitavecchia (rispettivamente a nord e a sud), mentre la stazione POS.01 è la più prossima alla foce del fiume Mignone, quindi è un altro sito in cui la disponibilità di luce è ridotta da importanti apporti continentali.

Un'ulteriore interessante osservazione riguarda la stazione POS.14, situata in prossimità del Rio Fiume: per ciascun parametro analizzato, ad eccezione dell'età (densità, copertura, produzione epigea, produzione ipogea, E_k , ETR_{max} , α , F_v/F_m), presenta i valori più bassi dell'intera area di studio ed è geneticamente isolata dagli altri cluster.

Per quanto riguarda i valori medi dei parametri fotosintetici, analizzati per l'intera area di studio, è risultato che: il coefficiente di fotoadattamento E_k è $126 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; il tasso di trasporto elettronico ETR_s (in assenza di fotoinibizione) è $23.44 \mu\text{mol e}^{-} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, il tasso ETR_{max} (con fotoinibizione) è $19.79 \mu\text{mol e}^{-} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, E_d è $2905 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; il parametro α è 0.2 e il parametro β è 0.007. Infine l'efficienza fotosintetica per le 9 praterie analizzate è mediamente del 56%, con un contenuto medio di clorofilla di 0.0071 mg/cm^2 .

La modellazione matematica ed il metodo lepidocronologico hanno condotto all'ottenimento di importanti risultati di produzione fogliare. Il valore ottenuto dal metodo lepidocronologico, che consiste nel calcolo di un'effettiva biomassa secca in grammi, è stato usato come valore di confronto per verificare l'efficienza del modello, che si basa invece sui processi di assorbimento della luce da parte dei pigmenti fotosintetici

e sulle risposte in termini di efficienza e tasso fotosintetico. E' risultata una correlazione di 0.65-0.7 tra i data set ottenuti con i due differenti metodi, valore che può essere incrementato con un numero maggiore di misure *in situ*, ai fini della calibrazione.

Inoltre, questo approccio innovativo per il calcolo della produzione a partire da efficienza fotosintetica, contenuto di clorofilla ed ETR, permette di non effettuare necessariamente un campionamento distruttivo dell'intera pianta, ma di individuare l'ultima foglia intermedia e tagliarla ad una distanza di 10 cm dalla base, permettendo la sopravvivenza della pianta. Questo particolare può sembrare trascurabile, ma per una specie come la *Posidonia oceanica*, in continua regressione sulle coste mediterranee, può rappresentare un'alternativa eco-sostenibile al metodo di campionamento classico.

6_CONCLUSIONI

Il crescente rateo di cambiamento ambientale, dovuto soprattutto alle attività umane che insistono lungo le coste, e la conseguente risposta dinamica degli ecosistemi costieri, aumentano la necessità di indagare nuovi descrittori, soprattutto per quanto riguarda il monitoraggio delle praterie di *Posidonia oceanica* (Rotini *et al.*, 2013).

Il presente lavoro ha permesso di ottenere numerose e preziose informazioni sullo stato attuale delle praterie di *Posidonia oceanica* situate nel tratto di costa laziale tra Marina di Tarquinia e Santa Severa (Mar Tirreno, Italia), un'area caratterizzata da un'elevata eterogeneità geomorfologica e da un'ampia varietà di potenziali stressori, naturali ed antropici. Le analisi dei principali descrittori sono state condotte in termini spaziali, produttivi e genetici, ai fini della comprensione delle complesse dinamiche coinvolte.

In primo luogo è stato osservato che la distribuzione delle praterie riflette le condizioni di un habitat morfologicamente frammentato: solo una stazione molto superficiale, a 5 m (POS.05) e la stazione POS.12 rientrano nella categoria di “prateria densa” (classe II secondo Giraud, 1977) o di “prateria in equilibrio” (Pergent *et al.*, 1995); di contro, le stazioni POS7 e POS14 rientrano nella categoria di “semi-prateria” di Giraud (1977) o “prateria molto disturbata” di Pergent *et al.*, (1995); le restanti 14 praterie rientrano nelle categorie “rada” o “molto rada” (Giraud, 1977), oppure in “praterie disturbate” (Pergent *et al.*, 1995). La densità assoluta delle praterie è stata analizzata secondo 3 parametri abiotici: la profondità, il substrato e la popolazione di appartenenza, mostrando differenze significative per quanto riguarda i primi due. Queste prime considerazioni confermano la necessità di indagare più a fondo la dinamica delle praterie in questione, non solo attraverso i classici descrittori strutturali, fenologici e lepidocronologici, ma anche attraverso lo studio della produzione (che è stato possibile sul 50% dei siti) e della variabilità genetica. I valori di produzione totale (epigea ed ipogea) più bassi sono stati registrati per il sito POS.14 (situata in prossimità del Rio Fiume e nei pressi di una vecchia discarica degli anni '70), che mostra anche i più bassi valori di densità assoluta e variabilità genetica dell'intera area di studio. La stazione POS.05 (in prossimità della centrale di Torvaldaliga) mostra invece i valori più elevati di densità assoluta, ma anche l'età media e la lunghezza totale media fogliare più basse (quest'ultimo valore è giustificato dalla bassa profondità, infatti la lunghezza media fogliare è un parametro direttamente proporzionale alla profondità). L'analisi della variabilità genetica si è rivelata molto utile nel confermare l'ipotesi di partenza che, data l'estrema frammentazione dell'habitat e le numerose attività costiere naturali ed antropiche, le

praterie, anch'esse frammentate, rispondessero “localmente” alle variabili ambientali alle quali sono sottoposte, soprattutto in termini di densità, copertura, età, produzione, genetica. In effetti, nonostante l'elevata eterogeneità riscontrata nell'area di studio, le differenze nei parametri analizzati tra i siti sono maggiori delle differenze all'interno di ciascun sito. La variabilità genetica inter-popolazione è quindi risultata essere maggiore di quella intra-popolazione e le risposte da parte delle piante in termini genetici sono “sito-specifiche” e confermano i particolari adattamenti locali. Il clustering applicato sulla matrice di similarità e l'albero filogenetico hanno evidenziato la presenza di 3 grandi gruppi di praterie che corrispondono alle 3 zone geografiche (e alle 3 diverse tipologie di impatto costiero) identificate nell'area di studio: l'area Nord, caratterizzata principalmente dalla presenza delle due centrali elettriche e di un impianto di acquacultura, coinvolge le praterie comprese tra POS.01 e POS.05; l'area centrale, che comprende la presenza del Porto di Civitavecchia e di altri due porti commerciali, coinvolge le praterie comprese tra POS.06 e POS.10 e POS.19 e POS.20; l'area Sud, caratterizzata da turismo di massa estivo, urbanizzazione costiera e nautica da diporto, coinvolge le restanti praterie. Il risultato dell'analisi spiega che praterie sottoposte a più simili condizioni ambientali, rispondono, in termini genetici, in modo simile, formando 3 cluster distribuiti filogeograficamente lungo l'area di studio.

I monitoraggi ecologici possono essere considerati parte di un sistema regolatore più ampio e il disegno di una strategia di monitoraggio è una delle principali componenti nei programmi di gestione costiera. Anche se i dati variano in accordo con le aree di studio analizzate, i risultati ottenuti dai singoli studi possono contribuire ad una migliore conservazione di praterie situate in zone diverse, ma in condizioni simili (Moreno *et al.*, 2001).

In conclusione, in considerazione degli eventi regressivi che interessano le praterie dell'area di studio esaminata, la richiesta di misure di tutela e gestione efficaci di facile attuazione, diventa necessaria. Per tale motivo, recentemente, nei programmi di monitoraggio costieri, viene indicata la necessità di inserire nei rapporti tecnici i trend di frammentazione dei paesaggi a fanerogame (Sleeman *et al.*, 2005; Patichio *et al.*, 2012). A tal proposito questo progetto ha condotto all'applicazione di un modello (fino ad ora mai utilizzato per questa specie) per il calcolo della produzione delle praterie (descrittore dello stato qualitativo), che fornisce risposte sulle dinamiche fotosintetiche e produttive delle piante, senza la necessità di un campionamento distruttivo. I risultati ottenuti hanno mostrato una buona correlazione tra i valori di produzione stimati dal

modello e i valori di produzione misurati in laboratorio. Con la raccolta di un maggior numero di dati e conducendo simulazioni su un numero maggiore di praterie, la correlazione tra il dato di produzione stimato dal modello e il dato di produzione calcolato in laboratorio può essere ulteriormente incrementata, rendendo questo approccio per lo studio delle praterie di *Posidonia oceanica* innovativo, economico e non invasivo.

Questo progetto ha condotto alla pubblicazione del seguente articolo:

ID: remotesensing-39588

Titolo: *Mapping spatial pattern of Posidonia oceanica meadow by means of Daedalus ATM airborne sensor in the coastal area of Civitavecchia (central Tyrrhenian sea, Italy).*

Autori: Flavio Borfecchia *, Carla Micheli, Filippo Carli, Selvaggia Cognetti de Martiis, Valentina Gnisci, Viviana Piermattei, Alessandro Belmonte, Luigi De Cecco, Sandro Martini, Marco Marcelli

Un secondo articolo è in fase di elaborazione.

Ringraziamenti

Per il conseguimento del presente progetto di ricerca ringrazio profondamente tutti i collaboratori del Laboratorio di Oceanologia Sperimentale ed Ecologia Marina di Civitavecchia (Università della Tuscia), che con le loro competenze mi hanno aiutata in questa esperienza; in particolare Cristiano Melchiorri e Simone Bonamano per l'apporto scientifico-tecnico nella parte di tesi che riguarda la modellazione matematica, Emanuele Mancini e Monica Giovacchini per l'aiuto psico-fisico nei campionamenti subacquei ed il Prof. Marco Marcelli per avermi guidata scientificamente e moralmente nell'intero progetto.

Ringrazio inoltre la Prof.ssa Carla Micheli (ENEA) per le analisi genetiche, il Prof. Luigi Lazzara per la strumentazione utilizzata e il Diving di Riva di Traiano per il supporto alle numerose immersioni subacquee effettuate per i campionamenti.

Voglio inoltre esprimere la mia gratitudine nei confronti delle persone che, facendo parte della mia vita, mi hanno accompagnata, aiutata, supportata lungo il percorso, anche semplicemente con la loro presenza.

A Laura, la sorpresa più bella di quest'ultimo anno, per la sua capacità di cancellare ogni mia fatica mettendo il sorriso e la dolcezza in ogni cosa.

A mio padre, Gianni, che nonostante la distanza fisica rappresenta il mio punto di riferimento costante. Grazie: per la fiducia, la stima, l'affetto, e per avermi dato sempre la libertà di scegliere con la mia testa e di camminare sulle mie gambe.

A Maia e Melissa, le mie dolci, presenti e pazienti sorelle.

Alle mie amiche Barbara, Sonia, Chiara e Francesca per avermi sempre ricordato di credere in me stessa nei momenti difficili.

A Marta, collega e compagna di numerose avventure, che ha quotidianamente condiviso

con me gioie e dolori.

A Monica, collega ed amica scoperta che mi ha accompagnata giorno dopo giorno lungo tutto il percorso del progetto.

Grazie, infine, a quelle persone che hanno cercato di screditare le mie scelte e il mio lavoro, poichè è anche grazie a loro se sono cresciuta e migliorata a livello scientifico ed umano.

BIBLIOGRAFIA

Alcoverro T., Manzanera M., Romero J., (1998). *Seasonal and age-dependent variability of Posidonia oceanica (L.) Delile photosynthetic parameters*. Journal of experimental marine biology and ecology, 230: 1-13.

Allendorf F.W., Luikart G., (2007). *Conservation and the Genetics of Population*. Balckwell, 642.

Apostolaki E.T., Marbà N., Holmer M., Karakassis I., (2009). *Fish farming enhances biomass and nutrient loss in Posidonia oceanica (L.) Delile*. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 81: 390-400.

Ardizzone G.D., Pelusi P., (1984). *Yield and damage evaluation of bottom trawling on Posidonia meadows*. International Workshop *Posidonia oceanica* Beds, Boudouresque C.F., Jeudy de Grissac A. et Olivier J. edit., GIS Posidonie Publ., Fr., 1: 63-72.

Augier H., (1985). *L'herbier a Posidonia oceanica, son importance pour le littoral mediterraneen, sa valeur comme indicateur biologique de l'etat de santè de la mer, son utilisation dans le surveillance du milieu, les bilans ecologiques et les etudes d'impact*. Vie marine, 7: 85-113.

Bertrand M.C., Boudouresque C.F., Foret P., Lefevre J.R., Meinesz A., (1986). *Reseu de surveillance Posidonies*. Rapport 1985. Conseille Reg. PACA, GIS Posidonie CIPALM, CAPVAR, CELCOP, GIS Posidonie ed., Marseille, Fr:1-161.

Bianchi C.N., Bedulli D., Morri C., Occhipinti, Ambrogi A., (1989). *L'herbier de posidonies: écosystème ou carrefour écoéthologique?* In: International Workshop on *Posidonia oceanica* beds, C.F. Boudouresque, A. Meinesz and E. Fresi, eds, GIS Posidonie, FR, 2: 257-272.

Blanc J.J., Jeudy de Grissac A., (1984). *Erosion sous-marines des herbiers a Posidonia oceanica (Mediterranee)*. In International Workshop on *Posidonia oceanica* Beds, eds C.F. Boudouresque, A. Jeudy de Grissac, J. Olivier, GIS Posidonie publ, 1: 23-28.

Bonamano S. (2013). *Influenza dei processi dinamici marini sulla distribuzione della produzione primaria fitoplanctonica nel mar di Sardegna*. Corso di dottorato di ricerca in “Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche”- XIX.

Borg J. A., Rowden A. A., Attrill M. J., Schembri P. J., Jones M. B., (2006). *Wanted or alive: high diversity of macroinvertebrates associated with living and dead posidonia oceanic matte*. Marine Biol., 149: 667-677.

Boudouresque C.F., Thommeret J., Thommeret Y., (1980). *Sur la decouverte d'un bioconcretionnement fossile intercalé dans l'herbier a Posidonia oceanica dans la baie de calvi (Corse)*. Journées Etud. Systém. Biogéogr. Médit. Comm. Int: Explor. Scient. Mediterr., Cagliari, 139-142.

Boudouresque C.F., Meinesz A., (1982). *Decouverte de l'herbier de Posidonies*. Chahier Parc Nation. Port-Cros, 4: 80.

Boudouresque C.F., Bianconi C.H., (1986). *Posidonies profondes dans le coralligene de Sulana*. Trav. Sci. Parc. Nat. reg. Res Nat. Corse, 2: 36-39.

Boudouresque C.F., Bertrand M.C., Bouladier E., Foret P., Meinesz A., Pergent G., Vitello P., (1990). *Le Réseau de surveillance des herbiers de Posidonies mis en place en Région Provence-Alpes-Côte d'Azur*. Rapp. Commiss. internation. Mer Médit., 32(1): 11.

Boudouresque C.F., Bernard G., Bonhomme P., Charbonnel E., Diviacco G., Meisnez A., Pergent G., Pergent-Martini C., Ruitton S., Tunesi L., (2006). *Preservation et conservation des herbiers a Posidonia oceanica*. RaMoGe Publication, Monaco.

Boudouresque C.F., Bernard, G., Pergent G., Shili A., Verlaque M., (2013). *Regression of Mediterranean seagrasses caused by natural processes and anthropogenic disturbances and stress: A critical review*. Med. Marine Science, 14 (1): 193-203.

Bourcier M., (1989). *Regression des herbiers a Posidonia oceanica (L.) Delile, a l'est*

de Marseille, sous l'action conjuguée des activités humaines et des modifications climatiques. In International Workshop on Posidonia oceanica Beds, eds. C.F. Boudour-
esque, A. Meinesz, E. Fresi, V. Gravez, GIS Posidonie publ, 2: 287-292.

Buia M.C., Russo G.F., Mazzella L., (1985). *Interrelazioni tra Cymodocea nodosa e Zostera noltii in un prato misto superficiale dell'isola d'Ischia*. Nova Thalassia, 7: 328-331.

Buia M.C., Marzocchi M., (1995). *Dinamica dei sistemi a Cymodocea Nodosa, Zostera marina e Zostera noltii nel Mediterraneo*. Giorn. Bot. It., 129 (1): 319-326.

Buia M.C., Gambi M.C., Dappiano M., (2003). *Manuale di metodologie di campionamento e studio del Benthos marino mediterraneo*. I sistemi a Fanerogame marine (5): 156-160.

Burkholder J.M., Tomasko D.A., Touchette B.W., (2007). *Seagrasses and eutrophication*. Journal of experimental Marine Biology and Ecology. 350: 46-72.

Cabello-Pasini A., Muniz-Salazar R., Ward D.H., (2003). *Annual variation of biomass and photosynthesis in Zostera marina at its southern end of distribution in the North Pacific*. Aquatic Botany, 76: 31-47.

Caniglia G., Borella S., Curiel D., Nascimbeni P., Paloschi F., Rismondo A., Scarton F., Tagliapietra D., Zanella L., (1990). *Cartografia della distribuzione delle fanerogame marine nella laguna di Venezia*. Giorn. Bot. Ital., 124(1): 212.

Costanza R. et al., (1997). *The value of the world's ecosystem services and natural capital*. Nature: 387: 253-260.

De Falco G., Baroli M., Murru E., Piergallini G., Cancemi G., (2006). *Sediment analysis evidences two different depositional phenomena influencing seagrass distribution in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean Sea)*. Journal of Coastal Research, 22(5): 1043-1050.

Delgado O., Ruiz J., Perez M., Romero J., Ballesteros E., (1999). *Effects of fish farming on seagrass (Posidonia oceanica) in a Mediterranean bay: seagrass decline after organic loading cessation*. Oceanol. Acta 22; 109-117.

Della Porta S. L., Wood J. and Hicks J. B., (1983). *A plant DNA miniprep: version II*. Plant Molecular Biology Reporter, 1 (4): 19-21.

Denninson W.C., (1990). *Chlorophyll content*. Seagrass research methods, 15: 83-85.

Denninson W.C., Orth R.J., Moore K.A., Stevenson J.C., Carter V., Kollar S., Bergstrom P.W., Batiuk R.A., (1993). *Assessing water quality with submersed aquatic vegetation*. Bioscience, 43: 86-94.

Diviacco G., Spada E., Virno Lamberti C., (2001). *Le Fanerogame marine del Lazio. Descrizione e cartografia delle praterie di Posidonia oceanica e dei prati di Cymodocea nodosa*. Quaderno ICRAM: 113.

Dolce T.(2010). *Analisi della produzione primaria in Posidonia oceanica*. Tesi di Dottorato.

Duarte C.M., Chiscano C.L., (1999). *Seagrass biomass and production: a reassessment*. Aquat. Bot., 65: 159-174.

Durako M.J., Kunzelman J.I., (2002). *Photosynthetic characteristics of Thalassia testudinum measured in situ by pulse-amplitude modulated (PAM) fluorometry: methodological and scale-base considerations*. Aquat. Bot., 73: 173-185.

Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M., (1992). *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data*. Genetics 131: 479-491.

Falkowski P.G., Raven J., (1997). *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science:375.

Gambi M.C., Dappiano M., (2003). *Manuale di metodologie di campionamento e studio*

del benthos marino mediterraneo. APAT-ICRAM-SIBM; 145-187.

Gera A., Alcoverro T., Mascarò o., Pérez M., Romero J., (2012). *Exploring the utility of Posidonia oceanica chlorophyll fluorescence as an indicator of water quality within the European Water Framework Directive*. Environ Monit Assess, 184: 3675-3686.

Giraud G., (1977). *Contribution a la description et a la phenologie quantitative des herbiers a Posidonia oceanica (L.) Delile*. These doctorat 3eme cycle, univ. Aix-Marseille II, France: 150.

Guidetti P. e Fabiano M., (2000). *The use of lepidochronology to assess the impact of terrigenous Discharges on the Primary Leaf Production of the Mediterranean Seagrass Posidonia oceanica*. Mar. Poll. Bull., 40 (5): 449–453.

Geider R.J., Osborne B.A., (1992). *Algal photosynthesis*. Chapman and Hall: 256.

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P. D., (2001). *PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*. Palaeontologia Electronica 4(1): 9.

Kautsky H., Platt T., (1960). *Chlorophyll fluorescenz und kohlenzure assimilation*. Biochemische Zeitschrift, 322: 277-292.

Krause G.H., Weis E., (1991). *Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics*. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 42: 313-49.

Kuo J. E Kirkman H., (1996). *Seedling development of selected Posidonia species from southwest Australia*. In: proceeding of an International Workshop on Seagrass Biology, WA, 57-64.

Jeudy de Grissac A., Boudouresque C.F. (1985). *Role des herbiers des phanerogames marines dans les mouvements des sèdiments cotiers: les herbiers a Posidonia oceanica*. Colloque Fr-japon. Oceanography, 1: 143-151.

Lazzara L., Bianchi F., Massi L., Ribera D'Alcalà M., (2010). *Pigmenti clorofilliani per la stima della biomassa fototrofa*. Manuali e Linee guida ISPRA 56/2010. Metodologie di studio del plancton marino. ISBN 978-88-448-0427-5. pp.365-377.

Lazzara L., Saggiomo V., Fani F., Mangoni O., Santarpia I., (2010). *Parametri fotosintetici da fluorescenza variabile modulata (PAM)*. Metodologie di studio del plancton marino, 30: 339-344.

Lee K.S., Park S.R., Kim Y. K., (2007). *Effects of irradiance, temperature and nutrients on growth dynamics of seagrasses: a review*. Journal of Experimental Marine biology and Ecology, 350: 144-175.

Leriche *et al.*, (2005). *Spatial, temporal and structural variations of a Posidonia oceanica seagrass meadow facing human activities*. Aquatic Botany, 84: 287-293.

Levenberg K., (1944). *A method for the solution of certain non-Linear problems in least squares*. Quarterly of Applied Mathematics, 2: 164-168.

Mantel N., 1967. *The detection of disease clustering and a generalized regression approach*. Cancer research, 27 (1): 209-220.

Marcelli, M.; Campana, O., Di Maio A., Mangoni, O., Ribera d'Alcala, M., Saggiomo, V., T Tozzi, S., Fresi, E., (1997). *Development of a new operative method to estimate primary production in the pelagic system with a quasi synoptic space time scale*. Paper presented at Progress in oceanography of the Mediterranean Sea- International Conference, Rome, 17-19 Novembre 1997.

Marcelli, M., Carlini, L., Di Maio, A., Lazzara, L., Nardello, I., Vellucci, V. Ribera D'Alcalà, M., (2003). *Modello di stima della produzione primaria pelagica basato sulle variazioni circadiane dell' efficienza fotosintetica*. XIII Congresso Nazionale Società Italiana di Ecologia, Como 8-10/09/03.

Maritorena S. e Siegel D.A., (2005). *Consistent merging of satellite ocean color data sets using a bio-optical model*. Remote sensing of environment, Elsevier, 94: 429-440.

Marquardt D., (1963). *An Algorithm for Least-Squares Estimation of nonlinear Parameters*. SIAM Journal on Applied Mathematics, 11(2): 431-441.

Maxwell K., Johnson G.N., (2000). *Chlorophyll fluorescence- a practical guide*. J. Exp. Bot., 51: 659-668.

Mazzella L., Buia M.C., Spinoccia L., (1995). *Biodiversity of the epiphytic diatom community on leaves of Posidonia oceanica*. Proceedings of the 13th Diatom Symposium. Biopress limited, Bristol: 241-251.

McKillup S. e Darby Dyar M., (2010). *Geostatistics explained*. Cambridge University press.

Mc Roy C.P. e McMillan C., (1977). *Production, ecology and physiology of seagrasses*. In:McRoy C.P., Helfferich C. (eds.). Seagrass ecosystems. Dekker, New York, 53-87.

Micheli C., Paganin P., Peirano A., Caye G., Meinesz A., Bianchi C.N., (2005). *Variability of Posidonia oceanica (L.) Delile in relation to local factors and biogeographic patterns*. Aquatic botany, 82: 210-223.

Micheli, C., Borfecchia, F., De Cecco, L., Martini, S., Ceriola, G., Bollanos, S., Vlachopoulos, G., Valiante, L. M., Fresi, E., Campbell, G., (2010a). *Seagrass Monitoring by Remote Sensing in the Context of Biodiversity Conservation*. Rapp. Comm. int. Mer Médit., 39.

Molinier R., Picard J., (1953). *Reserches sur les herbiers de phanerogames marines du littoral mediterraneen francais*. Ann. Inst. Oceanogr. Paris, 27(3): 127-324.

Montefalcone M., Chiantore M., Lanzone A., Morri C., Bianchi C.N., Albertelli G., (2008). *BACI design reveals the decline of the seagrass Posidonia oceanica induced by anchoring*. Marine Pollution Bulletin, 56: 1637-1645.

Morel A. and Prieur L., (1977). *Analysis of variations in ocean color1*. Limnology and

oceanography, 22(4): 709-722.

Moreno D., Aguilera P. A., Castro H., (2001). *Assessment of the conservation status of seagrass (Posidonia oceanica) meadows: implications for monitoring strategy and the decision-making process*. Biological Conservation, 102: 325-332.

Nei, M., Li, W.H., 1979. "Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases." Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76, 5269–5273.

Nybakken J.W., (2001). *Seagrass communities*. In: Marine Biology: An Ecological Approach, San Francisco, 210—218.

Onuf C.P., (1994). *Seagrasses, dredging and light in Laguna Madre Texas, U.S.A.* Estuar. Coast. Shelf Sci., 39: 75-91.

Ott J., (1980). *Growth and production in Posidonia oceanica (L.) Delile*. P.S.Z.N Mar. Ecol., 1: 47-64.

Pasqualini V., Pergent-Martini C., Pergent G., (1998). *Use of remote sensing for the characterization of the Mediterranean coastal environment – the case of Posidonia oceanica*. Journal of Coastal Conservation, 4: 59-66.

Paticchio N., Belluscio A., Criscoli A., Ardizzone G.D., (2012). *La cartografia come strumento di analisi per i paesaggi marini. Le praterie di Posidonia oceanica: un caso studio*. Biol. Mar. Mediterr., (19) 1: 108-111.

Pergent G., (1987). *Recherches lépidochronologiques chez Posidonia oceanica (Potamogetonaceae). Fluctuations des anatomiques et morphologiques des écailles des rhizomes*. Thèse Doct. Océanol., Univ. Aix-Marseille II, Fr.: 1-853.

Pergent G., Boudouresque C.F., Crouzet A., Meinesz A., (1989). *Cyclic changes along Posidonia oceanica rhizomes (Lepidochronology). Present state and perspectives*. Mar. Ecol., 10 (3): 221-230.

Pergent G., (1990). *Lepidochronological analysis of the seagrass Posidonia oceanica (L.) Delile: a standardized approach*. Aquatic Botany, 37: 39-54.

Pergent G., (1991). *Les indicateurs écologiques de la qualité du milieu marin en Méditerranée*. Oceanis, 17 (4): 341-350.

Pergent G., Romero J., Pergent-Martini C., Mateo M.A., Boudouresque C.F., (1994). *Primary production, stocks and fluxes in the Mediterranean seagrass Posidonia oceanica*. Mar. Ecol. Progr. Ser. 106: 139-146.

Pergent-Martini C. e Pergent G., (1994). *Lepidochronological analysis in the mediterranean seagrass Posidonia oceanica: state of the art and future developments*. Oceanologica acta, 17 (6): 673-681.

Pergent-Martini C., Rico-Raimondino V., Pergent G., (1994). *Primary production of Posidonia oceanica in the Mediterranean Basin*. Mar. Biol., 120: 9–15.

Pergent G., Pergent-Martini C., Boudouresque C. F., (1995). *Utilisation de l'herbier à Posidonia oceanica comme indicateur biologique de la qualité du milieu littoral en Méditerranée: état des connaissances*. Mesogée, 54: 3–27.

Pergent-Martini C., Pergent G., (1996). *Spatio-temporal dynamics of Posidonia oceanica beds near a sewage outfall (Mediterranean-France)*. Seagrass Biology. Proceedings of an International Workshop, Rottnest Island, Western Australia, 299-306.

Pergent-Martini C., Pergent G., (2000). *Are marine phanerogams a valuable tool in the evaluation of marine trace-metal contamination: example of the Mediterranean sea?* Environ. Pollut., 13 (1-6): 126-147.

Pergent-Martini C., Leoni V., Pasqualini V., Ardizzone G.D., Balestri E., Bedini R., Beluscio A., Belsher T., Borg J., Boudouresque C.F., Boumaza S., Bouquegneau J.M., Buia M.C., Calvo S., Cebrian J., Charbonnel E., Cinelli F., Cossu A., Di Maida G., Dural B., Francour P., Gobert S., Lepoint G., Meinesz A., Molenaar H., Mansour H. M., Panayo-

tidis P., Peirano A., Pergent G., Piazzzi L., Pirrotta M., Relini G., Romero J., Sanchez-Lizaso J.L., Semroud R., Shembri P., Shili A., Tomasello A., Velimirov B., (2005). *Descriptors of Posidonia oceanica meadows: use and application*. Ecological Indicators, 5: 213-230.

Pergent-Martini C., Boudouresque C.F., Pasqualini V., Pergent G., (2006). *Impact of fish farming facilities on Posidonia oceanica meadows: a review*. Marine ecology, 27 (4): 310-319.

Phillips R.C., Mc Roy C.P. ,(1980). *Handbook of seagrass biology: an ecosystem perspective*. Garland STPM Press, new York.

Piermattei, V., Bortoluzzi, G., Cozzi, S., Di Maio, A., & Marcelli, M. (2006). *Analysis of mesoscale productivity processes in the Adriatic Sea: Comparison between data acquired by Sarago, a towed undulating vehicle, and CTD casts*. Chemistry and Ecology, 22(sup1), S275-S292.

Platt T. , Gallegos C. L. e Harrison W. G., (1980). *Photoihibition of ohotosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton*. Journal of Marine Research, 38.

Procaccini G., Buia M.C., Gambi M.C., Perez M., Pergent G., Pergent-Martini C., Romero J., (2003). *Seagrass status and extent along the Mediterranean coasts of Italy, France and Spain*. World Atlas of seagrass: Present Status and Future Conservation. University of California Press Publ., 56-66.

Procaccini G., Olsen J. L. , Reusch T.B.H., (2007). *Contribution of genetics and genomics to seagrass biology and conservation*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 350: 234-259.

Ralph P. J., Durako M. J., Enriquez S., Collier C. J., Doblin M. A., (2007). *Impact of light on seagrasses*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 350: 176-193.

R Development Core Team, (2008). *R: a language and ebvironment for statistical com-*

puting. R Foundation for Statistical Computing.

Rohlf F.J., (1993). NT-SYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.0. Seyauket, N.Y.: Exeter Pub.

Romero J., (1989). *Primary production of Posidonia oceanica beds in the Medas Island (Girona, NE Spain)*. In: Boudouresque C.F., Meinesz A., Fresi E., Gravez V. (eds.). International Workshop on *Posidonia oceanica* beds, GIS Posidonie, Marseilles, 2: 85-91.

Romero J., Alcoverro T., Martinez-Crego B., Perez M., (2005). *The seagrass Posidonia oceanica as a quality element under the Water Framework Directive: POMI, a multivariate method to assess ecological status of catalan coastal waters*. Working document of the POMI group, University of barcelona and Centre d'estudis Avancats de Blanes, 15.

Rotini A., Belmonte A., Barrote I., Micheli C., Peirano A., Santos R.O., Silva J., Migliore L., (2013). *Effectiveness and consistency of a suite of descriptors for assessing the ecological status of seagrass meadows (Posidonia oceanica L. Delile)*. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 1-8.

Ruiz J.M., Romero J., (2003). *Effects of disturbances caused by coastal constructions on spatial structure, growth dynamics and photosynthesis of the seagrass Posidonia oceanica*. Marine pollution Bulletin. 46: 1523-1533.

Ruiz J.M., Pèerez M., Romero J., (2001). *Effects of fish farm loadings on seagrass (Posidonia oceanica) distribution, growth and photosynthesis*. Marine Pollution Bulletin, 42: 749-760.

Saggiomo V., Lazzara O., Mangoni O., Fani F., Santarpia I., (2010). Parametri fotosintesi: curve fotosintesi-irradianza. Metodologie di studio del Plancton marino. ISPRA, 31: 345-351.

Sanchez-Lizaso J.L., Guillen J.E., Ramos A., (1990). *The regression of Posidonia oceanica meadows in El Campello (Spain)*. Rapports et proces-Verbaux des Reunions de la Commission internationale pour l'Exploration scientifique de la Mediterranee, 32 (1): 7.

Scarton F., Curiel D., Rismondo A., (1995). *Aspetti della dinamica temporale delle praterie a fanerogame marine in laguna di Venezia*. Lavori Soc. Ven. Sc. Nat., 20:95-102.

Short F.T., Wyllie-Echeverria S., (1996). *Natural and human induced disturbance of seagrasses*. Environmental Conservation, 23(1): 17-27.

Sleeman J. D., Kendrick G. A., Boggs G. S., Hegge J. J., (2005). *Measuring fragmentation of seagrass landscapes: which indices are most appropriate for detecting change?* Mar. Freshwater Res., 56: 851-864.

Zieman J.C., 1974. *Methods for the study of the growth and production of the turtle grass, Thalassia testudinum Konig*. Aquaculture, 4: 139-143.

Zieman J.C., Thayer G.W., Robblee M.B., Zieman R.T., (1979). *Production and export of seagrasses from a tropical bay*. In: Livingston R.J., (ed.). Ecological processes in coastal and marine systems. Plenum Press, New York, 21-34.

Zieman J.C., Wetzel R.G., (1980). *Productivity in seagrasses: methods and rates*. Handbook of seagrass biology: an ecosystem perspective, 87-117.