

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI ECOLOGIA E SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

DOTTORATO IN ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE

XIX CICLO

**STRUTTURA GENETICA ED ETEROGENEITÀ AMBIENTALE NEL
NASELLO (*Merluccius merluccius*)**

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE: BIO/07

COORDINATORE:

Prof.ssa Roberta Cimmaruta

TUTOR:

Prof.ssa Roberta Cimmaruta

DOTTORANDO:

Dott. Massimo Despini

INDICE

INDICE	2
1. INTRODUZIONE	4
2. STUDI RECENTI SU <i>M. MERLUCCIUS</i>	11
3. BIOLOGIA E SISTEMATICA	16
3.1 Inquadramento tassonomico	16
3.2 Morfologia	17
3.3 Distribuzione e migrazioni	17
3.4 Riproduzione	18
3.5 Alimentazione	19
4. CENNI DI PALEOCEANOLOGIA:	
LA STORIA DEL MEDITERRANEO	20
4.1 Le glaciazioni Pleistoceniche	21
4.2 Interglaciale Riss-Würm	22
4.3 Variazioni della ricchezza specifica	23
4.4 Affinità delle popolazioni mediterranee	24
5. MATERIALI E METODI	25
5.1 Campionamento	25
5.2 Analisi di laboratorio	26
5.2.1 Tecniche elettroforetiche	26
5.2.2 Estrazione del DNA	26
5.2.3 Amplificazione mediante PCR	27
5.2.4 Sequenziamento	28
5.3 Analisi dei dati elettroforetici	29
5.3.1 Equazione di Hardy-Weinberg e linkage-disequilibria	26
5.3.2 Differenziamento allozimico e struttura delle popolazioni	29
5.3.3 Variabilità genetica delle popolazioni	30
5.4 Analisi dei dati di sequenza	32

5.4.1 Analisi dei polimorfismi e stima del network di Parsimonia	32
5.4.2 Diversità genetica delle popolazioni	32
5.4.3 Fluttuazioni demografiche delle popolazioni	33
6. RISULTATI	35
6.1 Loci allozimici	35
6.1.1 Analisi dei polimorfismi	35
6.1.2 Variabilità genetica delle popolazioni	41
6.1.3 Differenziamento genetico delle popolazioni	42
6.2 Analisi delle sequenze mitocondriali	48
6.2.1 Network di parsimonia e distribuzione geografica degli aplotipi	48
6.2.2 Variabilità delle popolazioni	50
6.2.3 Test di espansione demografica	52
7. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	56
BIBLIOGRAFIA	66

INTRODUZIONE

Gli studi sulla struttura genetica delle popolazioni naturali condotti attraverso l'applicazione di tecniche sia biochimiche (analisi elettroforetica dei sistemi gene-enzima) che molecolari, a partire degli anni sessanta in poi, hanno contribuito a dar importanti risultati, come:

- 1) la conoscenza della tassonomia e delle relazioni evolutive tra le specie;
- 2) la stima dei livelli di variabilità genetica intrapopolazionale;
- 3) la chiarificazione dei meccanismi che collegano la struttura genetica con la demografia delle popolazioni naturali, oggetto di cattura;
- 4) la valutazione della diversità genetica tra le popolazioni naturali e conseguente identificazione di stock per le specie sfruttate dall'uomo.

Il nasello (*Merluccius merluccius*) è una specie economicamente importante, in gran parte del suo areale, dove è fortemente sfruttata, e quindi da considerare a rischio sia di crollo demografico che di erosione delle sue risorse genetiche.

La ricerca condotta per la presente tesi, ha come obiettivo la caratterizzazione genetica mediante DNA mitocondriale di campioni mediterranei ed atlantici di *Merluccius merluccius* con lo scopo di:

- 1) Verificare il grado di differenziamento delle varie popolazioni e stock;
- 2) Analizzare il contributo delle diverse forze evolutive nel plasmare il pattern genetico di *Merluccius merluccius*, con particolare riguardo al ruolo della selezione;
- 3) Ricostruire gli eventi paleogeografici che eventualmente possono aver contribuito a produrre i pattern osservati.

Le interazioni che si instaurano tra le popolazioni e l'ambiente in cui esse vivono generano i processi di adattamento, attraverso l'azione della selezione naturale. Tale processo implica però l'esistenza del polimorfismo genetico, cioè la coesistenza di più genotipi all'interno di una stessa popolazione. La selezione naturale agisce aumentando la fitness dei portatori di genotipi meglio adattati all'ambiente e quindi, di generazione in generazione, le frequenze di quegli alleli conferiti da tale fitness.

Un punto di partenza per la conservazione delle specie, consiste quindi nel mantenimento della diversità genetica nelle popolazioni naturali (Avice e Hamrick, 1996);

questo perché ad alti livelli di variabilità genetica nelle popolazioni corrisponde una maggiore probabilità di sopravvivenza e adattamento della specie nel tempo e/o in condizioni ecologiche variabili (Red Queen hypothesis, Van Valen, 1973).

Gli adattamenti biologici sono il risultato di interazioni tra i pool genici delle popolazioni e i fattori selettivi dell'ambiente in cui esse vivono. La selezione naturale è quindi il processo responsabile dell'adattamento degli organismi all'ambiente, ed agisce operando sulle frequenze delle variazioni genetiche che aumentano la fitness dei loro portatori. Se i portatori di un allele hanno in media una progenie più numerosa (= maggiore fitness) dei portatori di altre varianti alleliche, la frequenza di tale allele aumenterà nel pool genetico della popolazione di generazione in generazione. Naturalmente al mutare delle condizioni ambientali possono variare anche le combinazioni alleliche (genotipi) che presentano maggiore fitness e quindi la variazione delle frequenze alleliche a livello di popolazione può mostrare "tendenze" diverse in tempi diversi. Attraverso questo processo la selezione naturale dirige in senso adattativo l'evoluzione del patrimonio ereditario delle popolazioni e non mira ad ottenere tipi predeterminati di organismi quanto piuttosto organismi che siano adattati all'ambiente in cui vivono.

Questo significa che ogni variabile fisica, chimica e biologica dell'ambiente che influisce sulla vita di un organismo, almeno in una fase del suo ciclo vitale, assume il ruolo di fattore ecologico evolutivo, contribuendo a selezionare ad ogni generazione i genotipi meglio adattati alle condizioni ambientali presenti. Se ne deduce che l'adattamento di una popolazione ad una nuova condizione ambientale è possibile solo in presenza di polimorfismo genetico. Su questa "base comune" si sono poi evolute strategie adattative estremamente eterogenee, da quelle più semplici che coinvolgono adattamenti basati sulla selezione di mutanti a uno o pochi geni fino a strategie adattative complesse, che implicano cambiamenti spesso integrati del ciclo biologico e del comportamento di una o più specie. Inoltre, in ambienti eterogenei, la selezione stessa può promuovere e mantenere polimorfismi genetici e determinare una distribuzione non casuale dei genotipi nei diversi microhabitat (habitat selection). E ancora, a livello comportamentale, si può osservare che individui caratterizzati da genotipi differenti si posizionino in tessere ambientali diverse (habitat choice). Tessere ambientali ampie e discontinue possono perfino portare alla formazione di ecotipi, ovvero di popolazioni conspecifiche diversamente adattate ad uno o più fattori ecologici. E su tempi più lunghi tali ecotipi possono evolvere in specie

biologiche distinte, morfologicamente simili, ma tra loro riproduttivamente isolate: specie gemelle (Bullini, 1998).

La ricerca delle evidenze sperimentali delle interazioni in ambienti naturali tra struttura genetica delle popolazioni e caratteristiche degli habitat in cui esse vivono, presenta non poche difficoltà; ciò che a livello teorico può essere considerato singolarmente (selezione, deriva, mutazione, flusso genico, habitat choice etc.), è molto probabile che in natura agisca contemporaneamente. In tal modo gli strumenti teorici a disposizione non sempre si rivelano all'altezza di spiegare i fenomeni riscontrati.

Pesci ed altri organismi marini hanno mostrato in molti casi una stretta correlazione fra polimorfismo genetico e risposta ecologica al cambiamento ambientale (Nevo *et al.*, 1984; Cimmaruta *et al.*, 2003). Alcuni studi allozimici condotti su specie marine hanno rivelato il ruolo della selezione nel mantenimento del polimorfismo genetico, come evidenziato nei lavori su *Fundulus heteroclitus* (Power & Schulte, 1998; Ropson *et al.*, 1990), *Mytilus edulis* (Koehn *et al.*, 1980; Hilbish & Koehn, 1985) o *Merluccius merluccius* (Cimmaruta *et al.*, 2005).

Il ciprinodonte *Fundulus heteroclitus*, ampiamente distribuito in Nord America e caratterizzato da un elevato livello di polimorfismo, si presta bene come modello per comprendere il rapporto che intercorre fra la struttura genetica e la differenziazione geografica delle popolazioni e la variazione delle caratteristiche ecologiche dell'habitat. Nello studio di Ropson *et al.* (1990) sono stati analizzati 15 campioni della costa orientale del Nord America mediante elettroforesi multilocus. I campioni raccolti nelle acque fredde delle latitudini più a nord presentavano una ridotta diversità genetica rispetto alle popolazioni delle acque più calde nelle latitudini meridionali. Inoltre in otto loci è stata riscontrata una variazione clinale delle frequenze alleliche associata alla latitudine; tale variazione è stata interpretata come un'intergradazione secondaria legata alle oscillazioni climatiche dei periodi glaciali. L'andamento dei singoli clini lungo il gradiente di latitudine, però, non risultava perfettamente coincidente per tutti i loci interessati, per i quali variavano sia la forma che l'ampiezza del cline. Inoltre un campione raccolto a latitudini settentrionali, ma caratterizzato da acque più calde, presentava un genotipo "meridionale", più simile quindi ai campioni delle località del sud. Tali particolari osservazioni e anomalie nella struttura del cline hanno permesso di ipotizzare l'azione della selezione sulla distribuzione allelica di alcuni loci. Probabilmente la temperatura agisce selettivamente sui

genotipi di ciascun locus in maniera differenziale, infatti ogni locus risulta essere caratterizzato da un proprio intervallo termico di sensibilità, e questo spiegherebbe la variazione riscontrata tra i diversi pattern del cline.

Alcuni ambienti sono caratterizzati da brusche e profonde fluttuazioni dei parametri ambientali quali salinità, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto, condizioni che rendono particolarmente difficile la sopravvivenza e l'adattamento delle popolazioni.

Negli ecosistemi acquatici marini spesso è la salinità che assume un importante ruolo di fattore ecologico selettivo sulle popolazioni. In diversi casi di studio (*Dicentrarchus labrax*, Lemaire *et al.*, 2000; *Mytilus edulis*, Hilbish e Koehn, 1985; *Merluccius merluccius*, Cimmaruta *et al.*, 2005) è stato dimostrato come l'azione selettiva della salinità possa influenzare la struttura genetica ed il differenziamento delle popolazioni naturali. Nel nasello, ad esempio, la salinità sembra agire come fattore selettivo sui primi stadi di vita (uova e larve) favorendo alleli differenziati tra i bacini atlantico e mediterraneo, caratterizzati da diversi valori di salinità. Nella spigola e nel mitile, in particolare, è stato evidenziato come la salinità influenzi selettivamente la distribuzione dei genotipi tra le popolazioni degli ambienti lagunari e quelle del mare aperto.

Uno studio allozimico condotto da Cimmaruta *et al.* (2005) ha analizzato i rapporti tra la struttura genetica del nasello (*Merluccius merluccius*) e l'andamento delle principali caratteristiche ambientali (salinità e temperatura) nel suo areale di distribuzione. Le popolazioni dell'Atlantico e del Mediterraneo sono risultate geneticamente differenziate e separate fra loro dal fronte di Almeria-Oran, situato ad est dello Stretto di Gibilterra. Quest'area costituisce una sorta di confine ecologico ed idrodinamico per molti organismi marini a causa della presenza di correnti che si ipotizza agiscano come barriere nei confronti del flusso genico. Due loci in particolare (*Gapdh* e *Gpi-2*) hanno mostrato una variazione clinale delle frequenze alleliche in senso longitudinale, con gli alleli di entrambi i loci che presentano un graduale cambiamento nelle frequenze alleliche, in maniera più marcata nella *Gapdh*, fino ad osservare una completa inversione tra i campioni atlantici e quelli del Mediterraneo orientale. Il cline delle frequenze alleliche è risultato significativamente correlato alla variazione di due parametri ambientali: temperatura e salinità lungo un gradiente Est-Ovest.

L'osservazione di un cline geografico limitato a soli 2 loci su 31 analizzati e l'evidenza della forte correlazione fra distribuzione spaziale delle frequenze alleliche e variazione spaziale dei parametri ambientali suggeriscono un plausibile ruolo dei meccanismi della selezione su questi loci.

In particolare i valori di salinità delle acque superficiali influiscono sui primi stadi di vita del merluzzo, ovvero sulle uova e sulle larve che galleggiano sull'acqua.

La salinità continua a svolgere il suo ruolo selettivo anche alla profondità di -320 m dove gli individui giovani lasciano l'ambiente pelagico per spostarsi sul fondo. In profondità il parametro ambientale che ricopre maggior importanza è la temperatura che influisce sul tasso di crescita e di deposizione delle uova.

L'analisi della struttura genetica di *Mytilus edulis* (Hilbish & Koehn, 1985) in popolazioni marine e di estuario ha messo nuovamente in luce una distribuzione differenziata delle frequenze alleliche ad un locus (*Lap*) associata con la concentrazione salina dell'acqua. Questo pattern delle frequenze alleliche è stato interpretato anche come risultato di un possibile contatto secondario tra due gruppi geneticamente distinti (mare aperto ed estuario), ma numerosi test statistici non hanno supportato questa ipotesi. L'azione diretta della selezione, dunque, sembra spiegare meglio questa particolare strutturazione genetica. Infatti i due ambienti, mare aperto ed estuario, essendo caratterizzati da concentrazioni saline diverse, potrebbero agire sulle capacità di osmoregolazione determinando una mortalità differenziale delle larve tra i due comparti ambientali.

Un approccio metodologico impiegato recentemente per stabilire il ruolo della selezione sulla variazione delle frequenze alleliche è quello di comparare i pattern di loci putativi sotto selezione con quelli ottenuti da marcatori dichiaratamente neutrali quali DNA mitocondriale e microsatelliti. Una ricerca svolta da Dufresne *et al.* (2002) ha permesso di evidenziare il ruolo della selezione sulla struttura genetica del cirripede *Semibalanus balanoides* mediante l'utilizzo contemporaneo di due marcatori: allozimi e microsatelliti. Il cirripede *S. balanoides* è tipico dell'ambiente intertidale, una zona di confine fra ambiente terrestre e marino, ciclicamente interessata dal flusso di marea.

Le comunità di questa zona sono di conseguenza soggette a drastiche variazioni giornaliere di disponibilità di acqua ed a forti variazioni di temperatura (Campbell, 1995). L'analisi degli allozimi (Holm & Bourget, 1994) in popolazioni della costa atlantica del

Canada ha evidenziato una variazione geografica nelle frequenze alleliche di due loci (*Mpi* e *Gpi*). In contrasto l'analisi di quattro loci microsatelliti non ha mostrato alcun pattern di distribuzione particolare e pertanto la strutturazione genetica evidenziata dagli allozimi risultava un effetto dell'azione della selezione. Dufresne *et al.* (2002) hanno ipotizzato che la temperatura svolga una pressione selettiva sulla capacità di sopravvivenza di questi organismi così come in altre specie sessili (Bertness & Gaines, 1993). In questo lavoro è emerso inoltre che altri due loci microsatelliti avevano una distribuzione delle frequenze alleliche concorde con il locus *Mpi*. Tale risultato è stato attribuito all'associazione tra questi loci microsatelliti ed i loci allozimici sotto selezione, evidenziando quindi come anche i microsatelliti non abbiano sempre un comportamento neutrale e necessitino di un'analisi comparata con altri marcatori.

Negli ultimi anni si stanno accumulando sempre più studi che mostrano come l'influenza degli eventi paleogeografici sia di estremo rilievo nel determinare gli attuali pattern filogeografici e come quindi non si possa prescindere da tali ricostruzioni nella comprensione dei processi evolutivi.

Un'approccio utile per identificare patterns paleogeografici può venire dal confronto di specie relativamente vicine e con una biologia simile. A tale proposito Bargelloni *et al.* (2003) hanno analizzato la struttura di popolazione di 5 specie appartenenti alla famiglia *Sparidae* (*Pagellus bogaraveo*; *Pagrus pagrus*; *Dentex dentex*; *Lithognathus mormyrus*; *Spondyliosoma cantharus*). Due delle cinque specie (*Pagellus bogaraveo*; *Pagrus pagrus*) hanno mostrato un'assenza di differenziamento genetico. Gli autori hanno ipotizzato per le specie *P. pagrus* e *P. bogaraveo* che, anche se la migrazione tra popolazioni contemporanee dell'Atlantico e del Mediterraneo è effettivamente bassa o non esistente come per le altre specie di *sparide*, l'assenza di differenziamento genetico sia la conseguenza di eventi storici. Per esempio, se le riduzioni drammatiche nelle dimensioni delle popolazioni mediterranee le avessero portate all'estinzione, la mancanza di differenziamento sarebbe il risultato di una recente ricolonizzazione del Mediterraneo dall'Atlantico. Rispetto a questo scenario, non ci sarebbe stato tempo per le popolazioni dei due bacini di differenziarsi ulteriormente, anche se la migrazione attraverso lo Stretto di Gibilterra è veramente limitata, come sospettato per le altre specie di *Sparidae*. Per *P. bogaraveo*, questa distribuzione, che è limitata nella porzione più occidentale del mediterraneo potrebbe

indicare che la presenza di questa specie nel Mediterraneo è stata (ri)stabilita solo recentemente, senza la possibilità di accumulare divergenze discernenti tra i due stock. L'ipotesi di estinzione–ricolonizzazione (o recente colonizzazione) è inoltre congruente con i dati geologici e paleogeografici. Benchè i periodi glaciali avessero ridotto gli scambi tra il Mediterraneo e l'Atlantico, durante i periodi interglaciali, il livello del mare era bruscamente alzato, provocando movimenti di grosse masse d'acqua, dando la possibilità di (ri)invasione il bacino del Mediterraneo. Questa spiegazione non esclude la possibilità di ricorrenti invasioni che si sarebbero verificate durante gli interglaciali senza l'estinzione delle linee mediterranee nelle altre specie. Per le altre specie analizzate (*Dentex dentex*; *Lithognathus mormyrus*; *Spondyliosoma cantharus*) si è riscontrata invece presenza di differenziamento genetico. Per concludere, sebbene i marcatori genetici e la strategia di campionamento fossero strettamente comparabili, i risultati ottenuti per le 5 specie esaminate sembrerebbero riflettere, anche se in una sola famiglia di pesci, l'evidente conflitto sulla divisione atlantico-mediterraneo, nella maggior parte delle specie marine.

L'estinzione in Mediterraneo seguita da ricolonizzazione a partire dalle popolazioni atlantiche potrebbe essere una spiegazione che giustifica l'assenza di suddivisione tra popolazioni in molte specie marine, non solo negli sparidi. Infatti, anche assumendo che i processi di cladogenesi abbiano determinato una discontinuità genetica attraverso il limite geografico rappresentato dallo Stretto di Gibilterra, l'estinzione di una delle due linee seguita da ricolonizzazione di membri dell'altra linea risulta in una omogenizzazione genetica che coinvolge l'intero range di distribuzione delle specie (Wares & Cunningham 2001).

Da questo quadro generale risulta che specie diverse presentano non solo gradi di differenziamento diverso tra i due bacini atlantico e mediterraneo, ma che queste differenze sono imputabili sia all'azione delle forze evolutive (selezione, flusso genico ecc) sia agli eventi paleoclimatici e che queste due componenti hanno pesi diversi caso per caso. I dati finora raccolti sul nasello indicano nella selezione il principale responsabile dell'attuale pattern di diversità genetica. Lo scopo di questo lavoro consiste quindi nel verificare il ruolo effettivamente svolto dai processi selettivi nel determinare il differenziamento genetico esistente tra le popolazioni atlantiche e quelle mediterranee e parallelamente nel ricostruire quali eventi paleogeografici possano aver eventualmente contribuito a determinare tale differenziamento e in che misura.

2. STUDI RECENTI SU *M. merluccius*

Data l'importanza economica delle diverse specie riconosciute nell'ambito del genere *Merluccius*, non sorprende l'elevato numero di studi presenti in letteratura. Di seguito vengono riassunti i lavori più recenti e rilevanti sulla struttura genetica di varie specie di *Merluccius*, allo scopo di mostrare il livello di conoscenza finora raggiunto.

Gli studi più generali riguardano le relazioni filogenetiche e biogeografiche all'interno del genere. In uno studio effettuato da Roldan *et al.* (1999) tali relazioni sono state investigate mediante l'analisi di 21 loci enzimatici in nove specie del genere *Merluccius*. I dati ottenuti hanno mostrato un alto livello di polimorfismo nelle quattro specie americane, mentre valori di polimorfismo più bassi sono stati osservati nelle specie europee ed africane. Questo dato è stato interpretato dagli autori come un'indicazione dell'azione di diverse modalità di speciazione nelle varie aree geografiche, con popolazioni che hanno mantenuto grandi dimensioni anche durante la fase di speciazione nell'area americana e popolazioni che invece hanno subito colli di bottiglia e frammentazioni nell'area euro-africana.

Per quanto riguarda la struttura genetica di popolazioni, l'applicazione di marcatori genetici ha permesso di evidenziare un grado di eterogeneità non rilevato dai più antiquati approcci biologici e morfologici in molte specie di merluzzi. Ad esempio, l'analisi genetica di dieci enzimi in *Merluccius hubbsi* della piattaforma continentale in Argentina ha dimostrato che nelle aree di Isla Escondida e Patagonia centrale sono presenti cinque diversi stock.. La maggiore variabilità osservata nella seconda zona, probabilmente è correlata alla confluenza di un diverso stock più meridionale, che non è stato analizzato (Roldan, *et al.*, 1991).

Più recentemente von der Heyden *et al.* nel 2007 hanno analizzato la struttura di popolazione e la storia evolutiva di due specie di nasello della Provincia del Capo, *Merluccius capensis* e *Merluccius paradoxus* attraverso l'uso della regione di controllo del mtDNA. Le analisi rivelano che *M. capensis* ha subito una espansione demografica di popolazione negli ultimi 4500-23,000 anni, mentre non si è verificata per la specie *M. paradoxus* a causa della competizione interspecifica fra le due specie.

Anche nel caso di *Merluccius merluccius* i primi studi condotti hanno riscontrato un'omogeneità della specie che si è poi dimostrato non corrispondere al vero. Tale risultato è dovuto in parte alla natura dei marcatori utilizzati e in parte al tipo di campionamento applicato, che in molti studi è risultato limitato solamente alle popolazioni di un unico bacino (Mar Mediterraneo o Oceano Atlantico).

Ad esempio, Lo Brutto *et al.* nel 1998 hanno effettuato un'analisi elettroforetica nel Mar Mediterraneo che ha dimostrato che quattro loci, rispetto ai venti esaminati, sono polimorfici, cioè: *Adh*, *Pgi-1*, *Pgil-2* e *Sod-1*. L'eterozigosi media attesa ed il polimorfismo sono risultati rispettivamente pari a 0.090 e 0.2, mentre l'eterozigosi attesa era uguale a 0.084. La conclusione di questo studio è stata che le variazioni allozimiche non mettono in evidenza un pattern geografico, oppure clini, ma suggeriscono un'omogeneità genetica della popolazione mediterranea di *M. merluccius*. Inoltre sono stati trovati bassi livelli di variazione genetica tra i vari saggi, e sono stati attribuiti alle capacità natatorie di questa specie (Levi *et al.*, 1994), malgrado la possibilità della presenza di barriere oceanografiche, dovute a complesse situazioni ambientali.

Nello stesso anno Roldan e collaboratori hanno effettuato un'analisi enzimatica in saggi di *Merluccius merluccius* provenienti dall'Oceano nord Atlantico e dal Mar Mediterraneo che ha rivelato 21 loci polimorfici su 34 saggiati. La differenza di frequenze alleliche riscontrata in due loci, cioè *Gapdh-1* e *Gr-2*, tra i naselli dell'Oceano Atlantico e quelli del Mediterraneo, confermano una suddivisione tra essi. Lo stock atlantico appare differenziato da quello Mediterraneo. L'alta diversità genetica, stimata mediante F_{ST} , è pari a 0.054 in tutti i loci saggiati, mentre è di 0.030 in Atlantico e 0.024 nel Mediterraneo; quindi F_{ST} dimostra una maggiore eterogeneità tra i due bacini rispetto a quella rilevata all'interno dei due campioni. È stato notato inoltre che i naselli provenienti da due località del Mediterraneo, cioè Larache e Penones, essendo molto vicine allo Stretto di Gibilterra, si dimostrano essere strettamente correlate all'Atlantico. Quest'ultimo sembra avere un gruppo di popolazioni eterogenee, differenziate dalle altre per il locus *Gr-2*. L'andamento delle frequenze alleliche tra le quattro collezioni del Mediterraneo non mostra alcun pattern geografico. Una chiave di distinzione tra lo stock dell'Atlantico e quello Mediterraneo, può essere data dalla limitazione della migrazione attraverso lo Stretto di Gibilterra, che separa la piattaforma iberica da quella africana (Hopkins, 1985). In questo

punto è esistita una barriera, che ha precluso la colonizzazione del bacino semichiuso, da parte delle specie atlantiche fino al Pleistocene (Pérès, 1985). Oltretutto, durante le glaciazioni del Quaternario, ci fu una totale chiusura dello Stretto (Bianco, 1990), che portò grande restrizione al flusso genico nella colonizzazione del Mediterraneo da parte del nasello europeo. Come in seguito verrà riportato, le popolazioni dell'Atlantico e del Mediterraneo sono risultate geneticamente differenziate e separate fra loro dal fronte di Almeria-Oran, situato ad Est dello Stretto di Gibilterra.

Lundy *et al.* nel 1999 hanno scelto l'analisi di microsatelliti in *Merluccius merluccius* che ha dimostrato, anche in questo caso, una suddivisione tra i campioni dell'Oceano Atlantico e quelli del Mediterraneo. Lo stock di quest'ultimo bacino viene già amministrato indipendentemente rispetto a quello atlantico. Lo Stretto di Gibilterra è visto come una barriera geografica per quanto riguarda la dispersione tra i due bacini. Altra differenza riscontrata è quella tra il campione del Golfo di Biscaglia e quello del Portogallo, che fa ipotizzare una suddivisione dell'areale atlantico in due stock, già amministrati in modo indipendente, anche se in realtà la differenza tra i due campioni non è risultata significativa.

Lundy e collaboratori nello stesso anno hanno analizzato il poliformismo, la variabilità genetica e la struttura di popolazione in sei popolazioni naturali di merluzzo europeo (*Merluccius merluccius* L.) geograficamente distanti utilizzando sei loci microsatelliti (Lundy C. J. *et al.*, 1999). Quattrocentottantatré individui sono stati campionati da Trondheimsfjord in Norvegia, dal Mar Celtico, dal sud del Golfo di Biscaglia, dal Portogallo, dal Mar Mediterraneo nel nord della costa della Tunisia e nel Mar Adriatico. I risultati ottenuti hanno mostrato una suddivisione tra le popolazioni del Mediterraneo e dell'Atlantico mentre non è stata individuata alcuna sub-strutturazione tra i campioni all'interno del Mar Mediterraneo, $\theta = 0.003$ e $RST = 0.007$ ($P > 0.05$). La struttura di popolazione dell'Atlantico è apparsa invece più complessa di quella precedentemente suggerita dall'ICES (International Council for the Exploration of the Seas) dato che tutte le analisi condotte suggerivano una differenziazione tra i campioni del Golfo di Biscaglia e quelli portoghesi, che fino a quel momento erano però gestiti come un singolo stock. In contrasto, gli indici di fissazione non hanno indicato differenza tra i campioni del sud del Golfo di Biscaglia e i campioni del Mar Celtico che invece erano gestiti come stock separati. Questi risultati hanno spinto gli Autori a suggerire una profonda revisione della

politica di gestione del merluzzo europeo (Lundy *et al.*, 1999). Successivamente gli stessi autori hanno approfondito gli studi sulla variabilità genetica e la stabilità temporale della struttura genetica della popolazione di merluzzo europeo del Golfo di Biscaglia (Lundy *et al.*, 2000), analizzando 5 loci microsatelliti, le sequenze della regione di controllo (900 bp) e di i geni del DNA mitocondriale (ATPase, subunità 6 e 8, 842 bp e una sequenza parziale del ND1, 800 bp).

Lo Brutto e suoi collaboratori nel 2004 hanno analizzato otto popolazioni di nasello, *Merluccius merluccius* L., proveniente dal bacino del Mediterraneo ed uno proveniente dall'Oceano Atlantico con lo scopo di stimare la variabilità e la struttura genetica della popolazione (Lo Brutto *et al.*, 2004). L'analisi è stata effettuata sia sui loci enzimatici sia sulla regione di controllo del DNA mitocondriale. Il valore medio di eterozigosi osservata era più alta di quella attesa, mentre la diversità aplo-tipica sul mtDNA era veramente bassa. I campioni provenienti dal bacino del Mediterraneo risultavano geneticamente omogenei al contrario di quelli dell'Atlantico. L'analisi genetica nucleare e mitocondriale ha mostrato risultati simili dimostrando che lo Stretto di Gibilterra può essere considerato come una barriera geografica al flusso genico.

Uno studio allozimico condotto da Cimmaruta *et al.* (2005) ha analizzato i rapporti tra la struttura genetica del nasello e l'andamento dei principali parametri ambientali (salinità e temperatura) nel suo areale di distribuzione. Le popolazioni dell'Atlantico e del Mediterraneo sono risultate geneticamente differenziate e separate fra loro dal fronte di Almeria-Oran, situato ad Est dello Stretto di Gibilterra. Quest'area costituisce una sorta di confine ecologico ed idrodinamico per molti organismi marini a causa della presenza di correnti che si ipotizza agiscano come barriere nei confronti del flusso genico. Due loci in particolare (*Gapdh* e *Gpi-2*) hanno mostrato una variazione clinale delle frequenze alleliche in senso longitudinale, con gli alleli di entrambi i loci che presentano un graduale cambiamento nelle frequenze alleliche, in maniera più marcata nella *Gapdh*, fino ad osservare una completa inversione tra i campioni atlantici e quelli del Mediterraneo orientale. Il cline delle frequenze alleliche è risultato significativamente correlato alla variazione di due parametri ambientali: temperatura e salinità lungo un gradiente Est-Ovest.

L'osservazione di un cline geografico limitato a soli 2 loci su 31 analizzati e l'evidenza della forte correlazione fra distribuzione spaziale delle frequenze alleliche e

variazione spaziale dei parametri ambientali suggeriscono un plausibile ruolo dei meccanismi della selezione su questi loci.

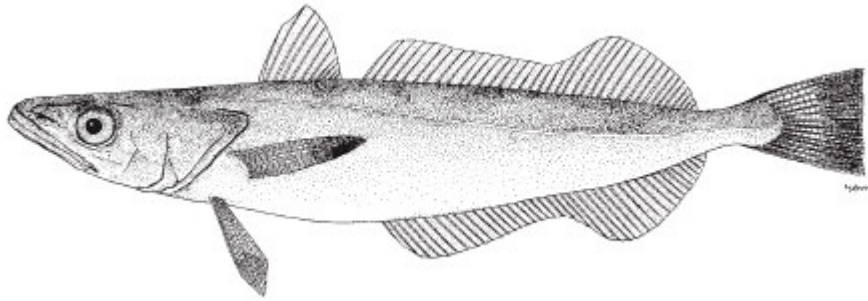
In particolare, questa ipotesi è sostenuta dal fatto che i valori di salinità delle acque superficiali influiscono sui primi stadi di vita del merluzzo, ovvero sulle uova e sulle larve che sono planctoniche.

La salinità probabilmente continua a svolgere il suo ruolo selettivo anche alla profondità di -320 m, quando gli individui giovani lasciano l'ambiente pelagico per spostarsi sul fondo. In profondità, il parametro ambientale che ricopre maggior importanza è però la temperatura che notoriamente influisce sul tasso di crescita e di deposizione delle uova.

3. BIOLOGIA E SISTEMATICA

3.1 Inquadramento tassonomico

Merluccius merluccius è una specie demersale conosciuta in Italia con il nome comune di nasello.



Divisione: Paracantotterigi

Classe: Osteitti

Superordine: Teleostei

Ordine: Gadiformi

Famiglia: Merlucciidae

Genere: *Merluccius*

Specie: merluccius

La revisione completa del genere *Merluccius* ha confermato *Merluccius merluccius* come specie facente parte, insieme con altre 11, del genere sopra menzionato (Inada, 1981).

Le più importanti ipotesi riguardanti l'origine e la dispersione di *Merluccius merluccius*, sono d'accordo nel confermare che la popolazione del Mediterraneo derivi da una recente colonizzazione (tardo Pleistocene) da parte di quella atlantica (Roldan, 1999).

Nella revisione della tassonomia del genere *Merluccius* condotta da Franca nel 1962, i naselli del Mediterraneo furono classificati come facenti parte della sottospecie *M. merluccius mediterraneus*. Tali conclusioni erano state ricavate attraverso studi basati su

caratteri morfologici, come i conteggi delle vertebre, che però possono essere influenzati dalle diverse condizioni ambientali dei due corpi d'acqua, Mediterraneo e Atlantico (Zupanovic & Jardas, 1986). Gli studi genetici degli allozimi, in un primo momento, non avevano dato una chiara visione della divisione e delimitazione dello stock atlantico da quello mediterraneo. Tuttavia l'applicazione più recente di questi stessi metodi ha messo in evidenza che ci sono differenze genetiche tra i naselli dell'Oceano Atlantico e quelli del Mediterraneo, e che il fronte di Almeria-Oran è da considerarsi una barriera geografica tra loro (Cimmaruta *et al.*, 2005). Questa strutturazione genetica, sostiene l'ipotesi che i naselli del Mediterraneo costituiscano una sottospecie distinta da quelli dell'Atlantico, in accordo con quanto evidenziato dai precedenti studi morfometrici e morfologici, (Maurin, 1965; Inada, 1981; Belloc, 1929; Soliman, 1973).

3.2 Morfologia

Merluccius merluccius è provvisto di due pinne dorsali ed una anale. La mandibola, più lunga della mascella, è sprovvista di barbiglio. Su ciascuna mascella sono presenti due serie di denti. Il fondo della bocca è nerastro.

Le squame sono caduche. Il dorso è di colore grigio bruno, spesso punteggiato di nero; la parte ventrale è bianco-argentea.

La lunghezza varia tra i 30 e gli 80 cm ed anche di più, fino al raggiungimento di 1.30 m; nel Mediterraneo i naselli non superano i 40 cm all'età di 10-12 anni.

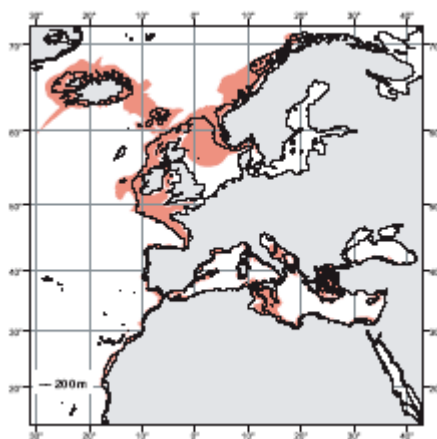
3.3 Distribuzione e migrazioni

L'areale geografico di *Merluccius merluccius* si estende dal nord-est dell'Oceano Atlantico, corrispondente a 62 °N, fino al limite sud nelle acque della Mauritania, vale a dire al 21 ° parallelo nord (Inada, 1981).

La distribuzione batimetrica di questa specie varia tra i 50 ed i 750 metri di profondità, sebbene la sua densità vada diminuendo sotto i 400 metri. La variazione della batimetria sembra essere correlata con le fluttuazioni delle correnti calde (FAO, 1986). Le reclute e gli stadi giovanili hanno una distribuzione limitata al di sopra dei 400 metri, e si

trovano soprattutto tra i 100 ed i 200 metri. La primavera e l'estate sono le due stagioni di reclutamento.

I giovani adulti sono distribuiti in tutto il range di profondità sopradDETTO, anche se i più grandi si trovano al margine della piattaforma continentale, vale a dire tra i 150 ed i 300 metri, specialmente in autunno ed inverno (Recasens *et al.*, 1998).



Nell'Oceano Atlantico si è riscontrato che gli adulti migrano nel Mare Celtico e nel Golfo di Biscaglia da gennaio a marzo, riunendosi nell'area irlandese di Great Sole e sulla piattaforma continentale Armoricana. Ci sono anche migrazioni giornaliere dei naselli, che tendono a rimanere sul fondo del mare durante le ore diurne e risalire la colonna d'acqua nella notte (Casey & Pereiro, 1995). Queste migrazioni giornaliere si hanno anche nel Mare Mediterraneo e sono più intense per gli stadi giovanili, esse sono probabilmente correlate alla nutrizione.

3.4 Riproduzione

In *M. merluccius* c'è dimorfismo sessuale e la differenza tra i sessi è pronunciata soprattutto dopo il terzo anno di vita (Bagenal, 1954).

I maschi di questa specie raggiungono la maturità sessuale intorno ai tre anni, che corrisponde ad una lunghezza di circa 28 centimetri. Le femmine invece, sono mature tra i tre ed i cinque anni, vale a dire intorno ai 38 centimetri. In ogni modo esiste anche una differenza tra l'Oceano Atlantico ed il Mar Mediterraneo, poiché nel primo la maturità è raggiunta ad età più elevate (Casey & Pereiro, 1995).

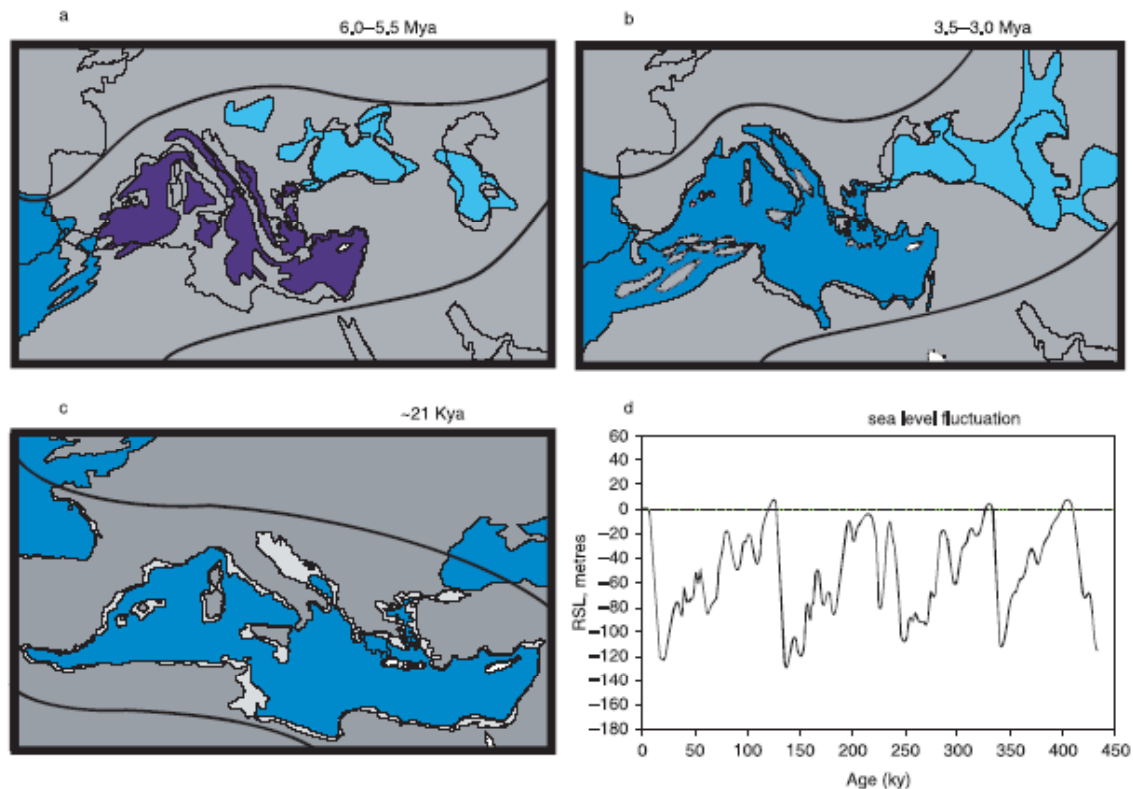
Il periodo di deposizione delle uova va da dicembre ad aprile (Alcazar *et al.*, 1983), con un picco tra febbraio e marzo (Pérez & Pereiro, 1985). Le uova del nasello sono pelagiche e si trovano distribuite a profondità inferiori ai 150 metri (Coombs & Mitchell, 1982). Le larve sono distribuite in tutta la colonna d'acqua fino a profondità superiori a 350 metri, anche se la maggior parte degli individui si trova tra i 50 ed i 100 metri.

3.5 Alimentazione

M. merluccius è un pesce carnivoro, che si trova al vertice della piramide alimentare. Si ciba di una grande varietà di organismi ed è attivo soprattutto di notte. Gli individui con dimensioni inferiori ai 15 centimetri mangiano soprattutto piccoli crostacei, pesci e molluschi (Olaso, 1990). La dieta dei naselli con lunghezza superiore ai 25 centimetri è composta da cefalopodi e pesci. Sono stati riscontrati anche fenomeni di cannibalismo nei confronti degli stadi giovanili.

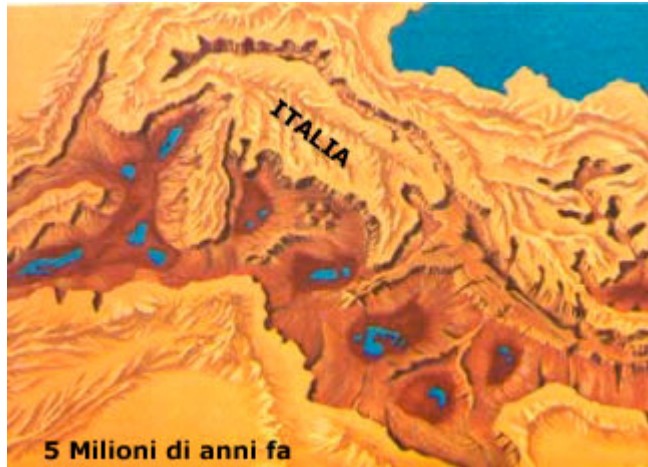
4. CENNI DI PALEOCEANOLOGIA: LA STORIA DEL MEDITERRANEO

Nel 1961, una campagna di rilevamento sismico del fondo del Mediterraneo rivelò l'esistenza di un livello sismico fortemente riflettente, con una continuità laterale e delineante una struttura geologica ad una profondità compresa tra 100 e 200 m al di sotto del fondo marino. Questo livello, denominato M reflector, segue fedelmente la morfologia del fondo marino attuale, suggerendo la presenza di un livello con caratteristiche di uniformità ed elevata velocità delle onde sismiche. Trivellazioni eseguite dieci anni più tardi rivelarono la natura dell'M reflector: si tratta di un livello di sedimenti evaporitici, con spessore fino a 3 km.



Campioni di sedimenti prelevati, che includono evaporiti, suolo, e piante fossili, mostrano che circa 5,9 milioni di anni fa, nel tardo Miocene, il precursore dell'odierno stretto di Gibilterra si chiuse ed il Mediterraneo evaporò e si trasformò in una conca prevalentemente asciutta e profonda, la cui base in alcuni punti raggiungeva 3,2 - 4,9 km al di sotto del livello degli oceani (Clauzon *et al.*, 1996)

Tuttora il Mediterraneo è un mare molto più salato del nord Atlantico poiché comunica con questo solo attraverso lo stretto di Gibilterra ed è soggetto ad un alto tasso di evaporazione, non globalmente compensato dall'apporto idrico delle acque dei fiumi che vi si riversano.



4.1 LE GLACIAZIONI PLEISTOCENICHE

Il maggior effetto delle glaciazioni è la variazione dei livelli marini: durante i massimi periodi glaciali, quasi il 30% delle terre emerse fu ricoperto dai ghiacci e come conseguenza i livelli marini si abbassarono di circa 100 m.

Tali abbassamenti di livello consentirono la congiunzione di molti territori (Alaska-Siberia).

Durante il Würm, comparvero elementi provenienti dall'Atlantico settentrionale (ospiti freddi: molluschi bivalvi come *Arctica islandica*, *Mya truncata* e gasteropodi come *Buccinum undatum*).

Glaciazione di Gunz (600-550 mila anni fa)

Glaciazione di Mindel (480-430 mila anni fa)

Glaciazione di Riss (240-180 mila anni fa)

Glaciazione di Würm (120-10 mila anni fa)

Durante i post-glaciali l'Egeo e le acque del Nilo ebbero una grande influenza sul bacino del Mediterraneo. Si formò probabilmente una stratificazione salina (acque dolci in superficie e salate sul fondo).

La stratificazione con acque più salate sul fondo impedisce il rimescolamento delle acque e quindi le acque sul fondo risultano anossiche. Inoltre gli apporti idrici massici nel post glaciale favorirono apporti di sostanza organica e quindi la fioritura algale. Tale condizione di anossia del bacino orientale, durata circa 1000 anni a partire da circa 9000 anni fa, è testimoniata dalla presenza di strati sapropelitici (strati con elevata percentuale di carbonio organico).

4.2 INTERGLACIALE RISS-WÜRM

Tra la glaciazione di Riss e di Würm compaiono i cosiddetti ospiti caldi (attualmente quasi completamente estinti): i molluschi gasteropodi *Strombus bubonius* e *Conus guinaicus* ed il bivalve *Mytilus senegalensis* (attualmente forme simili si ritrovano lungo le coste del Senegal).

Le variazioni nei popolamenti del Mediterraneo (faune “calde” – faune “fredde”) non sono solamente da mettere in relazione alle variazioni di temperatura ma anche alle modificazioni del regime delle correnti dello Stretto di Gibilterra legate alle oscillazioni climatiche.

Negli interglaciali la regione mediterranea presentava un clima caldoarido ed un bilancio idrico deficitario. Questa situazione determinò l'afflusso di grandi quantità di acque atlantiche più leggere (meno salate). La temperatura delle acque sia di superficie sia di profondità era abbastanza elevata precludendo la sopravvivenza di specie boreali (faune “fredde”). Attualmente nel Mediterraneo a 3000 m di profondità vi è una temperatura media di 12° C (nel resto dei bacini oceanici, alla stessa profondità, 3-4 °C). Questa situazione favorì l'ingresso di faune “calde”.

Nei periodi glaciali il clima nell'area mediterranea risultava freddo ed umido. L'aumento delle precipitazioni, la diminuzione dell'evaporazione e l'abbassamento dell'Atlantico (ghiacciai) favorì una eccedenza di acqua nel Mediterraneo rispetto all'Atlantico. Si invertì, di conseguenza, la corrente di Gibilterra: una corrente superficiale

più calda in uscita ed una corrente fredda, profonda, in entrata. Questa situazione favorì l'insediarsi di una fauna "fredda" che sostituì la precedente.

Attualmente, nel Mediterraneo, è presente una fauna litorale calda ed una profonda boreale di origine quaternaria.

4.3 VARIAZIONI DELLA RICCHEZZA SPECIFICA

Il 70% della superficie terrestre è ricoperta dagli oceani ma solamente il 10% delle specie è marina. La maggiore omogeneità ambientale, l'assenza di grosse barriere, la minor influenza degli eventi storici rispetto alle terre emerse hanno meno favorito l'isolamento e quindi la differenziazione delle faune.

I fattori principali che influenzano la distribuzione degli organismi marini non sono di ordine storico o geomorfologico ma soprattutto ecologico (luce, temperatura, salinità, ossigeno...)

Attualmente, negli oceani, vi sono temperature prossime ai 30° nelle aree equatoriali e agli 0° vicino ai poli. Poche specie sono in grado di tollerare l'intero range di variazione. Questo limita la distribuzione latitudinale.

Anche per le specie marine è evidenziabile un incremento numerico in prossimità dell'equatore. L'area indo-pacifica, inoltre, mostra la più alta diversità specifica rispetto agli altri oceani. Le cause della maggior diversità dell'area indo-pacifica sono le seguenti:

- mancanza di stagionalità nella quantità di radiazione solare;
- stabilità della colonna d'acqua;
- presenza di barriere coralline che incrementano l'eterogeneità spaziale aumentando i microhabitat;
- le zone di mare profondo tra le aree di acqua bassa (atolli) agiscono da filtro frazionando le popolazioni ed incrementando i fenomeni di speciazione.

La seconda regione con la maggior diversità è la costa pacifica tropicale dell'America, mentre la più bassa si rileva sulla costa atlantica. Al contrario le coste antartiche mostrano una maggior diversità rispetto a quelle artiche.

4.4 AFFINITÀ DELLE POPOLAZIONI MEDITERRANEE

Una delle particolarità del Mediterraneo è quella di ospitare sia specie provenienti dall'Africa sia specie dal Nord Europa che invece nell'Atlantico vivono separate. Nei settori più settentrionali del Mediterraneo (es. Mar Ligure e Mar Adriatico settentrionale) vivono specie ad affinità boreale (Passera di mare ed alcuni molluschi). Ad affinità africana troviamo invece la *Donzella pavonina*, presente nei settori più meridionali del bacino Mediterraneo.

Sono riscontrabili anche casi di vicarianza ecologica: specie presenti nel Mediterraneo che in Atlantico sono sostituite da specie ecologicamente affini. È il caso di *Mytilus edulis*, specie circumboreale, che nel Mediterraneo è sostituita da *Mytilus galloprovincialis*.

Il bacino orientale del Mediterraneo è una delle aree faunisticamente più povere. In esso sono riscontrabili solamente il 57% dei pesci ed il 48% dei molluschi presenti nel bacino occidentale. Dei 60 pesci endemici del Mediterraneo solo 3 appartengono al bacino orientale.

Le specie endemiche mediterranee (circa il 20%) possono avere tre possibili origini:

- sopravvivenza nel Mediterraneo dopo il frazionamento della Tetide (paleoendemismi tetidiani)
- sopravvivenza esclusiva in mediterraneo a causa di estinzioni nelle altre aree per variazioni climatiche (endemismi relitto)
- casi di speciazione a partire da elementi atlantici (neoendemismi)

All'interno del bacino mediterraneo è possibile distinguere diversi tassi di endemismi, il maggiore (82%) è riscontrabile nella parte Occidentale seguito poi dall'Adriatico (33%) e dal bacino Orientale (22%).

Tutte queste specie sono comprese tra 0 e 200 metri di profondità ma il popolamento profondo è più recente rispetto a quello litorale.

5. MATERIALI E METODI

5.1 CAMPIONAMENTO

Gli esemplari di nasello studiati per la presente tesi sono stati catturati e subito congelati per far sì che gli enzimi non venissero danneggiati nella loro attività. Subito dopo il rinvenimento dell'animale i tessuti necessari per le analisi venivano prelevati ed immersi in azoto liquido per il trasporto in laboratorio, dove venivano successivamente conservati in congelatori a -80°C .

Ad ognuno degli individui da analizzare sono stati prelevati sia tessuto epatico che muscolare scheletrico.

I campionamenti sono stati replicati in due anni consecutivi nelle località dove è stato possibile, in modo da poter testare la stabilità temporale della struttura delle popolazioni studiate. Il primo anno sono stati analizzati elettroforeticamente 651 naselli, provenienti da 10 differenti località. Il secondo anno le località di provenienza sono divenute 9 e si sono studiati 516 naselli, per un totale di 1167 esemplari.

La provenienza geografica dei campioni studiati ed il numero di individui saggiati elettroforeticamente per ciascuna località sono riportati in Tabella 1.

Nel presente lavoro, la variazione geografica in *M. merluccius* è stata studiata mediante l'utilizzo di due distinti tipi di marcatori genetici: i) loci allozimici autosomici, ad eredità biparentale del lavoro Cimmaruta *et al.*, 2005; ii) sequenze di un frammento di un gene mitocondriale, ad eredità uniparentale materna; iii) e quindi il confronto fra i due tipi di dati.

5.2 ANALISI DI LABORATORIO

5.2.1 Tecniche elettroforetiche

Sono stati analizzati in totale 31 loci enzimatici (Tab. 3) in *Merluccius merluccius* mediante analisi elettroforetica di sistemi gene-enzima. Lo studio della variazione allozimica ha avuto inizio diversi anni fa. Nel presente lavoro i dati elettroforetici relativi a *M. merluccius* sono stati ripresi ed analizzati nuovamente, anche al fine di una loro comparazione con quanto osservato a livello dei nuovi marcatori studiati. Per i dettagli sulle tecniche elettroforetiche, si rimanda dunque ai sopracitati lavori.

5.2.2 Estrazione del DNA

Per l'analisi del DNA mitocondriale, è stata effettuata l'estrazione del DNA totale con metodo C-TAB/fenol-cloroformio (Doyle & Doyle, 1987, modificato). Questo metodo prevede l'incubazione a 55° C del tessuto (circa 200 mg) per circa 12 ore in 600 µl di tampone C-TAB [(C-TAB (bromuro esadeciltrimetilammonio) 2%; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 0.1 M, pH 8; EDTA 0.02 M; 2-β-mercaptoetanol 0.2%)] e 15 µl di Proteinasi-K alla concentrazione di 20 mg/ml. Questo primo passaggio serve per digerire i tessuti ed eliminare le DNAasi. Quindi il campione viene incubato per 1 ora a 37° C con 5 µl RNAasi alla concentrazione di 20 mg/ml, per evitare che l'RNA interferisca con la reazione di PCR (vedi in seguito). Vengono aggiunti 600 µl di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) e la soluzione viene agitata per circa 5 minuti e poi centrifugata per 10 minuti a 13.000 giri/min per separare una fase più pesante contenente i prodotti di digestione, da una fase acquosa contenente il DNA (il supernatante). Quest'ultima viene recuperata e posta in un tubo pulito. Questo passaggio viene ripetuto altre due volte, di cui una di nuovo con fenolo: cloroformio: alcol isoamilico (25:24:1) e l'altra con cloroformio:alcol isoamilico (24:1), in modo da separare più accuratamente le due fasi. Per permettere la precipitazione del DNA viene usato etanolo al 99% (1 ml) e NaCl (20 µl). Il campione viene quindi posto in un congelatore a -20° C per circa 1 ora e poi centrifugato. L'etanolo al 99% viene tolto e sostituito con etanolo al 70% per eliminare i sali residui. Il

pellet di DNA, ottenuto dopo la centrifugazione, viene fatto asciugare a temperatura ambiente e risospeso in 100 µl di H₂O.

5.2.3 Amplificazione mediante PCR

Il DNA estratto è stato sottoposto alla reazione a catena della polimerasi (PCR, Saiki *et al.*, 1988), che serve ad amplificare numerose volte uno specifico frammento di DNA a partire da una soluzione contenente tutto il DNA genomico.

In questo studio è stato amplificato un frammento di 448 paia di basi (pb) del d-loop (mtDNA). Sono state usate le coppie di primers L15998 (5'-TAC CCC AAA CTC CCA AAG CTA-3'); H235 (5'-CGT GTG CAC TCT GAA ATG TCA-3') (Alvarado Bremer *et al.*, 1995).

Le reazioni sono state condotte con TAQ Promega (5 u/µl), nel tampone di reazione fornito dal produttore, alle seguenti concentrazioni di reagenti: MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0.2 mM ognuno; primers 0.5 µM ognuno. 2 µl della soluzione prodotta dall'estrazione sono stati aggiunti a 48 µl di soluzione di reazione sopra descritta, per fornire il DNA templatato. L'amplificazione è stata effettuata in un termocicizzatore automatico (mod. Perkin Elmer 2400).

Il programma di reazione, per la regione amplificata, è il seguente: una fase iniziale di 5 minuti a 94 °C (per garantire la completa denaturazione di tutto il DNA a doppio filamento iniziale presente) seguita da 35 cicli costituiti da 5 secondi a 94 °C (fase di denaturazione), 45 secondi a 47 °C (annealing), 1' a 72 °C (estensione) e infine, un ciclo di 5 minuti a 72 °C (per permettere il completamento dell'attività di sintesi dei frammenti incompleti eventualmente ancora presenti).

Il prodotto di reazione è stato controllato correndone 5 µl in un gel di agarosio al 2% in TBE (0.045 M Tris-borato; 0.001 M EDTA, pH 8) contenente 0.01% di bromuro di etidio. Quest'ultimo si intercala alle basi di DNA e risulta fluorescente quando è posto su una sorgente di luce ultravioletta di opportuna lunghezza d'onda. I frammenti di DNA appaiono, quindi, come bande luminose sullo sfondo scuro del gel; l'intensità luminosa, dipendendo dalla quantità di bromuro di etidio legata, è maggiore nei frammenti più lunghi. Le dimensioni del frammento possono essere stabilite in maniera approssimativa

facendo migrare nello stesso gel un marcatore di peso, ovvero una miscela di frammenti di DNA di lunghezza nota.

5.2.4 Sequenziamento

I prodotti di PCR sono stati purificati (PCR Purification kit, Qiagen) e quindi sequenziati mediante sequenziatore automatico (modello A.B.I. 3730XL, Perkin Elmer). La soluzione per la reazione di sequenza avviene in un volume finale di 10 μ l e contiene 2 μ l di ABI-mix per sequenziamento (Perkin Elmer), 1,2 μ l di primer (10 μ M) e circa 50 ng di prodotto di PCR purificato; sono utilizzati gli stessi primer della reazione di PCR. Per ogni individuo sono stati sequenziati entrambi i filamenti di DNA, poi questi sono stati allineati tra loro in modo da ottenere una lettura finale quanto più accurata possibile.

5.3 ANALISI DEI DATI ELETTROFORETICI

I dati ottenuti mediante l'elettroforesi nel lavoro di Cimmaruta *et al.*, 2005 sono stati utilizzati per studiare la distribuzione geografica della variazione genetica a livello nucleare e stimare i livelli di variabilità delle popolazioni. Le elaborazioni statistiche sono state condotte utilizzando i software BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1997), ARLEQUIN ver. 2.000 (Schneider et al., 2000) e PHYLIP.

5.3.1 Equilibrio di Hardy-Weinberg e linkage-disequilibria

Per ciascun locus polimorfico in ciascun campione, l'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato verificato sia con il test del χ^2 che con il test esatto di Fisher (Finney, 1949), cui è stata applicata la correzione di Levene (1949) per i piccoli campioni. Il test esatto di Fisher è stato anche utilizzato per ottenere una stima della probabilità dell'associazione di ogni coppia di loci attraverso tutti i campioni (linkage-disequilibria). Infine, è stata applicata la correzione sequenziale di Bonferroni (Rice, 1989), al fine di ridurre l'incremento della probabilità di rigettare un'ipotesi nulla nel caso in cui essa fosse in realtà vera (errore α o di I tipo), associato all'applicazione di tests multipli.

5.3.2 Differenziamento allozimico e struttura delle popolazioni

Il grado di divergenza genetica tra le popolazioni è stato stimato mediante l'indice di distanza di Nei (1972). Tale indice è stato poi utilizzato per effettuare un'analisi gerarchica dei clusters usando l'algoritmo UPGMA (Sneath & Sokal, 1973).

Saranno costruiti alberi filogenetici sia separatamente che in combinazione utilizzando metodi differenti: UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages), NJ (neighbor-joining) e ML (maximum likelihood). Per le analisi UPGMA, NJ e ML sarà utilizzato il pacchetto per computer PHYLIP 3.5 (Felsenstein 1993). Il programma SEQBOOT contenuto in PHYLIP, che consente di saggiare l'attendibilità statistica dei raggruppamenti mediante analisi "bootstrap" su ciascun nodo dell'albero.

Sulla base della matrice delle distanze genetiche sarà effettuato l'ordinamento spaziale delle popolazioni mediante nonmetric multidimensional scaling (MDS). Questa tecnica multivariata consente di ordinare i gruppi (i siti o le località) in uno spazio bi- o tri-dimensionale al fine di verificare la presenza di rapporti tra i gruppi non individuabili con l'analisi dei cluster.

Arlequin è un software utilizzato nelle analisi di genetica delle popolazioni. L'utilizzo di questo programma permette di eseguire un ampio numero di test statistici in modo da ottenere informazioni in merito alle caratteristiche genetiche e demografiche di una popolazione. Utilizzando questo software è stata eseguita l'analisi molecolare della varianza (AMOVA). L'AMOVA è uno strumento utile per verificare come sia distribuita la variabilità genetica tra popolazioni, produce stime delle componenti della varianza ed analoghi dell' F -statistico, designati come θ -statistico, che riflettono la correlazione dei diversi allozimi per i differenti livelli di suddivisione della popolazione (individui, popolazioni e gruppi di popolazioni). La significatività dei componenti della varianza (e quindi la distanza genetica) e del θ -statistico viene testata usando 1000 o 10000 permutazioni dei dati di partenza (Excoffier et al., 1992). La struttura della popolazione è quantificata da un termine statistico noto come F_{st} . Esso significa “indice di fissazione” e misura la riduzione di eterozigosità di una sottopopolazione dovuta alla deriva genetica, per cui mostra una tendenza alla fissazione dell'allele. Si ottiene confrontando le sottopopolazioni alla popolazione totale. Viene usato per quantificare la proporzione della variazione genetica che è presente tra le sottopopolazioni e all'interno della popolazione totale. E' un termine usato come misura della differenza genetica tra le popolazioni (indice di differenziazione genetica). Per valori di F_{st} compresi tra 0 e 0.01 si individua una assente o piccola divergenza tra le popolazioni, per valori superiori a 0.1 vi è una grande divergenza.

5.3.3 Variabilità genetica delle popolazioni

Il livello di variabilità genetica di ciascuna delle popolazioni campionate è stato stimato utilizzando i seguenti parametri:

1. Numero medio di alleli per locus (A) calcolato con la seguente formula:

$$N_{\text{all}}/N_{\text{loci}}$$

nella quale N_{all} è il numero totale di alleli trovati e N_{loc} è il numero di loci.

2. Proporzione di loci polimorfici (P) calcolato con la seguente formula:

$$X/N_{\text{loci}}$$

in cui X è il numero di loci considerati polimorfici, e N_{loci} è il numero totale di loci.

Un locus viene ritenuto polimorfico se presenta due o più alleli o se la frequenza dell'allele più comune non supera il 99% o il 95%, a seconda del criterio usato. In questa tesi, un locus è stato considerato polimorfico se la frequenza dell'allele più comune non supera il 99%.

3. Eterozigosi media osservata (H_o) e attesa (H_e) per campione: H_o è la proporzione di individui campionati che sono eterozigoti (conta diretta) a ciascun locus, mediata su tutti i loci; H_e è l'eterozigosi media attesa per locus in condizioni di equilibrio di Hardy-Weinberg, stimata con la formula di Nei (1978) per campioni di piccole dimensioni:

$$H_e = \sum_{k=1}^r h_k / r$$

dove r sono i loci studiati, e h_k è il valore di h per il k -esimo locus. h è la stima dell'eterozigosi attesa per ogni singolo locus, calcolata nel seguente modo:

$$h = 2n(1 - \sum x_i^2) / (2n - 1)$$

con x_i corrispondente alla frequenza dello i -esimo allele del locus, e n uguale al numero di individui campionati per locus.

5.4 ANALISI DEI DATI DI SEQUENZA

Le sequenze ottenute sono state analizzate e corrette con il programma CHROMAS 2.13 (Technesium Pty) e allineate con il programma CLUSTAL-X 1.83 (Thompson *et al.*, 1997). I software usati per le analisi statistiche sono DnaSP 4.10.4 (Rozas *et al.*, 2003), MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004), TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), ARLEQUIN 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

5.4.1 Analisi dei polimorfismi e stima del network di Parsimonia

Il numero di siti polimorfici, la loro posizione, la natura ed il numero delle mutazioni, il numero complessivo di aplotipi e la loro divergenza percentuale sono stati accertati con il programma MEGA.

Le relazioni di affinità tra gli aplotipi individuati sono state indagate attraverso la costruzione di un network di parsimonia statistica, con metodo di Templeton *et al.* (1992) implementato in TCS. Il software TCS determina la probabilità di una connessione parsimoniosa tra ciascuna coppia di aplotipi e trattiene gli aplotipi nel network solo se essi possono essere connessi con un livello di confidenza superiore al 95%. Questo metodo è stato preferito ai metodi filogenetici classici di costruzione degli alberi, poiché più adatto per indagare le relazioni tra aplotipi strettamente correlati, come sono spesso quelli individuati in indagini intraspecifiche (Posada & Crandall, 2001 e riferimenti all'interno). Esso ad esempio consente ad un aplotipo individuato come ancestrale di occupare una posizione centrale rispetto a quelli da esso derivati, contrariamente a quanto avviene per i metodi di costruzione di alberi, che collocano tutti gli elementi indagati come rami terminali (Posada & Crandall, 2001).

5.4.2 Diversità genetica delle popolazioni

Per ogni campione sono stati stimati due indici di diversità, la diversità nucleotidica (π) e quella aplotipica (h), con il software DnaSP. La diversità nucleotidica è stata calcolata

come il numero medio di differenze nucleotidiche per sito tra due sequenze (Nei, 1987) ed è data da:

$$\pi = \sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_j p_i d_{ij}$$

dove d è una stima del numero di mutazioni avvenute dalla divergenza degli aplotipi j e i , k è il numero di aplotipi e p_i è la frequenza dell'aplotipo i -esimo. Per la stima della diversità aplotipica è stata usata la seguente formula (Nei, 1987):

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

in cui n è il numero di copie geniche nel campione, k e p_i hanno lo stesso significato della precedente equazione.

5.4.3 Fluttuazioni demografiche delle popolazioni

Tra i diversi strumenti sviluppati negli ultimi anni per verificare un possibile contributo di passati eventi d'espansione demografica nel determinare la struttura genetica osservata a livello mitocondriale nelle popolazioni, nel presente studio ne sono stati applicati due:

1. La statistica F_s di Fu (Fu, 1997). Essa valuta la frequenza di mutazioni recenti (e perciò anche di alleli rari) rispetto a quella attesa in condizioni di equilibrio. La selezione in atto o un'espansione demografica della popolazione ci si aspetta che generino un eccesso di tali mutazioni, rilevabile da valori negativi e significativi di F_s . Allo scopo di valutare la significatività del valore ottenuto, è stata generata con il programma DnaSP una distribuzione empirica del parametro tramite simulazioni basate sul processo di coalescenza, inserendo il valore di θ ($=2N\mu$) stimato dai dati (Tajima, 1993b), dove N rappresenta la dimensione effettiva della popolazione e μ il tasso di mutazione per generazione.

2. L'analisi della distribuzione delle differenze tra coppie di sequenze ("mismatch distribution"; Rogers & Harpending, 1992; Rogers, 1995). Questa distribuzione diviene regolare e solitamente unimodale nelle popolazioni che si siano accresciute per lungo

tempo, che abbiano avuto un'esplosione demografica o che hanno subito colli di bottiglia, mentre in popolazioni che abbiano sperimentato una prolungata stasi demografica essa è solitamente multimodale ed irregolare. Essa consente inoltre di ottenere un'indicazione del tempo trascorso dall'inizio dell'evento di espansione, mediante la stima del parametro τ ($= 2\mu t$ dove μ è il tasso di mutazione per sequenza per generazione e t è il tempo in generazioni). La statistica r (raggedness; Harpending 1994) è stata utilizzata come misura dell'irregolarità della distribuzione.

Pertanto, qui essa è stata utilizzata per verificare l'accordo tra i dati ed un modello di rapida espansione demografica. La distribuzione attesa ed i parametri di espansione sono stati stimati utilizzando la procedura dei minimi quadrati, generalizzata e non lineare, implementata dal software ARLEQUIN. La statistica r (raggedness; Harpending *et al.*, 1993; Harpending, 1994 equazione 1) è stata utilizzata come misura dell'irregolarità della distribuzione. Sebbene recenti evidenze indichino che questa statistica non sia particolarmente potente nell'evidenziare un fenomeno di crescita demografica (è risultato tendenzialmente conservativo; Ramos-Onsins & Rozas, 2002), esso è stato comunque applicato per fini comparativi, essendo ancora uno dei test più utilizzati.

Arlequin è un software utilizzato nelle analisi di genetica delle popolazioni. L'utilizzo di questo programma permette di eseguire un ampio numero di test statistici in modo da ottenere informazioni in merito alle caratteristiche genetiche e demografiche di una popolazione. Utilizzando questo software è stata eseguita l'analisi molecolare della varianza (AMOVA). L'AMOVA è uno strumento utile per verificare come sia distribuita la variabilità genetica tra popolazioni, utilizzando le distanze molecolari dei diversi aplotipi. L'AMOVA produce stime delle componenti della varianza ed analoghi dell' F -statistico, designati come θ -statistico, che riflettono la correlazione dei diversi aplotipi per i differenti livelli di suddivisione della popolazione (individui, popolazioni e gruppi di popolazioni). La significatività dei componenti della varianza (e quindi la distanza genetica) e del θ -statistico viene testata usando 1000 o 10000 permutazioni dei dati di partenza (Excoffier *et al.*, 1992). La struttura della popolazione è quantificata da un termine statistico noto come F_{st} . Esso significa "indice di fissazione" ed è un termine usato come misura della differenza genetica tra le popolazioni (indice di differenziazione genetica). Per valori di F_{st} compresi tra 0 e 0.01 si individua una assente o piccola divergenza tra le popolazioni, per valori superiori a 0.1 vi è una grande divergenza.

6. RISULTATI

6.1 *Loci allozimici*

6.1.1 Analisi dei polimorfismi

Dei 31 loci analizzati nello studio di Cimmaruta *et al.* (2005), 10 sono risultati monomorfici: *a-GPDH*, *LDH-3*, *MDH-1*, *MDH-2*, *MDH-3*, *CK*, *ADK*, *EST-1*, *EST-2* e *CA*. Gli altri 21 loci hanno mostrato diversi gradi di polimorfismo, con numero massimo di alleli per ciascun singolo locus pari a 5 (*IDH-1*, *GPI-1* e *PGM-2*). La tabella delle frequenze alleliche è mostrata in tab. 2. Il polimorfismo ai loci *IDDH*, *LDH-1*, *LDH-2*, *IDH-2* e *PEPB-1* è risultato esclusivamente legato alla presenza di alleli privati presenti peraltro a frequenze molto basse. Di seguito viene presentata una breve descrizione della variazione ai restanti loci polimorfici.

MDHP-1

Presenta 3 alleli: il 100 e il 104 si trovano in tutto l'areale campionato, mentre il 96 risulta essere fissato solo in alcune popolazioni (Ionio, Ligure, Baleari, Alicante, Malaga e Galizia).

MDHP-2

L'allele 100 è fissato in tutta la regione, il 95 è prettamente Mediterraneo ma si ritrova anche in Irlanda e nel Golfo di Biscaglia, mentre il 104 è presente a basse frequenze in alcuni siti (Tirreno, Ligure, Marocco e Golfo di Biscaglia).

IDH-1

Gli alleli 92 e 100 sono fissati in tutto l'areale, mentre il 105 e il 108 sono alleli privati rispettivamente dell'Adriatico e delle Baleari. Il 95 si trova solo in due popolazioni: Cipro e Golfo di Biscaglia.

6-PGDH

Gli alleli 90 e 95 sono privati di alcune popolazioni del Mediterraneo, il 105 è presente nel Tirreno, ad Alicante e nel Golfo di Biscaglia. Infine il 100 è presente in tutto l'areale.

GAPDH

Questo locus mostra un andamento particolare, è costituito da due soli loci (100 e 120) che presentano una inversione di frequenza passando dal Mediterraneo all'Atlantico.

SOD

Questo locus presenta 3 alleli: 80, 100 e 120. I primi due si estendono in tutto l'areale, mentre il 120 è privato del Marocco.

PEPB-2

Gli alleli 95 e 100 sono presenti in tutti i siti, il 92 solo in Tirreno e Creta, infine il 104 è un allele privato di Alicante.

PEPB-3

Anche qui il 100 è fissato in tutta l'area, il 105 è presente dappertutto tranne in Sardegna, mentre il 95 è privato di Alicante.

GDA

Gli alleli 100 e 105 sono fissati in tutta la regione studiata.

ADA

L'allele 100 è distribuito in tutto il territorio, il 92 si trova in tutti i siti tranne che in Galizia e Irlanda. L'allele 105 è presente nello Ionio, Marocco Galizia e Golfo di Biscaglia.

MPI

A questo locus sono presenti 5 alleli di cui il 100 presente in tutta la regione; gli alleli 96 e 104 si ritrovano nelle popolazioni mediterranee; l'85 e il 106 sono privati rispettivamente di Creta e del Marocco.

GPI-1

Oltre all'allele caratteristico (100), sono riscontrabili altri quattro: il 92 e il 108 diffusi su tutto l'areale, l'85 che si trova in quasi tutto il Mediterraneo e il 104 esclusivo dello Ionio.

GPI-2

Tre alleli (96, 100 e 104) sono distribuiti in tutto l'areale, mentre il 108 è privato del Mar Ligure.

GPI-3

Il 90 e il 100 sono fissati in tutte le popolazioni analizzate, l'80 si trova solo a Creta, mentre il 110 a Cipro, nel Tirreno e in Galizia.

PGM-1

I tre alleli (93, 100 e 108) sono praticamente presenti in tutto l'areale.

PGM-2

L'allele 100 è presente in tutta la regione analizzata, il 90 è diffuso nel Mediterraneo, l'87 si trova solo a Creta, Marocco e Golfo di Biscaglia, il 108 è visibile in Adriatico, Ligure, Alicante e Irlanda, mentre il 95 è un allele privato dell'Irlanda.

LOCUS	CIPRO	CRETA	IONIO	ADRIATICO	TIRRENO	LIGURE	SARDEGNA	BALEARI	ALICANTE	MALAGA	MAROCOCO	GALIZIA	G.DI BIS	IRLANDA
α Gpdh (N) 100	93 1.000	106 1.000	96 1.000	30 1.000	43 1.000	2 1.000	2 1.000	40 1.000	40 1.000	41 1.000	96 1.000	40 1.000	21 1.000	53 1.000
Iddh (N) 90 100 110	37 ----- 0.973 0.027	58 0.017 0.983 -----	80 0.006 0.988 0.006	131 0.004 0.989 0.008	134 0.004 0.989 0.007	108 0.005 0.986 0.009	49 0.010 0.990 -----	23 ----- 1.000 -----	21 ----- 1.000 -----	32 ----- 1.000 -----	65 0.008 0.992 -----	20 ----- 1.000 -----	53 0.009 0.981 0.009	28 ----- 1.000 -----
Ldh-1 (N) 90 100 110	83 ----- 0.994 0.006	106 ----- 1.000 -----	99 ----- 0.995 0.005	132 ----- 0.992 0.008	125 ----- 1.000 -----	151 0.003 0.997 -----	49 ----- 1.000 -----	44 ----- 1.000 -----	40 ----- 1.000 -----	41 ----- 1.000 -----	87 ----- 1.000 -----	40 ----- 1.000 -----	58 ----- 1.000 -----	44 ----- 1.000 -----
Ldh-2 (N) 90 100 110	83 ----- 0.994 0.006	106 ----- 1.000 -----	99 ----- 1.000 -----	130 ----- 0.996 0.004	136 0.004 0.996 -----	151 ----- 1.000 -----	49 ----- 1.000 -----	44 ----- 1.000 -----	40 ----- 1.000 -----	41 ----- 1.000 -----	87 ----- 1.000 -----	40 ----- 1.000 -----	39 ----- 1.000 -----	44 ----- 1.000 -----
Ldh-3 (N) 100	76 1.000	86 1.000	95 1.000	132 1.000	125 1.000	151 1.000	49 1.000	44 1.000	40 1.000	41 1.000	81 1.000	40 1.000	58 1.000	44 1.000
Mdh-1 (N) 100	5 1.000	36 1.000	5 1.000	8 1.000	29 1.000	116 1.000	2 1.000	44 1.000	40 1.000	41 1.000	96 1.000	40 1.000	40 1.000	53 1.000
Mdh-2 (N) 100	12 1.000	56 1.000	5 1.000	13 1.000	29 1.000	116 1.000	2 1.000	44 1.000	40 1.000	41 1.000	54 1.000	40 1.000	3 1.000	53 1.000
Mdh-3 (N) 100	5 1.000	36 1.000	6 1.000	20 1.000	34 1.000	116 1.000	2 1.000	44 1.000	40 1.000	41 1.000	96 1.000	40 1.000	2 1.000	53 1.000
Mdhp-1 (N) 96 100 104	57 ----- 0.930 0.070	91 ----- 0.967 0.033	51 0.010 0.951 0.039	118 ----- 0.941 0.059	118 ----- 0.911 0.089	154 0.003 0.929 0.068	49 ----- 0.990 0.010	42 0.012 0.929 0.060	40 0.013 0.925 0.062	41 0.012 0.963 0.024	94 ----- 0.883 0.117	15 0.100 0.700 0.200	57 ----- 0.860 0.140	44 ----- 0.886 0.114
Mdhp-2 (N) 95 100 104	57 0.018 0.982 -----	79 0.006 0.994 -----	53 0.009 0.991 -----	113 0.031 0.969 -----	118 0.017 0.979 0.004	160 0.009 0.972 0.019	2 ----- 1.000 -----	44 ----- 1.000 -----	40 ----- 1.000 -----	41 ----- 1.000 -----	96 0.010 0.984 0.005	12 ----- 1.000 -----	58 0.026 0.957 0.017	44 0.011 0.989 -----
Idh-1 (N) 92 95 100 105 108	59 0.017 0.034 0.949 ----- -----	81 0.086 ----- 0.914 ----- -----	74 0.047 ----- 0.953 ----- -----	113 0.040 ----- 0.956 0.004 -----	102 0.059 ----- 0.941 ----- -----	138 0.069 ----- 0.931 ----- -----	49 0.010 ----- 0.990 ----- -----	13 0.038 ----- 0.923 0.038 -----	21 0.024 ----- 0.976 ----- -----	36 0.056 ----- 0.944 ----- -----	40 0.013 ----- 0.988 ----- -----	20 ----- 1.000 ----- ----- -----	51 0.059 0.010 0.931 ----- -----	36 0.083 ----- 0.917 ----- -----
Idh-2 (N) 98 100	75 ----- 1.000	6 ----- 1.000	40 ----- 1.000	105 0.005 0.995	67 0.022 0.978	75 0.007 0.993	49 ----- 1.000	44 0.011 0.989	40 ----- 1.000	41 ----- 1.000	84 0.006 0.994	19 0.026 0.974	20 ----- 1.000	44 ----- 1.000
6-Pgdh (N) 90 95 100 105	92 0.005 ----- 0.995 -----	106 ----- ----- 1.000 -----	78 ----- 0.006 0.994 -----	108 ----- 0.005 0.995 0.005	102 ----- ----- 0.995 0.005	156 0.003 0.010 0.987 -----	49 ----- ----- 1.000 -----	44 ----- ----- 1.000 -----	40 ----- ----- 0.988 0.013	41 ----- ----- 1.000 -----	96 ----- ----- 1.000 -----	40 ----- ----- 1.000 -----	58 ----- ----- 0.991 0.009	44 ----- ----- 1.000 -----
Gapd (N) 100 120	93 0.253 0.747	105 0.305 0.695	83 0.235 0.765	127 0.287 0.713	132 0.402 0.598	161 0.391 0.609	49 0.429 0.571	44 0.545 0.455	40 0.525 0.475	41 0.744 0.256	95 0.805 0.195	39 0.731 0.269	56 0.821 0.179	44 0.898 0.102
Sod (N) 80 100 120	40 0.375 0.625 -----	78 0.308 0.692 -----	87 0.305 0.695 -----	130 0.288 0.712 -----	135 0.359 0.641 -----	133 0.387 0.613 -----	40 0.375 0.625 -----	44 0.239 0.761 -----	40 0.150 0.850 -----	41 0.220 0.780 -----	84 0.250 0.744 0.006	32 0.266 0.734 -----	44 0.261 0.739 -----	42 0.167 0.833 -----
CK (N) 100	40 1.000	59 1.000	36 1.000	40 1.000	44 1.000	73 1.000	2 1.000	44 1.000	40 1.000	41 1.000	63 1.000	40 1.000	18 1.000	53 1.000
Adk (N) 100	30 1.000	59 1.000	36 1.000	35 1.000	32 1.000	52 1.000	2 1.000	44 1.000	40 1.000	41 1.000	53 1.000	40 1.000	39 1.000	53 1.000
Est-1 (N) 100	1 1.000	59 1.000	36 1.000	27 1.000	26 1.000	108 1.000	2 1.000	44 1.000	40 1.000	41 1.000	96 1.000	40 1.000	60 1.000	53 1.000
Est-2 (N) 100	1 1.000	59 1.000	36 1.000	27 1.000	26 1.000	108 1.000	2 1.000	44 1.000	40 1.000	41 1.000	96 1.000	40 1.000	60 1.000	53 1.000
PepB-1 (N) 95 100	6 ----- 1.000	35 ----- 1.000	3 ----- 1.000	53 ----- 1.000	13 0.038 0.962	108 ----- 1.000	2 ----- 1.000	44 ----- 1.000	40 ----- 1.000	20 ----- 1.000	75 ----- 1.000	20 ----- 1.000	40 ----- 1.000	22 ----- 1.000

PepB-2														
(N)	40	100	58	120	118	126	49	44	21	35	74	12	58	36
92	-----	0.015	-----	-----	0.008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
95	0.050	0.025	0.060	0.038	0.030	0.040	0.010	0.034	0.048	0.071	0.061	0.042	0.060	0.125
100	0.950	0.960	0.940	0.962	0.962	0.960	0.990	0.966	0.929	0.929	0.939	0.958	0.940	0.875
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.024	-----	-----	-----	-----	-----
PepB-3														
(N)	41	96	63	120	125	134	2	43	21	18	66	12	58	38
95	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
100	0.988	0.964	0.968	0.962	0.916	0.959	1.000	0.907	0.952	0.833	0.879	1.000	0.828	0.934
105	0.012	0.036	0.032	0.038	0.084	0.041	-----	0.093	0.048	0.167	0.121	-----	0.172	0.066
GDA														
(N)	39	78	77	89	85	156	49	41	40	38	79	12	40	38
85	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.049	0.025	0.039	0.101	0.083	0.025	0.053
100	0.872	0.981	0.968	0.904	0.959	0.978	0.990	0.866	0.887	0.842	0.753	0.750	0.837	0.842
105	0.128	0.019	0.032	0.096	0.041	0.022	0.010	0.085	0.087	0.118	0.146	0.167	0.138	0.105
ADA														
(N)	58	106	39	122	125	81	49	23	21	41	75	40	48	31
92	0.026	0.028	0.013	0.016	0.048	0.037	0.010	0.022	0.048	-----	0.007	-----	0.010	-----
100	0.974	0.972	0.897	0.984	0.952	0.963	0.990	0.978	0.952	1.000	0.987	0.988	0.969	1.000
105	-----	-----	0.090	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.007	0.013	0.021	-----
Ca														
(N)	5	2	30	39	52	68	2	44	40	41	41	40	55	53
100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
MPI														
(N)	16	53	27	109	100	110	2	44	38	20	39	40	40	53
85	-----	0.009	-----	-----	0.005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	0.031	0.009	-----	-----	0.045	0.018	-----	0.023	0.013	0.025	-----	-----	-----	-----
100	0.812	0.632	1.000	0.931	0.950	0.941	1.000	0.977	0.987	0.975	0.987	1.000	1.000	1.000
104	0.156	0.349	-----	0.069	-----	0.041	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
106	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.013	-----	-----	-----
Gpi-1														
(N)	93	105	66	129	132	160	49	41	40	41	69	39	56	43
85	-----	-----	-----	0.008	0.004	0.003	0.010	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
92	0.430	0.395	0.258	0.372	0.326	0.328	0.316	0.415	0.250	0.244	0.210	0.295	0.214	0.233
100	0.548	0.605	0.712	0.620	0.667	0.659	0.663	0.585	0.738	0.732	0.725	0.705	0.768	0.767
104	-----	-----	0.008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
108	0.022	-----	0.023	-----	0.004	0.009	0.010	-----	0.013	0.024	0.065	-----	0.018	-----
Gpi-2														
(N)	46	92	68	108	118	149	49	43	37	15	51	19	50	34
96	0.196	0.217	0.132	0.144	0.140	0.141	0.204	0.140	0.108	0.033	-----	0.211	0.110	0.088
100	0.435	0.451	0.515	0.514	0.475	0.490	0.520	0.558	0.514	0.833	0.990	0.711	0.560	0.706
104	0.370	0.332	0.353	0.343	0.386	0.362	0.276	0.302	0.378	0.133	0.010	0.079	0.330	0.206
108	-----	-----	-----	-----	-----	0.007	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gpi-3														
(N)	92	106	103	129	133	160	49	44	40	40	95	39	57	44
80	-----	0.005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
90	0.505	0.524	0.432	0.484	0.511	0.509	0.510	0.489	0.538	0.500	0.521	0.564	0.535	0.591
100	0.489	0.472	0.568	0.516	0.485	0.491	0.490	0.511	0.463	0.500	0.479	0.423	0.465	0.409
110	0.005	-----	-----	-----	0.004	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.013	-----	-----
Pgm-1														
(N)	59	49	41	83	88	98	42	36	40	41	65	20	16	39
93	-----	0.051	0.073	-----	0.062	0.005	0.012	0.014	0.075	-----	0.031	-----	-----	-----
100	0.864	0.908	0.915	0.958	0.937	0.949	0.893	0.917	0.925	0.951	0.923	1.000	1.000	0.974
108	0.136	0.041	0.012	0.042	-----	0.046	0.095	0.069	-----	0.049	0.046	-----	-----	0.026
Pgm-2														
(N)	93	101	96	109	133	118	49	44	40	41	96	40	58	44
87	-----	0.005	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.005	-----	0.009	-----
90	0.027	0.015	0.005	0.005	0.008	0.013	0.020	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
95	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.034
100	0.973	0.980	0.995	0.991	0.992	0.983	0.980	1.000	0.988	1.000	0.995	1.000	0.991	0.955
108	-----	-----	-----	0.005	-----	0.004	-----	-----	0.013	-----	-----	-----	-----	0.011

Tab. 2 Frequenze alleliche dei loci polimorfici. (N) = numero degli individui saggiati

In Tab.3 vengono riportati i risultati del *p-test* per l'equilibrio di Hardy-Weinberg (H-W) eseguito in ciascuna popolazione per ognuno dei 31 loci. Una popolazione si discosta in modo significativo dall'equilibrio di Hardy-Weinberg quando il corrispondente valore di *p* è uguale o minore alla soglia di significatività prestabilita (0,05).

Come si osserva dai valori in grassetto, tutte le popolazioni sono in equilibrio di H-W per tutti i loci, mentre le popolazioni Ionio, Tirreno e Baleari deviano significativamente da tale equilibrio per almeno un locus, mentre discostamenti altamente significativi risultano essere presenti nella Sardegna dove il valore di *p* per *Gapdh* è pari a 0,001. Nessuno dei loci presenta deviazioni significative in più della metà delle popolazioni, ciò permette l'utilizzo di tutti i loci per le successive analisi sul differenziamento delle popolazioni. Delle 6 combinazioni popolazione/locus che non sono in equilibrio di H-W, solamente 2 presentano un eccesso di eterozigoti rispetto ai valori attesi (Tirreno e Sardegna), le restanti 4 presentano, invece, un deficit di eterozigoti.

	Cip	Cre	Ion	Adr	Tir	Lig	Sar	Bal	Ali	Mal	Mar	Gal	Bis	Irl
Iddh	0.906	0.925	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-----	-----	-----	1.000	-----	1.000	-----
Ldh-1	1.000	-----	1.000	0.951	1.000	1.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ldh-2	1.000	-----	-----	1.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Mdhp-1	0.596	0.767	0.991	0.297	0.301	0.972	1.000	0.977	0.975	0.998	0.438	0.017*	0.294	0.454
Mdhp-2	0.924	1.000	1.000	0.754	0.998	0.989	-----	-----	-----	-----	0.999	-----	0.993	1.000
Idh-1	0.987	0.413	0.694	0.975	0.547	0.608	1.000	0.998	1.000	0.761	1.000	-----	0.972	0.065
Idh-2	-----	-----	-----	1.000	0.879	1.000	-----	1.000	-----	-----	1.000	1.000	-----	-----
6-Pgdh	1.000	-----	1.000	1.000	1.000	0.999	-----	-----	1.000	-----	-----	-----	1.000	-----
Gapdh	0.642	0.766	0.755	0.790	0.026	0.627	0.001	0.529	0.569	0.245	0.730	0.823	0.790	0.478
Sod	0.309	0.883	0.012	0.044	0.624	0.667	0.739	0.030	0.834	0.305	0.950	0.442	0.133	0.913
PepB-1	-----	-----	-----	-----	1.000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PepB-2	0.774	0.985	0.652	0.024*	0.983	0.661	1.000	0.849	0.994	0.686	0.601	-----	0.652	0.435
PepB-3	1.000	0.732	0.822	0.688	0.853	0.637	-----	0.531	0.873	0.307	0.921	1.000	0.746	0.700
Gda	0.386	0.888	0.793	0.771	0.715	0.791	1.000	0.005*	0.904	0.777	0.125	0.387	0.921	0.750
Ada	0.869	0.785	0.504	0.874	0.135	0.753	1.000	1.000	0.873	-----	1.000	1.000	0.998	-----
Mpi	0.577	0.930	-----	0.428	0.969	0.193	-----	0.914	1.000	1.000	1.000	-----	-----	-----
Gpi-1	0.923	0.600	0.948	0.749	0.862	0.911	0.835	0.962	0.908	0.822	0.372	0.077	0.874	0.839
Gpi-2	-----	0.464	0.286	0.909	0.205	0.262	0.393	0.421	0.575	0.087	1.000	0.916	0.371	0.849
Gpi-3	0.387	0.807	0.658	0.088	0.752	0.847	0.352	0.708	0.784	0.476	0.891	0.203	0.135	0.272
Pgm-1	0.269	0.932	0.960	0.011*	0.194	0.267	0.912	0.970	0.642	0.777	0.060	-----	-----	0.908
Pgm-2	0.812	0.999	1.000	1.000	0.951	0.999	0.918	-----	1.000	-----	1.000	-----	1.000	0.995

Tab. 3 Risultati del *p-test* per la verifica dell'equilibrio di Hardy-Weinberg (H-W) eseguito in ciascuna popolazione per ognuno dei 31 loci.

6.1.2 Variabilità genetica delle popolazioni

Le stime dei parametri di variabilità genetica delle popolazioni sono riportate in Tabella 4.

L'eterozigosi attesa presenta valori relativamente alti nelle popolazioni mediterranee (1-10), variando in quest'area nel range 10-12%. L'unica eccezione è rappresentata dalla Sardegna che mostra un'eterozigosi leggermente inferiore, pari al 9%. Per quanto riguarda le popolazioni atlantiche (11-15), i valori di eterozigosi sono inferiori al 10%, fanno eccezione la Galizia e il Golfo di Biscaglia che oscillano tra il 10 e l'11% e sono del tutto comparabili con quelli mediterranei. Gli altri parametri di diversità studiati, hanno mostrato un andamento geografico del tutto comparabile con quello osservato per *He*.

Località	Allozimi					mtDNA			
	H _o		H _e		A	P	Aplotipi	h	π
1 Cipro	0.124	0.095*	0.125	0.099*	1.8	35.5	H1(4), H2(1), H4(2), H15(1), H16(4), H20(1)	0.833	0.007
2 Creta	0.123	0.091*	0.119	0.090*	1.7	25.8	H1(1), H15(1)	1.000	0.004
3 Ionio	0.106	0.080*	0.102	0.076*	1.8	25.8	H16(2)	0.000	0.000
4 Adriatico	0.105	0.077*	0.107	0.079*	1.8	25.8	H1(1), H15(1)	1.000	0.004
5 Tirreno	0.121	0.087*	0.117	0.087*	1.9	32.3	H1(6), H3(1), H4(3), H5(1), H6(3), H7(1), H15(3), H17(1), H21(1)	0.874	0.006
6 Ligure	0.110	0.079*	0.111	0.081*	2.0	29.0	H1(5), H4(5), H5(1), H6(1), H7(1), H8(1), H9(1), H15(1), H16(4)	0.963	0.006
7 Sardegna	0.099	0.062*	0.094	0.062*	1.5	19.4	H1(7), H4(3), H5(2), H6(1), H15(2), H16(4)	0.813	0.006
8 Baleari	0.104	0.078*	0.112	0.083*	1.6	32.3	H1(1), H4(1), H5(1), H6(1), H15(1), H16(2), H22(1)	0.964	0.007
9 Alicante	0.107	0,074*	0.103	0.072*	1.6	29.0	H1(5), H5(1), H6(2), H11(1), H12(1), H13(1), H14(1), H15(2), H16(5)	0.871	0.006
10 Malaga	0.086	0,072*	0.096	0.079*	1.5	29.0	H1(9), H4(3), H5(3), H15(3), H16(1), H25(1)	0.763	0.006
11 Marocco	0.091	0.086*	0.093	0.088*	1.7	29.0	H4(4), H15(1), H16(1), H17(1), H23(1), H24(2), H27(4)	0.833	0.004
12 Galizia	0.097	0.076*	0.104	0.082*	1.5	22.6	H1(3), H4(2), H5(2), H10(1)	0.821	0.007
13 Golfo di Biscaglia	0.108	0.085*	0.110	0.087*	1.7	32.3	H1(10), H4(2), H6(2), H7(1), H15(3), H18(1), H19(1)	0.737	0.004
14 Irlanda	0.091	0.075*	0.094	0.079*	1.5	32.3	H1(5), H12(2), H15(4), H16(4), H18(1), H26(1), H27(1), H28(2)	0.874	0.006

Tab. 4 Stime dei parametri di diversità genetica per le 14 popolazioni campionate di *Merluccius merluccius*.

h=diversità aplotipica; **π** =diversità nucleotidica; **H_e** =eterozigosi media attesa; **H_o** = eterozigosi media osservata; **A** = numero medio di alleli per locus; **P** = percentuale di loci polimorfici.

In asterisco viene indicata l'eterozigosi attesa e osservata calcolata omettendo i loci sottoselezione (*Gapdh* e *Gpi-2*).

6.1.3 Differenziamento genetico tra le popolazioni

In Figura 1 è riportato il dendrogramma UPGMA calcolato a partire dalla matrice di distanze genetiche di Nei (1972). Viene evidenziata una suddivisione delle popolazioni in due cluster principali: il primo comprende le popolazioni del Mediterraneo (popolazioni 1-10), mentre al secondo vengono ascritte tutte le restanti popolazioni dell'Atlantico (11-15). All'interno del primo cluster è possibile evidenziare due sottogruppi: uno comprende le popolazioni del Mediterraneo più occidentale (Baleari e Alicante), l'altro raggruppa tutte le altre.

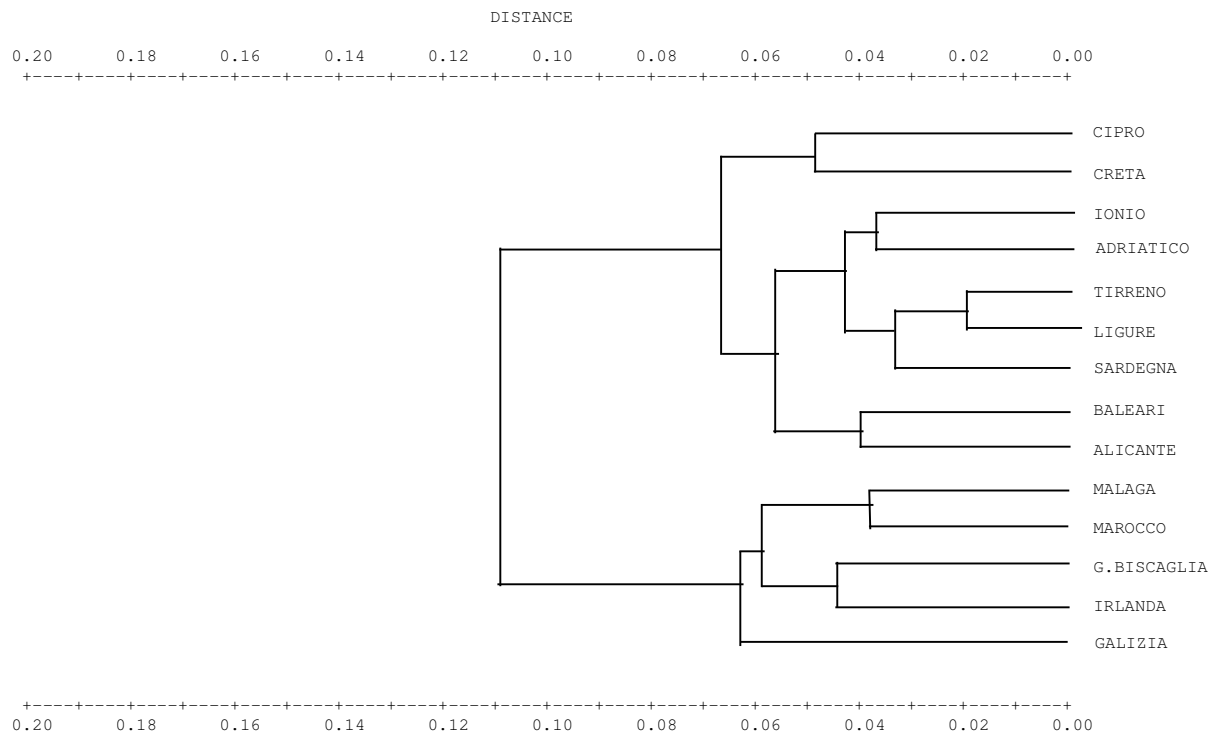


Fig.1 Dendrogramma costruito in base alle distanze genetiche calcolate secondo Nei (1972)

Un'altra analisi che è stata effettuata è la matrice di distanza F_{st} che rappresenta la probabilità di estrarre casualmente da una sottopopolazione due alleli diversi rispetto alla stessa probabilità sull'intera popolazione.

Per questa analisi (Tab. 5) è stata utilizzata la correzione di Bonferroni che ha permesso di poter individuare la presenza di due sottopopolazioni: la prima comprende le popolazioni mediterranee ad eccezione di Malaga, la seconda il resto dei campioni. La popolazione di Cipro in quanto risulta differenziata dalle altre popolazioni del Mediterraneo ad eccezione di Creta, Ionio e Adriatico.

	CIP	CRE	ION	ADR	TIR	LIG	SAR	BAL	ALI	MAL	MAR	GAL	BIS	IRL
CIP	-----													
CRE	-0,00149	-----												
ION	-0,0083	-0,00394	-----											
ADR	-0,00363	-0,00514	-0,00579	-----										
TIR	0,02002*	0,00599	0,01165	0,00743	-----									
LIG	0,01666*	0,00415	0,00628	0,00427	-0,00329	-----								
SAR	0,02524*	0,00842	0,01303	0,00891	-0,00667	-0,00545	-----							
BAL	0,07867*	0,05088*	0,06276*	0,05537*	0,01345	0,01709*	0,00329	-----						
ALI	0,068*	0,04022*	0,06021*	0,04784*	0,00744	0,01103	-0,00135	-0,00923	-----					
MAL	0,21092*	0,16851*	0,20495*	0,18696*	0,10482*	0,11085*	0,08641*	0,02923*	0,03858*	-----				
MAR	0,26207*	0,21807*	0,25534*	0,2352*	0,14899*	0,15506*	0,13286*	0,06455*	0,07456*	-0,00415	-----			
GAL	0,20051*	0,15713*	0,20504*	0,17982*	0,09666*	0,10283*	0,07912*	0,02839*	0,03031*	-0,00655	0,00133	-----		
BIS	0,26525*	0,21828*	0,26835*	0,24168*	0,14823*	0,15347*	0,13304*	0,06366*	0,07295*	-0,00645	-0,00817	-0,00232	-----	
IRL	0,30467*	0,25012*	0,32282*	0,28306*	0,17368*	0,17703*	0,16646*	0,08599*	0,09412*	-0,0099	-0,02086	-0,01135	-0,01509	-----

Tab. 5 Valori di F_{st} calcolati sui dati delle frequenze allozimiche. L'asterisco indica i valori significativi con $p \leq 0,05$

Per stabilire la relazione tra le popolazioni analizzate, è stato calcolato il valore di F_{st} a coppie di popolazioni, che ha mostrato valori significativi, indici di un effettivo differenziamento, nella maggior parte dei confronti ed in particolare in tutti i casi in cui la coppia era formata da una popolazione atlantica vs una mediterranea.

L'AMOVA è uno strumento utile per verificare come sia distribuita la variabilità genetica tra popolazioni la cui struttura viene quantificata dall' F_{st} . Come si può osservare in Tab. 6, la percentuale di variazione tra i gruppi risulta essere di circa 18%, mentre all'interno delle popolazioni di circa 82%.

Fonte di variabilità	Somma dei quadrati	Componenti di varianza	Percentuale di variazione
Tra gruppi	80.811	0.09182	17.59
Tra gruppi all'interno delle popolazioni	10.896	0.00294	0.56
All'interno delle popolazioni	986.933	0.42724	81.85
Totale	1078.639	0.52200	100

Tab. 6 Struttura delle popolazioni investigata con l'analisi della varianza (AMOVA) per tutti i loci

Lo studio condotto da Cimmaruta *et al.*, 2005 aveva evidenziato due loci allozimici (*Gapdh* e *Gpi-2*) che mostravano una variazione clinale delle frequenze alleliche correlata con l'andamento di parametri ambientali (salinità e temperatura).

In questa tesi i dati elettroforetici sono stati rielaborati omettendo tali loci sotto selezione per verificare il loro peso nel determinare il pattern di differenziamento osservato tra stock atlantico e mediterraneo e consentire il confronto con il marcatore neutrale di riferimento, cioè la regione di controllo

In Figura 3 è riportato il dendrogramma UPGMA calcolato a partire dalla matrice di distanze genetiche di Nei (1972). Non è più possibile evidenziare la presenza di due cluster come nell'analisi precedente, in quanto le frequenze alleliche risultano essere omogenee.

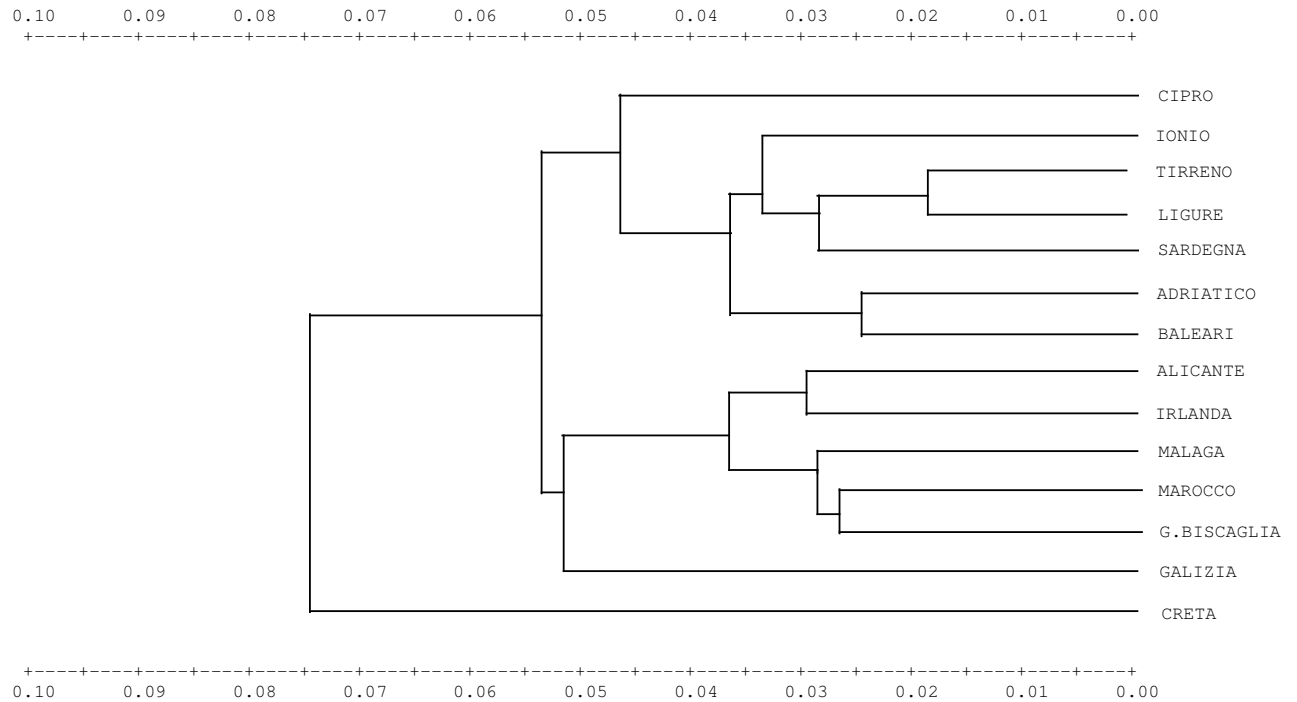


Fig. 3 Dendrogramma costruito in base alle distanze genetiche calcolate secondo Nei (1972). Sono stati omessi i loci sottoselezione (*Gapdh* e *Gpi-2*)

I risultati ottenuti calcolando il parametro F_{st} di Wright (Tab. 8), e corretti con Bonferroni ($p \leq 0,05$), mostrano come non ci siano praticamente più coppie di popolazioni che risultino significativamente differenziate con l'unica eccezione dello Ionio che si differenzia da Galizia e Irlanda.

	CIP	CRE	ION	ADR	TIR	LIG	SAR	BAL	ALI	MAL	MAR	GAL	BIS	IRL
CIP	-----													
CRE	-0,00443	-----												
ION	0,00656	0,01274	-----											
ADR	-0,0053	-0,00325	-0,00035	-----										
TIR	-0,00458	-0,0041	0,00891	-0,0032	-----									
LIG	-0,00427	-0,00356	0,00803	-0,00333	-0,00333	-----								
SAR	-0,0078	-0,00699	0,00474	-0,00797	-0,00712	-0,00685	-----							
BAL	-0,00763	-0,00528	-0,00166	-0,00991	-0,00651	-0,00656	-0,00996	-----						
ALI	-0,00721	-0,00838	0,01356	-0,00446	-0,00704	-0,00635	-0,00997	-0,00725	-----					
MAL	-0,00886	-0,00754	0,0006	-0,00844	-0,00764	-0,00753	-0,01142	-0,01196	-0,00989	-----				
MAR	-0,00494	-0,00501	0,01081	-0,00335	-0,00434	-0,00391	-0,00759	-0,00629	-0,00842	-0,00798	-----			
GAL	-0,0014	-0,00487	0,02881*	0,00616	-0,00149	-0,00014	-0,00422	0,00126	-0,01039	-0,00231	-0,00386	-----		
BIS	-0,00654	-0,00797	0,01337	-0,00094	-0,00565	-0,00502	-0,00955	-0,00701	-0,01184	-0,00829	-0,00732	-0,00821	-----	
IRL	-0,01254	-0,01886	0,0227*	0,0065	-0,01074	-0,00933	-0,01718	-0,00969	-0,02574	-0,00989	-0,01527	-0,02663	-0,01362	-----

Tab. 8 Valori di Fst calcolati sui dati delle frequenze allozimiche omettendo i loci *Gapdh* e *Gpi-2*. L'asterisco indica i valori significativi con $p \leq 0,05$.

Anche in questo caso sono state calcolate le distanze genetiche tramite l'Fst tra coppie di popolazioni per stabilire la relazione tra le popolazioni analizzate, rappresentate dall'albero genetico UPGMA. L'albero UPGMA (fig. 4) ottenuto dalla matrice dell'Fst divide le popolazioni in due cluster, uno che raccoglie le popolazioni Mediterranee, e l'altro cluster che comprende le popolazioni Atlantiche includendo anche Malaga, ma i valori dell'indice di similarità scendono drasticamente rispetto a quelli con tutti i loci (circa il 30% nei due cluster).

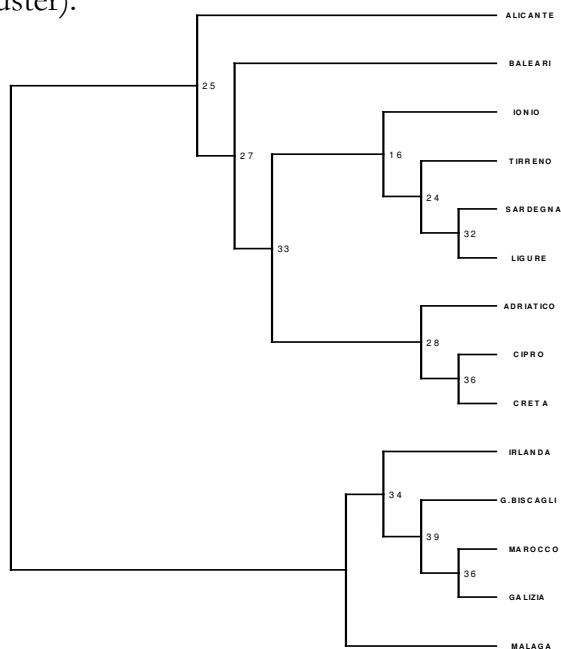


Fig 4 Cluster UPGMA basato sulla distanza di Nei (1972): dati genotipici omettendo i loci *Gapdh* e *Gpi-2*

Anche in questo caso è stata effettuata l'analisi della varianza molecolare (AMOVA), che individua (Tab. 9) una percentuale di variazione tra gruppi di 0,20, mentre all'interno delle popolazioni è circa il 100%.

Fonte di variabilità	Somma dei quadrati	Componenti di varianza	Percentuale di variazione
Tra gruppi	0.505	0.00047	0.20
Tra gruppi all'interno delle popolazioni	1.069	-0.00091	-0.38
All'interno delle popolazioni	550.611	0.23836	100.19
Totale	550.611	0.23836	100.19

Tab. 9 Struttura delle popolazioni investigata con l'analisi della varianza (AMOVA) omettendo i loci sotto selezione (*Gapdh* e *Gpi-2*)

6.2 ANALISI DELLE SEQUENZE MITOCONDRIALI

Per tutti gli individui analizzati ($n=189$) è stato ottenuto un frammento di DNA mitocondriale della lunghezza di 448 paia di basi, interno al gene codificante per l'enzima D-loop.

Complessivamente sono stati individuati 28 aplotipi dove è stato osservato: 432 siti monomorfi, 8 siti polimorfici, 7 siti informativi parsimoniosi e 1 singolo sito variabile.

6.2.1 Network di parsimonia statistica e distribuzione geografica degli aplotipi

Il network di parsimonia statistica raffigurante l'affinità tra gli aplotipi individuati è mostrato in figura 5. Gli aplotipi presenti con maggiore frequenza nel dataset sono: H1, H4, H15 e H16 (Tab. 4). Tali aplotipi sono anche caratterizzati dal fatto di avere un elevato numero di connessioni nel network di parsimonia statistica. Infatti H1 ha sei connessioni, H4 e H16 quattro e H15 tre.

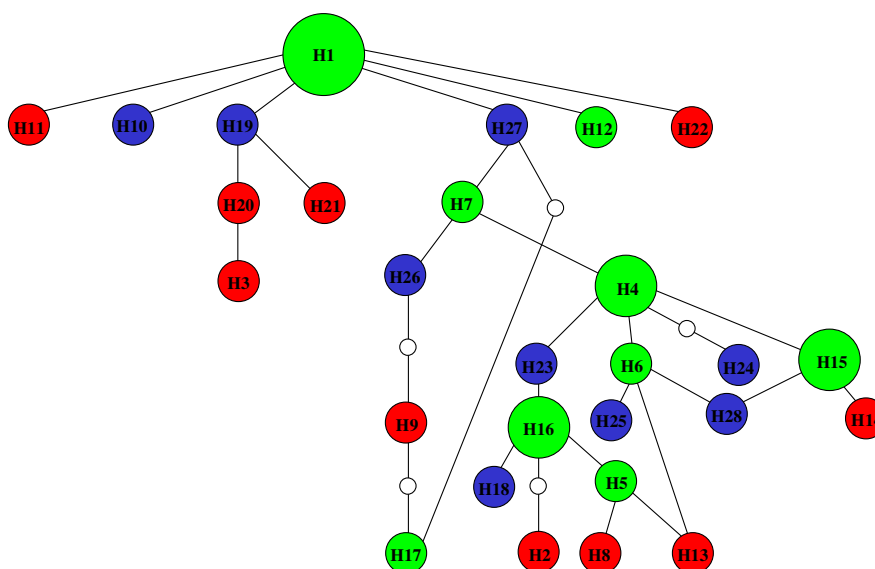


Fig 5 Diagramma delle relazioni filogenetiche tra aplotipi mitocondriali, basati sulla sequenza primaria di un frammento di 448 pb del gene per il D-loop, in *M. merluccius*. La dimensione dei cerchi nel network è proporzionale al numero di individui campionati che possiedono l'aplotipo. Gli aplotipi collegati direttamente differiscono per una singola posizione, i cerchi vuoti rappresentano aplotipi non osservati.

Attraverso il network non è possibile individuare la presenza dei gruppi Mediterraneo e Atlantico.

La distribuzione geografica degli aplotipi è mostrata in figura 6. Come si può osservare gli aplotipi sono stati distinti con tre colori diversi: in rosso vengono evidenziati quelli mediterranei, in blu atlantici e in verde gli aplotipi presenti in tutte le popolazioni. Anche se in numero inferiore rispetto a quelli comuni, gli aplotipi privati riescono ad evidenziare le differenze tra Atlantico e Mediterraneo.

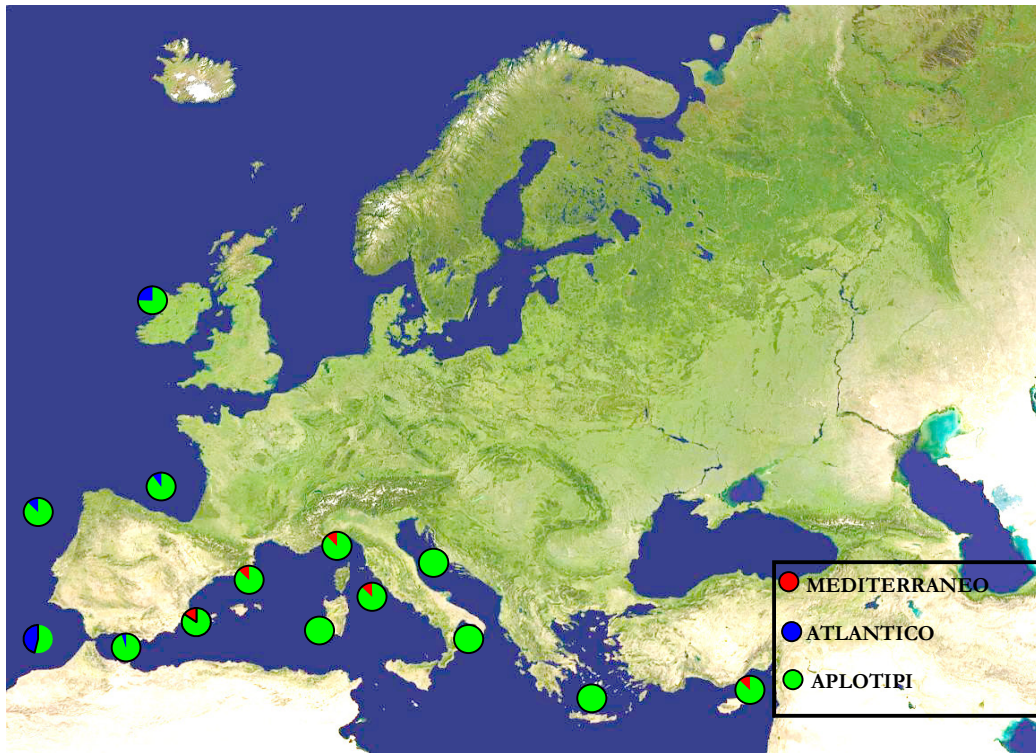


Fig. 6 Frequenze relative degli aplogruppi del D-loop osservati in *M. merluccius*

Per poter comparare meglio i dati molecolari ed elettroforetici, anche per le sequenze mitocondriali è stato calcolato un UPGMA (Fig. 7) basato sulla distanza di Nei (1972) utilizzando come outgroup la sequenza della specie *Gadus* dello stesso frammento qui analizzato (448bp del D-loop). Come si può notare non è possibile distinguere differenze tra Atlantico e Mediterraneo, inoltre i valori di bootstrap sono veramente bassi, spesso inferiori 20.

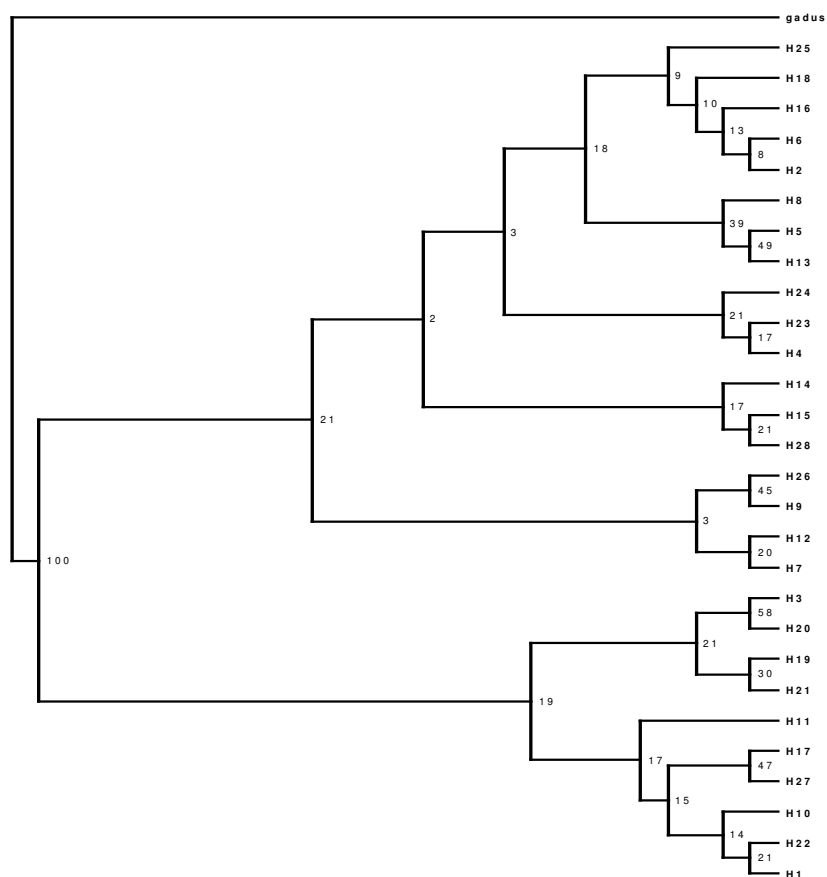


Fig 7 Cluster UPGMA basato sulla distanza di Nei (1972): dati mitocondriali (l'outgroup è rappresentato da *Gadus*)

6.2.2 Variabilità delle popolazioni

Le stime dei parametri di variabilità genetica mitocondriale per ciascuna delle popolazioni campionate sono riportate in Tab. 4. I valori di diversità aplo-tipica oscillano in un range compreso da 0,74 a 0,964, le popolazioni di Creta, Ionio e Adriatico non possono essere prese molto in considerazione avendo a disposizione solo 2 sequenze. I valori di diversità nucleare variano in un range piuttosto omogeneo (da 0,004 del Marocco a 0,007 di Baleari e Galizia). Anche la statistica F_{st} , mostrata in Tab. 10, non permette di evidenziare la presenza dei gruppi mediterraneo e atlantico, in quanto i valori non sono significativi e quindi non c'è differenziamento tra le popolazioni. L'unica eccezione è rappresentata dal Marocco che si differenzia dalle altre popolazioni atlantiche (Galizia, Biscaglia e Irlanda) e da Cipro e Ligure mostrando valori significativi anche dopo la correzione di Bonferroni.

	CIP	CRE	ION	ADR	TIR	LIG	SAR	BAL	ALI	MAL	MAR	GAL	BIS	IRL
CIP	-----													
CRE	-0,09160	-----												
ION	0,10035	0,50000	-----											
ADR	-0,0916	-1,00000	0,50000	-----										
TIR	0,02167	-0,17647	0,30061*	-0,17647	-----									
LIG	-0,03579	-0,06001	0,16709	-0,06001	-0,00106	-----								
SAR	-0,04236	-0,13713	0,19927	-0,13713	-0,00778	-0,03063	-----							
BAL	-0,04719	-0,11461	0,07097	-0,11461	-0,01751	-0,04831	-0,04164	-----						
ALI	-0,02743	-0,11362	0,10418	-0,11362	0,01615	0,00136	-0,02013	-0,0539	-----					
MAL	0,01773	-0,19346	0,34868	-0,19346	-0,00729	0,01435	-0,02543	0,02285	0,03276	-----				
MAR	0,09722*	0,08917	0,29155*	0,08917	0,08954	0,06086*	0,11270	0,04048	0,12189	0,15157*	-----			
GAL	0,02180	-0,07731	0,36661*	-0,07731	-0,01427	-0,01509	-0,02615	-0,00251	0,04446	-0,04533	0,10320*	-----		
BIS	-0,00931	-0,17647	0,15885	-0,17647	0,02382	0,0215	0,00163	-0,02477	-0,02017	0,03431	0,10417*	0,06184	-----	
IRL	0,04382	-0,21212	0,39525*	-0,21212	-0,01291	0,04192	0,00539	0,06122	0,04544	-0,01695	0,18346*	0,01512	0,0442	-----

Tab. 10 Valori di Fst calcolati sui dati del DNA mitocondriale. L'asterisco indica i valori significativi con $p \leq 0,05$.

L'AMOVA (analisi della varianza molecolare) mostrata in Tab. 11 permette di evidenziare una alta percentuale di variazione all'interno delle popolazioni (~98%), mentre tra i gruppi è di 0,95.

Fonte di variabilità	Somma dei quadrati	Componenti di varianza	Percentuale di variazione
Tra gruppi	2.586	0.01217	0.95
Tra gruppi all'interno delle popolazioni	17.964	0.01743	1.36
All'interno delle popolazioni	236.514	1.25140	97.69
Totale	257.064	1.28100	100

Tab. 11 Struttura delle popolazioni investigata con l'analisi della varianza (AMOVA) per le sequenze mitocondriali

6.2.3 Test di espansione demografica

I risultati dell'analisi della “mismatch distribution” effettuata sui presunti stock (Atlantico e Mediterraneo) e sull'intero areale (Fig. 8) mostrano un accordo pressoché completo tra le distribuzioni osservate e attese (in caso di espansione demografica) per il gruppo del Mediterraneo e per tutto l'areale, mentre appare parziale per il gruppo Atlantico.

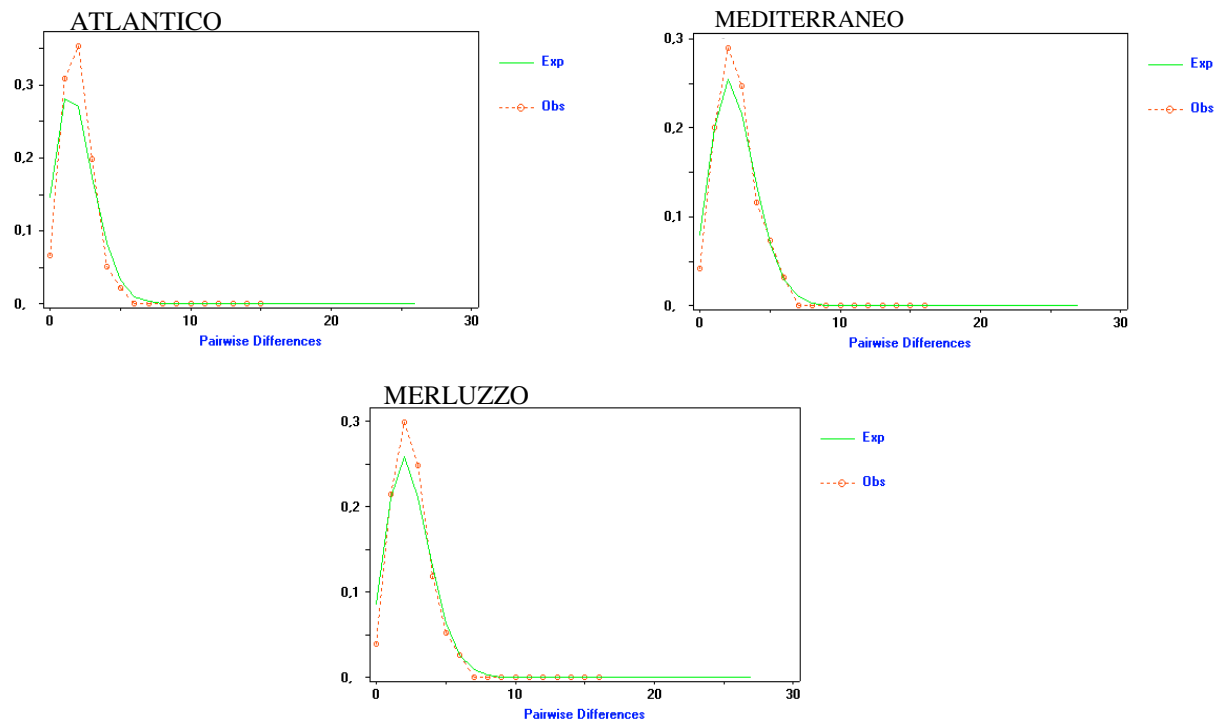


Fig. 8 Mismatch distribution delle sequenze di DNA mitocondriale. a) gruppo Atlantico b) gruppo Mediterraneo; c) tutte le popolazioni. La linea continua verde mostra la distribuzione della popolazione attesa, mentre quella tratteggiata rossa la distribuzione osservata.

Valori elevati, negativi e significativi della statistica **F_s** (Fu, 1997) (Tab. 12) si sono osservati per tutti e due i gruppi soprattutto se si considerano un unico raggruppamento, suggerendo così un possibile evento di espansione.

POPOLAZIONE	n	θ	Hd	Fs	R ₂	TsD
MEDITERRANEO	126	1,973	0,958	-7,887*	0,177	0,948
ATLANTICO	63	1,775	0,934	-7,349*	0,156	0,286
TOTALE	189	2,056	0,960	-12,460*	0,151	0.603

Tab. 12 n = numero di individui

θ = diversità nucleotidica

Hd = diversità aplo-tipica

r = statistica r (raggedness; Harpending *et al.*, 1993; Harpending, 1994)

F_s = statistica F_s di Fu (Fu, 1997)

TsD = statistica Tajima D

ns = non significativo

* = p < 0.05

La migrazione tra le popolazioni studiate è stata analizzata con il programma MIGRATE 2.0.3 (Beerli, 2003) che permette di stimare la massima probabilità basandosi sulla teoria della coalescenza. Il programma usa l'approccio Markov Chain Monte Carlo per indagare tutte le genealogie possibili con gli eventi di migrazione. Per ogni stima sono state fatte 10 repliche generando un valore medio di migrazione (Nm).

In Tab. 13 vengono riportati i valori di flusso genico direzionale (immigrazione) ottenuti dal programma MIGRATE. In rosso vengono indicati i valori più alti del numero di migranti per generazione. Come si può osservare solo quattro popolazioni (Cipro, Sardegna, Biscaglia e Irlanda) migrano verso altre zone, presentando valori alti di migranti unidirezionali. Al contrario non c'è stato nessun individuo di Tirreno e Marocco che si è spostato dal luogo originario. In Fig. 9 viene rappresentato scenario ottenuto dai dati precedenti. Come si può notare da Cipro si sono spostati migranti verso l'Adriatico e Malaga, dalla Sardegna verso l'Adriatico, dall'Irlanda alle Baleari e dal Golfo di Biscaglia a Malaga.

Pop	Theta	M[m/mu] [+receiving population] [xNmu]													
		1,+	2,+	3,+	4,+	5,+	6,+	7,+	8,+	9,+	10,+	11,+	12,+	13,+	14,+
Cipro	0,00601	-----	0	0	0	678,2232	0	2170,181	0	135,6446	0	0	946,331	0	813,8678
Creta	0,00021	0	-----	210,5469	1263,281	210,5469	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ionio	14547.00848	1358,542	0	-----	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adriatico	1576241.70029	8312,804	0	0	-----	0	0	8410,865	0	0	0	0	0	0	0
Tirreno	0,00346	180,132	0	0	0	-----	0	0	450,3299	0	0	0	540,3964	0	90,066
Ligure	11766031330.287	0	0	0	0	0	-----	1364,799	0	0	170,5999	0		0	0
Sardegna	0,00183	0	2175,9752	0	0	0	0	-----	0	0	0	0	711,8559	0	0
Baleari	0,00351	0	0	0	0	0	0	0	-----	0	0	0	1889,62	5038,986	0
Alicante	0,01059	1864,795	0	0	0	0	0	0	0	-----	1119,098	0	1119,098	0	0
Malaga	92897288190.48482	4220,843	703,4738	0	0	0	0	0	0	0	-----	0	0	0	2110,422
Marocco	10616457131463.684	1938,92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-----	0	0	0
Galizia	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-----	0	1128,13
Irlanda	26611250.44407	1835,481	0	0	0	0	0	0	0	407,8841	0	0	1019,711	-----	0
Biscaglia	0,01217	129,9104	0	0	0	1039,283	0	2075,391	0	0	0	0	0	0	-----

Tab. 13 Stime di migrazione tra ogni popolazione di *M. merluccius*. In rosso vengono evidenziate le popolazioni migranti.

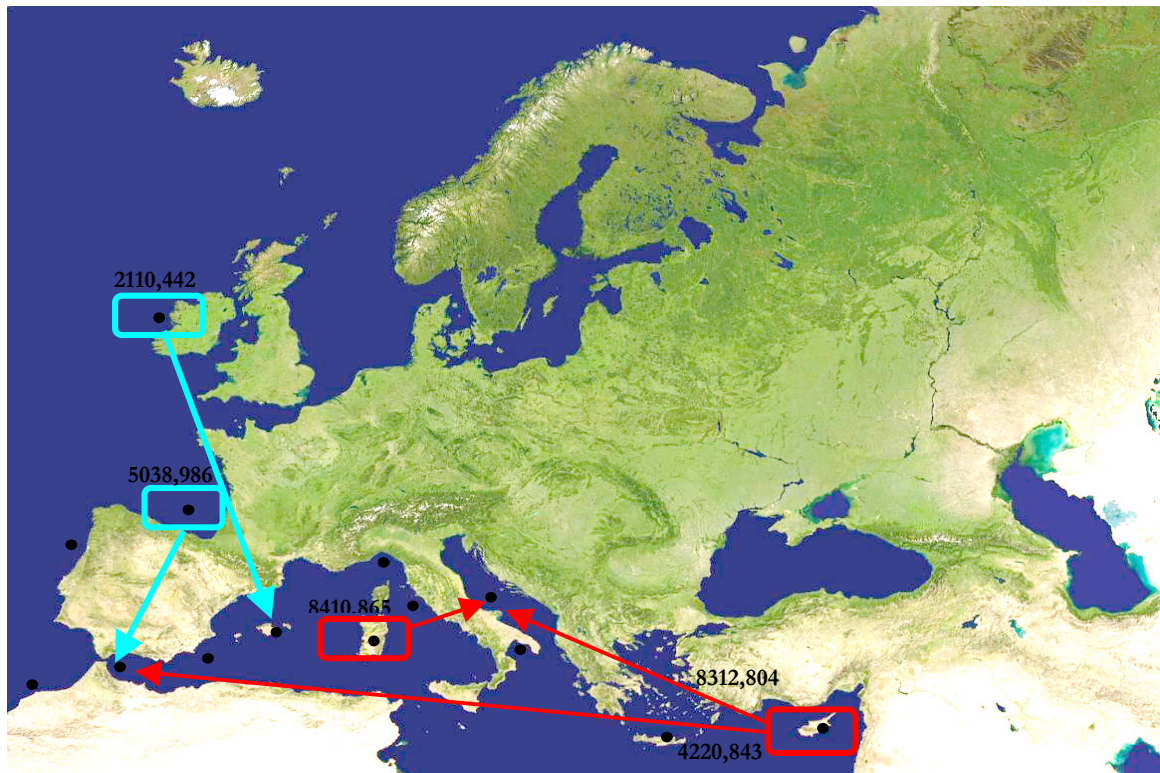


Fig. 9 Rotte di migrazione nell'espansione demografica di *M. merluccius*. Il numero di migranti è stato stimato da MIGRATE (Beerli, 2004)

Infine, dal valore stimato per il parametro tau ($\tau = 2,458$), utilizzando un tasso di divergenza pari a 1,7-2% per milione di anni, stimato su specie strettamente affini al *M. merluccius* e per il medesimo frammento mitocondriale (Quenteiro *et al.*, 2000; Burrridge, 2002), si ottiene una stima del tempo trascorso dall'inizio dell'espansione pari circa 183.000 considerando l'intero areale, mentre per il Mediterraneo e l'Atlantico è rispettivamente di 190000 e 180000.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Il Mar Mediterraneo presenta elevati valori di biodiversità in quanto più di un quarto degli organismi macroscopici sono endemici di questo bacino (Tortonese, 1985). Tali valori possono essere attribuiti a ragioni storiche, paleogeografiche (se si considera la travagliata storia geologica di tale bacino) ed ecologiche (comprende una varietà di situazioni climatiche ed idrologiche presenti in nessun altro bacino al mondo). Infatti nel Mar Mediterraneo si sono succedute, negli ultimi milioni di anni, situazioni che vanno dal quasi completo disseccamento durante la crisi del Messiniano (circa 5.33Ma), a fasi di forte dolcificazione, a cicli di periodi glaciali e interglaciali con marcate fluttuazioni climatiche ed idrologiche durante il Quaternario. Ne consegue che il biota presente oggi è il risultato della persistenza dei popolamenti locali che sono sopravvissuti di volta in volta a tali cambiamenti, unitamente a specie e linee evolutive provenienti da colonizzazioni, per lo più dall'Oceano Atlantico (Almada *et al.*, 2001; Domingues *et al.*, 2005). Infatti, dopo un periodo di isolamento e disseccamento durato circa 500000 anni, il riallagamento del bacino mediterraneo è stato possibile grazie ad un afflusso di acque atlantiche attraverso la recente apertura dello Stretto di Gibilterra.

Sulla base di questa storia paleogeografica è stato suggerito che le comunità di specie che abitano le acque del Mediterraneo possano essere divise in differenti categorie biogeografiche (Bianchi *et al.*, 2000): 1) specie temperate Atlantico-Mediterranee; 2) specie cosmopolite/panoceaniche; 3) specie endemiche, includendo specie paleoendemiche (mioceniche) e neoendemiche (plioceniche); 4) specie subtropicali dell'Atlantico (restanti interglaciali); 5) boreali atlantiche; 6) specie invasive provenienti dal Canale di Suez; 7) specie invasive dell'Atlantico orientale (specialmente nel mare di Alboran). Questi gruppi si distribuirebbero nel Mediterraneo in accordo con la loro origine: flora e fauna tipiche mediterranee si trovano nella parte centrale del bacino e specialmente nella zona occidentale. Il Mare di Alboran, localizzato immediatamente ad est di Gibilterra, mostra un'affinità con l'Atlantico, dovuta alla continua penetrazione di flora e fauna atlantica per il flusso d'acqua (Harmelin e d'Hont, 1993). Al contrario, la parte orientale del Mediterraneo ha un elevato apporto di specie provenienti dal Mar Rosso dopo l'apertura

del Canale di Suez (Galil, 1993). Infatti, le due principali barriere geografiche che sono presenti in Mediterraneo, cioè lo Stretto di Gibilterra (che divide l'Oceano Atlantico dal Mediterraneo occidentale) e lo Stretto di Sicilia (che divide il Mediterraneo occidentale da quello orientale), creano delle interruzioni filogenetiche intraspecifiche e/o transizioni genetiche.

Dati più recenti, ottenuti mediante l'analisi della struttura genetica di varie specie a distribuzione atlantico-mediterranea, evidenziano come nonostante la storia del Mar Mediterraneo sia così ben documentata, la transizione Atlantico-Mediterranea a livello biologico è piuttosto controversa, con risultati discordanti per ciò che concerne le modalità di separazione tra i bioti dei due bacini.

Tra i vari lavori trovati in letteratura è possibile distinguere due situazioni, abbastanza prevedibili:

1. Le specie mostrano un chiaro differenziamento tra Atlantico e Mediterraneo;
2. Le specie mostrano assenza di struttura tra i due bacini.

I casi in cui si osserva un differenziamento delle popolazioni tra Atlantico e Mediterraneo comprendono numerose specie marine, presentando casi estremi di reciproca monofilia. Esempi di questo differenziamento possono essere riscontrati nelle specie *Dicentrarchus labrax* (Allegrucci *et al.*, 1997; Naciri *et al.*, 1999; Lemaire *et al.*, 2005), *Pomatoschistus minutus* (Gysels *et al.*, 2004a, 2004b), *Crambe crambe* (Duran *et al.*, 2004a, 2004c), *Chthamalus montagui* (Pannacciulli *et al.*, 1997), *Mythilus galloprovincialis* (Ladoukakis *et al.*, 2002) dove i dati indicano che il flusso genico tra Mediterraneo e Atlantico è limitato o quasi assente. In questa prospettiva si possono inserire i dati allozimici di *M. merluccius* che mostra due gruppi di popolazioni ben differenziate in Atlantico e Mediterraneo, con il confine localizzato sul fronte di Almeria-Oran (Cimmaruta *et al.* 2005). Simili risultati sono stati riscontrati in *Anguilla anguilla* (Maes *et al.*, 2002), *Chthamalus montagui* (Pannacciulli *et al.*, 1997), *Dicentrarchus labrax* (Allegrucci *et al.*, 1997) e *Platichthys flesus* (Borsa *et al.*, 1997a) dove tutte le specie mostrano un brusco cambiamento nelle frequenze alleliche associato al Mare di Alboran. Infatti, nel caso del nasello, Malaga anche se si trova nel bacino del Mediterraneo presenta un'affinità genetica maggiore con le popolazioni atlantiche e rappresenta il punto di contatto tra le due correnti.

Come già detto, ci sono varie specie in cui non si evidenzia differenziamento tra popolazioni atlantiche e mediterranee ed un elemento di forte interesse è costituito dal fatto che i due tipi di pattern (differenziamento presente o assente) non sembrano caratteristici di specie affini ne' filogeneticamente ne' ecologicamente. Ad esempio nel lavoro di Bargelloni *et al.* (2003) sulla famiglia Sparidae è stata analizzata la struttura delle popolazioni di *Dentex dentex*, *Lithognathus mormyrus*, *Pagellus bogaraveo*, *Pagrus pagrus* e *Spondyllosoma cantharus* sia con marcatori nucleari (allozimi) che con il DNA mitocondriale (D-loop) e i risultati ottenuti mostrano un'alta discordanza tra i pattern delle varie specie. Tre di queste (*De. dentex*, *L. mormyrus* e *Sp. cantharus*) rivelano una chiara separazione tra Atlantico e Mediterraneo, mentre altre due (*P. bogaraveo* e *P. pagrus*) mostrano una bassa o assente struttura delle popolazioni Atlantico-Mediterranee. Risultati simili sono stati osservati nella filogeografia comparata di due grandi pelagici, il tonno rosso *Thunnus thynnus* e il pesce spada *Xiphias gladius* (Alvarado-Bremer *et al.*, 2005). Entrambi sono caratterizzati da una complessa struttura aplo-tipica, ma mentre non è possibile distinguere una suddivisione geografica nei campioni di tonno analizzati, che non presentano quindi una strutturazione genetica su base geografica, nel caso del pesce spada si osserva un forte differenziamento della popolazione mediterranea rispetto a quella atlantica. La spiegazione deriva dalla storia demografica di queste specie e dalle loro caratteristiche biologiche; infatti le oscillazioni della temperatura che caratterizzarono il Mar Mediterraneo durante il Pleistocene raggiunsero dei valori minimi troppo bassi per consentire di riprodursi al tonno (che quindi si estinse a livello del Mediterraneo) ma non al pesce spada. Ne consegue che al ristabilirsi delle condizioni climatiche idonee (ultimo interglaciale) la ricolonizzazione del Mediterraneo da parte del tonno ha determinato la presenza di una sola linea atlantica presente anche in Mediterraneo, con assenza di differenziamento. Nel caso del pesce spada invece, l'isolamento tra i popolamenti di Atlantico e Mediterraneo si è protratto almeno per la durata delle ultime due fasi glaciali spiegando, assieme al comportamento filopatrino di questi animali, il forte differenziamento che si osserva attualmente.

Da questo quadro generale risulta che specie diverse presentano non solo gradi di differenziamento diverso tra i due bacini atlantico e mediterraneo, ma che gli eventi paleoclimatici hanno giocato un ruolo chiave nel determinare la situazione attuale. Nel caso del nasello però i dati raccolti prima di questo lavoro indicavano nella selezione il

principale responsabile dell'attuale pattern di diversità genetica. Lo scopo di questo lavoro è quindi consistito nel verificare il ruolo effettivamente svolto dai processi selettivi nel determinare il differenziamento genetico esistente tra le popolazioni atlantiche e quelle mediterranee di nasello. Inoltre si è cercato di ricostruire quali eventi paleogeografici possano aver eventualmente contribuito a determinare tale differenziamento e in che misura.

A tal fine sono stati confrontati i risultati ottenuti con un marcatore molecolare sicuramente neutrale, il DNA mitocondriale, con quelli ottenuti mediante gli allozimi, sospettati invece di essere sotto selezione.

L'analisi delle sequenze mitocondriali del D-loop ha evidenziato la presenza di 28 aplotipi distribuiti nelle 14 popolazioni campionate su tutto l'areale della specie. Quattro di questi aplotipi (H1, H4, H15 e H16) sono stati osservati ad alta frequenza sia in Atlantico sia in Mediterraneo ed altri cinque (H5, H6, H7, H12 e H17) sono presenti in entrambi i bacini ma a frequenze più basse (Fig. 5 e Tab. 4). Ciò testimonia un alto livello di flusso genico tra i due mari. Molti degli altri aplotipi osservati sono invece privati di uno dei due bacini: sono stati cioè registrati o soltanto in Atlantico o soltanto in Mediterraneo. Il bacino mediterraneo è caratterizzato dalla presenza di aplotipi privati registrati a bassa frequenza e distribuiti in quasi tutte le aree (Fig. 6): in Mediterraneo orientale (H2 e H20 a Cipro), centrale (H3 e H21 in Tirreno, H8 e H9 in Mar Ligure) e occidentale (H22 alle Baleari, H11, H13 e H14 ad Alicante). Come già detto questi aplotipi sono a bassa frequenza, osservati in uno o al massimo due individui e questo testimonia che lo scambio tra i diversi bacini non è totalmente libero, coerentemente con quanto ci si attende per un pesce demersale, anche se un discreto livello di flusso genico è presente fra i vari mari mediterranei, in accordo con la natura planctonica di uova e larve soggette al trasporto passivo. L'osservazione di un sia pur lieve differenziamento in ambito mediterraneo sembra in accordo con le ipotesi di Bianchi *et al.* (2000) che distingue dieci settori biogeografici in Mediterraneo. Gli aplotipi privati osservati in Atlantico si distribuiscono a bassa frequenza in quasi tutti i campioni, ad eccezione dell'Irlanda: H25 a Malaga, H23 H24 e H27 in Marocco, H10 in Galizia, H18 H19 H26 e H28 nel Golfo di Biscaglia. Anche qui le basse frequenze degli aplotipi privati mostrano che il flusso genico collega le varie popolazioni atlantiche anche se è presente un certo

grado di differenziamento, in accordo con le notevoli distanze geografiche che separano alcuni dei campioni.

L'elevato numero di aplotipi privati che caratterizzano le popolazioni atlantiche vs. mediterranee (19 su 28) farebbe pensare ad un marcato differenziamento tra i due gruppi, ma in realtà non è così; la bassa frequenza di tali aplotipi rispetto alla diffusione e alle elevate frequenze dei 9 aplotipi comuni, suggerisce che la regione di controllo non rilevi significative differenze tra i due gruppi. I risultati di tutte le analisi statistiche condotte confermano tale mancato differenziamento a livello mitocondriale. La statistica F_{st} (Tab. 10) non permette di evidenziare la presenza dei due gruppi mediterraneo e atlantico, in quanto i valori osservati non risultano mai significativi dopo la correzione di Bonferroni. Il network (Fig. 5) non individua la presenza dei gruppi Mediterraneo e Atlantico, e mette in collegamento gli aplotipi a bassa frequenza con gli aplotipi più comuni a prescindere dalla loro origine geografica, senza quindi identificare gruppi di aplotipi affini che siano anche localizzati nelle stesse aree geografiche. Da notare però che gli aplotipi privati del Mediterraneo derivano tutti o da aplotipi atlantici o dagli aplotipi comuni. Anche i risultati ottenuti dall'AMOVA (Tab. 11) allocano la quasi totalità della varianza osservata all'interno delle popolazioni, circa il 98%, mentre solo lo 0,95% è attribuibile alla varianza tra i gruppi. Infine, il dendrogramma UPGMA (Fig. 7) distingue due subcluster che però non hanno alcun supporto geografico: in ognuno sono presenti contemporaneamente aplotipi comuni ad Atlantico e Mediterraneo (sia ad alta che a bassa frequenza), aplotipi privati atlantici ed aplotipi privati mediterranei. In conclusione, possiamo affermare che i dati mitocondriali indicano una totale mancanza di differenziamento tra Atlantico e Mediterraneo e che tale osservazione non è dovuta ad uno scarso potere di risoluzione del marcatore utilizzato dato che i risultati ottenuti mostrano dei livelli di variabilità genetica per il frammento di D-loop analizzato sufficientemente elevati ad indicare un'eventuale differenziamento tra le popolazioni analizzate.

Apparentemente si rileva dunque una discrepanza tra i risultati prodotti dai dati allozimici e quelli mitocondriali. Nel primo caso le popolazioni atlantiche e mediterranee risultano essere chiaramente distinte, un'osservazione confermata da tutte le analisi statistiche effettuate: confronto di F_{st} a coppie, analisi della varianza molecolare (AMOVA), dendrogrammi (Fig. 1 e 2). Al contrario, i dati mitocondriali rilevano una sostanziale omogeneità genetica su tutti i campioni osservati. Ma questa differenza

riguarda l'intero insieme dei dati? In realtà abbiamo osservato come a livello di dati allozimici la maggior parte del differenziamento tra i due stock sia imputabile al pattern di variazione registrato ai loci *Gapdh* e *Gpi-2*, che mostrano una variazione clinale correlata all'andamento della salinità in superficie e della temperatura a -300 m di profondità (Fig. 10) e che pertanto sono stati indicati come possibili loci sotto selezione (Cimmaruta *et al.*, 2005).

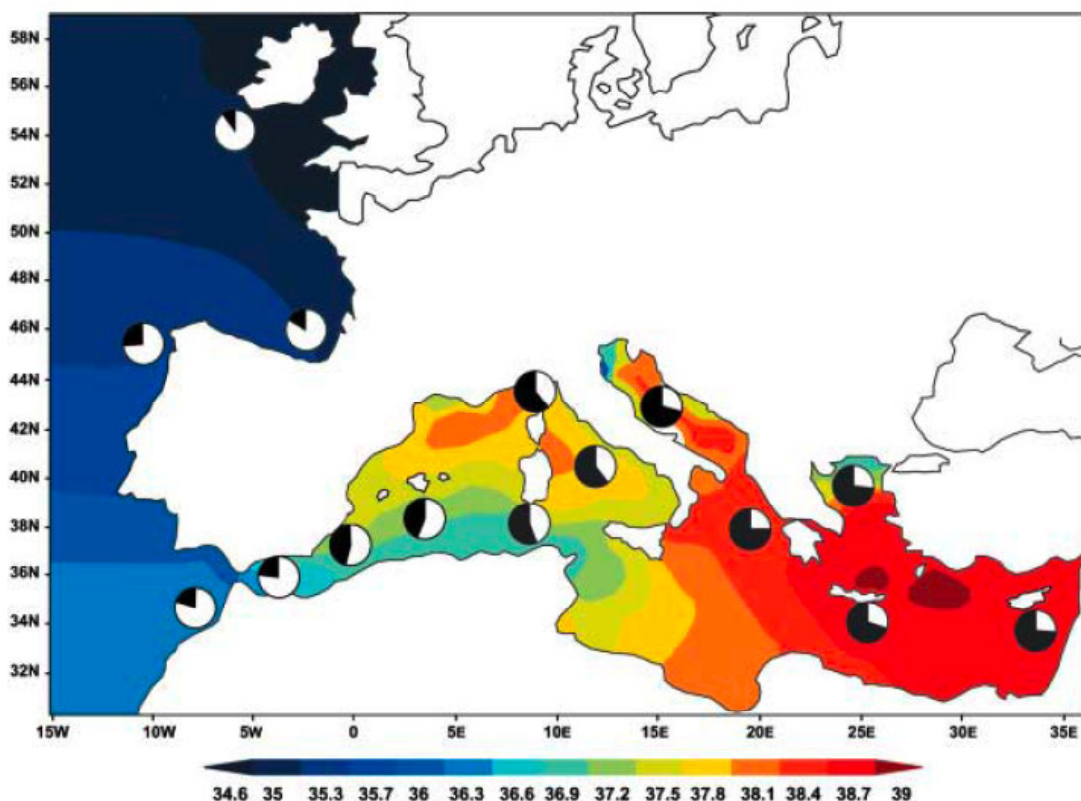


Fig. 10. Mappa dei valori di salinità (‰) con sovrimposte le frequenze alleliche del locus *Gapdh* nelle varie popolazioni di nasello.

Uno dei metodi per provare che fenomeni selettivi sono in atto su una parte del genoma degli organismi analizzati consiste nel confrontare i pattern di un marcatore neutrale con quello dei singoli loci per individuare eventuali “outlayers” il cui pattern si discosta significativamente da quello del marcatore neutrale di riferimento. Il confronto effettuato tra il pattern degli allozimi compresi i due loci *Gapdh* e *Gpi-2* sospettati di essere sotto selezione e quello del marcatore mitocondriale ha mostrato una differenza significativa, come esposto nelle pagine precedenti. Per verificare però se tale discrepanza sia imputabile realmente al contributo di *Gapdh* e *Gpi-2*, tutte le analisi statistiche intese a

quantificare il differenziamento tra i due stock sono state ripetute sul dato allozimico eliminando però *Gapdh* e *Gpi-2* e confrontando poi il pattern ottenuto con quelli degli allozimi nel loro complesso (differenziamento atlantico-mediterraneo) e del marcatore mitocondriale (mancanza di differenziamento). I risultati ottenuti mostrano che i dati allozimici, privati dei loci *Gapdh* e *Gpi-2*, non sono più in grado di identificare i due gruppi di popolazioni: i confronti di F_{st} a coppie perdono di significatività (tab. 9), l'analisi della varianza molecolare attribuisce tutta la varianza osservata (100%) all'interno delle singole popolazioni (mentre ne attribuiva ben il 18% fra le popolazioni in presenza del data set completo), il dendrogramma raggruppa ancora popolazioni atlantiche e mediterranee in due sub cluster che però non hanno nessun supporto a livello di bootstrap (Fig. 4), indicando che di fatto non ci sono differenziamenti tali da giustificare la separazione in due gruppi.

Si può quindi concludere che la selezione svolge un ruolo essenziale nel plasmare la struttura genetica attuale del nasello, determinando sia la marcata distribuzione clinale osservata all'interno del Mediterraneo sia il differenziamento tra lo stock atlantico e quello mediterraneo.

Se la selezione è implicata nel determinare il pattern di diversità genetica osservata nel nasello, ciò non esclude che gli eventi paleobiogeografici abbiano comunque potuto contribuire a generarli. Per verificare questa ipotesi e ricostruire uno scenario paleogeografico a supporto dell'attuale struttura genetica del nasello sono stati elaborati in maniera appropriata i dati mitocondriali.

L'analisi della “mismatch distribution” è stata effettuata sui presunti stock (Atlantico e Mediterraneo) e sull'intero areale (Figura 8) per tracciare gli eventi demografici di maggior rilievo che il nasello ha subito in passato. I risultati mostrano un accordo pressoché completo tra le distribuzioni osservate e attese in tutti i gruppi analizzati (mediterraneo, atlantico e intero areale). La distribuzione unimodale osservata può indicare o un recente collo di bottiglia (drastica diminuzione della dimensione delle popolazioni) o un'improvvisa espansione demografica. Per dirimere tra queste due ipotesi è stata elaborata la statistica F_s di Fu (1997) (Tab. 12) che ha mostrato valori elevati, negativi e significativi per entrambi i gruppi (-7,887 per il bacino del Mediterraneo e -

7,349 per l'Atlantico) e per l'intero areale (-12,460), suggerendo un possibile evento di espansione. L'affidabilità dell'ipotesi di una recente espansione demografica è confermata anche dai risultati forniti dalla statistica Tajima D, che evidenzia la presenza di colli di bottiglia e che ha mostrato valori non significativi (Tab. 12), permettendo di scartare l'alternativa costituita appunto da un recente repentino calo demografico.

Stabilita la presenza di eventi di espansione demografica nella storia recente del nasello è stato impiegato il software MIGRATE (Beerli, 2004) per stabilire quali popolazioni siano state coinvolte da tale fenomeno e per cercare di ricostruire le rotte di migrazione seguite durante l'espansione degli areali. I risultati ottenuti mostrano principalmente due rotte di migrazione (Tab. 13 e Fig. 9): la prima parte da Cipro e arriva in Adriatico e Malaga, la seconda origina in Irlanda e Golfo di Biscaglia e giunge rispettivamente ad Alicante e Malaga. Come si può notare, mentre le migrazioni nel Mediterraneo rimangono vincolate all'interno dello stesso bacino, per quelle a partire dall'Atlantico viene superato lo Stretto di Gibilterra ed il Mare di Alboran. In altre parole, l'espansione demografica ha portato ad una colonizzazione del Mediterraneo da parte delle forme atlantiche ma non viceversa.

La datazione dell'espansione demografica permette di ricostruire con una certa precisione quali episodi paleoclimatici abbiano contribuito a tale evento. La data ottenuta per l'espansione demografica è pari a circa 183000 anni fa considerando l'intero areale, in accordo con quanto calcolato sia per il Mediterraneo sia per l'Atlantico: 190000 e 180000 anni fa, rispettivamente. Questa datazione corrisponde alla penultima glaciazione del Pleistocene, il Riss, verificatasi tra 200000 e 125000 anni fa. Durante le fasi glaciali, Riss compresa, si determinò un fenomeno noto come “conversione delle correnti”. Attualmente la zona dello Stretto di Gibilterra e del Mare di Alboran è caratterizzata dalla presenza di una corrente superficiale fredda in entrata nel Mediterraneo, che porta acque atlantiche in Mediterraneo determinando le condizioni ecologiche “di tipo atlantico” che caratterizzano il Mare di Alboran e generando il Fronte di Almeria-Oran. Da qui si genera una corrente calda che, scorrendo in profondità, porta acque mediterranee in atlantico. Questa situazione risulta completamente all'opposto durante le fasi glaciali: le acque fredde oceaniche generano una corrente profonda che entra in Mediterraneo portando con sé rappresentanti della fauna fredda atlantica, i cosiddetti “ospiti freddi” che proprio durante le fasi glaciali hanno colonizzato il Mediterraneo. Ad esempio, durante il Würm

comparvero elementi provenienti dall'Atlantico settentrionale come i molluschi bivalvi *Arctica islandica*, *Mya truncata* e il gasteropode *Buccinum undatum*.

Il caso del nasello sembra rientrare in questo quadro, con un'eccezione costituita dal fatto che quando le popolazioni atlantiche colonizzarono il Mediterraneo favorite dalle condizioni climatiche del Riss, questo era ancora abitato da popolazioni locali mediterranee. A suffragio di questa ricostruzione sta l'elevata variabilità genetica delle popolazioni mediterranee rispetto a quelle atlantiche (con dati congruenti per i marcatori sia nucleari che mitocondriali), generata dalla confluenza in Mediterraneo della variabilità genetica tipica sia del Mediterraneo che dell'Atlantico. Inoltre il network di parsimonia mostra come diversi aplotipi mediterranei derivino per mutazione da aplotipi atlantici (ma mai il contrario) a dimostrazione dell'ingresso, in epoche passate, di linee genetiche atlantiche in Mediterraneo (e non dell'opposto). Questo dato ci dice anche che per quanto gli eventi paleogeografici siano stati rilevanti nel determinare l'attuale pattern di diversità genetica del nasello, essi non hanno mai interrotto il flusso genico tra le popolazioni atlantiche e quelle mediterranee abbastanza a lungo da determinare in questa specie l'insorgenza di linee filetiche distinte, come osservato invece ad esempio in alcune specie di sparidi o nel pesce spada (Bargelloni *et al.*, 2003 [vedi Fig. 11]; Alvarado-Bremer *et al.*, 2005).

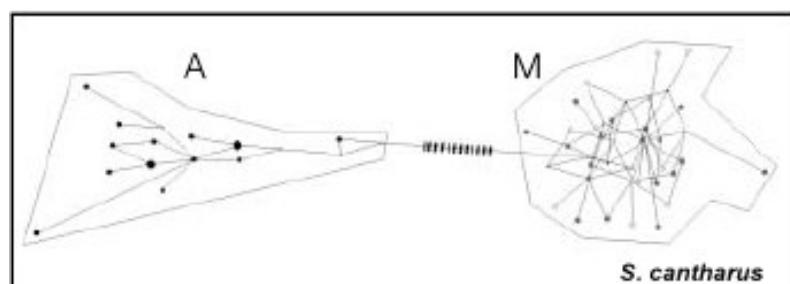


Fig. 11. Network di parsimonia per lo sparide *Spondylosoma cantharus* con i due gruppi di aplotipi atlantico (A) e mediterraneo (M) (da Bargelloni *et al.*, 2003).

Osservando i risultati ottenuti nel loro insieme si può concludere che la struttura genetica del nasello è dovuta ugualmente all'impronta lasciata dagli eventi paleobiogeografici ("past-history") e all'azione attuale delle forze evolutive, con la selezione che, ad ogni generazione, contrasta l'azione omogeneizzante del flusso genico che tenderebbe invece ad uniformare la struttura genetica di tutte le popolazioni. E' da

sottolineare come un simile quadro non avrebbe potuto essere dedotto con l'utilizzo di un solo marcatore genetico. I dati allozimici hanno evidenziato il pattern clinale dei loci *Gapdh* e *Gpi-2*, che permettono di determinare il differenziamento tra le popolazioni Atlantiche e Mediterranee, correlato alla distribuzione spaziale della salinità e temperatura, suggerendo il ruolo fondamentale della selezione che agisce su questi geni (o altri ad essi linked). Allo stesso tempo i dati mitocondriali hanno permesso di ricostruire la storia paleogeografica della specie, responsabile in larga parte del pattern di diversità genetica osservato.

BIBLIOGRAFIA

- Alcazar J. et al.** (1983). Biología dinámica Y pesca de la merluza en Asturias. *Recursos Pesqueros de Asturias*, 3, pp. 135.
- Allegrucci G., Fortunato C. & Sbordoni V.** (1997). Genetic structure and allozyme variation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* and *D. punctatus*) in the Mediterranean Sea. *Marine Biology* 128, p.p. 347-358.
- Allendorf F. W. & Leary R. F.** (1988). Conservation and distribution of genetic variation in polytypic species, the cutthroat trout. *Conservation Biology* 2, pp. 170-184.
- Allendorf F. W. et al.** (1987). Genetics and fishery management: Past present, and future: In: *Population Genetics and fishery Management* (Ryman N. & Utter F., eds.), pp. 1-19. Seattle: Washington Sea Grant Publications/University of Washington Press.
- Allendorf F. W. & Leary R. F.** (1986). Heterozygosity and fitness in natural population of animals. In: *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*, Soulé M. E. (ed.) Sinauer, Sunderland, pp. 57-76.
- Almada V. C., Oliveira R. F., Gonçalves E. J., et al.** (2001). Patterns of diversity of the north-eastern Atlantic blennid fish fauna (Pisces: *Blenniidae*). *Global Ecology and Biogeography* 10, p.p. 411-422.
- Alvarado-Bremer J. R., Mejuto J. & Baker A. J.** (1995). Mitochondrial DNA Control Region Sequences Indicate Extensive Mixing of Swordfish (*Xiphias gladius*) Populations in the Atlantic Ocean. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* **52**, p.p. 1720-1732.
- Alvarado-Bremer J. R., Vinas J., Mejuto J., Ely B. & Pla C.** (2005). Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36, p.p. 169-187.
- Alvarez M. C.** (1994). Interspecific genetic differentiation in Western Mediterranean sparid fish. *Aquaculture*, 125 pp. 47-57.
- Anderson L. et al.** (1981). Genetic variability in herring (*Clupea harengus harengus*): description of protein loci and population data. *Hereditas* 95, pp. 69-78.

- Avise J. C. & Hamrick J. L.** (1996). Conservation Genetics. **Chapman & Hall**, New York..
- Ayala F., Powell J. R., Tracey M. L., Mourao C. A. & Perez-Salas S.** (1972). Enzyme variability in *Drosophila willistoni* group IV. Genetic variation in natural population of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, 70 pp. 113-139.
- Bagenal T. B.** (1954). Growth rate of the hake (*Merluccius merluccius* L.) in the Clyde and other Scottish areas. *J. Mar. biol. Ass. U. K.* 33 (1) pp. 69-95.
- Bagenal T. B.** (1954). Growth rate of the hake (*Merluccius merluccius* L.) in the Clyde and other Scottish areas. *J. Mar. biol. Ass. U. K.* 33 (1) pp. 69-95.
- Bargelloni L., Alarcon J. A., Alvarez M.C., Penzo E., Magoulas A., Reis C. & Patarnello T.** (2003). Discord in the family Sparidae (Teleostei): divergent phylogeographical patterns across the Atlantic-Mediterranean divide. *J. Evol. Biol.* 16, p.p. 1149-1158.
- Bazin E., Glemin S. & Galtier N.** (2006). Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312, 570-572.
- Beerli P.** (2003). MIGRATE: Documentation and Program, Part of LAMARC. Available: <http://evolution.genetics.washington.edu/lamarc.html>.
- Beerli P.** (2004). Effect of unsampled populations on the estimation population sizes and migration rates between sampled populations. *Molecular Ecology* 13, p.p. 827-836.
- Belloc G.** (1929). Étude monographique du merlu (*Merluccius merluccius* L.). Première et deuxième parties. *Rev. Trav. Off Pêch. Marit.*, 2(2-3), p.p. 153-199.
- Bertness M. D. & Gaines S. D.** (1993). Larval dispersal and local adaptation in acorn barnacles. *Evolution* 47, p.p. 316-320.
- Bianchi C .N. & Morri C.** (2000). Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Marine Pollution Bulletin* 40, p.p. 367-376.
- Bianco P. G.** (1990). Potential role of the palaeohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyol. Exploration Freshwater*, 1 pp. 167-184.
- Borsa P., Blanquer A. & Berrebi P.** (1997a). Genetic structure of the flounders *Platichthys flesus* and *P. Stellatus* at different geographic scales. *Marine Biology* 129, p.p. 233-246.

- Brewer G. J. & Sing C. F.** (1970). *An introduction to isozyme techniques*. New York & London, Academic Press, XII + 186 pp.
- Bullini L., Sbordoni V.** (1980). Electrophoretic studies of gene-enzyme systems: microevolutionary processes and phylogenetic inference. *Zool.* 47 (suppl.) pp. 95-112.
- Bullini L., Pignatti S., Virzo De Santo A.** (1998). *Ecologia generale*. Editore UTET.
- Burridge C. P.** (2002). Antitropicality in Pacific fishes: molecular insights. *Environ. Biol. Fish.* 65, p.p. 151-164.
- Campbell N. A.** (1995). *Biologia*. Zanichelli.
- Casey J., Pereiro J.** (1995). European hake (*M. Merluccius*) in the North-East Atlantic. *Biology, fisheries and markets* pp. 125-148.
- Charvalho G. R. & Hauser L.** (1995). Molecular genetics and stock cocept in fisheries. Carvalho G. R. and Pitcher T. J. (eds.). Chapman and Hall, London, pp. 55-80.
- Charvalho G. R. and Pitcher T. J.** (1995). *Molecular genetics in fisheries*. Chapman & Hall, Padstow.
- Cimmaruta R., Bondanelli P. & Nascetti G.** (2005). Genetic structure and environmental heterogeneity in the European hake (*Merluccius merluccius*). *Molecular Ecology* 14, p.p. 2577-2591.
- Cimmaruta R., Scialanca F., Luccioli F. & Nascetti G.** (2003). Genetic diversity and environmental stress in Italian population of the cyprinodont fish *Aphanius fasciatus*. *Oceanologica Acta* 26, p.p. 101-110.
- Clauzon G., Suc J.-P., Gautier F., Berger A., Loutre M.-F.** (1996). Alternate interpretation of the Messinian salinity crisis: Controversy resolved? *Geology* 24, p.p. 363–366.
- Clement T.S, Feltus J, Kaiser D.H, Zentall T.R.** (2000). “Work ethic” in pigeons: Reward value is directly related to the effort or time required to obtain the reward. *Psychonomic Bulletin & Review* 7, p.p. 100–106.
- Coombs S. H. & Mitchell C. E.** (1982). The development rate of eggs and larvae of the hake *Merluccius merluccius* (L.) and their distribution to the west of the British Isles. *J. Cons. int. Explor. Mer*, 40 pp. 119-126.

- Crow J. F. & Aoki K.** (1984). Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of a population subdivision. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81 pp. 6073-6077.
- Crutcher D. C. & Carr S. M.** (1996). Population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the North West Atlantic as determined by mitochondrial DNA sequence data. *Bull. Can. Soc. Zool.*, in press.
- Danzman R. G. et al.** (1988). Heterozygosity and components of fitness in rainbow trout. *Biol. J. Linn. Soc.*, 33 pp. 285-304.
- Domingues V. S., Bucciarelli G., Almada V. C. & Bernardi G.** (2005). Historical colonization and demography of the Mediterranean damselfish, *Chromis chromis*. *Molecular Ecology* 14, p.p. 4051-4063.
- Doyle J.J. and Doyle J.L.** (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull.* 19, p.p. 11-15.
- Dufresne F., Bourget E. & Bernatchez L.** (2002). Differential patterns of spatial divergence in microsatellite and allozyme alleles: further evidence for locus-specific selection in the acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*? *Molecular Ecology* 11, p.p. 113-123.
- Duggen S., Hoernle K., van den Bogaard P., Rüpke L. and Morgan J. P.** (2003). Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature* 422 p.p. 602- 606.
- Duran S., Giribet G & Turon X.** (2004a). Phylogeographical history of the sponge *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida): range expansion and recent invasion of the Macaronesian islands from the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 13, p.p. 109-122.
- Duran S., Pascual M. & Turon X.** (2004c). Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Marine Biology* 144, p.p. 31-35.
- Emerson B., Paradis E. & Thebaud C.** (2001). Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology & Evolution* 16, p.p. 707-716.
- Excoffier L., Smouse P. E. & Quattro J. M.** (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, p.p. 479-491.

- Excoffier L., Laval G., Schneider S.** (2005). Arlequin ver. 3.0: un integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, p.p. 47-50.
- FAO** (1986a). Rapport du premier groupe de travail spécial sur les pecheries de merlus et de crevettes profondes dans la zone nord du COPACE. FAO COPACE/PACE Sér., 86/33 pp. 295.
- Farris J. S.** (1972). Estimation phylogenetic trees from distance matrices. *Am. Nat.*, 106 pp. 645-668.
- Felsenstein J.** (1993). PHYLIP (*Phylogeny inference Package*), Version 3.572. Seattle, WA: Department of Genetics, University of Washington (distributed by the author).
- Ferguson M. M., Drahushchak L. R.** (1990). Enzyme heterozygosity and disease resistance in rainbow trout. *Heredity*, 64 pp. 413-417.
- Finney D. J.** (1949). On a method of estimating frequencies. *Biometrika* 36, p.p. 233-234.
- Fu Y-X.** (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, p.p. 915-925.
- Galil B. S.** (1993). Lessepsian migration: new findings on the foremost anthropogenic change in the Levant basin fauna. In *Symposium Mediterranean Seas 2000*, ed. N. F. R. Della Croce, p.p. 307-323. University of Genova, Istituto di Scienze Ambientali Marine, Santa Margherita Ligure.
- González-Garcés & Pereiro** (1994). The Present State of knowledge of Hake Populations Which Live on the Continental Shelf of the Atlantic and Mediterranean Parts of the European Union, with Special Attention to the Iberian Peninsula. *Privately published*, Vigo, Spain.
- Grant W. S.** (1984). Biochemical population genetics of Atlantic herring *Clupea harengus*. *Copeia* 1984, pp. 357-364.
- Gutscher M.-A., Malod J., Rehault J.-P., Contrucci I., Klingelhoefer F., Mendes-Victor L., and Spakman W.** (2002). Evidence for active subduction beneath Gibraltar. *Geology*, v.30, p.p. 1071-1074.
- Gysels E. S., Hellemans B., Pampoulie C. & Volckaert F. A. M.** (2004a). Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Molecular Ecology* 13, p.p. 403-417.

- Gysels E. S., Hellemans B., Patarnello T. & Volckaert F. A. M.** (2004b). Current and historic gene flow of the sand goby *Pomatoschistus minutus* on the European Continental Shelf and in the Nediterranean Sea. *Biological Journal of the Linnean Society* 83, p.p. 561-576.
- Harmelin J. -G. & d'Hont J. -L.** (1993). Transfers of bryozoan species between the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea via the Strait of Gibraltar. *Oceanologica Acta* 16 (1), p.p. 63-72.
- Harpending H.C., Sherry S.T., Rogers A.R. and Stoneking M.** (1993). Structure of ancient human populations. *Current Anthropology* 34, p.p. 483-496. [Discussed in *Science* 262:27-28, 265:1661, 267:35-36.]
- Harpending H. C.** (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66, p.p. 591-600.
- Harris H. & Hopkinson D. A.** (1976). Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. *North Holland publishing Company Inc.*, New York .
- Hilbish T. L. & Koehn R. K.** (1985). Exclusion of the role of secondary contact in an allele frequency cline in the mussel *Mytilus edulis*. *Evolution* 39 (2), p.p. 432-443.
- Holm E. R. & Bourget E.** (1994). Selection and population genetic structure of the barnacle *Semibalanus balanoides* in the North Atlantic and Gulf of St. Lawrence. *Marine Ecology Progressive Series* 113, p.p. 247-256.
- Hopkins T. S.** (1985). Physics of the sea. In: Margalef R. (ed.) *Western Mediterranean*, pp. 102-127. Pargamon Press., London.
- Hunter R. L. & Market C. L.** (1957). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gel. *Science*, 125 pp. 1294-1295.
- Il Pesce** (Dicembre, 1998).
- Inada T.** (1981). Studies on the Merlucciid fish. *Bulletin Far Seas Fish Res. Laboratory, Shimizu, Japan*, 18 pp. 1-172.
- Institut Français pour l'Exploitation de la Mer** (1998). Mediterranean Hydrographic Atlas (MEDATLAS); Ifremer/Sismer, coordinator.
- Jones B. W.** (1974). World resources of hakes of the genus *Merluccius*. In: (ed. Harden-Jones F. R.) *Sea Fisheries Research*, pp. 139-166 Paul Elek Scientific Books, London.
- Jones M. W. et al.** (1996). Implications of low genetic variability in brook trout populations in Fundy National Park, New Brunswick. *Bull. Can. Soc. Zool.*, in press.

- Kenneth J. Hsu** (1983). The Mediterranean Was a Desert. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. A Voyage of the Glomar Challenger.
- Koehn R. K., Newell R. I. E., Immermann F.** (1980). Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77, p.p. 5385-5389.
- Krom M. D., Michard A. & Cliff R. A.** (1999). Sources of sediment to the Ionian Sea and the western Levantine basin of the Eastern Mediterranean during S-1 sapropel time. *Marine Geology* 160, p.p. 45-61.
- Kumar S., Tamura K., Nei M.** (2004). MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150–163.
- Ladoukakis E. D., Saavedra C., Magoulas A., Zouros E.** (2002). Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Molecular Ecology* 11, p.p. 755-769.
- Lemaire C., Allegrucci G., Naciri M., Bahri-Sfar L., Kara H. & Bonhomme F.** (2000). Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Molecular Ecology* 9, p.p. 457-467.
- Lemaire C., Versini J. J. & Bonhomme F.** (2005). Maintenance of genetic differentiation across a transition zone in the sea: discordance between nuclear and cytoplasmic markers. *Journal of Evolutionary Biology* 18, p.p. 70-80.
- Levene H** (1949). On a matching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.* 20, p.p. 91-94
- Levi D., Andreoli M. G., Arnieri E., Giannetti G., Rizzo P.** (1994). Otolith reading as a tool for stock identification. *Fish. Res.*, 20 pp. 97-107.
- Linneo C.** (1758). *Sistema naturae*. Editio decima. Holmiae, p.p. 482.
- Lo Brutto S., Arculeo M., Mauro A., Scalisi M., Cammarata M., Parrinello N.** (1998) Allozymic variation in Mediterranean hake, *Merluccius merluccius*, (Gadidae). *Ital. J. Zool.* 65 (Suppl.) p.p. 49-52.

- Lo Brutto S., Arculeo M., Parrinello N.** (2004). Congruence in genetic markers used to describe Mediterranean and Atlantic populations of European hake (*Merluccius merluccius* L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 20, p.p. 81-86.
- Loget N., Van Den Driessche J., & DAVY P.** (2005). How did the Messinian Salinity Crisis end? *Terra Nova* 17, p.p. 414-419
- Lundy C. J., Moran P., Rico C. et al.** (1999). Macrogeographical population differentiation in oceanic environments: a case study of European hake (*Merluccius merluccius*), a commercially important fish. *Molecular Ecology* 8, p.p. 1889-1898.
- Lundy C., Rico C., Hewitt G. M.** (2000). Temporal and spatial genetic variation in spawning grounds of European hake *Merluccius merluccius* in the Bay of Biscay. *Molecular Ecology* 9, p.p. 2067-2079.
- Maes G. E. & Volckaert F. A. M.** (2002). Clinal genetic variation and isolation by distance in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Biological Journal of the Linnean Society* 77, p.p. 509-521.
- Marr** (1957). In: Taking Stock of Genetic Concepts in fisheries Management. Gauldie R. W. (1991). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48 pp. 722-731.
- Maurin C.** (1965). Les merlus des mers européennes et nord-ouest africaines. *Rapp. Comm. Int. Mer. Médit.*, 18 pp. 215-220.
- Monaldo A.** (1985). Evolution of the Mediterranean basins and reconstruction of the Cenozoic palaeoceanography. In: Margalef R. (ed.) *Western Mediterranean*, pp. 18-61. Pergamon Press, London.
- Morales-Nin B., Torres G. J. & Lombarte A.** (1998). Otolith growth age estimation in the European hake. *Journal of Fish Biology*, 53 pp. 1155-1168.
- Mork J. et al.** (1985). Genetic variation in Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout its range. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42 pp. 1580-1587.
- Mulligan C. J., Kitchen A. & Miyamoto M. M.** (2006). Comment on Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312, 570-572.
- Murgahid A. R. & Hashem M. T.** (1982). Some aspects of the fishery biology of hake (*Merluccius merluccius*) in the Libyan waters. *Bulletin of the Institute of Oceanography and Fish*, ARE, 8 pp. 145-162.

- Naciri M., Lemaire C., Borsa P. & Bonhomme F.** (1999). Genetic study of the Atlantic/Mediterranean transition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Heredity* 90 (6), p.p. 591-596.
- Neel M.** (1973). Private variants and the frequency of mutation among South American Indians. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70 pp. 3311-3315.
- Nei M.** (1972). Genetic distance between populations. *Amer. Nat.*, 106 pp. 283-292.
- Nevo E., Ben-Shlomo R. & Lavie B.** (1984). Mercury selection of allozymes in marine organism: prediction and verification in nature. *PNAS* 81, p.p. 1258-1259.
- Nielsen E. E. et al.** (1997). Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar* a comparison of genetic composition over 60 years. *Molecular Ecology*, 6 pp. 487-492.
- Olaso I.** (1990). Distribucion y abundancia del megabentos invertebrado en fondos de la plataforma cantabrica. *Publ. Expec. Inst. Esp. Oceanogr.* No. 5, pp. 128.
- Oliver P. & Massuti E.** (1995). Biology and fisheries of western Mediterranean hake (*M. Merluccius*). *Biology, fisheries and markets*, pp. 181-200.
- Pannacciulli F. G., Bishop J. D. D. & Hawkins S. J.** (1997). Genetic structure of populations of two species of *Chthamalus* (Crustacea: Cirripedia) in the north-east Atlantic and Mediterranean. *Marine Biology* 128, p.p. 73-82.
- Patarnello T., Volckaert F. A. M. J. & Castilho R.** (2007). Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break?. *Molecular Ecology* 16, p.p. 4426-4444.
- Pérès J. M.** (1985). History of the Mediterranean biota and the colonization of the depth. In: Margalef R. (ed.) *Western Mediterranean*, pp. 200-234. Pargamon Press, London.
- Pérez N. & Pereiro F. J.** (1985). Aspectos de la reproduccion de la merluza (*Merluccius merluccius* L.) de plataforma gallega y cantabrica. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 2 (3) pp. 39-47.
- Pla C. et al.** (1991). Differentiation de stocks du merlu (*Merluccius merluccius*) per l'analyse genetique: comparaison de plusieurs populations mediterraneennes et atlantiques du littoral espagnol. *FAO Rapport Peches*, 447 pp. 87-93.
- Planes S. et al.** (1996). A genetic metapopulation model for reef fishes in oceanic islands: the case of the surgeonfish, *Acanthurus triostegus*. *J. Evol. Biol.* 9, pp. 103-117.

- Posada D. & Crandall K. A.** (2001). Intraspecific gene genealogies : trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16, p.p. 37-45.
- Powers D. A. & Schulte P. M.** (1998). Evolutionary adaptations of gene structure and expression in natural environment: a multidisciplinary approach to address the million-year saga of a small fish. *Journal of Experimental Zoology*, 282 p.p. 71-94.
- Prakash S., Lewontin R. C. & Hubby J. L.** (1996). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudobscura*. *Genetics*, 61 pp. 841-858.
- Quenteiro J., Vidal R. & Rey-M'endez M.** (2000). Phylogeny and biogeographic history of hake (genus *Merluccius*), inferred from mitochondrial DNA control-region sequences. *Mar. Biol.* 136, p.p. 163-174.
- Ramos-Onsins S. E. & Rozas J.** (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19, p.p. 2092-2100.
- Recasens L., Lombarte A. & Torres G. J.** (1998). Spatiotemporal variation in the population structure of the European hake in the NW Mediterranean. *Journal of Fish Biology* Vol. 53, No. 2 pp. 387-401.
- Rice W.R.** (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, p.p. 223-225.
- Richardson B. J., Baverstock P. R. & Adams M.** (1986). Allozyme electrophoresis. Academic press. London.
- Richarson R. J.** (1983). Distribution of protein variation in skipjack (*Katsuwonus pelamis*) from the central and the south-western Pacific. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 34, pp. 231-251.
- Rogers J. S.** (1972). Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics*. VII. University of Texas Publications, 7213 pp. 145-153.
- Rogers A. R.** (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population growth. *Evolution* 49, p.p. 608-615.
- Rogers A. R. & Harpending H. C.** (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, p.p. 552-569.
- Roldan M. I.** (1991). Enzymatic polymorphisms in the Argentinian hake, *Merluccius hubbsi* Marini, of the Argentinian continental shelf. *Journal of Fish Biology* Vol. 39 (Supplement A) pp. 53-59.

- Roldan M. I.** (1998). Population genetic structure of European hake, *Merluccius merluccius*. *Heredity* 81, pp. 327-334.
- Roldan M. I., Garcia-Marin J. L. & Pla C.** (1999). Genetic relationships among *Merluccius* species. Vol. 83 pp. 79-86.
- Ropson I. J., Brown D. C. & Powers D. A.** (1990). Biochemical genetics of *Fundulus heteroclitus* (L.). VI. Geographical variation in the gene frequencies of 15 loci. *Evolution* 44 (1), p.p. 16-26.
- Rozas J., Sanchez-Delbarrio J. C., Messeguer X. and Rozas R.** (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, p.p. 2496-2497.
- Ryman N.** (1981). Fish Gene Pools. *Ecological Bulletins* 34, Stockholm: Editorial Service, FRN.
- Ryman N.** (1991). Conservation genetics considerations in fishery management. *Journal of Fish Biology*, 39 pp. 211-224.
- Ryman N. et al.** (1979). Reproductive isolation with little genetic divergence in sympatric populations of brown trout (*Salmo trutta*). *Genetics* 92, pp. 247-262.
- Ryman N. et al.** (1984). Lack of correspondence between genetic and morphological variability patterns in Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Heredity* 53, pp. 687-704.
- Sabatés A.** (1990). Distribution pattern of larval fish populations in the Northwestern Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* 59, pp. 75-82.
- Sakinc M. and Yaltirak C.** (2005). Messinian crisis : What happened around the northeastern Aegean? *Marine geology*, 221, pp. 423-436.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K. and Erlich H.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, p.p. 487-91
- Schneider S., Roessli D. & Excoffier L.** (2000). Arlequin Ver. 2000: Software for Population Genetic Data Analysis. University of Geneva, Geneva.
- Selander R. K., Smith M. H., Yang S. Y., Johnson W. E. & Gentry J. B.** (1971). Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Univ. Tex. Publ. (Stud. Genet. 6)*, 103 pp. 49-69.

- Shaw C. R. & Prasad R.** (1980). Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4 pp. 297-320.
- Siciliano M. J. & Shaw C. R.** (1983). Separation and visualization of enzymes of gels. In: Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. II, Zone Electrophoresis, 4th ed., Smith, I (ed.), Heinemann, London, pp. 185-207.
- Smith P. J. *et al.*** (1991). Loss of genetic diversity due to fishing pressure. *Fischeries Research*, 10 pp. 309-316.
- Sneath PHA, Sokal RR.** (1973). Numerical Taxonomy. *San Francisco: Freeman*. 573 p.
- Sokal R. R. & Rohlf F. G.** (1981). *Biometry*, Freeman, San Francisco.
- Swafford D. L. & Selander R. B.** (1981). Biosys-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *Heredity*, 72 pp. 281-283.
- Swofford D. L., Selander R. B. & Black W. C. IV** (1997). BIOSYS-2: A Computer Program for the Analysis of Allelic Variation in Genetics, Ft. Collins, CO.
- Tajima F.** (1993b). Simple method for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics*, 135, p.p. 599–607.
- Tortonese** (1985). Distribution and Ecology of Endemic Elements in the Mediterranean Fauna (Fishes and Echinoderms). *Plenum Press, New York*.
- Van Valen L.** (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1 p.p. 1 - 30.
- Vila A. *et al.*** (1990). Utilisation du locus *Gapdh-1* comme marqueure génétique dans la différentiation de stocks de Merlu (*Merluccius merluccius*). *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.* 32: 1PS.
- von der Heyden S., Lipinski M.R. & Matthee C.A.** (2007). Species-specific genetic markers for identification of early life history stages of Cape hakes, *Merluccius capensis* and *M. paradoxus* in the southern Benguela Current. *J. Fish Biol.* **70** (Supplement B), p.p. 262-256.
- Ward R. D. *et al.***, (1994). A comparison of genetic diversity level in marine, fresh water and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44 pp. 213-232.
- Wares J. P. & Cunningham C. W.** (2001). Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 55, p.p. 2455-2469.
- West I.** (2002). The Messinian Salinity Crisis of the Mediterranean. *St. Lect. Sum.*
- Wright S.** (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28 pp. 114-138.

- Wright S.** (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* (London), 15 pp. 323-345.
- Zane L., Bargelloni L. & Patarnello T.** (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, p.p. 1-16.
- Zupanovic S. & Jardas I.** (1986). A contribution to the study of biology and population dynamics of the Adriatic hake (*Merluccius merluccius* L.). *Acta Adriatica*, 27 pp. 97-146.