

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile
(DECOS)

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE
XVIII CICLO

**Erosione genetica e relazioni genotipo-ambiente
nella popolazione delle Saline di Tarquinia
di *Aphanius fasciatus* (Teleostea)**

s.s.d.:BIO/07

Coordinatore: Prof. Giuseppe Nascetti

Tutor: Dr.ssa Roberta Cimmaruta

Dottorando: Dario Angeletti

INDICE

CAP. 1 – INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO.....	4
CAP. 2 – AREA DI STUDIO.....	9
2.1 – CARATTERISTICHE GENERALI E CHIMICO-FISICHE DEGLI AMBIENTI SALMASTRI	9
2.2 – CARATTERISTICHE BIOLOGICHE GENERALI.....	11
2.3 – LE SALINE.....	12
2.4 – LE SALINE DI TARQUINIA.....	14
CAP. 3 – BIOLOGIA E SISTEMATICA DI <i>Aphanius fasciatus</i>	20
3.1 – TASSONOMIA E NOMENCLATURA	20
3.2 – MORFOLOGIA	21
3.3 – DISTRIBUZIONE E HABITAT.....	22
3.4 – ECOLOGIA E ALIMENTAZIONE.....	23
3.5 – BIOLOGIA RIPRODUTTIVA.....	24
3.6 – INTERESSE ANTROPICO E SATUS DELLA SPECIE	24
CAP. 4 – EROSIONE GENETICA	26
CAP. 5 – LO STUDIO DELLE RELAZIONI GENOTIPO-AMBIENTE	28
5.1 – LA GENETICA ECOLOGICA	28
5.2 – RELAZIONI GENOTIPO-AMBIENTE IN AMBIENTE MARINO.....	30
5.3 – RELAZIONI GENOTIPO-AMBIENTE IN AMBIENTE SALMASTRO.....	32
5.4 – HABITAT CHOICE.....	34

CAP. 6 – MATERIALI E METODI.....	36
6.1 – MATERIALI.....	36
6.2 – METODI.....	40
6.2.1 – ANALISI ELETTROFORETICHE.....	40
6.2.2 – ANALISI STATISTICHE.....	45
CAP. 7 – RISULTATI E DISCUSSIONI.....	49
7.1 – EROSIONE GENETICA.....	49
7.1 – RELAZIONI GENOTIPO-AMBIENTE.....	57
7.2.1 – SELEZIONE.....	64
7.2.2 – HABITAT CHIOCE.....	71
CAP. 8 – CONCLUSIONI.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	95

CAP. 1 – INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

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 che tale maggiore fitness conferiscono.

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).

Il progressivo impatto antropico, in tutti gli ambienti naturali, provoca spesso la riduzione della variabilità genetica. Molte sono le cause che innescano dei processi di erosione genetica; tra questi, l'inquinamento e le alterazioni degli habitat, hanno un ruolo fondamentale; questi eventi possono da un lato costituire una pressione selettiva in favore di particolari genotipi, dall'altro, più frequentemente, possono provocare consistenti riduzioni delle dimensioni delle popolazioni naturali, fino a veri e propri "colli di bottiglia", o comunque favorendo fenomeni di deriva genetica nelle popolazioni. Il risultato è la creazione di popolazioni geneticamente omogenee, con una fitness ridotta, l'aumento dei fenomeni negativi connessi all'inbreeding (*depressione da inbreeding*) e la diminuzione delle potenzialità di adattamento ed evoluzione della popolazione.

La Riserva Naturale delle Saline di Tarquinia costituisce un laboratorio naturale di grande interesse per lo studio della biodiversità nei suoi vari aspetti, sia per l'elevato valore naturalistico e l'importante funzione ecologica dell'area, che per le peculiarità di questo ambiente di tipo seminaturale, in cui i fenomeni riscontrati, in alcuni casi, possono essere correlati direttamente alle modalità di gestione della Riserva da parte dell'uomo. Gli ambienti particolarmente eterogenei, quali gli ambienti salmastri, si

prestano anche molto bene per indagare come le pressioni selettive dell'ambiente agiscano sul patrimonio genetico delle popolazioni. Questi 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. Non a caso negli ambienti salmastri troviamo un ridotto numero di specie euriecie, in grado di sopportare frequenti ed improvvise fluttuazioni dei parametri ambientali.

L'attività estrattiva delle Saline ha subito nello scorso decennio una progressiva riduzione fino alla definitiva sospensione della produzione nel 1997, comportando inevitabilmente anche l'interruzione degli interventi di manutenzione delle strutture. A partire dallo stesso anno questo ambiente, che svolge una funzione ecologica fondamentale per la conservazione delle specie ornitiche migratorie, è stato oggetto di numerosi studi volti alla caratterizzazione delle diverse componenti ecologiche dell'area, studi condotti dal gruppo di Ricerca della Cattedra di Ecologia attraverso diversi approcci metodologici (ecologici, genetici, fisico-chimici).

In particolare due ricerche condotte sulla comunità macrozoobenthonica, rispettivamente nell'anno della dismissione dell'impianto (Blasi, 1998) e a distanza di cinque anni da questo evento (Bramucci, 2003), hanno dimostrato una consistente diminuzione di biodiversità a questo livello, accompagnato da un cambiamento radicale della struttura della comunità bentonica, con diminuzione del numero di specie e degli individui nei gruppi tassonomici più sensibili a bassi tenori di ossigeno, quali Molluschi e Crostacei, ed aumento o persistenza delle componenti della biocenosi più resistenti a condizioni anossiche, quali larve di Chironomidi e Policheti. Questo dato appare come la conseguenza diretta della mancanza di interventi di manutenzione e gestione attiva dell'area, che ha comportato l'accumulo di sedimenti e materia organica nei bacini dell'impianto, innescando processi di eutrofizzazione ed occasionali crisi distrofiche nei mesi più caldi.

Un'altro lavoro ha avuto come oggetto lo studio della struttura genetica del Ciprinide *Aphanius fasciatus* condotto su questa ed altre popolazioni del bacino del mediterraneo, utilizzando la tecnica dell'elettroforesi multilocus dei sistemi genenzima (Luccioli, 2000); le analisi condotte su individui campionati nel 1998, hanno mostrato, per quel che riguarda le Saline di Tarquinia, una popolazione con i più alti

livelli di variabilità genetica, indice di un ambiente sostanzialmente integro, anche se soggetto a forti escursioni stagionali dei parametri chimico-fisici.

Il presente lavoro ha come oggetto lo studio della struttura genetica della popolazione di *Aphanius fasciatus* delle saline di Tarquinia condotto con la tecnica dell'elettroforesi multilocus con un duplice obiettivo.

Il primo obiettivo è stato quello di verificare se il calo di biodiversità, riscontrato a livello di specie della comunità macrozoobenthonica, dovuto alla estremizzazione delle condizioni ambientali, si è registrato anche a livello genetico nella popolazione del ciprinide. A questo scopo la struttura genetica della attuale popolazione di *Aphanius fasciatus* è stata confrontata con quella relativa a campioni risalenti al 1998, prelevati a ridosso della chiusura dell'impianto, provenienti quindi da un ambiente sostanzialmente integro, anche se soggetto a forti escursioni stagionali.

Il secondo obiettivo di questo lavoro era verificare se l'estrema eterogeneità delle tessere ambientali che costituiscono l'habitat delle saline fosse correlato alla struttura genetica del pesce. Infatti, a bacini e vasche originariamente destinati a funzioni diverse corrispondono microhabitat differenti per i valori e gli andamenti dei principali parametri ambientali. 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.

Un'altra possibile risposta adattativa ad un ambiente frammentato ed eterogeneo consiste nel fenomeno dell'habitat choice, per il quale gli individui stessi, in funzione del loro genotipo, possono scegliere attivamente un determinato microhabitat, al quale sono più adattati a priori.

Ci si chiede quindi se, per alcuni dei loci studiati, si possano riscontrare relazioni genotipo-ambiente in termini di differenze nelle frequenze alleliche e/o genotipiche tra gli individui campionati in condizioni ambientali differenti. Per raggiungere questo secondo obiettivo, nel corso dei tre anni di lavoro le campagne di raccolta sono state condotte tenendo conto di tale eterogeneità ambientale, riscontrabile sia dal punto di vista spaziale, dai bacini della zona nord a quelli della zona sud, che dal punto di vista temporale, in una medesima zona con il progredire delle stagioni. Al fine di testare le eventuali correlazioni, durante i campionamenti sono stati raccolti i dati relativi ai principali parametri fisico-chimici che definiscono le peculiarità ambientali del sito di campionamento, quali salinità, ossigeno disciolto, temperatura.

Lo studio si inserisce in una serie di ricerche condotte nell'area delle Saline di Tarquinia, parte delle quali con lo scopo di definire lo stato di conservazione della Riserva in relazione alle attività produttive e di gestione dell'area.

La specie oggetto di studio è un ciprinide tipico degli ambienti salmastri del bacino del Mediterraneo centrale, sostituito alle estremità occidentale ed orientale di tale bacino da specie congeneriche quali *Aphanius iberus*, *Aphanius anatoliae*, *Aphanius dispar* ed altre. A causa della progressiva riduzione delle zone umide *Aphanius fasciatus* è “a rischio di estinzione”, segnalato nell'allegato III della Convenzione di Berna relativa alla conservazione della vita selvatica e dell'ambiente naturale in Europa, e nell'Allegato II della Direttiva 92/43/CEE “FAUNA-FLORA-HABITAT”, che riguarda la conservazione degli habitat naturali, della flora e della fauna selvatica dell'Unione Europea. Si tratta di una specie alolimnobia di origine limnica, euriecia, particolarmente tollerante alle variazioni di salinità e temperatura che si verificano in questi ambienti. *Aphanius fasciatus* si è rivelato particolarmente adatto per entrambi gli scopi, poiché, compiendo l'intero ciclo vitale in ambiente lagunare e vivendo in habitat disgiunti (saline, laghi salmastri, lagune costiere), presenta un basso flusso genico tra le diverse popolazioni; si può quindi ragionevolmente ipotizzare che il pool genico locale sia frutto di processi circoscritti all'ambiente di studio. D'altro canto l'estrema mobilità ed adattabilità di cui è capace

all'interno del proprio habitat le consente una colonizzazione pressoché immediata dei microhabitat che si rendono disponibili.

CAP. 2 – AREA DI STUDIO

2.1 - Caratteristiche generali e chimico-fisiche degli ambienti salmastri

Gli ambienti salmastri sono zone di transizione tra l'ambiente marino e quello delle acque dolci, ovvero una zona di scambio morfologico e dinamico tra questi due ecosistemi; lagune, stagni costieri, estuari, delta dei fiumi, mari diluiti e saline rientrano in questa definizione.

Caratteristica generale degli ambienti salmastri è una certa instabilità dei parametri ambientali; si può fare una distinzione tra i grandi bacini, in cui si fa sentire meno l'effetto dell'instabilità dei parametri chimico-fisici rispetto a bacini più limitati, confinati e poco profondi dove le fluttuazioni di salinità, temperatura, pH, ossigeno, sono più ampie e per di più possono avvenire in un breve arco di tempo come può essere il semplice alternarsi del giorno e della notte, delle stagioni, oppure in rapporto alle maree, alle piogge, all'evaporazione, alle mareggiate o alle piene dei fiumi (Carrada, 1990). A questa seconda categoria, più strettamente legata alla variabilità delle condizioni climatiche, appartengono sicuramente le lagune costiere e le saline.

Tra i parametri chimico-fisici più importanti la salinità ricopre un aspetto fondamentale tanto da rientrare nella definizione stessa d'ambienti salmastri (Cognetti *et al.*, 1999). Basandosi su questo parametro è stata proposta una classificazione delle acque salmastre conosciuta con il nome di "Sistema Venezia", che denomina il tipo d'acqua in rapporto alla quantità di sali presenti.

Tipo di acqua	Salinità
Iperalina	> 40 ‰
Marina	40-30 ‰
Polialina	30-18 ‰
Mesoalina	18-5 ‰
Oligoalina	5-0.5 ‰
Dolce	0.5 ‰

Negli ambienti salmastri le variazioni di temperatura possono avvenire entro limiti assai più ampi rispetto a quelli marini, tanto maggiori quanto minore è la profondità e il ricambio idrico. Ciò comporta uno stress elevato per le specie presenti se non posseggono particolari adattamenti fisiologici. Per la duplice oscillazione di salinità e temperatura, si possono verificare estese morie di alcuni organismi, fenomeno detto di tanatocenosi (Brunelli G., 1934).

Salinità e, soprattutto, temperatura influenzano direttamente un altro parametro-chiave che è la concentrazione dell'ossigeno disciolto, fondamentale per l'ecologia degli ambienti salmastri. L'ossigeno varia anche in risposta all'attività fotosintetica e a quella respiratoria dell'intera comunità.

Sul fondo delle lagune, degli stagni e degli estuari si accumula del sedimento composto principalmente da limo e detrito organico. Alla sostanza organica naturalmente prodotta da questi ambienti, va anche aggiunta quella dovuta all'alta mortalità di queste zone di transizione dove, organismi privi di particolari meccanismi osmoregolativi, trasportati dalle correnti marine o provenienti dalle acque dolci, vengono a trovarsi in condizioni ecologiche totalmente differenti da quelle originali. Si formano così fondali fangosi che non favoriscono un buon ricambio d'acqua, ciò insieme ad un elevato popolamento batterico può determinare condizioni di anaerobiosi a pochi centimetri dalla superficie.

Quando le condizioni si fanno estreme, con elevate temperature, nelle zone più calde può succedere che, a causa dell'eccessivo accumulo di sostanza organica in decomposizione, l'ossigeno disciolto possa diminuire fino a scomparire totalmente prima nei sedimenti, poi nell'intera colonna d'acqua.

Si parla allora di crisi distrofica: la comunità vivente viene letteralmente avvelenata dalla produzione di metano, ammoniaca e idrogeno solforato da parte di batteri anaerobi attivi in tali situazioni. La capacità di resilienza di questi ambienti dopo perturbazioni così forti, è notevole, a condizione che vi sia un adeguato ricambio idrico.

2.2 - Caratteristiche biologiche generali

Gli organismi che colonizzano le acque salmastre devono far fronte alla instabilità dei parametri ambientali, le variazioni di uno di questi parametri può costituire un fattore limitante per la presenza della specie.

Due, infatti, sono gli aspetti peculiari della vita nei bacini costieri, rispetto alle popolazioni delle acque marine e continentali. Il primo è la presenza di un numero ridotto di specie: ciò è spiegato dal fatto che questi ecosistemi sono altamente selettivi, per i ripidi e variabili gradienti ambientali che vi si ritrovano. Le oscillazioni della salinità permettono solo a poche specie eurialine marine o d'acqua dolce, di adattarsi alla vita in ambienti simili, grazie ai meccanismi fisiologici di osmoregolazione che esse possiedono. Le specie che entrano nel bacino devono far fronte anche ai ricorrenti sbalzi di temperatura: si adatteranno solo se euriterme. La presenza di un numero ridotto di specie è spiegata anche dal carattere effimero di questi ambienti che possono formarsi e scomparire in archi temporali relativamente brevi.

Il secondo aspetto è l'elevato numero di individui con cui ogni specie è rappresentata: la selettività del luogo permette alle poche specie presenti di sfruttare al massimo le risorse di tali habitat, perché è minima la competizione; tali specie, inoltre, presentano spesso strategie riproduttive opportunistiche (*r-selezionate*).

In generale le acque salmastre presentano profonde analogie con gli ambienti inquinati essendo, come questi, imprevedibili soprattutto per la loro instabilità chimico-fisica (Cognetti, 1992).

Bacci (1954) ha distinto due categorie di organismi marini: alolimnofili e alolimnobi. I primi si portano in queste acque solo a scopo nutrizionale; i secondi, invece, si riproducono e svolgono interamente il loro ciclo vitale nelle acque salmastre. Tra le specie alolimnofile frequenti in acque salmastre abbiamo le muggini (*Liza*

saliens), le spigole (*Dicentrarchus labrax*), le orate (*Sparus aurata*), esse però devono tornare in mare per la riproduzione. Gli avannotti di queste specie invece migrano verso le foci seguendo la diminuzione del gradiente di salinità, entrano quindi nell'ambiente salmastro, dove si accrescono fino alla maturità sessuale. Attraversano le acque salmastre anche quei pesci che compiono migrazioni riproduttive; catadrome come le anguille (*Anguilla anguilla*) o anadrome come storioni (*Acipenser sturio*) o salmoni (*Salmo salar*).

Gli alolimnobi sia animali sia vegetali appartengono ai più diversi gruppi e sono in prevalenza di origine marina. I vari ambienti salmastri di una stessa regione geografica hanno in comune la maggior parte delle specie alolimnobie più resistenti, mentre notevoli sono le differenze tra un biotopo ed un altro per quanto riguarda la colonizzazione di alolimnobi con un medio grado di adattabilità.

Tra le alghe benttoniche marine che tollerano bassi valori di salinità ci sono varie specie appartenenti ai generi *Enteromorpha*, *Cladophora*, *Ulva*. Tra le specie animali di origine marina troviamo: il briozoo *Victorella pavida*, il lamellibranco *Abra ovata*, il gasteropode *Hydrobia ulvae*, i policheti *Nereis diversicolor* e *Mercierella enigmatica*.

Il ciprinodontide *Aphanius fasciatus*, è invece una delle specie alolimnobie di origine limnica tipica di acque salmastre.

2.3 – Le Saline

Le saline sono ambienti iperalini artificiali creati cioè, almeno in parte, dall'uomo (Iberite, 1992). Sono impianti industriali per la produzione di sale, suddivisi in gruppi di vasche che variano nel loro numero e nella loro grandezza, da una salina all'altra, anche se la struttura dell'impianto non si modifica profondamente.

Per quanto riguarda gli aspetti ecologici, la vita nel comparto acquatico è legata alle caratteristiche peculiari di tali ambienti. L'iperalinità è sicuramente un fattore fondamentale: l'afflusso di acqua dolce non compensa mai l'evaporazione che, nei mesi estivi è elevatissima. L'acqua, inoltre, non raggiunge mai grandi profondità, i bacini sono chiusi e la loro superficie è modesta, rendendo le saline ambienti fortemente confinati e perciò caratterizzati da un basso idrodinamismo accentuato da

uno scarso ricambio idrico che diventa quasi nullo nelle saline ormai chiuse, in cui non c'è una gestione attiva che permetta il controllo costante dell'immissione di acqua nei bacini. Tutto ciò le rende particolarmente sensibili alle variazioni climatiche locali e ai loro effetti.

A dispetto di queste loro peculiari caratteristiche, le saline, lungi dall'essere prive di vita, ospitano sia produttori primari che consumatori primari e secondari; tuttavia l'ecosistema risulta semplificato poiché il numero delle specie presenti ad ogni livello trofico è assai basso; in pratica, con l'aumentare della salinità, la diversità in specie diminuisce (Iberite, 1992), poiché sempre meno specie possono adattarsi a condizioni via via più estreme.

Per i motivi sopra esposti, le saline sono parte integrante degli ecosistemi classificati come ambienti estremi (Picard, 1985; Brock, 1979) ossia, ambienti condizionati dalle scarse o eccessive variazioni climatiche e edafiche, in cui sicuramente la salinità tanto elevata è un fattore determinante nella costituzione delle comunità presenti. Possiamo affermare che specie eurialine ed euriterme comuni di ambienti lagunari, possono colonizzare anche questi ambienti: così come loro sanno adattarsi a basse salinità, sapranno anche vivere in condizioni estreme opposte grazie alle loro naturali capacità d'osmoregolazione. Come nelle lagune, il reclutamento delle specie è assicurato dall'apporto di acqua marina che periodicamente viene fatta entrare nelle vasche.

Cognetti (1999) sostiene che si tratta di ambienti che possiamo definire marginali sia in senso fisico che ecologico perché sono ecologicamente transitori e presentano delle condizioni tali che non consentono, se non a pochissime specie, la colonizzazione; tra queste dominano anellidi policheti, crostacei, molluschi, alcuni pesci mentre echinodermi, idroidi e spugne sono solitamente assenti. Specie tipiche delle saline e di ambienti soprassalati sono il fillopode *Artemia salina* e il fitoflagellato *Dunaliella salina* (Cognetti et al., 1999).

Gli studi scientifici condotti in ecosistemi costieri iperalini non sono comunque molti e le conoscenze sono ancora assai scarse.

2.4 – Le Saline di Tarquinia

Le Saline di Tarquinia sono di proprietà del Ministero delle Finanze che ha gestito la produzione di sale fino al mese di luglio 1997, tramite l'amministrazione dei Monopoli di Stato.

Si trovano sul litorale laziale e fanno parte del territorio del Comune di Tarquinia (rif. Cartografico: tavoletta I.G.M. 1:25000, foglio 142 I SO, Marina di Tarquinia); sono precisamente ubicate tra la foce del fiume Marta a NW e la foce del fiume Mignone a SE. Si estendono su un'ampia superficie pianeggiante costiera per circa 193 ha, di cui 90 ha circa sono occupati dall'impianto di produzione del sale.

Tra le saline e il mare, s'interpongono la spiaggia antistante quindi una zona a dune sabbiose: queste ultime, soprattutto nel periodo 1941-1979, hanno subito una notevole riduzione in larghezza a causa dell'erosione costiera, che anche oggi minaccia nuovamente e pesantemente l'area. Il perimetro interno delle saline è percorso da un canale, il "Canale circondario", che le separa dai terreni confinanti.

La comunicazione col mare è assicurata da due foci: la Foce di Ponente, da cui entra l'acqua marina e la Foce di Levante da cui solitamente escono le acque. Quando l'impianto era in funzione, l'acqua entrava dalla Foce di Ponente sfruttando il flusso di marea, attraverso una paratoia azionata manualmente; la paratoia ormai non è più in uso da anni, ed è stata dapprima affiancata, poi sostituita da una pompa centrifuga a motore elettrico. Da qui le acque seguivano un lungo e complesso percorso attraverso le circa cento vasche della salina, tutte a pianta pressappoco rettangolare. Le vasche sono di modesta profondità e vanno progressivamente riducendosi sia in superficie sia in profondità, passando da quelle evaporanti a quelle di cristallizzazione (Stazi, 1978).

Le vasche delle saline sono suddivise in dieci gruppi: le prime sono dette di Sterro, quindi ci sono le Piscine, la Riserva grande, la Vasca passoni, i Giochi di mare, le Partite alte e le Riserve, infine la I, II, e III Sezione (Figura 1). Dei terrapieni separavano le vasche non permettendo il passaggio diretto dell'acqua da una vasca all'altra, ciò invece avveniva attraverso un sistema di chiuse e canali che circondano ancora i bacini. Le vasche di cristallizzazione avevano oltre i normali terrapieni ulteriori argini in legno per ottimizzare l'impermeabilizzazione.

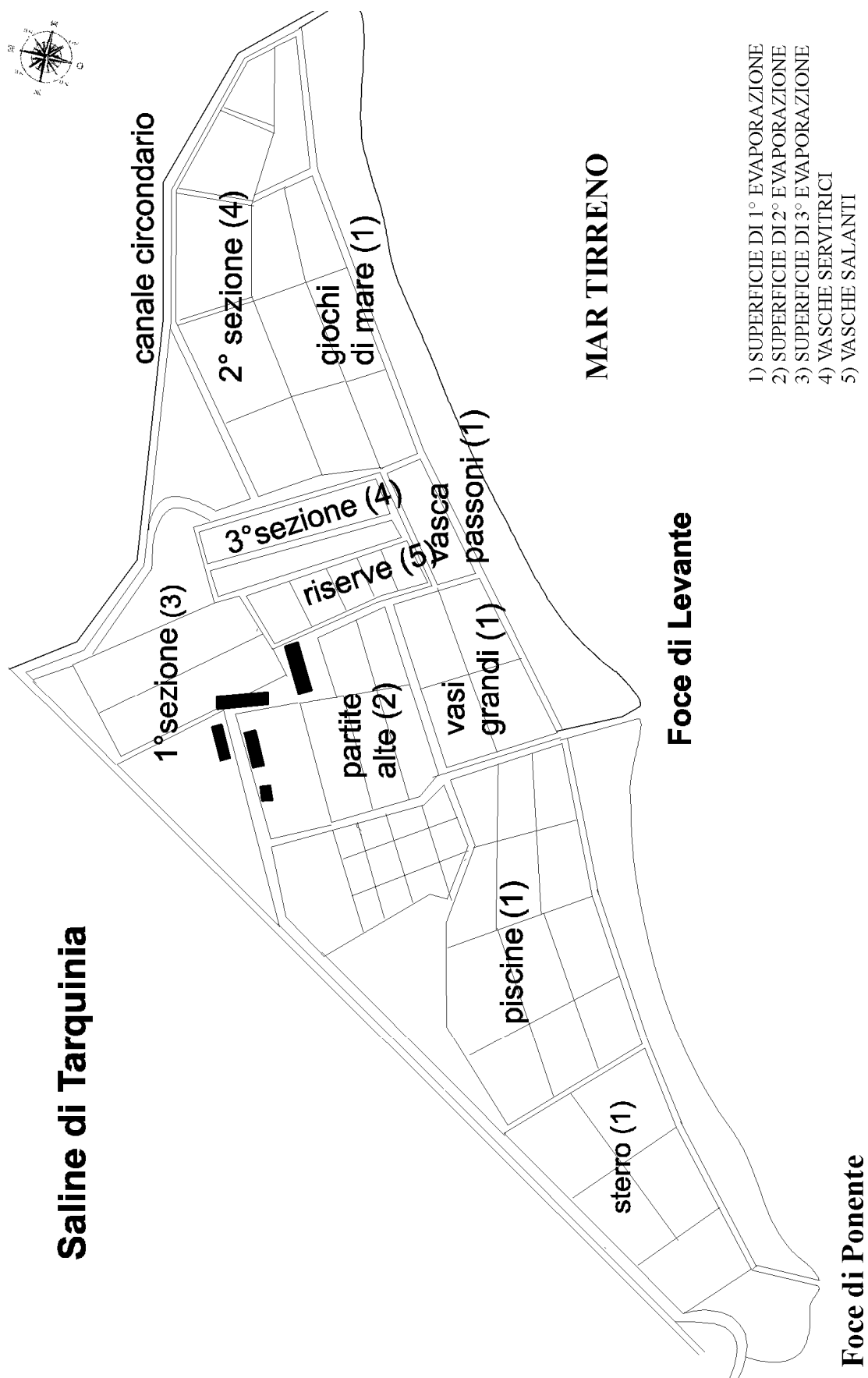


Figura 1. Pianta delle Saline di Tarquinia: funzione dei bacini

Le Saline di Tarquinia rappresentano un patrimonio di straordinario interesse naturalistico ed è per questo motivo che il 25 gennaio 1980, con decreto del Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste e del Ministero delle Finanze, è stata costituita la Riserva Naturale di Popolamento Animale "Salina di Tarquinia".

Con l'istituzione della Riserva viene sancita l'importanza naturalistica di questo biotopo che presenta caratteristiche ambientali particolarmente adatte per la sosta e la nidificazione di numerosi uccelli migratori e, in particolare, di trampolieri, sempre più rari per la riduzione del loro habitat. Fu inoltre appurato che l'attività di produzione del sale non contrastava con le esigenze di tutela dell'avifauna e del relativo habitat.

Allavena e Zapparoli (1992) affermano che dal punto di vista naturalistico quello della Salina di Tarquinia, come del resto tutti gli ambienti seminaturali salmastri costieri, è un ambiente assai fragile e il mantenimento del suo valore è legato a una gestione attiva che garantisca la conservazione di alcuni parametri ambientali fondamentali. Caratteristiche di quest'ambiente sono un'elevatissima evaporazione ed un notevole grado di riscaldamento dell'acqua nei mesi estivi. Per questo la conservazione dell'area è vincolata da un mantenimento del flusso d'acqua attraverso le vasche, da una rimozione periodica del fango che ne ricopre il fondale, nonché da interventi di ripristino degli argini.

Lo stato attuale di conservazione dell'impianto è critico: le strutture industriali mostrano gli inequivocabili segni della fatiscenza dovuta alla mancanza del lavoro specifico per cui erano state create (Rossi, 1996), ed i bacini soffrono per l'assenza di regolari interventi di manutenzione. Di riflesso, una delle principali minacce per la porzione umida del sistema è la sedimentazione nelle vasche e nei canali della salina, che può portare, nel lungo periodo, all'interramento graduale dell'intero impianto. Molti bacini hanno infatti il fondo ricoperto da uno spesso strato di fango che rende possibile l'ingresso nelle vasche solo per pochissimi metri: ciò è conseguenza sia dell'alluvione del 1987, che ha portato alla deposizione di un'ingente quantità di fango mai rimosso, sia della forte sedimentazione accentuata dallo scarso ricambio idrico. Alcune vasche tra quelle situate nella zona più interna della salina, rispetto alla linea di costa, dove avveniva la deposizione del cloruro di sodio, sono oggi del tutto o parzialmente interrate; quindi sono poco più di 50 le vasche in cui attualmente permane una costante circolazione delle acque.

Per quanto riguarda le altre strutture dell'impianto, gli argini della maggior parte delle vasche sono danneggiati; alcuni dei terrapieni che separano i bacini sono stati erosi dalle acque riversandosi nei bacini stessi, ed i canali per la circolazione delle acque sono talvolta inutilizzabili per l'elevata quantità di materiale organico e inorganico sedimentato e per la presenza di rifiuti vari.

L'assenza di manutenzione ordinaria, che comprendeva anche l'asporto del sedimento in eccesso da vasche e canali, ha quindi permesso l'accumulo di questo e la crescita eccessiva di varie specie vegetali, sia sui terrapieni sia nei bacini e canali della riserva; questi eventi, insieme al trasporto eolico e al tutt'altro che trascurabile contributo di nutrienti e materiale organico da parte delle specie avicole, vanno ad aumentare il carico organico nell'ambiente acquatico, già di per sé a forte sedimentazione, e caratterizzato da un fragile equilibrio ecologico strettamente legato alle attività umane.

Come conseguenza nelle vasche si osservano in questi anni frequenti fioriture algali, indice di un processo di eutrofizzazione in corso cui possono far seguito pericolose crisi distrofiche soprattutto nei mesi più caldi. In alcune zone inoltre, si assiste ormai a fenomeni di impaludamento dei bacini, con la formazione di nuove aree emerse dove avanza la vegetazione pioniera.



Figura 2. Sterro: veduta di alcune vasche; sulla destra si può vedere un terrapieno crollato.



Figura 3. Giochi di mare: fenomeni di eutrofizzazione; estesa crescita algale.

Grazie agli studi condotti tra il 1997 e il 2002, è possibile oggi, avere informazioni sul popolamento all'interno delle vasche, di specie acquatiche e in particolare sulla comunità macrozoobenthonica di fondo molle. Tra gli invertebrati benthonic di fondo molle sono state ritrovate (Blasi, 1998; Serrano, 1998; Meschini, 1998; Bramucci, 2002) specie caratteristiche di ambienti salmastri o comunque segnalate in tali biotopi, appartenenti ai seguenti gruppi tassonomici: Molluschi

(Bivalvi e Gasteropodi), Policheti e Oligocheti, Crostacei (anfipodi e Isopodi) ed Insetti (larve di Chironomidi).

Come già accennato, gli studi più recenti condotti sulla comunità macrozoobenthonica hanno evidenziato una consistente perdita di biodiversità per quanto riguarda le specie di questo comparto. Dalla dismissione dell'impianto la comunità bentonica appare sensibilmente cambiata: dal punto di vista qualitativo, si è assistito alla scomparsa totale di alcune specie, senza che queste siano state sostituite da nuove; dal punto di vista quantitativo si è osservato l'aumento delle dimensioni delle popolazioni delle specie più tolleranti a condizioni anossiche (larve di chironomidi), la persistenza di policheti bioindicatori di condizioni eutrofiche (*Capitella capitata*, *Spio decoratus*), a fronte di una generale tendenza all'assottigliamento delle dimensioni della maggior parte delle altre popolazioni (Bramucci, 2002).

CAP. 3 - BIOLOGIA E SISTEMATICA DI *Aphanius fasciatus*

3.1-Tassonomia e nomenclatura

Aphanius fasciatus è un ciprinide tipico degli ambienti di transizione del bacino del Mediterraneo centrale, come canali salmastri e acque lagunari, ma si rinviene talvolta anche nelle acque interne. In Italia questo ciprinodonte è noto anche come “nono”, “voltacchio”, “vetriolo”, “conch’e mallu”.

Classe: Osteitti

Superordine: Teleostei

Ordine: Cyprinodontiformes

Sottordine: Cyprinodontoidei

Famiglia: Cyprinodontidae

Genere: *Aphanius*

Nome specifico

Aphanius fasciatus (Nardo, 1827)

Sinonimi:

Cyprinoides nanus e *C. nanofasciatus* (Nardo, 1827)

Lebias calaritana (Canestrini, 1866)

Cyprinodon calaritanus (Griffini, 1903)

Lebia calaritanus (Binagli, 1929)

Cyprinodon marmoratus (Gridelli, 1936)

3.2-Morfologia

Aphanius fasciatus è un pesce di piccole dimensioni con corpo moderatamente slanciato, lievemente appiattito sui lati; la lunghezza massima delle femmine può superare di poco i 7 cm, mentre nei maschi è sempre inferiore, circa 4-5 cm. Il capo rappresenta circa il 21% dell'intero animale e risulta poco allungato, mentre appare notevole la grandezza degli occhi e la mandibola leggermente sporgente sulla mascella (Cottiglia, 1980). I premaxillari sono protrattili. La mascella inferiore è leggermente prominente rispetto a quella superiore. La bocca è supera ed è fornita di piccoli denti tricuspidali. Il peduncolo caudale è alto e corto, la pinna caudale è caratterizzata da un margine lievemente arrotondato con orlo convesso. Le pinne dorsale e anale sono piuttosto alte e arretrate, le pinne pettorali sono poco sviluppate e inserite piuttosto in basso, mentre le pinne ventrali sono piccole e arretrate.

La specie è caratterizzata da un notevole dimorfismo sessuale nella colorazione (Fig. 4), il maschio ha una sagoma leggermente più slanciata ed un capo più tozzo della femmina (Cottiglia, 1980). I maschi hanno il dorso blu-verde oliva, ventre bianco e fianchi con 7-15 bande verticali del colore del dorso che spiccano su una colorazione di fondo bianco-argentea. Le pinne sono giallastre con orlo nero nel margine anteriore e superiore della pinna dorsale, mentre la pinna caudale presenta una sola banda scura nel margine posteriore. La colorazione diviene più intensa durante il periodo riproduttivo. Le femmine presentano una colorazione più tenue, grigio-verde, il dorso è più chiaro e un numero variabile di bande sui fianchi più sottili e meno definite rispetto ai maschi.

All'interno della stessa specie sono state evidenziate notevoli differenze morfologiche e morfometriche fra le popolazioni dell'Adriatico e quelle della Sicilia (Tigano e Ferrito, 1983) e differenze genetiche fra le popolazioni dell'Adriatico, del Tirreno, della Sicilia e della Sardegna (Cimmaruta *et al.*, 2003).



Figura 4. Morfologia di *A. fasciatus*

3.3-Distribuzione e habitat

La distribuzione di *Aphanius fasciatus* interessa le coste del Mediterraneo ad eccezione delle zone più occidentali ed orientali. Nel Mediterraneo è possibile rinvenire altre specie congeneri di *Aphanius*, quali *A. iberus* e *A. dispar*. *A. iberus* occupa la parte più occidentale del bacino mediterraneo (Spagna e Algeria), mentre *A. dispar* è una specie localizzata nella parte più orientale del bacino, presso il canale di Suez, e deve la propria diffusione nel Mediterraneo all'apertura del canale stesso. *A. fasciatus* è la specie maggiormente diffusa e l'unica ad invadere le coste italiane (Cottiglia, 1980). In Italia la specie è presente nelle zone lagunari ed in maniera discontinua lungo tutte le coste della penisola, Sicilia e Sardegna; la specie può essere localmente molto abbondante.

L'origine della specie è limnica, ma la specie è alolimnobia cioè si riproduce e svolge interamente il proprio ciclo vitale nelle acque salmastre (Bacci, 1954).

L'habitat di *Aphanius* è costituito in prevalenza da vaste lagune di acqua salmastra, da stagni salati, da canali che si mescolano con l'acqua di mare e persino da

pozze povere di ossigeno che costeggiano gli argini, soggette a rapida evaporazione e quindi a brusche variazioni di salinità (Cavicchioli, 1962).

Pur essendo il ciprinodonte tipico di ambienti di acqua salmastra, è stato osservato anche in acque dolci, in Sicilia e Sardegna ad una certa distanza dal mare (Cottiglia, 1965; Tigano, 1982). La sua presenza è stata segnalata occasionalmente anche in mare aperto, ciò è probabilmente imputabile ad eventi imprevedibili come inondazioni e piogge eccezionali che producono flussi individuali di *Aphanius fasciatus* dalle acque salmastre al mare aperto (Torchio, 1967).

3.4-Ecologia e alimentazione

A. fasciatus è una specie gregaria che vive in acque con bassa profondità, con correnti molto deboli o inesistenti, si localizza nei canali ricchi di vegetazione, ai margini delle lagune, alle foci dei fiumi e nelle pozze che si originano durante la bassa marea nelle aree lagunari. Preferisce vivere sottomarino e durante le ore più luminose cerca riparo fra zone ombrose e ammassi algali (Cottiglia, 1980).

Questa specie riesce a vivere in acque soggette a forti escursioni di salinità, di temperatura e di concentrazione di ossigeno disciolto (Cottiglia, 1980), riesce a sopravvivere persino in acque caratterizzate da concentrazioni saline superiori a quattro volte quelle delle acque marine (Bianco, 1988).

Alte temperature ma soprattutto salinità elevate hanno effetti sulla fecondità, riducendola e inibendo la maturazione delle uova; in queste condizioni si verifica l'interruzione dei processi riproduttivi e si ha nelle femmine il riassorbimento delle uova ed il successivo utilizzo di questa risorsa per la propria crescita e per la regolazione osmotica (Leonardos e Sinis, 1998).

Nelle popolazioni di *A. fasciatus* esiste una netta dominanza delle femmine rispetto ai maschi, anche se prendendo una coorte subito dopo la schiusa delle uova, la proporzione fra femmine e maschi è di 1:1. Tale rapporto si mantiene inalterato fino al periodo riproduttivo, quando la colorazione dei maschi diviene più intensa e ciò li rende più facilmente visibili e di conseguenza predabili (Leonardos e Sinis, 1999).

L'alimentazione è piuttosto varia andando dal meiobenthos al ticoplancton (Cottiglia, 1980); l'*Aphanius fasciatus* si nutre inoltre di alghe, tenere parti della vegetazione e detriti.

Il ciprinodonte subisce la predazione da parte di anguille, spigole e grandi Gobidi (Cottiglia, 1980), ma anche da parte di una fauna ornitica composta da specie stanziali e stagionali.

3.5-Biologia riproduttiva

La specie *Aphanius fasciatus* è gonocorica a fecondazione esterna. Osservazioni sul comportamento riproduttivo (Marconato, 1982) hanno dimostrato che i maschi entrano in forte competizione per fecondare le uova delle femmine. Il maschio reagisce allo stimolo visivo della femmina matura; durante il corteggiamento la separa dal gruppo ed una volta deposte le uova avviene la fecondazione. Le uova, di volume cospicuo (circa 2.5 mm di diametro), vengono deposte e fecondate nel periodo primaverile. Queste, data la notevole densità, tendono a calare sul fondo e possono ancorarsi qui per mezzo di filamenti propri, (Cottiglia, 1980), oppure su praterie di alghe o fra foglie di piante acquatiche (Cavicchioli, 1962). Le uova si sviluppano nell'arco di circa due settimane (Cottiglia, 1980); alla nascita gli avannotti misurano 4-4.5 mm e già entro il primo anno di vita comincia ad evidenziarsi il dimorfismo sessuale con il conseguente raggiungimento della maturità sessuale (Mazza, 1901). La precoce maturazione sessuale è una strategia riproduttiva spesso adottata dalle specie che vivono in habitat instabili, infatti alcuni individui nati all'inizio del periodo riproduttivo riescono a raggiungere la maturità sessuale e a riprodursi entro la fine della stagione (Leonardos e Sinis, 1998).

3.6-Interesse antropico e status della specie

In Italia *Aphanius fasciatus* è piuttosto diffuso nelle acque salmastre, sebbene il disturbo antropico subito recentemente da questi ambienti abbia provocato un generale declino di questa specie. Per questo motivo *A. fasciatus* è stato dichiarato “a rischio di estinzione”, è segnalato nell'allegato III della Convenzione di Berna, relativa alla

conservazione della vita selvatica e dell'ambiente naturale in Europa, e nell'Allegato II della Direttiva 92/43/CEE "HABITAT", che riguarda la conservazione degli habitat naturali, della flora e della fauna selvatica dell'Unione Europea.

Negli ambienti acquatici meno salati è entrato in competizione con *Gambusia affinis*, specie introdotta in molti paesi europei agli inizi del 1900 per il controllo della malaria, risultando almeno parzialmente sostituito da questa (Gandolfi, 1973).

Secondo alcuni autori le carni di *A. fasciatus* conterrebbero una ittiotossina per piccoli mammiferi, ma, per quanto non diffusamente, la specie viene mangiata dall'uomo (es. Isola di S. Pietro, Cagliari) senza che ne derivi danno (Cottiglia, 1980). Talvolta viene utilizzato come pesce d'acquario.

CAP. 4 – EROSIONE GENETICA

Numerosi studi testimoniano ormai le conseguenze negative di un impoverimento genetico sulla fitness e sulle capacità di adattamento e sopravvivenza delle popolazioni naturali (Schonewald-Cox *et al.*, 1993; Avise, 1994; O'Brien, 1994a; 1994b; Avise ed Hamrick, 1996), e le politiche di conservazione non possono più prescindere dalla salvaguardia o dal ripristino delle risorse genetiche e della biodiversità a questo livello.

In primo luogo la diversità genetica rappresenta il potenziale necessario affinché le popolazioni possano evolvere per adattarsi alla variabilità delle condizioni ambientali, come nel caso del melanismo industriale in più di duecento specie di falene (Kettlewell, 1973; Majerus 1998) o la resistenza ai pesticidi sviluppata da molte specie infestanti (Georghiou, 1986; McKenzie 1996); in alcuni casi, come in *Leuciscus cephalus*, si è addirittura riscontrata una tolleranza maggiore agli inquinanti da parte degli individui più eterozigoti (Larno *et al.* 2001).

In secondo luogo la diminuzione di variabilità a questo livello è spesso causa di riduzione della fitness riproduttiva e di depressione da inbreeding; i risultati di una meta-analisi indicano che c'è una correlazione significativa pressoché totale tra l'eterozigosi media delle popolazioni e la loro fitness riproduttiva (Reed & Frankham, 2003).

La variabilità genetica ha quindi sia un valore a lungo termine (come potenziale adattativo ed evolutivo delle popolazioni), che a breve termine (per il mantenimento della fitness riproduttiva). Per tali motivi la diversità genetica è riconosciuta dall'*IUCN* (World Conservation Union) come una delle tre forme di biodiversità da preservare (McNeely *et al.* 1990).

Lo sviluppo dei metodi di analisi a livello biochimico e molecolare, a partire dagli anni sessanta, ha reso possibile lo studio della variabilità genetica nelle popolazioni naturali, e sono ormai innumerevoli i lavori che testimoniano casi di erosione genetica nelle popolazioni, riconducibili per lo più a fattori di impatto antropico.

Un esempio classico riguardante una specie ittica, è quello relativo ad *Hoplostetetus atlanticus* (Smith *et al.*, 1991). Questa specie è stata sottoposta ad intensa pesca solo di recente, per cui è stato possibile analizzare in dettaglio la perdita di variabilità mentre questa si realizzava. Come altri teleostei questa specie mostra una relazione diretta tra eterozigosi e taglia degli individui, cosicché il tipo di pesca praticata, orientata alla cattura degli individui di maggiore dimensione, tende a rimuovere dalla popolazione gli individui con genotipo più eterozigote, magnificando gli effetti negativi del sovrasfruttamento sulle risorse genetiche. Come dimostrano altri lavori (Crutcher e Carr, 1996; Jones *et al.*, 1996), compresi quelli condotti su materiale antico (Nielsen *et al.*, 1997), questa tendenza all'impoverimento delle risorse genetiche per le specie ittiche sfruttate commercialmente può considerarsi un dato pressoché costante.

Indipendentemente dalle cause, l'instabilità demografica può considerarsi alla base di tale fenomeno (Chikhi *et al.*, 1998), per cui anche variazioni ambientali repentine che mettano in difficoltà le capacità di sopravvivenza delle popolazioni, connesse o meno alle attività umane, possono innescare questo processo. Ad Oretello, ad esempio, i bassi valori di variabilità riscontrati proprio in *Aphanius fasciatus*, sono imputabili alle varie crisi anossiche registrate negli anni in laguna, legate all'inquinamento, all'eccessivo apporto di nutrienti ed ai fenomeni di eutrofizzazione che ne conseguono (Cimmaruta *et al.*, 2003). Vista la stretta relazione tra le condizioni ambientali, stabilità demografica della popolazione e mantenimento della variabilità genetica, ultimamente la struttura genetica delle popolazioni ed i livelli di variabilità, sono considerati degli efficaci bio-marker per monitorare le condizioni ecologiche degli ambienti acquatici, abbastanza sensibili per monitorare cambiamenti prima che si rischi la perdita di specie (Foré *et al.*, 1995).

Anche *Aphanius fasciatus*, in considerazione del fatto che rappresenta spesso l'unica specie ittica interamente legata a questi ambienti per svolgere il suo ciclo biologico, può essere potenzialmente considerata una specie target per il biomonitoraggio delle acque salmastre (Maltagliati, 2002).

CAP 5 – LO STUDIO DELLE RELAZIONI GENOTIPO-AMBIENTE

5.1-La genetica ecologica

La genetica ecologica è lo studio dei processi evolutivi, specialmente l'adattamento, attraverso la selezione naturale, in un contesto ecologico. Laddove la genetica di popolazione tende a fare leva su modelli matematici fondati sugli assiomi mendeliani, spesso la genetica ecologica si trova a dover rilevare lo scontro tra teorie matematiche e osservazioni empiriche fatte sul campo o in laboratorio.

Si può affermare che l'obiettivo delle ricerche in genetica ecologica è quello di spiegare l'origine della variabilità che si riscontra a livello genetico all'interno delle popolazioni e tra i diversi gruppi sistematici, cercando di assegnare il giusto peso ad ognuna delle quattro forze evolutive. A dispetto delle teorie neutraliste che considerano le mutazioni e i movimenti genetici casuali le cause principali dei cambiamenti evolutivi, oggi la maggior parte dei genetici ecologici tendono a considerare la selezione naturale come, se non l'unica, la più importante tra le quattro forze evolutive.

A livello teorico 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.

5.2-Relazioni genotipo-ambiente in ambiente marino

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 e Schulte, 1998; Ropson *et al.*, 1990), *Mytilus edulis* (Koehn *et al.*, 1980; Hilbish e 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.

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 e 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 e 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. hanno ipotizzato che la temperatura svolga una pressione selettiva sulla capacità di sopravvivenza di questi organismi così come in altre specie sessili (Bertness e 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.

5.3-Relazioni genotipo ambiente in ambienti salmastri

Lo studio di ambienti eterogenei, instabili, con caratteristiche stressanti può fornire un notevole contributo per la comprensione dei meccanismi biologici coinvolti nelle complesse relazioni genotipo-ambiente. Per ambienti sottoposti a stress si

intendono tutti quegli ambienti che subiscono gli effetti di frequenti e brusche variazioni dei parametri chimico-fisici quali temperatura, salinità e concentrazione di ossigeno.

Le lagune salmastre, così come le saline, costituiscono senz'altro un ambiente con caratteristiche più eterogenee e stressanti per gli organismi marini rispetto al mare aperto. L'ambiente può agire sulle popolazioni naturali con diverse modalità: i) in maniera casuale, riducendo la dimensione delle popolazioni e, di conseguenza, determinando una diminuzione dei livelli di variabilità genetica (erosione genetica); ii) in maniera selettiva, attraverso un tasso di mortalità differenziale tra i vari genotipi, modificando quindi le frequenze genotipiche nella popolazione coinvolta; iii) favorendo strategie riproduttive alternative (ermafroditismo, partenogenesi).

La spigola (*Dicentrarchus labrax*) rappresenta un buon modello biologico per indagare la relazione tra struttura genetica e selezione. La spigola è un pesce demersale euritermo ed eurialino, capace di colonizzare e sopravvivere sia in mare aperto che in laguna (Barnabé, 1980). Lavori recenti hanno dimostrato che l'acclimatazione all'acqua dolce nella spigola è associata ad un cambiamento nelle frequenze di alcuni allozimi (Allegrucci *et al.*, 1994, 1997) e di alcuni RAPD (Allegrucci *et al.*, 1995). Lemaire *et al.* (2000) hanno condotto un'analisi comparativa fra i dati allozimici e microsatelliti sullo stesso campione del Mediterraneo, ottenendo pattern di variazione differenti per i due marcatori: gli allozimi presentano una struttura genetica correlata con la tipologia dell'habitat, cioè i campioni si differenziano in base all'ecologia dell'ambiente, marino o lagunare, mentre i microsatelliti sembrano strutturati in funzione di una distribuzione geografica, indipendentemente dal tipo di ambiente. Questi risultati confermano l'ipotesi che in *D. labrax* alcuni loci allozimici siano sottoposti ad una pressione selettiva che ne favorisce l'adattamento. Per questo organismo gli Autori propongono una possibile azione della selezione sul ciclo vitale: la spigola può disperdersi sia nei primi anni di vita che da adulta e si pensa che l'accoppiamento e la fecondazione avvengano solo nel mare aperto. Quando i giovani adulti lasciano la laguna per accoppiarsi nel mare il loro pool di gameti può integrarsi con quello degli individui che hanno trascorso la vita in mare e ciò comporta l'omogeneizzazione delle frequenze genetiche. Nuove larve vengono così prodotte e le giovani spigole che entrano nelle lagune subiscono nuovamente l'effetto della

selezione in questo ambiente caratterizzato da numerose fluttuazioni di salinità, di temperatura e di concentrazione di ossigeno.

5.4-Habitat choice

Si definisce habitat choice quel fenomeno ecologico che si verifica quando in un contesto ambientale particolarmente eterogeneo si assiste ad una distribuzione non casuale dei genotipi nei diversi microhabitat presenti all'interno del quadro ambientale. Alcuni autori fanno rientrare l'habitat choice nella selezione disruptiva (Bullini, 1998), e considerano il mantenimento del polimorfismo su questa base, come la prima fase dei processi di speciazione simpatica (Maynard Smith, 1966).

L'associazione tra polimorfismo genetico e scelta dell'habitat è stata più volte predetta e ipotizzata, in particolare per gli ambienti eterogenei a livello spaziale, quali ad esempio quello occupato dalla lumaca di mare *Tegula funebris*. Questa specie vive nella zona intertidale, caratterizzata da improvvise e marcate fluttuazioni ambientali, tipiche di un ambiente che risente enormemente dei moti marini.

Byers (1983) ha condotto uno studio su individui di *Tegula funebris* in due località della costa Pacifica del Nord America: Cape Arago, nell'Oregon, e Mukkaw Bay, a Washington. Per ogni sito sono stati campionati, marcati e analizzati un uguale numero di individui. Per evidenziare le preferenze di habitat delle singole lumache è stata considerata la disposizione da loro assunta nelle pozze permanenti d'acqua, misurata come altezza media rispetto al livello dell'acqua contenuta all'interno di pozze. Le dimensioni della lumaca, il sesso, ed il genotipo nei due loci più polimorfici, (*Lap* e *Gpi*) sono stati messi in correlazione con la scelta dell'habitat.

A Cape Arago si è evidenziata una correlazione fra altezza intertidale media, dimensione della lumaca e la presenza di un allele al locus *Lap*; mentre a Mukkaw Bay la correlazione interessava altezza media, dimensioni, e presenza di un allele al locus *Gpi*. L'associazione statisticamente significativa tra i genotipi ai due loci polimorfici e le misure sulla preferenza dell'habitat in *Tegula funebris* permettono di avvalorare l'ipotesi che una parte della variazione genetica a questi loci, o ad altri strettamente associati, sia correlata alla fitness negli ambienti intertidali eterogenei.

La variazione genetica al locus *Gpi* ed il probabile comportamento ad essa correlato sembrerebbero in relazione con un adattamento termico. La distribuzione delle popolazioni di *T. funebris* nella zona intertidale, infatti, è influenzata dal gradiente di temperatura (Byers, 1980). Nei giorni assolati e caldi le lumache si muovono verso il basso della zona intertidale e restringono il loro range di distribuzione in altezza rispetto ai giorni più freddi e con cielo coperto. Poiché sia il gradiente termico che i genotipi della *Gpi* risultano associati con la distribuzione delle lumache lungo la colonna intertidale, viene postulato un possibile effetto della *Gpi* sulla fisiologia di *T. funebris*.

Un ulteriore studio sul gasteropode *Bythinella* (Szarowska *et al.*, 1998) ha evidenziato l'esistenza di una possibile correlazione fra il locus *Gpi* e l'adattamento degli organismi all'ambiente. Durante il periodo estivo fra il 1994 e il 1995, 60 esemplari di *Bythinella* sono stati campionati in ognuna delle 20 località dell'Europa centrale. Una parte di questi è stata utilizzata per ricavare un coefficiente multivariato di variabilità considerando i caratteri morfologici degli individui, mentre la parte restante è stata sottoposta ad elettroforesi multilocus per una caratterizzazione di tipo genetico.

La *Gpi* è risultata polimorfica in 13 delle 20 popolazioni. Inoltre è apparso evidente che in condizioni sfavorevoli, causate da stress ambientali come temperature più elevate e ridotta concentrazione di ossigeno o salinità elevata, esista una correlazione diretta fra frequenze alleliche nella *Gpi* e scelta dell'habitat.

CAP. 6 - MATERIALI E METODI

6.1 – Materiali

Un totale di 1047 individui di *Aphanius fasciatus* sono stati campionati presso le saline di Tarquinia nei tre anni di lavoro di questa tesi, 2003 – 2005. Il campionamento è stato eseguito sui luoghi naturali mediante l'utilizzo di una rete da pesca (trattina) e di due trappole non innescate (nasse) con maglie delle dimensioni di 5x5 mm.

Dopo la cattura dal loro ambiente naturale, gli individui sono stati posti in borse refrigerate e trasportati in laboratorio dove sono stati posti singolarmente in provette di tipo Eppendorf numerate e conservate ad una temperatura di circa – 80°C. Per i campioni catturati nel 2004 e nel 2005 sono stati rilevati sesso e dimensione maggiore dell'animale (Appendice B). Di questi campioni sono stati analizzati loci attivi nell'occhio e nel muscolo scheletrico.

Per verificare l'ipotizzato calo di biodiversità a livello genetico, la variabilità genetica di un campione di 342 individui campionati nel corso del 2003 è stata confrontata con quella di 102 individui campionati tra il 1995 ed il 1998. Mediante elettroforesi multilocus sono stati analizzati 24 loci corrispondenti a 17 sistemi enzimatici.

Sui restanti 705 individui, campionati negli anni 2004 e 2005, sono stati analizzati 5 loci enzimatici che ad una prima analisi, condotta sui campioni dell'anno precedente, avevano dato indicazione di una possibile relazione tra frequenze alleliche e parametri ambientali.

Le campagne di campionamento rispecchiano le finalità per cui sono state condotte, in quanto a criteri nella scelta delle stazioni di campionamento e rilevamento dei parametri chimico-fisici.

Relativamente ai campionamenti condotti nel 2003, questi sono stati condotti in primavera (I campionamento) e in autunno (II campionamento). Per questi campioni, subito dopo la pesca è stata analizzata la salinità dell'acqua delle vasche, dove è

avvenuto il campionamento, mediante l'utilizzo di un rifrattometro. Per i valori si faccia riferimento alla Tabella 1 ed alla Figura 6

Tabella 1. Siti di campionamento di *A. fasciatus* anno 2003.

zona	stazione campionamento	campionati		salinità ‰	
		I camp.	II camp.	I camp.	II camp.
nord	vasca 1	48	71	38	36
centro	vasche 11; 12; 14; 15.	43	48	40	47
“	vasche 20; 22.	37	-	42	-
“	canale 23	19	29	91	62
sud	vasche 24; 26.	28	19	49	65

Per quanto riguarda gli individui raccolti nel 2004 e nel 2005, i campionamenti all'interno delle vasche delle saline di Tarquinia sono stati effettuati seguendo due criteri, uno spaziale ed uno temporale (Tab. 2).

Secondo il criterio spaziale, seguendo una direttrice Nord-Sud, l'intera area delle saline è stata suddivisa in 3 zone principali, ognuna con specifiche caratteristiche ambientali in rapporto alla collocazione geografica (Fig.6). La zona a Nord in prossimità della foce di Ponente è contraddistinta da una situazione ambientale simile a quella della zona costiera antistante; dovuta all'ingresso regolare dell'acqua marina in queste vasche, che svolge un'azione mitigante nei confronti dei cambiamenti delle condizioni chimiche e fisiche, legate ai ritmi stagionali e circadiani. Nella zona meridionale delle saline, sia in funzione della distanza dal mare che per la ridotta profondità delle vasche stesse, i cambiamenti climatici stagionali e giornalieri generano invece marcate fluttuazioni dei parametri ambientali. Le vasche della zona centrale in base alla loro collocazione geografica, sono quindi dotate di caratteristiche intermedie fra le vasche settentrionali e meridionali.

Il secondo criterio di campionamento, è di tipo temporale. Dal 16 giugno 2004 al 22 agosto 2005 sono stati effettuati numerosi campionamenti volti ad evidenziare i cambiamenti della struttura genetica della popolazione in rapporto alle mutevoli condizioni ambientali all'interno delle vasche, legate ai cambiamenti climatici stagionali. Inoltre nel giugno 2005 si è proceduto ad isolare nella zona centrale le vasche 21 e 23 ed il lungo canale ad esse limitrofo. La chiusura di queste vasche ha permesso di creare artificialmente delle condizioni particolarmente estreme di salinità,

temperatura ed ossigeno disciolto in modo da amplificare lo stress ambientale e valutarne gli effetti sulla popolazione.

Durante ogni campionamento sono stati annotati alcuni fondamentali parametri ambientali relativi alle singole vasche oggetto della pesca: mediante l'utilizzo di una sonda multiparametrica da campo è stato stimato il valore di temperatura, la concentrazione di ossigeno disciolto nell'acqua è stata rilevata grazie ad un ossimetro da campo, mentre la salinità è stata quantificata mediante un rifrattometro.

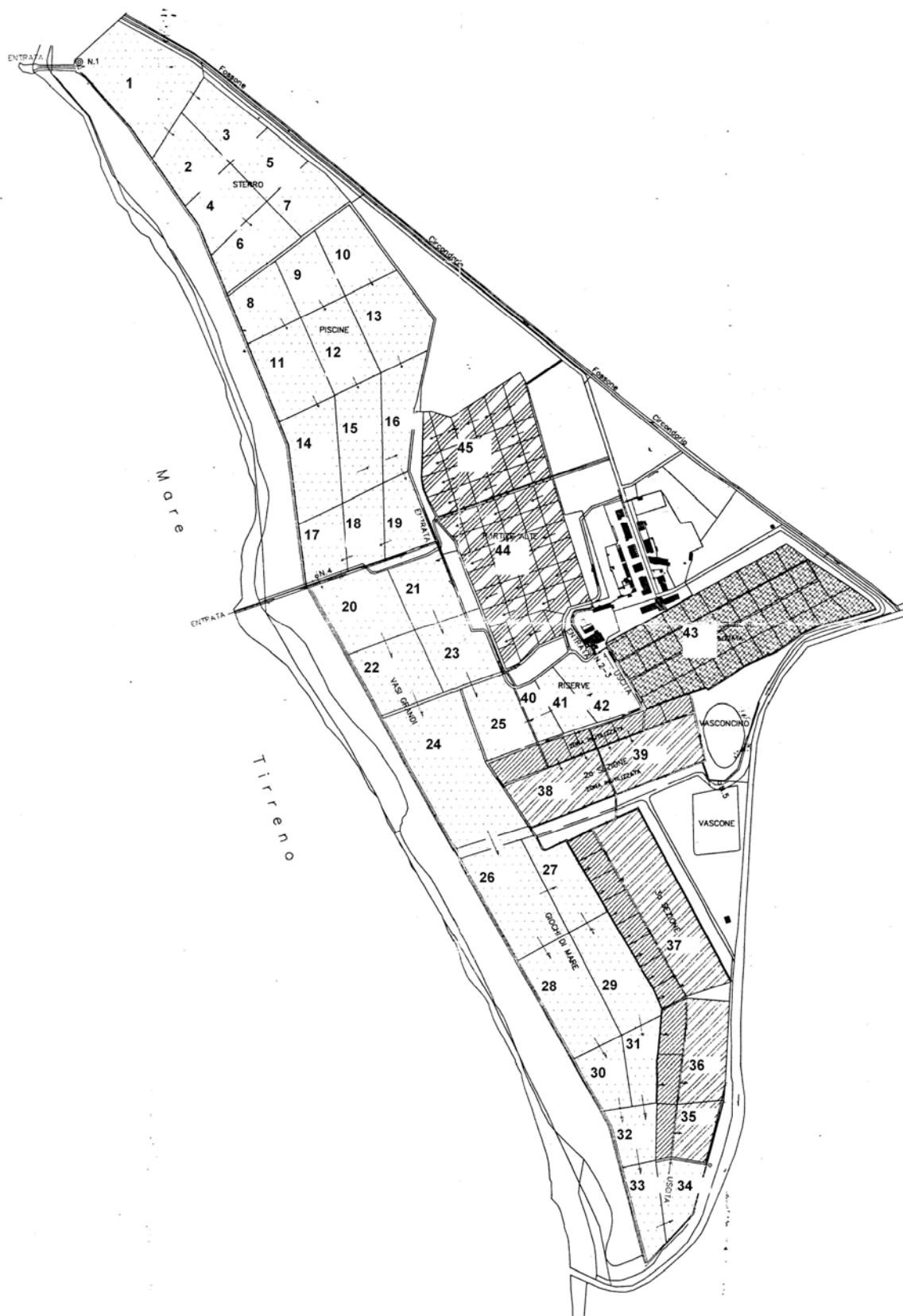


Figura 6. Pianta delle Saline di Tarquinia

Tabella 2. Siti di campionamento di *A. fasciatus* anni 2004 e 2005: data di raccolta, numero di esemplari, salinità, temperatura, ossigeno disciolto per sito.

zona	gruppo	data	stazione campionamento	campionati	salinità ‰	temp °C	O₂ mg/l
nord	D	16.06.04	vasca 6	66	38		
centro	B	16.06.04	vasca 23	88	70		
“	A	15.12.04	vasca 23	48	18		
“	E	14.01.05	vasca 23	37	26	5.7	10.5
“	H	10.02.05	vasca 23	50	32	6.1	11.5
“	N	11.05.05	v. e c. 23	52	45	24.2	9.1
“	P	16.05.05	can. 23 uscita sud	53	59	28.3	7.9
“	QI	19.07.05	canale 21	7	120		
“	QII	20.07.05	canale 23	12	120	29	5.1
“	QIII	20.07.05	canale 21	22	123	29	7.1
“	QIV	22.07.05	canale 23	40	128	28.2	6.3
“	S	22.07.05	canale 21	43	130	26.1	7.3
“	R	11.08.05	v. e c. 23	42	140	24.5	8.5
“	T	22.08.05	canale 21	10	75	24.9	5.2
“	U	22.08.05	canale 23	42	68	23.9	6
sud	OI	11.05.05	vasca 33	13	38	26.8	11
“	OII	16.05.05	canale 35	8	54	27.5	2.2
“	OIII	01.07.05	vasca 34	14	50	26	7.2
“	OIV	01.07.05	canale 34	6	70	28.1	2.4
“	OV	07.07.05	vasca 34	14	50	27	7.3
“	Z	14.07.05	vasca 34	38	105	27.6	7.6

Ovviamente, relativamente ai cinque loci su cui si è condotto lo studio delle relazioni genotipo-ambiente, sono stati utilizzati anche i dati relativi ai campioni raccolti nel 2003, così come i campioni raccolti nel 2004 e nel 2005 sono stati presi in considerazione per approfondire le analisi delle variazioni nella struttura genetica della popolazione.

6.2 – Metodi

6.2.1 – Analisi elettroforetiche

Per la presente tesi sono stati analizzati 25 loci enzimatici di *A. fasciatus*, riportati in tabella 3.

Tabella 3. Enzimi analizzati con i relativi loci codificanti, la migrazione elettroforetica (+ anodica; - catodica), i sistemi tampone utilizzati, codice enzima, tessuto analizzato, struttura quaternaria e durata della corsa elettroforetica.

Enzimi	Codice Enzima	Loci	Migrazione	Sistema tampone *	V/cm	Corsa (ore)	Struttura Quaternaria	Tessuto	Rif **
Glicerolo-3-Fosfato Deidrogenasi	1.1.1.8	<i>G3pdh-1</i>	+	6,3	8	5,30	Dimero	M	d
Lattato Deidrogenasi	1.1.1.28	<i>Ldh-1</i>	+	4	8	5,30	Tetramero	O	a
		<i>Ldh-2</i>	+					M	
		<i>Ldh-3</i>	+					M	
Malato Deidrogenasi	1.1.1.37	<i>Mdh-1</i>	+	6	8	6	Dimero	M	b
		<i>Mdh-2</i>	+						
		<i>Mdh-4</i>	+						
Enzima Malico	1.1.1.40	<i>Mdhp-1</i>	+	2	8	4,30	Dimero	M	d
		<i>Mdhp-2</i>	+					M	
Isocitrato Deidrogenasi	1.1.1.42	<i>Idh-2</i>	+	2	8	5	Dimero	M	b
Fosfogluconato Deidrogenasi	1.1.1.43	<i>6Pgdh</i>	+	6	8	5,30	Dimero	M	b
Glucosio-6-Fosfato Deidrogenasi	1.1.1.49	<i>G6pdh</i>	+	5	8	5,30	Dimero	M	b
Glicerolo-3-Fosfato Deidrogenasi	1.2.1.12	<i>Gapdh1</i>	+	2	8	5	Tetramero	M	b,d
Super Ossido Dismutasi	1.15.1.1	<i>Sod</i>	+	2	8	4,30	Dimero	M	c
Esterasi	3.1.1.2	<i>Est-3</i>	+	3	8	5	Monomero	M	d
Peptidasi (Leu-Gly-Gly)	3.4.11	<i>Pep-B</i>	+	2	8	5,30	Monomero	M	f
Adenosina Deaminasi	3.5.4.4	<i>Ada</i>	+	2	8	5	Monomero	M	e
Anidrasi Carbonica	4.2.1.1	<i>Ca</i>	+	3,2	8	5,30	Monomero	M	e
Aconitasi	4.2.1.3	<i>Acon</i>	+	5	8	5,30	Dimero	M	
Mannosio-6-Fosfato Isomerasi	5.3.1.8	<i>Mpi</i>	+	2,3	8	4,30	Monomero	M	e
Glucosio-6-Fosfato Isomerasi	5.3.1.9	<i>Gpi-1</i>	+	6	8	6	Dimero	M	c
		<i>Gpi-3</i>	+					M	
Fosfoglucomutasi	5.4.2.2	<i>Pgm-1</i>	+	4	8	5,30	Monomero	M	a
		<i>Pgm-2</i>	+					M	

*I sistemi tampone usati sono i seguenti:

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

**Fonti bibliografiche tecniche di colorazione:

a) BREWER e SING (1970); b) SHAW e PRASAD (1970); c) SELANDER *et al.* (1971); d) AYALA *et al.* (1972); e) HARRIS e HOPKINSON (1976); f) RICHARDSON *et al.* (1986).

Gli individui esaminati sono stati preparati e caricati sul gel secondo una metodica standard. I campioni di tessuto, preparati singolarmente, vengono omogeneizzati meccanicamente in 0,5 ml d'acqua distillata. Per la preparazione del gel si è impiegato l'amido della Connaught Laboratories Ltd (Starch-hydrolysed), sciolto in proporzione del 10% nel sistema tampone più adatto ad ogni enzima (Tabella 4).

Tabella 4. Sistemi tampone (quantità di reagenti per litro di soluzione).

<i>Sistema Tampone</i>	<i>Elettrodi</i>	<i>Gel</i>
1. Tris/citrato discontinuo (Poulik, 1957)	Tris 0.076 M, acido citrico 0.005 M, pH 8.2 (18.55 g di ac. borico, 2.40 g di NaOH)	Tris 0.076 M, ac. Citrico 0.005 M, pH 8.7 (9.21 g di Tris, 1.05 g di ac. citrico)
2. Tris/citrato continuo (Selander <i>et al.</i> , 1971)	Tris 0.678 M, acido citrico 0.157 M, pH 8 (83.2 g di Tris, 30 g di ac.citrato monoidrato)	Tris 0.023 M, ac. Citrico 0.005 M, pH 8 (2.77 g di Tris, 1.1 g di ac. citrico)
3. Tris/versene/borato (Brewer e Sing, 1970)	Tris 0.21 M, acido borico 0.15 M, EDTA 0.006 M, pH 8 (25.4 g di Tris, 9.27 g di ac. borico, 2.20 g di EDTA)	Tris 0.021 M, ac. Borico 0.02 M, EDTA 0,007 M pH 8,6 (2,5 g di Tris, 1.24 g di ac. borico, 0.25 g di EDTA)
4. Tris/maleato (Brewer e Sing, 1970, modificato)	Tris 0.1 M, acido maleico 0.1 M, EDTA 0.01 M, MgCl ₂ 0.015 M, NaOH 0.125 M, pH 7.2 (12.11 g di Tris, 11.61 g di ac. maleico, 3.72 g di EDTA, 3.05 g di MgCl ₂ , 5 g di NaOH)	Tampone elettrodi diluito 1:10, pH 7.2
5. Litio/borato discontinuo (Soltis <i>et al.</i> , 1983)	LiOH 0.038 M, ac. Borico 0.188 M pH 8.1 (1,6 g di LiOH, 11.6 g di ac. borico)	Tris 0.045 M, ac citrico 0.007 M, LiOH 0.004 M, ac. Borico 0.019 M pH 8.3 (5.45 g di Tris, 1.28 g di ac. citrico in 900 ml, portare a volume con 100 ml di tampone elettrodi 9:1)
6. Fosfato citrato (Harris e Hopkinson, 1976)	Citrato di Na tribasico diidrato 0.15 M, fosfato di sodio mono-basico 0.24M pH 6.3 (44.11 g di citrato di Na, 33.12 g di ac. borico)	Tris 0.045 M, ac citrico 0.007 M, LiOH 0.004 M, ac. Borico 0.019 M pH 8.3 (5.45 g di Tris, 1.28 g di ac. citrico in 900 ml, portare a volume con 100 ml di tampone elettrodi 9:1)

La soluzione ottenuta viene portata ad ebollizione, degassata con una pompa a vuoto e poi versata su piastre di plexiglas di 16 x 21,5 x 0,7 cm. Una volta che il gel si è solidificato, con un pettine di plexiglas munito di 21 denti, vi si pratica un solco longitudinale in uno dei due lati maggiori della piastra posto da 2,5 a 6 cm dal bordo. Nei pozzetti ricavati nel gel sono posti dei cartellini (5 x 5 mm) di carta Whatmann 3 MM precedentemente imbibiti con l'estratto di tessuto.

Successivamente la piastra contenente il gel viene collocata orizzontalmente su due vaschette, anch'esse di plexiglas, provviste d'elettrodi e contenenti il tampone adatto, *bridge buffer* (Tabella 4); delle apposite spugnette consentono il contatto tra i

bordi del gel e le vaschette del tampone. La migrazione avviene in una cella a temperatura costante di 5°C. La durata della migrazione può variare da 4h30m fino a 6h30m in funzione dell'enzima da studiare e del sistema tampone utilizzato, per le stesse ragioni anche l'amperaggio applicato varia tra i 50 e i 100 mA. Al termine della migrazione sono estratti i cartellini e il gel viene tagliato in due fette con del filo di nylon teso. Ciascuna delle due fette viene trattata con una soluzione colorante specifica per l'enzima da evidenziare. La soluzione è composta da un substrato su cui agisce l'enzima, un coenzima (NAD o NADP) ed un colorante che si lega al prodotto della reazione. Alcune soluzioni sono usate direttamente allo stato liquido, altre invece vengono rese solide con agar allo 0.8% in soluzione tampone tris HCl 0,05 M (pH 8), precedentemente portato ad ebollizione e poi lasciato raffreddare a 48°C.

Le tecniche di colorazione che sono state utilizzate rientrano in due categorie (Harris e Hopkinson, 1976):

1. *Metodi di “evidenziamento chimico”*. L'evidenziazione delle bande avviene grazie alla reazione tra il colorante e il prodotto dell'attività enzimatica. Di solito vengono usati polimeri aromatici quali i sali di diazonio (Fast Garnet GBC e Fast Blue BB) e i derivati dell' α -e β -naftolo. Queste tecniche sono impiegate nel caso di enzimi come idrolasi, peptidasi e transaminasi.
2. *Metodi di “colorazione per trasferimento di elettroni”*. Tali metodi sfruttano sostanze come il metil-tiazolo-tetrazolio (MTT) che ha il ruolo di marcatore di trasportatori di elettroni, infatti, questa sostanza reagendo con un donatore di elettroni viene ridotto a formazano insolubile, un prodotto che si colora molto intensamente. Per accelerare la reazione di norma si aggiunge alla soluzione colorante fenazina metasolfato (PMS) che funge da catalizzatore intermedio. Enzimi quali chinasi, perossidasi, ossidasi e deidrogenasi sono identificabili con queste tecniche.

Per alcuni enzimi il prodotto primario della reazione non è visualizzabile direttamente, in questo caso è necessario aggiungere un “linking enzyme” che reagisce con il prodotto primario trasformandolo in un altro prodotto evidenziabile tramite MTT e PMS. Per osservare i metodi di visualizzazione applicati a ciascun enzima si può fare riferimento alla tabella 5.

Tabella 5. Enzimi analizzati con i relativi loci codificanti, la migrazione elettroforetica (+ anodica; - catodica), sistemi tampone utilizzati e durata della corsa elettroforetica.

<i>Isozimi</i>	<i>Tamponi di colorazione</i>	<i>Coenzimi</i>	<i>Enzimi</i>	<i>Substrati</i>	<i>Attivatori-inibitori</i>	<i>Metodi di visualizzazione</i>
<i>G3pdh</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 20 ml	NAD 15mg	ALD 0,05 mg	α -glicerofosfato 300 mg	EDTA 50 mg	MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Ldh</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 20 ml	NAD 15mg		acido DL lattico 50 mg		MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Mdh</i>	malato di Na 20 ml	NAD 15mg				MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Idh</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 20 ml	NADP 5 mg		isocitrato 30 mg	MgCl ₂ 10 mg	MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>6Pgdh</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 20 ml	NADP 5 mg		gluconato-6-fosfato 20 mg	MgCl ₂ 10 mg	MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Ada</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml		NP 0,02 mg XO 0,02 mg	adenosina 20 mg		MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>G3pdh1</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 50 ml	NAD 30mg	Ald 0,1 mg	fruttosio-1,6- difosfato 125 mg	Arseniato di Na 125 mg	MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Sod</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 20 ml	NAD 15mg				MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Mdhp</i>	malato di Na 30 ml	NADP 5 mg			MgCl ₂ 10 mg	MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Est</i>	Na ₂ HPO ₄ 0,1 M KH ₂ PO ₄ 0,1 M pH 6,5 50 ml			α -naftil acetato 50 mg β -naftil acetato 50 mg		Fast Garnet 150 mg
<i>Pep-B</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 20 ml		Per 0,04 mg Ao 0,02 mg	leu-gly-gly20mg orto-dianisidina 10 mg	MnCl ₂ 20 mg	agar 0,8%
<i>Ca</i>	Na ₂ HPO ₄ 0,1 M KH ₂ PO ₄ 0,1 M pH 6,5 20 ml			4-metil-umbeliferil-acetato 10 mg acetone 1 ml		UV
<i>Mpi</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 20 ml	NADP 5 mg	G6pdh 0,02 mg Gpi 0,04 mg	mannosio-6-fosfato 25 mg	MgCl ₂ 10 mg	MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Gpi</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 20 ml	NADP 5 mg	G6pdh 0,02 mg	fruttosio-6-fosfato 10 mg	MgCl ₂ 10 mg	MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Acon</i>	0,05 M Tris/Hcl pH 8 30 ml	NAD 15 mg		acido cis aconitico 700 mg pH 7,5 con Tris		MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>G6pdh</i>	0,05 M Tris/Hcl pH 8 30 ml	NADP 5 mg		glucosio-6-fosfato 100 mg		MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%
<i>Pgm</i>	0,05 M Tris/HCl pH 8 20 ml	NADP 5 mg	G6pdh 0,02 mg	glucosio-1-fosfato 80 mg	MgCl ₂ 10 mg	MTT 10mg PMS 2 mg agar 0,8%

Dopo la colorazione, i gel sono posti ad incubare al buio, in una stufa a 37°C per un tempo variabile in funzione dell'enzima tra i 15' e le 2 ore.

Gli enzimi che hanno la stessa funzione enzimatica ma sono codificati da loci diversi (gli isozimi) si presentano all'analisi elettroforetica con una mobilità differente; per distinguerli sono stati numerati in ordine decrescente a partire da quello più anodico, ad esempio *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Ldh-3*, e così via. Per gli allozimi, cioè quegli enzimi che sono codificati da alleli diversi dello stesso locus, è stata adottata una nomenclatura che esprime la loro mobilità relativa in mm rispetto all'allele "100", che per definizione viene dato all'allele più frequente della popolazione, ad esempio *Ldh-1*⁹⁰, *Ldh-1*¹⁰⁰.

Le mutazioni a carico di loci enzimatici, che si traducono in differenze nella mobilità elettroforetica relativa delle varie forme allozimiche, potrebbero essere inferiori al carico mutazionale totale riferibile al locus enzimatico stesso. Poiché la tecnica elettroforetica è in grado di evidenziare soltanto le mutazioni che comportano una variazione della carica elettrica della proteina enzimatica, bisogna tenere presente che la variabilità genetica dei loci strutturali viene sottostimata.

6.2.2 – Analisi statistiche

I dati ottenuti dalle analisi elettroforetiche sono stati elaborati utilizzando i programmi BYOSIS (Swafford e Selander, 1981), GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset 1995; <http://www.cefe.cnrs-mop.fr>), STRUCTURE (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/>), BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999) e *N_e*-ESTIMATOR. Metodi statistici differenti sono stati utilizzati per i due obbiettivi del lavoro: erosione genetica e relazioni genotipo-ambiente.

Erosione genetica

Il programma BYOSIS (Swafford e Selander, 1981) è stato utilizzato per ottenere frequenze alleliche e genotipiche e per stimare la significatività statistica delle deviazioni delle frequenze genotipiche osservate rispetto alle attese, in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg, applicando il test statistico del χ^2 (Sokal e Rohlf, 1969).

Il linkage disequilibrium genotipico è stato testato utilizzando l'exact test di Fisher, usando il programma GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995; <http://www.cefe.cnrs-mop.fr>); Per testare l'eterogeneità nella distribuzione degli alleli tra le popolazioni è stato applicato un exact probability test (Raymond e Rousset 1995) per coppie di popolazioni su ciascun locus. Per ogni locus è stata condotta una stima della probabilità mediante il l'exact test di Fisher.

Il grado di strutturazione genetica dei campioni è stato analizzato per i loci variabili mediante i parametri della F statistica (Weir & Cockerham 1984), così come implementato nel software GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995).

La struttura genetica è stata inoltre esaminata utilizzando il metodo Bayesiano di Pritchard *et al.* (2000) e Falush *et al.* (2003) presente nel programma STRUCTURE (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/>). Questo metodo, mediante l'analisi dei singoli genotipi, stima il livello di mescolamento genetico (admixture) all'interno di ogni campione ed identifica eventuali clusters geneticamente distinti (K) all'interno della totalità dei campioni. Il valore di K più probabile è assegnato confrontando la omogeneità dei dati per valori differenti di K . Il modello di "admixture" è stato applicato sia ai due campioni temporalmente distinti che all'insieme dei due campioni (1998 + 2003), compiendo tre analisi indipendenti per ogni valore di K tra 1 e 4. le analisi sono state condotte con 10.000 iterazioni, senza fornire informazioni relative all'appartenenza degli esemplari ai due campioni.

La variabilità genetica dei due campioni temporali (1998; 2003) è stata stimata utilizzando i seguenti parametri: numero totale di alleli per popolazione (A_{tot}); numero medio di alleli per locus (A); percentuale di loci polimorfici (P) utilizzando sia il criterio di polimorfismo del 99% (P_{99}) che il criterio del 95% (P_{95}); eterozigosi media osservata e attesa per popolazione (H_o ed H_e). Per verificare la significatività delle differenze tra i valori di eterozigoti registrati nei due anni è stato applicato il test t -Student.

Il programma BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999) è stato utilizzato per individuare eventuali "colli di bottiglia" recenti nelle popolazioni campionate usando il Wilcoxon sign-rank test (Luikart *et al.* 1998), mediante il modello "infinite allele mutation (IAM)" (Kimura & Crow 1964).

La dimensione effettiva della popolazione è stata calcolata usando due metodi differenti: i) Moments Based Temporal Method (Waples 1989, 1991) che stima il valore di N_e esaminando le variazioni nelle frequenze alleliche tra le generazioni e ii) Pseudo Likelihood Temporal Method (MLNE; Wang 2001, Wang & Whitlock 2003). Entrambi i metodi necessitano di stimare il numero di generazioni che intercorrono tra i due campioni distinti temporalmente; per questa analisi sono stati utilizzati i valori di 4 6 e 8 generazioni tra il 1998 ed il 2003 in quanto il numero di generazioni/anno per *Aphanius fasciatus* può essere variabile da 1 a 2 a seconda delle condizioni climatiche. Per il secondo metodo è stato utilizzato il programma MLNE 1.0 (Wang & Whitlock 2003) che permette la stima di N_e prendendo in considerazione la possibilità o meno di tassi di immigrazione da popolazioni conspecifiche; in questo caso è stata considerata la popolazione di Orbetello, precedentemente studiata (Cimmaruta *et al.* 2003), quale possibile popolazione sorgente.

Relazioni genotipo-ambiente

Il programma BYOSIS (Swafford e Selander, 1981) è stato utilizzato per ottenere frequenze alleliche e genotipiche e per stimare la significatività statistica delle deviazioni delle frequenze genotipiche osservate rispetto alle attese, in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg, applicando il test statistico del χ^2 (Sokal e Rohlf, 1969).

Per testare l'eterogeneità nella distribuzione degli alleli e dei genotipi tra le popolazioni e i diversi raggruppamenti (sub-demi) è stato applicato un exact probability test (Raymond e Rousset 1995) per coppie di popolazioni su ciascun locus utilizzando il programma GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995; <http://www.cefe.cnrs-mop.fr>). Per ogni locus è stata condotta una stima della probabilità mediante il l'exact test di Fisher.

Il grado di strutturazione genetica dei campioni è stato analizzato mediante i parametri della F statistica (Weir e Cockerham, 1984) con il programma GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset, 1995)

Per stabilire il livello di correlazione ecologica tra le frequenze alleliche ai loci analizzati e l'andamento dei valori dei parametri ambientali (salinità, temperatura ed ossigeno disciolto) è stato calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson. Un

valore di probabilità è stato poi calcolato per il coefficiente di correlazione di Pearson mediante la distribuzione t –Student, al fine di stimare la significatività statistica della correlazione.

CAP. 7 – RISULTATI E DISCUSSIONI

7.1 – Erosione genetica

I due campioni studiati (1998 e 2003) sono risultati conformi all'equilibrio di Hardy-Weinberg, ad eccezione del locus *Ada*. Questo locus mostra un deficit di eterozigoti significativo in entrambi i campioni ($P = 0.044$ e $P = 0.014$ rispettivamente), con un eccesso di omozigoti sia per l'allele *Ada*¹⁰⁰ che *Ada*¹⁰⁸. Nessuna evidenza della presenza di un linkage disequilibrium è stata mostrata dall'analisi dei dati attraverso l'exact test di Fisher, quindi i genotipi in ciascun locus possono essere considerati indipendenti dai genotipi degli altri loci studiati.

Sei dei ventiquattro loci analizzati sono risultati monomorfici in entrambi i campioni: *Ldh-2*, *Ldh-3*, *Mdh-2*, *Mdhp-1*, *Gapdh*, *Sod*. Altri sei loci (*Ldh-1*, *Est-3*, *Ada*, *Mpi*, *Gpi-1* e *Pgm-1*) hanno mostrato alti livelli di polimorfismo, avendo da 2 a 4 alleli per locus, con frequenze dell'allele 100 comprese tra 0.53 e 0.69. I rimanenti 12 loci rivelano livelli moderati di polimorfismo, avendo un numero di 2 o 3 alleli per locus, e con la frequenza dell'allele più comune sopra lo 0.82 (*G3pdh-1*, *Mdh-1*, *Mdh-4*, *Mdhp-2*, *Idh-2*, *6Pgdh*, *G6pdh-1*, *PepB*, *Ca*, *Acon*, *Gpi-3*, *Pgm-2*). È importante notare che, quando vengono comparati i campioni raccolti nei due anni, alcuni loci che risultavano moderatamente polimorfici nel 1998, sono monomorfici nei campioni del 2003; è il caso di *Mdh-4*, *Mdhp-2*, *Idh-2*, *6Gpdh* e *Ca*. Altri, pur presentandosi ancora polimorfici nel 2003, risultano comunque avere perso una variante allelica, come *Ada* e *Mpi*.

L'exact probability test (Raymond & Rousset 1995) condotto sulle frequenze alleliche per valutare l'eterogeneità tra i due campioni distinti dal punto di vista temporale, mostra come sette loci presentino una deviazione statisticamente significativa ($P < 0.05$) rispetto alla ipotesi nulla testata (ovvero che la distribuzione genotipica sia identica tra i due campioni temporali); questi sono *G6pdh-1*, *Est-3*, *Ada*, *Ca*, *Acon*, *Mpi* e *Pgm-1*. Va notato che tra questi *Ca*, *Ada*, *Mpi* sono loci interessati dall'erosione genetica. (Tabella 6).

Tabella 6

Frequenze alleliche nei 18 loci polimorfici nella popolazione di *A.fasciatus* delle Saline di Tarquinia nei 2 anni. A lato è indicato il valore di *P* per l'exact test di Fisher.

LOCUS	Allele	1998	2003	P
<i>G3pdh</i>	92	0.040	0.011	0.051
	100	0.960	0.989	
<i>Ldh-1</i>	100	0.621	0.573	0.565
	110	0.379	0.427	
<i>Mdh-1</i>	100	0.994	0.997	1.000
	104	0.006	0.003	
<i>Mdh-4</i>	100	0.994	1.000	0.327
	104	0.006	0.000	
<i>Mdhp-2</i>	92	0.006	0.000	0.391
	100	0.994	1.000	
<i>Idh-2</i>	97	0.018	0.000	0.499
	100	0.982	1.000	
<i>6Pgdh</i>	100	0.987	1.000	0.205
	110	0.013	0.000	
<i>G6pdh</i>	100	0.886	0.996	0.000
	110	0.114	0.004	
<i>Est-3</i>	100	0.625	0.997	0.000
	105	0.375	0.003	
<i>PepB</i>	96	0.184	0.106	0.187
	100	0.816	0.894	
<i>Ada</i>	94	0.011	0.000	0.030
	100	0.596	0.691	
	108	0.394	0.309	
<i>Ca</i>	100	0.979	1.000	0.044
	108	0.021	0.000	
<i>Acon</i>	97	0.071	0.005	0.003
	100	0.900	0.953	
	110	0.029	0.042	
<i>Mpi</i>	100	0.642	0.532	0.002
	104	0.353	0.468	
	107	0.005	0.000	
<i>Gpi-1</i>	85	0.368	0.372	1.000
	100	0.632	0.628	
<i>Gpi-3</i>	100	0.926	0.928	1.000
	108	0.074	0.072	
<i>Pgm-1</i>	90	0.167	0.135	0.007
	94	0.237	0.309	
	100	0.564	0.552	
	104	0.032	0.004	
<i>Pgm-2</i>	95	0.015	0.018	1.000
	100	0.985	0.982	

Il grado di strutturazione genetica dei campioni (F -statistico Weir & Cockerham 1984), mostra un valore medio di F_{ST} di 0.024 ($F_{IT} = 0.048$; $F_{IS} = 0.025$). Anche i valori ad ogni singolo locus risultano piuttosto bassi (meno di 0.04), con due eccezioni ai loci *G6pdh* ($F_{ST} = 0.142$) ed *Est-3* ($F_{ST} = 0.700$), come mostrato nella tabella che segue.

Tabella 7

Valori di F -statistico (Weir & Cockerham 1984).

Locus	Fwc(is)	Fwc(st)	Fwc(it)
G3PDH	-0.0227	0.0176	-0.0047
LDH1	-0.0625	-0.0049	-0.0677
MDH1	-0.0003	-0.0037	-0.0040
MDH4	-0.0023	0.0050	0.0028
MDHP2	-0.0014	0.0028	0.0015
IDH2	-0.0086	0.0073	-0.0012
6PGDH	-0.0077	0.0228	0.0152
G6PDH	0.0254	0.1418	0.1635
EST3	-0.1514	0.7002	0.6548
PEPB	-0.0689	0.0137	-0.0542
ADA	0.1580	0.0091	0.1656
CA	-0.0168	0.0416	0.0254
ACON	-0.0636	0.0217	-0.0406
MPI	-0.0057	0.0221	0.0166
PHI1	0.0191	-0.0035	0.0157
PHI3	0.0002	-0.0035	-0.0032
PHI4	0.0800	-0.0081	0.0726
PGM1	0.0620	0.0030	0.0649
PGM2	-0.0150	-0.0032	-0.0182
All:	0.0253	0.0237	0.0484

I livelli di variabilità genetica (Tabella 8) variano nei due campioni, con valori sensibilmente più bassi registrati nel 2003 rispetto al 1998. Il numero totale di alleli per locus (A_{tot}), la percentuale di loci polimorfici (P_{99} e P_{95}) e l'eterozigosi media sia osservata che attesa (H_o and H_e), mostrano un decremento temporale tra il 1998 ed 2003. In particolare, le differenze tra i valori di eterozigosi risultano statisticamente significative se testate con l'analisi del t -Student ($P < 0.05$). Infatti, come mostrato in Tabella 9, non solo alcuni loci polimorfici nel 1998 sono risultati monomorfici nel 2003, ma altri loci mostrano consistenti differenze tra i valori di eterozigosi nei due anni.

Tabella 8. Confronto tra parametri di variabilità genetica della popolazione nei due anni.

Parametri di variabilità genetica		1998	2003
Numero totale di individui saggiati	N_{tot}	102	342
Numero medio di individui saggiati per locus	N	61.5	174.2
Numero totale di alleli osservati	A_{tot}	47	40
Numero medio di alleli per locus	A	1.8	1.5
Percentuale di loci polimorfici	P₉₅	48.0	32.0
Percentuale di loci polimorfici	P₉₉	75.0	54.2
Eterozigoti media osservata	H_o	0.173	0.120
Eterozigoti media attesa	H_e	0.169	0.123

Tabella 9. Valori di eterozigosi osservata per ogni singolo locus nei 2 anni.

Locus	1998	2003
<i>G3pdh</i>	0,079	0,023
<i>Ldh-1</i>	0,552	0,514
<i>Mdh-1</i>	0,011	0,006
<i>Mdh-4</i>	0,013	0
<i>Mdhp-2</i>	0,012	0
<i>Idh-2</i>	0,036	0
<i>6Pgdh</i>	0,026	0
<i>G6pdh</i>	0,200	0,007
<i>Est-3</i>	0,550	0,006
<i>PepB</i>	0,316	0,213
<i>Ada</i>	0,400	0,364
<i>Ca</i>	0,041	0
<i>Acon</i>	0,200	0,095
<i>Mpi</i>	0,505	0,490
<i>Gpi-1</i>	0,463	0,458
<i>Gpi-3</i>	0,147	0,130
<i>Pgm-1</i>	0,588	0,535
<i>Pgm-2</i>	0,031	0,035

I valori di eterozigosi attesa sono sempre molto simili a quelli dell'eterozigosi osservata, come prevedibile in virtù del fatto che, eccetto il locus *Ada* nel campione del 2003, tutti i loci si presentano in equilibrio di Hardy-Weinberg.

Il Wilcoxon sign-rank test secondo il modello IAM (infinite allele mutation) è stato applicato per verificare se i campioni abbiano subito “colli di bottiglia” recenti. Per tale analisi il locus *Ada* è stato omesso, non essendo in equilibrio di Hardy-Weinberg per il campione del 2003. Nessuno dei 2 campioni, 1998 e 2003, ha mostrato indicazioni di recenti colli di bottiglia ($P = 0.73$; $P = 0.54$ rispettivamente).

Per investigare ulteriormente la stabilità temporale della popolazione delle Saline di Tarquinia del ciprinide, è stato condotto un test per l'assegnazione genetica dei singoli individui a clusters supposti, utilizzando il programma “Structure” (Pritchard *et al.* 2000). Il test è stato condotto sia sui singoli campioni temporalmente distinti, che sull'insieme dei dati cumulati. In entrambi i casi la probabilità più alta è stata assegnata per il raggruppamento in una unica popolazione ($k=1$): quando sono state ipotizzate 2, 3 o 4 popolazioni, il valore di q (il livello medio di assegnazione dei singoli individui al cluster più probabile) ha indicato una minore verosimiglianza dell'assegnazione. Inoltre ognuno degli individui analizzati presenta probabilità

confrontabili di appartenere a qualsiasi delle popolazioni ipotizzate (ad esempio 40%-60% nel caso di due popolazioni).

Nella tabella seguente, infine, sono riportati i valori di N_e calcolati secondo i due metodi utilizzati (Moments Based Temporal Method e Pseudo Likelihood Temporal Method). In entrambi i casi, anche se crescenti in proporzione al numero di generazioni ipotizzate, i valori di N_e sono risultati estremamente bassi e confrontabili tra loro. I valori più alti scaturiscono utilizzando il secondo dei metodi, ipotizzando la possibilità di flusso genico dalla popolazione di Orbetello. Va notato che la stima del tasso di migrazione tra le popolazioni di Tarquinia ed Orbetello risulta sempre estremamente bassa, come già emerso da studi precedenti (Cimmaruta *et al.* 2003).

Va sottolineato che questi ultimi metodi statistici non forniscono una stima assoluta del valore della dimensione effettiva della popolazione, ma proporzionale alla variabilità presente nella popolazione stessa. In altre parole i dati riportati significano che, in quanto ad apporto di variabilità genetica, la popolazione si comporta come se la sua dimensione effettiva fosse quella indicata dai test.

Tabella 10. Stima della dimensione effettiva della popolazione (N_e) e del tasso di migrazione (m) nella popolazione di Tarquinia di *A. fasciatus*.

No. of generations	Without migration		With migration	
	Moments Based	Pseudo Likelihood	Pseudo Likelihood	m
4	34	60	77	0.022
6	51	74	93	0.018
8	69	88	108	0.015

Le differenze tra frequenze alleliche e parametri di variabilità genetica nei due anni, che risultano spesso statisticamente significative, mostrano un'inequivocabile calo della variabilità genetica della popolazione. Si noti che il numero medio di individui saggiati per locus è di gran lunga superiore nel 2003; questo conferma la validità del confronto.

Tranne che per il locus *Ada*, questi loci non presentano scostamenti significativi dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, che indicherebbero la presenza di forti pressioni selettive in favore di determinati genotipi; quindi un calo così repentino della variabilità genetica può essere difficilmente spiegato come un effetto di questa forza. I test condotti sulla stabilità temporale della popolazione così come i valori medi di F_{ST} , suggeriscono che la popolazione non è stata sottoposta in questi anni ad eventi che ne hanno profondamente mutato la struttura genetica; questa ipotesi viene confermata dall'assenza di indicazioni, per entrambi i campioni, che la popolazione abbia subito recenti colli di bottiglia.

Alla luce delle stime del valore di N_e , l'erosione genetica riscontrata, che pur non modificando radicalmente la struttura della popolazione ne ridimensiona sensibilmente l'eterogeneità, può essere invece verosimilmente attribuita a deriva genetica favorita da occasionali diminuzioni nella dimensione effettiva. A conferma dell'azione di una forza stocastica, si noti che la variazione delle frequenze alleliche non è unidirezionale, in quanto alcune varianti in loci che presentano differenze significative, risultano aumentare la loro incidenza: è il caso dell'allele *Acon*¹¹⁰ che passa da 0.029 a 0.042 o dell'allele *Mpi*¹⁰⁴ che ha aumentato la propria frequenza, passando da 0.353 nel 1998 a 0.468 nel 2003. Va altresì precisato che a questo livello di indagine non si può completamente escludere che pressioni selettive moderate abbiano contribuito alla variazione delle frequenze alleliche riscontrata.

L'ipotesi è consistente con quelle già avanzate per giustificare il calo dei livelli di biodiversità a livello di specie della comunità macrozoobenthonica: nel caso del ciprinide l'estremizzazione delle condizioni ambientali potrebbe, in alcuni casi, influire negativamente sul tasso di sopravvivenza e riproduttivo della popolazione, come peraltro già dimostrato per questa specie (Leonardos e Sinis, 1998). Questi eventi potrebbero aver agito su scale temporali relativamente lunghe in quanto, in linea teorica, riduzioni limitate nel tempo delle dimensioni effettive della popolazione,

dovrebbero influire significativamente sul numero degli alleli, ma non sui livelli di eterozigosi media (Franklin, 1980; Frankel & Soulé, 1981).

7.2 – Relazioni genotipo-ambiente

Nel corso del 2003, per una prima analisi di possibili relazioni genotipo-ambiente, i campionamenti sono stati condotti in vasche caratterizzate da salinità differenti ed i campioni raccolti sono stati riuniti in funzione dei diversi valori di salinità registrati. Il primo campionamento, condotto nel marzo 2003, ha permesso una suddivisione della popolazione in quattro gruppi (vedi Tabella 1 e Figura 6):

Gruppo A: individui campionati in vasche a salinità comprese tra il 38‰ ed il 40‰ (vasche 1;11;12;14;15);

Gruppo B: individui campionati a salinità pari al 42‰ (vasche 20; 22);

Gruppo C: individui campionati a salinità pari al 49‰ (vasche 24; 26);

Gruppo D: individui campionati a salinità pari al 91‰ (canale 23).

Dall'esame delle frequenze alleliche risulta che alcuni loci presentano differenze tra i campioni prelevati a diverse salinità, come riportato in Tabella 11.

Tabella 11. Frequenze alleliche per 5 loci polimorfici in 4 campioni di *A. fasciatus* raccolti a diverse salinità : I campionamento 2003.

LOCUS	GRUPPI			
	A	B	C	D
<i>ADA</i>				
100	0.650	0.649	0.769	0.667
108	0.350	0.351	0.231	0.333
<i>MPI</i>				
100	0.515	0.488	0.500	0.679
104	0.485	0.512	0.500	0.321
<i>GPI-1</i>				
85	0.375	0.337	0.296	0.184
100	0.625	0.663	0.704	0.816
<i>GPI-3</i>				
100	0.944	0.962	0.898	0.857
108	0.056	0.038	0.102	0.143
<i>PGM-1</i>				
90	0.132	0.208	0.071	0.143
94	0.237	0.222	0.296	0.429
100	0.632	0.569	0.633	0.429

Le maggiori differenze si riscontrano nelle frequenze alleliche del gruppo D (campionato a salinità più elevata): in questi individui gli alleli *Mpi*¹⁰⁰, *Pgm-1*⁹⁴ e *Gpi*¹⁰⁰ risultano avere frequenze sensibilmente maggiori rispetto agli altri tre raggruppamenti. Si nota inoltre che, per quanto riguarda *Gpi-1*, il locus presenta un aumento clinale delle frequenze con l'allele *Gpi*¹⁰⁰ che, parallelamente all'aumento dei valori di salinità, passa dallo 0.625 del gruppo A fino allo 0.816 del gruppo D, attraverso valori di 0.663 e 0.704 dei gruppi B e C rispettivamente (figura 7). Per il locus *Gpi-3* inoltre, il test del χ^2 ha messo in evidenza un significativo deficit di eterozigoti nel gruppo A ($P = 0,001$).

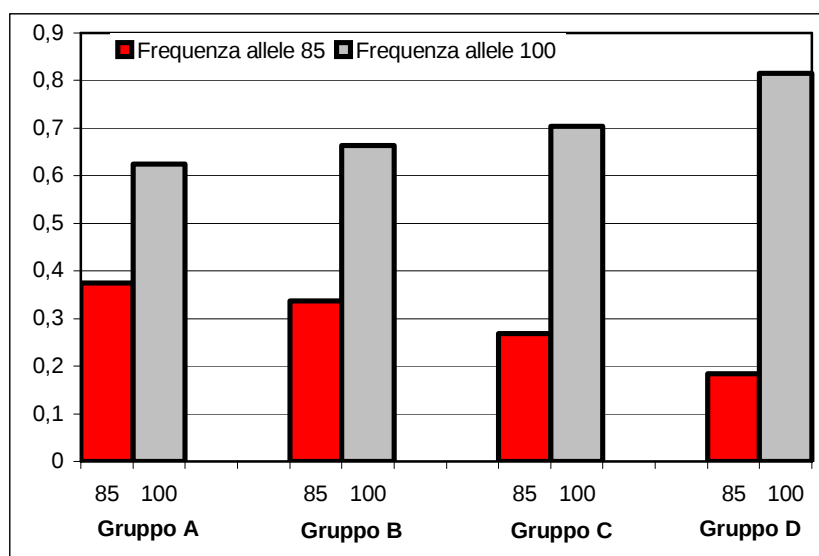


Figura 7. Andamento delle frequenze alleliche nel locus *Gpi-1*.

L'Exact test sulle frequenze alleliche mostra differenze significative in alcuni loci tra coppie di campioni: tra A e D, caratterizzati rispettivamente da salinità del 38‰ e del 91‰ per il locus *Gpi-1* ($P = 0,05$) e tra i campioni B e C, a salinità del 42‰ e 49‰, per il locus *Pgm-1* ($P = 0,03$).

Disponendo dei valori di salinità, si è testata, mediante l'indice di Pearson, l'esistenza di una possibile correlazione fra la salinità e frequenze alleliche nei loci considerati (Tab. 12). Le due variabili, salinità e frequenze alleliche, sono risultate significativamente correlate per i loci *Gpi-1*, *Mpi* e *Pgm-1*. Tra questi, *Gpi-1* e *Pgm-1*

avevano già mostrato una significativa eterogeneità delle frequenze alleliche in alcune coppie di campioni.

Tabella 12. Indice di Pearson e significatività per la correlazione fra salinità e frequenze alleliche.

Coefficienti di correlazione di Pearson, N = 4								
Prob > r rispetto a H0: Rho=0								
		Gpi1 ¹⁰⁰	Mpi ¹⁰⁰	Ada ¹⁰⁰	Gpi3 ¹⁰⁰	Pgm1 ⁹⁰	Pgm1 ⁹⁴	Pgm1 ¹⁰⁰
SALINITA'	rho	0,9728	0,9699	-0,0294	-0,8921	-0,0571	0,9784	-0,9229
	P-value	0,0272	0,0301	0,9706	0,1079	0,9429	0,0216	0,0771

Sulla base di questi primi risultati, nell'ottobre 2003, è stato effettuato un secondo campionamento negli stessi bacini in modo da aumentare il numero degli individui dei quattro gruppi; in questa seconda occasione le salinità registrate sono risultate però differenti a causa sia della diversa stagione sia dell'attività di gestione del flusso idrico da parte del personale dell'impianto. Per questo motivo in questa seconda occasione non è stato possibile campionare a salinità maggiori del 65‰ (Tabella 1). Per l'analisi dei dati questi individui sono stati cumulati ai precedenti sulla base di intervalli di salinità, definendo i seguenti gruppi:

Gruppo A :individui campionati in vasche a salinità compresa tra il 36 ed il 40‰ (vasche 1; 11;12;14;15);

Gruppo B: individui campionati a salinità comprese tra il 42‰ ed il 49‰ (vasche 11;12;14;15; 20; 22; 24; 26);

Gruppo C: individui campionati a salinità comprese tra il 62‰ ed il 65‰ (vasche 24; 26; canale 23);

Gruppo D: individui campionati a salinità pari al 91‰ (canale 23).

Nella Tabella 13 sono riportate le frequenze alleliche dei loci considerati.

Tabella 13. Frequenze alleliche per 5 loci polimorfici in 4 campioni di *A. fasciatus* raccolti a diverse salinità : I e II campionamento 2003.

LOCUS	GRUPPI			
	A	B	C	D
<i>ADA</i>				
100	0.629	0.728	0.803	0.667
108	0.371	0.272	0.197	0.333
<i>MPI</i>				
100	0.528	0.516	0.531	0.679
104	0.472	0.484	0.469	0.321
<i>GPI-1</i>				
85	0.391	0.343	0.448	0.184
100	0.609	0.657	0.552	0.816
<i>GPI-3</i>				
100	0.941	0.936	0.896	0.857
108	0.059	0.064	0.104	0.143
<i>PGM-1</i>				
90	0.134	0.075	0.225	0.143
94	0.276	0.333	0.338	0.429
100	0.587	0.592	0.425	0.429
104	0.004	0.000	0.013	0.000

L'analisi dei raggruppamenti così definiti conferma solo in parte le indicazioni scaturite dal primo campionamento. Il locus *Gpi-1* non presenta più il cline riscontrato per gli individui del primo campionamento, mentre solo la correlazione positiva di *Pgm-1*⁹⁴ con la salinità risulta confermata ($\rho=0,96$; $P=0,04$); inoltre la correlazione negativa di *Gpi3*¹⁰⁰ (non significativa precedentemente), risulta in questo caso significativa ($\rho= -0,99$; $P=0,01$). Riguardo alle differenze nelle frequenze alleliche, sono numerose quelle che risultano statisticamente rilevanti, anche se in parte riguardano il gruppo D, che rimane invariato rispetto ai raggruppamenti relativi al primo campionamento: tra A e D ($P = 0,01$) e tra C e D ($P = 0,01$) per *Gpi-1*; tra A e C ($P = 0,02$) e tra B e C ($P = 0,01$) per *Pgm-1*; tra A e B ($P = 0,03$) e tra A e C ($P = 0,01$) per *Ada*.

Lo studio comparativo tra eterozigoti osservati ed attesi, secondo l'equazione di Hardy-Weinberg, mostra scostamenti per i loci *Ada* e *Gpi-3*, con deficit di eterozigoti

significativi nel gruppo A ($P = 0.02$; $P = 0.018$ rispettivamente), come già rilevato nel primo campionamento del 2003 per *Gpi-3*, e nei campioni relativi al 1998 ed al 2003, considerati nel loro insieme, per *Ada*.

Nel 2003, in fase di campionamento, l'unico parametro ambientale che è stato misurato e registrato è la salinità e pertanto non è stato possibile stimare la correlazione fra le variazioni alleliche ed altri parametri ambientali, quali temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto.

Così durante la campagna di raccolta del 2004-2005, si è monitorato l'andamento di alcuni parametri ambientali fondamentali: temperatura, ossigeno disciolto e salinità, in associazione al campionamento di esemplari di *A. fasciatus*.

I loci enzimatici analizzati per i campioni del 2004-2005 sono stati scelti in rapporto ai risultati ottenuti nel 2003: sono stati presi in considerazione quei loci che o per il particolare andamento delle frequenze alleliche in correlazione con i valori di salinità, o per una deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, lasciassero ipotizzare un'eventuale influenza dell'ambiente (salinità) sul pool genico di questa popolazione. Nel 2004-2005 i campionamenti hanno interessato un numero maggiore di vasche rispetto al 2003 e sono stati condotti durante tutto l'anno. Durante il corso dell'anno, infatti, si assiste ad una variazione dei parametri ambientali; l'innalzamento della temperatura atmosferica, ad esempio, si traduce in valori di salinità e temperatura crescenti e nella riduzione del tenore di ossigeno disciolto nelle acque. Inoltre la diversa collocazione spaziale delle vasche comporta una caratterizzazione ambientale specifica di ognuna di esse, in rapporto alla distanza dal mare (= approvvigionamento di acqua marina) e alla profondità della vasca stessa. Pertanto, per il 2004-2005, è stato eseguito un dettagliato disegno di campionamento sia a livello spaziale che temporale, al fine di raccogliere campioni nelle più diversificate condizioni ambientali che si vengono a creare all'interno delle saline (vedi tabella 2). Per magnificare e rendere più evidenti gli effetti di eventuali pressioni selettive sulla popolazione, due vasche ed un canale ad esse limitrofo (vasche 21, 23; canale 23) sono state mantenute isolate da giugno ad agosto 2005, allo scopo di estremizzarne le condizioni ambientali. Inoltre un evento alluvionale occorso all'inizio di Dicembre 2004 ha permesso di campionare in

condizioni alterate, a salinità molto bassa in vasche che solitamente non raggiungono tali valori (centro e sud dell'impianto).

L'ipotesi che viene testata con l'analisi dei campioni così raccolti è che i subdemi di *Aphanius fasciatus* sottoposti a condizioni più variabili, come quelle che si riscontrano nella zona centrale e nella zona sud dell'impianto, subiscano l'influenza di forze che ne condizionano la struttura genetica, anche su scale temporali ridotte. Se ciò fosse vero, variazioni significative nelle frequenze alleliche dovrebbero essere riscontrabili solo in tali sub-popolazioni, e non in quelle provenienti dalla zona nord dell'impianto.

Si è quindi condotto un primo studio per verificare la supposta stabilità temporale delle frequenze alleliche nei campioni raccolti nei diversi anni nella vasca 1. I dati relativi a tali frequenze sono riportati in tabella 14.

L'applicazione dell'Exact test sulla distribuzione delle frequenze alleliche non ha evidenziato alcun confronto significativo fra i campioni dei diversi anni, confermando la stabilità temporale della sub-popolazione della prima vasca, verosimilmente associata alle ridotte fluttuazioni ambientali che si verificano in questa porzione della salina.

Tabella 14. Frequenze alleliche di campioni di *A. fasciatus* della vasca n. 1 in anni diversi.

LOCI	CAMPIONI			
	98	Mar03	Ott03	Giu04
ADA				
94	0.011	0.000	0.000	0.000
100	0.596	0.650	0.605	0.500
108	0.394	0.350	0.395	0.500
MPI				
100	0.652	0.515	0.558	0.546
104	0.342	0.485	0.442	0.454
107	0.005	0.000	0.000	0.000
GPI1				
85	0.366	0.375	0.435	0.377
100	0.634	0.625	0.565	0.623
GPI3				
100	0.930	0.944	0.928	0.931
108	0.070	0.056	0.072	0.069
PGM1				
90	0.167	0.132	0.085	0.204
94	0.237	0.237	0.340	0.245
100	0.564	0.632	0.566	0.541
104	0.032	0.000	0.009	0.010

Lo stesso confronto tra le frequenze alleliche, ampliato a tutti i sub-campioni raccolti nelle altre zone, non ha invece rivelato la stessa stabilità. Come si è già visto per i campioni del 2003 e come si vedrà in seguito per i campioni del 2004 – 2005, sono infatti molte le frequenze alleliche che, sempre secondo l’exact test, risultano significativamente differenti. Questo risultato riguarda sia i confronti tra gruppi distinti geograficamente, provenienti dalla medesima campagna di campionamento, che confronti tra sub-campioni provenienti dalla stessa stazione di campionamento, ma distinti dal punto di vista temporale.

Per interpretare questi risultati, nell’analisi dei dati e delle correlazioni con i parametri ambientali si è proceduto secondo due ipotesi principali. Si è prima ipotizzato che le variazioni nelle frequenze fossero dovute a pressione selettiva da parte di qualcuno dei principali macrodescrittori: in questo caso gli individui sono stati raggruppati, quando possibile, sulla base della coincidenza di tali valori, pur

mantenendo distinti i campioni appartenenti alle diverse stazioni di campionamento. Successivamente, sulla base di osservazioni fatte sul campo durante i campionamenti, si è voluto verificare se da parte degli individui vi fosse una “scelta” attiva dell’habitat in relazione al proprio genotipo.

I risultati delle analisi secondo questi due diversi approcci, selezione e habitat choice, sono esposti separatamente.

7.2.1 – Selezione

Viste le indicazioni dell’analisi dei campioni del 2003, il primo parametro ambientale di cui si è voluto verificare l’eventuale ruolo selettivo è stato la salinità, pertanto si è proceduto a raggruppare i campioni in base a valori simili di salinità (Tab. 2).

I raggruppamenti ottenuti sono:

$$F=QI+QII+QIII$$

$$G=QIV+S$$

$$J=T+U$$

$$L= OII+OIII+OV$$

In tabella 15 è riportato l’elenco di tutti i gruppi considerati con i relativi valori di salinità.

Il gruppo OIV è stato escluso in quanto non cumulabile con altri e troppo esiguo per essere considerato singolarmente.

Tabella 15. Campioni di *A. fasciatus* raggruppati per valori diversi di salinità.

gruppo	stazione	individui	salinità
D	Vasca 1	66	38‰
B	Vasca 23	88	70‰
A	Vasca 23	48	18‰
E	Vasca 23	37	26‰
H	Vasca 23	50	32‰
N	Vasca e canale 23	52	45‰
P	Canale 23 uscita sud	53	59‰
F	Canale 21-23	41	121‰
G	Canale 21-23	83	129‰
R	Vasca e canale 23	42	140‰
J	Canale 21-23	52	72‰
OI	Vasca 33	13	38‰
L	Vasca 34	20	50‰
Z	Vasca 34	38	105‰

Si noti che i campioni da A a J provengono dalla stessa stazione di campionamento prelevati da dicembre 2004 ad agosto 2005: si tratta della zona che dal giugno 2005 a metà agosto 2005 è stata isolata per intensificare l'estremizzazione delle condizioni ambientali. Pertanto i campioni F, G ed R, raccolti in condizioni estreme artificialmente create, sono quelli che avrebbero dovuto risentire maggiormente di una eventuale azione selettiva sui genotipi.

Considerazioni simili possono essere estese ai gruppi OI, L e Z, anch'essi raccolti con il progredire della stagione calda e l'aumento dei valori di salinità, nella zona sud dell'impianto.

Le frequenze alleliche dei loci considerati (tabella 16), rivelano una certa variabilità, la cui significatività è, in alcuni casi, confermata dall'exact test condotto sulle stesse (tabella 17).

Tabella 16. Frequenze alleliche nei gruppi a diversa salinità.

LOCUS	POPULATION													
	D	B	A	E	H	N	P	F	G	R	J	OI	L	Z
ADA														
(N)	4	6	48	35	44	52	53	41	83	10	38	13	35	38
100	0.500	0.833	0.687	0.743	0.682	0.663	0.698	0.732	0.717	0.650	0.750	0.885	0.671	0.789
108	0.500	0.167	0.312	0.257	0.318	0.337	0.302	0.268	0.283	0.350	0.250	0.115	0.329	0.211
MPI														
(N)	66	88	48	37	50	52	53	41	82	39	51	13	35	38
100	0.538	0.534	0.510	0.514	0.510	0.538	0.594	0.561	0.494	0.513	0.618	0.692	0.543	0.645
104	0.462	0.466	0.490	0.486	0.490	0.462	0.406	0.439	0.506	0.487	0.382	0.308	0.457	0.355
GPI1														
(N)	66	88	48	37	50	52	53	41	83	42	52	13	27	38
85	0.379	0.420	0.333	0.419	0.450	0.327	0.462	0.366	0.440	0.405	0.471	0.269	0.426	0.408
100	0.621	0.580	0.667	0.581	0.550	0.673	0.538	0.634	0.560	0.595	0.529	0.731	0.574	0.592
GPI3														
(N)	66	88	48	37	50	52	53	41	83	42	52	13	27	38
100	0.924	0.909	0.948	0.932	0.930	0.952	0.962	0.927	0.904	0.917	0.952	0.923	1.000	0.947
108	0.076	0.091	0.052	0.068	0.070	0.048	0.038	0.073	0.096	0.083	0.048	0.077	0.000	0.053
PGM1														
(N)	50	71	48	35	44	51	53	41	80	41	49	13	31	38
90	0.200	0.120	0.167	0.129	0.193	0.147	0.132	0.195	0.169	0.122	0.204	0.154	0.113	0.171
94	0.250	0.310	0.365	0.243	0.239	0.363	0.311	0.305	0.294	0.354	0.286	0.231	0.339	0.316
97	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.013
100	0.540	0.570	0.469	0.629	0.523	0.490	0.557	0.488	0.538	0.512	0.510	0.615	0.548	0.500
104	0.010	0.000	0.000	0.000	0.045	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabella 17. Exact-test per singolo locus tra coppie di campioni a diversa salinità (risultati significativi).

Locus	CAMPIONI			PROBABILITA'	E.S.
-----	-----	-----	-----	-----	-----
MPI	GRUPPO-G	&	GRUPPO-J	0.05	0.004
MPI	GRUPPO-G	&	GRUPPO-Z	0.03	0.003
ADA	GRUPPO-A	&	GRUPPO-OI	0.05	0.002
ADA	GRUPPO-D	&	GRUPPO-OI	0.04	0.001
ADA	GRUPPO-H	&	GRUPPO-OI	0.04	0.002
ADA	GRUPPO-N	&	GRUPPO-OI	0.03	0.002
ADA	GRUPPO-OI	&	GRUPPO-L	0.01	0.001
ADA	GRUPPO-L	&	GRUPPO-Z	0.02	0.001
GPI1	GRUPPO-A	&	GRUPPO-J	0.05	0.003
GPI1	GRUPPO-P	&	GRUPPO-N	0.05	0.003
GPI1	GRUPPO-N	&	GRUPPO-J	0.04	0.003
GPI3	GRUPPO-L	&	GRUPPO-G	0.05	0.001
PGM1	GRUPPO-H	&	GRUPPO-G	0.05	0.005
-----	-----	-----	-----	-----	-----

Va sottolineato che in alcuni casi differenze significative scaturiscono dal confronto tra campioni prelevati nello stesso bacino, anche a breve distanza di tempo (in evidenza).

In tabella 18 sono riportate le deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg risultate significative per questi gruppi.

Tabella 18. Deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg in campioni di *A. fasciatus* raggruppati per valori di salinità (risultati significativi)

LOCI	GENOTIPI	FREQUENZE OSSERVATE	FREQUENZE ATTESE	CHI- QUADRO	GRADI DI LIBERTA'	PROBABILITA'
Campione: A						
MPI	100-100	9	12.505	4.099	1	0.043
	100-104	31	23.990			
	104-104	8	11.505			
Campione: P						
PGM1	- HOMOZYGOTES FOR MOST COMMON ALLELE	12	16.420	6.051	1	0.014
	- COMMON/RARE HETEROZYGOTES	35	26.160			
	- RARE HOMOZYGOTES AND OTHER HETEROZYGOTES	6	10.420			
Campione: F						
GPI1	85-85	2	5.488	5.512	1	0.019
	85-100	26	19.024			
	100-100	13	16.488			
PGM1	- HOMOZYGOTES FOR MOST COMMON ALLELE	14	9.756	7.037	1	0.008
	- COMMON/RARE HETEROZYGOTES	12	20.488			
	- RARE HOMOZYGOTES AND OTHER HETEROZYGOTES	15	10.756			
Campione: L						
ADA	100-100	19	15.779	6.092	1	0.014
	100-108	9	15.443			
	108-108	7	3.779			
Campione: Z						
MPI	100-100	13	15.796	3.921	1	0.048
	100-104	23	17.408			
	104-104	2	4.796			
GPI1	85-85	2	6.322	8.429	1	0.004
	85-100	27	18.355			
	100-100	9	13.322			

Si noti che quattro dei cinque loci considerati presentano deviazioni significative dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Nel locus *Ada* ricompare un deficit di eterozigoti già presente nel 1998 e nel 2003 nelle vasche a nord; questa volta il deficit si realizza nella zona più a sud, anche se in condizioni in parte alterate a causa degli eventi alluvionali occorsi. Riguardo ai loci *Mpi* e *Gpi*, gli eccessi di eterozigoti significativi corrispondono a campioni prelevati in occasione di repentini cambiamenti delle condizioni ambientali, quali eventi alluvionali (gruppo A) o improvviso afflusso di acqua ipersalata (gruppo Z), od ancora in uno dei campioni raccolti a maggiore salinità (gruppo F), indicando un generico vantaggio degli eterozigoti in queste condizioni. Va altresì precisato che queste deviazioni non ricompaiono più in campioni successivi provenienti dalle medesime stazioni (ad esempio i gruppi G ed R), suggerendo semmai una maggiore vitalità legata al genotipo eterozigote, più che una vera selezione in favore di questo.

Detto ciò, nessuna frequenza allelica ad alcun locus ha mostrato quel particolare andamento “clinale” osservato nel 2003 e che aveva fatto ipotizzare una possibile correlazione fra salinità e frequenze alleliche. Infatti, la stima del coefficiente di Pearson tra le frequenze alleliche dei campioni ed il valore di salinità ad essi associato ha prodotto valori di rho molto bassi e comunque non significativi (tabella 19). Considerazioni analoghe a quelle riguardanti la salinità valgono per gli altri due parametri (ossigeno disciolto e temperatura): anche in questo caso, dove possibile, gli individui saggiati sono stati raggruppati in base a valori simili registrati durante il campionamento ed i risultati delle analisi, danno generica indicazione di una certa variabilità e di forze agenti sulla popolazione (differenze significative tra le frequenze alleliche, deviazioni da H.W.), mentre è risultata un'unica correlazione significativa tra le frequenze dell'allele *Pgm-1*⁹⁴ e le temperature registrate (tabella 19). Tale correlazione positiva è stata ottenuta riunendo gli individui in soltanto quattro raggruppamenti, in quanto i valori di temperatura registrati sono molto vicini tra loro (5,7-6,1°C; 23,9-24,9°C; 26,1-29°C zona centrale; 26-28,1°C zona sud); inoltre il medesimo allele è risultato precedentemente correlato positivamente con la salinità (I e II campionamento 2003), e questo risultato non è stato confermato in questa occasione. Quindi, come si vedrà anche in seguito, su questo locus si sono ottenute indicazioni tutt'altro che univoche, che coinvolgono più di un allele e tutti i macrodescrittori

considerati (vedi anche tabella 26); è quindi necessario considerare tali indicazioni con estrema cautela.

I risultati finora descritti non permettono quindi di avvalorare l'ipotesi della selezione quale forza preponderante generante la non casuale distribuzione dei genotipi che è stata osservata all'interno delle vasche sia nel 2003 che nel 2004-2005.

Tabella 19. Correlazione fra parametri ambientali e frequenze alleliche.

Coefficienti di correlazione di Pearson, N = 8								
Prob > r rispetto a H0: Rho=0								
	Gpi1 ¹⁰⁰	Mpi ¹⁰⁰	Ada ¹⁰⁰	Gpi3 ¹⁰⁰	Pgm1 ⁹⁰	Pgm1 ⁹⁴	Pgm1 ¹⁰⁰	Pgm1 ¹⁰⁴
Ossigeno	-0,061	0,321	-0,410	-0,493	0,398	-0,241	-0,148	0,497
p-value	0,886	0,439	0,314	0,214	0,329	0,565	0,726	0,210

Coefficienti di correlazione di Pearson, N = 4								
Prob > r rispetto a H0: Rho=0								
	Gpi1 ¹⁰⁰	Mpi ¹⁰⁰	Ada ¹⁰⁰	Gpi3 ¹⁰⁰	Pgm1 ⁹⁰	Pgm1 ⁹⁴	Pgm1 ¹⁰⁰	Pgm1 ¹⁰⁴
Temperatura	0,553	0,727	0,370	0,348	-0,347	0,997	0,357	-0,683
p-value	0,447	0,273	0,630	0,652	0,653	0,023	0,643	0,317

Coefficienti di correlazione di Pearson, N = 14								
Prob > r rispetto a H0: Rho=0								
	Gpi1 ¹⁰⁰	Mpi ¹⁰⁰	Ada ¹⁰⁰	Gpi3 ¹⁰⁰	Pgm1 ⁹⁰	Pgm1 ⁹⁴	Pgm1 ¹⁰⁰	Pgm1 ¹⁰⁴
SALINITA'	0,316	-0,050	0,222	-0,528	0,241	0,185	-0,302	-0,067
p-value	0,269	0,863	0,444	0,052	0,404	0,524	0,292	0,819

7.2.2 – Habitat Choice

Il fenomeno dell'habitat choice si può manifestare quando, in ambienti particolarmente eterogenei, gli individui si trovano a poter scegliere tra le diverse tessere ambientali che costituiscono l'ambiente. In tali condizioni è possibile a volte riscontrare una distribuzione non casuale degli individui nei diversi microhabitat in funzione del loro genotipo.

L'ipotesi dell'habitat choice è stata presa in considerazione partendo da una serie di osservazioni dirette effettuate sul campo: in occasione dei campionamenti si è notato che alcuni gruppi di individui di *A. fasciatus* mostravano una spiccata preferenza per particolari microhabitat, caratterizzati da condizioni ambientali differenti. Per quanto riguarda la zona centrale, mantenuta isolata allo scopo di estremizzarne le condizioni, questo comportamento si manifestava nell'addensamento degli individui in prossimità di chiuse che separavano i canali da bacini limitrofi, dai quali filtrava acqua relativamente più dolce. Nella zona sud, dove gli animali erano meno ostacolati nella loro possibilità di movimento, la distribuzione differenziale degli individui si verificava tra vasche e canali contigui ed in comunicazione tra loro, nei quali, a causa di un differente idrodinamismo, si instauravano condizioni differenti.

Tenendo conto di questo fattore comportamentale, i campioni sono stati considerati in funzione della specifica collocazione in una determinata tessera ambientale per cui, rispetto alla tabella 15, alcuni campioni di dimensioni ridotte sono stati raggruppati sulla base dell'appartenenza a microhabitat simili, laddove la similarità dei valori dei macrodescrittori lo ha reso possibile:

W=QI+QIII (campionati in prossimità della chiusa canale limitrofo vasca 21)

V=OII+OIV (campionati nel canale limitrofo alle vasche 34 e 35)

Y=OIII+OV (campionati nella vasca 34)

In altri casi sono stati mantenuti separati i gruppi campionati in punti differenti dello stesso bacino, anche se, in virtù della loro appartenenza alla stessa stazione di

campionamento, della stessa data di prelievo e della similarità dei valori dei parametri ambientali, risultano uniti nella ipotesi della selezione. È il caso dei gruppi:

QII (ex parte di F)

QIV ed S (ex G)

T ed U (ex J)

I campioni presi in esame secondo questo criterio sono riportati nella tabella seguente.

Tabella 20. Campioni di *A. fasciatus* in base al criterio della scelta del microhabitat.

gruppo	stazione	individui
N	Vasca e canale 23	52
P	Canale 23uscita sud	53
QII	Canale 23	12
W	Canale 21	29
QIV	Canale 23	40
S	Canale 21	43
U	Canale 23	42
T	Canale 21	10
V	Canale 34-35	14
Y	Vasca 34	28

I campioni riportati in tabella 19 sono risultati idonei per le correlazioni tra frequenze alleliche e genotipiche, sia con i valori salinità che di ossigeno disciolto e temperatura, in virtù del fatto che i raggruppamenti eseguiti presentano valori, nei singoli gruppi di cui sono costituiti, simili per tutti i parametri (vedi tabella 2).

Anche in questo caso le frequenze alleliche dei loci considerati (tabella 21), rivelano una certa variabilità. Nel valutare la significatività di queste differenze (tabella 22), nel caso della ipotesi di una scelta preferenziale dell'habitat legata al proprio genotipo, si deve porre particolare attenzione ad alcuni specifici confronti tra coppie di campioni. Si tratta dei gruppi raccolti nella stessa stazione, a breve distanza gli uni dagli altri, in date coincidenti (o a pochi giorni di distanza) in cui però gli

esemplari risultavano distribuiti in modo frammentato (ad esempio N con P; QII con W; QIV con S; U con T e Y con V); i campionamenti di questi individui sono stati effettuati con nasse non innescate, quindi la distribuzione non omogenea degli individui si può, ad ogni buon conto, considerare spontanea e le differenze che ne risultano in termini di frequenze alleliche, in alcuni casi risultano statisticamente significative.

Tabella 21. Frequenze alleliche nei campioni raggruppati per scelta di microhabitat.

LOCUS	CAMPIONI									
	N	P	QII	W	QIV	S	U	T	V	Y
MPI										
(N)	52	53	12	29	39	43	41	10	14	27
100	0.538	0.594	0.542	0.569	0.526	0.465	0.561	0.850	0.500	0.556
104	0.462	0.406	0.458	0.431	0.474	0.535	0.439	0.150	0.500	0.444
ADA										
(N)	52	53	12	29	40	43	28	10	8	27
100	0.663	0.698	0.792	0.707	0.750	0.686	0.714	0.850	0.937	0.593
108	0.337	0.302	0.208	0.293	0.250	0.314	0.286	0.150	0.062	0.407
GPI1										
(N)	52	53	12	29	40	43	42	10	14	19
85	0.327	0.462	0.333	0.379	0.400	0.477	0.429	0.650	0.286	0.500
100	0.673	0.538	0.667	0.621	0.600	0.523	0.571	0.350	0.714	0.500
GPI3										
(N)	52	53	12	29	40	43	42	10	14	19
100	0.952	0.962	0.875	0.948	0.900	0.907	0.964	0.900	1.000	1.000
108	0.048	0.038	0.125	0.052	0.100	0.093	0.036	0.100	0.000	0.000
PGM1										
(N)	51	53	12	29	39	41	41	8	12	23
90	0.147	0.132	0.208	0.190	0.128	0.207	0.232	0.062	0.083	0.109
94	0.363	0.311	0.292	0.310	0.282	0.305	0.293	0.250	0.292	0.370
97	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
100	0.490	0.557	0.500	0.483	0.590	0.488	0.476	0.687	0.625	0.522
104	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabella 22. Exact-test per singolo locus tra coppie di campioni raggruppati in base al criterio della scelta del microhabitat (risultati significativi). In evidenza le coppie di campioni prelevati in punti differenti dello stesso bacino.

Locus	CAMPIONI		PROBABILITA'	E.S.
MPI	GRUPPO-N	& GRUPPO-T	0.01	0.004
MPI	GRUPPO-W	& GRUPPO-T	0.03	0.003
MPI	GRUPPO-QII&	GRUPPO-T	0.05	0.003
MPI	GRUPPO-QIV&	GRUPPO-T	0.01	0.003
MPI	GRUPPO-U	& GRUPPO-T	0.02	0.003
ADA	GRUPPO-V	& GRUPPO-Y	0.01	0.002
ADA	GRUPPO-N	& GRUPPO-V	0.04	0.001
ADA	GRUPPO-T	& GRUPPO-Y	0.05	0.002
GPI1	GRUPPO-P	& GRUPPO-N	0.05	0.003
GPI1	GRUPPO-S	& GRUPPO-N	0.04	0.003
GPI1	GRUPPO-N	& GRUPPO-T	0.01	0.003
GPI1	GRUPPO-W	& GRUPPO-T	0.04	0.003
GPI1	GRUPPO-V	& GRUPPO-T	0.02	0.003
GPI3	GRUPPO-QII	& GRUPPO-Y	0.05	0.001
GPI3	GRUPPO-QIV	& GRUPPO-Y	0.05	0.001

Alcuni di questi campioni mostrano delle deviazioni statisticamente significative delle frequenze genotipiche osservate, rispetto alle attese, in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg (Tab. 23). Dai dati finora esposti emerge che lo scostamento dall'equilibrio di Hardy-Weinberg è un fenomeno diffuso che riguarda più di un locus; va altresì sottolineato che anche in questo caso lo scostamento per il locus *Ada* si presenta come un deficit di eterozigoti.

Tabella 23. Deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg in campioni di *A. fasciatus* raggruppati per scelta di microhabitat (risultati significativi).

LOCI	GENOTIPI	FREQUENZE OSSERVATE	FREQUENZE ATTESE	CHI - QUADRO	GRADI DI LIBERTA'	PROBABILITA'
Campione: P						
PGM1						
	- HOMOZYGOTES FOR MOST COMMON ALLELE	12	16.420			
	- COMMON/RARE HETEROZYGOTES	35	26.160			
	- RARE HOMOZYGOTES AND OTHER HETEROZYGOTES	6	10.420			
				6.051	1	0.014
Campione W						
PGM1						
	- HOMOZYGOTES FOR MOST COMMON ALLELE	11	6.759			
	- COMMON/RARE HETEROZYGOTES	6	14.483			
	- RARE HOMOZYGOTES AND OTHER HETEROZYGOTES	12	7.759			
				9.949	1	0.002
Campione Y						
ADA						
	100-100	12	9.358			
	100-108	8	13.283			
	108-108	7	4.358			
				4.448	1	0.035

Per cercare di comprendere meglio quale ruolo possa svolgere l'ambiente rispetto al pattern di distribuzione appena descritto, è stato calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson tra le frequenze alleliche ed i valori di temperatura, salinità ed ossigeno disciolto per ciascun campione (Tab. 24).

Tabella 24. Correlazione fra parametri ambientali e frequenze alleliche.

Coefficienti di correlazione di Pearson, N = 10									
Prob > r rispetto a H0: Rho=0									
		Gpi1 ¹⁰⁰	Mpi ¹⁰⁰	Ada ¹⁰⁰	Gpi3 ¹⁰⁰	Pgm1 ⁹⁰	Pgm1 ⁹⁴	Pgm1 ¹⁰⁰	Pgm1 ¹⁰⁴
TEMPERATURA	rho	0,3570	-0,3162	0,2031	-0,2039	0,0405	-0,1770	0,0242	0,4127
	P-value	0,3113	0,3733	0,5736	0,5721	0,9115	0,6246	0,9472	0,2359
		Gpi1 ¹⁰⁰	Mpi ¹⁰⁰	Ada ¹⁰⁰	Gpi3 ¹⁰⁰	Pgm1 ⁹⁰	Pgm1 ⁹⁴	Pgm1 ¹⁰⁰	Pgm1 ¹⁰⁴
OSSIGENO	rho	-0,1660	-0,1448	-0,8805	-0,0476	0,2982	0,5971	-0,5488	0,1408
	P-value	0,6468	0,6897	0,0008	0,8960	0,4027	0,0684	0,1004	0,6981
		Gpi1 ¹⁰⁰	Mpi ¹⁰⁰	Ada ¹⁰⁰	Gpi3 ¹⁰⁰	Pgm1 ⁹⁰	Pgm1 ⁹⁴	Pgm1 ¹⁰⁰	Pgm1 ¹⁰⁴
SALINITA'	rho	0,0847	-0,1813	0,1048	-0,7131	0,4454	-0,4519	-0,1582	0,3480
	P-value	0,8161	0,6162	0,7732	0,0206	0,1971	0,1898	0,6624	0,3244

Non è risultata alcuna correlazione significativa fra temperatura e frequenze alleliche, pertanto questo parametro non sembra influenzare, almeno direttamente, la distribuzione degli alleli.

La salinità risulta significativamente correlata ($P = 0,02$) con la frequenza dell'allele 100 al locus *Gpi-3*: questo risultato era già emerso dalle correlazioni fatte con i campioni del 2003, anche se in modo non significativo per quanto riguarda il primo campionamento ($\rho = -0,8921$ $P=0,1$). A questo proposito è bene ricordare che il valore di p è spesso determinato dall'ampiezza del campione, per cui un valore di p alto non necessariamente esclude la correlazione, ma indica la necessità di ampliare il campione.

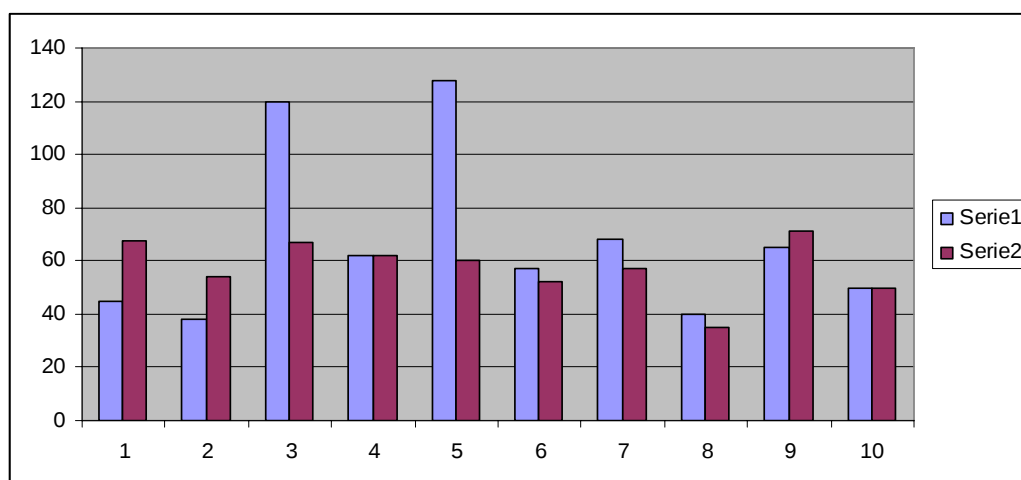
Nessun'altra frequenza allelica è risultata correlata con questo parametro; per quanto riguarda il locus *Gpi-1*, si è ulteriormente indagato per tentare di dare una spiegazione, oltre che all'alta correlazione risultata nel 2003, anche all'evidente andamento clinale riscontrato nel medesimo campione, parallelo all'aumento di concentrazione salina.

Dando credito alle osservazioni fatte sul campo si sono utilizzati, per una nuova analisi delle correlazioni, i valori di salinità registrati al di là delle chiuse (condizioni ambientali che tali individui sembravano voler raggiungere). In tal modo, nei confronti a coppie, si registra il ripetersi di un fenomeno per cui a frequenze relativamente più alte dell'allele *Gpi-1*¹⁰⁰ corrispondono sub-campioni provenienti da zone poste a distanza da tali chiuse (confronti N - P; QII - W; QIV - S; U - T) o, nel caso della zona

sud dove tali barriere erano assenti, da zone a salinità più elevata (confronto V - Y); questo andamento è riportato in figura 8.

Figura 8 Andamento delle frequenze alleliche *Gpi-1*¹⁰⁰: i diversi colori indicano le coppie di confronto; in grassetto i valori di salinità “sostituiti” (vedi testo per maggiori spiegazioni).

numero graf.	gruppo	salinità ‰ serie 1	freq. <i>Gpi-1</i> ¹⁰⁰ % serie 2
1	N	45	67,3
2	P	38	53,8
3	QII	120	66,7
4	W	62	62,1
5	QIV	128	60
6	S	57	52,3
7	U	68	57,1
8	T	40	35
9	V	65	71,4
10	Y	50	50



Questa ipotesi è in accordo con quanto riscontrato in precedenza e fornisce una spiegazione plausibile della correlazione tra salinità e frequenze alleliche in questo locus per gli individui del primo campionamento del 2003, in quanto questo è stato effettuato in un periodo in cui i bacini erano per lo più in comunicazione tra loro, consentendo ai pesci di spostarsi liberamente all'interno dell'impianto. Ciò premesso va precisato che, per quanto l'indice di correlazione risulti più alto ($\rho=0,40514$), l'ipotesi non è confermata statisticamente e le eventuali relazioni tra frequenze alleliche ed i parametri ambientali per questo locus restano di difficile interpretazione.

Particolarmente interessante è risultata la correlazione fra la concentrazione di ossigeno disciolto e le frequenze dell'allele 100 al locus *Ada*; si tratta di un locus che, diversamente da *Gpi-3*, presenta solo 2 alleli a frequenze comparabili, quindi con probabilità bilanciate di aumentare la propria frequenza di generazione in generazione per semplice deriva genetica. Le fluttuazioni che si registrano sono quindi meno attribuibili al caso e, per tale motivo, la correlazione con la concentrazione di ossigeno disciolto è da considerarsi più rilevante. Anche in questo caso si osserva una correlazione negativa altamente significativa ($P < 0,01$) in cui l'allele 100 risulta a più alta frequenza nei siti caratterizzati da una bassa concentrazione di ossigeno disciolto.

Per confermare quanto emerso con questa correlazione si è condotto un exact test sulle frequenze genotipiche; si ritiene infatti che, se la correlazione è reale, allora i genotipi omozigoti per questo allele dovrebbero essere maggiormente presenti in ambienti poveri di ossigeno. In effetti i campioni caratterizzati da una minore concentrazione di ossigeno presentano, proporzionalmente alla dimensione del campione, un numero maggiore di omozigoti per l'allele *Ada 100* ed in tre casi le differenze nelle frequenze genotipiche sono risultate statisticamente significative (tabella 25).

Tabella 25 Risultati dell'exact test sulle frequenze genotipiche per il locus *Ada*.

Locus: ADA				
=====				
Genotypes:				

Pop:	100	100	108	
	100	108	108	All

VASCA-P	28	18	7	53
VASCA-N	22	25	5	52
VASCA-W	15	11	3	29
VASCA-QII	8	3	1	12
VASCA-QIV	24	12	4	40
VASCA-S	19	21	3	43
VASCA-T	7	3	0	10
VASCA-U	14	12	2	28
VASCA-V	7	1	0	8
VASCA-Y	12	8	7	27
VASCA-C	22	11	7	40
VASCA-Z	23	14	1	38

Locus	CAMPIONI		PROBABILITA'	E.S.
-----	-----		-----	-----
ADA	VASCA-V &	VASCA-N	0.02059	0.00109
ADA	VASCA-V &	VASCA-S	0.03225	0.00134
ADA	VASCA-Y &	VASCA-V	0.02987	0.00139

Se ne deduce che anche l'exact test condotto sulle frequenze genotipiche indica che gli omozigoti per questo allele sono presenti in maggior numero ed in modo statisticamente rilevante laddove la concentrazione di ossigeno è scarsa.

Ottenuto questo risultato si è voluto verificare se fossero evidenziabili correlazioni tra i valori dei parametri ambientali e struttura genetica dei diversi subdemi, questa volta utilizzando a tale scopo le frequenze genotipiche. Nella tabella seguente (tabella 26) sono riportati i risultati dell'indice di correlazione di Pearson condotto a questo scopo.

Tabella 26. Correlazione fra parametri ambientali e frequenze genotipiche: in evidenza le correlazioni significative.

Coefficienti di correlazione di Pearson, N = 10 (popolazioni: N, P, QII, W, QIV, S, U, T, V, Y)																			
Prob > r rispetto a H0: Rho=0																			
	<u>gpi1_1</u>	<u>gpi1_2</u>	<u>gpi1_3</u>	<u>Mpi_1</u>	<u>Mpi_2</u>	<u>Mpi_3</u>	<u>ada_1</u>	<u>ada_2</u>	<u>ada_3</u>	<u>pgm1_1</u>	<u>pgm1_2</u>	<u>pgm1_3</u>	<u>pgm1_4</u>	<u>pgm1_5</u>	<u>pgm1_6</u>	<u>pgm1_7</u>	<u>gpi3_1</u>	<u>gpi3_2</u>	<u>gpi3_3</u>
Temperatura	-0,529	0,562	0,119	-0,271	0,258	0,209	0,326	-0,481	0,092	0,380	-0,006	-0,213	-0,041	-0,125	0,178	0,413	-0,184	0,161	0,269
p-value	0,116	0,091	0,743	0,448	0,471	0,562	0,357	0,160	0,800	0,279	0,986	0,556	0,910	0,732	0,623	0,236	0,612	0,656	0,453
	<u>gpi1_1</u>	<u>gpi1_2</u>	<u>gpi1_3</u>	<u>Mpi_1</u>	<u>Mpi_2</u>	<u>Mpi_3</u>	<u>ada¹⁰⁰</u>	<u>ada^{et}</u>	<u>ada_3</u>	<u>pgm1⁹⁰</u>	<u>pgm1_2</u>	<u>pgm1_3</u>	<u>pgm1_4</u>	<u>pgm1_5</u>	<u>pgm1_6</u>	<u>pgm1_7</u>	<u>gpi3_1</u>	<u>gpi3_2</u>	<u>gpi3_3</u>
Ossigeno	0,115	0,097	-0,196	-0,065	0,008	0,116	-0,923	0,814	0,570	-0,699	0,508	0,555	0,313	-0,115	-0,577	0,141	-0,049	0,051	-0,007
p-value	0,752	0,790	0,588	0,859	0,983	0,750	0,000	0,004	0,086	0,025	0,134	0,096	0,379	0,751	0,081	0,698	0,893	0,889	0,984
	<u>gpi1_1</u>	<u>gpi1_2</u>	<u>gpi1_3</u>	<u>Mpi_1</u>	<u>Mpi_2</u>	<u>Mpi_3</u>	<u>ada_1</u>	<u>ada_2</u>	<u>ada_3</u>	<u>pgm1_1</u>	<u>pgm1_2</u>	<u>pgm1_3</u>	<u>pgm1_4</u>	<u>pgm1_5</u>	<u>pgm1_6</u>	<u>pgm1_7</u>	<u>gpi3¹⁰⁰</u>	<u>gpi3^{et}</u>	<u>gpi3_3</u>
Salinità	-0,202	0,341	-0,052	-0,234	0,186	0,226	0,050	0,067	-0,200	0,082	0,374	0,260	0,052	-0,576	0,058	0,348	-0,692	0,664	0,430
p-value	0,576	0,335	0,886	0,516	0,607	0,531	0,891	0,854	0,579	0,822	0,287	0,468	0,886	0,082	0,874	0,324	0,027	0,036	0,215

La correlazione negativa tra ossigeno e frequenza del genotipo omozigote *Ada*¹⁰⁰ è molto alta ed altamente significativa (ancor più della frequenza allelica) mentre la frequenza degli eterozigoti è correlata positivamente alla concentrazione di ossigeno disciolto. In altre parole, come ci si attendeva, al diminuire della concentrazione di ossigeno aumentano gli individui con genotipo omozigote *Ada*¹⁰⁰, mentre diminuiscono gli eterozigoti. Quest'ultimo dato è inoltre in accordo con i frequenti deficit di eterozigoti che si sono evidenziati per questo locus (se è vero che il comparto acquatico è sottoposto ad occasionali crisi anossiche, i deficit di eterozigoti riscontrati potrebbero trovare giustificazione in questa correlazione tra frequenza degli eterozigoti e concentrazione di ossigeno).

Come prevedibile in base alle correlazioni esistenti tra parametri ambientali e frequenze alleliche, anche il genotipo omozigote *Gpi-3*¹⁰⁰ è correlato negativamente con la concentrazione salina dei bacini, mentre gli eterozigoti per questo locus presentano una correlazione positiva. Infine, inedita e per ora senza altri riscontri, è la correlazione esistente tra la salinità e la frequenza dell'omozigote *Pgm-1*⁹⁰.

È il caso di ricordare che tutti i risultati fin qui esposti, sono stati ottenuti con elaborazioni condotte nell'ottica di una scelta preferenziale dell'habitat da parte degli individui in relazione al proprio genotipo (habitat choice).

Alla luce di quanto esposto si è ipotizzato che, se l'allele *Ada*¹⁰⁰ è legato preferibilmente ad ambienti poveri di ossigeno (visto il peggioramento graduale delle condizioni ambientali, che implica come primo effetto della eutrofizzazione la carenza di ossigeno nel comparto acquatico), si sarebbe potuta verificare nel corso degli anni, una selezione in favore di tale variante; inoltre, sempre in virtù delle correlazioni riscontrate, risulterebbe prevedibile una maggior incidenza di questa variante allelica nelle zone meridionale dell'impianto, dove per le caratteristiche intrinseche dei bacini, la concentrazione di ossigeno disciolto è mediamente inferiore. Per verificare quanto ipotizzato i dati sono stati elaborati costituendo gruppi composti da tutti gli individui campionati nello stesso anno e, per ogni singolo anno, tre gruppi composti da individui campionati nella zona settentrionale, centrale e meridionale della Salina, rispettivamente.

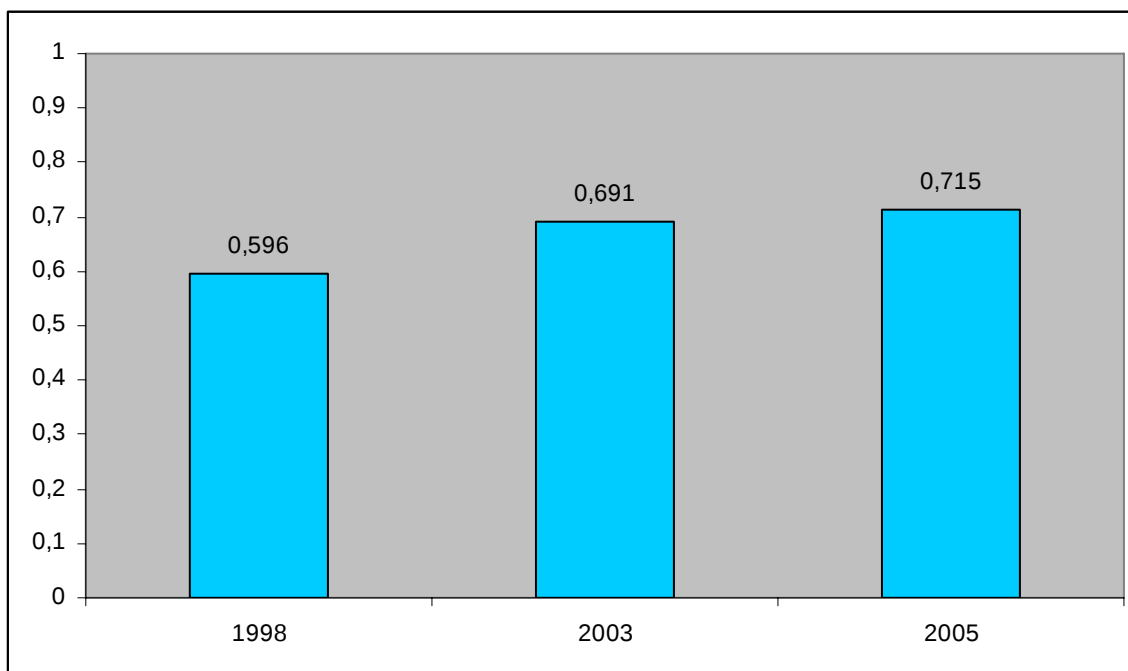
In tabella 27 sono riportati i valori delle frequenze alleliche della totalità degli individui divisi per anno di appartenenza e nell'istogramma della figura 9 è evidenziato l'andamento negli anni per l'allele *Ada*¹⁰⁰.

Tabella 27: frequenze alleliche degli individui divisi per anno di appartenenza: in evidenza i loci per i quali le differenze nelle frequenze alleliche sono risultate significative.

	POPULATION		
LOCUS	1998	2003	2005

ADA			
(N)	47	275	501
94	0.011	0.000	0.000
100	0.596	0.691	0.715
108	0.394	0.309	0.285
MPI			
(N)	92	300	700
100	0.652	0.532	0.545
104	0.342	0.468	0.455
107	0.005	0.000	0.000
PGM1			
(N)	78	241	650
90	0.167	0.135	0.158
94	0.237	0.309	0.304
97	0.000	0.000	0.002
100	0.564	0.552	0.532
104	0.032	0.004	0.005

Figura 9. Istogrammi delle frequenze alleliche al locus *Ada* negli anni 1998, 2003, 2005.



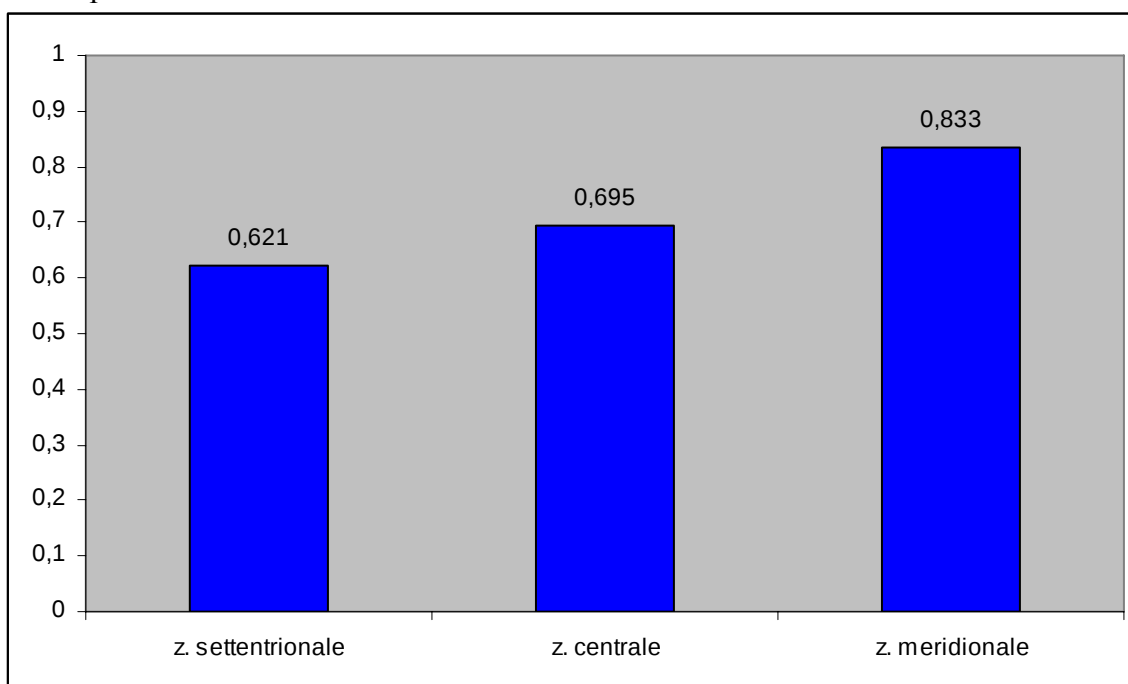
Come si vede la frequenza dell'allele 100, relativa alla totalità degli individui campionati nei diversi anni, cresce nel tempo passando dal 59,6% del 1998 al 69,1% del 2003 fino ad arrivare al 71,5% del 2005. L'exact test conferma la significatività delle differenze tra le frequenze alleliche osservate per i loci *Ada*, *Mpi* e *Pgm-1* ($P < 0.03$); nei confronti a coppie di campioni, per tutti e tre i loci le differenze risultano significative tra il 1998 ed il 2003 e tra il 1998 ed il 2005 (in accordo con il fatto che a breve distanza di tempo gli effetti di una selezione in corso siano meno evidenti).

Relativamente al confronto tra le tre zone in cui è stata virtualmente suddivisa la salina, si riportano i dati relativi al 2003, che costituisce il campione più completo (nel 1998 si hanno dati relativi solo alla zona settentrionale, mentre nel 2005 pur avendo campionato in tutta la salina, non si hanno a disposizione dati per la zona settentrionale, in seguito al deterioramento del materiale dei campioni che non ha permesso la lettura del locus *Ada*). Anche in questo caso si riportano le frequenze alleliche nella tabella che segue, e l'andamento delle frequenze dell'allele *Ada*¹⁰⁰ in figura 10.

Tabella 28: frequenze alleliche degli individui divisi per l'anno 2003 nelle tre zone dell'impianto: in evidenza i loci per i quali le differenze nelle frequenze alleliche sono risultate significative.

LOCUS	POPULATION		
	nord	centro	sud
ADA			
(N)	87	149	39
100	0.621	0.695	0.833
108	0.379	0.305	0.167
MPI			
(N)	102	163	35
100	0.544	0.525	0.529
104	0.456	0.475	0.471
GPI1			
(N)	109	168	44
85	0.413	0.354	0.341
100	0.587	0.646	0.659
GPI3			
(N)	96	159	44
1	0.932	0.937	0.886
2	0.068	0.063	0.114
PGM1			
(N)	91	116	34
90	0.104	0.168	0.103
94	0.297	0.310	0.338
100	0.593	0.522	0.544
104	0.005	0.000	0.015
PGM2			
(N)	110	164	38
1	0.014	0.015	0.039
2	0.986	0.985	0.961

Figura 10. Istogrammi delle frequenze alleliche al locus *Ada* nel 2003 nelle tre zone dell'impianto.



Nel 2003 si osserva una variazione delle frequenze dell'allele 100 in rapporto alla zona di campionamento, passando dal 62,1% della zona settentrionale al 69,5% della zona centrale all'83,3% della zona meridionale; in questo caso, dall'applicazione dell'Exact test, i valori delle frequenze alleliche risultano significativamente differenti solo per il locus *Ada* ($P < 0.01$), e nei confronti a coppie le differenze risultano significative tra la zona nord e la zona sud e tra la zona centrale e la zona sud. Lo stesso aumento si registra anche considerando i due campionamenti del 2003 separatamente (dal 65,0% al 75,0% per il primo campionamento e dal 60,5% al 86,8% per il secondo campionamento). Pur non disponendo di dati relativi alla zona settentrionale, lo stesso tipo di andamento della frequenza dell'allele 100 è stato confermato nel 2005, registrando una frequenza del 70,7% nella zona centrale e del 75,6% nella zona meridionale. Ovviamente, con tali presupposti, cumulando i dati per appartenenza geografica indipendentemente dall'anno di campionamento, si ottengono risultati del tutto simili, con la frequenza dell'allele *Ada*¹⁰⁰ che va dal 60,9% della zona settentrionale al 70,4% e 78,0% delle zone centrale e meridionale rispettivamente.

I risultati di queste analisi sono in accordo con quanto teoricamente previsto. Inoltre, la coerenza dei risultati nei diversi anni, supporta in modo consistente l'ipotesi di pressioni selettive agenti su questo locus (o su loci ad esso legati), che favoriscono l'affermazione della variante allelica più frequente, la cui intensità di azione è maggiore nei bacini meridionali delle saline. I loci *Pgm-1* ed *Mpi*, sebbene sembrano subire cambiamenti significativi nella loro composizione allelica, forniscono invece indicazioni meno chiare ed univoche.

CAP. 8 – CONCLUSIONI

La popolazione di *A. fasciatus* delle Saline di Tarquinia è oggetto di studio presso il Laboratorio di Ecologia dell'Università della Tuscia dal 1998, quando vennero effettuati i primi campionamenti. Nella tesi di laurea di Luccioli (2000) venne presa in considerazione tale popolazione insieme ad altre 9 del bacino del Mediterraneo, per evidenziare la correlazione fra livello di variabilità genetica e stress ambientale (Cimmaruta *et al.*, 2003). Dal lavoro si evinse che la popolazione di Tarquinia mostrava i più alti livelli di variabilità genetica, indice di un ambiente sostanzialmente integro, anche se soggetto a forti escursioni stagionali dei parametri chimico-fisici. Questo è in accordo con l' "Ipotesi della regina rossa" in base alla quale, se la variabilità genetica è la risorsa che consente alle popolazioni naturali un'efficace risposta alla variabilità ambientale, allora stress ambientali di origine naturale dovrebbero mantenere e promuovere il polimorfismo nelle popolazioni.

Il calo di biodiversità a livello di specie scaturito dal confronto tra l'analisi della comunità macrozoobenthonica delle Saline del 1997 e del 2003, nonché l'attuale struttura della comunità di fondo molle, largamente rappresentata da specie tolleranti a condizioni di inquinamento di tipo organico, è stato interpretato come la conseguenza dell'accumulo di sedimenti e nutrienti sul fondo dei bacini e dei processi di eutrofizzazione connessi. Relativamente alla erosione genetica riscontrata in *A. fasciatus* l'ipotesi che il generale peggioramento e l'estremizzazione delle condizioni ambientali sia la causa principale del fenomeno, sembra essere anche in questo caso la più probabile. Crisi anossiche potrebbero aver causato occasionali drastiche riduzioni della popolazione e la riduzione della dimensione effettiva della popolazione. Queste condizioni avrebbero favorito la fissazione delle varianti più frequenti per deriva genetica casuale. In *Aphanius fasciatus* è stato dimostrato che in condizioni ambientali estreme, quindi con valori elevati di salinità, la specie risponde con l'interruzione dei processi riproduttivi e perfino con il riassorbimento delle uova stesse (Leonardos e Sinis, 1998).

In una condizione del genere, quindi, le marcate variazioni stagionali dei parametri ambientali (salinità, ossigeno disciolto, temperatura, etc.), che fino alla chiusura dell'impianto hanno promosso selettivamente il mantenimento di alti livelli di variabilità genetica, come base per un'efficace risposta delle popolazioni locali ai cambiamenti ambientali, sono probabilmente divenute una barriera per la sopravvivenza della specie, perlomeno nei bacini dove tali fluttuazioni dei parametri ambientali si sono fatte via via più estreme. Non si può inoltre escludere che la pressione selettiva costituita da questa estremizzazione possa aver giocato un ruolo nel modificare la struttura genetica della popolazione. Per cui la situazione attuale sarebbe il risultato dell'azione combinata di più forze, stocastiche e direzionali, distinguere le quali risulterebbe molto complesso, se non impossibile, anche se l'affermazione pressoché costante delle varianti alleliche più frequenti, fa supporre un peso preponderante delle prime. In ogni caso la perdita di sette varianti alleliche tra i loci enzimatici studiati, riscontrata dal confronto della struttura genetica nei due anni, si ripercuote sui principali parametri di variabilità genetica che a loro volta sono diminuiti in maniera significativa.

Il basso flusso genico, dovuto al fatto che questa specie vive in ambienti disgiunti e gli individui adulti hanno scarsa mobilità al di fuori del proprio habitat, non aiuta il mantenimento o il ripristino di livelli elevati di variabilità. La scomparsa di varianti alleliche risulta essere un evento difficilmente sanabile; infatti, se per la scomparsa di specie bentoniche è ipotizzabile una ricolonizzazione se le condizioni ambientali cambiassero, per il recupero di biodiversità a livello genetico si può confidare solo sull'esiguo flusso genico ed il lentissimo processo delle mutazioni. Tuttavia si tratta di una popolazione apparentemente abbastanza ampia, anche se non esistono studi che ne diano una sua stima reale, e distribuita in tessere ambientali anche molto diverse la cui variabilità genetica rimane una delle più alte tra quelle studiate a livello italiano.

L'erosione genetica riscontrata nella popolazione delle Saline di Tarquinia sembra, per alcuni aspetti, paragonabile a quella che si è probabilmente verificata in passato, per la stessa specie, nella laguna di Orbetello. Le due popolazioni di *Aphanius fasciatus* anche se geneticamente simili (Distanza genetica di Nei (1972): $D=0.010$; distanza genetica di Rogers modificata (Wright, 1978): $D=0.098$), poiché provenienti

da uno stesso cluster del medio Tirreno, presentano una notevole differenza per quanto riguarda la variabilità genetica espressa in eterozigosi media osservata e numero totale di alleli. Ciò sembra essere funzione del tipo di stress subito; il forte inquinamento cui è stata soggetta la laguna di Orbetello ha causato varie crisi anossiche che hanno ripetutamente decimato la popolazione locale di questa e di altre specie ittiche. I crolli demografici possono essere ritenuti responsabili della deriva genetica che ha causato la forte perdita di variabilità che caratterizza la popolazione di Orbetello. Nei bacini delle saline, quindi, si sta probabilmente delineando una situazione ecologica che, seppure di diversa origine, simula condizioni di elevato stress di natura antropica.

Gli ambienti salmastri sono caratterizzati per loro natura da una profonda instabilità dei parametri chimico-fisici, che si traduce in fluttuazioni temporali di tali parametri ed in cambiamenti anche bruschi dei loro valori su scale spaziali limitate. Tale caratteristica diviene particolarmente marcata nei bacini di piccole dimensioni, dove le fluttuazioni di salinità, temperatura, ed ossigeno disciolto sono molto profonde e si verificano in tempi brevi (Carrada, 1990). L'ambiente delle Saline di Tarquinia rientra nella categoria dei bacini di piccole dimensioni, costituendo un ambiente iperalino artificiale, creato dall'uomo, per la produzione di sale. Esso è caratterizzato da un centinaio di vasche di ridotta estensione e profondità, in cui le variazioni climatiche locali influenzano notevolmente i parametri ambientali.

Le fluttuazioni ambientali all'interno delle vasche della salina ricoprono un ruolo estremamente rilevante non solo nel determinare la composizione specifica della comunità, ma anche nello strutturare a livello demografico e, presumibilmente, genetico le popolazioni locali. Infatti, l'instabilità e la variabilità degli ambienti eterogenei impongono alle specie l'adozione di strategie adattative di lungo e breve periodo, che implicano risposte di tipo morfologico, riproduttivo, comportamentale ed evolutivo.

Negli ambienti salmastri, il parametro chimico-fisico che riveste il ruolo di maggiore importanza, è indubbiamente la salinità (Cognetti *et al.*, 1999). Ci sono infatti diversi lavori che testimoniano il ruolo selettivo svolto dalla salinità nei confronti della struttura genetica e del differenziamento delle popolazioni naturali in ambienti sia salmastri sia marini (*Mytilus edulis*, Hilbish e Koehn, 1985;

Dicentrarchus labrax, Lemaire *et al.*, 2000; *Merluccius merluccius*, Cimmaruta *et al.*, 2005).

In questo lavoro gli andamenti delle frequenze alleliche per alcuni loci, in particolare *Gpi-1*, *Gpi-3* ed *Ada* si prestano ad una interpretazione in termini di correlazione tra genotipo e parametri ambientali.

Le frequenze alleliche dell'isozima *Gpi-1* sono risultate correlate con il parametro salinità per i campioni raccolti nel 2003 provenienti dal primo campionamento. L'allele *Gpi1*⁸⁵, risulta correlato negativamente con il livello di salinità, quindi questo locus (o un locus ad esso legato) sembra essere sottoposto ad una pressione selettiva in favore della variante allelica *Gpi1*¹⁰⁰ in condizioni di salinità elevata. Già le analisi degli individui provenienti dal secondo campionamento del 2003 hanno dato indicazioni meno chiare in questo senso, e l'analisi dei dati raccolti negli anni successivi sembra escludere questa possibilità, visto che nessuna correlazione è stata evidenziata dai test statistici.

Qualche indicazione in più si ha invece se si esaminano i dati nell'ottica di una scelta selettiva dei microhabitat da parte degli individui, scelta correlata con il genotipo degli individui stessi. Se si dà credito alle osservazioni empiriche fatte sul campo e si utilizzano, per l'analisi dei dati, i valori di salinità registrati al di là delle chiuse (condizioni ambientali che tali individui sembravano voler raggiungere), si registra il ripetersi di un fenomeno per cui a frequenze relativamente più basse dell'allele *Gpi1*⁸⁵ corrispondono sub-campioni provenienti da zone poste a distanza da tali chiuse o, nel caso della zona sud dove tali barriere erano assenti, da zone a salinità più elevata. Questa ipotesi fornisce una spiegazione plausibile della correlazione tra salinità e frequenze alleliche in questo locus riscontrata per gli individui del primo campionamento, in quanto questo è stato effettuato in un periodo in cui i bacini erano per lo più in comunicazione tra loro, consentendo ai pesci di spostarsi liberamente all'interno dell'impianto. Ciò premesso va precisato che i test statistici confermano solo parzialmente l'ipotesi avanzata. Altro dato rilevante per il locus *Gpi1* è la presenza di eccessi di eterozigoti statisticamente significativi in alcuni sub-campioni prelevati in occasione di repentini cambiamenti delle condizioni ambientali, quali eventi alluvionali o improvviso afflusso di acqua ipersalata, indicando un generico vantaggio degli eterozigoti in queste condizioni.

Anche per *Gpi-3* le frequenze alleliche e genotipiche sono risultate correlate con i valori di salinità, sia in un'ottica di selezione (I e II campionamento 2003) che di habitat choice (campionamenti 2004-2005). Come già detto nel capitolo precedente, per quanto interessante (soprattutto per la ripetitività), la composizione allelica di questo locus, che vede la variante più frequente intorno al 90%, impone un atteggiamento prudente nel valutare il dato, in quanto non si può escludere un ruolo determinante della deriva nel definire le frequenze alleliche e le correlazioni sono scaturite da modeste variazioni percentuali delle frequenze. Inoltre per questo locus non si è registrato, come ci si sarebbe potuto attendere, una incidenza maggiore della variante allelica *Gpi-3*¹⁰⁸ nei bacini meridionali dell'impianto caratterizzati da salinità più elevate.

Relativamente al locus *Ada* le analisi statistiche sembrano escludere la selezione quale fattore dominante nel determinare le frequenze alleliche dei vari sub-campioni. Esaminando invece i dati in termini di "habitat choice" si evidenzia una interessante correlazione delle frequenze alleliche dei campioni con i valori di ossigeno disciolto. In questo caso la frequenza dell'allele *Ada*¹⁰⁰ risulta correlata negativamente alla concentrazione di ossigeno disciolto (mg/l), aumentando dove questo scarseggia e viceversa. Inoltre anche l'exact test condotto sulle frequenze genotipiche e la correlazione esistente tra tali frequenze e la concentrazione di ossigeno, indica che gli omozigoti per questo allele sono presenti in maggior numero ed in modo statisticamente significativo laddove la concentrazione di ossigeno è scarsa.

Queste correlazioni sono particolarmente rilevanti se si considerano anche i dati relativi ai campionamenti degli anni precedenti. Infatti, raggruppando i dati per anno di campionamento, questo allele aumenta la sua frequenza dal 1998 al 2005, progressivamente ed in modo statisticamente significativo. Analizzando poi i dati secondo un criterio geografico, da nord a sud, si registra lo stesso evento indipendentemente dalla campagna di campionamento che si prende in considerazione, ed in modo particolarmente evidente per i campioni del 2003.

Questi ultimi risultati sono in perfetto accordo con le caratteristiche ambientali delle diverse zone della salina: le vasche della zona settentrionale, in virtù della vicinanza con il mare e della sua azione mitigante e della loro maggiore profondità, risentono poco delle variazioni dei parametri ambientali. Grazie alla foce di Ponente

queste vasche ricevono costantemente acqua marina e questo si traduce in un'elevata ossigenazione. Tale fenomeno motiva la frequenza minore dell'allele *Ada*¹⁰⁰ rispetto alle restanti zone della salina. Scendendo verso la zona centrale la profondità delle vasche si riduce e di conseguenza la concentrazione di ossigeno disciolto diminuisce, come testimoniato anche dai popolamenti della comunità bentonica, anche perché il ricambio idrico è meno frequente. Infine, nella zona meridionale, l'influenza delle fluttuazioni ambientali diviene sempre più marcata, in relazione alla ridotta profondità delle vasche e alla maggiore distanza dal mare. Mentre per gli altri loci l'aspetto delle eventuali relazioni genotipo-ambiente, che coinvolge temi molto dibattuti in genetica ecologica, è risultato di difficile interpretazione, per *Ada* l'ipotesi dell'habitat choice è statisticamente confermata, e l'aumento della frequenza dell'allele *Ada*¹⁰⁰ nel tempo e da nord a sud risulta anch'esso significativo.

Per questo locus (o per loci a questo legati) è ipotizzabile una pressione selettiva leggera (soft selection) a favore di tale allele in condizioni di anossia. A questo proposito è il caso di porre l'accento sulla presenza dei numerosi deficit di eterozigoti che si verificano in questo locus, sia nei singoli sub-demi che nei raggruppamenti più ampi. Questo è uno dei dati più ricorrenti che la ricerca ha fornito, e, secondo i modelli teorici che scaturiscono dalla legge di Hardy-Weinberg, la pressione selettiva contro gli eterozigoti produce l'affermazione della variante allelica più frequente, come accade per il locus *Ada*. Questo dato, insieme alla correlazione positiva tra genotipi eterozigoti e concentrazione di ossigeno, fa supporre che questo meccanismo sia implicato nel processo di selezione in favore dell'allele *Ada*¹⁰⁰ (oltre alla selezione diretta in favore del genotipo omozigote per questo allele). Si noti che tutti i risultati ottenuti per questo locus sono coerenti tra loro, e con quanto teoricamente ipotizzato. Tale selezione, su scale temporali e spaziali ridotte, si esprimerebbe come distribuzione preferenziale degli individui nei microhabitat a disposizione più confacenti al proprio genotipo (habitat choice); questo rappresenterebbe un passo evolutivo di grande valore come prima risposta all'estrema variabilità di questo habitat. È quindi verosimile che un comportamento in parte condizionato dalle proprie caratteristiche genetiche sia evolutivamente favorito.

Infine è interessante notare la convergenza dei dati verso l'indicazione di un progressivo deterioramento delle condizioni ambientali della Riserva: da un lato il calo di biodiversità a livello di variabilità genetica della popolazione di *Aphanius fasciatus*, peraltro già riscontrata a livello di specie della comunità bentonica; dall'altro il progressivo affermarsi per il locus *Ada*, della variante allelica che risulta correlata con ambienti poveri di ossigeno disciolto. Con il peggioramento delle condizioni quindi, la specie subisce danni alle proprie potenzialità ecologiche, perdendo variabilità; contestualmente risponde in modo adattativo con l'affermazione delle varianti alleliche più rispondenti alla situazione attuale. Paradossalmente quello che oggi ha valore adattativo, potrebbe rivelarsi in futuro un limite nelle capacità di sopravvivenza della specie a mutamenti repentini delle condizioni, perdendosi quel polimorfismo genetico necessario per ogni processo evolutivo.

BIBLIOGRAFIA

ALFINITO S., IBERITE M., FUMANTI B., 1990. The algal microflora of the salt works of Tarquinia (Italy). *Hydrobiologia* 203: 137-146.

ALLAVENA S., 1976. Osservazioni di uccelli acquatici nell'Oasi delle Saline di Tarquinia. *Riv. Ital. orn.*, 46: 160 - 163.

ALLAVENA S., ZAPPAROLI M., 1992. Gestione e tutela della Riserva Naturale di Popolamento Animale Salina di Tarquinia. In: *L'ambiente nella Tuscia laziale* a cura di Olmi M. e Zapparoli M., pp: 189-192.

ALLAVENA S., ZAPPAROLI M., 1992. Aspetti faunistici della Riserva Naturale di Popolamento Animale Salina di Tarquinia ed aree adiacenti. In "L'ambiente nella Tuscia laziale" a cura di Olmi M. e Zapparoli M.; pp 209-216.

ALLEGRUCCI G., FORTUNATO C., CATAUDELLA S., SBORDONI V., 1994. Acclimation to fresh water of the sea bass: evidence of selective mortality and allozyme genotypes. In: (Ed. Beaumont A.) *Genetics and Evolution of Marine Organism*, pp. 486-502. Chapman & Hall, London.

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, pp: 347-358.

ALLEGRUCCI G., CACCONE A., CATAUDELLA S., POWELL J., SBORDONI V., 1995. Acclimation of the European sea bass to fresh water: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Marine Biology*, 121, pp: 591-599.

AYALA F., POWELL J.R., TRACEY M.L., MOURAU 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.

AVISE J.C., 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman&Hall, Londra - New York ;

AVISE J.C., HAMRICK J.L., 1996. Conservation Genetics. Chapman & Hall, New York.

BACCI G., 1954. Alcuni rilievi sulle faune di acque salmastre. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 25 (2), pp: 380-396.

BARNABE G., 1980. Exposé synoptique des données biologiques sur le loup ou bar, *Dicentrarchus labrax*. *Synop. FAO Pêches* 126-170.

BERTNESS M.D., GAINES S.D., 1993. Larval dispersal and local adaptation in acorn barnacles. *Evolution*, 47, pp: 316-320.

BIANCO P.G., 1988. I pesci d'acqua dolce d'Italia: note su un recente contributo. *Atti Soc. ital. sci. nat. Museo civ. stor. nat. Milano* 129, pp: 146-158.

BINAGLI G., 1929. Contributi alla conoscenza del *Cyprinodon (Lebia) calaritanus*. *R. Comitato Talassografico Ital.*, Mem CLXII (1929).

BLASI S., 1998. Caratterizzazione ecologica delle Saline di Tarquinia: II) Analisi spaziale della comunità macrozoobentonica. Univ. della Tuscia di Viterbo, Fac. di Scienze, Tesi di laurea A.A. 1997-1998.

BOUMAIZA M., QUINARD J.P., KTARI M.H., 1979. Contribution a la biologie de la reproduction de Tynis d'*Aphanius fasciatus* Nardo 1827 (Pisces, Cyprinodontidae) de Tynisiae. *Bull.de l'Officie Nat. Des Pesc de Tynis* 3 (2) : 221 - 240.

BRAMUCCI S., 2002. Caratterizzazione ecologica di un s.i.c. (sito importanza comunitaria): Saline di Tarquinia. analisi spaziale della comunità macrozoobenthonica a cinque anni dall' interruzione delle attività produttive. Univ. della Tuscia di Viterbo, Fac. di Scienze MM.FF.NN., Tesi di laurea A.A. 1997-1998,

BREWER G.J., SING C.F., 1970. An introduction to isozyme techniques. *New York & London, Academic press*, XII: 186.

BROCK T.D., 1979. Ecology of saline lakes. In: *Strategies of microbial life in extreme environments*. M. Shilo edt. pp: 29-47.

BRUNELLI G., 1934. Le caratteristiche biologiche dell'ambiente lagunare e degli stagni salmastri. *Boll. Pescic. Idrobiol.*, 10, pp: 18-28.

BULLINI L., PIGNATTI S., VIRZO DE SANTO A., 1998. *Ecologia generale*. Utet

BYERS B.A., 1980. The Ecological Behavioural Genetics of Habitat Selection in an intertidal snail, *Tegula funebris*. *Ph.D. thesis. University of Colorado*, Boulder.

BYERS B.A., 1983. Enzyme polymorphism associated with Habitat Choice in the intertidale snail *Tegula funebris*. *Behaviour Genetics*. Vol. 13 (1), pp: 65-75.

CAMPBELL N. A., 1995. *Biologia*. Zanichelli.

CANESTRINI G., 1886. Catalogo sistematico dei pesci d'acqua dolce d'Italia. In: *Ann. D. Soc. Die Natur*. Modena Anno I, 1866, pp:73-90.

CARRADA G., 1990. Le lagune costiere. *Le Scienze*, 264, pp: 32-39.

CAVICCHIOLI G., 1962. Considerazioni bio-ecologiche su *Aphanius fasciatus* Valenciennes (Cyprinodontidae). *Boll. Zool.*, 29, pp: 713-720.

CHIKHI L., BONHOMME F., AGNÈSE J.-F., 1998. Low genetic variability in a widely distributed and abundant clupeid species, *Sardinella aurita*. New empirical results and interpretations. *Journal of Fish Biology* 52: 861 – 878.

CIMMARUTA R., IACONELLI M., NASCETTI G., BULLINI L (1998) Diversità genetica in popolazioni di grandi pelagici del Mediterraneo. *Biologia Marina Mediterranea* 5, 300-310.

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, pp: 101-110.

CIMMARUTA R., ANGELETTI D., CARDILLO A., SCIALANCA F., NASCETTI G., 2004. Environmental stress and genetic erosion in the killifish *Aphanius fasciatus* from the Tarquinia salt-works. *Comunicazione del XIV Congresso SIte 4-6 Ottobre 2004*.

CIMMARUTA R., BONDANELLI P., NASCETTI G., 2005. Genetic structure and environmental heterogeneity in the European hake (*Merluccius merluccius*). *Molecular Ecology*, 14, pp: 2577-2591.

COGNETTI G., 1992. Inquinamenti e protezione del mare. Calderini, Bologna .

COGNETTI G., SARÀ M., MAGAZZÙ G., 1999. *Biologia marina*. Calderini, Bologna.

COTTIGLIA M., 1965. Sur la distribution de l'ichthyofaune dulcicole en Sardaigne (Note préliminaire). *Rapp. proces-verbaux C.I.E.S.M.M.*, Paris, 18,2, pp: 503-506.

COTTIGLIA M., 1980. Pesci lagunari. *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane*. Vol. 1 ed. CNR, 141 pp.

CRUTCHER D.C., CARR S. M., 1996. Population structure of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) in the Northwest Atlantic as determined by mitochondrial DNA sequence data, *Bull. Can. Soc. Zool.*

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, pp: 113-123.

FALUSH D, STEPHENS M, PRITCHARD JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.

FORÉ S. A., GUTTMAN S. A., BAILER A. J., ALTFATER D. J., COUNST B. V., 1995. Exploratory Analysis of Population Genetic Assessment as a Water Quality Indicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30: 36 – 46.

FRANKEL OH, SOULÉ ME, 1981. Conservation and Evolution. *Cambridge University, Cambridge*

FRANKLIN IA, 1980. Evolutionary change in small population In: Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological perspective (eds Soule ME, Wilcox BA), pp. 135-150. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

GANDOLFI G., 1973. Primi dati sul popolamento ittico nelle acque interne del Delta Padano. Ateneo parmense, *Acta Nat.* 9, pp: 409-417.

GEORGHIOU GP, 1986. The magnitudo of the resistance problem. In: *Pesticide restistance: Strategies and Tactics for Management* pp: 14-43. National Academy Press, Washington, DC.

GRIDELLI E., 1936. *I pesci d'acqua dolce della Venezia Giulia*. Udine 1936

GRIFFINI A., 1903. *Ittiologia italiana. Descrizione dei pesci di mare e di acqua dolce*. Hoepli, Milano, pp:238-240.

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), pp: 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, pp: 247-256.

IBERITE M., PALOZZI, 1990. Segnalazioni floristiche italiane: 613. *Arthrocnemum macrostachyum* (Moric) Moris (Chenopodiaceae). *Inf. Bot. Ital.* 22: 69-70. In Rossi A., 1996- Sulla tutela delle Saline di Tarquinia. In “Le Saline di Tarquinia” suppl. a *Tecknos* n° 9 settembre 1996, pp15-34. In collaborazione con MUSIS e CNR.

IBERITE M., PALOZZI, 1991. Segnalazioni floristiche italiane: 624. *Suaeda vera* J. F. Gmelin (Chenopodiaceae). *Inf. Bot. Ital.* 23: 49-50. In Rossi A., 1996- Sulla tutela delle Saline di Tarquinia. In “Le Saline di Tarquinia” suppl. a *Tecknos* n° 9 settembre 1996, pp15-34. In collaborazione con MUSIS e CNR.

IBERITE M., 1992. La vegetazione macrofita e algale della Riserva Naturale di Popolamento Animale Salina di Tarquinia. In “L’ ambiente nella Tuscia laziale” a cura di Olmi M. e Zapparoli M.; pp 203-207

JONES *et al.*, 1996. Conservation genetics of brook trout *Salvelinus fontinalis*: population structuring in Fundy National Park, New Brunswick and eastern Canada, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 2776 – 2791

KETTLEWELL HBD, 1973. The Evolution of Melanism. Clarendon Press. Oxford UK.

KIMURA M, CROW JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**, 725-738.

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**, pp: 5385-5389.

LARNO V., LAROCHE J., LAUNEY S., FLAMMARION P., DEVAUX A., 2001. Responses of Chub (*Leuciscus cephalus*) Populations to Chemical Stress, Assessed by Genetic Markers, DNA Damage and Cytochrome P4501A Induction. *Ecotoxicology*, **10**: 145-158.

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**, pp: 457-467.

LEONARDOS I., SINIS A., 1998. Reproductive strategy of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces, Cyprinodontidae) in the Mesolongi and Etolikon lagoons (W. Greece). *Fisheries Research*, **35**, pp: 171-181.

LEONARDOS I., SINIS A., 1999. Population age and sex structure of *Aphanius fasciatus* Nardo 1827 (Pisces, Cyprinodontidae) in the Mesolongi and Etolikon lagoons (W. Greece). *Fisheries Research*, **40**, pp: 227-235.

LUCCIOLI F., 2000. Diversità genetica e stress ambientale in *Aphanius fasciatus*. Univ. della Tuscia di Viterbo, Fac. di Scienze MM.FF.NN., *Tesi di laurea A.A. 1999-2000*.

LUIKART G, SHERWIN WB, STEELE BM, ALLENDORF FW (1998) Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology*, **7**, 963-974.

MAJERUS MEN, 1998. Melanism: Evolution in action. *Oxford University Press*, Oxford, UK.

MALTAGLIATI F., 2002. Genetic monitoring of brackish-water population: the Mediterranean toothcarp *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae) as a model. *Mar Ecol. Prog. Ser.*, 235: 257 – 262.

MARCONATO A., 1982. Preliminary investigation on the reproductive behaviour of *Aphanius fasciatus* Nardo (Cyprinodontidae). *Nwsl. Intern. Ass. Fish Ethologists*, **5**, pp: 24-26.

MAYNARD SMITH J, 1966. Sympatric speciation, *Am. Nat.*, **100**: 637-650.

MAZZA F., 1901. Sulla prima differenziazione delle gonadi e sulla maturazione delle uova nella *Lebias calaritana*. *Monitore zool.*, **12**, pp: 235-237.

McKENZIE JA, 1996. Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance. *Academy Press and RG Lands Co.*, Austin TX.

McNEELY, J. A., K. R. MILLER, W. V. REID, R. A. MITTERMEIER, and T. B. WERNER. 1990. Conserving the world's biological diversity. World Conservation Union, World Resources Institute, Conservation International, World Wildlife Fund-US, and the World Bank, Washington, D.C.

MESCHINI L., 1998. Caratterizzazione ecologica delle Saline di Tarquinia: I) Stima della produzione secondaria di *Cerastoderma glaucum*. Univ. della Tuscia di Viterbo, Fac. di Scienze, Tesi di laurea A.A. 1997-1998.

MINISTERO DELL' AMBIENTE E DELLA TUTELA DEL TERRITORIO, 1992. Servizio conservazione della natura. Inventario delle zone umide del territorio italiano. Istituto Poligrafico e Zecca di Stato.

NARDO G.D., 1827. Prodrum observationum et disquisitionum Adriaticae Ichthyologiae. *Ticini 4° Giorn. Fisica di Pavia Bim. I Prodr. Adr. Ittiol.*

NARDO G.D., 1827. De Proctostego, Novo piscium genere specie *Ichthyologicum. Patavini, 4° de Proctostego.*

NEI M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.

NEVO E., BEN-SHLOMO R., LAVIE B., 1984. Mercury selection of allozymes in marine organism: prediction and verification in nature. *PNAS* 81, pp: 1258-1259.

NEVO E., 2001. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *PNAS* 98, pp: 6233-6240

NIELSEN *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: 487 – 492.

O'BRIEN S.L., 1994a. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 91: 5748-55;

O'BRIEN S.L., 1994b. Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annu. Rev. Genet.*, 28: 467-89;

PALLADINO S., 1990. Lista delle aree naturali protette in Italia. I° edizione (Parchi Nazionali- Riserve statali- Zone umide di importanza internazionale secondo la Convenzione di Ramsar). Centro studio sulla genetica evoluzionistica del CNR.

PAPITTO G., 2003. Fotografia: "Veduta".
http://www.corpoforestale.it/Aree_protette/Riserve/SalineTarquinia

PICARD J., 1985. Milieux Extremes et benthos mediterraneen. *Rapp. Comm. Int. Mer. Medit.*, 29, 5, pp: 213-214.

PIRY SG, LUIKART G, CORNUET JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective populations size using allele frequency data *Journal of Heredity* **90**, 502-503.

POULIK M.D., 1957. Starch gel electrophoresis in discontinuos system of buffer. *Nature*, 180: 1477.

POWERS DA., SCHULTE PM., (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, pp: 71-94.

PRAKASH S., LEWONTIN R.C.,HUBBY J.L., 1969. 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 pseudoscura*. *Genetics*, 61: 841-858.

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **139**, 375-385.

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

REED H. D., FRANKHAM R., 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* vol. 17: 230 – 237.

RICHARDSON B.J., BAVERSTOCK P.R., ADAMS M., 1986. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematic and population studies. *Academy Press, San Diego, California*.

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), pp: 16-26.

ROSSI A., 1996. Sulla tutela delle Saline di Tarquinia. In “Le Saline di Tarquinia” suppl. a Tecknos n° 9 settembre 1996, pp15-34. In collaborazione con MUSIS e CNR.

SACCHI C. F., 1986. Le sel de La Palice. Mem. Oceanogr. *Biol. Mar.*, 15 (1985): 71-89.

SCHONEWALD-COX C.M., CHAMBERS S.M., MACBRIDE B., THOMAS L., 1993. Genetics and conservation. A reference for managing Wild mammals and plant populations. Benjamin-Cummings, Menlo Park (Cal);

SELANDER R.K., SMITH M.H., YANG S.Y., JOHNSON W.E., GENTRY J.B., 1971. Biochemical polymorphism and systematic in the genus *Peromyscus*. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Univ. Tex. Publ. (Stud. Genet.* 6), 103, pp: 49-69.

SERRANO S., 1998. Caratterizzazione ecologica delle Saline di Tarquinia: III) Analisi temporale della comunità macrozoobentonica, Univ. della Tuscia di Viterbo, Fac. di Scienze, Tesi di laurea A.A. 1997-1998, 67pp.

SHAW C.R., PRASAD R., 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4, pp: 297-320.

SMITH *et al.*, 1991. Loss of genetic diversity due to fishing pressure, *Fisheries Research*, 10: 309 – 316.

SOLTIS D.E., HAUFLE C.H., DARROW D.C., GASTONY G.J., 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffer, gel and electrode buffer, and staining schedules. *Amer. Fern. J.*, 73: 9-27.

SOKAL R.R., ROHLF F.J., 1969. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco.

STAZI M., 1978. Distribuzione ecologica e geografica dei Coleotteri Caraibidi degli stagni retrodunali del Tirreno centrale. Univ. Roma “La Sapienza”, Fac. Di Scienze, *tesi di laurea A.A. 1977-1978*, pp 157.

SWOFFORD D.L., SELANDER R.B., 1981. Biosys-1: a fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *Journal of Heredity*, 72, pp: 281-283.

SZAROWSKA M., FALNIOWSKI A., MAZAN K., FIALKOWSKI W., 1998. Adaptative significance of glucose phosphate isomerase (GPI) allozymes in the spring snail *Bythinella*? *Journal of Molluscan Studies*, 64, pp: 257-261.

TIGANO C., 1982. Le popolazioni di *Aphanius fasciatus* (Nardo) della Sicilia orientale (Pisces, Cyprinodontidae). *Animalia*, 9 (1/3), pp: 153-183.

TIGANO C., FERRITO V., 1983. Studio biometrico e morfologico in popolazioni di *Aphanius fasciatus* (Nardo) dell'Adriatico e della Sicilia (Pisces, Cyprinodontidae). *Nova Thalassia* 6, pp: 679-680.

TORCHIO M., 1967. Osservazioni e considerazioni sulla presenza in acque mediterranee costiere di ciprinidi, ciprinodonti e gasteropodi. *Natura: Rivista di Scienze Naturali* 5, pp: 235-243.

VAN VALEN L.,1973. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1: 1 - 30.

WANG J (2001) A pseudo-likelihood method for estimating effective population size from temporally spaced samples. *Genetical Research* **78**, 243-257.

WANG J, WHITLOCK MC (2003) Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *Genetics* **163**, 429-446.

WAPLES RS (1989) A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, **121**, 379-391.

WAPLES RS (1991) Genetic methods for estimating the effective size of Cetacean populations. Report of the International Whaling Commission Special Issue **13**, 279-300.

WEIR BS, COCKERHAM CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, pp: 1358-1370.

WRIGHT S., 1978. Evolution and genetic of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago, Chicago, Illinois.

Ringraziamenti: ringrazio Domenico Zamboni che ha collaborato in modo determinante agli “esperimenti” condotti sul campo.

A Paola un ringraziamento particolare, per l’aiuto in tutte le fasi del lavoro e per il sostegno.