



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI Ecologia e Biologia

Corso di Dottorato di Ricerca in

Ecologia e gestione delle risorse biologiche- XXVI Ciclo.

**“Valutazione dello stato di salute di *Posidonia oceanica* (L. Delile) del
Tirreno settentrionale attraverso l’utilizzo di marcatori nucleari e
funzionali”
(Bio/07)**

Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Francesca Focaracci

Coordinatore del corso

Prof. Daniele Canestrelli

Tutor

Prof.ssa Carla Caruso

Dott.ssa Laura Bertini

A Fabio

*“Dopo l'istante magico in cui i miei occhi si sono
aperti nel mare, non mi è stato più possibile
vedere, pensare, vivere come prima.”*

Jacques-Yves Cousteau

Abstract

La *Posidonia oceanica* è una fanerogama comune nel bacino del Mar Mediterraneo dove forma vaste praterie lungo le coste ricoprendo un ruolo ecologico fondamentale per la produzione di materiale organico e di ossigeno; è inoltre luogo di riparo e nursery per molte specie animali e vegetali e contribuisce al mantenimento dell'equilibrio dei litorali contenendo l'erosione costiera.

L'utilizzo di *Posidonia oceanica* come indicatore biologico di inquinamento chimico risale agli anni '80. In effetti questa fanerogama presenta tutte le qualità richieste per un impiego in questo senso: specie bentonica, longeva, largamente diffusa in tutto il bacino del Mediterraneo e con capacità di bioaccumulo di contaminanti persistenti.

Il lavoro presentato ha riguardato la standardizzazione di un sistema rapido e riproducibile di monitoraggio ambientale sulle acque costiere del Tirreno settentrionale utilizzando come bioindicatore la *Posidonia Oceanica*. Questo tipo di controllo si basa sul principio che una sostanza tossica può essere rilevata negli organismi viventi ad essa esposti tramite l'analisi di biomarcatori (markers molecolari), che comprendono l'insieme dei cambiamenti cellulari, molecolari e biochimici indotti da inquinanti chimici misurabili in tessuti, cellule e fluidi biologici.

Le aree di studio sono quattro praterie antistanti il tratto costiero tirrenico settentrionale di Lazio e Toscana: SIC "Fondali antistanti Punta Murelle" IT6000002 (1.111,99 ha), SIC "Fondali tra il Chiarone e il Fiora" IT6000001 (1.761,9 ha), "Isola di Giannutri" IT51A0024 e SIC "Secche di Tor Paterno" IT 6000010 (26,79 ha).

Lo studio di biomarcatori correlati a specifici stress ambientali ha riguardato:

- enzimi antiossidanti correlati allo stress ossidativo: Catalasi (CAT), Glutathione-S-transferasi (GST), Perossidasi (POX) e Superossidodismutasi (SOD) (Ranvier et al., 2000; Ferrat et al., 2002; Hamoutène et al., 2002; Bucalossi et al., 2006);
- geni responsivi all'accumulo di metalli pesanti: Metallotioneina 2b (MT-2b); Cromometilasi (CMT);
- geni responsivi alla disponibilità di luce: Geranilgeranil reduttasi (CHL P), Citocromo c Ossidasi (CcOx), Peptidasi Putativa (PeP), Ribulosio 1,6-Bisfosfato Carbossilasi/Ossigenasi (RuBisCO) (Bruno et al., 2010; Serra et al. 2012).

Nell'ambito di questo lavoro sono state anche effettuate analisi della struttura genica delle praterie studiate attraverso analisi della variabilità genetica, utilizzando sette marcatori microsatelliti altamente polimorfici (Alberto et al., 2005).

Dalle analisi della struttura genica è emerso come le cinque praterie siano essenzialmente un mosaico di un'unica prateria originaria dove Chiarone e Murelle sono sostanzialmente identiche mentre la prateria di Giannutri sembra essere molto più vicina a quelle di Tor Paterno. Differenze interessanti sono state riscontrate tra le due praterie di Tor Paterno a differenti profondità.

Dai dati ottenuti dall'analisi dei metalli pesanti a livello fogliare, si rileva come i campioni prelevati dal sito di Giannutri presentino contaminazioni molto elevate di Pb e Cr, ma anche di Cu e Ni, questi ultimi secondi solo al sito di Tor Paterno. I campioni prelevati dai siti di Chiarone e Murelle presentano una minore contaminazione da metalli pesanti che hanno valori di concentrazione piuttosto simili, ad indicare una storia comune, fatta eccezione per il Cu che in Murelle presenta i valori più bassi di tutti i siti.

Dai risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica e dell'attività enzimatica dei biomarcatori, il sito di Murelle sembra quello più attivo nella risposta a stress di tipo ossidativo sia a livello di geni che di enzimi. I bassi livelli di Cu nel sito di Murelle suggeriscono l'ipotesi che un'eccessiva quantità di tale metallo possa avere effetto inibitorio sui biomarcatori considerati. Per gli altri metalli non è stato possibile legare la risposta del biomarcatore ad una condizione peculiare del singolo sito, in quanto la risposta della pianta può dipendere sia da una esposizione dose- e tempo-dipendente che dall'effetto sinergico di più metalli.

Data anche l'importanza economica ed ecologia della *P. oceanica*, sarebbe auspicabile comprendere quale sia il reale livello di tolleranza della pianta rispetto a stress mirati e controllati attraverso l'allestimento di acquari di monitoraggio. Questo consentirebbe di confrontare le risposte che si hanno in mare rispetto a quelle ottenute in acquario, dove gli stress vengono applicati secondo trattamenti dose-tempo precisi, in esposizione singola o combinata.

Per quanto riguarda i risultati dei biomarcatori responsivi alla disponibilità di luce, i dati estrapolati da questo lavoro ci spingono ad ipotizzare che la prateria più disturbata da un punto di vista luminoso sia quella di Murelle, anche se durante il campionamento non è stato possibile effettuare misure relative a PAR e Chl a, per cui la nostra è una valutazione per deduzione rispetto al comportamento di questi biomarcatori allo stress luminoso, secondo quanto già noto in bibliografia.

...

Posidonia oceanica (L. Delile), commonly known as the Neptune Grass, is a marine flowering seagrass endemic of the Mediterranean Sea; forming vast grasslands along the coast, it contributes to preserve costal environments from erosion. Furthermore, *P. oceanica* conveys important ecological services such as the consistent production of organic matter and oxygen and represents a shelter site and a nursery area for several species belonging to different groups (both in the Animalia and in the Plantae kingdom). The use of *P. oceanica* as a biological indicator of chemical pollution dates back to the 80s; this seagrass has indeed all the requirements for being successfully used as a biological indicator, i.e. it's a long living benthic species, widely spread throughout the Mediterranean basin and has the capability of accumulate persistent pollutants.

A standardized, fast and reproducible technique for coastal waters' monitoring using *Posidonia oceanica* as bioindicator is proposed in this manuscript. This technique is based on the detection of molecular markers in *P. oceanica* (biomarkers) induced by the contamination of toxic substances; the exposure to pollutants, indeed, causes a whole range of cellular, molecular and biochemical changes in *P. oceanica* that can be precisely measured in tissues, cells and biological fluids.

The study area included four meadows of the Tyrrhenian coastline of Northern Lazio and Tuscany: in particular, the SIC "Backdrops front Punta Murelle" IT6000002 (1,111.99 ha), the SIC "Backdrops between Chiarone and Fiora" IT6000001 (1761.9 ha), the SIC "Giannutri" IT51A0024 and, finally, the SIC "Tor Paterno" IT 6,000,010 (26.79 ha).

Several biomarkers of specific environmental stressors have been identified in this study. In particular:

- the antioxidant enzymes related to oxidative stress: catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), peroxidase (POX) and superoxide dismutase (SOD) (Ranvier et al., 2000; Ferrat et al., 2002; Hamoutène et al., 2002; Bucalossi et al., 2006);
- the genes responsive to heavy metal accumulation: 2b-metallothionein (MT-2b) and Chromomethylase (CMT);

- the genes responsive to light availability: geranylgeranyl reductase (CHL P), Cytochrome c oxidase (CCOX), putative peptidase (PEP) and ribulose 1,6-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Ru-BisCO) (Brown et al., 2010; Serra et al. 2012).

Furthermore, as part of this study, the analysis of the genetic variability of *P. oceanica* was assessed through genetic structures analysis based on seven highly polymorphic microsatellite markers (Alberto et al., 2005).

The findings of this study suggest that *P. oceanica* populations inhabiting the four meadows in the Tyrrhenian coastline of Northern Lazio and Tuscany are essentially a mosaic of a single original prairie; *P. oceanica* inhabiting the Chiarone and the Murelle sites are substantially identical from a genetic perspective, while the one inhabiting the Giannutri site appeared to be genetically similar to those inhabiting the Tor Paterno site. An interesting finding of this study was the identification of genetic differences between *P. oceanica* inhabiting different depths within the Tor Paterno site.

From the analysis of heavy metals accumulation at the leaf level, the site of Giannutri appeared to be characterized by an extremely high contamination of Pb and Cr and lower concentration of Cu and Ni, which, on the contrary, represented the principal contaminants of the Tor Paterno site. *P. oceanica* inhabiting the Chiarone and Murelle sites were characterized by lower levels of heavy metals contamination; contaminants concentration in these two sites appeared rather similar (with the exception of Cu, which at the Murelle site is present in the lowest concentration), suggesting a common history of this two sites. The analysis of biomarkers gene expression and enzymatic activity revealed that *P. oceanica* specimens inhabiting the Murelle site are more active in oxidative stress responses, both at the genetic and the enzymatic level. The low levels of Cu characterizing the Murelle site suggests that excessive amounts of this metal may have an inhibitory effect on the considered biomarkers. The relationship between biomarkers response and the peculiar conditions characterizing each site has not been addressed for the other heavy metals, considering that the plant response can depend on both a dose-time dependent exposure and the synergistic effect of more metals.

Considering the economic and ecological importance of *Posidonia oceanica*, further studies are recommendable; in particular, the identification of the real levels of stress tolerance of the plant should be addressed in controlled situations, such as targeted and controlled aquariums monitoring. Comparing *P. oceanica* response in controlled situation with the one of wild population inhabiting different environments would indeed provide important insights on the overall process of stress re-

sponse of this seagrass, allowing to discriminate between synergic and single effects, as well as short term and long term exposures. Finally, the analysis of biomarkers responsive to light exposure, and the comparison of the findings of this study with others reported in literature, suggests that *P. oceanica* inhabiting the Murelle sites is the one more affected from poor light condition.

Keywords: *Posidonia oceanica*, microsatellites, enzyme assays, gene expression, molecular markers, oxidative stress

Ringraziamenti

Userò questo spazio per ringraziare tutte quelle persone senza le quali tutto questo non sarebbe stato possibile.

Un ringraziamento doveroso va al Prof. Nascetti, con il quale ho iniziato il mio percorso e senza il quale non avrei mai pensato di lavorare su questa pianta affascinante e ricca di sorprese quale è la *Posidonia oceanica*.

Un ringraziamento tutto al femminile va alla Prof.ssa Carla Caruso e alla Dott.ssa Laura Bertini che mi hanno accolto nel loro laboratorio credendo in me e nel progetto, sostenendomi nei momenti più duri e dandomi la possibilità di imparare e crescere molto sotto la loro guida. Queste parole non renderanno mai giustizia a quello che hanno fatto per me e a come mi hanno fatto sentire ogni giorno da quando le ho incontrate. Non mi sono mai sentita sola e per questo le ringrazio di cuore.

Vorrei ringraziare anche tutte le persone che ho avuto il piacere di incontrare da quando sono in laboratorio e che a modo loro ognuna di esse ha arricchito il mio lavoro.

Lavorare nel laboratorio della Prof.ssa Caruso è stata un'esperienza stupenda e gratificante sia dal punto di vista umano che lavorativo e non posso che augurarmi di proseguire la collaborazione nel prossimo futuro.

In questa sede non posso non citare tutte quelle persone che con il loro contributo hanno partecipato a questo progetto come: la Prof.ssa Roberta Cimmaruta sempre disponibile ad ascoltare i miei dubbi e che ha fornito un contributo indispensabile sulla parte inerente la variabilità genetica; la Prof.ssa Patrizia Papetti e la Dott.ssa Ilenia Bravo che hanno effettuato tutte le analisi sui metalli pesanti presso l'Università di Cassino; la studentessa Fabiana Canini che mi ha accompagnato nell'ultima parte del lavoro sostenendomi sia dal punto di vista personale che lavorativo, senza mai risparmiarsi; tutte le persone senza le quali non sarebbe stato possibile effettuare i campionamenti come la Dott.ssa Federica Camisa, il Dott. Armando Macali e tutti i sub dell'associazione Assopaguro di Montalto di Castro in particolare Enzo, Stefano, Vittorio e Tonino.

Non si vive di solo lavoro. È stato infatti grazie al calore del mio compagno Fabio, della mia famiglia e dei miei amici vicini e lontani che ho potuto superare momenti difficili e che non mi hanno mai fatto perdere la fiducia in me stessa. Soprattutto li ringrazio per aver sopportato tutti i miei sfoghi e per aver condiviso insieme a me le ansie del meteo tutti i giorni antecedenti i campionamenti.

Grazie a tutti voi per esserci stati sempre.

L'unico vero viaggio verso la scoperta non consiste nella ricerca di nuovi paesaggi, ma nell'aver nuovi occhi. (Marcel Proust).

1. INTRODUZIONE	10
1.1 Distribuzione e caratteristiche generali.....	10
1.2 Riproduzione e variabilità.....	15
1.3 Importanza ecologica dei sistemi di <i>Posidonia oceanica</i>	20
1.4 Fattori che influenzano la regressione delle praterie	21
1.5 Bioindicatori	25
1.6 Stress ossidativo.....	28
1.7 La luce in mare	33
1.8 Biomarcatori.....	40
1.9 Enzimi antiossidanti	43
1.10 Metallothioneine e Metiltrasferasi.....	47
1.11 Geni responsivi alla luce	50
2. SCOPO DELLA TESI	52
3. MATERIALI E METODI	55
3.1 Area di studio e campionamento	55
3.2 Analisi della struttura genetica di <i>Posidonia oceanica</i>	56
3.2.1 Estrazione del DNA	56
3.2.2 Loci microsatelliti e genotipizzazione.....	56
3.2.3 Analisi dei frammenti	59
3.2.4 Analisi dei dati	62
3.3 Procedura analitica e Assorbimento atomico.....	63
3.4 Espressione genica	67
3.4.1 Estrazione dell'RNA.....	67
3.4.2 – Quantizzazione dell'RNA estratto	68
3.4.3 PCR di controllo e RT-PCR.....	68
3.4.4 Real time Q-PCR.....	70
3.4.5 Curva standard	71
3.4.6 Quantificazione relativa	71
3.4.7 Condizioni sperimentali e geni selezionati.....	74
3.5 Attività enzimatica.....	76

3.5.1 Estrazione di proteine da foglie di posidonia e determinazione della concentrazione proteica mediante saggio Bradford	76
3.5.2 Saggi di attività enzimatica	76
3.5.2.1 Catalasi	76
3.5.2.2 Guaicolo perossidasi	77
3.5.2.3 Ascorbato perossidasi	77
3.5.2.4 SOD	78
3.5.2.5 GST	79
4. RISULTATI E DISCUSSIONI.....	80
4.1 Analisi della variabilità.....	80
4.2 Metalli pesanti	87
4.3 Analisi di metalli pesanti su campioni di <i>Posidonia oceanica</i>	90
4.4 Analisi dell'espressione genica e saggi di attività enzimatica.....	97
4.4.1 SOD.....	98
4.4.2 CAT	101
4.4.3 Perossidasi (POX).....	104
4.4.4 GST.....	107
4.5 Metallotioneine e Metiltrasferasi.....	109
4.6 Geni responsivi alla luce (CHLP, RuBisCO, Citocromo c ossidasi, Pep)	112
5. CONCLUSIONI.....	116
BIBLIOGRAFIA.....	120

1. Introduzione

1.1 Distribuzione e caratteristiche generali

Le fanerogame marine sono angiosperme acquatiche che vivono esclusivamente in ambiente marino sono in grado di sopravvivere in presenza di alta o variabile salinità, hanno un sistema di ancoraggio resistente ai movimenti dell'acqua e utilizzano un meccanismo di impollinazione subacqueo che consente loro di colonizzare vaste aree soprattutto a substrato sabbioso (Green e Short, 2003; Kuo e Hartog, 2001). Esse costituiscono un gruppo ecologico, ma non un gruppo tassonomico.

La molecola di lignina si è riscontrata anche nelle Magnoliofite marine, in particolare in *Posidonia oceanica*, e non è presente in nessun'altra pianta marina, macroalghe incluse (Larkum et al., 1989). Tale presenza attesterebbe le antiche origini di questo genere (Les et al., 1997).

Posidonia oceanica (L.) Delile (subphylum Angiospermae, classe Monocothyledonae, ordine Potamogetonales, famiglia Posidoniaceae) è una delle cinque fanerogame marine presenti nel Mediterraneo, del quale è endemica. Nel bacino Mediterraneo è presente in modo più o meno costante su tutta la costa fatta eccezione per le coste dell'Egitto (ad Est del delta del Nilo), Palestina, Israele e Libano. Recenti studi ne hanno evidenziato la presenza nel mar di Marmara (Menesz et al. 2009). Non si spinge nel mar Nero ed è rara o assente a Nord dell'Adriatico e lungo le coste di Camargue e Port-la-Nouvelle (Boudouresque e Meinez, 1982; Boudouresque al.2006). Nel suo complesso le praterie di *Posidonia* occupano tra il 2 e il 4% dell'intero bacino (Den Hartog,1970; Boudouresque al., 1984; Semroud et al., 1993) (Fig.1.1a). La batimetrica fin dove è presente *Posidonia oceanica* (circa 40 m) segna nel Mediterraneo il limite inferiore del piano infralitorale.



Fig.1.1a Distribuzione delle praterie a *Posidonia oceanica* lungo le coste del Mediterraneo evidenziata in verde (Procaccini et al., 2003).

La distribuzione geografica di *Posidonia* viene definita “bipolare” poiché è presente soltanto nel Mediterraneo e in Australia (Fig.1.1b). L’ipotesi più accreditata a suffragio di questa distribuzione è che il genere *Posidonia*, agli albori della sua storia evolutiva, abbia colonizzato il mare in aree assai più estese di quelle attuali, comprendenti sia zone tropicali che temperate; solo in seguito alla competizione con specie apparse più tardi e meglio adattate agli ambienti tropicali, le specie del genere *Posidonia* sarebbero state relegate ai margini di tale areale (Den Hartog, 1970).



Fig.1.1b: Distribuzione bipolare di *Posidonia oceanica*

In Australia, a differenza del Mediterraneo, si distinguono ben 8 specie: *P. angustifolia*, *P. australis*, *P. coriacea*, *P. denhartogii*, *P. kirkemanii*, *P. ostenfeldii*, *P. robertsonae* e *P. sinuosa* (Kuo et Hartog, 2001). Come evidenziato dal lavoro di Weycott e Les del 2000, tra la specie mediterranea e quelle australi sono presenti notevoli differenze a livello genetico, ciò suggerisce che la separazione tra i due gruppi sia avvenuta in tempi lontani, probabilmente alla fine dell’Eocene.

Posidonia oceanica è sopravvissuta alla crisi del Messiniano (5,6 – 5,3 Ma) quando, in seguito alla chiusura dello stretto di Gibilterra, il Mediterraneo è evaporato quasi completamente riducendosi a una serie di pozze. Non è del tutto chiaro come *Posidonia* abbia resistito a tali condizioni; si ritiene che alcune zone di rifugio sia nel Mediterraneo che nel vicino Atlantico abbiano poi consentito alla pianta di ricolonizzare il bacino dopo la riapertura dello stretto (Boudouresque et al., 2006).

Posidonia oceanica, così come tutte le piante superiori, è provvista di strutture vegetative differenziate quali: radici, fusto e foglie (Fig.1.1c). La pianta è in grado di riprodursi sia per via vegetativa (stolonizzazione), che sessuata. I fusti sono modificati e prendono il nome di rizomi che per via vegetativa possono accrescersi sia in senso orizzontale (rizoma plagiotropo) che in senso verticale (rizoma ortotropo) (Mazzella et al., 1986).

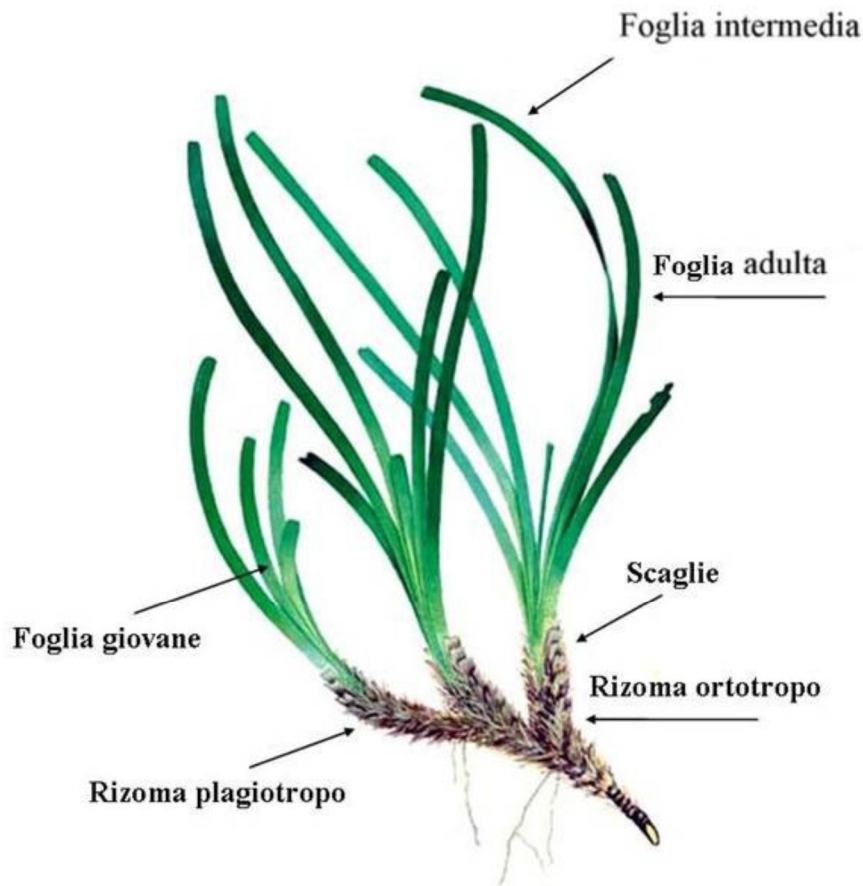


Fig. 1.1c: Rappresentazione schematica di tre fasci di *P. oceanica*

I rizomi plagiotropi, che consentono l'espansione e la crescita in senso orizzontale della pianta, presentano radici sul lato inferiore, assolvono così sia la funzione di ancoraggio della pianta al substrato, sia di trasporto dei nutrienti. L'accrescimento orizzontale è quello prevalente poiché consente l'occupazione progressiva del substrato e, in determinate condizioni ambientali, ad esempio quando la densità fogliare diviene elevata e la disponibilità di substrato diminuisce, i rizomi possono attivare una crescita in senso verticale, consentendo alla pianta di sfruttare la luce e di contrastare il progressivo insabbiamento dovuto alla continua sedimentazione di detrito (Boudouresque et al., 1984). Un rizoma ortotropo può diventare plagiotropo e viceversa a seconda dello spazio e della luce disponibile (Caye, 1980). Questi due tipi di accrescimento sono all'origine della formazione delle cosiddette *mattes*, tipiche strutture a terrazzo costituite dall'intreccio di più strati di rizomi, di radici e di sedimento intrappolato tra questi che possono innalzare anche di diversi metri il fondo del mare (Peres e Picard, 1964) (Fig.1.1d).

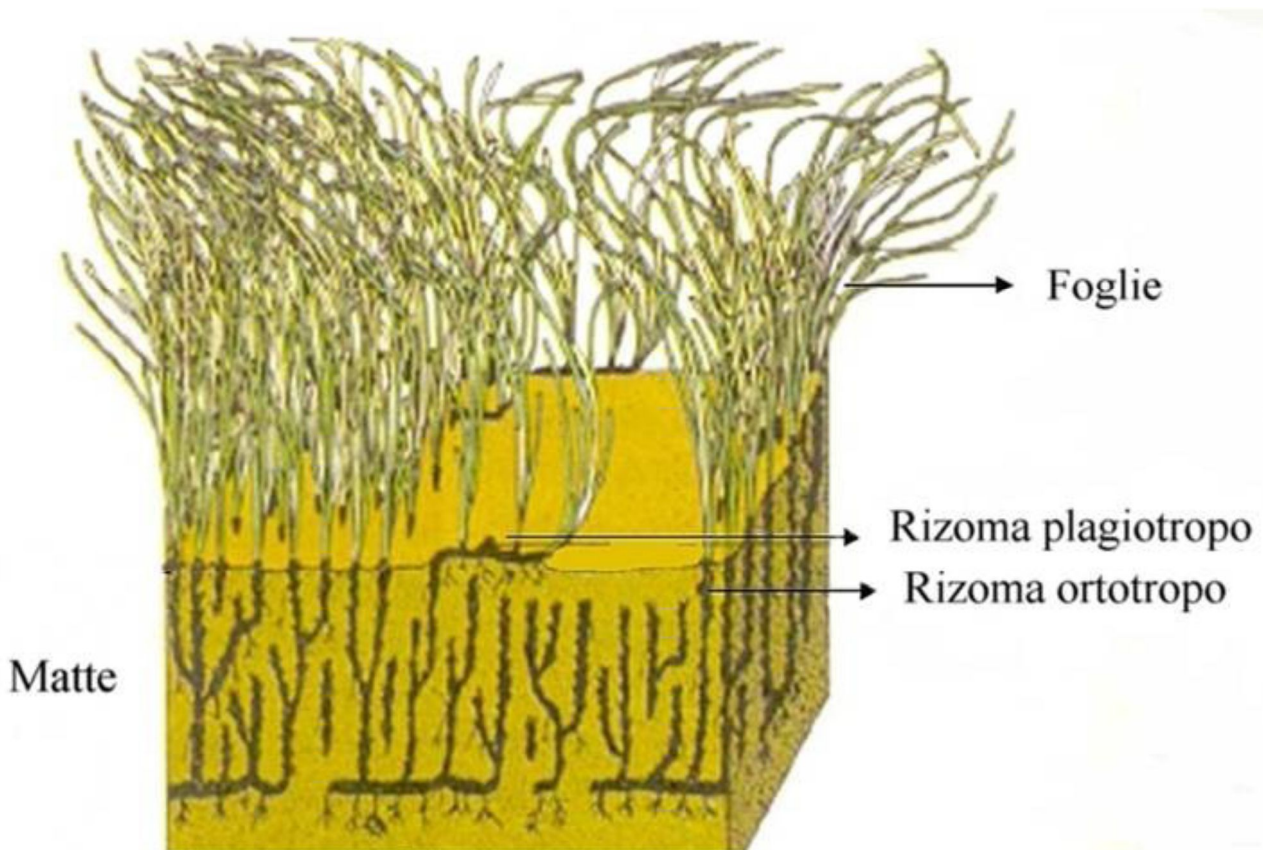


Fig.1.1d: Schema rappresentativo della *matte*, dello strato dei rizomi e delle foglie di *Posidonia oceanica* (Boudouresque e Meinesz, 1982).

La *matte* è una struttura resistente nata dal risultato di due forze opposte: l'accrescimento verticale della pianta e l'accumulo dei sedimenti; se quest'ultimo è troppo rapido si può verificare un progressivo insabbiamento della pianta, fino alla morte per soffocamento delle parti vegetative. Al contrario una sedimentazione scarsa, porta allo scalzamento dei rizomi con conseguente indebolimento della *matte* e progressiva distruzione della prateria (Boudouresque e Meisnez, 1982).

In zone riparate, come ad esempio le baie, la *matte* può formare una barriera naturale detta *récif-barrière*; si tratta di strutture spettacolari formate dalla *matte* che, arrivando in prossimità della superficie, spinge verso l'alto la prateria con conseguente emersione delle foglie (Boudouresque et al., 1984; Augier e Boudouresque, 1970; Boudouresque et al., 1985). In zone con elevato idrodinamismo invece, la *matte* può essere scalzata ed erosa con conseguente formazione di canali di erosione detti "*intermatte*". Aree di discontinuità si possono formare anche a causa di danni meccanici legati a frequenti ancoraggi di natanti sulle praterie (Ceccherelli e Campo, 2002; Ceccherelli et al., 2007; Milazzo e Baldamenti, 2002).

Le foglie di *Posidonia oceanica* sono nastriformi, con apici arrotondati; hanno una larghezza media di 1 cm e possono raggiungere oltre 1 m di lunghezza. Esse hanno funzione sia fotosintetizzante che di assorbimento dei nutrienti dall'acqua (Fresi e Saggiomo, 1981). Le foglie possono essere distinte in adulte, intermedie e giovanili in base alla loro lunghezza e alla presenza di una base lignificata (Giraud, 1977). Il limite tra lembo, tessuto verde e base è rappresentato da una linea concava detta "ligula" in corrispondenza della quale, al momento della caduta, le foglie si staccano lasciando sul rizoma le basi, che con il tempo si riducono a sottili scaglie, formando una sorta di manicotto che avvolge il rizoma (Mazzella et al., 1986). La decomposizione delle scaglie è molto lenta grazie alla presenza di lignina e quindi anche la loro persistenza sul rizoma è molto lunga. Le foglie intermedie non presentano base ed hanno una lunghezza minima di 5 cm; al di sotto di tale lunghezza, le foglie rientrano nella categoria di foglie giovanili. Le foglie sono riunite in fasci, in media di 6 – 7 per fascio, disposte in maniera distica e alterna: partendo dal centro del ciuffo e progredendo verso l'esterno, le foglie passano da giovani ad intermedie fino ad adulte (Panayotidis e Giraud, 1981). Si assiste quindi ad un duplice gradiente di età: quello verticale (lungo l'asse fogliare) e quello orizzontale (nell'ambito del ciuffo) (Mazzella et al. 1992; Casola et al. 1987). Il fascio va pertanto rinnovandosi dall'interno verso l'esterno, con un massimo sviluppo nel periodo primaverile. Il tasso di accrescimento diminuisce durante l'estate, quando le foglie sono più lunghe, ricoperte da epifiti e cominciano a manifestare un più avanzato tasso di senescenza, caratterizzato dalla presenza di tessuto di colore bruno, fotosinteticamente inattivo (Buia et al., 1992).

Le foglie al culmine della senescenza si staccano prevalentemente in autunno (Romero et al., 1992; Chessa et al., 2000). Le foglie staccate possono decomporsi all'interno della prateria o attraverso le correnti essere trasportate altrove o ammassate sulla battigia. In alcune zone, in particolare nelle spiagge sabbiose è possibile trovare questi accumuli di foglie chiamati *banquettes* (Boudouresque e Meinesz, 1982) che possono arrivare ad uno spessore di 2 m (Boudouresque et al., 2006; Guala et al., 2006; Mateo et al., 2003). È stata riconosciuta l'importanza ecologica delle *banquettes* soprattutto per il ruolo che svolgono nel contenimento dei processi erosivi della linea di costa (Chessa et al., 2000; Guala et al., 2006; Mateo et al., 2003; Romero et al., 1992).

1.2 Riproduzione e variabilità

Posidonia oceanica così come tutte le angiosperme marine si riproduce sia per via vegetativa che per via sessuata; il principale meccanismo di propagazione è quello vegetativo che viene detto “stonizzazione”. Questo processo si realizza sia con il distacco di rizomi terminali dal rizoma parentale per necrosi o a causa dell'idrodinamismo (Molinier e Picard, 1952) e sia per divisione e allungamento dei rizomi. *Posidonia oceanica* è inoltre in grado di riprodursi asessualmente mediante la formazione di piantine direttamente dalle infiorescenze. La pseudoviviparità, formazione delle piantine direttamente dalle infiorescenze, è stata osservata per la prima volta vicino alle coste delle isole di Formentera (Isole Baleari, Mediterraneo occidentale) nel maggio del 2004 (Ballesteros et al., 2005). Non si conosce la frequenza di questo fenomeno e il suo significato; probabilmente si tratta di una strategia utile per la dispersione sulle brevi distanze (Ballesteros et al., 2005). La riproduzione sessuata, invece, avviene mediante fiori ermafroditi, cioè formati da una parte maschile (stami) contenente il polline, che circonda una parte femminile (carpello) che contiene la cellula uovo. I fiori (Fig 1.2a), in numero variabile, sono raggruppati in particolari infiorescenze di colore verde, portate da uno stelo inserito nel centro del ciuffo e sono avvolte per tutta la loro lunghezza da due brattee floreali (Cinelli et al., 1995). La maturazione dei frutti può avvenire in tempi differenti a seconda della loro inserzione sull'asse dell'infiorescenza (Caye e Meisnez, 1984). Una discordanza temporale nell'antesi si è osservata anche in relazione alla profondità di impianto (Mazzella e Buia, 1991): esiste uno sfasamento di circa due mesi tra l'inizio del ciclo riproduttivo in praterie superficiali (entro i 15 m di profondità) rispetto a quelle profonde (oltre i 15 m). Nelle praterie superficiali i fiori compaiono nei mesi di Settembre-Ottobre e nel tardo autunno è già possibile osservare i primi stadi di sviluppo dei frutti che raggiungono la loro maturazione nei mesi di Marzo-Aprile, mentre nelle praterie profonde questo ciclo si presenta identico, ma con un ritardo di circa due mesi (Mazzella e Buia, 1991). Le fioriture non avvengono con regolarità e possono essere limitate a determinate località (Díaz-Almela et al., 2006). Giraud (1977) ipotizza una relazione tra la fioritura e la temperatura, essendosi verificata in condizioni di elevata temperatura nell'estate precedente i suoi studi. Analogamente Mazzella e Buia (1991) hanno osservato che la fioritura si verifica generalmente un mese dopo il raggiungimento della massima temperatura dell'acqua. Fenomeni di fioriture massicce si sono osservate contemporaneamente in tutto il bacino: l'ipotesi più accreditata è quella della risposta della pianta ad andamenti termici al di sopra della norma (Buia et al., 2002; Diaz-

Almea *et al.*, 2007). L'influenza della temperatura sull'induzione del processo di antesi è ipotizzata anche per altre fanerogame insieme ad altri fattori quali il fotoperiodo e l'apporto di nutrienti (De Cock, 1981; Mac Millan, 1979, 1980).

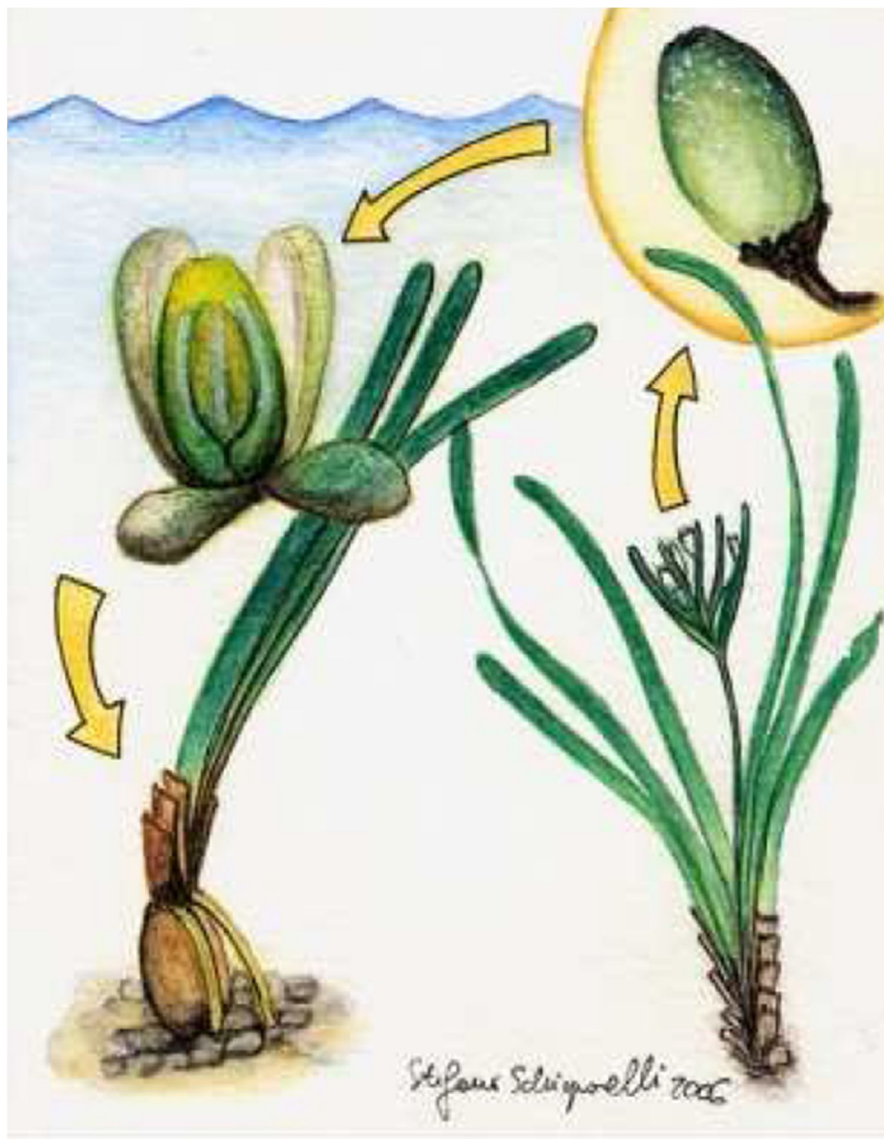


Fig 1.2a: Rappresentazione schematica del fiore, frutto e seme di *P. oceanica*

I frutti, detti “olive di mare”, giunti a maturazione si staccano dalla pianta madre e, galleggiando grazie alle sostanze oleose presenti nel pericarpo, sono trasportati dalle correnti in luoghi anche molto lontani dalla prateria di provenienza, a vantaggio della capacità di dispersione della specie (Serra *et al.* 2010). I frutti, se non finiscono spiaggiati con la deiscenza del pericarpo, liberano i semi, i quali cadono sul fondo e in presenza di condizioni favorevoli germinano direttamente. Sui germogli già nella prima settimana compare la prima radice e nelle successive 5 - 6 settimane altre quattro radici avventizie. In generale l'apparato radicale è formato da radici multiple di rapida for-

mazione, forti e flessibili grazie una larga porzione di tessuto corticale e a un multistrato ipodermico che facilitano la fase iniziale di ancoraggio (Belzunce et al., 2008). Tuttavia, nonostante esperimenti in laboratorio e in campo abbiano dimostrato un'elevata vitalità dei semi e dei germogli (Balestri et al., 1998a; Balestri et al., 1998b; Balestri e Bertini, 2003; Piazzini et al., 2000), in condizioni naturali sono pochi i semi che riescono a germinare (Balestri et al., 1998a; Piazzini et al., 1999); molti degenerano assumendo una colorazione bruno-nerastra e persistono in questo stato per diversi mesi.

Sulla base delle poche osservazioni a disposizione, risulta difficile valutare l'importanza della riproduzione sessuata nell'insediamento e nel mantenimento delle praterie, è noto che il successo riproduttivo della specie mediante riproduzione sessuata sembra fortemente compromesso sia dall'enorme numero di semi che vanno incontro a degenerazione, sia dagli erbivori che danneggiano una buona parte delle infiorescenze (Balestri et al., 2003). Inoltre, in termini di crescita, la riproduzione sessuata si trasforma in un costo elevato soprattutto per i fasci più vecchi, poiché per almeno due anni successivi alla fioritura si osserva una riduzione significativa dell'allungamento del rizoma e del numero di foglie prodotte per anno (Buia et al., 2005; Calvo et al., 2006). In generale i dati sembrano indicare un ruolo prevalente della riproduzione vegetativa nell'accrescimento delle praterie di *Posidonia oceanica* (Caye e Meinesz, 1984; Buia e Mazzella, 1991; Meinesz et al., 1993); a conferma di questo fenomeno vi è inoltre la bassa variabilità genetica riscontrata in alcune praterie del Mediterraneo (Procaccini e Mazzella, 1998; Procaccini et al., 1996; 2002; Serra et al., 2010; Waycott et al., 2006).

La variabilità genetica, infatti, sembra avere significativi effetti sulla possibilità di recupero delle popolazioni dopo eventi di disturbo, sia naturali che di origine antropica, nonché su altri processi ecologici, quali la produttività primaria, la competizione interspecifica, la struttura della comunità e i flussi di energia e nutrienti (Hughes et al. 2008). Si ritiene inoltre che le differenze genetiche tra individui all'interno della stessa specie pongono le basi per un sensibile aumento della diversità tra le specie della comunità associate e, in ultima analisi, per la stessa biodiversità degli ecosistemi (Féral, 2002, Reusch, 2006). La variabilità genetica infra-specifica, inoltre, potrebbe determinare il potenziale evolutivo ed ecologico della specie (Féral, 2002).

I primi studi di genetica di popolazione di *P. oceanica* indicavano una quasi completa uniformità genetica delle praterie nel Mediterraneo, imputata a un possibile sviluppo apomittico di semi con soppressione della fusione dei due gameti, a un basso livello di riproduzione sessuale e infine a un alto tasso di *inbreeding* dovuto a processi di autoimpollinazione e di geitonogamia (impollinazione con il polline di un altro fiore dello stesso individuo).

L'utilizzo di marcatori polimorfici ha dimostrato, in seguito, che la variabilità genetica della specie non è bassa, ma dipende dalla frequenza della riproduzione vegetativa (tasso di stolonizzazione) rispetto a quella sessuata (ricombinazione allelica), infatti non è costante ma varia in località diverse. Conoscere la variabilità genetica delle popolazioni è un importante strumento per valutare lo stato di salute della prateria in esame, ma anche per programmare interventi di recupero e trapianto secondo criteri più stringenti.

Fino ad oggi sono stati analizzati un'ampia gamma di marcatori molecolari che possono essere applicati alle scienze ecologiche ed evolutive (Carvalho, 1998). Gli allozimi sono stati tra i primi marcatori utilizzati, ma senza grandi risultati per quanto riguarda l'analisi della variabilità nelle praterie di *Posidonia oceanica* (Capiomont et al., 1996).

Successivamente, è stato introdotto l'utilizzo dei RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*, Williams et al., 1990). Questi marcatori sono dominanti e non consentono la distinzione tra eterozigoti e omozigoti. Inoltre, i risultati ottenuti sono scarsamente riproducibili, rendendo impossibile il confronto tra studi indipendenti e indicavano una quasi completa clonalità delle praterie, un numero molto basso di alleli per locus e un'estrema differenziazione genetica tra le popolazioni (Procaccini et al., 1996; Procaccini e Mazzarella, 1996; Jover et al., 2003).

I marcatori dominanti ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), (Zietkiewitz et al., 1994), al contrario, sono molto più riproducibili. Il maggior limite di questa tecnica è rappresentato dal fatto che i polimorfismi ISSR sono visualizzati come marcatori dominanti e quindi, come nel caso della tecnica RAPD, la presenza di una banda può indicare sia un omozigote dominante, che un eterozigote, così che non è possibile distinguere i diversi genotipi e ricavare stime di eterozigosità. L'assenza della banda, invece, può essere dovuta sia alla perdita del sito di *annealing* del *primer*, che a inserzioni o delezioni del frammento nel sito d'appaiamento del *primer*. L'assenza di banda può essere dovuta, in due individui, alla stessa mutazione ancestrale (Culley e Wolfe, 2001).

Lo studio della struttura genetica delle praterie di *P. oceanica* ha conosciuto nuove prospettive grazie all'utilizzo di una nuova generazione di marcatori genetici polimorfici: i microsatelliti.

I microsatelliti, detti anche SSR (*Simple Sequence Repeats*), sono costituiti da corte sequenze (da 1 a 6 paia di basi) ripetute in tandem, presenti nel genoma di un'ampia varietà di organismi eucariotici e procariotici (Li et al., 2002). In base alla lunghezza delle unità ripetute i microsatelliti vengono distinti in mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, ed esanucleotidi. È possibile rilevare i polimorfismi dei microsatelliti amplificando, attraverso dei *primer* specifici, regioni conservate fiancheggiando i microsatelliti.

La variabilità genetica può essere analizzata a differenti livelli gerarchici, da quello individuale (stimando l'eterozigosi), a quello di intra-popolazione (considerando, ad esempio, il valore di diversità clonale o genotipica) e di inter-popolazione (tramite stime di flusso genico e valutando i rapporti biogeografici e filogeografici tra popolazioni), fino ad arrivare a considerare specie o taxa superiori attraverso studi filogenetici e tassonomici. Va considerato inoltre che in ambiente marino la diversità genetica è distribuita su scale spaziali diverse, che possono andare da pochi millimetri a migliaia di chilometri (Procaccini e Maltagliati, 2004). In realtà, si ha una grande difformità delle masse d'acqua rispetto alle condizioni locali di salinità, temperatura, idrodinamismo, disponibilità di luce e questo determina la necessità per ciascuna popolazione di sviluppare adattamenti specifici e ne limita il flusso genico.

Nelle popolazioni di fanerogame marine, la distribuzione spaziale dei genotipi all'interno di una prateria può non essere stocastica a causa dei processi di accrescimento vegetativo. "Genet" (individui genetici derivanti dalla fecondazione dello zigote) e "ramet" (individui morfologici che si originano per riproduzione vegetativa, cloni) possono formare delle "macchie" a diversi livelli di variabilità (Migliaccio et al., 2005). Studi recenti (Serra et al., 2010) hanno permesso di evidenziare un maggiore polimorfismo genetico nelle popolazioni del bacino occidentale (Bacino Algero-Provenzale e Bacino Tirrenico), rispetto a quelle del bacino orientale (Mar Adriatico e Mar Egeo). Popolazioni del Canale di Sicilia, pur facendo parte formalmente del bacino orientale, appartengono in realtà al gruppo delle popolazioni occidentali. Tale studio ha spostato la linea di transizione tra i due bacini a livello di Palizzi (punta sud-orientale della Calabria). Sembra tuttavia che non vi sia isolamento a livello riproduttivo, in quanto nella maggior parte delle popolazioni della zona di contatto non si riscontra *linkage disequilibrium* e in esse sono presenti alleli comuni sia alle popolazioni orientali che in quelle occidentali. *Linkage disequilibrium* (LD) è l'associazione non casuale tra alleli di loci differenti, ed è utile per descrivere la distribuzione dei genotipi ibridi. Se le popolazioni che sono venute in contatto sono geneticamente differenziate si possono avere forti linkage disequilibria anche fra loci non linked e deficit di eterozigoti. Alla formazione di una zona ibrida questi valori sono in genere massimi, ma con il passare delle generazioni possono calare con l'aumentare del "mixing" tra i pool genici, in assenza di selezione, e in assenza di flusso di parentali al centro della zona. Gli autori hanno ipotizzato che la separazione tra popolazioni orientali ed occidentali si sia originata durante le glaciazioni del Pleistocene, con la formazione di due differenti zone di rifugio localizzate nel Sud-Est e nel Sud-Ovest del Mediterraneo, tornate in contatto in tempi geologicamente recenti (Arnaud-Haond et al., 2007; Serra et al., 2010). A sostegno di tale ipotesi le popolazioni del Canale di Sicilia mostrano un valore medio di alleli più alto e una maggiore diversità clo-

nale rispetto ad altre popolazioni del Mediterraneo, come dovrebbe essere in una zona di ibridazione intraspecifica.

La bassa variabilità propria di alcune zone, invece, potrebbe essere una conseguenza dell'“effetto del fondatore” durante i processi di ricolonizzazione “post glaciale”, cosa che si ipotizza sia accaduta nelle popolazioni monoclonali del Nord-Adriatico (Ruggiero et al., 2002; Waycott et al., 2006).

1.3 Importanza ecologica dei sistemi di *Posidonia oceanica*

Le praterie di *P. oceanica* rivestono un ruolo importante e multifunzionale nei sistemi litorali (Duarte, 2002). L'apparato radicale e quello stolonifero della pianta garantiscono un effetto di stabilizzazione del fondo marino, mentre gli accumuli sulla spiaggia di foglie morte, o “*banquettes*”, riducono l'azione erosiva del moto ondoso sul litorale, assorbendo l'energia che si libera in seguito all'impatto dell'onda. Studi condotti da Jeudy de Grissac et al. (1984) hanno evidenziato un arretramento di 15 - 18 metri del litorale sabbioso come conseguenza della regressione di un solo metro cubo di prateria.

Posidonia oceanica contribuisce in maniera cospicua all'ossigenazione delle acque, grazie alla sua attività fotosintetica. Si stima che 1 m² di prateria produca giornalmente da 4 a 20 litri di ossigeno (Bay, 1978) e che, grazie agli scambi che avvengono nell'interfaccia tra acqua e aria, *Posidonia oceanica* possa essere considerata una produttrice di ossigeno anche per gli ambienti terrestri, almeno in alcuni periodi dell'anno (Frankignoulle et al., 1984).

Per alcuni autori, la prateria di *P. oceanica* rappresenta il luogo con maggiore biomassa e produttività del Mediterraneo (Buia et al., 1992; Boudouresque et al., 1984; Ott., 1980; Wittman, 1984). La grande quantità di sostanza organica prodotta costituisce una fonte di cibo diretta e indiretta per numerosi organismi ed è il punto di partenza di una complessa rete trofica (Mazzella et al., 1992; Mazzella e Zupo, 1995), che coinvolge sia la catena del detrito (con le foglie morte) che quella del pascolo. I tessuti verdi della fanerogama vengono utilizzati direttamente solo da poche specie animali (l'echinoderma *Paracentrotus lividus*, lo sparide *Sarpa salpa* e l'isopode *Idotea hectica*), per la presenza di acido cicorico e l'alto contenuto di cellulosa che ne limitano la digeribilità. La maggior parte degli erbivori che vivono nella prateria (molluschi, anfipodi, policheti e isopodi) si cibano degli epifiti algali presenti sulle foglie (Gambi et al., 1992). Gli effetti della componente epifita dimostrati per altre fanerogame, come la riduzione del disseccamento, la protezione dai raggi ultra-

violetti, l'interferenza per l'assimilazione del carbonio e del fosforo (Penhale e Smith, 1977; Trocine *et al.*, 1981; Borum e Wium-Andersen, 1980; Bulthuis e Woelkerling, 1983; Sand-Jensen e Borum, 1983; Cebrián e Enriquez, 1999; Sand-Jensen, 1977; Johnstone, 1979), non sono stati messi in luce in questa fanerogama, in cui l'abbondanza degli epifiti sembra non superare mai il 20% della biomassa fogliare (Buia *et al.*, 1996). La maggior ricchezza floristica e la massima epifitizzazione si raggiungono nel periodo estivo, tra Giugno e Settembre, mentre i valori minimi si registrano nel periodo invernale, compreso tra Dicembre e Aprile; tale stagionalità corrisponde alle fasi di crescita delle foglie di *P. oceanica*. Tanto maggiore è la velocità di crescita, tanto minore è l'insediamento degli epibionti (Buia *et al.*, 1989).

Le praterie di *P. oceanica* rivestono anche notevole importanza per l'elevatissima diversità ecologica delle comunità animali ad esse associate, costituendo una sorta di *nursery* e un rifugio per un grande numero di organismi, tra cui anche specie di importanza commerciale, come pesci, cefalopodi e crostacei (Francour, 1997) e specie minacciate d'estinzione come *Pinna nobilis* (Coppa *et al.*, 2010).

1.4 Fattori che influenzano la regressione delle praterie

La regressione è un fenomeno, che purtroppo colpisce tutte le fanerogame a livello mondiale. Per *Posidonia oceanica* la regressione delle praterie è maggiormente diffusa nelle regioni costiere del bacino occidentale, in particolare nel settore centro-settentrionale, dove si manifesta con un arretramento dei limiti delle praterie, sia superiore che inferiore, con una riduzione della densità e una diminuzione dell'estensione dell'areale di distribuzione. Lungo molte aree costiere di questo settore del Mediterraneo, la profondità massima a cui la pianta si spinge è risalita da 30 a 15-20 m negli ultimi 20 anni.

Le attività umane rappresentano uno dei principali fattori di disturbo e alterazione delle praterie (Leriche *et al.*, 2006; Montefalcone *et al.*, 2010). L'eccessivo sfruttamento delle zone costiere, la presenza di strutture portuali, dighe foranee, sbarramenti e canali artificiali, modificando il regime idrodinamico, possono provocare un aumento della sedimentazione con conseguente soffocamento delle piante. L'immissione nelle acque costiere di reflui urbani crea una condizione di elevata torbidità, dovuta sia all'aumento delle particelle in sospensione, che al massiccio sviluppo di organismi fitoplanctonici, come conseguenza dell'eutrofizzazione delle acque. Il risultato è una diminuzione

dell'intensità luminosa e la conseguente riduzione dell'attività fotosintetica della pianta. Gli scarichi urbani inoltre provocano una netta regressione delle praterie a causa della grande quantità e varietà di sostanze chimiche ad essi associate, che alterano la biosintesi dei pigmenti fotosintetici (Augier e Madinas, 1979; Panayotidis et al., 1990). Alle sostanze altamente inquinanti appartengono anche i detergenti, le cui caratteristiche tossicologiche provocano danni letali a livello istologico e alterano i processi di accrescimento della pianta (Augier et al., 1984). Infine gli idrocarburi, formando un sottile film sulla superficie dell'acqua, ostacolano la penetrazione della luce e, depositandosi sulle foglie, ne riducono gli scambi gassosi. Gli impianti di acquacultura e, in particolare, quelli che utilizzano gabbie galleggianti hanno una forte azione impattante sulle praterie a *P. oceanica*, per l'aumento del carico organico nell'acqua e nei sedimenti, favorendo così la copertura epifita e l'attenuazione dell'intensità luminosa (Cancemi et al., 2000; Cancemi et al., 2003; Holmer et al., 2008; Pérez et al., 2008).

Tra gli inquinanti più tossici dal punto di vista ambientale vanno sicuramente annoverati i metalli pesanti quali mercurio, arsenico, cadmio e piombo che sono tra i più dannosi. Questi elementi, una volta entrati in contatto con la fauna e la flora, hanno dei meccanismi d'azione specifici che li rendono altamente pericolosi. La capacità di bioaccumulo di molte specie animali e vegetali fa sì che alcuni metalli attraverso la biomagnificazione della rete trofica, possano giungere all'organismo umano, con effetti sistemici. Per esempio, è noto come il mercurio inorganico contenuto negli scarichi industriali tenda a depositarsi sul fondo di fiumi, laghi e mari. I batteri anaerobi lo complessano in dimetil-mercurio, $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, il quale può causare seri danni al sistema nervoso e al cervello di numerose specie animali e all'uomo stesso, fino a provocare anche delle mutazioni genetiche (Ferrari et al., 2002).

La tossicità dei metalli pesanti dipende dai numerosi stadi di ossidazione che possono assumere e che conferiscono loro un'alta instabilità. Generalmente, i metalli pesanti tendono a stabilire interazioni stabili con le macromolecole tramite legami ionici e covalenti che causano modificazioni strutturali e funzionali. I principali effetti negativi che i metalli pesanti hanno sulle cellule sono l'alterazione dell'attività enzimatica, la formazione di radicali liberi che a loro volta danneggiano altre componenti cellulari grazie alla loro attività ossidante, i danni al livello del DNA con effetti mutageni e cancerogeni (Costa, 1991; Lees, 1991).

La gran parte delle piante è in grado di accumulare metalli pesanti (Fe, Zn, Mn, Cu) indispensabili ai loro processi vitali. Alcuni tipi di ioni metallici, che risultano notevolmente tossici per la maggior parte degli organismi viventi, possono invece essere accumulati da alcune piante anche in notevole quantità.

Il meccanismo di accumulo dei metalli pesanti nelle piante può essere suddiviso in tre fasi principali (Salt *et al.*, 1995a):

- assorbimento a livello radicale;
- trasporto dei metalli all'interno della pianta;
- meccanismi di detossificazione.

Le piante hanno anche sviluppato delle strategie difensive di detossificazione. Per esempio, alcune piante escludono i metalli dalle radici evitando di sviluppare l'apparato radicale nelle zone più contaminate, oppure vengono indotte delle modificazioni nei trasportatori di membrana per ridurre l'influsso o aumentare l'efflusso di metalli (Clemens, 2001).

Molte piante reagiscono ad elevate concentrazioni di metalli pesanti confinandoli nelle radici ed evitando la loro traslocazione nei tessuti epigei; all'interno delle cellule radicali i metalli si legano ad alcuni composti, tipicamente fitochelatine e metallotioneine, e vengono immobilizzati nei vacuoli (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Le metallotioneine (MTs) sono proteine a basso peso molecolare (da 500 a 14000 Da), localizzate nell'apparato del Golgi, caratterizzate da un ricco contenuto in cisteina e un'elevata affinità per i metalli pesanti (Liu *et al.* 2002, Yu *et al.* 1998, Garcia-Hernandez *et al.* 1998, Moriguchi *et al.*, 1998, Nam *et al.* 1999, Giordani *et al.*, 2000, Bhalerao *et al.*, 2003, Buchanan-Wollaston, 1997, Choi *et al.* 1996, Dong and Dunstan, 1996, Seki *et al.* 2002, Ferrat *et al.*, 2007).

Le fitochelatine sono proteine citoplasmatiche appartenenti alla famiglia delle metallotioneine e quindi anch'esse hanno un basso peso molecolare e sono ricche in cisteina. Queste molecole si complessano ai metalli attraverso il gruppo sulfidrilico delle cisteine e li sequestrano nel vacuolo.

L'induzione di fitochelatine e/o metallotioneine è specie-specifica e dipende anche dal tipo di stress ambientale.

Altre piante rispondono alla presenza di elevate concentrazioni di metalli traslocandone una discreta quantità nella parte aerea e immagazzinandoli nei tessuti fogliari. Qui la tossicità dei metalli viene ridotta tramite la complessazione con ligandi specifici o la precipitazione in composti insolubili, in modo da ridurre la concentrazione del metallo libero.

Molti ioni metallici sono essenziali alle piante all'interno di parecchie vie metaboliche e per il corretto funzionamento di alcuni enzimi. Tuttavia, anche nelle piante, la presenza di concentrazioni elevate di uno o più metalli può portare al manifestarsi di effetti fitotossici con conseguenze anche letali.

La tossicità di alcuni xenobiotici attiva quindi un processo di detossificazione, inducendo l'attivazione di numerosi enzimi e metaboliti secondari: si sviluppa in tal modo uno stato antiossi-

dante cellulare, ovvero una serie di meccanismi che consentono agli organismi di resistere ad una situazione di stress ambientale (Mitrovic et al., 2004).

Il recente utilizzo di tecniche di trattamento delle acque consente di monitorare e ridurre tale regressione, come è stato registrato lungo le coste francesi (Boudouresque et al., 2000).

Tra le cause di regressione delle praterie a *Posidonia oceanica*, anche i danni meccanici occupano un ruolo importante. Tra di essi sono da menzionare i danni provocati dalla pesca con attrezzi distruttivi quali le reti a strascico (Ardizzone et al., 1984), che determinano lo scalzamento di intere zolle di *matte* mettendo a nudo il substrato, difficilmente ricolonizzabile dalla pianta, in considerazione dei suoi bassi tassi di crescita. Effetto simile a quello delle reti a strascico deriva dai frequenti ancoraggi, evidente in zone altamente frequentate dai diportisti (Ceccherelli e Campo, 2002; Ceccherelli et al., 2007; Montefalcone et al., 2008). Tipologie diverse di ancore possono provocare danni di diversa entità (Milazzo et al., 2002), suggerendo quindi l'importanza di un'adeguata regolamentazione degli ancoraggi nelle zone costiere in cui cresce la fanerogama.

Altre alterazioni indirettamente legate alle attività umane sono rappresentate dall'introduzione di specie alloctone. È il caso recente dell'"invasione" di specie algali del genere *Caulerpa*, *Caulerpa taxifolia* e *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*, alghe tropicali con una crescita rapidissima. Queste specie possono competere con le fanerogame per il substrato (De Villele e Verlaque, 1995; Ceccherelli et al., 2000; Piazzini et al., 2001; Ceccherelli et al., 2002).

Un'ulteriore minaccia per le praterie è legata al cambiamento termico in atto nel bacino mediterraneo (Moliner e Picard, 1952; Augier e Boudouresque, 1970; Astraldi et al., 1995). Studi recenti evidenziano un incremento della produzione fogliare di *Posidonia* a partire dal 1987, anno in cui si è assistito ad una inversione termica (Astraldi et al., 1995), come conseguenza del cambiamento termico registrato nel nostro bacino (Buia et al., 2006). Si può ipotizzare che un continuo incremento nel tasso di crescita epigeo, a danno di quello ipogeo e delle riserve di carboidrati nei rizomi, possa alterare la resistenza meccanica della pianta con danni funzionali al sistema. Ciò potrebbe anche rappresentare nel tempo una limitazione della *fitness* della pianta e contribuire a fenomeni di regressione su più ampia scala (Buia et al., 2006).

È probabile che nessuna di queste fonti di disturbo sia sufficiente da sola a innescare il processo di regressione delle praterie a cui stiamo assistendo, ma che piuttosto si tratti di un effetto sinergico dei vari fattori considerati. In un organismo a strategia K, la durata e la frequenza dei diversi disturbi sono sicuramente d'importanza basilare nel determinare il tipo di risposta, la sua capacità di contrastare il disturbo nonché quella di resilienza.

1.5 Bioindicatori

La fascia costiera è soggetta a continui cambiamenti legati a diversi impatti, sia di origine naturale (come ad esempio l'erosione delle coste), che di origine antropica (Ruiz e Romero, 2003). Quest'ultimo, a partire dagli anni 50 fino a oggi, ha subito un forte incremento.

I sistemi a fanerogame, cui le Magnoliofite appartengono, proprio a causa della loro vicinanza alla costa, sono soggetti a diversi tipi di impatti antropici (scarichi industriali e urbani, pesca a strascico, opere marittime, allevamenti marini, attività legate al diporto nautico) i quali, sommati a quelli naturali (in prevalenza eventi meteo-climatici), ne causano un evidente e generalizzato declino (Short e Willy-Echeverria, 1996; Ruiz e Romero, 2003; González-Correa *et al.*, 2005; Montefalcone *et al.*, 2008; Montefalcone *et al.*, 2010).

La Conferenza di Rio de Janeiro del 1992 sulla Biodiversità (<http://habitat.igc.org/agenda21/Index.html>), segna un importante momento per alcune specie di fanerogame marine ritenute specie minacciate e quindi da sottoporre a regime di protezione. La Direttiva 2000/60/CE "Water Framework Directive" (WFD) per la protezione e il miglioramento della qualità di tutte le risorse idriche dell'Unione Europea, invece, si pone l'obiettivo di fissare un quadro comunitario per la protezione delle acque che assicuri la prevenzione e la riduzione dell'inquinamento, agevoli l'utilizzo idrico sostenibile, protegga l'ambiente e migliori le condizioni dei sistemi acquatici (EC, 2000; <http://europa.eu.int/scadplus/leg/it/evb/128002b.htm>). In particolare, la WFD prevede che gli Stati Membri eseguano analisi e monitoraggi, raccolta ed elaborazione dei dati per arrivare a classificare lo stato di qualità ecologica delle acque superficiali e conseguire infine lo "stato buono" dei diversi corpi idrici entro il 2015. A tal fine, la Commissione Europea ha stabilito una Strategia Comune di Implementazione (CIS), con l'obiettivo di creare delle linee metodologiche comuni ai vari paesi per l'interpretazione e l'applicazione della Direttiva.

Allo scopo di valutare lo stato ecologico dei corpi d'acqua, l'ambiente marino viene monitorato utilizzando degli indicatori biologici in grado di rispondere a diverse forme d'inquinamento.

In generale, con il termine "indicatore biologico" ci si riferisce ad un qualsiasi organismo (o insieme di organismi) in grado di fornire informazioni sulla qualità dell'ambiente e i suoi cambiamenti. Secondo la definizione data da Blandin nel 1986, *"l'indicatore biologico è un organismo o un gruppo di organismi (popolazione, comunità) che, con una risposta a livello biochimico, citologico, fisiologico o ecologico, permette di caratterizzare, in modo pratico e sicuro, lo stato di un ecosistema e di evidenziare, il più precocemente possibile, le probabili alterazioni"*. L'uso di bioindica-

tori è stato riconosciuto come uno degli strumenti di indagine più promettenti, poiché individua metodi pratici di valutazione indiretta della qualità dell'ambiente marino (Bellan, 1993).

Anche in Italia, alcune normative ministeriali assegnano alle comunità biologiche un importante ruolo nel definire lo stato di qualità dell'ambiente. La Legge 979/82 prima e poi il DL 152/99 richiamano la necessità di procedere a indagini quali-quantitative sul fitoplancton, sullo zooplancton, sulle fitocenosi a *Posidonia oceanica* e sulle comunità bentoniche più rappresentative dei fondali marino costieri del nostro territorio. Con la più recente normativa comunitaria, per la prima volta nella storia dei controlli ambientali in ambiente marino, la matrice biologica assume un ruolo fondamentale al pari di quella fisica e chimica. Con l'“analisi biologica”, infatti, si può determinare la storia di un sito dove proprio gli organismi che vi vivono, denunciano, attraverso le loro sensibilità, le alterazioni ambientali di quell'ecosistema nel tempo.

Nell'ambito dell'attuazione della WFD diventano prioritari la messa a punto di descrittori biologici a diversi livelli trofici dell'ecosistema (produttori primari, consumatori di diverso ordine, comunità macrobentoniche, macrofite e comunità ittiche).

Tali indicatori biologici:

- possono descrivere lo stato di salute di un corpo idrico poiché mantengono una memoria storica e spaziale dei fenomeni naturali e di perturbazione di un dato ecosistema;
- reagiscono non tanto ad un singolo fattore, ma alla variazione della situazione ambientale nel suo complesso;
- hanno la capacità di esprimere un effetto cumulativo;
- possono essere utilizzati in modo pratico fornendo valori quantitativi e confrontabili attraverso un linguaggio universale.

Tra gli organismi proposti come indicatori delle acque marine sono presenti alcune fanerogame che danno vita ad ecosistemi chiave per la fascia costiera (Hemminga e Duarte, 2001).

Nell'area mediterranea le fanerogame più comuni sono *Cymodocea nodosa*, *Zostera noltii* e *Posidonia oceanica*. Meno frequenti sono *Halophila stipulacea*, specie tropicale che è riuscita ad insediarsi prevalentemente nel settore sud-orientale del Mediterraneo e *Zostera marina* che predilige ambienti lagunari. Tra le varie fanerogame, *Posidonia oceanica* è stata considerata bioindicatore fitobentonico per l'eco-regione Mediterranea. Infatti, *Posidonia* è uno degli ecosistemi più produttivi e maggiormente diffusi del nostro bacino e per questo soggetta a continui impatti antropici di natura sia meccanica che chimica; è una specie molto longeva (Raniello et al., 2002), è sensibile all'inquinamento e ad altre pressioni legate all'attività umana (Augier et al., 1984; Ardizzone e Pe-

lusi, 1984; Ceccherelli et al., 2007; Guidetti e Fabiano, 2000; Holmer et al., 2008; Lefabrie et al., 2008; Leriche et al., 2006; Meinesz e Laurent, 1978; Pérez et al., 2008).

Le caratteristiche strutturali delle praterie, come profondità e tipologia di limite inferiore, densità dei fasci e ricoprimento, sono di fatto il risultato delle condizioni ambientali a cui la prateria è sottoposta (trasparenza dell'acqua, condizioni idrodinamiche e tasso di sedimentazione) (Meinez e Laurent, 1978; Pergent et al., 1995; Pergent-Martini et al., 1999).

La valutazione dello stato di una prateria di *Posidonia oceanica* può essere effettuato a tre livelli (Montefalcone, 2008): il livello "individuale" in cui si studia la fenologia della pianta, ossia la biometria delle foglie su base stagionale, così da ottenere informazioni sullo suo stato di "salute" e sulle condizioni di crescita (Buia et al., 2004; Leoni *et al.*, 2006; Marabà et al., 2006); il livello "popolazione" in cui si studia la morfologia e la struttura della prateria (coperture, densità, presenza di *matte* morta o canali *intermatte*, profondità del limite inferiore, tipologia di limite inferiore) in modo da ottenere informazioni indirette sulle condizioni ambientali a cui la prateria è sottoposta (Pergent et al., 1995; Montefalcone et al., 2008); il livello "comunità" in cui vengono studiate le interazioni tra pianta, flora e fauna associata (in particolare gli epifiti presenti sulle foglie) anche esse influenzate dalle alterazioni ambientali (Cancemi et al., 2003; Ruiz et al., 2001; Balata et al., 2007). I metodi utilizzati per lo studio possono essere distinti in "distruttivi" e "non distruttivi" (Buia et al., 2004). La maggior parte delle informazioni relative alla pianta (livello individuale) così come la maggior parte delle informazioni riguardanti la fauna e la flora associate (livello comunità) vengono ottenute attraverso tecniche "distruttive" in quanto si ha la necessità di prelevare campioni con un numero di repliche rappresentativo per ciascuna stazione di campionamento. Al contrario le informazioni relative al livello di popolazione e alcune analisi a livello di comunità, come ad esempio lo studio della fauna vagile, si possono ottenere mediante osservazioni in campo e per questo sono definite "non distruttive". L'importanza di *Posidonia oceanica* è legata anche al fatto che può essere considerata un tracciante di variazioni ambientali. Infatti, lungo i rizomi (fusti modificati) si conservano i resti di tessuto fogliare con maggiore contenuto in lignina, in particolare le basi delle foglie, la cui età può essere stimata attraverso una tecnica di retrodatazione detta lepidocronologia (Pergent et al., 1983; Pergent et al., 1989; Boudouresque et al., 1984). Questa tecnica si basa sulla variazione ciclica annuale dello spessore delle scaglie (così vengono definite le basi delle foglie una volta che la lamina fogliare si è staccata); un anno lepidocronologico è compreso tra due basi con spessore minimo e inizia all'incirca alla fine dell'inverno (Crouzet, 1981; Pergent et al. 1983). Attraverso questa tecnica è possibile stimare l'andamento annuale della produzione della pianta, sia come biomassa e allungamento del rizoma che come numero di foglie; è possibile altresì rilevare le fioriture

pregresse e l'eventuale contaminazione da metalli pesanti nei tessuti (Pergent, 1990). In definitiva, la combinazione delle tecniche di monitoraggio e quelle di retrodatazione consentono di valutare lo stato della pianta e delle praterie e la loro evoluzione su ampie scale temporali, desumendo indirettamente informazioni sulla qualità dell'ambiente (Pergent et al., 1995).

In un lavoro di Gosselin e collaboratori del 2006 condotto su praterie della fascia settentrionale della Corsica, è emerso come posidonieti antistanti a centri urbani (Nonza e Bastia) siano maggiormente esposti all'inquinamento antropogenico, presentano un contenuto di metalli pesanti molto elevato e un'attività enzimatica antiossidante alterata.

Queste ricerche hanno dimostrato come la *Posidonia* sia un attendibile bioindicatore, non solo perché la sua distribuzione è ampia, ma anche perché permette la retrodatazione e l'appianamento delle variazioni dei parametri in funzione dei cambiamenti stagionali.

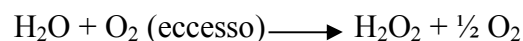
1.6 Stress ossidativo

Nelle piante lo stress ossidativo è la conseguenza di uno sbilanciamento fra l'accumulo e la rimozione all'interno dei tessuti di composti ossidanti, quali radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno. Le specie ROS (Reactive Oxygen Species) comprendono non soltanto i radicali liberi ma anche derivati dell'ossigeno non radicalici. Si formano nelle cellule in seguito alle normali reazioni metaboliche a cui partecipa l'ossigeno, oppure in seguito a stimoli esterni (radiazioni, sostanze chimiche, etc.). I radicali liberi sono frammenti di molecola dotati di un elettrone spaiato. Hanno un'altissima reattività poiché tendono a sottrarre alle molecole con cui vengono a contatto l'elettrone di cui hanno bisogno per ripristinare la normale situazione dell'orbitale.

I radicali liberi più pericolosi sono il radicale superossido (O_2^-) e il radicale idrossile (OH^\cdot). Quando un radicale libero reagisce con una molecola non radicalica si produce un nuovo radicale libero e si innesca una catena di reazioni fino a che non si forma un composto stabile.

Le specie non radicaliche sono molecole contenenti ossigeno, reattive ma prive di elettroni spaiati.

Tra queste abbiamo il perossido di idrogeno o acqua ossigenata (H_2O_2). Si forma durante i processi ossidativi:



La reattività dell'ossigeno molecolare (O_2) e delle sue specie parzialmente ridotte può essere spiegata analizzando la struttura dei loro orbitali molecolari e il valore dei potenziali di riduzione. O_2 è un diradiale stabile che presenta due elettroni spaiati negli orbitali π di antilegame (Fig. 1.6a); una importante conseguenza di ciò è che le molecole organiche con elettroni appaiati possono trasferire solo un elettrone alla volta all'ossigeno. Poiché l' O_2 è un accettore di elettroni relativamente debole

e molte molecole organiche sono donatori di elettroni deboli, l'O₂ non è capace di ossidare in maniera efficiente gli amminoacidi e gli acidi nucleici, tuttavia reagisce facilmente con gli elettroni spaiati di metalli di transizione e di radicali organici. Al contrario i potenziali di riduzione di O₂⁻, H₂O₂ e OH· mostrano come essi siano ossidanti molto più forti dell'O₂ (Fig. 1.6b).

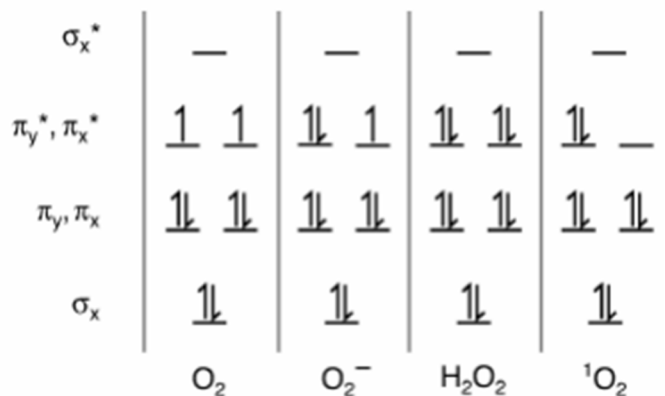


Fig 1.6a: Diagramma degli orbitali molecolari dell'ossigeno (O₂), del radicale superossido (O₂⁻), del perossido di idrogeno (H₂O₂) e del singoletto d'ossigeno (O₂⁻)

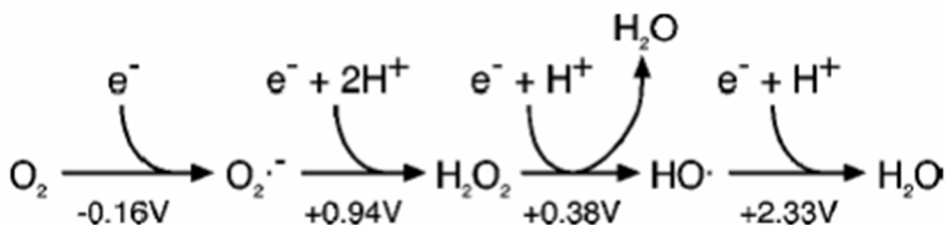


Fig 1.6b: Potenziali di riduzione dell'ossigeno molecolare e delle sue specie.

Il radicale ossidrilico OH· è tra i più dannosi poiché ossida qualsiasi classe di macromolecole; ha un'emivita di circa 1 μs ed è altamente reattivo. Queste caratteristiche lo rendono altamente pericoloso per la cellula. Generalmente viene prodotto a partire dall'idrolisi dell'acqua o dal perossido di idrogeno ed è definito *scavenger* perché partecipa alla trasformazione di molte sostanze inquinanti presenti nella troposfera. Viene convertito in O₂⁻ e perossido di idrogeno attraverso la reazione di Haber-Weiss. Quest'ultimo è moderatamente reattivo, ha un'emivita breve (1 ms), ma sufficiente per permettergli di diffondere ad una buona distanza dal sito di produzione (Dynowsky et al., 2008). Le

acquaporine gli consentono di attraversare le membrane cellulari sia direttamente che indirettamente e può inattivare diversi enzimi grazie a interazioni molecolari a livello dei gruppi tiolici.

Le proteine sono macromolecole target dell'azione dei ROS, in particolare a livello dei residui di arginina, lisina, prolina, treonina e triptofano: l'ossidazione riduce l'attività biologica delle proteine e quindi si ha un'alterazione non solo strutturale, ma anche funzionale della proteina stessa che diviene più suscettibile ad attacchi proteolitici. Le proteine cellulari possono essere ossidate mediante modificazione covalente dall'azione di ROS o altri sottoprodotti dello stress ossidativo (Gill e Tuteja, 2010).

I danni alle membrane lipidiche tramite la perossidazione lipidica (Fig.1.6c) sono uno degli effetti più gravi prodotti dai ROS, poiché non sono solo danni contro la compartimentalizzazione e la funzione cellulare, ma sono anche una fonte di propagazione dei radicali lipidici (ROO•), che possono andare a danneggiare gli altri componenti cellulari (Mano et al., 2009). A partire dai composti polinsaturi vengono prodotte numerose molecole quali chetoni, malondialdeide e composti correlati (Garg e Manchanda, 2009). Quando si supera ampiamente il livello soglia dei ROS la perossidazione lipidica diventa diffusa e si traduce in una diminuzione della fluidità della membrana, un aumento della fuoriuscita di soluti, ed un'entrata di composti tossici attraverso di essa (Moller et al., 2007).

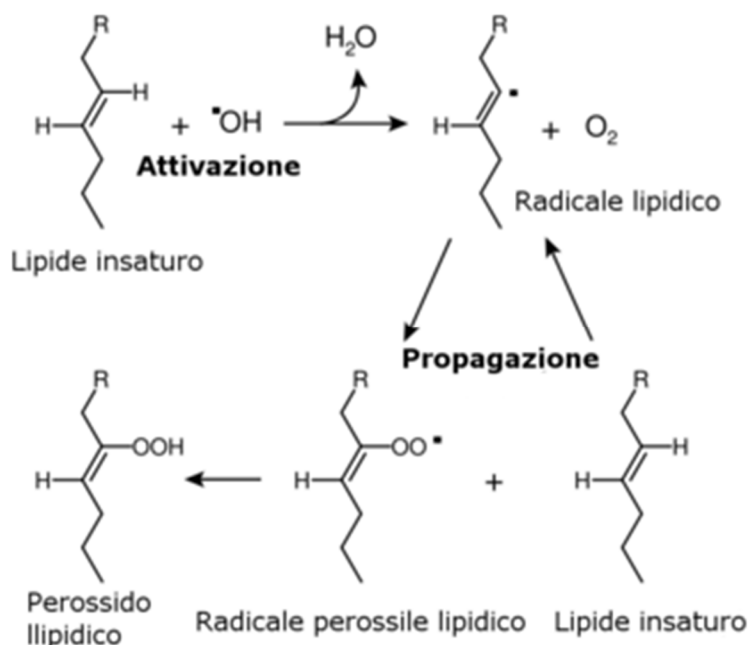


Fig1.6c: Perossidazione lipidica

Le interazioni tra ROS e acidi nucleici sono le più gravi, l'ossidazione del DNA ad esempio porta alla formazione di lesioni capaci di indurre mutazione genica, interrompere la trascrizione e influenzare i modelli di regolazione genica riducendo la sintesi proteica (Britt, 1999; Cooke et al., 2003). Il danno ossidativo a livello del DNA ha un profondo impatto sulla crescita e lo sviluppo cellulare che può avere gravi conseguenze per l'intero organismo.

Il sistema di protezione più comune nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno è quello di convertire i ROS in prodotti meno reattivi e quindi meno tossici per la cellula attraverso enzimi specifici. Se in passato i ROS erano considerati solamente dannosi per le cellule, ora è riconosciuto che la regolazione redox che coinvolge i prodotti dello stress ossidativo è anche un fattore importante di modulazione delle attività cellulari (Allen e Tresini, 2000). L'accumulo di perossido d'idrogeno nei tessuti vegetali funge infatti da molecola segnale per l'attivazione di alcuni geni tra i quali quelli di difesa (Levine et al., 1994), quelli di morte cellulare programmata per dare risposta ipersensibile e geni per la biogenesi dei perossisomi, importantissimi organelli dove vengono detossificate molecole tossiche (López Huertas et al., 2000).

Durante il loro normale metabolismo, le piante mantengono una produzione basale di ROS, che hanno differenti funzioni all'interno dei tessuti, tra le quali la trasmissione di elettroni nei percorsi di segnalazione degli stimoli e nella catena di trasporto degli elettroni durante la fotosintesi (Noctor e Foyer, 1998). Ciò si traduce in un equilibrio tra le reazioni di ossidazione e riduzione all'interno della cellula vegetale, che può essere interrotto da condizioni di stress che portano alla sovrapproduzione di ROS, oppure ad un'insufficienza di difese antiossidanti e tutto questo porta a uno stato di stress ossidativo.

Nelle piante i ROS vengono prodotti principalmente nei cloroplasti, organelli in cui avviene la fotosintesi clorofilliana. Durante la fotosintesi, infatti, l'energia solare viene trasferita ai fotosistemi I e II, localizzati nella membrana tilacoidale dei cloroplasti, in cui avvengono delle reazioni di ossidoriduzione, affinché gli elettroni vengano trasportati fino all'accettore finale di elettroni. Quando ai cloroplasti arriva un'eccessiva quantità di luce, l'energia radiante è superiore alla capacità del resto dell'apparato fotosintetico e quindi la sovraccitazione dei fotosistemi porta alla produzione di clorofilla nello stato di tripletto ($^3\text{chl}^*$), favorendo la produzione di ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), una delle specie reattive dell'ossigeno. Anche se le piante, al fine di prevenire i processi di fotossidazione, hanno sviluppato vari meccanismi fotoprotettivi, il cloroplasto rimane la maggior fonte di ROS nella cellula vegetale a partire almeno da tre diversi meccanismi:

- 1) la sovraeccitazione, mediata dalla luce, della clorofilla a livello del fotosistema II (PSII);

2) la reazione di Mehler a livello del fotosistema I (PSI), in cui l'O₂ viene ridotto direttamente dalla catena di trasporto elettronico;

3) la fotorespirazione.

Durante la fotorespirazione la RuBisCo, agendo come ossigenasi, porta alla sostanziale produzione di H₂O₂ attraverso il processo di riciclo del fosfoglicolato. Il perossisoma è un altro sito di produzione di ROS, nello specifico radicali O₂⁻ e ossido nitrico come conseguenza del loro normale metabolismo (del Rio, 2006).

I ROS possono essere prodotti in condizioni fisiologiche dai mitocondri e in piccola percentuale dal citocromo P450 nel citosol e nel reticolo endoplasmico, dove il citocromo assume un importante ruolo di detossificazione da sostanze potenzialmente dannose, producendo come metaboliti secondari i ROS. Nella pianta esistono differenti fonti di produzione di ROS, tra le quali l'enzima NADPH ossidasi nella membrana cellulare, gli enzimi perossidasi e ammino ossidasi legati alla parete cellulare e il trasporto di elettroni nel cloroplasto, mitocondrio e perossisoma, oltre a reazioni innescate dall'attacco di microrganismi patogeni alla pianta, la quale risponde con un "burst" ossidativo, implicato nella risposta ipersensibile (Lamb and Dixon, 1997).

Gli organismi viventi hanno evoluto dei meccanismi di difesa per assicurarsi il mantenimento dei livelli basali di ROS, necessari al loro normale funzionamento, attraverso un sistema di antiossidanti enzimatici e non enzimatici che mantengono ai giusti livelli le quantità di ROS presenti nei tessuti. I sistemi antiossidanti non enzimatici sono costituiti da molecole, dette "scavenger", tra cui l'acido ascorbico (vitamina C), l'α-tocoferolo (vitamina E), il β-carotene, i flavonoidi o i composti tiolici come il glutathione e la cisteina. Questi sono in genere donatori reversibili di idrogeno in processi coinvolgenti radicali liberi che, interagendo direttamente con le specie attivate dell'ossigeno, ne prevengono l'azione deleteria su altri componenti cellulari. I principali enzimi antiossidanti presenti nei tessuti vegetali sono la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), l'ascorbato perossidasi (APX), la guaiacolo perossidasi (GPOX) e la glutathione -S-transferasi (GST).

Il sistema di antiossidanti vegetali è caratterizzato da ridondanza e multifunzionalità delle molecole ed enzimi coinvolti, consentendo il mantenimento di un elevato grado di potere antiossidante, anche quando alcune componenti scarseggiano o non sono proprio presenti (Mittler, 2002; Van Breusegem et al., 2008).

1.7 La luce in mare

Il termine luce (dal latino *lux*) si riferisce alla porzione dello spettro elettromagnetico visibile dall'occhio umano, ed è approssimativamente compresa tra 400 e 700 nanometri di lunghezza d'onda, ovvero tra 790 e 435 THz di frequenza. Questo intervallo coincide con il centro della regione spettrale della luce emessa dal sole che riesce ad arrivare al suolo attraverso l'atmosfera. I limiti dello spettro visibile all'occhio umano non sono uguali per tutte le persone, ma variano soggettivamente e possono raggiungere i 720 nanometri, avvicinandosi agli infrarossi, e i 380 nanometri avvicinandosi agli ultravioletti.

La radiazione ultravioletta è una radiazione elettromagnetica con lunghezza d'onda immediatamente inferiore a quella della luce visibile e immediatamente superiore a quella dei raggi X (Fig1.7a).

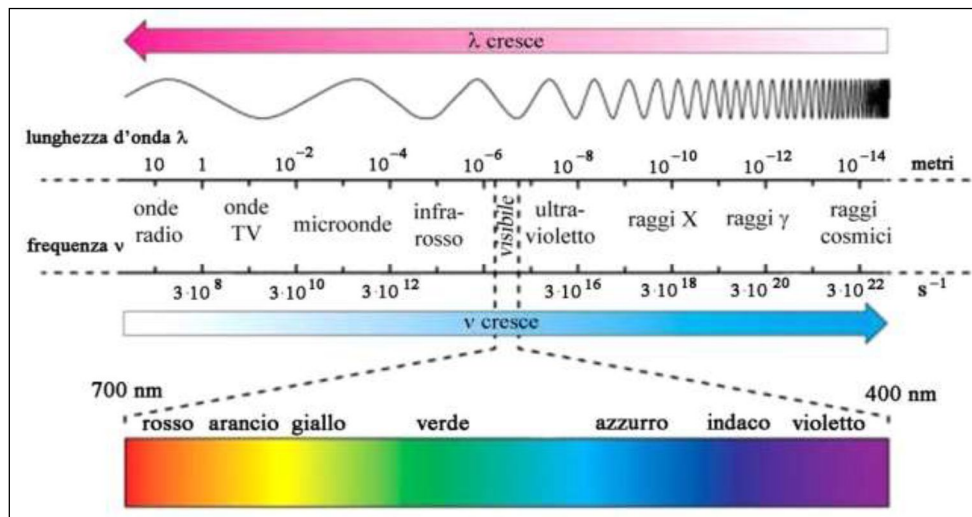


Fig 1.7a: Spettro della radiazione elettromagnetica

Il nome significa appunto "oltre il violetto", perché il violetto è l'ultimo colore dello spettro del visibile percepito dall'uomo, cioè quello con la lunghezza d'onda più corta, ovvero compresa tra i 380-450 nm. Rispetto alla radiazione visibile quella UV presenta frequenza maggiore e quindi risulta più energetica secondo l'equazione di Planck in cui l'energia di una radiazione è inversamente proporzionale alla sua lunghezza d'onda (λ).

La radiazione ultravioletta è suddivisa convenzionalmente in tre bande spettrali (Fig 1.7b):

- UV-C (100-280 nm): radiazione estremamente pericolosa per la vita a causa del suo alto contributo energetico;
- UV-B (280-315 nm): solo una piccola parte di UV-B provenienti dal Sole raggiunge la superficie terrestre. È la frazione più piccola dello spettro degli UV;

- UV-A (315-400 nm): è la radiazione non assorbita dall'atmosfera, responsabile dell'arrossamento ed invecchiamento della pelle.

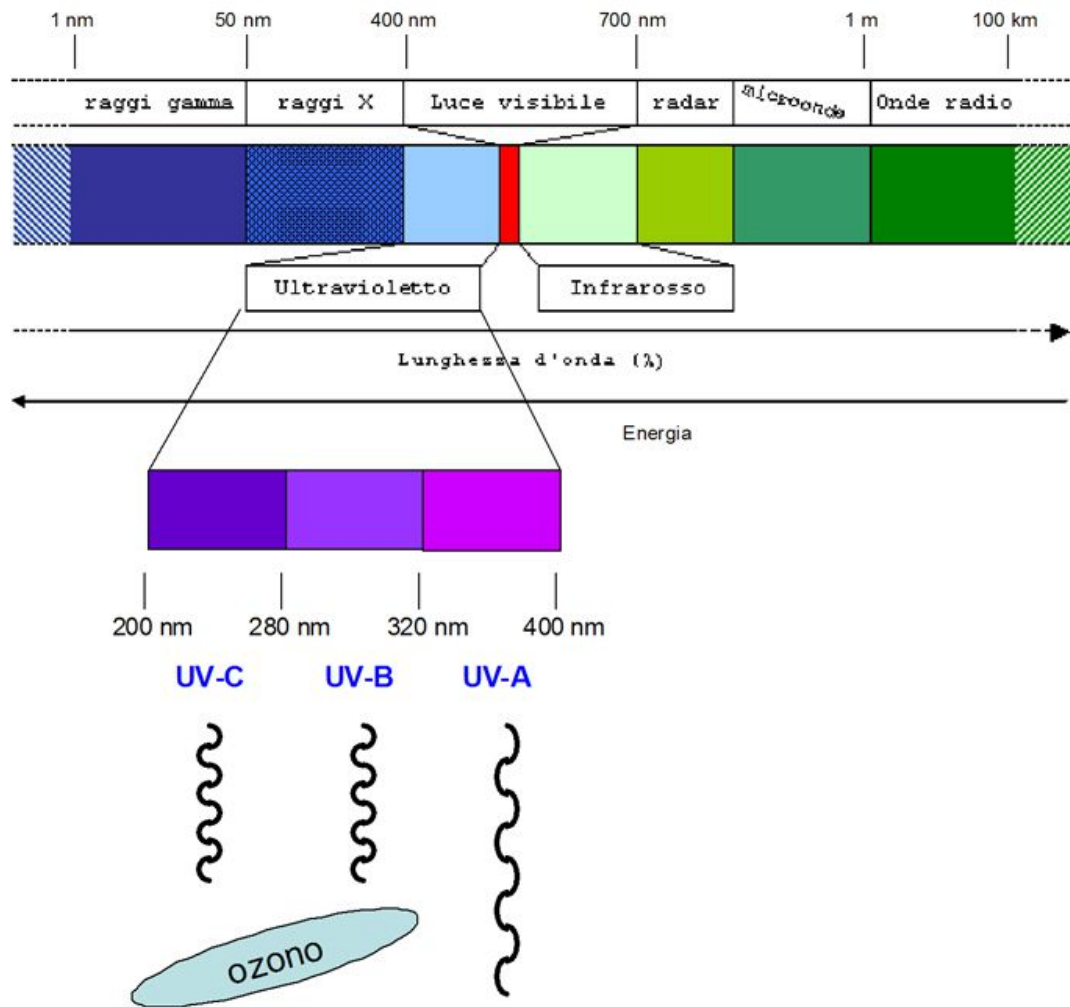


Fig 1.7 b: Spettro della radiazione ultravioletta

Il Sole emette luce ultravioletta in tutte e tre le bande UV-A, UV-B e UV-C, ma, a causa dell'assorbimento da parte dell'ozono in atmosfera, circa il 99% degli ultravioletti che arrivano sulla superficie terrestre sono UV-A. Infatti, praticamente il 100% degli UV-C e il 95% degli UV-B è assorbito dall'atmosfera terrestre. La diminuzione continua dello strato di ozono nella stratosfera è dovuta al rilascio di molecole alogenate inquinanti, come i clorofluorocarburi (CFCs) che, combinandosi con l'ozono, portano alla sua degradazione. Questa contaminazione risulta quindi essere un pericolo per le piante, gli ecosistemi acquatici, gli animali e la salute umana. La creazione di “buchi” nello strato di ozono aumenta la percentuale di radiazione UV-B che arriva a colpire la superficie terrestre e, di conseguenza, gli effetti citotossici, mutageni e carcinogeni di queste radiazioni (Longstreth et al., 1995). La pericolosità più alta della radiazione UV-B è dovuta a un effetto sterilizzante che questa

possiede per moltissime forme di vita, al danno per la pelle, potendo innescare la formazione di melanomi e altri tumori e favorirne l'invecchiamento e a danni che può recare alle componenti degli occhi.

Numerosi studi hanno dimostrato che le piante mostrano una sensibilità alla radiazione UV-B estremamente variabile (Musil et al., 2002). Le risposte più importanti riguardano l'accumulo di flavonoidi nelle foglie, cambiamenti di anatomia e morfologia fogliare e una ridotta crescita con una biomassa finale ridimensionata.

La luce è una radiazione elettromagnetica che si propaga alla velocità di $2,99 \times 10^8$ m/sec nel vuoto e che in mare si riduce a circa $2,2 \times 10^8$ m sec⁻¹.

La propagazione di un fascio luminoso, costituito da fotoni, è dominata da due processi fisici diversi: nell'atmosfera la diffusione, che consiste in una variazione della direzione rettilinea dei fotoni senza perdita di energia; invece, in acqua di mare, oltre alla diffusione, agisce anche l'assorbimento che è la trasformazione dell'energia radiante sostanzialmente in calore e, in minima quantità, nell'energia chimica posta in gioco nella fotosintesi clorofilliana.

In mare le stesse molecole d'acqua e i sali in soluzione provocano una debole diffusione molecolare, ma la maggior parte della radiazione luminosa è diffusa da tutte le particelle in sospensione (plancton, detriti organici ed inorganici). Lo studio delle proprietà ottiche delle acque marine è un aspetto importante dell'oceanografia fisica che per mezzo di esse classifica i diversi corpi idrici. Quando la radiazione luminosa si propaga nell'acqua di mare la sua intensità decresce in modo esponenziale: dopo i primi 50 cm dalla superficie del mare la radiazione incidente si riduce di almeno il 50%; l'1% penetra al massimo fino a 100-150 m, la completa oscurità domina da qualche centinaio di metri fino al fondo degli oceani. L'attenuazione della luce via via che essa penetra lungo la colonna d'acqua è dovuta a due processi fisici:

- 1) l'assorbimento che coinvolge la conversione dell'energia elettromagnetica in altre forme di energia, principalmente quella termica (calore) e chimica (fotosintesi); responsabili dell'assorbimento sono gli organismi del fitoplancton, le particelle organiche e le stesse molecole d'acqua;
- 2) la diffusione, processo che modifica la direzione di propagazione dei fotoni in rapporto alla riflessione procurata dalle particelle in sospensione; la variazione di direzione è minore quanto più piccole sono le particelle presenti nel mezzo ma, maggiore è la quantità di particelle, più grande sarà l'incidenza dell'assorbimento e della diffusione.

Le acque costiere sono generalmente meno trasparenti o più torbide di quelle al largo a causa dell'apporto fluviale di materiali terrigeni e di nutrienti che in prossimità delle foci dei fiumi (e di grandi sbocchi cloacali) possono innescare fioriture algali. Anche le correnti costiere o le onde sul

litorale contribuiscono all'aumento della torbidità risospendendo i sedimenti. Al largo e nelle grandi aree centrali marine a bassa concentrazione di nutrienti e modesta produzione biologica, le acque sono molto chiare e trasparenti.

La radiazione solare che giunge alla superficie del mare dipende dalla latitudine, dalla stagione e dalla copertura del cielo. La durata del fotoperiodo, cioè le ore di illuminazione, varia anche secondo la latitudine e il periodo dell'anno: all'equatore è di 12 ore ma nelle regioni temperate aumenta gradualmente procedendo verso le latitudini più alte e dalla primavera all'estate, fino al massimo di 24 ore in corrispondenza dei poli. Non tutta la radiazione che giunge alla superficie penetra in acqua: una parte viene immediatamente riflessa verso l'alto e diffusa dalle particelle presenti nel microstrato superficiale. La percentuale di luce riflessa (detta albedo) dipende dallo stato del mare (le onde aumentano la superficie di riflessione), dalla copertura del cielo (per la quantità di luce riflessa verso il basso dalle nuvole) e dall'altezza del sole sull'orizzonte.

La riduzione della radiazione che penetra in profondità nella colonna d'acqua può essere espressa dall'equazione seguente:

$$E_z = E_0 e^{-kz}$$

dove E_0 è la radiazione incidente alla superficie, E_z è la radiazione residua dopo la propagazione fino a z metri di profondità, k è il coefficiente di estinzione verticale (espresso in m^{-1}) ed e è la base dei logaritmi naturali. Il valore di k varia con la lunghezza d'onda: è elevato agli estremi dello spettro e aumenta con la torbidità (numero di particelle presenti) della colonna d'acqua.

Negli studi di biologia marina riguardanti la fotosintesi si utilizza il coefficiente di estinzione verticale medio, K_q , relativo al campo spettrale del visibile, compreso nell'intervallo di 350-720 nm, che corrisponde all'energia necessaria ai processi fotosintetici P.A.R. (Photosynthetically Active Radiation).

L'attività fotosintetica del fitoplancton mostra come un tasso fotosintetico positivo, sufficiente cioè a superare mediamente i processi respiratori giorno-notte nell'ecosistema marino, dall'equatore ai poli e durante i diversi periodi stagionali, si osserva dalla superficie fino alla profondità dove arriva in media l'1% della radiazione superficiale incidente. Questo strato si chiama zona eufotica e la profondità dell'1% viene definita come il limite inferiore dello strato eufotico. Poco al di sotto di essa si trova la quota alla quale si compensano, mediamente durante le 24 ore, i processi di produzione e di respirazione e viene chiamata profondità di compensazione (Z_c); l'energia luminosa disponibile a questa quota è definita come intensità di compensazione (E_c). I processi fotosintetici continuano al di sotto di Z_c ma la produzione netta è negativa.

Al di sotto della zona eufotica si estende la zona disfotica nella quale i processi fotosintetici hanno un bilancio negativo, ma la quantità di luce disponibile può essere ancora idonea per la visione degli organismi animali.

La zona afotica è dominata dall'oscurità e le modeste quantità di luce che possono pervenirvi dalla superficie sono di scarso significato biologico (Fig 1.7c). I limiti di queste zone differiscono ampiamente in dipendenza dalla trasparenza e dai diversi tipi di acque.

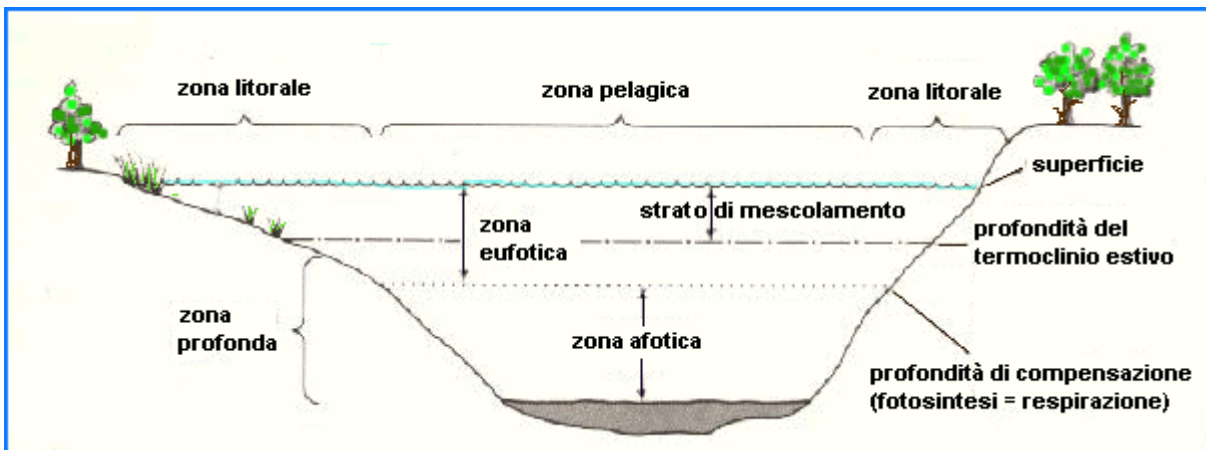


Fig1.7c: Zonazione della vegetazione marina del Mediterraneo

La crescita delle piante marine dipende dalla quantità e qualità di luce disponibile per la fotosintesi (Zieman e Wetzel, 1980). Pertanto, la riduzione di luce subacquea, a causa di disturbi antropici e naturali, spesso sfocia nella scomparsa di interi tratti di praterie (Short e Wyllie-Echeverria, 1996). Come risultato dell'assorbimento e dello *scattering*, dovuti a sostanze disciolte, fitoplancton, particolato ed acqua stessa (Weidemann e Bannister, 1986; McPherson e Miller, 1987; Roesler et al., 1989; Gallegos et al., 1990), l'irradianza lungo la colonna d'acqua, E_d , diminuisce con l'aumentare della profondità in maniera approssimativamente esponenziale secondo la relazione:

$$E_d(z) = E_d(0)e^{-kdz}$$

Dove $E_d(z)$ ed $E_d(0)$ sono rispettivamente i valori di irradianza a z metri di profondità e mediamente sotto la superficie; mentre kd è il coefficiente di attenuazione verticale per l'irradianza discendente.

Il campo di luce immediatamente sotto la superficie, al netto delle perdite dovute alla riflessione, ha essenzialmente la stessa composizione spettrale e la stessa energia di quello appena sopra la superficie. Circa la metà di questa energia è costituita dalla radiazione infrarossa che viene assorbita dalle molecole d'acqua nei primi 50 cm; il calore solare che deriva dalla radiazione infrarossa rima-

ne così intrappolato in questo strato superficiale per alcune ore, influenzando in modo rilevante il comportamento idrodinamico della massa d'acqua. Oltre tale profondità è possibile quindi considerare solamente la banda che si estende dal vicino ultravioletto alla zona del *far-red*, poco oltre i 700 nm. Dell'energia radiante rimasta, circa un terzo appartiene alla banda visibile dell'arancione-rosso tra 600 e 700 nm e viene assorbita sempre dall'acqua, non in modo così intenso come l'infrarosso, ma abbastanza fortemente da assicurare la sua completa rimozione già nei primi 10 metri. Perciò quasi due terzi del flusso solare totale che penetra nel mare vengono assorbiti nei primi 10 metri d'acqua: l'assorbimento di questa energia radiante, combinato con le turbolenze indotte dal vento, dà origine a strati d'acqua superiori, caldi e miscelati, l'esistenza dei quali ha importanti implicazioni nel funzionamento dell'intero ecosistema marino, specialmente per la produzione primaria fitoplanctonica. La distribuzione spettrale del campo di luce al di sotto dei 15m è ristretta alla banda blu-verde, tra i 400 ed i 500 nm, con un evidente picco nella regione del blu a 440-490 nm. L'acqua assorbe debolmente in questa regione spettrale, nondimeno tutta l'energia alla fine verrà assorbita trasportando verso i livelli più bassi dello strato eufotico l'energia termica contenuta nei fotoni. La velocità di attenuazione relativa alle diverse lunghezze d'onda è influenzata dallo spettro di assorbimento del mezzo acquatico. In acque marine non produttive, dove l'acqua è il principale componente assorbente, la luce blu e verde penetrano entrambe in profondità, mentre la luce rossa, che assorbe l'acqua, si attenua con rapidità. Nelle zone produttive di *upwelling*, la luce blu è attenuata più intensamente rispetto alla verde a causa dell'assorbimento da parte dei pigmenti fitoplanctonici, ma non tanto quanto quella rossa. Nelle aree costiere che contengono più sostanza gialla e fitoplancton rispetto alle acque in mare aperto, la banda verde è ancora quella più penetrante. Solo nelle acque costiere più torbide, influenzate dagli apporti fluviali, la luce blu è attenuata fortemente come la luce rossa (Fig 1.7d).

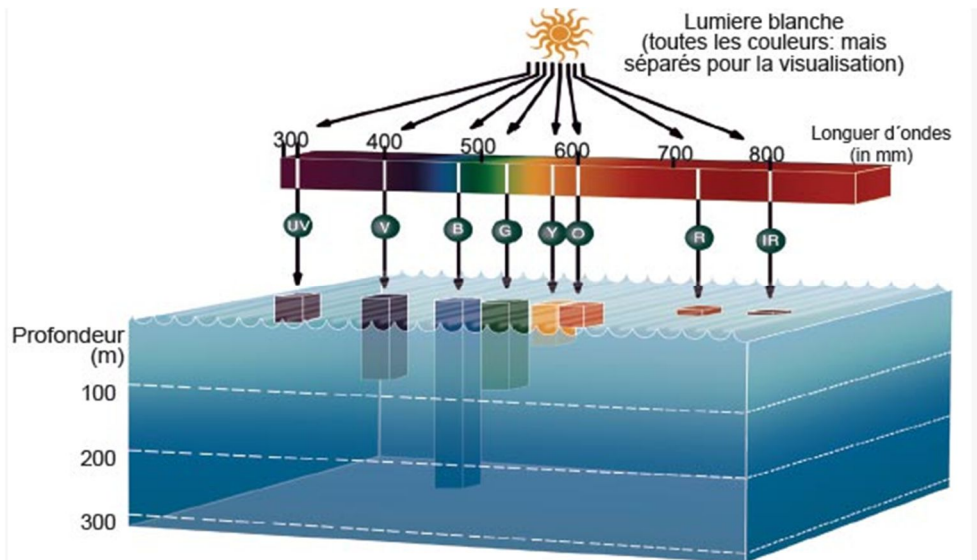


Fig1.7d: Profondità di penetrazione della luce chiara all'interno della colonna d'acqua. Poiché la luce rossa viene assorbita molto di più, ha una profondità di penetrazione più superficiale e la luce blu penetra più in profondità (Smith et al., 1981).

Dal momento che le cellule fitoplanctoniche devono raccogliere efficacemente la luce in accordo con le caratteristiche di assorbimento della massa d'acqua in cui si trovano, possiedono una composizione di pigmenti diversa a seconda delle lunghezze d'onda con cui più spesso sono in contatto. Questo è il motivo per cui, ad esempio, dinoflagellati e diatomee investono molta energia per produrre complessi specializzati proteina-carotenoidi che assorbono soprattutto nella regione blu-verde, come fanno anche le ficobiliproteine delle cianofite (Fig.1.7e).

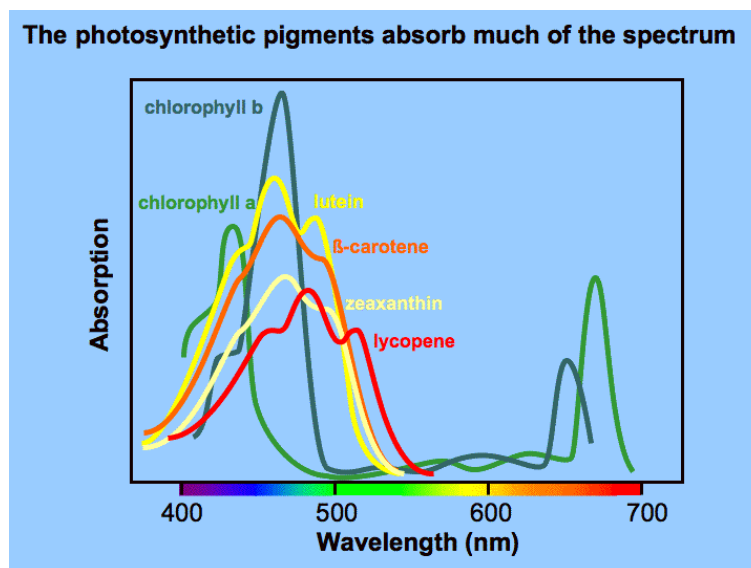


Fig. 1.7e: Pigmenti fotosintetici assorbiti maggiormente

Le fanerogame spesso crescono nella zona intertidale, dove c'è una disponibilità di luce minima per la sopravvivenza. I requisiti minimi di irraggiamento sono stati descritti come la percentuale di luce usata al limite della profondità massima, K_d è il coefficiente di attenuazione della luce (Duarte, 1991; Dennison et al., 1993). Tuttavia, i requisiti minimi di luce delle fanerogame marine sono compresi tra il 2-37% dell'irraggiamento superficiale e sono molto superiori a quelli di macroalghe e fitoplancton (circa il 1-3% , Strickland, 1958; Luning e Dring, 1979; Sand-Jensen, 1988; Duarte, 1991; Markager e Sand-Jensen, 1992; Dennison et al., 1993).

I requisiti minimi di luce variano tra le varie fanerogame marine (Dennison et al., 1993). Questa variabilità all'interno di ogni specie è probabilmente attribuita a foto-acclimatazione e a regimi semplificati locali. Le esigenze di luce delle piante sommerse sono strettamente correlate alla morfologia della pianta stessa (Middelboe e Markager, 1997).

1.8 Biomarcatori

Negli anni Ottanta, si è iniziato a porre l'attenzione sui possibili effetti che i contaminanti ambientali possono provocare sugli organismi, dalla molecola alla comunità.

Ogni organismo vivente, animale o vegetale, che campionato in un determinato ambiente fornisca indicazioni sul livello di contaminazione di quella stessa area si definisce "Organismo sentinella".

I biomarcatori o indici di stress, possono essere definiti come alterazioni, indotte da un contaminante, nella struttura o nella funzione a livello di componenti molecolari o cellulari che possono essere evidenziate e quantificate in un organismo sentinella.

Quando un composto tossico è presente in un ecosistema, sia questo marino, terrestre o d'acqua dolce, esso può provocare una serie d'alterazioni o danni a diversi livelli di complessità strutturale che vanno dal danno molecolare a livello cellulare, fino a giungere ad alterazioni al livello d'organismi, popolazioni o comunità (Stebbing, 1985).

L'attenzione è posta sull'identificazione del bersaglio primario dell'azione di un composto inquinante. La tossicità primaria di un contaminante si esercita, in linea generale, a livello molecolare, determinando modificazioni delle attività enzimatiche, alterazioni a livello DNA, regolazione della trascrizione etc. Gli effetti si possono rilevare, con un meccanismo a cascata, ai livelli successivi dell'organizzazione gerarchica: organello; cellula; tessuto; organo ed organismo fino a giungere al livello di popolazione.

Simultaneamente all'impatto negativo dell'inquinante, si sviluppano da parte dell'organismo delle risposte adattative allo stress chimico che mirano a riportare ad uno stato d'omeostasi. In particolare

le risposte omeostatiche a livello primario tendono a diminuire l'effetto tossico del composto inquinante. Tramite l'attivazione di sistemi multienzimatici come le monoossigenasi a funzione mista e gli enzimi coniugati, o le metallotioneine. Questi sistemi enzimatici riescono a detossificare totalmente o in parte l'organismo.

Le diverse risposte che l'organismo realizza nei confronti un determinato elemento di disturbo ambientale rappresentano quindi dei "potenziali biomarker" utilizzabili in programmi di monitoraggio ambientale (Bayne et al., 1985). L'utilizzo di biomarker permette, attraverso lo studio delle risposte immediate, di prevedere il manifestarsi d'effetti negativi a lungo termine, alterazioni patologiche, diminuzione delle capacità riproduttive, e mortalità nell'ambito di una popolazione.

Gli organismi che vivono in un ambiente inquinato, non sono mai sottoposti all'effetto di un solo composto tossico, ma ad una miscela di composti, che interagiscono attivamente tra loro provocando nell'individuo una risposta cumulativa o sinergica.

Appare evidente che in natura non ci troviamo di fronte ad una singola reazione dose-effetto, ma di fronte ad una "famiglia" di reazioni dose-effetto, che corrispondono alle diverse interazioni della miscela di contaminanti con gli stress ambientali (McCarthy et al., 1990).

Quindi l'interpretazione dei biomarker si basa su un nuovo paradigma concettuale che può essere così riassunto: utilizzando i biomarker non otteniamo la valutazione quantitativa dei livelli del composto tossico cui l'organismo è sottoposto, ma la determinazione del "livello di salute" in cui l'organismo si trova, nel suo passaggio dallo stato d'omeostasi alla malattia (McCarthy e Shugart, 1990; McCarthy et al., 1990).

Quando un organismo è sottoposto all'effetto di composti tossici si innescano una serie di meccanismi protettivi a livello biochimico e fisiologico che tendono a riportare il sistema ad uno stato d'omeostasi; se l'esposizione continua o aumenta i processi compensativi diventano inefficienti ed iniziano i processi di riparo. Quando i meccanismi di riparo non sono più sufficienti, siamo nella fase di manifestazioni visibile degli effetti tossici, con fenomeni d'infezioni batteriche, parassitismo, senescenza e morte (Depledge, 1989).

Se si è in grado di definire il grado di risposta del biomarcatore (omeostasi, risposte compensative, risposte di riparo, malattia), si può fare una valutazione del "livello di rischio" cui la popolazione è sottoposta.

Il biomonitoraggio mediante l'utilizzo dei biomarker fornisce informazioni aggiuntive a quelle ricavate dal monitoraggio chimico o tossicologico. Le analisi di chimica ambientale in molti casi non forniscono una panoramica esaustiva sulla qualità ambientale, poiché danno informazioni precise ed accurate dal punto di vista quantitativo e qualitativo sulla distribuzione degli inquinanti nei vari

comparti, ma non prevedono l'effetto che la sommatoria di questi contaminanti può esercitare sull'organismo (McCarthy et al., 1990).

L'utilizzo di biomarker in organismi sentinella (McCarthy e Shugart, 1990; McCarthy et al., 1990) fornisce:

- una risposta integrata dell'esposizione complessiva della specie sentinella ai composti tossici, considerando sia la sommatoria delle diverse vie d'assunzione che l'esposizione nel tempo entro un determinato intervallo spaziale;
- una risposta immediata all'esposizione alle sostanze tossiche; questo permette di prevedere l'effetto negativo a lungo termine.

I biomarker possono essere classificati sulla base dell'interazione tra il contaminante e l'organismo sentinella (Fossi et al., 1991):

- biomarker d'esposizione: segnalano risposte relative alla prima interazione tra la molecola inquinante ed il recettore biologico. Tramite quest'indice si individua l'avvenuta esposizione al contaminante. Per questo scopo possono essere utilizzati indici di stress quali le attività enzimatiche delle monoossigenasi a funzione miste (MFO), oppure le metallotioneine come segnalatori d'esposizione ai composti organo-clorurati e ai metalli pesanti, l'inibizione dell'acetilcolinesterasi a seguito d'esposizione ad insetticidi organo-fosforici e carbammati o la quantificazione degli addotti del DNA derivanti da idrocarburi policiclici aromatici (IPA) (Fossi et al., 1991);
- biomarker d'effetto: segnalano come un organismo, una popolazione o una comunità siano soggette ad effetti tossicologici da parte di uno o più inquinanti.

I biomarker possono essere divisi anche in funzione della loro "specificità" di risposta nei confronti d'agenti inquinanti (Bayne, 1986; Moore, 1985):

- biomarker specifici: quelle risposte molecolari e biochimiche che si manifestano in un organismo come risposta ad una specifica classe di contaminanti (ad esempio metallotioneine in risposta all'inquinamento da metalli). In questo caso la risposta di difesa è estremamente specifica e indica chiaramente la classe di sostanze responsabile della contaminazione.
- biomarker generali: quelle risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico, che non possono essere ricondotte ad una specifica classe d'inquinanti, ma rappresentano lo stato generale di stress dell'organismo (certi danni al DNA, disordini immunitari, indici somatici, stabilità della membrana lisosomiale etc..).

Esistono tre livelli gerarchici in cui possono essere applicati i biomarker nei programmi di biomonitoraggio (McCarthy e Shugart, 1990):

1. il primo stadio è l'identificazione del pericolo, tale approccio è applicato quando non si conosce la composizione della miscela contaminante. L'individuazione del pericolo è diagnosticata con l'utilizzo dei biomarker generali, la risposta che se ne ricava è la presenza o assenza di un rischio chimico;
2. il secondo stadio è la valutazione del pericolo, che si attua quando conosciamo a priori i potenziali inquinanti. In questa fase l'utilizzo dei biomarker specifici ci consente di identificare le classi dei contaminanti presenti, l'estensione e la gravità dell'area di contaminazione;
3. l'ultimo stadio è la previsione del rischio, dove le risposte dei biomarker possono dare indicazioni sulle potenziali conseguenze negative a lungo termine a livello di popolazione e di comunità.

Una classificazione generale dei biomarker, intesi come alterazione della fisiologia dell'organismo, distingue le seguenti categorie (McCarthy et al., 1990):

- alterazioni del DNA;
- risposte in termini d'induzione/inibizione della sintesi di proteine;
- alterazioni del sistema immunitario;
- alterazioni istopatologiche.

Molti inquinanti ambientali cancerogeni e mutageni, quali gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e le diossine, possono danneggiare il DNA in vario modo, causando la rottura della doppia elica, la frammentazioni dei cromosomi e mutazioni. Ognuna di queste alterazioni può essere quantificata ed utilizzata come biomarker (Shugart, 1990). In questa categoria di biomarker ricadono tutte quelle proteine funzionali che possono essere indotte o inibite dalla presenza di contaminanti (McCarthy e Shugart, 1990).

1.9 Enzimi antiossidanti

La produzione di enzimi antiossidanti è stata proposta come effetto indiretto della tossicità dei metalli in numerose piante acquatiche dove viene riscontrata una risposta dose-tempo dipendente a fronte di una esposizione a differenti metalli pesanti quali cadmio, rame, piombo, cromo e nichel (Lei et al., 2012; Dere, 2007; Srivastava et al., 2006; Bucalossi et al., 2006; Ferrat et al., 2002).

Come detto in precedenza, i principali enzimi antiossidanti presenti nei tessuti vegetali sono: la superossido dismutasi (SOD) che catalizza la dismutazione di O_2^- in H_2O_2 ; la catalasi (CAT), la perossidasi guaiacolo-dipendente (GPOX) e gli enzimi del ciclo ascorbato-glutatione, quali l'ascorbato

perossidasi (APX), che eliminano H_2O_2 prodotto; il glutatione-S-transferasi (GST) coniuga diversi metaboliti al glutatione ridotto per la loro eliminazione dall'organismo.

La **superossido dismutasi** (SOD) è uno degli enzimi più attivi nello *scavenging*, è ubiquitario in tutti i sistemi viventi e in tutti i compartimenti cellulari soggetti a stress ossidativo (Gill e Tuteja, 2010). Catalizza la reazione di dismutazione dello ione superossido (O_2^-) a perossido d'idrogeno (H_2O_2) ed è quindi il primo enzima ad intervenire nella detossificazione della cellula dai ROS. La regolazione dell'attività della SOD è modulata da livelli crescenti di O_2^- e un rapido aumento dell'attività SOD è registrata come risposta iniziale a diversi fattori di stress abiotici, tra cui gli UV-B (Gill e Tuteja, 2010; Han et al., 2009; Selvakumar, 2008). Il ruolo della SOD è quello di fornire una protezione immediata dagli effetti dello stress ossidativo nel sito di produzione dei ROS, prima che altri meccanismi di difesa antiossidante vengano attivati. Il rapido aumento dell'attività della SOD in risposta allo stress ossidativo è quindi spesso un fenomeno transitorio. Si registra un'elevata attività nei cloroplasti solo nelle prime fasi di trattamento con agenti di stress, ma poi i livelli ritornano ad essere normali, anche se la pianta continua ad essere sottoposta a stress (Dawar et al., 1998).

La SOD è un metallo-enzima contenente uno ione metallico di transizione redox-attivo, sono state identificate tre isoforme di SOD classificate in base al loro cofattore metallico: rame e zinco nelle Cu/Zn-SOD; manganese nelle Mn-SOD e ferro nelle Fe-SOD.

La distribuzione delle tre isoforme a livello cellulare è stata ampiamente studiata: Cu, Zn- SOD si trovano nel citosol e nei cloroplasti di organismi eucarioti; le Mn-SOD sono presenti in molti batteri, nei perossisomi e nella matrice mitocondriale di alcuni eucarioti e dei mammiferi; le Fe-SOD sono presenti nei procarioti anche se recentemente ne è riscontrata la presenza anche nei cloroplasti di alcune specie vegetali (del Rio, 2003).

Tutte le isoforme sono codificate nel nucleo e, quando necessario, sono trasportate agli organelli per mezzo di sequenze segnale NH_2 -terminali (Bowler et al., 1992).

La **catalasi** (CAT) è una emoproteina appartenente alla classe delle ossidoreduttasi coinvolta anch'essa nei meccanismi di detossificazione. Gli enzimi della classe delle catalasi si trovano in quasi tutte le cellule vegetali esposte a stress ossidativo (Gill e Tuteja, 2010).

Le CAT sono enzimi particolarmente abbondanti nei gliossisomi, dove eliminano H_2O_2 generato dalle ossidasi coinvolte nella β -ossidazione degli acidi grassi, e nei perossisomi delle foglie verdi, dove distruggono H_2O_2 prodotto dall'ossidazione del glicolato durante la fotorespirazione (Havir e McHale, 1987). Nonostante la localizzazione dell'enzima sia specifica, la catalasi sembra avere un ruolo centrale nella difesa contro gli stress ossidativi poiché l' H_2O_2 diffonde agevolmente attraverso le membrane (Noctor e Foyer, 1998 ; Willekens et al., 1997).

L'attività della catalasi varia in risposta ai diversi stress abiotici e spesso viene ridotta dopo irradiazione prolungata con raggi UV-B (Selvakumar, 2008; Zancan et al., 2008). È stato però verificato che nel frumento l'applicazione di radiazione UV-B induce un aumento dell'attività di questo enzima, specialmente a temperature elevate e in combinazione con altri fattori di stress (Ambasht e Agrawal, 2003; Yang et al., 2007).

La catalasi degrada sei milioni di molecole di acqua ossigenata in un minuto, tra tutti gli *scavenging* è quella che presenta l'attività più elevata. L'enzima può essere inibito però dalla presenza di ioni rame che vanno a legarsi stabilmente al sito attivo.

Come per la SOD anche la catalasi presenta diverse isoforme (CAT1, CAT2, CAT3), non sempre però presenti in tutte le specie e con una differente localizzazione cellulare. CAT1 e CAT2 sono presenti nei perossisomi e nel citosol, mentre CAT3 è localizzata nei mitocondri.

Le **perossidasi** (POX) sono emoproteine. In realtà il termine perossidasi indica una famiglia di enzimi molto vasta, che comprende NADPH/NADH-perossidasi (NADPH/NADH-POX), citocromo c perossidasi (CPOX), glutatione-perossidasi (GSHPOX), ascorbato perossidasi (APX) e guaiacolo perossidasi (GPOX).

L'**ascorbato perossidasi** (APX) è un enzima antiossidante trovato negli organelli, nel citoplasma e anche nell'apoplasto delle cellule vegetali (Noctor e Foyer, 1998) il cui ruolo è quello di detossificare per riduzione il perossido d'idrogeno catalizzando il trasferimento di protoni da una molecola di acido ascorbico definita donatore. L'APX può utilizzare anche il guaiacolo, pirogallolo o altri substrati, anche se con bassa affinità (Mehlhorn et al., 1996). Gli isozimi della APX sono generalmente presenti nei cloroplasti, ma ne esistono anche isoforme nei microsomi e nei perossisomi, come anche isoenzimi nel citosol e nell'apoplasto (Asada, 1992; Ohya et al., 1997; Noctor e Foyer, 1998). Wang et al. (1999), inoltre, hanno studiato le proprietà antiossidanti di una forma di APX legata alle membrane dei perossisomi. APX è un enzima molto labile, se confrontato con GPOX, ed è inattivato ad alte concentrazioni di H₂O₂. L'APX è un enzima chiave nella detossificazione di H₂O₂ nel cloroplasto, poiché in questo organulo non è presente CAT.

L'attività dell'ascorbato perossidasi viene aumentata durante l'esposizione ai raggi UV-B, che determina un incremento del contenuto di H₂O₂ nel tessuto vegetale, inducendo trascrizione dei geni che codificano per l'APX (Garg e Manchanda, 2009; Pekker et al., 2002). L'up-regolazione dell'attività dell'APX ad opera dei raggi UV-B è stata dimostrata anche in piante in cui l'attività della ascorbato perossidasi risulta limitata a causa di carenza di nutrienti (Zancan et al., 2008). Mentre alcuni studi suggeriscono che l'attività della APX può risultare limitata in condizioni di stress ossida-

tivo estremo (Jain et al., 2003), sembra probabile che la modulazione dell'attività dell'ascorbato perossidasi sia un effetto fondamentale nella risposta delle piante all'esposizione ai raggi UV-B.

Un aumento di APX in relazione ad una maggiore ossidazione lipidica, dovuta ad un aumento di metalli pesanti nell'organismo è stata documentata in alcune alghe (Adonaylo e Oteiza, 1999), come il dinoflagellato *L. polyedrum*, (Okamoto e Colepicolo, 1998; Okamoto et al., 2001) e nell'alga unicellulare *Selenastrum capricornutum* (Sauser et al., 1997).

La **guaicolo perossidasi** (GPOX) è presente nei vacuoli, nella parete cellulare e nel citoplasma dove interviene nella degradazione di perossido di idrogeno in acqua e ossigeno (Mittler, 2002).

Inoltre questo enzima ha un ruolo importante nella decomposizione dell'acido 3-indolo acetico (IAA) e svolge un ruolo molto importante nella biosintesi della lignina. In generale interviene contro gli stress biotici detossificando l'organismo dal perossido d'idrogeno (Gill e Tuteja, 2010). GPOX usa come donatore di elettroni molecole aromatiche quali il guaicololo e più raramente ossida l'ascorbato, è stato stimato che in media utilizza una molecola di ascorbato ogni 100 di guaicololo.

Studi effettuati su *Triticum aestivum* (Khan et al., 2007) e *Arabidopsis thaliana* (Cho e Seo, 2005) hanno dimostrato come in condizioni di stress ci sia un incremento dell'attività di GPOX. Le perossidasi sono state associate ad un gran numero di processi fisiologici: abscissione di foglie e fiori, invecchiamento e senescenza, dominanza apicale, tolleranza al freddo, dormienza, sviluppo e maturazione del frutto, germinazione e risposte ipersensibili di resistenza nei confronti di parassiti (Melhorn et al., 1996). La GPOX inoltre, insieme ad altri enzimi, quali le laccasi, sono coinvolte nella polimerizzazione ossidativa dei precursori della lignina (monolignoli) e quindi nella sintesi di quest'ultima (McEldoon et al., 1995).

Le **glutazione S-transferasi** (GST) sono una famiglia di isoenzimi detossificanti che catalizzano l'attacco nucleofilo in prossimità dei centri elettrofili di molecole idrofobiche attraverso l'anione tiolato del glutatione, il GSH o tripeptide γ -glutamilmisteinglicina (Fitzpatrick et al., 1995). L'aumento della produzione di GSH contribuisce alla protezione antiossidante delle cellule vegetali contro lo stress ossidativo causato da vari fattori ambientali. Le glutazione S-transferasi catalizzano le reazioni di coniugazione tra GSH e un certo numero di xenobiotici, giocano un ruolo cruciale nella degradazione di sostanze tossiche e quindi un regolatore non enzimatico ubiquitario, importante per l'omeostasi redox intracellulare.

La GST in alcune specie vegetali è coinvolta nella detossificazione di certe classi di erbicidi come i cloroacetani, i tiocarbammati, e le S-triazine. Le GST vegetali possono essere indotte da stimoli biotici, quali patogeni, e stimoli abiotici, quali erbicidi e metalli pesanti (Ferrari et al., 2002). E' an-

che coinvolta nell'omeostasi di ormoni, nel sequestro vacuolare delle antocianine, nel metabolismo della tirosina e nella regolazione dell'apoptosi (Gill e Tuteja, 2010).

La GST è una molecola dimerica, costituita da subunità di 25/30 KDa che è presente nei mammiferi, insetti, piante e microbi. Le differenti isoforme di questo enzima sono codificate da geni polimorfici comprendenti 6 classi: α , μ , π , β , ζ , θ e le caratteristiche che presentano nelle piante sono differenti rispetto a quelle presenti nel regno animale (Mannervik e Danielson, 1988; Gronwald e Plaisance, 1998).

Un meccanismo di detossificazione sviluppato da piante, alghe e funghi per evitare l'avvelenamento da metalli pesanti comporta il sequestro intracellulare di ioni di metalli pesanti mediante GSH e fitochelatine (PC), peptidi sintetizzati a scapito di quest'ultimo (De Vos et al., 1992). Le PC sono polimeri di unità -Glu-Cys con un residuo di glicina in posizione terminale e sintetizzate in risposta a molti metalli pesanti tra cui il rame (De Vos et al., 1992; Rijstenbil et al., 1998; Morelli e Scarano, 2004). Poiché il rame è uno ione essenziale per il metabolismo delle piante si ritiene che le PC possano giocare un ruolo nella omeostasi degli ioni entro limiti fisiologicamente accettabili (Steffens, 1990).

1.10 Metallotioneine e Metiltrasferasi

Le metallotioneine (MT) sono una grande famiglia di proteine ubiquitarie di piccole dimensioni (6-7 kDa) ricche di residui di cisteina presenti sia nel regno animale che vegetale e mostrano una grande capacità di legare metalli (Hamer, 1986; Kagi, 1991; Robinson et al., 1993).

Le metallotioneine permettono di complessare molti metalli e principalmente zinco, rame e cadmio. La loro espressione è indotta dai metalli per attivazione della trascrizione genica.

Queste proteine hanno in genere due domini di legame per i metalli che conferiscono alla proteina una tipica conformazione a manubrio (Cobbett et al., 2002). Sono in grado di legarsi sia a cationi monovalenti che bivalenti grazie alla presenza di numerosi gruppi sulfidrilici in ogni dominio. In particolare, a quello α della proteina si legano quattro molecole di cationi bivalenti, per esempio di zinco (II), mentre al dominio β se ne legano tre. Per quanto riguarda i cationi monovalenti, come il rame (I), si legano sei ioni per dominio proteico (Minami et al., 2002).

Esistono due classi di MTs distinte sulla base della sequenza amminoacidica. La classe I contiene 20 residui altamente conservati di cisteina ed è molto diffusa tra i mammiferi e i vertebrati (Klaassen et al., 1999). La classe II è presente nelle piante, nei funghi e anche negli invertebrati. Le proteine MT di classe II presenti nelle piante sono ulteriormente classificate in quattro tipi in base alla

loro sequenza amminoacidica (1-,2-,3-,4MT) (Cobbett e Goldsbrough, 2002). In *Arabidopsis*, ad esempio, sono stati identificati sette geni codificanti per MT attivamente espressi, che comprendono i rappresentanti di questi quattro tipi (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Sulla base di analisi dei livelli di espressione delle MT in un certo numero di specie di piante, si è visto che i geni 1MT sono più espressi nelle radici che nelle foglie, mentre geni 2MT sono espressi prevalentemente nelle foglie (Zhou e Goldsbrough, 1994, 1995; Hsieh et al, 1995, 1996; Foley et al.,1997; Garcia-Hernandez et al., 1998; Guo et al., 2003; Mir et al., 2004); i geni 3MT sono espressi in foglie o frutti carnosi in maturazione (Ledger e Gardner, 1994; Abdullah et al., 2002; Guo et al., 2003), mentre l'espressione del tipo 4MT sembra essere limitata a semi in via di sviluppo (Kawashima et al, 1992; Nam et al., 1999; Chyan et al., 2005).

In considerazione della loro capacità di legare metalli, è stato suggerito che le MT possano giocare un ruolo nell'omeostasi di ioni metallici essenziali e nella detossificazione di metalli pesanti.

Nelle piante, tuttavia, i geni MT possono essere coinvolti in una vasta gamma di processi biologici legati al normale sviluppo della pianta o a risposte dovute a stimoli biotici e abiotici (Cobbett e Goldsbrough, 2002; Guo et al., 2003; Lee et al., 2004; Zimeri et al., 2005; Zhou et al., 2005).

La fanerogama marina *Posidonia oceanica* rappresenta un importante substrato alimentare per molti organismi marini (Novak,1982; Pirc, 1985) e, come altre fanerogame marine, cioè *Zostera* e *Cymodocea*, svolge un ruolo importante nel mantenimento degli ambienti marini. Anche se un gran numero di studi hanno evidenziato la capacità di *P. oceanica* di sequestrare metalli dall'ambiente (Mallea e Haritonidis, 1989; Calmet et al., 1991; Pergent e Pergent-Martini, 1999; Tranchina et al., 2005), questa specie è stata principalmente proposta come un bioindicatore per siti ricchi di mercurio (Maserti et al, 1988; Pergent-Martini, 1998; Ferrat et al., 2003), sebbene i meccanismi di legame del metallo siano in gran parte ancora sconosciuti (Cozza et al.,2006).

La metilazione del DNA, insieme ad altri segnali epigenetici, regola l'attività trascrizionale dei geni in risposta sia a fattori endogeni che a stimoli esterni e quindi gioca un ruolo significativo nello sviluppo delle piante (Finnegan et al., 1993; Dennis et al., 1998; Bitonti et al., 2002; Fojtova et al 2003). Pertanto, in molte specie, condizioni di stress associate a variazioni di metilazione nel genoma sono note influenzare la crescita e lo sviluppo in modo significativo.

In particolare, la metilazione del DNA (ad esempio ipermetilazione e ipometilazione), può verificarsi in relazione a bassa temperatura, stress osmotico e siccità, ma anche per l'esposizione a metalli pesanti (Finnegan et al., 1998; Labra et al., 2002; Aina et al., 2004; Dyachenko et al., 2006; Hashida et al., 2006; Boyko et al., 2007; Choi e Sano, 2007).

Nel lavoro di Greco et al., (2012) su *Posidonia oceanica* è stata osservata un'ipermetilazione del DNA Cd-indotta e una sovraespressione delle CMT associate a un pattern nucleare specifico di metilazione del DNA e a cambiamenti nella struttura della cromatina.

A livello genetico, sia negli animali che nelle piante, alcuni metalli, come ad esempio il Cd possono indurre aberrazioni cromosomiche, anomalie nella struttura della cromatina e cambiamenti apoptotici nucleari (Zhang e Xiao, 1998; Foitova e Kovarik, 2000; Pulido e Parrish, 2003; Banfalvi et al., 2007; Deckert, 2005). Inoltre, nei mammiferi il Cd è ampiamente riconosciuto come cancerogeno (Agenzia Internazionale di Ricerca sul Cancro, 1993; National Toxicology Program, 2000). Sembrerebbe che entro certi limiti, su alcuni organismi, il Cd potrebbe non avere un effetto genotossico (Goering et al., 1994; Waalkes e Misra, 1996; Waisberg et al., 2003) ed anzi essere alla base di alcuni meccanismi epigenetici che coinvolgono la metilazione del DNA (Benbrahim-Tallaa et al., 2007; Jiang et al., 2008).

Nelle piante sono presenti tre diverse famiglie di DNA metiltransferasi con substrato specifico e diverse modalità di metilazione del DNA:

- la DNA metiltransferasi 1 (MET1, note anche come DMT1), i cui membri fungono da metiltransferasi di manutenzione, introducendo gruppi metilici in sequenze CG (Finnegan e Kovac, 2000);
- la metiltransferasi riarrangianti domini (DRM), un omologo della famiglia DNMT3 presente nei mammiferi, che mantengono asimmetrica la metilazione CHH attraverso la metilazione *de novo* (Cao e Jacobsen, 2002a, b; Wada et al, 2003);
- Le cromometilasi (CMT), una specifica famiglia di DNA metiltransferasi presente nelle piante, coinvolte in primo luogo nel mantenimento della metilazione simmetrica CHG (Lindroth et al., 2001; Papa et al., 2001). Inoltre, CMT svolge anche un ruolo nella metilazione *de novo* (Cao et al., 2003; Chan et al., 2005). CMT è caratterizzata da un dominio cromatico (*chromodomain*) incorporato all'interno dei motivi catalitici I e IV della proteina (Henikoff e Comai, 1998). La presenza di questa metiltransferasi caratteristica dei vegetali fornisce una spiegazione per gli elevati livelli di metilazione CHG nei genomi delle piante rispetto agli animali.

1.11 Geni responsivi alla luce

Molti autori attribuiscono la regressione delle praterie lungo le aree costiere ad un aumento della torbidità delle acque spesso legata ad un'elevata eutrofizzazione, conseguenza di un massivo sfruttamento dell'area costiera (Orth et al., 2006; Krause-Jensen et al., 2008).

L'assorbimento della luce da parte delle fanerogame marine ha bisogno di una lunghezza d'onda altamente selettiva, con picchi di assorbimento nel blu (circa 450 nm) e rosso (670 nm), regioni dello spettro visibile, e un assorbimento minimo nel verde tra 500 e 600 nm (Drake et al., 2003; Zimmerman, 2003). Fino ad oggi, attraverso l'utilizzo di sensori subacquei si è visto che le fanerogame utilizzano una radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) compresa tra 400-600nm (Batiuk et al., 2000; Kenworthy e Fonseca, 1996), però non si è ancora in grado di dire a quanto corrisponda la radiazione fotosinteticamente utilizzabile (PUR) (Morel, 1978).

Nelle piante, il fitolo (PHY) rappresenta la catena laterale di clorofilla (Chl), tocoferoli (TP), e fillochinoni (PQ) ed è necessario per la loro integrazione nella membrana plastidiale (Soll et al., 1980, 1983; Soll, 1987; Bollivar et al., 1994).

Quindi sia nella Chl che nel TP, la catena di phy è fornita dal geranilgeranil pirofosfato (GGPP), un isoprenoide plastidiale, formato da quattro molecole di isopentenil pirofosfato (IPP), che hanno origine citosolica e cloroplastica (Rohmer et al., 1993; Lichtenthaler et al., 1997). Più precisamente, nella sintesi Chl, GGPP può o essere ridotto a Fitol pirofosfato (PhyPP) e esterificato con il clorofillide fitil-clorofilla (ChlPHY), o prenilato a clorofillide e poi idrogenato a formare geranilgeranilclorofilla (ChlGG). Nel percorso TP, GGPP viene incanalato tramite condensazione di PhyPP a omogentisato che è un precursore dell'anello aromatico di tocoferoli (Schoch et al., 1977; Benz et al., 1980; Soll et al., 1980). L'idrogenazione del GGPP in PhyPP è catalizzata dalla geranilgeranil reductasi NADPH-dipendente. Questo enzima, comunemente denominato CHL P, è altamente conservato in organismi fotosinteticamente attivi come: batteri, alghe e piante (Bollivar et al., 1994; Keller et al., 1998). Questo gene interviene sia nella crescita vegetativa che nei meccanismi di difesa dallo stress, soprattutto per proteggere le membrane plastidiali contro lo stress ossidativo attraverso l'azione TP (Kamal-Eldin e Appelqvist 1996). Il gene CHL P è un marker candidato per studiare le risposte di *P. oceanica* allo stress luminoso. Ad oggi, CHL P è stato studiato in alghe rosse (Bollivar et al., 1994), cianobatteri (Addlesee et al., 1996) e in alcune dicotiledoni terrestri, in cui è stato sottolineato il suo ruolo nella risposta allo stress (Keller et al., 1998, Giannino et al., 2004, Bruno et al., 2009a).

La radiazione UV-B colpisce l'apparato fotosintetico della pianta, in particolare il fotosistema II (Bornman, 1989) e l'enzima chiave del ciclo di Calvin, la Ribulosio 1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO).

La **RuBisCO** (Rub) è un enzima localizzato sulla superficie stromale delle membrane tilacoidali dei cloroplasti che, durante la fotosintesi, catalizza la prima reazione del ciclo di Calvin, ossia il trasferimento di una molecola di anidride carbonica sul ribulosio-1,5-bisfosfato.

In piante, alghe, cianobatteri, e proteobatteri fototrofi e chemioautotrofi, l'enzima solitamente è costituito da otto subunità grandi (L, circa 55.000 Da) e otto piccole (S, circa 13.000 Da). Ciascuna catena L contiene un sito catalitico ed uno di regolazione. Le catene S potenziano l'attività catalitica delle catene L. La RuBisCO costituisce il 16 % delle proteine nei cloroplasti. Ogni molecola di RuBisCO possiede 8 siti attivi, dato che ogni subunità maggiore ne ha uno.

La RuBisCO richiede per la sua attività uno ione metallico bivalente legato, di solito uno ione Magnesio. Questo ione metallico serve ad attivare una molecola substrato legata, stabilizzando una carica negativa. Durante la fotosintesi, la RuBisCO è attivata da un meccanismo che coinvolge il pH, la CO₂ e il Mg⁺⁺. Nelle reazioni che avvengono alla luce, quando il pH dello stroma diventa più alcalino (pH 7,5-8,0), il gruppo ε amminico di un residuo di lisina della RuBisCO è carbossilato. La molecola di CO₂, però, non è impiegata nella catalisi, ma è necessaria per il legame dello ione Mg⁺⁺ indispensabile per attivare l'enzima. Nelle fasi al buio della fotosintesi, è sintetizzato un inibitore competitivo della RuBisCO, cosicché di notte la carbossilazione del ribulosio-1,5-bisfosfato è bloccata. La RuBisCO è un enzima bifunzionale dato che, negli stessi siti attivi per la carbossilazione, catalizza anche l'ossigenazione del ribulosio-1,5-bisfosfato con produzione di acido fosfoglicerico e acido fosfoglicolico. La RuBisCO è classificata come una monoossigenasi, perché introduce un atomo di ossigeno sia nell'acido fosfoglicolico che nell'acqua.

Il PSII è costituito da un eterodimero delle proteine D1 e D2 contenenti 4 molecole di clorofilla a. Queste proteine costituiscono i siti di ossidazione e riduzione delle molecole trasportatrici di elettroni durante la fase luce dipendente della fotosintesi. Il turnover della proteina D1 risulta essere più rapido in piante che hanno subito il trattamento con raggi UV-B (Greenberg et al., 1989). Per quanto riguarda l'enzima RuBisCO, la sua attività risulta diminuita in piante trattate con elevate quantità di radiazione UV-B, a causa dell'azione della radiazione sulle subunità che compongono l'enzima (Strid et al., 1994; Dattolo et al., 2014). Altri effetti fisiologici deleteri causati nelle piante dall'esposizione a radiazioni UV-B sono l'aumento dell'attività respiratoria, la diminuzione dell'attività assorbente delle radici e una chiusura stomatica alterata (Teramura et al., 1991; Quate et al., 1992) correlati comunque alla diminuzione della capacità fotosintetica globale.

2. Scopo della tesi

La *Posidonia oceanica* riveste un'enorme importanza nell'ecosistema marino: svolge un ruolo fondamentale nell'ossigenazione delle acque, funge da sito di rifugio per larve e giovani pesci e fornisce un substrato su cui si attacca una numerosissima flora e fauna bentonica, innescando una complessa rete alimentare.

Oltre ad essere estremamente importanti da un punto di vista ecologico, le praterie sono dei sistemi estremamente vulnerabili, anche in relazione alla loro bassa variabilità genetica. Ampie regressioni delle praterie si registrano soprattutto nel settore nord-occidentale del Mediterraneo. I fattori principali di regressione sono da collegare principalmente con le attività antropiche legate alla fruizione, gestione ed utilizzazione della fascia costiera e delle sue risorse.

In particolare, la distruzione delle praterie è direttamente e/o indirettamente connessa allo sversamento di reflui urbani ed industriali non trattati lungo la fascia costiera, alla realizzazione di opere marittime (porti, dighe, cementificazione dei litorali, opere di sbancamento, ecc.) e all'azione meccanica esercitata dalla pesca a strascico illegale e dagli ancoraggi (Marbà et al., 1996; Short e Wyllie-Echeverria, 1996). Tali danni sono ancora più gravi se si considerano le caratteristiche biologiche della pianta (lenti ritmi di accrescimento) e la dinamica delle praterie (lentissimo recupero da disturbi esterni). Il deperimento e la scomparsa di queste praterie sommerse produrrebbe effetti destabilizzanti sull'equilibrio della fascia costiera, con risvolti ecologici ed economici non indifferenti che si manifesterebbero sotto differenti aspetti: impoverimento delle biocenosi e conseguente abbattimento della biodiversità con significative ripercussioni ai livelli superiori delle reti alimentari (distruzione delle nursery, danni consistenti alla pesca artigianale costiera, ecc.); alterazione dell'equilibrio costiero e del regime sedimentario associati a fenomeni di erosione dei litorali sabbiosi e a ricadute negative su importanti attività economiche come il turismo.

La volontà di sviluppare metodi di biomonitoraggio più efficaci e rapidi rispetto ai tradizionali test utilizzati fino ad ora e la recente evoluzione delle tecniche di biologia molecolare applicate all'ecologia, ha portato lo studio verso la ricerca di nuovi indicatori biologici: i biomarcatori. Per biomarcatore si intende l'insieme dei cambiamenti cellulari, molecolari e biochimici indotti da inquinanti chimici misurabili in tessuti, cellule e fluidi biologici (McCarthy e Shugart, 1990). A differenza della semplice misurazione dell'accumulo di contaminanti nei tessuti, i biomarcatori sono in grado di offrire informazioni più complete e biologicamente più rilevanti sul potenziale impatto di

inquinanti tossici sulla salute degli organismi (van der Oost *et al.*, 1996) e possono dunque essere utilizzati come segnali di allarme precoci per specifici stress (Vangronsveld *et al.*, 1998).

Nel Mediterraneo la prateria di Posidonia è un buon indicatore della qualità globale del mare; essa è distribuita in tutto il litorale, è particolarmente sensibile all'inquinamento e ad altre aggressioni legate all'attività umana, fornisce informazioni sullo stato della qualità dell'acqua. In casi estremi la prateria è completamente sostituita da matte morte (Boudouresque C.F *et al.*, 2006). L'utilizzo di *Posidonia oceanica* come indicatore biologico di inquinamento chimico risale agli anni '80. In effetti questa fanerogama presenta tutte le qualità richieste per una utilizzazione in questo senso; specie bentonica, longeva, largamente diffusa in tutto il bacino del Mediterraneo e con capacità di bioaccumulo di contaminanti persistenti.

In un contesto di evidente criticità ambientale come quello attuale, conoscere la variabilità e la struttura genetica delle popolazioni di *Posidonia oceanica* assume una cruciale importanza in quanto da essa dipende la capacità di adattamento alla continua variazione delle condizioni ambientali e richiede un'alta capacità di adattamento. In aggiunta, l'utilizzo di geni target può aiutare a chiarire in quale modo questa specie possa adattarsi e sopravvivere al variare delle condizioni ambientali (luce, stress ossidativo, pH, salinità etc...).

E' noto che le praterie di Posidonia sono particolarmente sensibili agli stress ambientali, come la disponibilità di luce o l'inquinamento da metalli pesanti e quindi lo stato di salute delle praterie è in stretta correlazione con il grado di salubrità delle acque.

Scopo di questo lavoro è di valutare lo stato di salute delle praterie di *Posidonia oceanica* nel tratto costiero antistante le coste laziali attraverso:

- analisi della variabilità genetica, utilizzando sette marcatori microsatelliti altamente polimorfici (Alberto *et al.*; 2005);
- Analisi di biomarcatori correlati a specifici stress ambientali:
 - enzimi antiossidanti correlati allo stress ossidativo: *Catalasi (CAT)*, *Glutathione-S-transferasi (GST)*, *Perossidasi (POX)* e *Superossidodismutasi(SOD)* (Ranvier *et al.*, 2000; Ferrat *et al.*, 2002; Hamoutène *et al.*, 2002; Bucalossi *et al.*, 2006);

- geni responsivi all'accumulo di metalli pesanti: *Metallothioneina 2b (MT-2b)*; *Cromometilasi (CMT)*;
- geni responsivi alla disponibilità di luce : Geranilgeranil reduttasi (CHL P), Citocromo c Ossidasi (CcOx), Peptidasi Putativa (PeP), Ribuloso 1,6-Bisfosfato Carbossilasi/Ossigenasi (RuBisCO). (Bruno et al., 2010; Serra et al. 2012).

3. Materiali e Metodi

3.1 Area di studio e campionamento

L'area di studio comprende quattro praterie antistanti il tratto costiero tirrenico settentrionale di Lazio e Toscana.

I fasci fogliari di *Posidonia oceanica* utilizzati per l'analisi della variabilità genetica, sono stati campionati nel periodo di Maggio ed Agosto 2012 all'interno della campagna di monitoraggio Life+ Poseidone. Sono stati campionati in totale 140 fasci fogliari, di cui 40 nel SIC "Fondali antistanti Punta Murelle" IT6000002 (1.111,99 ha), 40 nel SIC "Fondali tra il Chiarone e il Fiora" IT6000001 (1.761,9 ha), 20 nel SIC "Isola di Giannutri" IT51A0024, 40 nel SIC "Secche di Tor Paterno" IT 6000010 (26,79 ha). In quest'ultimo sito sono stati prelevati 20 fasci a -26 m e 20 fasci a -18 m. I campioni sono stati prelevati mediante immersione subacquea ad una distanza minima di 10m, tale da ampliare l'area di campionamento e ridurre il più possibile la possibilità di campionare cloni dello stesso individuo.

In laboratorio i campioni sono stati puliti dalle epifite con lama di rasoio e mantenuti a -80 °C.

Il prelievo dei campioni di *Posidonia oceanica* utilizzati per saggiare il livello di stress rispetto al pool di geni scelti e la quantità di metalli pesanti (Cu, Pb, Cr, Ni), è stato subordinato alle condizioni meteorologiche, poiché per avere risultati significativi si rendeva indispensabile realizzare i prelievi dei differenti siti in un lasso di tempo estremamente ravvicinato, affinché le caratteristiche delle acque potessero considerarsi paragonabili. Tutti i campionamenti sono stati effettuati fra il 21 Maggio e l'11 Giugno 2014 con l'aiuto di subacquei specializzati e qualificati, al fine di poter campionare le piante senza danneggiarle, secondo un protocollo pianificato.

La profondità a cui sono stati effettuati i campionamenti è compresa tra i 14 ed i 18 metri per i siti di : Chiarone (42° 21'42.03" N, 11°29'83.7" E); Murelle (42° 17'86.3" N, 11°36'16.6" E); Giannutri 42° 15' 8.045" N, 11° 7' 0.215" E) e Tor Paterno (41°36'210" N, 12°20'501" E).

Nello specifico, ad ogni sito sono stati prelevati campioni di *Posidonia* da 4 diverse regioni della prateria (replicati biologici) e per ciascuna regione sono stati prelevati 5 esemplari provenienti dallo stesso rizoma, trattati come un unico campione. Immediatamente dopo il prelievo, le piante di *Posidonia* sono state lavate in acqua distillata e pulite con una lametta sterile per la rimozione degli epifiti; i rizomi sono stati separati dalle foglie ed i campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e poi conservati a -80 °C fino all'utilizzo.

3.2 Analisi della struttura genetica di *Posidonia oceanica*

3.2.1 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il metodo del CTAB (bromuro di esadeciltrimetilammonio) di Doyle e Doyle (1987), effettuando solo delle piccole modifiche.

Il tessuto fogliare (100 mg) è stato polverizzato in un mortaio con l'utilizzo di azoto liquido. Il materiale è stato quindi trasferito in tubi da centrifuga da 1.5 ml contenenti 500 µl di tampone di estrazione (2% CTAB, 2% β-Mercaptoetanol, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH8, 2% PVP-40) e 5µl di proteinasi k (20 mg/µl).

Dopo un'incubazione a 60 °C per 30' all'omogenato è stato aggiunto un egual volume di phenol:chloroform:isoamyl-alcohol (25:24:1), mescolando delicatamente per alcuni minuti. Successivamente il materiale è stato centrifugato (10' a 10000 rpm), il surnatante trasferito in un nuovo tubo è stato lavato con un egual volume di chloroform:isoamyl-alcohol (24:1), questo passaggio viene ripetuto per due volte (centrifugando ogni volta 15' a 10000 rpm).

La fase acquosa è stata addizionata con due volumi di Et-OH e 20 µl di NaCl 5M e incubata successivamente per 2h a -20 °C, per favorire la precipitazione del DNA.

La soluzione è stata centrifugata (30' a 12000 rpm) e la fase acquosa eliminata. A questo punto il *pellet* contenente il DNA è stato lavato con Et-OH 70% per favorire l'eliminazione dei sali.

Il DNA è in fine risospeso in 50µl di acqua distillata sterile e conservato a -20 °C.

3.2.2 Loci microsatelliti e genotipizzazione

L'analisi mediante microsatelliti è costituita da due step: l'amplificazione dei loci mediante PCR, attraverso l'utilizzo di primers fiancheggiati le sequenze ripetute e la visualizzazione dei prodotti dopo corsa elettroferetica. Poiché il polimorfismo dei microsatelliti risiede proprio nella lunghezza, essi possono essere separati con un'elettroforesi ad alta risoluzione, che permette una rapida caratterizzazione del genotipo degli individui. In questo lavoro sono stati utilizzati 7 loci microsatelliti con ripetizioni dinucleotidiche (Alberto et al. 2003) Tabella 3.2.2a.

Loci microsatelliti (Alberto et al., 2005)

Locus	Microsatellite motif	Sequenza dei primer (5'-3')	No. accesso GenBank	Range alleli (bp)
Po-5	(GA) ₂₀	CACAATGGCCCGGTAGCA GTGGTTGCGTGCCTTCGGTTG	AF547650	164-188
Po5-10	(GA) ₁₃	ATGAGACTCCCACAATAACA CATGGGAAGGTATAGAAGC	AF547651	151-179
Po5-39	(GA) ₁₃	CATTGGCTGAGTCCCTTTC GTCCAAGGCTTCCGTGATGG	AF547652	170-182
Po5-40	(GA) ₂₄	AAAACCAACCCACGATAAG AATCCAAAGGAACGACACTCA	AF547653	186-258
Po5-49	(GA) ₁₆	GGCTCGATGGTGCATTTCAGC GCCATTCTCCGCTCTGCTCC	AF547654	218-241
Po15	(GA) ₂₀	AAGCACGCCGCTTAAACCATA CATGTTAGTAGGCAATATACTAGGC	AY152814	137-171
Po4-3	(GA) ₁₀	ACAGAACTACGAACCATCAG TAAGGAGAAGGAGAAGGAAA	AF547656	158-178

Tabella 3.2.2a: Primer loci microsatelliti (Alberto et al., 2005)

La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando primers marcati all'estremità 5' con il fluoroforo 5'6-FAM, al fine di permettere l'identificazione del corrispondente prodotto di amplificazione al sequenziatore automatico *ABI PRISM 3700*.

La PCR è stata condotta in un volume finale di 25 μ l, contenente 2 μ l di DNA stampo diluito 1:10, corrispondenti a 20 ng/ μ l di DNA e 18 μ l di miscela di reazione costituita da: 1X buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0,2 μ M di primer (Primm), 1.5 unità di Taq Polimerasi (Go Taq Flexi DNA Polymerase - Promega).

La reazione di amplificazione selettiva avviene utilizzando un programma di PCR *touch down*, partendo da una temperatura di appaiamento di 5 °C superiore alla temperatura di denaturazione dei primer. Nei passaggi successivi questa temperatura viene progressivamente ridotta fino a portare la temperatura di *annealing* a quella specifica per il completamento della reazione. Questo favorisce l'amplificazione di sequenze perfettamente complementari agli inneschi utilizzati rispetto a frammenti non specifici.

La reazione di amplificazione consiste nel seguente programma PCR:

- 94 °C per 3 min
 - 94 °C per 30''
 - 64 °C per 30'' (riduzione di 0,5 °C ad ogni ciclo)
 - 72 °C per 30''
- } 24 cicli
-
- 94 °C per 30''
 - 52 °C per 30''
 - 72 °C per 30'
- } 10 cicli
- 72 ° per 10 min

Ogni coppia di primer presenta nell'estremità 5' (5 end labelling techniques) dell'oligonucleotide forward, un fluorocromo necessario per la successiva elettroforesi capillare. Questa molecola, se eccitata dalla luce laser del sequenziatore, emette una fluorescenza e permette l'identificazione dei frammenti amplificati.

Le piastre con i campioni di ciascuna miscela sono state preparate nel seguente modo: 1 μ l di un campione diluito con acqua, in ragione del rapporto 1:40, addizionato di 8,5 μ l di Highly Deionised Formamide (Formamide Hi-Di) e 0,5 μ l dello standard di peso molecolare Gene Scan 600-LIZ.

I campioni prima sono stati denaturati a 95°C per 5 minuti, passati in bagno di ghiaccio e quindi caricati sequenziatore automatico *ABI PRISM 3700* per essere sottoposti ad elettroforesi capillare automatica.

3.2.3 Analisi dei frammenti

L'analisi dei risultati è stata effettuata tramite il software GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems) per individuare gli alleli appartenenti ai diversi loci microsatelliti.

Il risultato ideale dell'elettroforesi dovrebbe produrre un picco chiaro e netto che si dirige verso il polo positivo dell'apparato. In realtà, poiché le molecole di DNA si trovano in una matrice tradizionale, sono sottoposte a una diffusione in tutte le direzioni e quindi saranno visualizzate in maniera più espansa dell'atteso. Inoltre, ogni sistema di separazione elettroforetica con acquisizione laser produce un certo segnale di fondo ("rumore"), detto "*warp e noise*" che può dare una certa riduzione della qualità del picco, soprattutto quando questo non sia chiaro e di dimensioni accettabili (Fig. 3.2.4 a).

Anche la preparazione dei campioni può influenzare negativamente il genotipo. Frequentissima è la cattiva denaturazione dei frammenti che formano così dei dimeri aspecifici, i quali vanno a falsare quello che è il reale genotipo; oppure la contaminazione degli strumenti di laboratorio con sostanze che inquinano l'immagine acquisita dal laser (detergenti per la vetreria non adatti, sostanze cosmetiche presenti sui guanti in lattice, spugne e strumenti abrasivi colorati). L'utilizzo di campioni troppo concentrati può tradursi in un fenomeno negativo detto "*de-multiplexing*" che consiste in un'interferenza di alcuni fluorocromi (specialmente il FAM) sugli altri colori, fatto che si presenta in fase di genotipaggio con consistenti bande aspecifiche all'interno della finestra di lettura (Davison e Chiba 2003).

Alcuni autori recentemente hanno anche valutato, in apparati per elettroforesi capillare, l'influenza negativa delle condizioni ambientali, quali la temperatura del laboratorio, sul processo di separazione, induce degli errori di tipizzazione (Black et al., 2001).

Un altro tipo di errore può essere causato dai reagenti utilizzati durante l'allestimento della reazione di PCR o, più semplicemente, dell'elettroforesi. Questi inconvenienti possono portare sia all'ottenimento di falsi alleli o falsi omozigoti, sia alla comparsa di picchi che presentano un rapporto falsato nelle dimensioni: ne sono un esempio alcuni alleli in cui alcuni picchi secondari, propri del pattern elettroforetico del marcatore, sono visualizzati con maggiore intensità e risoluzione dell'allele principale (*slipped mispairing*). Il fenomeno è dovuto alla temporanea denaturazione del DNA duplex seguita dalla non corretta rinaturazione e ciò può dar luogo alla formazione di una struttura a forcina o nel filamento stampo (il risultato è una delezione) o nel filamento neo-sintetizzato o nascente (il risultato è un'inserzione). Lo stesso effetto si ottiene nel caso di reazioni

multiplex di microsatelliti quando non si sia provata la temperatura di appaiamento più adeguata o ancora non sia ottimizzata la concentrazione dei reagenti (MgCl₂, buffer PCR e dNTPs).

Durante la reazione di amplificazione, una grande serie di artefatti ed errori può essere causata dall'enzima dal mal funzionamento della DNA polimerasi. Uno dei più noti è il fenomeno detto del “*plus A*”, secondo il quale la DNA polimerasi aggiunge un nucleotide all'estremità 3' di una sequenza, neo-sintetizzata con una certa frequenza, senza che ci sia effettivamente il nucleotide complementare sul filamento stampo. Questo effettivamente divide il picco elettroforetico rappresentante il prodotto di amplificazione in due differenti picchi. Il rapporto d'intensità di segnale fra il picco con l'originale dimensione e il picco *plusA* dipende dalla frequenza di addizione al 3'. E' consigliabile adottare un più lungo tempo di estensione per “forzare” l'enzima nell'aggiungere tale artefatto in tutti gli alleli, così da rendere costante la variazione. Altri autori suggeriscono l'utilizzo *post-PCR* della T4 DNA Polimerasi (Ginot *et al.* 1996; Oda *et al.* 1997): questo enzima riesce ad eliminare i nucleotidi e i frammenti secondari aggiunti dalla polimerasi in fase di estensione. Un ulteriore tecnica, detta “*PIG-tailing*” consiste nel migliorare l'affidabilità del genotipo visualizzato, forzando il meccanismo del plus – A (Brownstein *et al.* 1996; Kohn e Wayne 1997).

Infine, una grande quota degli errori di genotipaggio deriva dagli artefatti che possono prodursi nei sistemi di elettroforesi sia capillare sia a gel di acrilammide.

Alla luce di quanto detto finora in merito agli errori di genotipaggio, il fatto di utilizzare diversi apparati elettroforetici può apportare un certo grado di variabilità nella lettura dei risultati a causa del variare delle condizioni di temperatura (Davison e Chiba 2003) del laboratorio o per semplici fattori legati alla manualità dell'operatore. Ne deriva che, a parità di genotipo, differenti apparati possono restituire una lettura completamente differente, per cui è molto difficile trovare una documentazione affidabile con la quale confrontare i propri dati. Preso atto dei possibili artefatti, soprattutto a carico di un'elevata sovrastima degli eterozigoti, alla fine l'analisi di ogni picco allelico ed il suo dimensionamento in paia di basi ha permesso di ricavare il genotipo per ogni individuo di *Posidonia oceanica* delle praterie in esame.

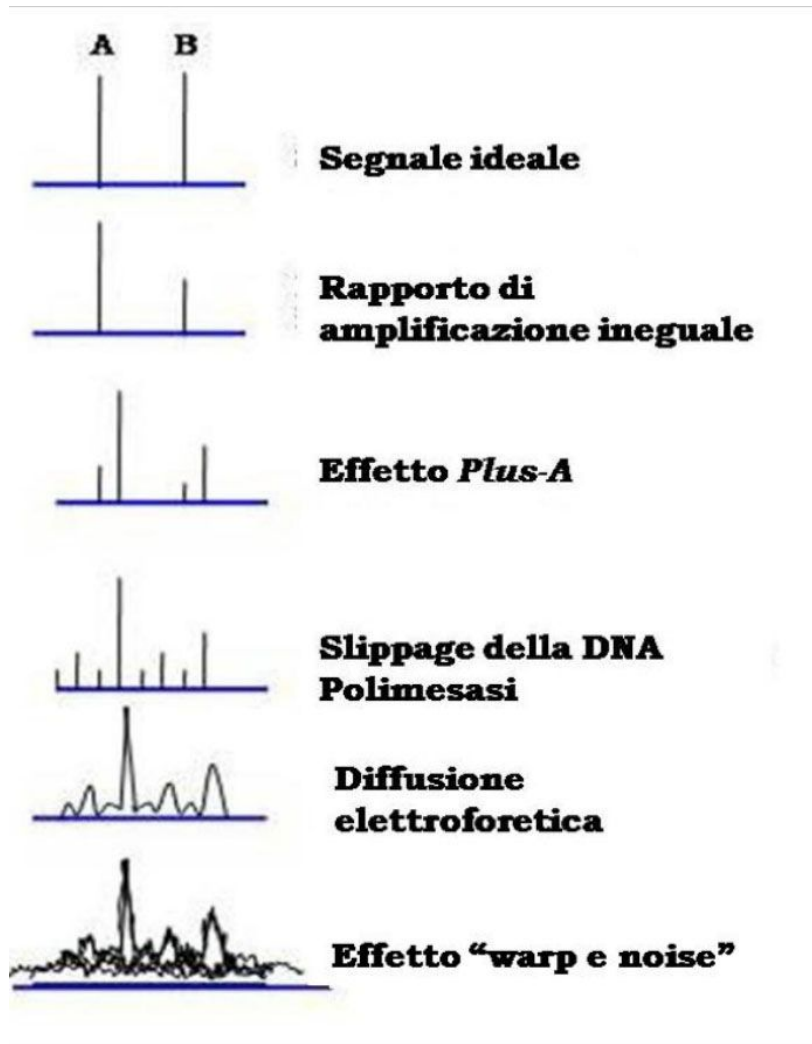


Fig. 3.2.4a: L'insieme dei fenomeni che influenzano la forma finale dei picchi in un individuo eterozigote

3.2.4 Analisi dei dati

Tutti i dati genotipici sono stati esportati dal software GeneMapper versione 4.0 in un file MS Excel versione 2010 (Microsoft) creando una colonna per ogni aplotipo di ogni campione, per ciascun marcatore.

Quando più individui presentano lo stesso genotipo, la probabilità che i campioni derivino da uno stesso evento riproduttivo è stata calcolata con il software GENCLONE 1.0 (Arnaud-Haond S e Belkhir K, 2007). Per stabilire se i ramet con gli stessi genotipi fossero identici per discendenza (dalla crescita clonale) o l'identità fosse dovuta ad un evento casuale, è stato calcolato il valore p_{sex} con il programma GENCLONE 1.0 (Arnaud-Haond e Belkhir 2007). Inoltre, è stato affinato lo score allelico per verificare l'esistenza di mutazioni somatiche o di errori di punteggio ricalcolando i valori di p_{sex} in tutte le combinazioni genotipiche che differiscono solo di un allele dopo l'eliminazione del locus variabile (Arnaud-Haond et al., 2007). Al di sotto della soglia dello 0,01 i genotipi identici sono stati considerati veramente ramets clonali.

La ricchezza genotipica di ogni prateria è stata calcolata attraverso il valore R secondo la formula $R = G-1/N-1$, dove G è il numero di multilocus genotypes (MLG) o multilocus lineages (MLL) discriminati in un campione; N il numero di ramets campionati. Quando R è uguale ad 1 tutti gli individui sono geneticamente distinti. Sia R che la ricchezza allelica (A) sono calcolate per il completo dataset e dopo la standardizzazione della dimensione del campione.

Dopo l'identificazione dei ramets appartenenti allo stesso genet i cloni sono stati rimossi dal dataset e su quest'ultimo sono state effettuate le analisi di variabilità genetica e struttura della popolazione.

La media delle frequenze alleliche per ogni locus è stata calcolata con Genalex ver. 6.0 (Peakall e Smouse, 2006). Le statistiche descrittive, come il numero di alleli (N_a), l'eterozigosità osservata (HO) e la diversità genica unbiased (HE), corrispondente all'eterozigosità attesa pesata sulla dimensione della popolazione, la diversità genetica (Nei, 1972), il valore di Fis per popolazione con rispettivo intervallo di confidenza (1000 bootstraps) e gli F statistici secondo la variante di Weir e Chocerman per marcatore (Weir e Cockerham, 1984), sono stati calcolati utilizzando il programma GENETIX ver. 4.03 (Belkhir et al., 2001).

MICROCHECKER ver. 2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004) è stato utilizzato per verificare la presenza di errori di *scoring* e alleli nulli.

Le probabilità di equilibrio di Hardy-Weinberg per ogni locus per ogni popolazione sono state stimate mediante i test del χ^2 implementati in GENALEX ver. 6 (Peakall e Smouse, 2006).

Infine con il software Arlequin versione 3.1 (Excoffier et al. 2005) è stata calcolata l'A.MO.VA (Analysis of MOlecular VAriance). L'analisi molecolare della varianza, utilizzato in Arlequin (AMOVA) è essenzialmente analogo ad altri approcci basati su analisi della varianza delle frequenze geniche, ma tiene conto del numero di mutazioni tra aplotipi. Con la definizione di gruppi di popolazioni, l'utente definisce una particolare struttura genetica che sarà testata. L'analisi gerarchica divide la varianza totale in componenti di covarianza secondo le differenze intra - individui, inter-individui, e inter - popolazionali (Weir 1996; Schneider et al., 2000). Le componenti della covarianza sono poi usati per calcolare gli indici di fissazione o F statistici (Wright 1951, 1965) usati poi per il test di significatività.

3.3 Procedura analitica e Assorbimento atomico

Il campione fogliare è stato mineralizzato attraverso attacco acido, così come previsto dalle direttive IRSA (Istituto di Ricerca Sulle Acque).

Le foglie sono state pulite dagli epifiti, lavate con acqua distillata ed infine essiccate in stufa a 105°C per 24h.

I campioni sono stati quindi polverizzati, 0,4 g circa di ogni campione è stato trasferito in un matraccio da 250 ml, posto in un mantello riscaldante e mineralizzato con sistema di refrigerazione a ricadere, in condizioni operative di 250 °C, a pressione atmosferica.

La mineralizzazione in tutti i protocolli metodologici per la determinazione delle specie metalliche e semimetalliche, prevede il trattamento dei campioni con digestione acida.

Nei campioni fogliari la distruzione della matrice organica è stata eseguita trattando 300 mg di campione con HNO₃ e H₂O₂ (3:1) e ponendo il tutto nel mantello riscaldante a riflusso per 4 ore.

Dopo il raffreddamento i campioni sono stati portati a volume di 10 ml con H₂O ultrapura MilliQ (18.2 MΩ*cm a 25 °C) in provette di vetro graduato e analizzati.

Il protocollo di analisi prevede una verifica su materiali di riferimento, 2 standard certificati: NIST 1570 (leaves) e NCBDC 87102 (soil), trattati con la stessa metodologia utilizzata per i campioni, per garantire l'accuratezza della preparazione e il controllo della determinazione analitica.

Per ogni elemento sono state utilizzate delle soluzioni standard, aventi concentrazioni di 1000 ± 3 µg/ml in 2% HNO₃, con cui sono state preparate delle soluzioni diluite con H₂O ultrapura MilliQ (18.2 MΩ*cm a 25 °C), a diverse concentrazioni comprese nel campo di indagine analitico, utilizzate per la calibrazione.

La strumentazione utilizzata è costituita da uno spettrometro ad assorbimento atomico con sistema a fornetto di grafite, per l'analisi quantitativa di Pb, Ni, Cd, Cr e Cu.

L'apparecchiatura è quindi composta da:

- Spettrofotometro AA 600 Perkin Elmer
- Fornetto di grafite THGA Perkin Elmer
- Campionatore automatico AS800 Perkin Elmer
- Fias 100 Perkin Elmer (determinazione degli idruri)
- Software: WinLab32

Il principio chimico fisico è basato sull'assorbimento da parte del campione, di una radiazione elettromagnetica con una determinata frequenza e lunghezza d'onda, caratteristica dell'elemento da analizzare. Quindi ogni atomo opportunamente eccitato si sposterà ad un livello energetico superiore e avrà uno specifico picco di assorbimento.

Lo schema di funzionamento prevede:

- una sorgente di radiazione EM data da una lampada a catodo cavo di forma cilindrica (Hollow Cathode Lamp, HCL) o EDL, selettiva per un determinato elemento o composita (multielemento). È costituita da un'ampolla di vetro in cui è posto il metallo insieme a due elettrodi a cui è applicata una forte differenza di potenziale elettrico rispetto ad un anodo metallico posto nelle sue vicinanze. Gli ioni positivi, accelerati dal campo elettrico, urtano il catodo e provocano l'espulsione degli atomi superficiali. A questo punto lo ione metallico carico tende a ritornare in una situazione di neutralità più stabile emettendo energia sotto forma di radiazione luminosa. La radiazione viene raccolta e inviata al comparto di atomizzazione dove sono presenti gli atomi del campione da analizzare;
- Il sistema di atomizzazione è quello mediante il quale il campione in analisi viene ridotto allo stato di gas monoatomico, dove viene misurata la differenza di intensità della radiazione in ingresso e in uscita, dopo attraversamento del campione atomizzato. Vi sono vari tipi di sistemi di atomizzazione: atomizzazione mediante fiamma (es. aria-acetilene o aria-idrogeno), in cui viene nebulizzato il campione e atomizzazione mediante fornetto di grafite, che sfrutta le alte temperature raggiunte da un tubicino di grafite. Il sistema a fornetto di grafite permette di diminuire la quantità di campione necessario all'analisi ed aumentare la sensibilità analitica. Il campione viene posto in una camera nella quale fluisce un gas inerte (Argon);

- Il sistema ottico e il monocromatore costituiscono un apparato di lenti e specchi che seleziona e indirizza la radiazione proveniente dalla lampada e quella in uscita dal campione prima di inviarla al rivelatore mediante diffrazione della luce;
- Il rivelatore è rappresentato da un fotoelettrodo o un fotomoltiplicatore che amplifica il segnale originale permettendo una migliore interpretazione;
- Il sistema di elaborazione per l'interpretazione, il calcolo ed il salvataggio dei dati.

Nella tabella sottostante (Tabella 3.3a) sono riportate per ogni elemento le condizioni operative e il programma termico utilizzato nell'assorbimento atomico.

Metals	Pb	Ni	Cd	Cu	Cr
Wavelength (nm)	283.3	232.0	228.8	324.8	357.9
Slit width (nm)	0.7	0.2	0.7	0.7	0.7
Argon flow (mL/min)	250	250	250	250	250
Sample volume (µL)	20	20	20	20	20
Heating program temperature (°C)					
Drying 1	110 (1, 30)	110 (1, 30)	110 (1, 30)	110 (1, 30)	110 (1,30)
Drying 2	130 (15, 30)	130(15, 30)	130 (15, 30)	130 (15, 30)	130 (15, 30)
Ashing	850 (10, 20)	500 (10,20)	1200 (10, 20)	1500 (10,20)	1100 (10,20)
Atomization	1600 (0, 5)	1500 (0, 5)	2100 (0, 5)	2300 (0, 5)	2300 (0, 5)
Cleaning	2450 (1, 3)	2450 (1, 3)	2500 (1, 3)	2450 (1, 3)	2450 (1, 3)
(ramp time, hold time sec)					

Tabella 3.3a: Condizioni operative

Si è utilizzata la strumentazione FIAS 100, per la determinazione degli idruri, composti ionici in cui l'idrogeno ha numero di ossidazione -1. Si utilizzano quindi agenti riducenti, come in questo caso l'ambiente acido, che viene fatto reagire con il campione introdotto mediante trasporto a flusso, con iniezione automatica, in un sistema di reazione esterno allo spettrofotometro, che riceve una corrente di gas inerte (Argon).

Il segnale è rappresentato da un picco la cui altezza è direttamente proporzionale alla concentrazione del campione. Il metodo di assorbimento atomico con fornello di grafite presenta un limite di rilevabilità di 1 $\mu\text{g/L}$ (ppb) per il Cr e il Ni; dello 0.15 $\mu\text{g/L}$ per il Cd, e di 2 e 3 $\mu\text{g/L}$, rispettivamente per il Pb e Cu.

3.4 Espressione genica

3.4.1 Estrazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il protocollo del CTAB modificato, che si basa sul metodo proposto da Chang *et al* (1993).

I 5 replicati di ogni rizoma sono stati inizialmente pestellati in azoto liquido tutti insieme e successivamente suddivisi in aliquote da 500 mg. Tale operazione è stata effettuata al fine di normalizzare le condizioni dei 5 replicati.

Per l'estrazione di RNA sono stati utilizzati approssimativamente 500 mg di tessuto fogliare prelevando sia foglie adulte che intermedie.

Il tampone di estrazione, costituito da TrisHCl (pH 8.0) 100 mM, NaCl 2.0 M, Spermidina 0.5 g/L, EDTA 20 mM e CTAB 2% (p/v), è stato riscaldato a 65 °C; addizionato con PVP 2% (p/v) e β -mercaptoetanololo 2% (v/v) immediatamente prima di procedere.

Il tessuto fogliare è stato ridotto in polvere mediante pestellamento in azoto liquido e successivamente trasferito in una falcon da 50 ml contenente 5 ml di tampone di estrazione (riscaldato a 65 °C). La soluzione che si forma è omogeneizzata il più possibile e messa ad incubare per 30 minuti a 65 °C. A questo punto viene aggiunto egual volume di cloroformio:Isoamilalcool (24:1) mescolando per inversione; si centrifuga 20 minuti a 9000 rpm e 4 °C, dopodiché il surnatante è stato trasferito in una nuova falcon. Questo procedimento viene ripetuto per due volte. Infine è stato aggiunto $\frac{1}{4}$ del volume di LiCl 10 M, mescolando per inversione e si lascia precipitare overnight a 4 °C.

Il giorno seguente il campione è stato centrifugato per 20 minuti a 13000 rpm a 4 °C, dopodiché è stata rimossa completamente la fase acquosa. Il pellet viene lavato con 500 ml di tampone SSTE (costituito da NaCl 1 M, SDS 5%, TrisHCl 10 mM pH 8.0 ed EDTA 1 mM) precedentemente preriscaldato a 37 °C. In seguito sono stati aggiunti 8 μ l di DNasi incubati per un'ora a 37 °C.

Al termine dell'incubazione è stato aggiunto egual volume di CHL:IAA (24:1), centrifugato 10 minuti a 13000 rpm a 4 °C ed infine è stato recuperato il surnatante. A questo sono stati aggiunti due volumi di etanolo 95% lasciato precipitare per 2 ore a -20 °C. Successivamente il campione è stato centrifugato a 13000 rpm per 20 minuti, una volta rimosso il surnatante, il pellet è lasciato ad asciugare sotto cappa biologica. Il campione è stato risospeso in 40 μ l di H₂O DEPC e conservato a -80°C fino alle successive applicazioni.

Tutte le soluzioni utilizzate sono preparate con H₂O DEPC, sono sterilizzate per filtrazione e conservate a temperatura ambiente.

3.4.2 – Quantizzazione dell'RNA estratto

L'RNA è stato quantizzato tramite una misura spettrofotometrica dell'assorbanza (A) del campione alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm. La concentrazione del campione è stata calcolata mediante la formula:

$$\text{Concentrazione } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times D \times 40$$

Dove D è il fattore di diluizione

La valutazione di un'eventuale contaminazione del campione da parte di proteine (P), è stata calcolata tramite il rapporto:

$$P = A_{260}/A_{280}$$

In un RNA di buona qualità, i valori di P dovrebbero essere compresi tra 1,8 e 2.

3.4.3 PCR di controllo e RT-PCR

Con la misura spettrofotometrica si controlla la quantità e la purezza dell'RNA totale. Per verificarne la qualità in termini di integrità ed eventuale contaminazione di DNA e possibilità di utilizzo per reazioni successive, è stata fatta una PCR di controllo con geni *housekeeping*, che si possono presupporre espressi in qualunque tessuto. Un'assenza di prodotto come risultato di quest'amplificazione sta ad indicare un buon livello di integrità dell'RNA e un'assenza di contaminazione da parte di DNA, per cui si può procedere alla retrotrascrizione (RT-PCR).

La reazione è stata condotta in un volume finale di 25 μl , in cui sono presenti:

- RNA stampo 200 ng
- 5X RT-PCR Buffer 1X
- MgCl_2 2,5 mM
- DNTPs 200 μM
- Primer Forward 0,5 μM
- Primer Reverse 0,5 μM
- Taq Polimerasi (Go-taq Promega 5 u/ μl) 1,5 Ui
- H_2O a volume

Primer utilizzati	Oligonucleotide Sequenza (5'-3')
18 S-For	ACATAGTAAGGATTGACAGATTG
18 S Rev	CTGAGGTCTCGTTCGTTA

Protocollo di amplificazione:

Step	Temperatura	Durata	n° cicli
Denaturazione iniziale	94°C	3'	1
Denaturazione	94°C	30''	25
Annealing	60°C	30''	
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	10'	1

Il risultato dell'amplificazione è stato controllato in gel di agarosio all'1,2 %.

La retrotrascrizione viene effettuata usando come innesco un oligo-d(T) che si appaia alla coda di poliadenilazione situata al 3' degli mRNA. Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA secondo il protocollo della Goscript Reverse Transcription System (Improm IITM Reverse transcriptase Promega) che prevede due passaggi, per raggiungere un volume finale di 20 µl.

La prima soluzione viene preparata con:

- RNA totale 1 µg
- Primer (oligo-dT) 0,5 µg/µl
- H₂O a volume di 5 µl

Viene lasciata incubare a 70 °C per 5 minuti e viene posta subito in ghiaccio. A questa soluzione vengono aggiunti i seguenti reagenti, fino ad un volume finale di 20 µl:

- Improm II buffer reaction 1X
- MgCl₂ 2,5 mM
- DNTPs 0,5 mM
- Enzima reverse transcriptase 1µl

La soluzione ottenuta viene fatta incubare:

- ❖ 25 °C per 5'
- ❖ 42 °C per 60'
- ❖ 70 °C per 15'

Al fine di verificare il buon esito della RT-PCR è stata effettuata una ulteriore PCR di controllo secondo il protocollo precedentemente descritto.

3.4.4 Real time Q-PCR

Le tecniche di Real Time PCR costituiscono un significativo miglioramento dei vari metodi di amplificazione e quantificazione di acidi nucleici rispetto alle tradizionali PCR (*endpoint*). A differenza della PCR convenzionale, questa tecnica permette di monitorare l'andamento dell'amplificazione durante il processo e non al suo termine, misurando, quindi, la quantità di acido nucleico prodotto durante ogni ciclo di amplificazione. In particolare si ha che nella fase esponenziale, l'aumentare dei prodotti di PCR è correlato in modo lineare con l'andamento della fluorescenza misurato dallo strumento.

La reazione di amplificazione è stata condotta su CFX96 Real-time system c1000 (Biorad Thermal cycler). Lo strumento utilizzato è dotato di un software dedicato BioRadCFXManager che permette di impostare i vari tipi di reazione, settare la piastra ed infine visualizzare i risultati e svolgere diversi tipi di analisi.

I risultati della reazione vengono elaborati in un grafico, in cui in ascissa sono presenti il numero di cicli della reazione e in ordinata la fluorescenza. Per effettuare la quantificazione, lo strumento si avvale del valore di CP (*Crossing Point*), dato che viene poi elaborato col metodo della Derivata Seconda. Il *Crossing Point* è quel valore di fluorescenza che identifica il numero di cicli al quale il campione diventa rilevabile dallo strumento. Esso inoltre è rapportato al valore della derivata seconda nel punto di massimo, in tal modo è possibile discernere tra amplificazioni che hanno lo stesso Ct (threshold cycle) ma una diversa velocità di crescita della fluorescenza. Con questa metodica è possibile effettuare due tipi diversi di quantificazioni:

- La quantificazione assoluta, nel caso in cui si calcoli il numero di copie del trascritto di interesse riferendosi ad una curva standard costruita in precedenza con campioni a titolo noto di molecola target;
- La quantificazione relativa, che descrive il cambiamento di espressione del gene *target* in un campione, relativamente ad un gene *reference* e ad un calibratore esterno.

3.4.5 Curva standard

Si tratta della quantificazione assoluta effettuata su una serie di diluizioni scalari dello stesso campione. La curva standard viene ottenuta per testare singole coppie di *primer*, per valutare l'efficienza di reazione di ogni singolo saggio (test) e il parametro R^2 all'interno del *range* dinamico. Per disegnare la curva standard il *software* riporta nel grafico i valori di CP di ogni campione. Se l'efficienza della reazione è alta (~100%) i valori di CP sono legati nella fase esponenziale da un rapporto di correlazione lineare. In queste condizioni la curva standard è la retta di regressione su cui giacciono i vari CP.

Il parametro R^2 (coefficiente di regressione) rappresenta graficamente la distanza media dei punti dalla retta di regressione. Tanto più la distanza tra i CP e la retta di regressione diminuisce tanto più il valore del coefficiente di regressione tende ad 1.

Il *range* dinamico corrisponde all'intervallo della curva di amplificazione in cui la reazione è lineare. La curva viene costruita riportando in grafico i valori di Ct, in funzione delle diluizioni seriali del campione a concentrazione nota di cui si vuole determinare l'efficienza. In questo lavoro sono state effettuate diluizioni 1:4 effettuando tre replicati tecnici per punto. Dopo aver calcolato la regressione lineare, l'efficienza viene ricavata dalla pendenza della retta (Lekanne et al.,2002). Noto il coefficiente angolare (q) della retta di regressione l'efficienza della reazione (E) p è determinata dalla seguente equazione :

$$E=10^{-1/q}$$

I valori ottimali di pendenza della retta standard e del coefficiente di regressione sono, rispettivamente, -3,30 e 0,997.

3.4.6 Quantificazione relativa

L'analisi di quantificazione relativa si basa su due rapporti:

- il primo rapporto tra la concentrazione della sequenza *target* e la concentrazione della sequenza *reference* del campione;
- il secondo rapporto tra le concentrazioni *target* e *reference* del calibratore.

Per *target* si intende il gene di interesse, mentre per *reference* si intende il gene che si conosce essere costante in tutti i campioni e che viene utilizzato come controllo endogeno (housekeeping). Il *reference* è usato per la normalizzazione tra campioni, mentre il calibratore è in genere un controllo

positivo che ha un rapporto *target-reference* costante ed è utilizzato per normalizzare e quindi poter comparare tutti gli esperimenti come se fossero un unico esperimento.

Il risultato dell'analisi di quantificazione relativa è un rapporto normalizzato:

$$\text{Normalized Ratio} = \left(\frac{\text{Concentrazione target}}{\text{Concentrazione reference}} \right)_{\text{Campione}} \div \left(\frac{\text{Concentrazione target}}{\text{Concentrazione reference}} \right)_{\text{Calibratore}}$$

La quantificazione relativa si basa sul presupposto che la concentrazione di DNA al *crossing point* sia la medesima per ogni campione che contiene lo stesso *target*. Questa è la concentrazione di acido nucleico necessaria affinché lo strumento possa rilevarla al di fuori del “rumore di fondo” (*background noise*). Ogni campione richiede un numero di cicli differente per raggiungere il *crossing point* (CP) in dipendenza della iniziale concentrazione di DNA del campione. Alla fine dell'esperimento, la concentrazione di acido nucleico di ogni campione può variare, in dipendenza di quanti cicli di replicazione sono stati completati dopo che è stato raggiunto il CP. Questo tipo di analisi sfrutta il CP (espresso come numero di cicli), l'efficienza della reazione, il numero di cicli completati e altri valori per determinare di quanto sia aumentata la concentrazione di DNA di ogni campione alla fine dell'amplificazione. L'analisi usa questi calcoli per comparare i campioni e determinare i rapporti. Il rapporto finale risultante dalla normalizzazione con il calibratore è determinato dall'efficienza della PCR e dai CP.

La quantificazione della espressione del gene di interesse è di tipo relativo in quanto viene normalizzata per l'housekeeping e viene calcolata applicando la formula matematica:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}; \text{ dove } -\Delta\Delta Ct = [(Ct(\text{gene di interesse}) - Ct(\text{HK})) - [(Ct(\text{campione}) - (Ct(\text{calibratore}))]]$$

Per normalizzatore si definisce un gene il cui valore di espressione corrisponde a 1 ed in cui espressione rimane costante in tutti i campioni: nel nostro caso sono stati scelti il 18 S e L23 sulla base di quanto già verificato da Serra et al, 2012. Quando l'esperimento non include un campione di controllo, come nel nostro caso, la scala di espressione normalizzata (NE) per ogni target si ottiene dividendo il livello di espressione di ogni campione rispetto al livello di espressione più basso in tutti i campioni. Il software imposta il livello più basso di espressione ad un valore di 1 e ridimensiona tutti i livelli di espressione dei campioni. La scala più bassa viene calcolato da questa formula:

$$\text{Scaled Normalized Expression}_{\text{sample (GOI)}} = \frac{\text{Normalized Expression}_{\text{sample (GOI)}}}{\text{Normalized Expression}_{\text{Lowest sample (GOI)}}}$$

Dove GOI sta per Gene di interesse (target).

La chimica di rivelazione usata è il SYBRGreen. Si tratta di un colorante asimmetrico a base di Cianina. Durante la reazione di polimerizzazione si intercala in modo aspecifico nell'acido nucleico a doppio filamento e diventa luminescente. Le cianine asimmetriche hanno due gruppi aromatici contenenti azoto, uno dei quali carico positivamente, collegato tramite un legame con l'amminoacido metionina. Questo colorante non è fluorescente quando è libero in soluzione, a causa delle vibrazioni che impegnano entrambi i gruppi aromatici; queste sono convertite in calore che viene dissipato nella soluzione circostante. Al contrario, il colorante diventa estremamente fluorescente quando si lega al DNA, presumibilmente perché viene limitata la possibilità di rotazione attorno al legame di metionina. (Nygren et al.,1998)

Nella reazione di PCR la fluorescenza aumenta man mano che si formano composti a doppio filamento poiché la quantità di colorante che si intercala è maggiore.

Alcuni fattori possono influire su quanto appena affermato: in effetti la velocità con cui il colorante si intercala nel doppio filamento decresce nel corso della reazione, per cui con un alto numero di cicli la fluorescenza sarà leggermente inferiore rispetto a una previsione iniziale.

La fluorescenza del colorante dipende anche in parte dal tipo di sequenza del DNA. Tuttavia, nonostante questi fattori possano modulare la reazione, una certa quantità di doppio filamento di DNA target, in assenza di quantità significative di altri doppi filamenti di DNA, sprigiona sempre la stessa fluorescenza ogni volta. Per questa caratteristica ripetibilità i coloranti aspecifici sono ottimi per le reazioni di Real Time PCR quantitativa quando i campioni sono raffrontati allo stesso livello di fluorescenza in assenza di altre strutture di DNA che interferiscono con la reazione.

Essendo intercalanti aspecifici, le cianine aumentano la fluorescenza del campione inserendosi in qualunque composto di DNA a doppio filamento: ad esempio, se si formano dimeri di primer (la cianina si intercala anche in essi) si osserva una fluorescenza che non rappresenta correttamente la reale quantità del campione esaminato. Per escludere l'errore dato da questo artefatto è buona prassi eseguire l'analisi della curva di *melting* al termine della PCR.

Man mano che la temperatura aumenta, i filamenti di DNA si separano e la fluorescenza diminuisce, poiché aumenta l'energia termica che consente una maggior capacità rotativa nel legame tra la sonda e il DNA. La fluorescenza diminuisce gradualmente fino a quando viene raggiunta la temperatura alla quale metà dei filamenti di DNA sono separati e metà sono uniti la cianina si separa e la fluorescenza diminuisce in modo estremamente rapido. Il valore di temperatura cui corrisponde questa reazione, noto come temperatura di *melting* (T_m), è determinato facilmente come il punto di massimo nella derivata prima negativa. Dal momento che i dimeri di *primer* sono tipicamente più

corti che i prodotti *target*, essi si separano a temperature più basse e la loro presenza è facilmente riconosciuta nell'analisi della curva di *melting*

3.4.7 Condizioni sperimentali e geni selezionati

La PCR real time è stata effettuata utilizzando il SYBR Green Supermix (Bio-Rad) ed i primers specifici per i geni di interesse. L'esperimento è stato condotto a partire da tre replicati biologici e rispettivi tre replicati tecnici. La reazione di PCR è stata effettuata in un volume finale di 15 µl contenenti: PCR-SYBR Green Master Mix 2x (Biorad), 500 nM primer forward, 500 nM primer reverse, cDNA (pari a 1/10 del volume finale) e H₂O ad un volume di 15 µl. Per i due normalizzatori 18S ed L23 e per il gene CCOX la concentrazione finale del primer forward e reverse è di 300 nM. Il profilo termico della reazione è il seguente:

- 1) 95 °C per 3:00
 - 2) 95 °C per 0:1
 - 3) 57 °C per 0:30
 - 4) Plate read
- } 44 cicli
- 5) Melt Curve 70,0 to 95,0 C, increment 0,5 C, Per 0:05 + Plate Read.

Le sequenze oligonucleotidiche dei primers dei geni target e per il gene housekeeping sono state disegnate utilizzando il programma Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)

Di seguito è riportata la tabella con tutti i geni d'interesse.

Gene	Funzione	Primer Forward	Primer Reverse	bp	E(%)	R ²	T	Accession Number
CHLP	geranyl geranyl reductase	ACGATGTCTCCCCTTACGTG	ATCTCCGCCAAGTCCTTGTA	314	100	0,99	60°	GQ421690.1
CMT	CMT-type DNA-methyltransferase (CMT1) mRNA	TGTAATCAATAGCAAAGTCTTCATGTC	AATGACCATCAATCTTTTGC	84	101,7	0,99	60°	JF787621.1
GST	Glutathione S-transferasi	TACATGAGCAGCGACGAGTT	CTTTGCATCTCCAGAACCTTG	169	101	0,99	60°	Pooc_B_rp3_C10_F
CAT	Catalase	AACTTCAAGCAGCCAGGAGA	ATCACATGCTGGGTTTCACA	202	101	0,99	60°	Pooc_PC013E04
PeP	Putative peptidase	GACATGCTTCAAGGGATCGT	GTAGGCAACGCTGAACGCTCT	202	104	0,98	60°	JK743875.1
MT-2b	partial mt2b gene for type II metallothionein	GAAGCTGTGGCTGTGGATCT	AGCTGCTTCCACATTTGCAT	189	100	0,99	60°	AJ249602.1
SOD	Superoxide dismutase	CAATGGCTGCATATCGACTG	TGCCGGACTTTATCTTCTGG	157	101,5	0,99	57°	Pooc_PC034C12
POX	Peroxidase	CCCTTGTTGTCGAGGATGTT	TTGGGCTTGTGCTCTTCTT	238	110	0,99	57°	Pooc_Contig114
RUB	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)	TCGTCCCCTATTGGGATGTA	ATTTACCTGTTTCGGCTTG	207	92	0,98	57°	U80719.1
CCOX	Cytochrome c oxidase	TCGTAGAAAGAGTGGATGAAGC	AGCAGGAGTCTCATCTTGTTT	238	104	0,99	57°	Pooc_PC045F12
18S	Ribosomal RNA 18S	ACATAGTAAGGATTGACAGATTG	CTGAGGTCTCGTTTCGTT	119	104,3	0,96	60°	AY491942.1
L23	60s ribosomal protein L23	TGGTCCAACCTTGTTCCCTTCC	AAGATACAGGCTGCCAAGG	168	103	0,98	60°	GO347779

3.5 Attività enzimatica

3.5.1 Estrazione di proteine da foglie di posidonia e determinazione della concentrazione proteica mediante saggio Bradford

Le foglie di Posidonia sono estremamente coriacee ed offrono molta resistenza al pestellamento. Tuttavia, il materiale vegetale è stato ridotto in polvere attraverso pestellamento aggiungendo aliquote di azoto liquido per evitarne lo scongelamento. Una volta ottenuta una polvere sottile, ad essa è stato aggiunto un buffer di estrazione costituito da sodio-fosfato 50mM (pH 7.8), EDTA 25mM, PVP 4%, DTT 4 mM e un cocktail di inibitori di proteasi.

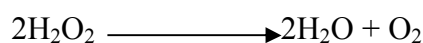
Per ogni grammo di tessuto vegetale sono stati aggiunti circa 3.5 ml di buffer di estrazione. Dopo aver ottenuto un'emulsione pipettabile, il campione è stato ulteriormente omogeneizzato utilizzando l'UltraTurrax T25 (IKA) a una velocità di 12500rpm per 3 minuti, mantenendo i campioni in ghiaccio. Successivamente il campione è stato centrifugato a 9000 rpm per 20 minuti per separare il particolato vegetale dalla parte acquosa contenente le proteine. Il supernatante è stato quindi prelevato e conservato in tubi falcon a 4° C. La concentrazione del materiale recuperato dai diversi campioni è stata stimata mediante saggio Bradford (1976). Le assorbanze delle miscele di reazione (volume finale 1 ml), contenenti in soluzione acquosa l'estratto da saggiare ed il colorante Coomassie Brilliant Blue G-250, sono state lette a 595 nm. Per la determinazione della retta standard di riferimento è stata utilizzata BSA (Albumina di siero bovino).

3.5.2 Saggi di attività enzimatica

Tutte le attività enzimatiche sono state saggiate utilizzando protocolli standardizzati e ogni saggio è stato ripetuto in triplicato. Per ogni saggio sono stati utilizzati enzimi purificati come controllo della qualità dell'esperimento.

3.5.2.1 Catalasi

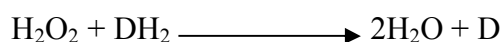
L'attività catalasica è stata misurata seguendo per due minuti, a 25 °C, il decremento di assorbimento a 240 nm, dovuto alla decomposizione del perossido di idrogeno ($\epsilon_{mM} = 0,043 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in acqua e ossigeno.



Il campione per il saggio (V_F 3 ml) è stato preparato utilizzando il protocollo di Claiborne (1984) su modificazione del protocollo precedentemente proposto da Beers e Sizer (1952). Il saggio è stato eseguito pipettando 21 μg di estratto proteico nel buffer potassio-fosfato 50 mM (pH 7.0) contenente perossido di idrogeno 19 mM. Un'unità enzimatica è definita come la quantità di enzima necessaria per il consumo di 1 μmole di perossido di idrogeno per minuto per ml di saggio.

3.5.2.2 *Guaicolo perossidasi*

L'attività della guaicolo perossidasi è stata misurata seguendo per 3 minuti, a 30 °C, l'incremento dell'assorbimento a 470 nm, dovuto all'ossidazione del guaiacolo (2-metossifenolo) a tetraguaiacolo ($\epsilon_{\text{mM}} = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



Il campione per il saggio (V_F 3 ml) è stato preparato secondo il seguente protocollo: 12 μl di guaiacolo (0,4% finale) sono stati aggiunti, direttamente in cuvetta, al tampone potassio-fosfato 50 mM (pH 7.0) e la cuvetta è stata agitata fino ad ottenere la completa solubilizzazione del guaiacolo nel buffer; di seguito è stato aggiunto il campione proteico in quantità di 2 μg e la cuvetta è stata fatta stabilizzare a 30° C per 30 secondi. La reazione è stata avviata con l'aggiunta di 26 μl di perossido di idrogeno (0,03 % finale).

Un'unità enzimatica è definita come la quantità di enzima richiesta per la produzione di 1 μmole di tetraguaiacolo per minuto, nelle condizioni di saggio descritte.

3.5.2.3 *Ascorbato perossidasi*

L'attività dell'ascorbato perossidasi è stata misurata per 3 minuti tramite l'incremento di assorbimento a 290 nm dovuto alla formazione di deidroascorbato ($\epsilon_{\text{mM}} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

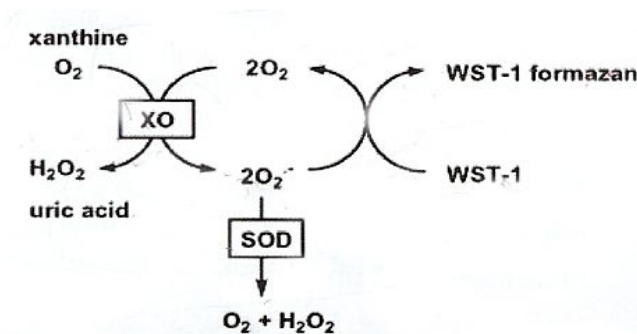
Il campione per il saggio (V_F 1 ml) è stato preparato come segue: direttamente in cuvetta al tampone potassio-fosfato 50 mM (pH 7.0) è stato aggiunto EDTA 0,1 mM ed ascorbato 0,5 mM. La cuvetta è stata agitata fino ad ottenere la completa solubilizzazione del preparato, subito dopo è stato ag-

giunto il campione proteico in quantità di 6 µg. La reazione è stata avviata con l'aggiunta H₂O₂ 0,1 mM (0,34%).

Un'unità enzimatica è definita come la quantità di enzima richiesta per la produzione di 1 µmole di deidroascorbato per minuto, nelle condizioni di saggio descritte

3.5.2.4 SOD

Per la realizzazione del saggio è stato utilizzato il kit della Sigma "SOD determination kit" in cui l'attività di SOD viene misurata utilizzando un saggio accoppiato con il sistema xantina/xantina ossidasi che produce anione superossido. In assenza di SOD, l'anione superossido riduce un sale di tetrazolio con formazione di un colorante (formazano) che assorbe a 440 nm, mentre, in presenza di SOD, l'anione superossido viene convertito in ossigeno e perossido di idrogeno, impedendo la formazione del formazano e causando un decremento dell'assorbimento a 450 nm. Quindi la IC₅₀ di SOD, ossia la quantità di SOD che inibisce al 50% la formazione del formazano, viene determinata con un metodo colorimetrico.



Il kit contiene la WST Solution, la Enzyme Solution, la Buffer Solution e il Dilution Buffer a partire dai quali vengono preparate le "working solution" da utilizzare nel saggio. La WST Working Solution è stata preparata diluendo 1 ml di WST Solution in 4 ml di Buffer Solution, mentre la Enzyme Working Solution è stata preparata aggiungendo 15 µl di Enzyme Solution (contenente la xantina ossidasi) a 2.5 ml di Dilution Buffer. Per il campione proteico sono state preparate diluizioni seriali, al fine di saggiare quantità decrescenti di estratto da 2 µg a 0.125 µg. Il saggio è stato allestito in piastre da 96 pozzetti in ognuno dei quali sono stati pipettati 50 µl di WST Working Solution, 150 µl fra campione proteico e Buffer Solution e 20 µl di Enzyme Working Solution. Ogni campione è stato preparato in duplicato. Contemporaneamente sono stati preparati specifici bianchi secondo lo schema sotto riportato:

	Sample	Blank 1	Blank 2	Blank3
Sample + Buffer solution	150 µl	150 µl - x µl sample	150 µl	150 µl - x µl sample
ddH ₂ O		x µl		xµl
WST Working Solution	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
EnzymeWorking Solution	20 µl	20 µl		
Dilution Buffer			20 µl	20 µl

La piastra è stata incubata a 37° C per 20 minuti, dopodiché l'assorbimento è stato letto utilizzando un luminometro (Lab system Multiskan MS) settato a 440 nm.

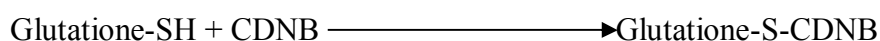
L'attività di SOD è stata valutata come la quantità di enzima in grado di inibire al 50% la formazione del formazano ed è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\{[(A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank 2}})] / (A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 3}})\} \times 100$$

3.5.2.5 GST

L'attività della Glutazione S-Transferasi è stata saggiata seguendo l'aumento dell'assorbimento a 340 nm relativo alla coniugazione del glutatione ridotto con l'1-cloro,2,4-dinitrobenzene (CDNB) per 1 minuto a 30 °C (ϵ 9.6 mM⁻¹cm⁻¹).

Il campione per il saggio (V_F 1 ml) è stato preparato utilizzando il protocollo proposto da Wallert and Provost(2007) (http://download.bion.com.cn/upload/201106/09134924_8439.pdf): 9 µl di CDNB 100 mM (sciolto in etanolo 100%) e 9 µl di GSH 100 mM sono stati aggiunti direttamente in cuvetta al tampone PBS 100 mM (pH 6.5); successivamente è stato aggiunto l'estratto proteico (42 µg) per avviare la reazione.



Un'unità enzimatica è definita come la quantità di enzima richiesta per la coniugazione di 1 µmole di CDNB al glutatione ridotto, nelle condizioni di saggio descritte.

4. Risultati e discussioni

4.1 Analisi della variabilità

Tra i 140 individui analizzati sono stati discriminati i cloni e le successive analisi sono state condotte su 124 MLL (Multi Locus Lineage) di cui: 34 nel sito del Chiarone, 37 nel sito delle Murelle, 20 per Giannutri, 13 per Tor Paterno a 18 m e 20 per Tor Paterno a 26m. La diversità clonale R (Tabella 4.1a) nelle cinque praterie esaminate è piuttosto alta. A Giannutri e Tor Paterno (campioni prelevati alla profondità di 26m) dove ogni individuo rappresenta un distinto MLL abbiamo i valori più alti, mentre per i campioni di Tor Paterno prelevati alla profondità di 18m riscontriamo i valori più bassi. Le praterie di Chiarone e Murelle presentano valori di diversità clonale molto simili e relativamente alti.

Sito	$R=MLL-1/N-1$
Chiarone	0,84
Murelle	0,92
Giannutri	1
Tor Paterno 18m	0,6
Tor Paterno 26m	1

Tabella 4.1a: Diversità clonale stimata con il metodo Dorken e Eckert (2001). $R=MLL-1/N-1$, dove MLL è il numero di Multi Locus Lineage, N è il numero di ramets campionati.

Dall'analisi del pattern allelico fra le popolazioni è emerso che il numero di alleli maggiore (2,74) è stato trovato nella prateria di Tor Paterno a 18m (fig.4.1a).

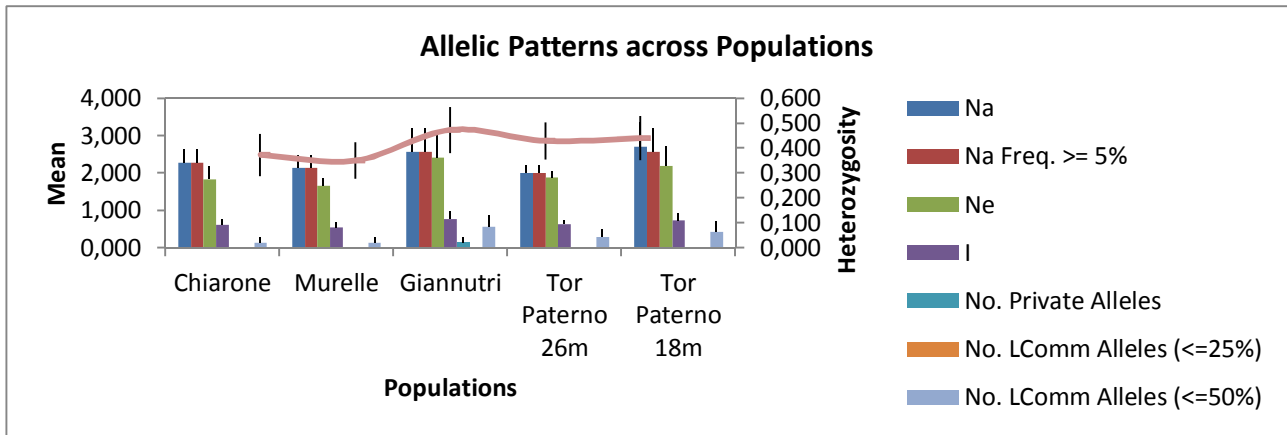


Fig 4.1a: Na = No. of Different Alleles; Na (Freq $\geq 5\%$) = No. of Different Alleles with a Frequency $\geq 5\%$; Ne = No. of Effective Alleles = $1 / (\sum \pi^2)$; I = Shannon's Information Index = $-1 * \sum (\pi * \ln(\pi))$; No. Private Alleles = No. of Alleles Unique to a Single Population; No. LComm Alleles ($\leq 25\%$) = No. of Locally Common Alleles (Freq. $\geq 5\%$) Found in 25% or Fewer Populations; No. LComm Alleles ($\leq 50\%$) = No. of Locally Common Alleles (Freq. $\geq 5\%$) Found in 50% or Fewer Populations; He = Expected Heterozygosity = $1 - \sum \pi^2$; uHe = Unbiased Expected Heterozygosity = $(2N / (2N-1)) * He$

Dopo aver escluso i cloni dal dataset sono state calcolate: Ho (eterozigosi osservata), He (eterozigosi attesa), indice di F_{is} (Weir e Cockerman 1984) ed equilibrio di Hardy-Weinberg. La Ho varia da un range di 0,4 (Chiarone e Murelle) a 0,6 (Tor Paterno 26m); He è compresa tra 0,3 (Chiarone e Murelle) e 0,4 nelle altre tre praterie; uHe (Unbiased eterozigosi attesa pesata sulla dimensione della popolazione) segue lo stesso andamento della He su tutti e cinque i siti è stato registrato un eccesso di eterozigoti (Tabella 4.1b)

La differenza della variabilità genetica riscontrata tra le due praterie di Tor Paterno presenta una situazione analoga a quella proposta nel lavoro di Migliaccio (2005), condotto sulle praterie di Ischia, dove si aveva un aumento della diversità all'aumentare della profondità, su una distanza di circa 400m tra il punto di campionamento più verso costa e quello più a largo verso mare.

Pop		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
Chiarone	Mean	34,000	2,286	1,841	0,612	0,412	0,374	0,379	-0,112
	SE	0,000	0,360	0,334	0,155	0,099	0,085	0,086	0,086
Murelle	Mean	37,000	2,143	1,662	0,553	0,402	0,351	0,356	-0,157
	SE	0,000	0,340	0,192	0,125	0,082	0,073	0,074	0,043
Giannutri	Mean	20,000	2,571	2,413	0,769	0,586	0,474	0,486	-0,226
	SE	0,000	0,612	0,598	0,200	0,142	0,093	0,095	0,171
Tor Paterno 26m	Mean	20,000	2,000	1,884	0,626	0,657	0,430	0,441	-0,547
	SE	0,000	0,218	0,174	0,115	0,115	0,074	0,076	0,102
Tor Paterno 18m	Mean	13,000	2,714	2,200	0,740	0,538	0,440	0,458	-0,233
	SE	0,000	0,644	0,515	0,192	0,119	0,089	0,093	0,125

Tabella 4.1b: Na = No. of Different Alleles; Ne = No. of Effective Alleles = $1 / (\sum \pi^2)$; I = Shannon's Information Index = $-1 * \sum (\pi * \ln(\pi))$; Ho = Observed Heterozygosity = No. of Hets / N; He = Expected Heterozygosity = $1 - \sum \pi^2$; uHe = Unbiased Expected Heterozygosity = $(2N / (2N-1)) * He$; F = Fixation Index = $(He - Ho) / He = 1 - (Ho / He)$; Where π is the frequency of the *i*th allele for the population & $\sum \pi^2$ is the sum of the squared population allele frequencies.

Sulla base delle frequenze alleliche, delle dimensioni degli alleli e dello scostamento dall'equilibrio di HW è stato effettuato un controllo dell'intero dataset con il software statistico MICROCHECKER che valuta la presenza di errori di *scoring* e non sono stati riscontrati alleli nulli. In tutte e cinque le praterie analizzate il locus Po-15 risulta monomorfo. L'unica prateria ad essere in equilibrio di Hardy-Weinberg per tutti i loci tranne quello monomorfo è quella di Tor Paterno a 26m. Mentre quella con uno squilibrio maggiore è quella di Murelle, in cui l'unico locus in equilibrio è il locus Po5-40 (Tabella 4.1c).

Popolazione	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
Chiarone	PO-5	1	0,791	0,374	ns
Chiarone	PO5-10	1	0,724	0,395	ns
Chiarone	PO5-39	1	2,723	0,099	ns
Chiarone	PO5-40	6	51,146	0,000	***
Chiarone	PO5-49	3	5,314	0,150	ns
Chiarone	PO-15	Monomorphic			
Chiarone	PO4-3	1	5,112	0,024	*
Murelle	PO-5	1	2,392	0,122	ns
Murelle	PO5-10	1	0,182	0,669	ns
Murelle	PO5-39	1	1,386	0,239	ns
Murelle	PO5-40	6	27,143	0,000	***
Murelle	PO5-49	1	1,128	0,288	ns
Murelle	PO-15	Monomorphic			
Murelle	PO4-3	1	1,537	0,215	ns
Giannutri	PO-5	1	1,839	0,175	ns
Giannutri	PO5-10	3	20,000	0,000	***
Giannutri	PO5-39	1	7,200	0,007	**
Giannutri	PO5-40	15	100,000	0,000	***
Giannutri	PO5-49	1	0,032	0,858	ns
Giannutri	PO-15	Monomorphic			

Giannutri	PO4-3	1	4,772	0,029	*
Tor Paterno 26m	PO-5	1	4,201	0,040	*
Tor Paterno 26m	PO5-10	1	13,388	0,000	***
Tor Paterno 26m	PO5-39	1	5,799	0,016	*
Tor Paterno 26m	PO5-40	1	10,926	0,001	***
Tor Paterno 26m	PO5-49	3	10,293	0,016	*
Tor Paterno 26m	PO-15	Monomorphic			
Tor Paterno 26m	PO4-3	1	8,889	0,003	**
Tor Paterno 18m	PO-5	1	0,138	0,710	ns
Tor Paterno 18m	PO5-10	1	3,644	0,056	ns
Tor Paterno 18m	PO5-39	1	2,568	0,109	ns
Tor Paterno 18m	PO5-40	15	65,000	0,000	***
Tor Paterno 18m	PO5-49	6	26,000	0,000	***
Tor Paterno 18m	PO-15	Monomorphic			
Tor Paterno 18m	PO4-3	1	2,568	0,109	ns

Tabella 4.1c: Chi-Square Tests for Hardy-Weinberg Equilibrium. ns=not significant, * P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001

È stata condotta un'analisi della varianza molecolare (AMOVA) per determinare la suddivisione della varianza tra e all'interno delle diverse stazioni campionate. I dati rivelano che la maggior parte della varianza (56%, $P < 0,001$) è dovuta alla variazione intraindividuale ma una differenziazione significativa è presente anche tra i gruppi (29%, $P < 0,001$) e tra gli individui (15%, $P < 0,001$) (Fig 4.1a).

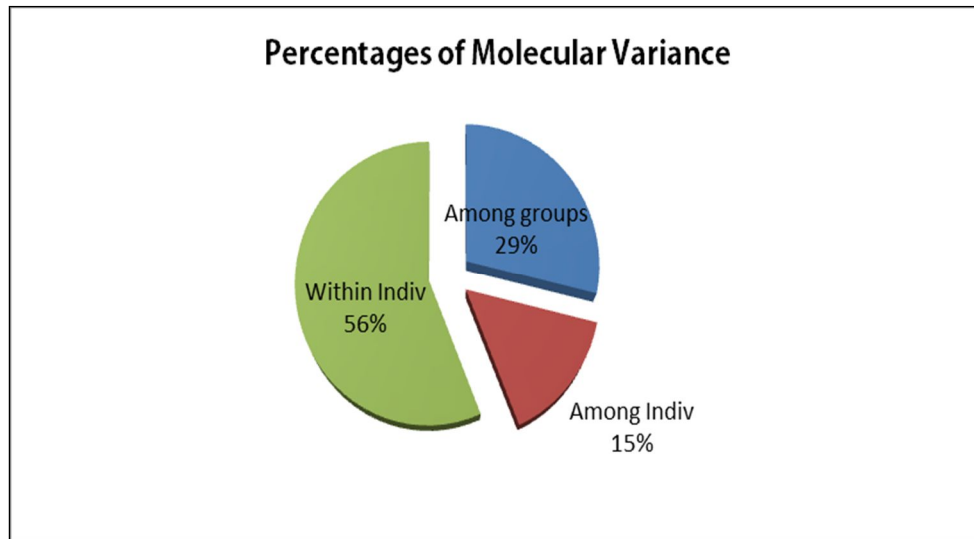


Fig. 4.1a: Risultati dell'analisi molecolare della varianza

La distanza genetica calcolata sulla base dell'indice di Nei (1972) (Tabella 4.1d) evidenzia una scarsissima differenza tra i siti di Chiarone e Murelle ad indicare un'unica prateria originaria frammentata in tempi recenti, probabilmente a causa dell'impatto antropico. La Prateria di Giannutri risulta geneticamente molto più simile alle praterie di Tor Paterno che a quelle di Chiarone e Murelle. Interessante è la differenza di pattern che si riscontra tra le praterie di Tor Paterno al variare della profondità, dove la diversità maggiore si ha a 26m.

Chiarone	Murelle	Giannutri	Tor Paterno 26m	Tor Paterno 18m	
0,000					Chiarone
0,019	0,000				Murelle
0,132	0,141	0,000			Giannutri
0,148	0,143	0,030	0,000		Tor Paterno 26m
0,136	0,164	0,078	0,090	0,000	Tor Paterno 18m

Tabella 4.1d: Indice della distanza genetica di Nei, F_{st} lungo la diagonale

Dati pregressi relativi alla zona esaminata sono stati difficili da reperire, tuttavia dalla letteratura è stato possibile risalire a dei dati relativi all'area di Civitavecchia (Arnaud-Haond et al., 2007; Serra et al., 2010) e sia il numero di alleli che H_o sono in linea con i dati estrapolati dal nostro studio. Ciononostante, va evidenziata la presenza di un'alta eterozigosi, associata con il sistematico e significativo eccesso di eterozigoti. Questo pattern suggerirebbe un vantaggio selettivo dell'eterozigote, che risulterebbe quindi meglio adattato alle condizioni locali. Questa ipotesi potrebbe sembrare in conflitto con la natura del marcatore utilizzato, dato che i microsatelliti sono considerati marcatori neutrali (Tautz e Renz 1984). In realtà studi recenti dimostrano che i loci microsatelliti possono essere collegati a regioni funzionali del genoma che sono selezionate a livello locale (Hämmerli e Reusch, 2003; Li et al., 2004).

4.2 Metalli pesanti

I metalli sono presenti nei suoli, nell'atmosfera, nelle acque e negli organismi viventi. Con la parola metalli tossici spesso si fa riferimento ai metalli pesanti che, dal punto di vista chimico, identificano una serie di elementi della tavola periodica che presentano una densità superiore ai 5 g/cm^3 , un numero atomico superiore a 20, sono caratterizzati da un comportamento cationico e sono costituiti da diversi stati di ossidazione.

Elementi chimici come Pb, Cd e Hg non sono essenziali per il metabolismo e pertanto determinano fenomeni di tossicità anche a bassissima concentrazione intracellulare. Altri elementi pesanti quali Fe, Cu, Zn, Co e Mn sono invece micronutrienti essenziali per il metabolismo (come attivatori o regolatori enzimatici); tuttavia il loro apporto eccessivo risulta estremamente tossico (Siedlecka, 1996; Bargagli, 1998).

Rispetto agli organismi vegetali un elemento può considerarsi:

- ❖ essenziale (quando è coinvolto nel metabolismo della pianta, che in sua assenza non può completare il suo ciclo vitale e la cui funzione non può essere svolta da altri elementi);
- ❖ benefico (l'elemento in questo caso non è indispensabile, ma migliora la crescita);
- ❖ tossico (anche se presente in basse concentrazioni riduce la crescita della pianta danneggiandone il metabolismo). Il concetto di tossicità non è assoluto, in quanto il grado di tossicità dipende dall'organismo e dalla concentrazione del metallo considerato.

Le proprietà chimico fisiche del suolo, sia esso terrestre che marino, fanno sì che i metalli in esso contenuti possano essere presenti in forme diverse:

- ❖ in soluzione (come ioni semplici o complessati nella soluzione circolante);
- ❖ legati alla sostanza organica;
- ❖ uniti in reticoli cristallini dei minerali primari;
- ❖ occlusi e coprecipitati (con ossidi, carbonati e fosfati);
- ❖ assorbiti con i costituenti di terreno inorganico.

I metalli pesanti nelle forme solubili e organiche sono quelli a maggiore mobilità e più biodisponibili, mentre le forme chimiche legate agli ossidi a basso ed elevato ordine cristallino sono più stabili e si mobilizzano solo in seguito ad eventi catastrofici, come una forte acidificazione del suolo. Le condizioni ambientali, il pH, il potenziale redox e la presenza di composti organici o inorganici hanno un ruolo fondamentale nella speciazione degli elementi, che a sua volta determina il loro destino nell'ambiente e in definitiva la loro biodisponibilità. I metalli pesanti presentano, infatti, una

forte affinità per i solfuri formando idrati insolubili oltre ad una forte attitudine a formare complessi.

Gli elementi che determinano più frequentemente fenomeni di inquinamento a causa dei loro molteplici impieghi a livello industriale sono: Pb, Cd, Cr e Ni.

In particolare, il Piombo viene utilizzato in numerose lavorazioni industriali e artigianali, viene estratto, fuso e impiegato nelle tecniche di saldatura, stagnatura e produzione di vernici e insetticidi. Esso non ha nessun ruolo essenziale nei processi metabolici delle piante ed arriva in mare soprattutto tramite l'atmosfera. Questa immissione a livello atmosferico ha un notevole peso in mari poco profondi e semi-chiusi come il Mediterraneo.

Altri elementi metallici da prendere in considerazione a causa della loro tossicità, sono il Cromo, impiegato nella produzione di leghe e nella cromatura galvanica; il Manganese, il Rame e lo Zinco, usati nella produzione di pile e leghe speciali.

L'assunzione dei metalli pesanti da parte delle piante, avviene principalmente attraverso il terreno in funzione della diversità delle forme chimiche, dove, diversi fattori fisici e ambientali ne influenzano l'assimilazione, condizionata dal pH, dal potenziale redox, dall'attività biologica, dalla sostanza organica e dalla capacità di scambio cationico del terreno.

La maggior parte delle sostanze inquinanti che si riversano nelle acque, è in grado di accumularsi negli organismi, data la natura prevalentemente idrofobica di tali sostanze che attraverso la rete trofica possono essere trasferite da un organismo all'altro subendo un progressivo aumento di concentrazione: tale processo è noto come biomagnificazione. I metalli inizialmente presenti nel terreno o nelle acque, si accumulano prima nelle piante, successivamente negli erbivori che se ne nutrono e più tardi nei carnivori (Conte et al., 2007).

Nelle piante l'assorbimento avviene attraverso le radici, nel caso di elementi presenti nel terreno o attraverso le foglie, per gli elementi presenti nell'atmosfera e giunti sull'apparato fogliare in seguito a deposizione di polveri o aspersione con acque irrigue inquinate e trattamenti vari.

La potenziale pericolosità che scaturisce dall'accumulo di metalli pesanti non dipende esclusivamente dal loro contenuto totale, ma dalla loro capacità di muoversi e di interagire con gli organismi viventi. Non tutte le forme chimiche dei metalli pesanti hanno la stessa mobilità, solubilità e potenziale tossicità, pertanto per definirne il rischio associato all'inquinamento e impostare interventi di bonifica è necessario quantificare le diverse forme geochimiche.

Il livello di tossicità è influenzato da diversi fattori: tipo di metallo e forma in soluzione, presenza di altri metalli o tossine, proprietà del suolo, condizioni ambientali e condizioni dell'organismo vegetale. Per quanto riguarda l'ambiente acquatico sono state approfondite le conoscenze sui diversi fat-

tori ambientali che possono influenzare l'accumulo nella specie vegetale, come: la stagionalità (Villares et al., 2002), la luce (Gorbi et al., 2001), la temperatura, la salinità e il pH (Gupta et al., 2001), la disponibilità dei nutrienti (Lee e Wang, 2001), la presenza dei metalli nell'acqua e nei sedimenti (Ligero, 2002) e il loro meccanismo d'azione sinergico o antagonistico (Rijstenbil e Gerringa, 2002). Tuttavia, data l'elevata variabilità naturale delle specie e dei parametri biotici/abiotici, i risultati delle analisi chimiche eseguite sulla matrice algale non sempre riflettono l'effettivo livello di inquinamento da metalli (Talarico, 2005). In generale, gli studi di biomonitoraggio, che prevedono il prelievo diretto di organismi da un ambiente potenzialmente alterato, difficilmente possono spiegare o dare indicazioni sulla tossicità di uno o più metalli e sulle possibili relazioni causa/effetto se non integrati con l'analisi di altri parametri (Burridge e Bidwell, 2002).

4.3 Analisi di metalli pesanti su campioni di *Posidonia oceanica*

Nel presente lavoro di tesi sono state effettuate analisi della concentrazione dei metalli (Cd, Pb, Cu, Cr, Ni) su foglie di *Posidonia oceanica* prelevati nel mese di Maggio e Giugno del 2014, per quattro siti del Tirreno settentrionale (Chiarone, Murelle, Giannutri e Tor Paterno) al fine di valutare il contenuto di ciascun metallo sulle praterie analizzate. Per saggiare l'effetto di tali metalli sulla singola pianta di *P. oceanica* e quindi sullo stato di salute dell'intera prateria, sono state effettuate anche indagini di tipo biochimico e molecolare: saggi dell'attività enzimatica ed espressione genica di geni noti in bibliografia per essere responsivi a stress specifici. L'utilizzo di questo tipo di tecniche ha come scopo quello di mettere a punto un protocollo di monitoraggio basato su un set di biomarcatori studiati in questi anni e risultati sensibili alla risposta a stress di tipo ossidativo, al legame con metalli pesanti e alla risposta a differenti condizioni luminose in cui la pianta vive. Quest'ultimo set di biomarcatori consente di avere un dato grezzo sulla torbidità delle acque in cui la prateria vive che però dovrebbe essere integrato con misure precise della PAR nella colonna d'acqua.

Nonostante la *Posidonia* sia riconosciuta a livello comunitario come descrittore partecipe nel caratterizzare la qualità dell'ecosistema in cui si trova, non sono ancora previste normative che disciplinano i limiti di concentrazione dei metalli pesanti. Il riferimento è perciò possibile solo con i dati presenti nella letteratura scientifica, tenendo comunque conto dei limiti previsti dai dettami ufficiali, in particolare relativi all'uso di acque destinate al consumo umano (D.Lgs. 31/2001), data la tossicità e la pericolosità che hanno alcuni elementi sulla salute umana.

Le concentrazioni di metalli rilevate sono espresse in mg/Kg (ppm). Le analisi effettuate sui campioni fogliari mostrano come il sito con una concentrazione maggiore di metalli totale sia quello di Giannutri, seguito dal sito delle Secche di Tor Paterno. I siti di Chiarone e Murelle presentano invece una contaminazione minore e molto simile tra loro (Fig. 4.3a).

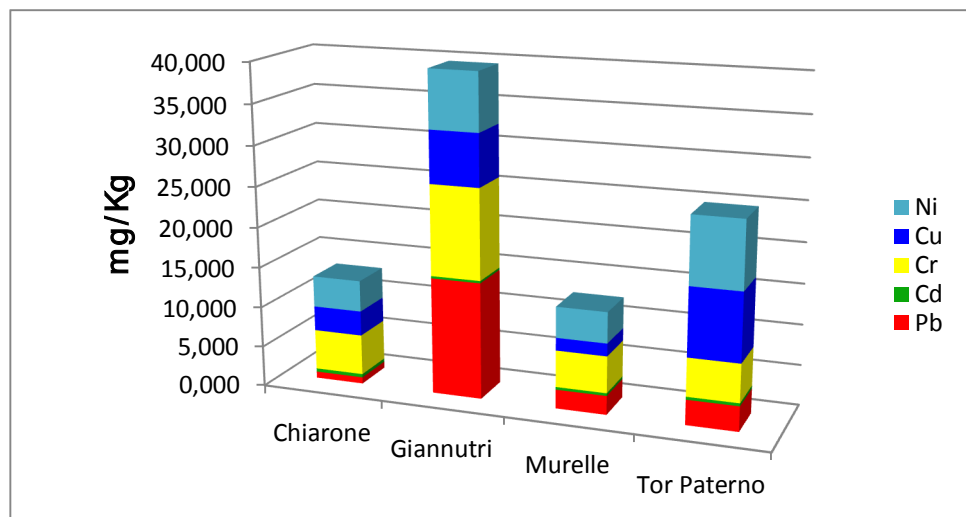


Fig. 4.3a: Quantità di metalli totali in mg/Kg (ppm) nei quattro siti studiati: Chiarone, Giannutri, Murelle e Tor Paterno.

I dati ottenuti per ciascun metallo analizzato (Tabella 4.3a) nei quattro siti sono relativi alla media \pm SD di tre replicati tecnici. Le differenze tra i siti sono state validate statisticamente tramite analisi della varianza (ANOVA) eseguita con il programma GraphPad 6.04.

Sito	Metallo				
	Pb	Cd	Cr	Cu	Ni
Chiarone	0,794 ± 0,084	0,421 ± 0,014	5,00 ± 0,030	3,067 ± 0,233	3,848 ± 0,069
Giannutri	14,439 ± 0,383	0,282 ± 0,004	11,232 ± 0,258	6,485 ± 0,039	7,165 ± 0,183
Murelle	2,345 ± 0,271	0,334 ± 0,003	4,524 ± 0,258	1,563 ± 0,104	3,840 ± 0,128
Tor Paterno	3,100 ± 0,105	0,360 ± 0,003	4,730 ± 0,021	8,455 ± 0,179	8,321 ± 0,042

Tabella 4.3a: Concentrazioni medie dei metalli (mg/Kg) nei campioni di foglia di *Posidonia oceanica*

Il sito di Giannutri presenta una forte contaminazione da Piombo ($14,439 \pm 0,383$ mg/Kg) e Cromo ($11,232 \pm 0,258$ mg/Kg), mentre negli altri siti esaminati tali metalli presentano concentrazioni più basse, in particolare il sito di Chiarone mostra un contenuto molto basso di Piombo ($0,794 \pm 0,084$ mg/Kg). Il differente contenuto di Pb tra i quattro siti è statisticamente significativo, mentre per il Cr si hanno differenze significative fra i siti di Murelle, Chiarone e Tor Paterno rispetto al sito di Giannutri, ma le differenze non sono statisticamente significative fra i tre siti su menzionati come mostrato negli istogrammi sottostanti (Fig. 4.3b; Fig 4.3c)

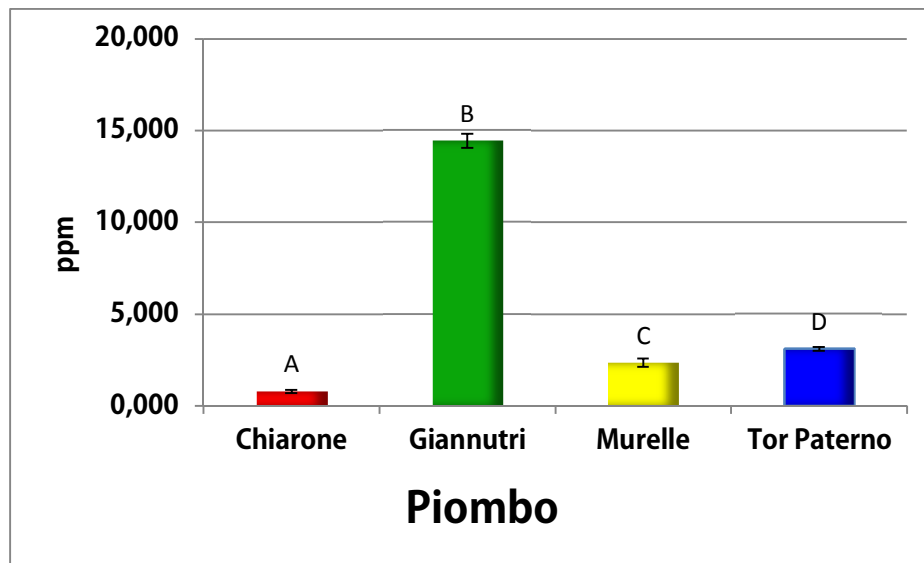


Fig. 4.3b: Concentrazione media di Piombo in foglie di *Posidonia oceanica*. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$)

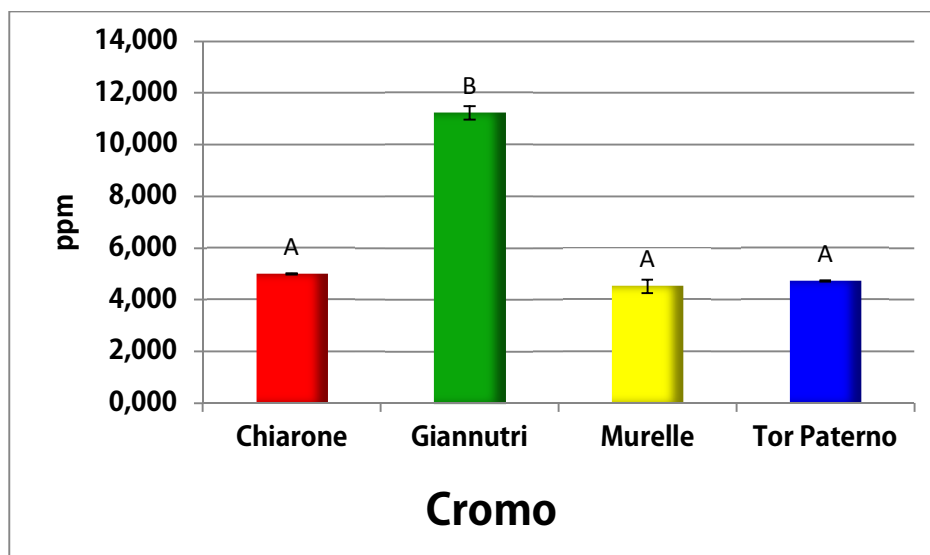


Fig. 4.3c: Concentrazione media di Cromo in foglie di *Posidonia oceanica*. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$)

Rame e Nichel sono presenti in notevole quantità nel sito di Tor Paterno ($8,455 \pm 0,179$ mg/Kg e $8,321 \pm 0,042$ mg/Kg, rispettivamente), al quale segue il sito di Giannutri ($6,485 \pm 0,039$ mg/Kg e $7,165 \pm 0,183$ mg/Kg, rispettivamente). I valori più bassi rispetto agli altri siti sono stati riscontrati nei siti di Murelle e Chiarone. Per quanto riguarda il Nichel i siti di Giannutri e Murelle non mostrano differenze statisticamente significative (Fig. 4.3d; Fig. 4.3e).

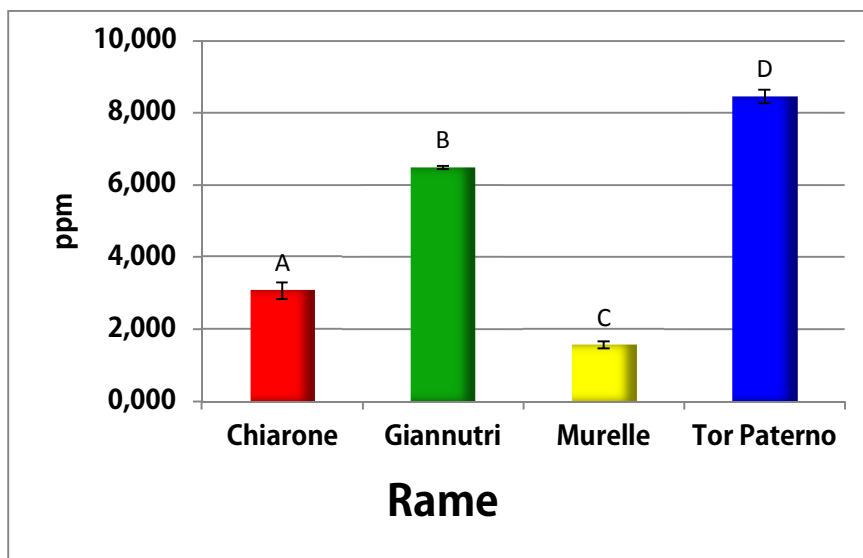


Fig. 4.3d: Concentrazione media di Rame in foglie di *Posidonia oceanica*. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$)

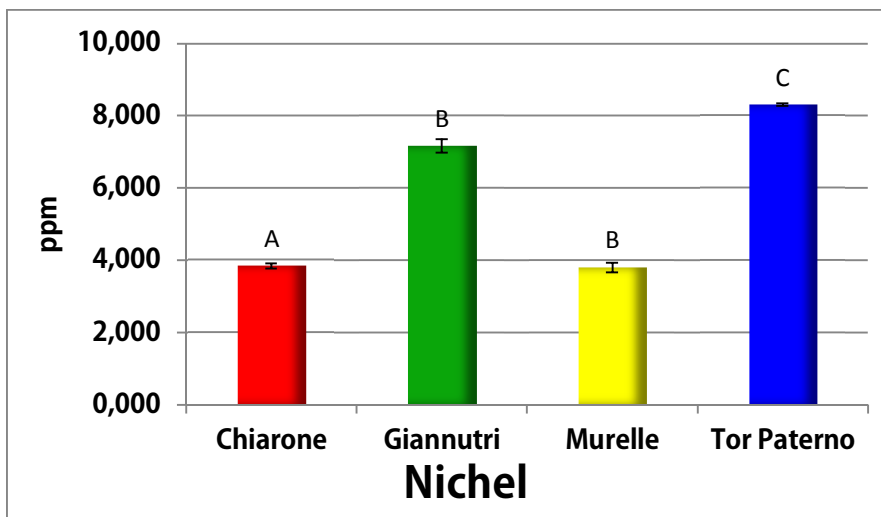


Fig. 4.3e: Concentrazione media di Nichel in foglie di *Posidonia oceanica*. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$).

Il Cadmio è presente con un ordine di grandezza inferiore rispetto agli altri metalli e il sito dove è stata registrata una presenza maggiore è quello del Chiarone ($0,421 \pm 0,014$ mg/Kg); in questo caso il sito di Giannutri è quello che presenta i valori più bassi (Fig. 4.3f).

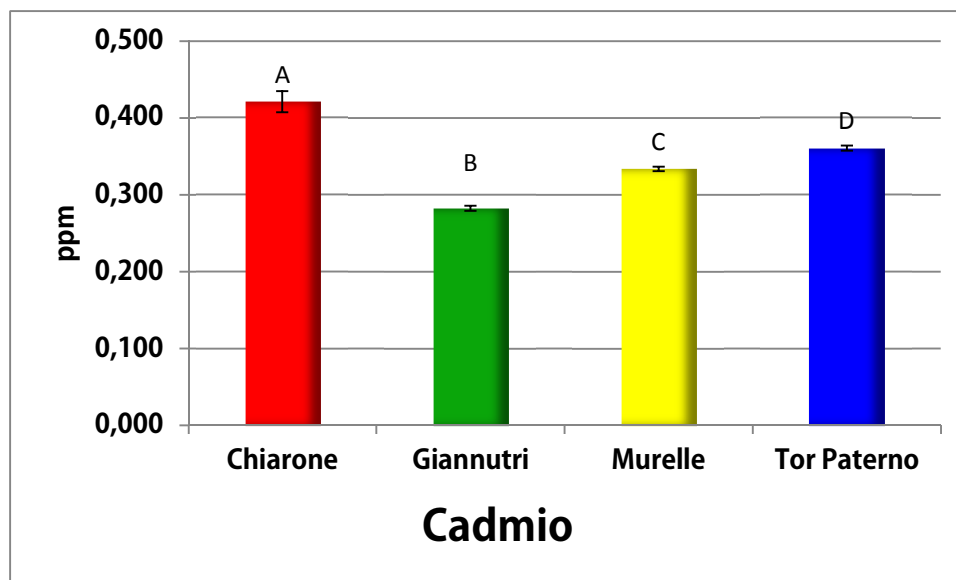


Fig. 4.3f: Concentrazione media di Cadmio in foglie di *Posidonia oceanica*. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$).

Alcuni autori hanno riportato che le macrofite marine, di cui la *Posidonia oceanica* fa parte, possono assorbire i metalli in due modi diversi: con un assorbimento diretto dall'acqua attraverso la superficie fogliare, oppure dal sedimento e dall'acqua interstiziale attraverso le radici (Brinkhuis et al., 1980).

In oltre è noto che l'assorbimento di Rame da parte delle macrofite avviene sia attraverso la lamina fogliare che attraverso l'apparato radicale, mentre l'assorbimento del Piombo e quello del Cadmio, sembra avvenire soprattutto attraverso la colonna d'acqua con processi passivi che dipendono dalla superficie fogliare esposta (Ward, 1989). Visto che le concentrazioni di Cadmio in *P. oceanica* riflettono quelle della colonna d'acqua e non del sedimento, l'uptake di Cadmio si verifica attraverso un processo passivo che dipende dalla superficie fogliare esposta e solo successivamente viene traslocato a rizoma e radici (Brinkhuis et al., 1980; Ward, 1989).

L'area mediterranea è caratterizzata da una mobilità relativamente scarsa delle acque; di conseguenza la debole dispersione degli inquinanti può aggravare l'impatto negativo delle sostanze tossi-

che e accelerare l'accumulo di metalli in tracce lungo le aree costiere, nelle vicinanze delle sorgenti contaminanti (Palanques e Diaz, 1995).

Nella tabella 4.3b sono riportate le concentrazioni espresse in mg/Kg dei metalli pesanti riscontrate nelle foglie di Posidonia tratti da alcuni dei lavori presenti in letteratura, riferite alla coste italiane e francesi. Facendo un raffronto con i valori da noi ottenuti e riportati in tabella 4.3a la concentrazione riscontrata per il Cd ricade nell'intervallo dei valori più bassi riportati in letteratura e al momento quindi questo metallo sembrerebbe non influenzare negativamente le praterie oggetto di studio; Ni e Cu presentano valori alti sia nel sito di Giannutri che in quello di Tor Paterno rispetto alle praterie di Murelle e Chiarone, i valori sono comunque mediamente più bassi rispetto a quelli riscontrati in altri lavori per altre zone di studio; il Cr presenta valori molto alti rispetto alla media in tutti e quattro i siti ed in particolare il sito di Giannutri è quello con il valore più alto; la concentrazione del Pb rientra nella media ad eccezione del sito di Giannutri che presenta valori molto alti.

Sito	Anno	Cd	Cu	Cr	Ni	Pb	Rif. Bibliografico
Calafuria (Livorno)	2009	2,92±0,07	17,5±6,5	0,15±0,11	15,1±3,7	2,5±1,35	De Biase et al., 2009
Corsica	2005	2,35		0,36	19,79	1,71	Lafabrie et al., 2008
Marsiglia (Francia)	2005	4,1		3,8		2,4	Warnau et al., 1995
Ischia	2005	2,1		1,67		8,35	Warnau et al., 1995
Coste Tir- reniche	2005	2,81					Taramelli et al., 1991
Livorno	2005	3,93±0,12		0,27±0,07	28,9±0,65		Lafabrie et al., 2007
Porto Tor- res	2004	2,10±0,10		0,20±0,06	1,80±0,03		Lafabrie et al., 2007
Ustica	2004		15,10±7,75			1,04±0,63	Conti et al., 2004

Tabella 4.3b: Concentrazioni in mg/Kg di foglie Posidonia tratte dalla letteratura.

4.4 Analisi dell'espressione genica e saggi di attività enzimatica

Nel mio lavoro di tesi sono state eseguite analisi di espressione genica e di attività enzimatica su campioni fogliari di *Posidonia oceanica* prelevati lungo il litorale laziale ed in particolare nei siti di Giannutri, Chiarone, Murelle e Tor Paterno al fine di verificare lo stato di salute di praterie che caratterizzano i quattro siti e, indirettamente, lo stato di salute delle acque.

Poiché è noto dalla letteratura che i metalli pesanti causano uno stress ossidativo negli organismi ad essi esposti, per ogni campione sono stati analizzati alcuni geni e relative proteine coinvolte nello scoppio ossidativo:

- Superossido dismutasi (SOD)
- Catalasi (CAT)
- Perossidasi (POX)
- Glutazione S-transferasi (GST)

Poiché dalla letteratura è noto che i metalli sono in grado di indurre l'espressione dei geni considerati, i dati ottenuti dalle analisi biochimiche e molecolari sono stati posti in relazione con i dati ottenuti sulla concentrazione di metalli per i medesimi campioni analizzati al fine di fornire una panoramica sullo stato di salute delle praterie esaminate.

Le analisi di espressione genica sono state effettuate in triplicati biologici, per ognuno dei quali sono stati effettuati tre replicati tecnici. Per poter integrare i dati ottenuti da esperimenti eseguiti su piastre differenti, in ogni piastra è stato inserito un calibratore, cioè un campione sempre identico in tutte le piastre.

Anche per i saggi di attività enzimatica sono state eseguite misurazioni su tre replicati biologici e rispettivi trireplicati tecnici.

Per confermare la validità dei risultati è stato eseguito l'ANOVA test, mentre per valutare la significatività relativa alle differenze di espressione e di attività tra i quattro siti è stato usato il test Siegel-Tukey, un test non parametrico. Il livello di significatività è stato fissato ad un valore massimo di $P < 0,05$. Le analisi sono state realizzate con il programma statistico GraphPadPrism 6.04.

4.4.1 SOD

La superossido dismutasi costituisce la prima linea di difesa contro i danni causati dai radicali liberi derivanti dall'ossigeno poiché agisce a monte della catalasi e della perossidasi, dismutando l'anione superossido in ossigeno e perossido d'idrogeno. Quest'ultimo a sua volta diviene il substrato di perossidasi e catalasi che lo trasformano in H₂O e O₂.

Il livello di espressione genica di SOD nei siti di Chiarone, Murelle e Giannutri risulta abbastanza alto e la differenza nei tre siti non appare significativa. I tre differiscono nettamente rispetto al sito di Tor Paterno che presenta invece un'espressione quasi nulla (Fig. 4.4.1a).

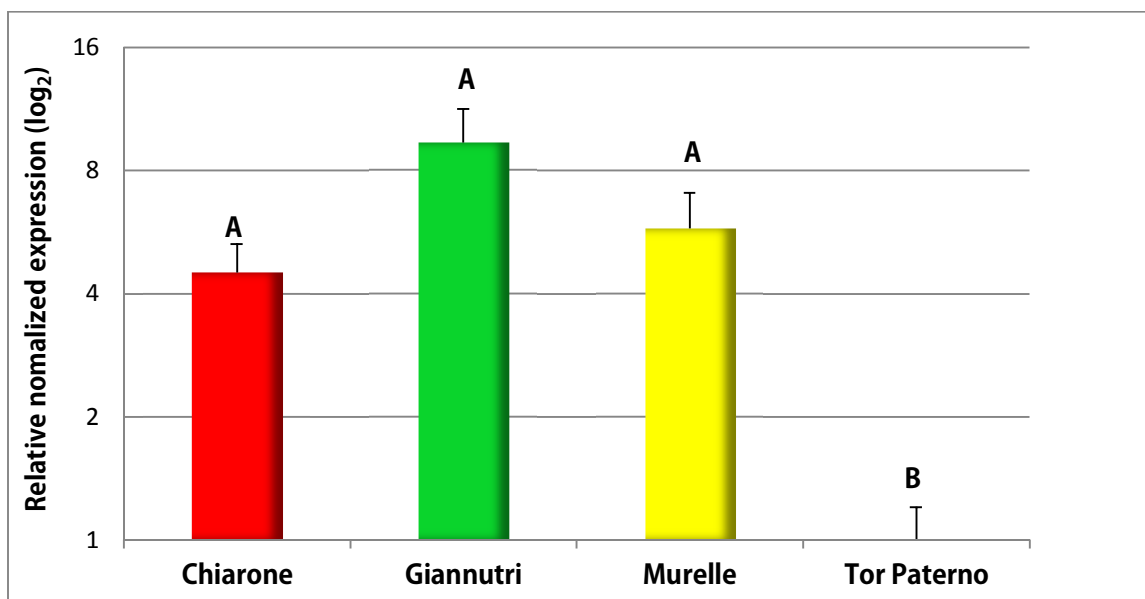


Fig. 4.4.1a: Espressione genica di SOD espressa in log₂. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: P < 0,01; Tukey post-test P < 0, 01).

La situazione è leggermente diversa nei risultati dell'attività enzimatica, espressa come IC₅₀ ossia µg di estratto proteico totale necessari per ridurre del 50% la formazione di formazano a partire dalla riduzione, mediata dall'anione superossido, di un sale di tetrazolio. Bassi livelli di IC₅₀, quindi, possono essere correlati ad un'alta concentrazione di SOD. A dispetto dei bassi livelli di espressione genica, il sito di Tor Paterno mostra un'attività enzimatica paragonabile a quella Giannutri e Chiarone, mentre Murelle è il sito con la più alta concentrazione di enzima attivo. Il risultato discordante per il sito di Tor Paterno tra l'attività enzimatica e l'espressione genica, dove quest'ultima è praticamente nulla, potrebbe essere dovuto a un RNA particolarmente labile con tempi di degradazione molto brevi (Fig. 4.4.1b; Tabella 4.4.1a).

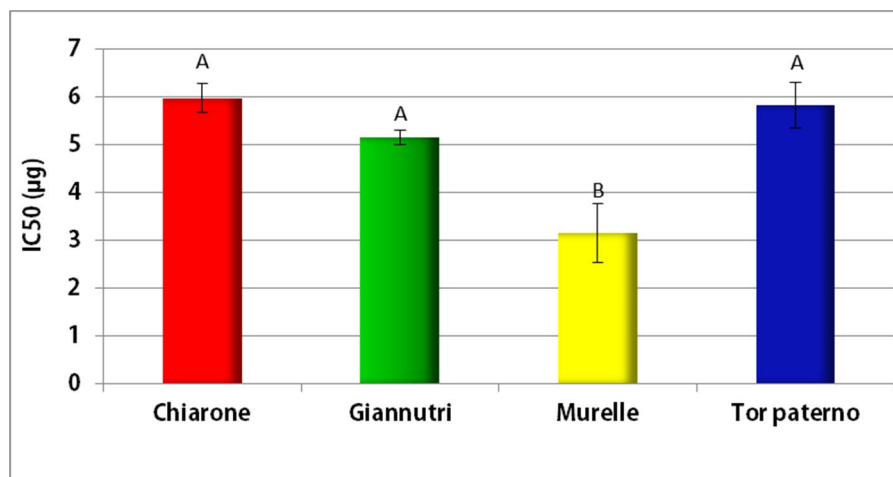


Fig. 4.4b: Attività enzimatica di SOD. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0, 001$).

	SOD	
	µg IC 50%	DS
Chiarone	5,985	±0,304056
Giannutri	5,16	±0,155563
Murelle	3,155	±0,615183
Tor Paterno	5,84	±0,480833

Tabella 4.4a: valori dell'attività enzimatica di SOD nei quattro siti e deviazione standard

In numerose piante acquatiche l'induzione di enzimi antiossidanti è stata proposta come un effetto indiretto della tossicità di alcune specie metalliche e composti organici. Nella pianta acquatica *Thalassia hemprichii* l'esposizione in acquario a Zinco e Cadmio determina un aumento dell'attività di SOD, mentre l'esposizione a Piombo e Rame comporta una diminuzione di tale enzima (Lei et. al, 2012).

Un'altra pianta acquatica, *Vallisneria natans*, considerata un ottimo bioaccumulatore, mostra un elevato incremento dell'attività di SOD se trattata con 75 mM di Piombo in un esperimento della durata di sei giorni (Wang, 2012). L'attività di SOD in *Hydrilla verticillata* mostra un andamento dose-tempo dipendente in piante trattate con una concentrazione di Rame che va da 0 a 25 µM per un periodo di esposizione di una settimana. In questo caso l'attività di SOD è stata monitorata al primo, secondo, quarto e settimo giorno di esposizione per le tutte le differenti concentrazioni di metallo saggiate (0 µM; 0,1 µM; 5 µM; 25 µM). L'attività di SOD mostra subito un lieve aumento già a scarse concentrazioni di metallo (0,1 µM), il picco massimo dell'attività si ha alla concentra-

zione maggiore (25 μM) per un tempo di esposizione di due giorni. L'attività enzimatica resta direttamente proporzionale alla concentrazione del metallo fino ad un'esposizione di quattro giorni se pur con una attività inferiore rispetto al tempo precedente. Si ha invece un effetto inibitorio al settimo giorno, all'aumentare della concentrazione di metallo. (Srivastava et. al, 2006).

I dati in nostro possesso, relativi alla quantità di metalli presenti nelle lamine fogliari di *Posidonia oceanica* (Tabella 4.3a), possono spingerci ad ipotizzare che l'elevata quantità di Cu combinata all'azione sinergica di altri metalli (la cui concentrazione può aumentare o diminuire) possano portare ad una diminuzione relativa dell'attività enzimatica rispetto al sito di Murelle dove invece la concentrazione del Cu è molto bassa. A differenza dei saggi effettuati in condizione controllate in acquario, non siamo in grado di stabilire la durata e l'entità di esposizione, nè l'effetto del singolo metallo o della combinazione di alcuni di essi. Quello che possiamo ipotizzare è che la quantità di Cu in Murelle possa essere tale da consentire una risposta difensiva della pianta, mentre nelle altre praterie interverranno altri meccanismi di difesa.

4.4.2 CAT

Relativamente al gene codificante per la catalasi, le analisi di espressione genica non mostrano differenze statisticamente significative nei quattro siti esaminati, se pur Murelle sembra comunque avere un'espressione maggiore rispetto agli altri. Le elevate deviazioni standard derivanti dall'esperimento probabilmente non consentono di attribuire una differenza statisticamente significativa tra i siti analizzati (Fig 4.4.2a).

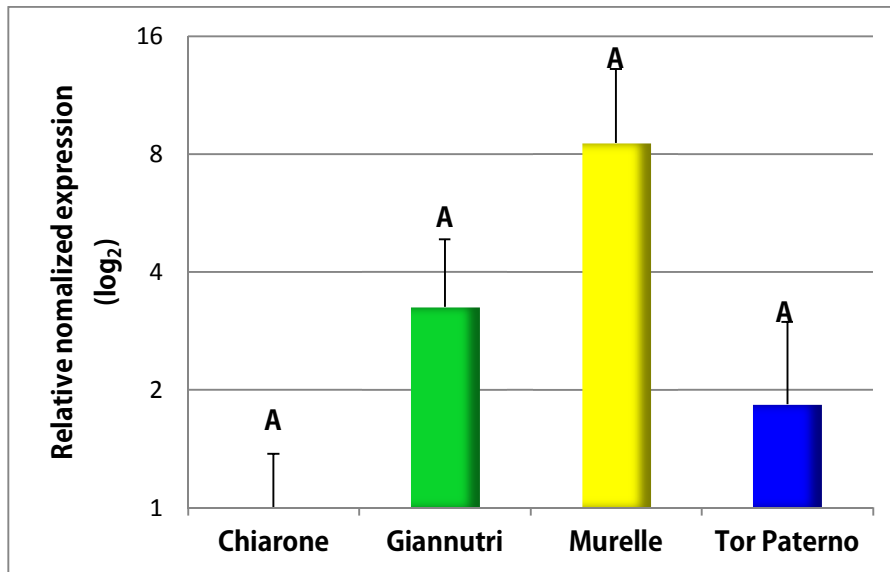


Fig. 4.5.1a: Espressione genica di CAT espressa in log₂. Lettere uguali indicano differenze non statisticamente significative.

L'analisi dell'attività enzimatica mostra invece una netta attività per il sito di Murelle (Fig. 4.4.2b; Tabella 4.4.2a)

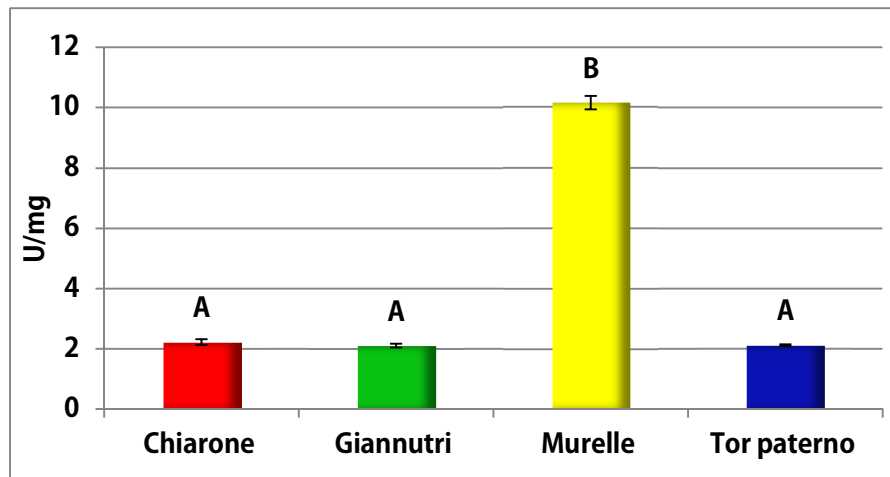


Fig. 4.4.2b: Attività enzimatica di CAT. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0, 001$).

	CAT	
	U/mg	DS
Chiarone	2,225	$\pm 0,091924$
Giannutri	2,105	$\pm 0,06364$
Murelle	10,16	$\pm 0,226274$
Tor Paterno	2,1175	$\pm 0,024749$

Tabella 4.5a: Valori dell'attività enzimatica espressa in U/mg nei quattro siti e deviazione standard

La Catalasi, in altre piante acquatiche, mostra un'attività dose-tempo dipendente con un massimo di attività a due giorni di esposizione per concentrazioni di Rame pari a $1 \mu\text{M}$, per poi essere inibita fortemente all'aumentare del tempo e della dose di esposizione, mostrando al 7^{mo} giorno una attività al disotto del campione di controllo ad una contrazione di $25 \mu\text{M}$ (Srivastava et. al, 2006). Un comportamento simile è stato studiato in altre piante acquatiche esposte a Piombo e Zinco, dove dapprima viene registrata un'elevata attività della catalasi, che però poi va a diminuire con il perdurare dell'esposizione o con l'aumentare delle concentrazioni di metalli utilizzati (Wang et al., 2009; 2012).

È pertanto ipotizzabile che il sito di Murelle presenti una concentrazione di metalli tale da consentire l'attivazione dell'enzima, mentre nei siti di Giannutri e Tor Paterno la quantità di Pb e Cu è talmente alta da inibire l'azione dell'enzima. Dalla letteratura non è noto l'effetto di Ni e Cr sull'attività di CAT, anche se sono presenti in elevate quantità nei siti di Giannutri e Tor Paterno.

La bassa attività di Chiarone, che presenta un livello di metalli molto simile al sito di Murrelle, potrebbe essere messa in relazione con una maggiore attività della Perossidasi nel medesimo sito.

4.4.3 POX

In merito all'espressione del gene codificante la perossidasi, che interviene a valle di SOD con una maggiore affinità per H_2O_2 rispetto alla Catalasi, notiamo come anch'esso sia maggiormente espresso nel sito di Murelle (Fig. 4.4.3a).

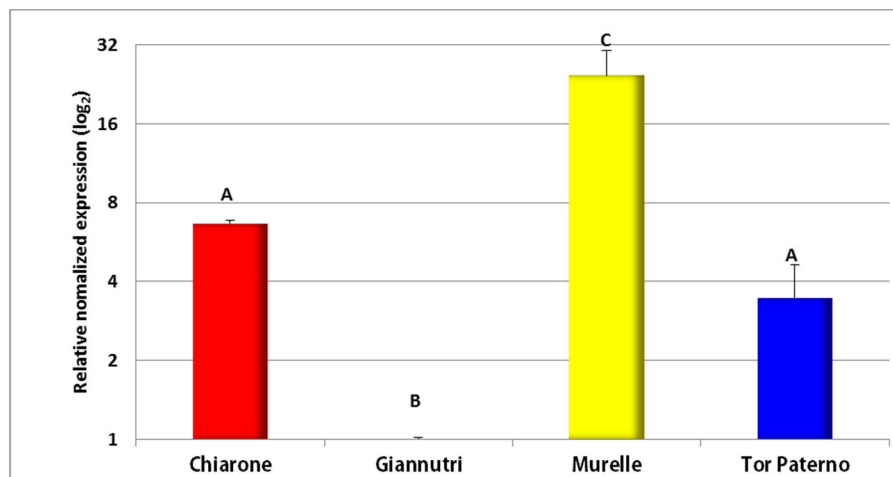


Fig. 4.4.3a: Espressione genica di POX espressa in \log_2 . Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,001$; Tukey post-test $P < 0,001$).

Tale risultato si abbina perfettamente con i dati di attività enzimatica relativi all'ascorbato perossidasi (APX) Fig 4.4.3b, ma non a quelli della guaiacolo perossidasi (GPX) Fig 4.4.3c, tabella 4.4.3a. Ciò è dovuto al fatto che i *primers* utilizzati per l'amplificazione del gene sono stati costruiti su una sequenza putativa di perossidasi e non sono in grado di discriminare fra le varie isoforme di perossidasi presenti invece nella cellula.

Più anomalo è il risultato relativo al sito di Giannutri dove, ad una minima espressione genica si abbina una discreta attività enzimatica sia di APX che GPX.

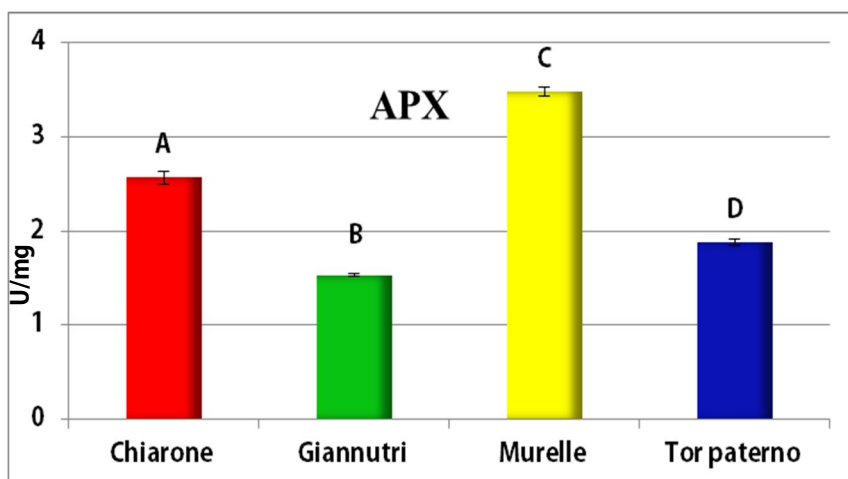


Fig. 4.4.3b: Attività enzimatica di APX. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0,0001$).

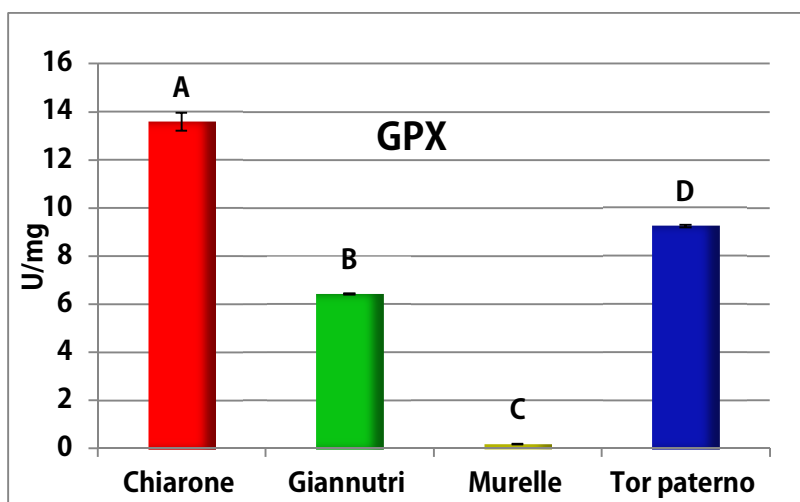


Fig. 4.4.3c: Attività enzimatica di GPX. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0,0001$).

	APX		GPX	
	U/mg	DS	U/mg	DS
Chiarone	2,568	0,071021	13,59	±0,367696
Giannutri	1,53	0,014142	6,42	±0,028284
Murelle	3,48	0,042426	0,19	±0,014142
Tor Paterno	1,88	0,028284	9,26	±0,056569

Tabella 4.4.3a: Valori dell'attività enzimatica di APX e GPX in U/mg e deviazione standard.

Come per gli enzimi analizzati fino ad ora in altre piante acquatiche, anche APX e GPX presentano un andamento dose-tempo dipendente sia in presenza di Rame (Srivastava et al., 2006) che di Cromo, Alluminio, Zinco (Bucalossi et al., 2006) e Cadmio (Lei et al., 2012), con un'inibizione dell'attività all'aumentare dei tempi e della dose di esposizione. In alcune piante terrestri come Abete rosso sembra che l'azione combinata di Nichel e Cadmio porti ad un aumento dell'attività perossidasi, soprattutto a lungo termine (15-30 giorni) (Rodotic et al., 2003).

Gli elevati livelli di Cu e Ni nei siti di Giannutri e Tor Paterno potrebbero giustificare i più bassi livelli di espressione genica e di attività enzimatica in questi siti rispetto agli altri.

4.4.4 GST

Relativamente al gene codificante per la glutatione-S-transferasi, le analisi di espressione genica hanno evidenziato come il sito con l'espressione maggiore sia sempre quello di Murelle, seguito dai siti di Tor Paterno, Chiarone e Giannutri che presenta l'espressione minore (Fig.4.4.4a).

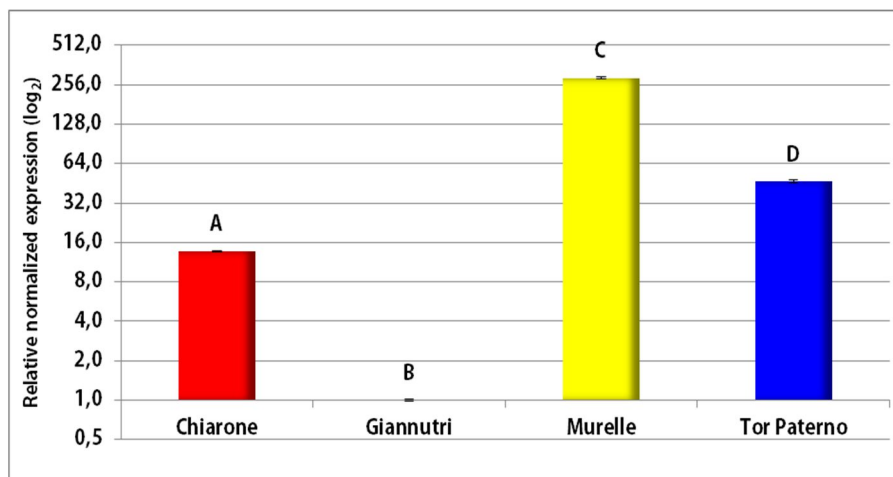


Fig. 4.4a: Espressione genica di GST espressa in log₂. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0,0001$).

I dati relativi all'attività enzimatica, se pur molto bassa, seguono l'andamento dell'espressione genica (Fig. 4.4.4b, tabella 4.4.4a). L'attività estremamente bassa della GST potrebbe essere messa in relazione al fatto che il GSH, il substrato dell'enzima, è un precursore delle fitochelatine (PC), oligopeptidi con funzione di chelare i metalli pesanti. Il GSH quindi, mobilitato verso la via di sintesi delle fitochelatine potrebbe divenire indisponibile per la GST, causandone una diminuzione dell'attività.

L'induzione di PC risponde alla presenza di elevate concentrazioni di metalli che sono causa di stress ossidativo e sembra essere un meccanismo di protezione rapida che viene attivato al minimo segnale di perossidazione lipidica (Toppi et al., 1998) o prima che la catalasi possa esplicare la sua azione antiossidante. In alcune piante superiori, un maggior accumulo di PC è stato rilevato appena 5 minuti dopo l'esposizione al Cadmio (Robinson et al., 1988). Nel nostro studio, i livelli di Cd risultano estremamente bassi e inferiori rispetto ai livelli di inquinamento da Cd riportati in altri studi (Tabella 4.3a) per cui l'induzione delle PC verosimilmente potrebbe essere messa in relazione ad altri metalli (Pb, Cr, Cu, Ni), possibilmente con modalità dose-tempo dipendente.

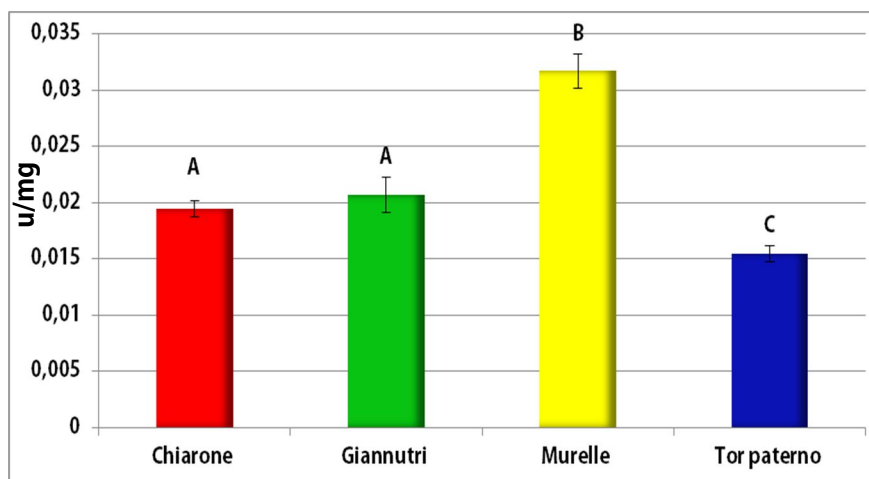


Fig. 4.4.4b: Attività enzimatica di GST. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0,001$).

	GST	
	U/mg	DS
Chiarone	0,0195	$\pm 0,000707$
Giannutri	0,0207	$\pm 0,001528$
Murelle	0,0317	$\pm 0,001528$
Tor Paterno	0,0155	$\pm 0,000707$

Tabella 4.4.4a: Valori dell'attività enzimatica di GST in U/mg e deviazione standard.

4.5 Metallotioneine e Metiltrasferasi

Le metallotioneine (MT) permettono di complessare molti metalli e principalmente Zinco, Rame e Cadmio. La loro espressione è indotta dai metalli per attivazione della trascrizione genica (Cobbett, 2000). MT sono piccole proteine (<10 kDa) ricche di cisteina (Cys) e impiegate dalla cellula nella disintossicazione da metalli pesanti (Cobbett e Goldsbrough, 2002; Huang e Wang., 2010), ma anche in risposta allo stress (recensione in Haq et al., 2003) e nella regolazione dello sviluppo (Zhi-gang et al., 2006; Yuan et al., 2008). In particolare, per quanto riguarda la risposta allo stress, le MT potrebbero svolgere un ruolo nello scavenging dei ROS (Akashi et al., 2004; Mir et al., 2004; Wong et al., 2004) e la protezione contro la salinità (Zhou et al., 2005; Jin et al., 2006; Quan et al., 2007; Nishiuchi et al., 2007; Xue et al., 2009; Yang et al., 2009).

Le MT-2b sono principalmente espresse nelle foglie, negli stami e nei fiori (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Nel presente lavoro tutte le analisi effettuate fino ad ora sono relative alla foglia per cui come biomarcatore è stato scelto proprio questo gene.

Il livello di espressione del gene codificante per le metallotioneine di tipo 2b (MT-2b) mostra un'elevata espressione nel sito di Murelle, seguendo il trend mostrato fino ad ora dagli altri bioindicatori, mentre nessuna differenza significativa è stata evidenziata negli altri tre siti esaminati (Fig.4.5a). Date le basse concentrazioni di Cd rilevate nei quattro siti, probabilmente l'induzione del gene MT-2b in Murelle è dovuto ai bassi livelli di Cu, che negli altri siti potrebbe avere un effetto inibitorio in sinergia ad altri metalli, che presumibilmente operano con un meccanismo dose-tempo dipendente. Non abbiamo purtroppo dati relativi alla concentrazione di Zinco nei quattro siti esaminati.

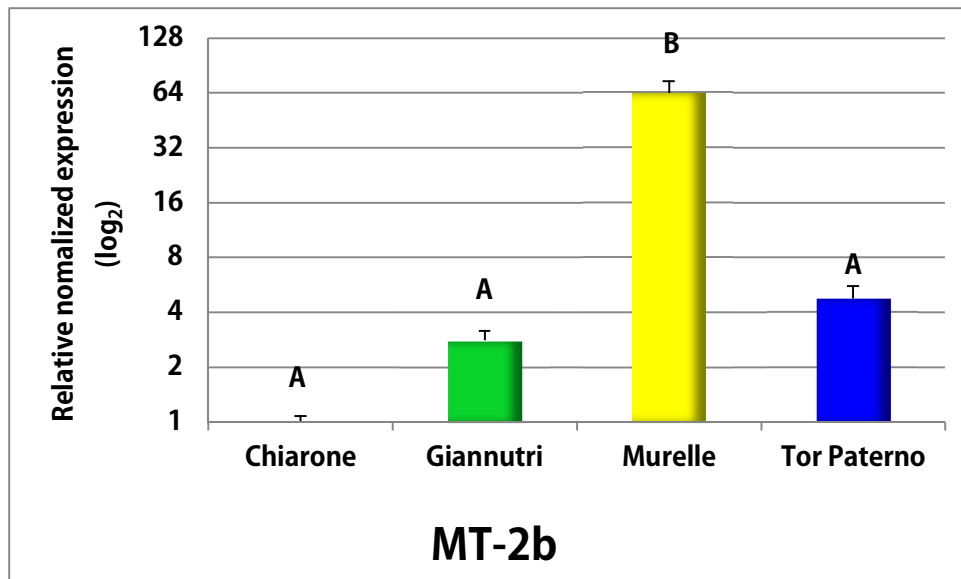


Fig. 4.5a: Espressione genica di MT-2b espressa in log₂. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0,001$).

In piante di *Posidonia oceanica* esposte a differenti concentrazioni di Cd (10 μM e 50 μM) al secondo giorno di esposizione è stata osservata una ipermetilazione del DNA Cd-indotta e una sovra espressione delle CMT associate a un pattern nucleare specifico di metilazione del DNA e a cambiamenti nella struttura della cromatina (Greco et al., 2012).

In questo studio il gene codificante per le cromometilasi (CMT) non mostra differenze significative nei quattro siti (Fig 4.5b), probabilmente le basse concentrazioni di Cd presente nei siti esaminati non sono tali da attivare una risposta rilevante di CMT che verosimilmente presenta un'attività elevata a concentrazioni di Cd molto più elevate.

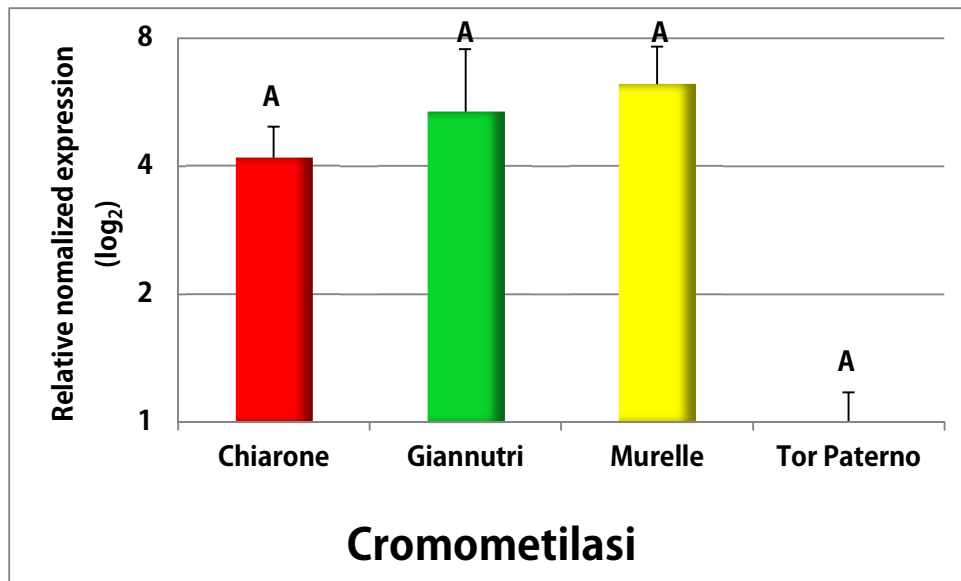


Fig. 4.5b: Espressione genica di CMT espressa in log₂. Lettere differenti uguali rappresentano differenze non significative.

4.6 Geni responsivi alla luce (CHLP, RuBisCO, Citocromo c ossidasi, Pep)

Attualmente una delle cause primarie di regressione delle praterie è legata ad un aumento della torbidità delle acque, la quale può essere causata anche da un aumento di nutrienti, che può influenzare quindi la qualità e la quantità della luce che raggiunge le foglie (Duarte et al 2004; Orth et al., 2006). La velocità con cui le condizioni ambientali cambiano richiede alle differenti specie un'elevata plasticità nella risposta adattativa, in particolare quando queste non possono spostarsi facilmente. Verosimilmente potremmo aspettarci che *P. oceanica* mostri differenze nella risposta adattativa e nella modulazione dell'espressione genica tra le popolazioni presenti in diverse aree del Mediterraneo, dove è stata osservata una struttura genetica forte (Arnaud-Haond et al 2007; Serra et al 2010).

In questo lavoro di tesi non è stato possibile misurare direttamente la PAR della colonna d'acqua né la Chl a; comunque, facendo riferimento a dati presenti in letteratura relativi ai biomarcatori selezionati in questo studio e correlandoli con i dati raccolti fino ad ora è stato possibile avere un quadro generale su quelle che potrebbero essere le praterie più disturbate anche dal punto di vista della qualità e quantità di luce.

La risposta di *P. oceanica* alla disponibilità di luce, per le praterie analizzate in questo studio, è stata analizzata con i seguenti marcatori: Geranilgeranil reduttasi (CHL P), Citocromo c Ossidasi (CcOx), Peptidasi Putativa (PeP), Ribuloso 1,6-Bisfosfato Carbossilasi/Ossigenasi (RuBisCO).

Il gene CHL P codifica per una proteina con un ruolo metabolico multifunzionale che è strettamente associata con la differenziazione e la protezione del cloroplasto (Keller et al., 1998). In *Posidonia oceanica*, PoCHL P è espressa principalmente nelle praterie più perturbate e aumenta in condizioni di scarsa disponibilità e qualità di luce (Bruno et al., 2010).

Il gene CHL P è coinvolto nella biosintesi di tocoferoli e della clorofilla, la cui espressione nel floema potrebbe essere collegata ad un ruolo proposto per il tocoferolo nel regolare la traslocazione dei fotoassimilati attraverso la modulazione di continuità simplastica tra la guaina dei fasci vascolari e lo stoccaggio di carboidrati nel rizoma (Pirc, 1965; Maeda e dellaPenna, 2007).

Nel nostro studio il sito di Murelle è quello che mostra una forte induzione del gene CHL P rispetto agli altri siti che mostrano invece un'attività minima (Fig.4.6a).

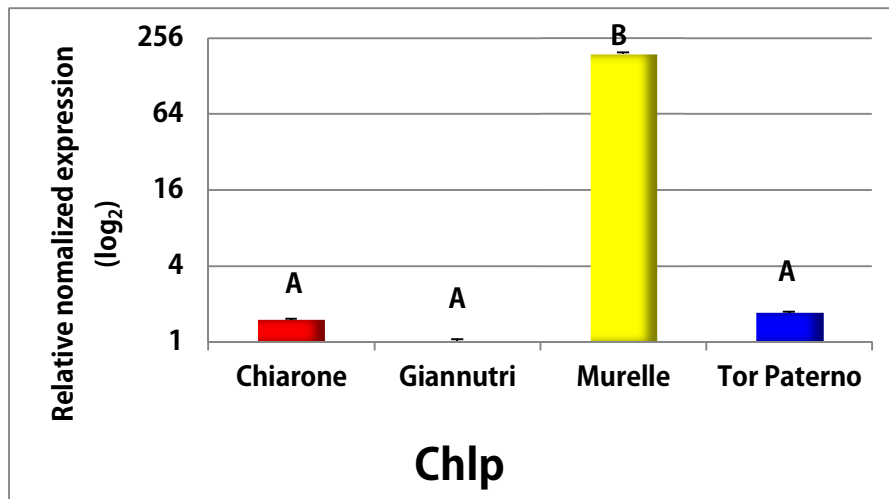


Fig. 4.6a: Espressione genica di Chl P espressa in log₂. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0,0001$).

In condizioni di fotolimitazione la *P. oceanica* è in grado di adattarsi metabolicamente aumentando la lisi delle proteine di membrane e del complesso antenna *down*-regolando la RuBisCO (Wissler et al., 2011).

In questo studio il gene codificante per la RuBisCO (large-subunit) (Fig.4.6b) presenta livelli di espressione molto bassi e nessuna differenza significativa tra i quattro siti. Questo può essere dovuto al fatto che i siti catalitici della RuBisCO si inattivano molto rapidamente in condizione di stress rendendo l'attività e quindi anche l'espressione di questo gene quasi nulla, come riscontrato anche in letteratura (Parry et al., 2003). L'estrema sensibilità alla variazione di molti parametri ambientali non la rende un buon biomarker, soprattutto in un sistema così mutevole come quello marino dove intervengono molteplici fattori contemporaneamente (temperatura, luce, salinità, pH).

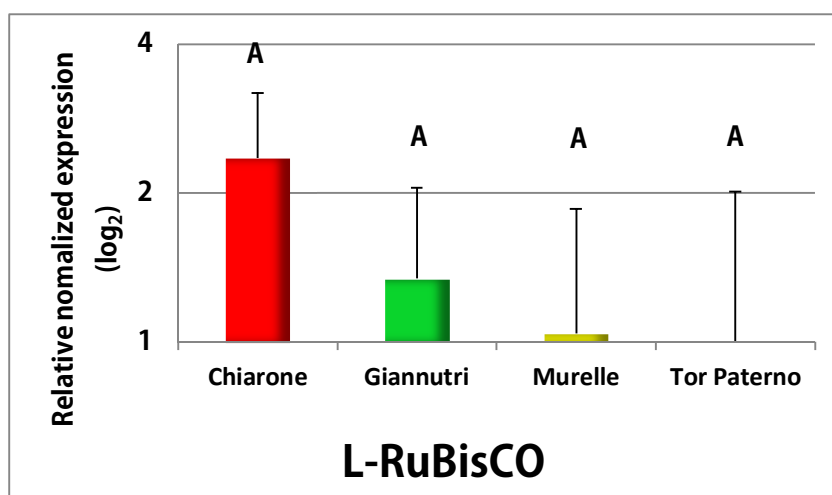


Fig. 4.6b: Espressione genica di L-Rubisco espressa in \log_2 . Lettere differenti uguali rappresentano differenze non significative.

La Citocromo c ossidasi (CcOX), catalizza la reazione di ossido-riduzione che necessita di citocromo ridotto e ossigeno molecolare per generare citocromo ossidato e acqua. La Citocromo c ossidasi partecipa anche alla conversione di energia e alla sintesi di ATP attraverso una traslocazione protonica accoppiata. L'unità minima di funzionamento contiene due gruppi eme e due atomi di rame.

I dati relativi a CcOx mostrano come questo gene sia *up*-regolato in Murelle dove, verosimilmente, la scarsa disponibilità di luce induce un aumento del catabolismo proteico (Dattolo et al.; 2013) (Fig. 4.6c).

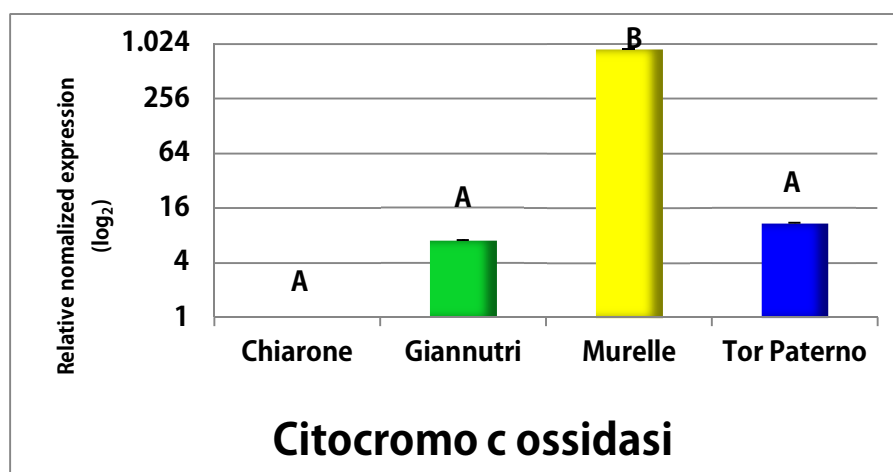


Fig. 4.6c: Espressione genica di CcOX espressa in \log_2 . Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0,0001$).

Dai dati presenti in letteratura, il gene codificante per PeP, una putativa proteasi, mostra una correlazione positiva in condizioni di scarsa luminosità, suggerendo un aumento del catabolismo proteico in queste condizioni (Serra et al., 2012). Nel presente lavoro sia i siti di Murelle che di Tor Paterno presentano un elevato livello di espressione di PeP, a differenza dei dati ottenuti con gli altri geni dove Tor Paterno mostrava un livello di espressione sempre estremamente basso. Anche se questo gene si mostra responsivo a differenti profondità e la prateria di Tor Paterno si trova ad una profondità di 18/20 m rispetto ai 14/15 m delle altre tre, tale differenza probabilmente non è sufficiente a giustificare gli alti livelli di espressione di questo gene. Il sito di Giannutri, invece, così come per CHL P, mostra un'attività quasi nulla (Fig. 4.6d).

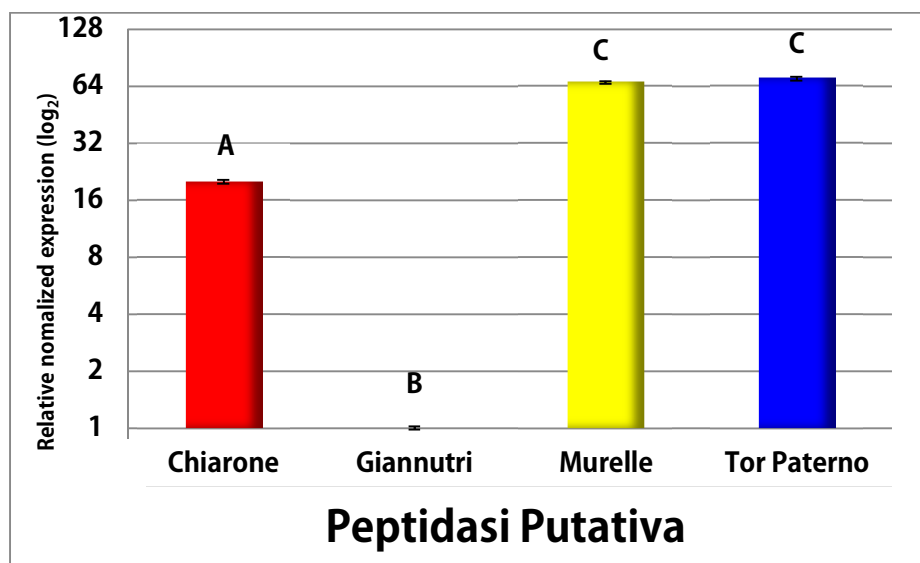


Fig. 4.6d: Espressione genica di PeP espressa in log₂. Lettere differenti rappresentano differenze significative (ANOVA: $P < 0,0001$; Tukey post-test $P < 0,0001$).

5. Conclusioni

Come ben descritto nella Dir. 2000/60/CE (recepita in Italia con D.Lgs. 152/06) la fanerogama marina *Posidonia oceanica* è un buon indicatore della qualità ambientale, grazie alla sua capacità di bioaccumulo e per le sue caratteristiche viene considerata uno degli elementi indicatori della qualità biologica da utilizzare per la classificazione dello stato ecologico delle acque marino-costiere.

Le praterie a *P. oceanica* costituiscono la “comunità climax” del Mediterraneo, ovvero il massimo livello di sviluppo e complessità che un ecosistema possa raggiungere. Nell’ultimo decennio le praterie di tutto il Mediterraneo stanno andando incontro ad un costante fenomeno di regressione causato dall’incremento delle pressioni antropiche a livello delle aree costiere.

Da alcuni anni a questa parte uno dei metodi utilizzati per indagare lo stato di salute delle praterie di *P. oceanica* è la stima del livello di variabilità genetica e la struttura della prateria. Di uso comune è l’assunto che ad una prateria in salute corrisponda un grado di variabilità genetica elevato. Questo tipo di analisi dipende dal tipo di marcatore scelto, ma soprattutto necessita di un elevato numero di individui su una vasta area affinché i dati ottenuti abbiano rilevanza statistica.

Praterie con un basso livello di diversità genica possono essere più a rischio di estinzione se le condizioni ambientali cambiano in maniera repentina e significativa. Dai risultati emersi in questo studio possiamo desumere come le praterie di Chiarone e Murelle siano un mosaico di un’unica prateria originaria, mentre nella prateria di Tor Paterno troviamo differenze significative tra le due profondità in un’area relativamente piccola, nonostante il sito non presenti reali barriere ecologiche che giustificano questo dato. Per quanto riguarda le praterie di Tor Paterno è ipotizzabile un isolamento riproduttivo legato alla profondità: a differenti profondità corrispondono variazioni di temperatura e penetrazione della luce nella colonna d’acqua. Il cambiamento di queste condizioni potrebbe portare ad uno spostamento della fioritura a differenti profondità. Un altro aspetto è la densità delle praterie; più questa è densa più risulta difficile l’attecchimento di nuove plantule trasportate dalle correnti nel core della prateria, le zone più accessibili sono quelle marginali, ma sono anche quelle sottoposte a maggiori impatti.

I risultati descritti in questa tesi hanno importanti implicazioni per la conservazione e il restauro, evidenziando come le popolazioni più frammentate siano quelle più minacciate dai cambiamenti

climatici e dall'aumentare dell'impatto antropico. Studi sulla struttura genetica delle praterie potrebbero essere utilizzati anche per la localizzazione delle popolazioni di donatori idonei ai fini di eventuali reimpianti.

Il crescente aumento dell'attività umana ha portato a un notevole cambiamento in quello che è l'ecosistema costiero e ha reso necessario l'individuazione di descrittori efficaci, in grado di definire quello che è lo stato di salute delle praterie di *P. oceanica*.

Il biomonitoraggio è un'attività dispendiosa in termini di tempo e la scelta appropriata di indicatori è fondamentale. Questo lavoro rappresenta un contributo alla questione complessa e rilevante di monitoraggio della *P. oceanica* e getta le basi per la creazione di un protocollo di monitoraggio mirato.

Dai dati ottenuti dall'analisi dei metalli pesanti a livello fogliare, vediamo come il sito di Giannutri presenti contaminazioni molto elevate di Pb e Cr, ma anche di Cu e Ni, questi ultimi secondi solo al sito di Tor Paterno. I siti di Chiarone e Murelle hanno un andamento piuttosto simile, ad indicare una storia comune, fatta eccezione per il Cu che in Murelle presenta valori molto bassi.

Dai risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica e dell'attività enzimatica, il sito di Murelle sembra quello più attivo a livello di risposte sia genica che enzimatica a stress di tipo ossidativo. L'unico metallo che è presente sempre in quantità diverse in tutti e quattro i siti e che in Murelle è più basso è il Cu, il che ci spinge ad ipotizzare come un'eccessiva quantità di tale metallo possa avere effetto inibitorio su i biomarcatori responsivi agli stress indotti principalmente da metalli. Gli altri metalli che spesso sono presenti anche in quantità elevate per alcuni siti in altri sono presenti in quantità molto simili, per cui non ci hanno permesso di legare la risposta del biomarcatore ad una condizione peculiare del singolo sito. Non sappiamo però i tempi e le quantità di tolleranza della pianta, né se ci siano effetti sinergici tra l'interazione di più metalli.

I dati estrapolati da questo lavoro e raffrontati con quelli già presenti in bibliografia ci spingono a ipotizzare che la prateria più disturbata da un punto di vista luminoso sia quella di Murelle, anche durante il campionamento non è stato possibile effettuare misure relative a PAR e Chla, per cui la nostra è una valutazione per deduzione rispetto al comportamento di questi biomarcatori dello stress luminoso, che sappiamo già essere noto in bibliografia.

In questo studio è stato possibile dunque verificare quale fosse la risposta della pianta rispetto a stress ambientali, quali accumulo di metalli pesanti e torbidità delle acque, attraverso l'utilizzo di un set di biomarcatori. Data la mancanza di una serie storica di dati, non è possibile stabilire da quanto

le praterie analizzate siano sottoposte agli stress considerati. Al fine di comprendere la causa dell'elevato accumulo di metalli sarebbe utile affinare il protocollo di monitoraggio includendo anche analisi del sedimento su cui la prateria cresce, aumentare i tipi di metalli analizzati, e uno studio delle correnti che influenzano i siti considerati.

In riferimento allo stress luminoso sarebbero sicuramente indicati dei monitoraggi su scala mensile, al fine di definire quelle che sono la quantità e la qualità della luce che interessa le praterie esaminate durante i differenti periodi dell'anno.

Data anche l'importanza economica ed ecologia della *P. oceanica*, sarebbe auspicabile comprendere quale sia il reale livello di tolleranza della pianta rispetto a stress mirati e controllati attraverso l'allestimento di acquari di monitoraggio. Questo consentirebbe di confrontare le risposte che si hanno in mare rispetto a quelle ottenute in acquario, dove gli stress vengono applicati secondo trattamenti dose-tempo precisi, in esposizione singola o combinata.

Inoltre, l'analisi delle attività enzimatiche potrebbe essere integrata con l'isolamento delle isoforme degli enzimi analizzati da organelli quali cloroplasti, mitocondri e perissosomi, in maniera tale da avere a disposizione una panoramica più generale di tutti gli enzimi attivi nelle cellule. In aggiunta potrebbe essere interessante identificare nuovi biomarkers coinvolti in processi di assorbimento, accumulo, disintossicazione, trasporto ed omeostasi dei metalli la cui sintesi è indotta dalla presenza dei metalli stessi e di altri xenobiotici.

In mare le condizioni sono mutevoli ed i fattori che possono influenzare le risposte della prateria a *P. oceanica* sono molteplici: temperatura, luce, salinità, pH. Nonostante ciò, in questo studio è stato possibile identificare un significativo *pool* di biomarcatori genici ed enzimatici. Data la difficoltà che abbiamo incontrato nel trovare una prateria che sia un vero controllo (*bianco*), l'allestimento di acquari in cui le condizioni possono essere controllate sarebbe utile anche a questo scopo.

Facendo una considerazione globale l'analisi di marcatori molecolari per valutare lo stato di salute delle praterie di *P. oceanica* ha l'indubbio vantaggio di segnalare precocemente un peggioramento delle condizioni della prateria, in quanto l'espressione dei geni correlati allo stress varia contestualmente alla manifestazione dello stress stesso. Esso dunque si propone come metodo di elezione rispetto all'analisi di parametri come densità, fenologia, lepidocronologia e comunità epifita che prevedono determinazioni onerose in termini di tempo, tanto da non consentire azioni di prevenzione in tempi adeguati al manifestarsi del rischio.

Bibliografia

- Abdullah S.N.A., Cheah S.C., Murphy D.J., 2002. Isolation and characterization of two type divergent type3 Ametallothioneins from oil palm., *Elaeis guineensis*. *Plant Physiol. Biochem.* 40:255-263.
- Acunto S., Cinelli F., 1999. In situ survival and development of *Posidonia oceanica* (L.) Delile seedlings. *Aquat bot* 63: 103-112.
- Addlesee H.A., Hunter C., 1999. Physical mapping and functional assignment of the geranylgeranyl-bacteriochlorophyll reductase gene *bchP* of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 181:7248–7255.
- Adonaylo V. N. & Oteiza P. I., 1999. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 135: 77–85.
- Aina R., Sgorbati S., Santagostino A., Labra M., Ghiani A., Citterio S., 2004. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiol Plantarum* 121: 472–480.
- Akashi K., Nishimura N., Ishida Y., Yokota A., 2004. Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem Biophys Res Commun* 323:72–78.
- Alberto F., Correia S., Arnaud-Haond S., Billot C., Duarte C.M., Serrao E., 2003. New microsatellite markers for the endemic Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Mol Ecol* 3: 253-255.
- Allen R.G., and Tresini M., 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 463–499.
- Ambasht N.K., Agrawal M., 2003. Effects of enhanced UV-B radiation and tropospheric ozone on physiological and biochemical characteristics of field grown wheat. *Biol Plantarum* 47(4): 625-628.
- Ardizzone G.D., Pelusi P., 1984. Yield and damage evaluation of bottom trawling on *Posidonia oceanica* meadows., Bourdoursque C.F., Jeudy de Grissac A., Oliver J., (Eds.), *International Workshop Posidonia oceanica* Bed. 1: 63-72.
- Arnaud-Haond S., Belkhir K., 2007. Genclone: a computer program to analyse genotypic data., test for clonality and describe spatial clonal organization. *Mol Ecol Notes* 7: 15–17.
- Arnaud-Haond S., Duarte C.M., Alberto F., Serrao E., 2007a. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Mol Ecol.*, 16: 5115–5139.

- Arnaud-Haond S., Migliaccio M., Diaz-Almela E. et al., 2007b. Vicariance patterns in the Mediterranean Sea: East-West cleavage and low dispersal in the endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *J Biogeogr* 34: 963–976.
- Asada K., 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85: 235–241.
- Astaldi M., Bianchi C.N., Gasparini G.P., Morri C., 1995. Climatic fluctuations, current variability and marine species distribution: a case study in the Ligurian Sea (north-west Mediterranean). *Oceanol Acta* 18 (2): 139-149.
- Augier H., Boudouresque C. F., 1970. Vegetation marine de l'île de Port-Cros. La baie de Port-Man et le problème de la regression de l'herbier de Posidonie. *Bull. Mus. Hist. nat. Marseille* 30:145-164.
- Augier H., Gilles G., Ramonda G., 1984. L'herbier de *Posidonia oceanica* et la pollution par le mercure sur le littoral des Bouches-du-Rhône et du Var (France).
- Augier H., Maudinas B., 1979. Influence of pollution on the photosynthetic pigments of the marine phanerogam *Posidonia oceanica* collected from different polluted areas of the region of Marseille (Mediterranean sea, France). *Oecologia Plantarum* 14 (2): 169-176.
- Balestri E., Bertini S., 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. *Aquat bot* 76: 291–297.
- Balestri E., Cinelli F., 2003. Sexual reproductive success in *Posidonia oceanica*. *Aquat bot* 75: 21-32.
- Balestri E., Piazzini L., Cinelli F., 1998. Survival and growth of transplanted and natural seedlings of *Posidonia oceanica* (L.) Delile in a damaged coastal area. *J exp Mar Biol Ecol* 228: 209–225.
- Balestri E., Piazzini L., Cinelli F., 1998b. In vitro germination and seedling development of *Posidonia oceanica*. *Aquat bot* 6: 83–93.
- Ballesteros E., Cebrian E., Garcia-Rubies A., Alcoverro T., Romero J., Font X., 2005. Pseudovivipary, a new form of asexual reproduction in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Bot Mar* 48:175-177.
- Banfalvi G., 2009. Apoptotic chromatin changes. Springer Science and Business Media BV., 293–364.
- Bargagli R., 1998 – Trace element in terrestrial plants. An ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer-Verlag, Berlino., 324 pp.
- Batiuk, R. A., P. Bergstrom, M. Kemp, E. Koch, L. Murray, J. C. Stevenson, R. Bartleson, V. Carter, N. B. Rybicki, J. M. Landwehr, C. L. Gallegos, L. Karrh, M. Naylor, D. Wilcox, K.

- A. Moore., S. Ailstock., and M. Teichberg. 2000. Chesapeake Bay Submerged Aquatic Vegetation Water Quality and Habitat-Based Requirements and Restoration Targets: A Second Technical synthesis. U. S. Environmental Protection Agency., Chesapeake Bay Program.
- Bay D., 1978. Etude “in situ” de la production primaire d’un herbier de Posidonies (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) de la baie de Calvi-Corse. These Fac. Sci., Univ. De Liège., 1-251.
- Bayne., B.L., D.A. Brown., K. Burns., D.R. Dixon., A. Ivanovici., D.R. Livingstone., D.M. Lowe., N.M. Moore., A.R.D. Stebbing and J. Widdows. 1985. The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals. Praeger Special Studies., Praeger Scientific., New York., 384 pp.
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L., Bonhomme F. ., 2001. GENETIX., Logiciel sous Windows pour la Genetique des Populations. Laboratoire Genome et Populations., Montpellier., France.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F., 2003. Genetix: 4.05 Logiciel sous Windows™ pour la genetique des populations. . (ed. by Montpellier Ud). Laboratoire Genoma Populations., Interactions., Adaptations., Montpellier., France.
- Bellan G., 1993. Les indicateurs biologiques du milieu marin – Remarques introductives., In: Boudouresque C.F., Avon M. e Pergent-Martini C. (Eds.), Qualité du milieu marin – Indicateurs biologiques et physico chimiques. Rencontres scientifiques de la Côte Bleue 3: 35-42.
- Belzunce M., Navarro R. M., Rapoport H. F., 2008. *Posidonia oceanica* seedling root structure and development. *Aquat bot* 88: 203–210.
- Benbrahim-Tallaa L., Waterland R., Dill A., Webber M., Waalkes M., 2007. Tumor suppressor gene inactivation during cadmium-induced malignant transformation of human prostate cells correlates with over- expression of de novo DNA methyltransferase. *Environ Health Persp* 115: 1454–1459.
- Benz J., Wolf C., Rüdiger W., 1980. Chlorophyll biosynthesis: hydrogenation of geranylgeraniol. *Plant Sci Lett* 19: 225–230.
- Bhalerao R., Keskitalo J., Sterky F., Erlandsson R., Björkbacka H., Birve S.J., Karlsson J., Gardeström P., Gustafsson P., Lundeberg J., Jansson S., 2003. Gene Expression in Autumn Leaves. *Plant Physiol* 131: 430–442.
- Bitonti M.B., Cozza R., Chiappetta A., Giannino D., Ruffini Castiglione M., Dewitte W., Mariotti D., Van Onckelen H., Innocenti A.M., 2002. Distinct nuclear organization., DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile., juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *J Exp Bot* 53: 1047–1054.

- Black W.C.I., Baer C.F., Antolin M.F. & DuTeau N.M. .,2001. POPULATION GENOMICS: Genome-Wide Sampling of Insect Populations. *Annu Rev Entomol* 46: 441-69.
- Blandin P., 1986. Bio – indicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *B Ecol* 17 (4):215-307.
- Bollivar DW., Wang SJ., Allen JP., Bauer CE. 1994. Molecular genetic analysis of terminal steps in bacteriochlorophyll a biosynthesis: characterization of a *Rhodobacter capsulatus* strain that synthesizes geranylgeraniol-esterified bacteriochlorophyll a. *Biochemistry* 33: 12763–12768.
- Bornman J.F., 1989. Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. *J Photoch Photobio B* 4: 145–58.
- Borum J., Wium-Andersen S., 1980. Biomass and production of epiphytes on eelgrass (*Zostera marina*, L.) in the Oresund., Denmark. *Ophelia* 1:57-64.
- Boudouresque C. F., Jeudi De Grissac A., Olivier J., 1984. International Workshop on *Posidonia oceanica* beds. Boudouresque C. F., Jeudy de Grissac A., Olivier J. (eds), GIS Posidonie publ., Fr., 1: 1-454.
- Boudouresque., C.F., Pergent., G., Francour., P., Harmelin-Vivien., M., Jangoux., M., Mazzella., L., Panayotidis., P., Pergent-Martini., c.,Rarnos Espla., R., Romero., J. & Scipione., M.B., 1990. Le COST 647: *Posidonia* project *Posidonia Newsletter* 3(2): 27-34.
- Boudouresque C.F., Bernard G., Bonhomme P., Charbonnel E., Diviacco G., Meinesz A., Pergent G., Pergent-Martini C., Ruitton S., Tunesi L., eds., 2006. Préservation et conservation des herbiers à *Posidonia oceanica*. RAMOGE. 202 pp.
- Boudouresque C.F., Charbonel E., Meinesz G., Pergent C., Pergent-Martini G., Cadiou M.C., Bertrand P., Foretm., Ragazzi M., Rico-Raimondino V. 2000. A monitoring network based on the seagrass *Posidonia oceanica* in the Northwestern Mediterranean sea. *Biologia Marina Mediterranea.*, 7:328-331.
- Boudouresque c.f., Jeudy de Grissac a., Meinesz a., 1984. Relations entre la sédimentation et l’allongement des rhizomes orthotropes de *Posidonia oceanica* dans la baie d’Elbu (Corse). In: Boudouresque C.F., Jeudy deGrissac A., Olivier J. edits. International Workshop on *Posidonia oceanica* beds., GIS Posidonie publ., Fr., 1: 185-191.
- Boudouresque c.f., Jeudy de Grissac a., Meinesz a., 1985. Un nouveau type d’herbier à *Posidonia oceanica*: l’herbier de colline. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, 29 (5): 173-175.
- Boudouresque c.f., Meinesz a., 1982. Découverte de l’herbier de Posidonie. *Cah. Parc nation. Port-Cros.*, Fr 4:1-79.
- Bourdouresque C.F., Jeudy de Grissac A., Oliver J., (Eds.), International Workshop *Posidonia oceanica* Beds 1: 399-406.

- Bowler C., Van Montagu M., Inzé D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 83-116.
- Boyko A., Kathiria P., Zemp F.J., Yao Y.L., Pogribny I., Kovalchuk I., 2007. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants (virus-induced plant genome instability). *Nucleic Acids Research* 35:1714–1725.
- Brinkhuis, B.H., Penello, W.F. and Churchill, A.C., 1980. Cadmium and manganese flux in eelgrass *Zostera marina* L. Metal uptake by leaf and root-rhizome tissues. *Mar. Biol.*, 58: 187-196.
- Britt A.B., 1997. Genetic analysis of DNA repair in plants. In Lumsden P (ed.). *Plants and UV-B: Responses to environmental change.*, Cambridge University Press. pp 77-93.
- Brownstein M.J., Carpten J.D. & Smith J.R. ,1996. Modulation of Non-Templated Nucleotide Addition by Taq DNA Polymerase: Primer Modifications that Facilitate Genotyping. *Biotechniques* 20: 1004-10.
- Bruno A., Bruno L., Chiappetta A., Giannino D., Bitonti M.B., 2010. Changes in PoCHL P expression pattern are related to critical light conditions for *Posidonia oceanica* plants. *Mar Ecol-Prog Serdoi:10.3354/meps08725*.
- Bruno L., Chiappetta A., Muzzalupo I., Gagliardi C., Iaria D., Bruno A., Greco M., Giannino D., Perri E., Bitonti M.B., 2009. Role of geranylgeranyl reductase gene in organ development and stress response in olive (*Olea europaea*) plants. *Functional Plant Biology* 36:370–381.
- Bucalossi D., Leonzio C., Casini S., Fossi M C., Marsili L., Ancora S., Wang W., Scali M., 2006. Application of a suite of biomarkers in *Posidonia oceanica* (L.) delile to assess the ecotoxicological impact on the coastal environment. *Mar Environ Res* 62:S 327–S331.
- Buchanan-Wollaston V., 1997. The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 48(307): 181–199.
- Buia M.C., Di Leva G., Mazzella L., 1996. Biodiversità della comunità epifita delle foglie di *Cymodocea nodosa* di prato antistante l'isola d'Ischia (Golfo di Napoli). *Bilogia Marina Mediterranea* 3 (1): 136-142.
- Buia M.C., FFlagella S., Guala I., Gravina T., FFlagella M.M., Cigliano M.M., 2005. Interannual and decadal variability in *Posidonia oceanica*. In: Ozhan (ed). *Proceedings of the Seventh International Conference on the Mediterranean Coastal Environment.*, MEDCOASTS 05., Kusadasi, Turkey., 407-418.

- Buia M.C., Gambi M.C., Badalamenti F., 2002. Morpho-chronological observations on seedlings and juvenile shoots of *Posidonia oceanica* (L.) Delile collected in situ in various coastal areas. *Biologia Marina Mediterranea* 9 (1): 600-604.
- Buia M.C., Mazzella, L., 1991. Reproductive strategy of the Mediterranean seagrasses *Posidonia oceanica* (L.) Delile., *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers., and *Zostera noltii* Hornem. *Aquat Bot* 40 (4): 343-362.
- Buia M.C., Zupo V., Mazzella L., 1992. Primary production and growth dynamics in *Posidonia oceanica*. *P.S.Z.N. I: Mar Ecol* 13 (1): 2-16.
- Buia M.C., Gambi M.C., Dappiano M., 2004. Seagrass systems. *Biologia Marina Mediterranea* 10 (Suppl): 133–183.
- Bulthuis D., Woelkerling W.J., 1983. Biomass accumulation and shading effects of epiphytes on leaves of the seagrasses., *Heterozostera tasmanica*., in Victoria., Australia. *Aquat Bot* 16: 137-48.
- Calmet., D., Charmasson., S., Gontier., G., Meinesz., A., Boudouresque., C.F., 1991. Chernobyl radionuclides in the Mediterranean Seagrass *Posidonia oceanica*., 1986-1987. *J. Environ. Radioactivity* 13: 157-173.
- Calvo S., Lovison G., Pirrotta M., Di Maida G., Tomasello A., Sciandra M., 2006. Modelling the relationship between sexual reproduction and rhizome growth in *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Mar Ecol* 27:361–371.
- Cancemi G., De Falco G., Pergent G., 2000. Impact of a fish farming facility on a *Posidonia oceanica* meadow. *Biologia Marina Mediterranea* 7 (2): 341-344.
- Cancemi G., De Falco G., Pergent G., 2003. Effects of organic matter input from a fish farming facility on a *Posidonia oceanica* meadow. *Estuar Coast Shelf S* 56: 961–968.
- Cao X., Aufsatz W., Zilberman D., Mette MF., Huang MS., Matzke M., Jacobsen SE. 2003. Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr Biol* 13: 2212–2217.
- Cao X., Jacobsen SE. 2002a. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 4., 16491–16498.
- Cao X., Jacobsen SE. 2002b. Role of the Arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr Biol* 12: 1138–1144.
- Capiomont A., Sanmeier M., Caye G., Meinesz A., 1996. Enzyme polymorphism in *Posidonia oceanica*., a seagrass endemic to the Mediterranean. *Aquat. Bot.* 54:265-277.

- Carvalho, G.R.,1998. Molecular ecology: Origins and approach. In: Advances in Molecular Ecology. NATO Science Series. Series A: Life Sciences, Vol. 306. IOS Press, Amsterdam, pp. 1–24.
- Casola E., Scardi M., Mazzella L. & Fresi E.,1987. Structure of the epiphytic community of *Posidonia oceanica* leaves in a shallow meadow. P.S.Z.N. Mar Ecol., 8 (4): 285-296.
- Caye G., 1980. Sur la morphogénèse et le cycle végétatif de *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Thèse Doc. Univ. Aix-Marseille 2., Fr. 1-121.
- Caye G., Meisnez A., 1984. Observations sur la floraison et la fructification de *Posidonia oceanica* dans la baie de Villefranche et en Corse du Sud. International Workshop on *Posidonia oceanica* beds. Boudouresque C. F., Jeudy de Grissac A., Olivier J. (eds), GIS Posidonie publ., Fr 1., 193-201.
- Cebrián, J., Enríquez, S., Fortes, M., Agawin, N., Vermaat, J.E. & Duarte, C.M.,1999. Epiphyte Accrual on *Posidonia oceanica* (L.) Delile Leaves: Implications for Light Absorption. Bot Mar., 42., 123-128.
- Ceccherelli G., Campo D., 2002. Valutazione sperimentale dell'effetto dell'ancoraggio su *Posidonia oceanica* L. (Delile). *Biologia Marina Mediterranea.*, 9 (1), 672-673.
- Ceccherelli G., Campo D., Milazzo M., 2007. Short-term response of the slow growing seagrass *Posidonia oceanica* to simulated anchor impact. *Mar Environ Res*63., 341–349.
- Ceccherelli G., Piazzini L., Cinelli F., 2000. Response of the non-indigenous *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh to the native seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile: effect of density of shoots and orientation of edges of meadows. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*, 243., 227-240.
- Chan SW., Henderson IR., Jacobsen SE. 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* 6., 351–360.
- Chang S., Puryear J., Cairney J.,1993. Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11: 113-116.
- Chessa L.A., Fustier V., Fernandez C., Mura F., Pais A., Pergent G., Serra S., Vitale L. 2000. Contribution to the knowledge of 'banquettes' of *Posidonia oceanica* (L.) Delile in Sardinia Island. Proceeding IV° International Seagrass Biology Workshop., Corsica France., *Biologia Marina Mediterranea.*, 7., 35–38.
- Cho U., Seo N., 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium in due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci.*, 168: 113-120.

- Choi CS., Sano H. 2007. Abiotic stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics* 277., 589–600.
- Choi D., Kim HM., Yun HK., Park JA., Kim WT., Bok SH.,1996. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 112: 353–359.
- Chyan Cl., Lee Ttt., Liu Cp., Yang Yc., Tzen Jtc., Chou Wm.,2005. Cloning and expression of seed- specific metallothioneins- like protein from sesame. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69(12)., 2319-2325.
- Cinelli F., Pardi G., Papi I., 1995. *Biologia della pianta. La Posidonia oceanica.*, supp. *Rivista Marittima Italiana.*, 17-2.
- Clemens S.,2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475–486.
- Cobbett C., Goldsbrough P.,2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159–182.
- Cobbett CS .,2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 123:825–832
- Conte M.H., Huang S., Weber J.C., Church T.M., 2006. Modulation of particle scavenging in the ocean interior in response to mesoscale surface ocean forcing. *Ocean Sci. Meet. Suppl. Eos Trans.* 87 (36).
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation., and disease. *Faseb Journal* 17(10): 1195-1214.
- Coppa S., Guala I., De Lucia G.A., Massaro G., Bressan M., 2010. Density and distribution patterns of the endangered species *Pinna nobilis* within a *Posidonia oceanica* meadow in the Gulf of Oristano (Italy). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.*, 1 – 10.
- Costa V., Moradas –Ferreira P.,2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces Cerevisiae*: insights into ageing., apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med* 22:217-246.
- Cozza R., Pangaro T., Maestrini P., Giordani T., Natali L., Cavallini A.,2006. Isolation of putative type 2 metallothionein encoding sequences and spatial expression pattern in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Aquat Bot* 85:317–323
- CROUZET., A., 1981. Mise en évidence de variations cycliques dans les écailles des rhizomes de *Posidonia oceanica* (Potamogetonaceae). *Trav. Sci. Parc- National Port-Cros., France.*, 7., 129-135.

- Culley T.M. & Wolfe A.D., 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity* 86., 545–556.
- Dattolo E., Ruocco M., Brunet C., Lorenti M., Lauritano C., D'Esposito D., De Luca P., Sanges R., Mazzuca S., Procaccini G., 2014. Response of the seagrass *Posidonia oceanica* to different light environments: Insights from a combined molecular and photo-physiological study. *Mar Environ Res* 101., 225-236.
- Dattolo E., Bayer, Mazzuca, Serra I. a., Spadafora A., Bernardo L., Natali L., Cavallini A., Procaccini G., 2013. Acclimation to different depths by the marine angiosperm *Posidonia oceanica*: transcriptomic and proteomic profiles. *Front. Plant Sci.* 4., 195.
- Davison A. & Chiba S., 2003. Laboratory temperature variation is a previously unrecognized source of genotyping error during capillary electrophoresis. *Mol Ecol Notes* 3., 321-3.
- Dawar S., Vani T., Singhal G.S., 1998. Stimulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in thylakoid membranes of wheat. *Biol Plantarum* 41(1): 65-73.
- De Biasi A.M., Pacciardi L., Piazzini L., Bontà Pittaluga G., De Ranieri S., 2009. Contenuto di metalli in tracce nelle scaglie e nei rizomi di *Posidonia oceanica* nell'area marina di Calafuria (Livorno). *Atti Soc. tosc. Sci. nat., Mem., Serie B*, 116: 111-118.
- De Cock A. M., 1981. Influence of temperature on flowering in *Zostera marina* L. under laboratory condition. *Aquat Bot* 10: 125-131.
- de Villèle X., Verlaque M., 1995. Changes and degradation in a *Posidonia oceanica* bed invaded by introduced tropical alga *Caulerpa taxifolia* in the North Western Mediterranean. *Bot Mar* 38: 79-87.
- De Vos, C.H.R., Vonk, M.J., Vooijs, R., Schat, H., 1992. Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* 98: 853–858.
- Deckert J. 2005. Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *Biometals* 18., 475–481.
- den Hartog C., Hennen J., Noten ThMPA., Van Wijk RJ. 1987. Chromosome numbers of the European seagrasses. *Plant syst Evol* 156:55–59.
- del Río L.A., Corporas F.J., Sandalio L., Palma J.M., Gomez., Barroso J.B., 2006. Reactive oxygen species, antioxidant system and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot* 53: 1255-1272.
- del Río LA., Sandalio MA., Altomare DA., Zilinskas BA., 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J Exp Bot* 54:923-933.

- Den Hartog, 1970. The seagrass of the world. Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch. afd. Naturk. ser. II. 59 (1) 275 pp.
- Dennis ES., Bilodeau P., Burn J., Finnegan EJ., Genger R., Helliwell C., Kang BJ., Sheldon CC., Peacock WJ. 1998. Methylation controls the low temperature induction of flowering in *Arabidopsis*. Symposia of the Society for Experimental Biology 51: 97–103.
- Dennison., W. C., R. J. Orth., K. A. Moore., J. C. Stevenson., V. Carter., S. Kollar., P. W. Bergstrom., and R. A. Batiuk. 1993. Assessing Water Quality with Submersed Aquatic Vegetation. *BioScience* 43:86–94.
- Depledge., M.H. 1989 . Re-evaluation of metabolic requirements for copper and zinc in decapod crustaceans. *Mar Environ Res* 27: 111-26.
- Dere E., Yildiz G., Dalkiran N., Karacaldu D., Dere P., 2007. Changes in Glutathione S-Transferase Enzyme Activity in *Ulva rigida* According to Abiotic Factors and Locations. *Ekoloji* 16:1-8.
- Diaz-Almeda E., Marbà N., Duarte C.M.,2007. Consequences of Mediterranean warming events in seagrass (*Posidonia oceanica*) flowering records. *Global Change Biol* 13:224–235.
- Diaz-Almela E., Marba N., Alvarez E et al.,2006. Patterns of seagrass (*Posidonia oceanica*) flowering in the Western Mediterranean. *Mar Biol* 148: 723–742.
- Dong J.Z., Dunstan D.I.,1996. Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta* 199: 459–466.
- Dorken M.E., Eckert C.G.,2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant., *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *J Ecol* 89:339–350.
- Doyle JJ and Doyle JL., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-20.
- Drake., L. A., F. C. Dobbs., and R. C. Zimmerman. 2003. Effects of Epiphyte Load on Optical Properties and Photosynthetic Potential of the Seagrasses *Thalassia testudinum* Banks ex König and *Zostera marina* L. *Limnol Oceanogr* 48:456–463.
- Duarte C., Marbà N., Santos R.,2004. What may cause loss of seagrasses? In: Borum J., Duarte CM., Krause-Jensen D., Greve TM (eds) *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*. The MandMS project., Hillerød., pp 19–23. ISBN: 87-89143-21-3.
- Duarte C. M., 2002. The future of seagrass meadow. *Environ Conserv* 29 (2): 192-196.
- Duarte C.M., 1991. Seagrass depth limits. *Aquat Bot* 40:363-377.
- Dyachenko OV., Zakharchenko NS., Shevchuk TV., Bohnert HJ., Cushman JC., Buryanov YI. 2006. Effect of hypermethylation of CCWGG sequences in DNA of *Mesembryanthemum crystallinum* plants on their adaptation to salt stress. *Biochemistry (Mosc)* 71:461–465.

- Dynowski M., Schaaf G., Loque D., Moran O., Ludewig U., 2008. Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂ Biochem. J 414:53–61.
- Excoffier., Laval L. G., Schneider S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software.
- Féral J.P., 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 268:121–145.
- Ferrat L., Bingert A., Romeo M., Gnassia-Barelli M., Pergent-Martini C., 2002. A. Mercury uptake and enzymatic response of *Posidonia Oceanica* after an experimental exposure organic and inorganic forms. Environ Toxicol Chem 11: 2365–2371.
- Ferrat L., Pergent-Martini C., Romeo M., 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. Aquat Toxicol 65: 87-204.
- Ferrat L., Pergent-Martini C., Fernandez C., Roméo M., 2002.B. Is glutathione transferase (GST) activity in *Posidonia Oceanica* stress response to mercury exposure? Bulletin of marine science 71: 1183–1190.
- Ferrat L., Pergent-Martini C., Fernandez C., Roméo M., 2002.C. Effects of mercury on antioxidant mechanisms in the marine phanerogam *Posidonia oceanica*. Dis. Aquat. Org. 50: 157–160.
- Finnegan E.J., Brettell R.I., Dennis E.S. 1993. The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. Experientia Supplementum 64:218–261.
- Finnegan E.J., Genger RK., Kovac K., Peacock W.J., Dennis ES. 1998. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. Proceedings of the National Academy of Sciences., USA 95: 5824–5829.
- Finnegan E.J., Kovac K.A., 2000. Plant DNA methyltransferases. Plant Mol Biol 43: 189-201.
- Fojtova` M., Kovarik A., 2000. Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptic changes in tobacco cells. Plant Cell Environ. 23: 531537.
- FojtovaM., Van HoudtH., DepickerA., Kovarik A. 2003. Epigenetic switch from posttranscriptional to transcriptional silencing is correlated with promoter hypermethylation. Plant Physiol 133:1240–1250.
- Foley RC., Liang ZM., Singh KB., 1997. Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. Plant Mol Biol 33.
- Fossi M.C., 1991. L'utilizzo dei "biomakers" nella valutazione dei rischio ambientale: metodologie ed applicazione. Inquinamento 12: 44-50.
- Frankignoulle m., Bouquegneau j. M., Ernst e., Biondo r., Ringo m., Bay d., 1984. Contribution de l'activite de l'herbier de Posidonies au metabolisme global de la baie de Calvi. Premiers result-

- ants. International Workshop on *Posidonia oceanica* beds. Boudouresque C. F., De Grissac A. J. & Olivier J. (eds), GIS Posidonie publ., Fr 1984 1: 23-28.
- Fresi, E., Saggiomo, V., 1981. Phosphorus uptake and transfer in *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Rapp. Comm. Int. Expl. Mer Médit 27:187-188.
- Gallegos C. L., Correll D. L. and Pierce J. W. 1990. Modeling spectral diffuse attenuation, absorption, and scattering coefficients in a turbid estuary. Limnol. Oceanogr 35: 1486-1502.
- Gambi M.C., Lorenti M., Russo G.F., Scipione M.B., Zupo V., 1992. Depth and seasonal distribution of some groups of the vagile fauna of the *Posidonia oceanica* leaf stratum: structural and trophic analyses. P.S.Z.N.I.: Mar Ecol 13 (1): 17-39.
- Garcia-Hernandez M., Murphy A., Taiz L., 1998. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression pattern in *Arabidopsis*. Plant Physiol 118: 387–397.
- Garg N. & Manchanda G., 2009. ROS generation in plants: boon or bane? Plant Biosystems 143(1): 81-96 .
- Gill S.S. & Tuteja N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Bioch 48: 909-930.
- Ginot F., Bordelais I., Nguyen S. & Gyapay G., 1996. Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. Nucl Acids Res 24., 540-1.
- Giordani T., Natali L., Maserti B.E., Taddei S., Cavallini A., 2000. Characterization and Expression of DNA Sequences Encoding Putative Type-II Metallothioneins in the Seagrass *Posidonia oceanica*. Plant Physiol 123:1571–1581.
- Giraud G., 1977. Contribution à la description et a la phenologie quantitative des herbiers de *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Doctorat de spécialité en oceanologie., Université Aix-Marseille II., Fac. Des Sciences de Lumy., Marseille., 1-50.
- Goering P., Waalkes M., Klaasen C. 1994. Toxicology of cadmium. In: Goyer RA., Cherian MG., eds. Handbook of experimental pharmacology: toxicology of metals., biochemical effects., Vol. 115. New York: Springer-Verlag., 189–214.
- González-Correa J.M., Bayle J.T, Sánchez-Lizaso J.L., Valle C., Sánchez-Jerez P., Ruiz J.M., 2005. Recovery of deep *Posidonia oceanica* meadows degraded by trawling. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 320: 65-76.
- Gorbi G., Corradi MG., Invidia M., Bassi M., 2001. Light intensity influences chromium biaccumulation and toxicity in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). Ecotoxicol Environ Saf 48: 36-42.

- Gosselin M., Bouquegneau J., Lefèbvre F., Lepoint G., Pergent G., Pergent-Martini C., Gobert S., 2006. Trace metal concentrations in *Posidonia oceanica* of North Corsica (northwestern Mediterranean Sea): use as a biological monitor? *BMC Ecology* 6-12.
- Greco M., Chiappetta A., Bruno L., Bitonti M.B., 2012. In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *J Exp Bot* 63 (2): 695–709.
- Green E.P., Short F.T. 2003. *World Atlas of Seagrasses*. University of California (eds). Berkeley., USA. 298 pp.
- Greenberg BM., Gaba V., Canaani O., Malkin S., Mattoo AK., Edelman M., 1989. Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:6617–6620.
- Gronwald J.W., Plaisance KL., 1998. Isolation and characterisation of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. *Plant Physiol* 117: 877–892.
- Guala I., Simeone S., Buia M.C., Flagella S., Barolil M., De Falco G., 2006. *Posidonia oceanica* ‘banquette’ removal: environmental impact and management implicatios. *Biologia Marina Mediterranea.*, 13 (4)., 149 – 153.
- Guidetti P., Fabiano M., 2000. The use of lepidochronology to asses the impact of terrigenous discharges on the primary leaf production of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Pollution Bulletin.*, 5 (40)., 449-453.
- Guo WJ., Bundithya W., Goldsbrough PB., 2003. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol* 159:369–381.
- Gupta S., Chaudhuri T., Seth P., Ganguly D. K. and Giri A. K., 2002. Antimutagenic Effects of Black Tea (WorldBlend) and its two Active Polyphenols Theaflavins and Thearubigins in *Salmonella* Assays. *Phytother Res* 16: 655–661 .
- Hammerli A., Reusch TBH., 2003. Genetic neighbourhood of clone structures in eelgrass meadows quantified by spatial auto-correlation of microsatellite markers. *Heredity* 91:448–455.
- Han C., Liu Q., Yang Y., 2009. Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regul* 58: 153-162.
- Hashida SN., Uchiyama T., Martin C., Kishima Y., Sano Y., Mikami T. 2006. The temperature-dependent change in methylation of the *Antirrhinum* transposon Tam3 is controlled by the activity of its transposase. *The Plant Cell* 18:104–118.

- Hemminga M.A., Duarte C., 2001. Seagrass ecology. Cambridge University (eds). United Kingdom., 298 pp.
- Havir EA., McHale NA .,1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84: 450-455.
- Henikoff S., Comai L. 1998. A dna methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149: 307–318.
- Holmer M., ARgyrou M., Dalsgaard T., Danovaro R., Diaz-Almea E., Duarte C.M., Frederiksen M., Grau A., Karakassis I., MARabà N., Mirto S., 2008. Effects of fish farm waste on *Posidonia oceanica* meadows: Synthesis and provision of monitoring and management tools. *Mar Pollut Bull* 56:618–1629.
- Hsieh HM., Liu WK., Chang A., Huang PC .,1996. RNA expression pattern of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* 32: 525–529.
- Huang GY., Wang YS .,2010. Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicennia marina*) in response to metal stress. *Aquat toxicol* 99:86–92.
- Hughes A .R.,Inouye., B. D., Johnson., M.T.J; Underwood N., Vellend M.,2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecol Lett* 11(6):609-23.
- International Agency for Research on Cancer. 1993. Beryllium., cadmium., mercury., and exposure in the glass manufacturing industry. In: International agency for research on cancer monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans., Vol. 58. Lyon., France: IARC
- Jain K., Kataria S., Guruprasad K.N., 2003. Changes in antioxidant defenses of cucumber cotyledons in response to UV-B and to the free radical generating compound AAPH. *Plant Sci* 165: 551-557.
- Jeudy de Grissacc A., 1984. Effects des herbiers à *Posidonia oceanica* sur la dynamique marine et la sedimentologie littorle. Boudouresque C.F.; Jeudy De Grissac A & Olivier J., eds., *GIS Posidonie.*, Fr. 1: 437-443.
- Jiang G., Xu L., Song S., Zhu C., Wu Q., Zhang L., Wu L. 2008. Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. *Toxicology* 244., 49–55.
- Johnstone I.M., 1979. Papa New Guinea seagrasses and aspects of the biology and growth of *Enhalus acoroides* (L.f.) Royle. *Aquat Bot* 7:197-208.

- Jin S., Cheng Y., Guan Q., Liu D., Takano T., Liu S., 2006. A metallothionein-like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. *Biotechnol Lett* 28:1749–1753.
- Jover MA., del Castillo-Agudo L., Garcí'a-Carrascosa M., Segura J., 2003. Random Amplified polymorphic DNA assessment of diversity in Western Mediterranean populations of the seagrass *Posidonia oceanica*. *Am J Bot* 90:364–369.
- Kagi., J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. *Meth Enzymol* 205: 613–626.
- Kamal-Eldin A., Appelqvist LA., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31:671–701.
- Kawashima I., Kennedy TD., Chino M., Lane BG., 1992. Wheat *Ec* metallothionein genes: like mammalian Zn11 metallothionein genes., wheat Zn11 metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Eur J Biochem* 209: 971–976.
- Kay J., Cryer A., Darke B.M., Kille P., Lees W.E., Norey C.G. and Stark J.M. (1991). *Int. J. Biochem.*, 23:1-5.
- Keller Y., Bouvier F., D'Harlingue A., Camara B., 1998. Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis: evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. *Eur J Biochem* 251:413–417.
- Keller Y., Bouvier FD., Harlingue A. 1998. Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis: evidence for the involvement of a multifunctional CHL P. *European Journal of Biochemistry* 251., 413–417.
- Keller Y., Bouvier FD., Harlingue A. 1998. Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis: evidence for the involvement of a multifunctional CHL P. *European Journal of Biochemistry* 251: 413–417.
- Kenworthy., W. J., and M. S. Fonseca., 1996. Light Requirements of Seagrasses *Halodule wrightii* and *Syringodium filiforme* Derived from the Relationship Between Diffuse Light Attenuation and Maximum Depth Distribution *Estuaries* 19:740– 750.
- Khan N.A., Samiullah., Singh S., Nazar R., 2007. Activities of antioxidative enzymes., sulphur assimilation., photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yeald potential under cadmium stress. *J. Agro. Crop Sci* 193: 435-444.
- Klaassen CD., Liu J., Choudhuri S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:267–94 .
- Kohn M.H. & Wayne R.K., 1997. Facts from feces revisited. *Trends Ecol Evol* 12:223-7.

- Krause-Jensen, D., S. Sagert., H. Schubert., and C. Bostrom. 2008. Empirical Relationships Linking Distribution and Abundance of Marine Vegetation to Eutrophication. *Ecological Indicators* 8:515– 529.
- KUO J., HARTOG C. D., 2001. Seagrass taxonomy and identification key. In: Short., Coles., Short edits. *Global seagrass research methods*. Elsevier publ. Amsterdam 31-58.
- Labra M., Vannini C., Sale F., Bracale M. 2002. Methylation change in specific sequences in response to water deficit. *Plant Biosystems* 136:269–276.
- Lafabrie, C., Pergent, G., Kantin, R., Pergent-Martini, C., Gonzalez, J. L., 2007. Trace metals assessment in water, sediment, mussel and seagrass species - validation of the use of *Posidonia oceanica* as a metal biomonitor. *Chemosphere*. 68(11), 2033-2039.
- Lafabrie C., Pergent-Martini C., Pergent G., 2008. Metal contamination of *Posidonia oceanica* meadows along the Corsican coastline (Mediterranean). *Environ Pollut A* 151: 262-268.
- Lamb C., Dixon RA.,1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251–275.
- Larkum A.W.D., Den Hertog C., 1989. Evolution and biogeography of seagrasses. In: Larkum A.W.D. Mc Comb A.J. Shepherd S.A. (eds) *Biology of seagrasses*. Aquatic Plant Studies. Elsevier., Amsterdam., 112-156.
- Lee K. D., Sreekanth T. V. M .,Nagajyoti P. C., 2010. Heavy metals., occurrence and toxicity for plants: a review Volume 8(3):199-216.
- Lee., W. Y. and W. X. Wang .,2001. Metal accumulation in the green macro alga *Ulva fasciata*: effects of nitrate., ammonium and phosphate. *Sci. Total Environ*. 278:11-22.
- Lei L., Huang X., Devajit B., Hui N.,2012. Photosynthetic activity and antioxidative response of seagrass *Thalassia hemprichii* to trace metal stress. *Acta. Oceanol Vol. 31 3*: 98-108.
- Lekanne Deprez RH., Fijnvandraat AC., Ruijter JM., Moorman AF.,2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem* 307:63–69.
- Leoni V., Pasqualini V., Pergent-Martini C., Vela A., Pergent G., 2006. Morphological responses of *Posidonia oceanica* to experimental nutrient enrichment of the canopy water. *J Exp Mar Biol Ecol* 339:1–14.
- Leriche A., Pasqualini V., Boudoresque C. F., Bernard G., Bonhomme P., Clabaut P., Denis J., 2006. Spatial., temporal and structural variations of a *Posidonia oceanica* seagrass meadow facing human activities. *Aquat bot* 84: 287–293.

- Les D.H., Cleland M. A., Waycott M., 1997. Phylogenetic studies in alismatidae., II: Evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Syst Bot* 22 (3):443-463.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb CJ., 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593.
- Li Y.-C., Korol AB., Fahima T., Nevo E., 2004. Microsatellites within genes: structure., function., and evolution. *Mol Biol Evol* 21:991– 1007.
- Li Y.-C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E., 2002. Microsatellites. genomic distribution., putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11: 2453–2465.
- Lichtentaler H.K., Schwender J., Disch A., Rohmer M., 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplast proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* 400: 271–274.
- Ligero R.A., Barrera M., Casas-Ruiz M., Sales D., López-Aguayo F., 2002. Dating of marine sediments and time evolution of heavy metal concentrations in the Bay of Cádiz., Spain. *Environ Pollut A* 118 (1): 97-108.
- Lindroth AM., Cao X., Jackson JP., Zilberman D., McCallum CM., Henikoff S., Jacobsen SE. 2001. Requirement of Chromomethylase3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292: 2077–2080 .
- Liu P., Goh CJ., Loh CS., Pua EC., 2002. Differential expression and characterization of three metallothionein-like genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*). *Physiol Plant* 114: 241–250.
- Longstreth J.D., de Gruijl F.R., Kripke M.L., Takizawa Y., van der Leun J., 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on human health. *Ambio* 24: 153-165.
- Luning K., Dring M.J., 1979. Continuous underwater light measurement in the sublittoral region. *Helgol. Wiss. Meeressun- ters.* 32: 403–424.
- Mac Millan C., 1979. Flowering under controlling conditions by *Cymodocea rotundata* from the Palau islands. *Aquat Bot* 6: 397-491.
- Mac Millan C., 1980. Reproductive physiology in the seagrasses *Syringodium filiforme.*, from the Gulf of Mexico and the Caribbean. *Americ. J Bot* 67 (1):104-110.
- Maeda H., DellaPenna D., 2007. Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Curr Opin Plant Biol* 10:260–265.
- Malea P., Haritonidis S., 1989. Uptake of Cu., Cd., Zn and Pb in *Posidonia oceanica* (Linnaeus) from Antikyra Gulf., Greece: preliminary note. *Environ Res* 28: 495–498.
- Mannervik B., Danielson UH. 1988. Glutathione transferases— Structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* 23:283– 337.

- Mano J., Miyatake F., Hiraoka E., Tamoi M., 2009. Evaluation of the toxicity of stress-related aldehydes to photosynthesis in chloroplasts. *Planta* 230(4): 639-648.
- Marbà N., Santiago R., Díaz-Almela E., Alvarez E., Duarte C.M., 2006. Seagrass (*Posidonia oceanica*) vertical growth as an early indicator of fish farm-derived stress. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67., 475–483.
- Markager S., Sand-Jensen K., 1994. The physiology and ecology of light-growth relationship in macroalgae. *Prog Physiol Res* 10:209–211.
- Maserti B.E., Ferrara R., Paterno P., 1988. *Posidonia* as an indicator of mercury contamination. *Mar Pollut Bull* 19: 381–382.
- Mateo M. A., Romero J., Perez M., Littler M.M., Littler D. S., 1997. Dynamics of millenary organic deposits resulting from the growth of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Estuar Coast Shelf Sci* 44 (1):103-110.
- Mazzella L., Buia M.C., 1991. Temporal evolution and complexity of Mediterranean seagrass ecosystems. *S.It.E. Proceedings* 17:293-295.
- Mazzella L., Buia M.C., Gambi M.C., Lorenti M., Russo G., Scipione M.B., Zupo V., 1992. Plant-animal trophic relationships in the *Posidonia oceanica* ecosystem of the Mediterranean Sea: a review. In: John D.M. Hawkins S.J., Price J.H. (ed). *Plant-Animal Interactions in the Marine Benthos*. Systematics Association., Clarendon Press., Oxford., England., Special Volume 46 (1): 165-187.
- Mazzella L., Scipione M.C., Fresi E., Buia M., Russo G., De Mario R., Lorenti M., Rando A., 1986. *Le praterie sommerse del Mediterraneo*. La Buona Stampa S.p.a., Ercolano., It., 59.
- Mazzella L., Zupo V., 1995. Reti trofiche e flussi di energia nei sistemi a fanerogame marine. *Giornale Botanico Italiano*., 129: 337-350.
- Mazucca S., Spadafora A., Filadoro D., Vannini C and others., 2009. Seagrass light acclimation: 2-DE protein analysis in *Posidonia* leaves grown in chronic low light conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 374:113–122.
- McCarthy F., Shugart L.R., 1990. *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Pub., Chelsea
- McEldoon J.P., Pokora A.R., Dordick J.S., 1995. Lignin peroxidase-type activity of soybean peroxidase. *Enz Microb Techn* 17: 359-365.
- McPherson B.F., Miller R., 1987. The vertical attenuation of light in Charlotte Harbor., a shallow., subtropical estuary., south-western Florida. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 25., 721–737.

- Mehlhorn H., Lelandais M., Korth HG., Foyer CH., 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett* 378: 203-206.
- Meinesz A., Caye G., Loquès F., Molenaar H., 1993. Polymorphism and development of *Posidonia oceanica* transplanted from different parts of the Mediterranean into the National Park of Port-Cros. *Bot. Mar.* 36: 209-216.
- Meinesz A., Cirik S., Akcali B., Javel F., Migliaccio M., Thibaut T., Yuksek A., Procaccini G., 2009. *Posidonia oceanica* in the Marmara sea. *Aquat bot* 90: 18-22.
- Meinesz A., Laurent R., 1978. Cartographie et état de la limite inférieure dans les Alpes-maritimes (France). Campagne Poséidon 1976. *Bot Mar.*, 21 (8): 513-526.
- Middelboe A.L., Markager S., 1997. Depth limits and minimum light requirements of freshwater-macrophytes. *Freshw.Biol.* 37: 553–568.
- Migliaccio M., De Martino F., Silvestre F., and Procaccini G., 2005. Meadow-scale genetic structure in *Posidonia oceanica*. *Mar Eco Prog Ser* 304: 55–65. doi: 10.3354/meps304055
- Milazzo M., Badalamenti F., Riggio S., Chemello R., 2002. Effetti degli ancoraggi sulla prateria di *Posidonia oceanica* della riserva marina dell'isola di Ustica: dati preliminari. *Biol Mar Medit* 9 (1):686-689.
- Minami T., Ichida S., Kubo K., 2002. Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B* 781: 303-311.
- Mir G., Doménech J., Huguet G., Guo WJ., Goldsbrough P., Atrian S., Molinas M., 2004. A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *J Exp Bot* 55:2483–2493.
- Mitrovic S.M., Pflugmacher S., James K.J., Furey A., 2004. Anatoxin-a elicits an increase in peroxidase and glutathione S-transferase activity in aquatic plants. *Aquatic toxicology.*, 68., 185-192.
- Mittler M., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-499.
- MOLINIER R., PICARD J., 1952. Recherches sur les herbiers de Phanérogames marines du littoral Méditerranéen français. *Annales de L'Institut Océanographique.*, 27(3): 157-234.
- Montefalcone M., Parravicini V., Vacchi M., Albertelli G., Morri C., Nike Bianchi C., 2010. Human influence on seagrass habitat fragmentation in NW Mediterranean Sea. *Estuar Coast Shelf S* 86:292–298.
- Montefalcone M., Chiantore M., Lanzone A., Morri C., Bianchi C.N., Albertelli G., 2008. BACI design reveals the decline of the seagrass *Posidonia oceanica* induced by anchoring. *Mar Pollut Bull* 56: 1637–1645.

- Moore., M. N. (1985) Cellular responses to pollutants. *Mar. Poll. Bull.* 16: 134-9.
- Moore., Migliaccio M., De Martino F., Silvestre F., Procaccini G (2005) Meadow-scale genetic structure in *Posidonia oceanica* L. (Delile). *Mar Eco Prog Ser* 304: 55–65.
- Morel., A. 1978. Available., Usable., and Stored Radiant Energy in Relation to Marine Photosynthesis. *Deep-Sea Res* 25:673– 688.
- Morelli E., Scarano G., 2004. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricoratum*. *Plant Sci* 167: 289–296.
- Moriguchi T., Kita M., Hisada S., Endo-Inagaki T., Omura M., 1998. Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant metallo-thionein-like genes expressed during fruit development. *Gene* 211: 221–227.
- Musil C.F., Chimphango S.B.M., Dakora F.D.; 2002. Effects of elevated ultraviolet-B radiation on native and cultivated plants of southern Africa. *Anna. Bot.* 90: 127-13.
- Nam YW., Tichit L., Leperlier M., Cuerq B., Marty I., Lelièvre JM., 1999. Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol Biol* 39: 629–636.
- Nei M., 1972. Genetic distances between populations. *The American Naturalist* 106, 283.
- Nishiuchi S., Liu S., Takano T., 2007. Isolation and characterization of a metallothionein-1 protein in *Chloris virgata* Swartz that enhances stress tolerances to oxidative., salinity and carbonate stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 29:1301–1305.
- Noctor G., Foyer CH., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant.* Vol. 49: 249-279.
- Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Foyer CH., 2000. Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Proc Biol Sci* 355: 1465–1475.
- Novak R., 1982. Spatial and seasonal distribution of the meiofauna in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Neth J Sea Res* 16: 380–388.
- Oda S., Oki E., Maehara Y. & Sugimachi K. , 1997. Precise assessment of microsatellite instability using high resolution fluorescent microsatellite analysis. *Nucl. Acids Res.* 25., 3415-20.
- Ohya T., Morimura Y., Saji H., Mihara T., Ikawa T. , 1997. Purification and characterization of ascorbate peroxidase in roots of Japanese radish. *Plant Sci* 125: 137-145.
- Okamoto., O. K. & Colepicolo., P. 1998. Response of super-oxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 119:67–73

- Okamoto O. K., Pinto E., Latorre L. R., Bechara E. J. H. & Colepicolo, P. 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40:18–24.
- Orth R.J., Carruthers T.J.B., Dennison W.C., Duarte C.M., Fourqurean J.W., Keck Jr K.L., Hughes A.R., Kendrick G.A., Kenworthy W.H., Olyarnik S., Short F.T., Waycott M., Williams S.L. 2006. A global crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience* 56:987–96.
- Ott J., 1980. Growth and production in *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *P. S. Z. N. I. Mar Ecol Germ.* 1: 47-64.
- Palanques A., Diaz J.I., Farran M., 1995. Contamination of heavy metals in the suspended and surface sediment of the Gulf of Cadiz Spain: the role of sources., currents., pathways and sinks. *Oceanolog. Acta* 18 (4):469–477.
- Panayotidis P. E Giraud G., 1981. Sur un cycle de renouvellement des feuilles de *Posidonia oceanica* (L.) Delile dans le golfe de Marseille. *Vie et Milieu* 31:129-136.
- Panayotidis P., Makris P., Catsiki V. A., 1990. Cycle de bioaccumulation du Cu., Cd., et Cr dans les écailles de *Posidonia oceanica*. *Rapp. Comm. Int. Mer Medit* 32(1): 13.
- Papa C.M., Springer N.M., Muszynski M.G., Meeley R., Kaeppler S.M. 2001. Maize chromomethylase *Zea methyltransferase2* is required for CpNpG methylation. *The Plant Cell* 13:1919–1928.
- Parry., M.A.J., Andralojc., P.J., Mitchell., R.A.C., Madgwick., P.J., Keys., A.J., 2003. Manipulation of Rubisco: the amount., activity., function and regulation. *J Exp Bot* 54:1321e1333.
- Peakall R., Smouse P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Pekker I., Tel-Or E., Mittler R., 2002. Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron mediated oxidative stress in bean. *Plant Mol Biol* 49(5): 429-438.
- Penhale P. A., Smith W. O., 1977. Excretion of dissolved organic carbon by seagrasses *Zostera marina* and its epiphytes. *Limnol Oceanogr* 22:400-407.
- Pérès J.M., Picard J., 1964. Nouveau manuel de bionomie benthique de la mer Méditerranéenne., *Rec. Trav. St Mar Endoume* 31 (47):1-137.
- Pérez M., Garcia T., Invers O., Ruiz J.M., 2008. Physiological responses of the seagrass *Posidonia oceanica* as indicators of fish farm impact. *Mar Pollut Bull* 56: 869–879.
- Pergent G., 1990. Lepidochronological analysis in the seagrass *Posidonia oceanica*: a standardized approach., *Aquat Bot.* , 37, 39-54.

- Pergent G., Boudouresque C.F., Crouzet A., 1983. Variation cycliques dans les écailles des rhizome orthotrope de *Posidonia oceanica*. Tra sci. Parc Nation. Port-Cros Fr 9: 107-148.
- Pergent G., Boudouresque C.F., Crouzet A., Meinesz A., 1989. Cyclic changes along *Posidonia oceanica* rhizomes (lepidochronology): Present state and perspectives. P.S.Z.N.I. Mar Ecol 10 (3): 221-230. 1989 Paul Parey Scientific Publishers., Berlin and Hamburg. ISSN 0173-9565.
- Pergent G., Pergent- Martini C., Boudouresque C.F. 1995. Utilisation de l'herbiera a *Posidonia oceanica* comme indicateur biologique de la qualité du milieu littoral en Méditerranée: etat des connaissances. Mésogée 54: 3-27.
- Pergent-Martini C. 1998. *Posidonia oceanica*: a biological indicator of past and present mercury contamination in the Mediterranean sea. Mar Environ Res 45: 101–111.
- Pergent-Martini C., Pergent G., Fernandez C., Ferrat L., 1999. Value and use of *Posidonia oceanica* as a biological indicator. In Ozahan., E. (Ed)., Proceedings of the MEDCOST 99-EMECS 99 joint conference: Land - Ocan Interactions – Managing Coastal Ecosystems., 9- 13 November 1999., Antalya., Turkey., MEDCOST., Middle East Technical Univ. Ankara., Turkey 1: 73 – 90.
- Piazzi L., Balata D., Ceccherelli G., Cinelli F., 2001. Compartive study of the growth of the two occurring introduced green algae *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa* along the Tuscan coast (Italy., Western Mediterranean). Cryptogamie Algol 22: 459-466.
- Piazzi L., Balestri E., Cinelli F., 2000. Grazing on inflorescences of the seagrass *Posidonia oceanica*. Bot Mar 43:581–584.
- Pirc H.,1985. Growth dynamics in *Posidonia oceanica* (L.) Delile. I. Seasonal changes of soluble carbohydrates., starch., free amino acids., nitrogen and organic anions in different parts of the plant. PSZN I: Mar Ecol 6:141–165.
- Pirc., H.,1986. Seasonal aspects of photosynthesis in *posidonia oceanica*: influence of depth., temperature aand lighth intensity. Aquat. Bot. 26., 203–212. doi: 10.1016/0304- 3770(86)90021-5.
- Procaccini G., R. S. Alberte and L. Mazzella. 1996. Genetic structure of the seagrass *Posidonia oceanica* in the Western Mediterranean: ecological implications. Mar Ecol Prog Ser 140: 153–160.
- Procaccini G., MaltagliatiF., 2004. Methodological approaches to the analysis of genetic diversity in benthic organisms. In: Gambi., M.C., Dappiano., M. (Eds.)., Methods for sampling and study of Mediterranean marine benthos. Bio Mar Med pp. 481–519.
- Procaccini G., Mazzella L., 1998. Population genetic structure and gene flow in the seagrass *Posidonia oceanica* assessed using microsatellite analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 169, 133–141.

- Procaccini G., Ruggiero M.V., Orsini L., 2002. Genetic structure and distribution of microsatellite population genetic diversity in *Posidonia oceanica* in the entire Mediterranean basin. *Bull Mar Sci* 71:1291–1297.
- Pulido MD., Parrish AR. 2003. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res* 533: 227–241.
- Quaite F.E., Sutherland B.M., Sutherland J.C., 1992. Quantitation of pyrimidine dimers in DNA from UVB-irradiated alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings. *Appl Theor Electrophor* 2(6):171–175.
- Quan XQ., Shan L., Bi YP., 2007. Cloning of metallothionein genes from *Arachis hypogaea* and characterization of AhMT2a. *Russ J Plant Physiol* 54:669–675.
- Radoti Ksenija ., Ducic Tanja., Prodanovic Radivoje., Vujcic Zoran., Karadic Branko., Antic-Jovanovic Svetlana., 2003. Toxicity of nickel and cadmium in spruce seedlings: effects on separated and combined treatments on peroxidase and superoxide-dismutase activity. *Jugoslav Med Biochem* 22: 41–52.
- Reusch., T.B.H., 2006. Does disturbance enhance genotypic diversity in clonal organisms? A field test in the marine angiosperm *Zostera marina*. *Mol Ecol* 15: 277–286.
- Rijstenbil., J.W., Gerringa., L.J.A., 2002. Interactions of algal ligands., metal complexation and availability., and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicol* 56: 115-131.
- Rijstenbil., J.W., Haritonidis., S., Melea., P., Seferlis., M., Wijnholds., J.A., 1998. Thiol pools and glutathione redox ratios as possible indicators of copper toxicity in the green macroalgae *Enteromorpha* spp. From the Scheldt Estuary (SW Netherlands., Belgium) and Thermaikos Gulf (Greece., N Aegean Sea). *Hydrobiologia* 385: 171–181.
- Robinson N.J., Ratcliff R.L., Anderson P.J., Delhaize E., Berger J.M., Jackson P.J ., 1988. Biosynthesis of poly(γ -glutamylcysteinyl) glycines in cadmium-resistant *Datura innoxia* cells. *Plant Sci* 56:197–204.
- Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C., Jackson PJ., 1993. Plant metallothioneins. *Biochem J* 295: 1–10.
- Roesler., C.S., Perry., M.J., Carder., K.L., 1989. Modeling in situ phytoplankton absorption from total absorption spectra in productive inland marine waters. *Limnol. Oceanogr.* 34: 1510–1523.
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemistry Journal* 295:517–524.

- Romero J., Pergent- Matrini C., Mateo M.A., Regnier C., 1992. The detritic compartment in a *Posidonia oceanica* meadow: litter features., decomposition rates and mineral stocks". *Mar Ecol* 13 (1):73-83.
- Ruggiero., M.V., Turk., R., Procaccini., G., 2002. Genetic identity and homozygosity of North Adriatic populations in *Posidonia oceanica*: an ancient Post-Glacial clone? *Cons Gen* 3:71–74.
- Ruiz J.M., Romero J., 2003. Effects of disturbances caused by coastal constructions on spatial structure., growth dynamics and photosynthesis of the seagrass *Posidonia oceanica*. *Mar Pollut Bull* 46:1523-1533.
- Salt D. E., Prince R. C., Pickering I. J., Raskin I., 1995 -Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiol* 110: 1427-1433.
- Sand-Jensen K., 1977. Effect of epiphytes on eelgrass photosynthesis. *Aquat Bot* 3:55-63.
- Sand-Jensen K., Borum J., 1983. Regulation on growth of eelgrass (*Zostera marina* L.) in Danish waters. *Mar Technol Sci J* 17:15-21.
- Sand-Jensen., K., 1988. Minimum light requirements for growth in *Ulva lactuca*. *Mar Ecol Prog Ser* 50: 187–193.
- Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. (2000) Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis (available at:<http://anthro.unige.ch/arlequin>).
- Sausser., K. R., Liu., J. K. & Wong., T. Y. 1997. Identification of a copper-sensitive ascorbate peroxidase in the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. *Biometals* 10:163–8.
- Schoch S., Lempert U., Rudiger W. 1977. The last steps of chlorophyll biosynthesis intermediate between chlorophyllide and phytol-containing chlorophyll. *Zeichnung Pflanzenphysiologie* 83., 427–436.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K., 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought., cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31: 279–292.
- Selvakumar V., 2008. Ultraviolet-B radiation (280-315 nm) invoked antioxidant defence systems in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Crotalaria juncea* L. *Photosynthetica* 46(1): 98-106.
- Semroud R., 1993. Données sur la floraison ancienne de *Posidonia oceanica* (L.) Delile dans la région d'Alger (Algerine). *Posidonia Newslette* 4 (2): 31-35.

- Serra I.A., Innocenti A.M., Di Maida G., Calvo S and others.,2010. Genetic structure in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: disentangling past vicariance events from contemporary patterns of gene flow. *Mol Ecol* 19: 557–568.
- Serra., I.A., Procaccini., G., Intrieri., M.C., Migliaccio., M., Mazzuca., S., Innocenti., A.M., 2007. Comparison of ISSR and SSR markers for the analysis of genetic diversity in *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Mar. Ecol Prog Ser* 338: 71–79.
- Serra I.A., Lauritano C., Dattolo E., Puoti A., Nicastro S., Innocenti A. M., et al.,2012. Reference genes assessment for the seagrass *Posidonia oceanica* in different salinity., pH and light conditions. *MarBiol* 159: 1269–1282.
- Short F.T., Willie-Echeverria S., 1996. Natural and human-induced disturbance of sea-grasses. *Environ Conserv* 23: 17-27.
- Shugart LR. Biological monitoring: testing for genotoxicity. 1990. In: McCarthy JF., Shugart LR., editors. *Biomarkers of environmental contamination*. Boca Raton: Lewis Publishers.
- Siedlecka A., Krupa Z.,1996. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthesis capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* 34:833–842.
- Smith., S. V., Kirnmerer., W. J., Laws., E. A., Brock., R. E., Walsh., T. W. .,1981. Kaneohe Bay sewage diversion experiment: perspectives on ecosystem responses to nutritional perturbation. *Pacif Sci* 35: 279-402.
- Soll J., Kemmerling M., Schultz G. 1980. Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplasts subfractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 200: 544–550.
- Soll J., Schultz G., Rüdiger W., Benz J. 1983. Hydrogenation of geranylgeraniol: two pathways exist in spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 71: 849–854.
- Soll J. 1987. α -Tocopherol and plastoquinone synthesis in chloroplast membranes. *Method enzymol* 148: 383–392.
- Srivastava S., Mishra S., Tripathi R D., et al. 2006. Copper- induced oxidative stress and responses of antioxi- idants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aquat Toxicol* 80(4): 405–415.
- Srivastava., S., Mishra., S., Tripathi., R.D., Dwivedi., S., Gupta., D.K., 2006. Copper- induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aquat Toxicol* 80(4):405–415. 30.
- Stebbing., N., 1985. Therapeutic considerations for use of immunomodulators in the treatment of ataxia–telangiectasia. *Kroc Found Ser* 19:339–352.

- Steffens., J.C., 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Mol Biol* 41: 53–575.
- Strid A., Chow WS., Anderson JM., 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth Res* 39: 475-489.
- Talarico L. e Frisenda P., 2005. Studio preliminare su specie macroalgali utili per il biorimediao di acque contaminate da metalli tossici. *Inform. Bot Ital* 37: 604-605.
- Taramelli, E., Costantini, S., Giordano, R., Olivieri, N., Perdicaro, R., 1991. Cadmium In Water, Sediments And benthic organisms from a stretch of coast facing the thermoelectric power plant at Torvaldiga (Civitavecchia, Rome). In: UNEP/FAO (Ed.), Final Reports on Research Projects Dealing with Bioaccumulation and Toxicity of Chemical Pollutants (MAP Technical Reports Series No. 52). UNEP/FAO Pub, Athens, pp. 15e31.
- Tautz D. & Renz M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucaryotic genomes. *Nucleic Acid Research* 12: 4127-238.
- Toppi L.S., Lambardi M., Pecchioni N., Pazzagli L., Cappugi G., Durante M., Gabbrielli R., 1998. Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures. *Plant Sci* 137:119–129.
- Tranchina., L., Brai., M., D'Agostino., F., Bartolotta., A., Rizzo., A., 2005. Trace metals in Posidonia oceanica seagrass from south-eastern Sicily. *Chem Ecol* 21 (2):109–118.
- Trocine R.P., Rice J.D., Wells G.N., 1981. Inhibition of seagrass photosynthesis by ultraviolet B radiation. *Plant Physiol* 68: 74-81.
- Van Breusegem F., Bailey-Serres J., Mittler R., 2008. Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiol* 147(3): 978-984.
- Vangronsveld, J.C.H.M. and Cunningham, S.D., 1998. Introduction to the concepts. In: Vangronsveld, J., Cunningham, S.D. (Eds.), Metal-contaminated soils: In situ Inactivation and phytoremediation. R.G. Landes Co., Georgetown, TX, pp 1-15.
- Van der Oost, R., Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquat. Toxicol* 35: 21-46.
- Van Oosterhout C., Hutchinson WF., Wills DP., Shipley P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4(3): 535-538.
- Villares R.; Puente X. and Carballeira A., 2002. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. *Environ Pollut* 119 (1):79-90.

- Waalkes M., Misra R. 1996. Cadmium carcinogenicity and genotoxicity. In: Chang L., ed. Toxicology of metals. Boca Raton., FL: CRC Press 231–244.
- Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192: 95–117.
- Wang J., Zhang H., Allen RD., 1999. Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 40 (7): 725-732.
- Wang P., Zhang S., Wang C., Lu J., 2012. Effects of Pb on the oxidative stress and antioxidant response in a Pb bioaccumulator plant *Vallisneria spiralis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 78:28–34.
- Wang C., Zhang S.H., Li W., Wang P.F., Qian J., Hou J., Zhang W.J., Lu J., 2009. Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Chemosphere* 76:938–945.
- Ward T.J., 1989. The accumulation and effects of metals in sea-grass habitats. In: Larkum A.W.D., McComb A.J. and Shepherd S.A. (eds) *Biology of Seagrasses: A Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region.*, pp 797–820. Elsevier., Amsterdam.
- Warnau M., Ledent G., Temara A., Bouquegneau J.-M., Jangoux M., Dubois P., 1995 - Heavy metals in *Posidonia oceanica* and *Paracentrotus lividus*. *The Science of Total Environ* 171:95-99.
- Waycott M., Les D.H., 2000. Current perspectives on marine Angiosperm evolution. *Biol mar Medit* 7 (2):160-163.
- Waycott M., Procaccini G., Les D., Reusch T.H.B., 2006. Genetic studies in seagrasses: molecular systematics to population genetics and beyond. In: Larkum A.W.D., Orth R.J., C. Duarte (eds) *Seagrass: Biology., Ecology and Conservation.* Springer., The Netherlands 25-50.
- Weidemann., A.D., Bannister., T.T., 1986. Absorption and scattering coefficients in Irondequoit Bay. *Limnol. Oceanogr.* 31: 567–583.
- Weir B.S., 1996. *Genetic Data Analysis II.* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Weir B.S. and Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schaudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D., and Van W., 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C₃ plants. *EMBO J.* 16: 4806–4816.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531–6535.

- Wiparati P.J.,2003. An automated allele-calling system for high-throughput microsatellite genotyping. In: Department of medical Biology. University of Melbourne.
- Wissler., L., Codoñer., F. M., Reusch., T. B. H., Olsen., J. L., Procaccini., G., and Bornberg-Bauer., E. .,2011.Back to the Sea twice: identifying candidate plant genes for molecular evolution to marine life. *BMC Evol. Biol.* 11:8. doi:10.1186/1471-2148-11-8.
- Wittmann., K. J., 1984 Temporal and morphological variations of growth in a natural stand of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *P.S.N.Z.I. Mar Ecol* 5:301–316.
- Wong., H. L., Sakamoto., T., Kawasaki., T., Umemura., K. and Shimamoto., K.,2004. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger., by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol.* 135:1447-1456.
- Wright S.,1965. Interpretation of populations structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Wright., S.,1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 322–354.
- Xue T., Li X., Zhu W., Wu C., Yang G., Zheng C.,2009. Cotton metallothionein GhMT3a., a reactive oxygen species scavenger., increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *J Exp Bot* 60:339–349.
- Yang S.H., Wang L.J., Li S.H., Duan W., Loescher W., Liang Z.C., 2007. The effects of UV-B radiation on photosynthesis in relation to Photosystem II photochemistry., thermal dissipation and antioxidant defenses in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings at different growth temperatures. *Functional Plant Biology* 34(10): 907-917.
- Yang Z., Wu Y., Li Y., Ling HQ., Chu C .,2009. OsMT1a., a type 1 metallothionein., plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 70:219–229.
- Yu LH., Umeda M., Liu JY., Zhao NM., Uchimya H.,1998. A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in node portion of the stem. *Gene* 206: 29–35.
- Yuan J., Chen D., Ren Y., Zhang X., Zhao J .,2008. Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene., OsMT2b., down-regulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice. *J Plant Physiol* 146:1637– 1650.
- Zancan S., Suglia I., La Rocca N., Ghisi R., 2008. Effects of UV-B radiation on antioxidant parameters of iron-deficient barley plants. *Environmental and Experimental Botany* 63: 71-79.
- Zhang Y., Xiao YM. 1998. Antagonistic effect of calcium., zinc and selenium against Cd induced chromosomal aberration and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. *Mutat Res* 420: 1–6.
- Zhigang A., Cuijie L., Yuangang Z., Yejie D., Wachter A., Gromes R., Rausch T .,2006. Expression of BjMT2., a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in

- Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Exp Bot* 57:3575–3582.
- Zhou GK., Xu YF., Liu JY., 2005. Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors. *J Plant Physiol* 162:686–696.
- Zhou J., Goldsbrough PB., 1994. Functional homologs of animal and fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6:875–84.
- Zhou J., Goldsbrough PB., 1995. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* 248:318–328.
- Zieman., J.C., Wetzel., R.G., 1980. Productivity in seagrasses: methods and rates. In: Phillips., R.C., McRoy., C.P. (Eds.), *Handbook of Seagrass Biology: An Ecosystem Perspective*. Garland STPM Press., New York., pp. 87–116.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.
- Zimeri., A.M., Dhanker., O.P., McCaig., B., Meagher., R.B., 2005. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol Biol* 58: 839–855.
- Zimmerman., R. C. 2003. A Biooptical Model of Irradiance Distribution and Photosynthesis in Seagrass Canopies. *Limnology and Oceanography*., 48:568– 585.
- Zieman., J.C., Wetzel., R.G., 1980. Productivity in seagrasses: methods and rates. In: Phillips., R.C., McRoy., C.P. (Eds.), *Handbook of Seagrass Biology: An Ecosystem Perspective*. Garland STPM Press., New York., pp. 87–116.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.
- Zimeri., A.M., Dhanker., O.P., McCaig., B., Meagher., R.B., 2005. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Mol Biol* 58: 839–855.
- Zimmerman., R. C. 2003. A Biooptical Model of Irradiance Distribution and Photosynthesis in Seagrass Canopies. *Limnology and Oceanography*., 48:568– 585.

