



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in **Scienze Ambientali** (LM-75)
Curriculum: Valutazione e Gestione dei Sistemi Ambientali

ordinamento
ex D.M. 270/2004

Tesi di Laurea

**Monitoraggio della biodiversità del genere *Ceramium*
(Rhodophyta) nella Laguna di Venezia e nei suoi litorali
tramite il metodo del DNA *Barcoding***

Relatore

Ch. Prof. Adriano Sfriso

Correlatore

Dott. Marion A. Wolf

Laureanda

Viola Maria Betto

Matricola 838243

Anno Accademico

2016/2017

INDICE

1. Introduzione	pag. 1
1.1 L'ambiente lagunare e litorale di Venezia	pag. 1
1.2 Lo studio della biodiversità macroalgale in Laguna di Venezia	pag. 2
1.3 Il genere <i>Ceramium</i> Roth (Ceramiaceae, Rhodophyta)	pag. 4
1.4. Caratteri diagnostici vegetativi	pag. 6
1.5 Ciclo vitale e caratteri diagnostici riproduttivi	pag. 8
1.6 Problematiche nella sistematica del genere <i>Ceramium</i>	pag. 10
1.7 Metodo del DNA <i>Barcoding</i> per l'identificazione delle specie macroalgali	pag. 12
1.8 <i>Marker</i> molecolari utilizzati	pag. 14
1.9 Analisi filogenetiche	pag. 16
1.10 Biodiversità del genere <i>Ceramium</i> in Laguna di Venezia	pag. 17
2. Scopo	pag. 18
3. Materiali e metodi	pag. 19
3.1 Campionamenti	pag. 19
3.2 <i>Sorting</i> e conservazione del materiale algale	pag. 20
3.3 Estrazione del DNA genomico	pag. 20
3.4 Amplificazione del DNA tramite PCR	pag. 21
3.5 Elettroforesi su gel d'agarosio	pag. 25
3.6 Reazione enzimatica per la purificazione del DNA amplificato	pag. 27
3.7 Sequenziamento del DNA	pag. 27
3.8 Analisi delle sequenze e ricostruzione filogenetica	pag. 28
3.9 Osservazione al microscopio ottico	pag. 29
3.10 Inclusione dei campioni in resina epossidica	pag. 29
3.11 Allestimento delle sezioni semifini	pag. 31

4. Risultati e discussione	pag. 32
4.1 Identificazione dei campioni tramite il confronto con sequenze di specie note	pag. 32
4.2 Analisi filogenetica dei <i>taxa</i> non presenti in <i>GenBank</i>	pag. 36
4.3 Analisi della divergenza nucleotidica	pag. 39
4.4 Caratterizzazione morfologica	pag. 41
4.5 Confronto con le specie note presenti in Laguna di Venezia e in Mar Mediterraneo	pag. 51
5. Conclusioni	pag. 57
6. Bibliografia	pag. 60

1. INTRODUZIONE

1.1 L'ambiente lagunare e litorale di Venezia

La Laguna di Venezia si trova nella parte settentrionale del Mar Adriatico ed è il più grande ambiente di transizione del Mar Mediterraneo, con una superficie totale di circa 549 km² (Sfriso *et al.*, 2009). La laguna veneta può essere suddivisa in tre principali bacini: il bacino nord, il bacino centrale e il bacino sud, i quali ricevono acqua dolce da 24 affluenti (Zuliani *et al.*, 2005) e comunicano con il Mar Adriatico attraverso tre bocche di porto: la bocca di porto di Lido (S. Nicolò), la bocca di porto di Malamocco e la bocca di porto di Chioggia (Sfriso *et al.*, 2009). La laguna è un ambiente eterogeneo: la profondità media è di circa 1,0-1,2 m, ma i canali principali e le bocche di porto arrivano ad una profondità di circa 10-20 m, con un massimo di 50 m nella bocca di porto di Malamocco, punto più profondo del nord Adriatico (Sfriso *et al.*, 2009). L'escursione di marea media annua è di ± 31 cm (Pirazzoli, 1974), anche se in condizioni meteorologiche particolari, il *range* di marea può essere molto più elevato (da -80 cm a +160 cm) (Sfriso *et al.*, 2009). La temperatura dell'acqua lagunare va da una minima di (-1) +5°C a una massima di +30 (+33)°C con una salinità che varia da 28 a 33 psu, che nel periodo estivo può arrivare a circa 43 psu nelle zone di barena e si abbassa notevolmente in vicinanza degli affluenti (18,5 psu) (Curiel *et al.*, 2002; Sfriso *et al.*, 2009) arrivando a valori inferiori a 10 psu presso le foci. L'alta variabilità ambientale che caratterizza la Laguna di Venezia è responsabile dell'elevata biodiversità di specie animali e vegetali che colonizzano queste aree.

A partire dalla seconda metà del '900, la Laguna di Venezia è stata affetta da un gran numero di pressioni antropiche, come, ad esempio, lo sviluppo dell'area industriale, lo scavo dei canali commerciali e la pratica delle monocolture nelle campagne adiacenti, che hanno causato il mutamento delle condizioni ambientali sia da un punto di vista fisico che chimico. In particolare, la Laguna di Venezia è caratterizzata da un intenso traffico navale. In essa, infatti, sono presenti due principali aree portuali: un *terminal* commerciale a Porto Marghera ed un *terminal* passeggeri per le navi da crociera a Marittima con due punti di accesso separati, la bocca di porto di Malamocco e la bocca di porto di S. Nicolò (Lido di Venezia) (www.port.venice.it).

Inoltre, la laguna di Venezia ospita svariati allevamenti di molluschi: mitili, vongole ed ostriche (Orel *et al.*, 2000), oltre a mercati di vendita all'ingrosso di prodotti ittici sia locali che di importazione (Chioggia e Venezia). In generale, le attività portuali e di acquacoltura influenzano la biodiversità degli ecosistemi lagunari del Mar Adriatico settentrionale in quanto collegate all'introduzione di specie non indigene (NIS). La Laguna di Venezia è, infatti, la località italiana con il più alto numero di specie alloctone marine di cui gran parte sono rappresentate da macroalghe (Cecere *et al.*, 2011; Curiel *et al.*, 2002, 2004, 2005; Occhipinti-Ambrogi *et al.*, 2011; Sfriso *et al.*, 2009, 2012a, 2012b, 2014a; Sfriso & Marchini, 2014; Marchini *et al.*, 2015; Wolf *et al.*, 2011b, 2012, 2014). Di conseguenza, in questo ambiente la biodiversità della flora è in continuo mutamento.

1.2 Lo studio della biodiversità macroalgale in Laguna di Venezia

La Laguna di Venezia e la flora macroalgale di questo ambiente sono state trattate, direttamente ed indirettamente, da numerosi autori. Infatti, a partire da un primo saggio di Olivi del 1794, riguardante una nuova specie di *Ulva* Linnaeus, fino al gennaio 2009 ci sono stati circa 242 articoli che hanno trattato le macrofite della Laguna di Venezia (Sfriso *et al.*, 2009). Da quanto riportato nella *check-list* di Sfriso e collaboratori del 2009, risulta che nella Laguna di Venezia siano presenti 300 *taxa* di macroalghe di cui 163 specie di Rhodophyta, che rappresentano il 54.3% del totale, seguite da 78 specie di Chlorophyta (26%) e dalle Ochrophyta con 59 specie (19.7%). Tale numero è tuttora in costante aumento (Sfriso *et al.*, 2010, 2012b, 2014a; Sfriso & Facca, 2011, 2013; Wolf *et al.*, 2011a, 2011b, 2012, 2014; Marchini *et al.*, 2015).

Molti degli studi sulle macroalghe sono stati effettuati durante il XIX e il XX secolo e le più consistenti informazioni sulla flora della laguna veneta sono di Zanardini, che tra il 1841 e il 1871 ha scritto sei monografie sulla flora mediterranea-adriatica. Molti altri studi si sono susseguiti tra la fine dell'Ottocento e la fine del secolo successivo: tra gli ultimi ricordiamo Pignatti (1962), Pignatti & Wikus (1962), Pignatti & Pignatti (1966) e La Rocca (1976). In ogni caso la maggior parte della letteratura è stata prodotta durante gli anni Ottanta del Novecento e la prima *check-list* di questo periodo è stata redatta da Sfriso (1987) che studiò le macroalghe trovate nella laguna e sulla linea di costa dell'isola del Lido. Sfriso & Curiel (2007) hanno successivamente effettuato

una completa revisione delle specie trovate nella Laguna di Venezia fino al 2004, la quale riportava 277 *taxa*.

La maggior distribuzione macroalgale è stata raggiunta negli anni '70-'80, probabilmente a causa dall'aumento dell'eutrofizzazione della Laguna di Venezia degli anni '60 e '70. In quegli anni l'alta produzione primaverile era stata seguita però da intensi fenomeni di anossia, causa della morte di pesci e di organismi bentonici, e da una marcata riduzione della biodiversità lagunare (Sfriso *et al.*, 2009). Nei primi anni '90 la laguna è stata affetta da altri stress antropici, connessi alla pesca del mollusco *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve). La pesca di questo bivalve ha causato la distruzione dei fondali, riducendo la biodiversità della macrofauna e causando la risospensione di una grande quantità di sedimenti (Orel *et al.*, 2000), con drammatiche conseguenze ambientali (Sfriso *et al.*, 2005), alcune delle quali hanno portato, in aggiunta ad una riduzione della biomassa di fitoplancton e di microfitobenthos, anche ad una drastica riduzione della biomassa delle macrofite (Facca *et al.*, 2002a, 2002b).

Al giorno d'oggi, l'eutrofizzazione e i suoi effetti ambientali stanno diminuendo e il numero di *taxa* della flora locale sta aumentando, nonostante un cospicuo numero di specie caratteristiche di ambienti di alta qualità siano scomparse. Ciò è dovuto non solo al recupero dell'ambiente lagunare, ma anche all'intensificarsi dei monitoraggi effettuati con la conseguente scoperta di nuovi *taxa* che, anno dopo anno, sono stati aggiunti alla *check-list* locale (Sfriso *et al.*, 2009).

Un altro fattore che ha notevolmente influenzato la biodiversità macroalgale nel corso degli ultimi decenni è stato l'introduzione di nuove specie alloctone (NIS). I meccanismi di trasporto di organismi esotici nell'ambiente marino sono largamente associati al commercio marittimo e alle attività di acquacoltura. Insieme, questi vettori sono la causa dell'85% dei casi accertati di introduzioni di macroalghe alloctone (Ribera Siguan, 2003; Williams & Smith, 2007). Tali meccanismi includono: il *fouling*, il trasporto di organismi planctonici o frammenti di organismi nell'acqua di zavorra delle navi, i trasferimenti volontari di organismi, il trasferimento di prodotti alimentari vivi, congelati o disidratati, il trasporto di organismi algali associati alle specie *target* degli allevamenti di acquacoltura (Wallentinus, 2002; Ribera Siguan, 2003).

Con il termine *fouling* ci si riferisce agli organismi che usano gli scafi delle navi come substrato di attacco durante le traversate (Carlton & Hodder, 1995). Come riportato in uno studio di Ribera Siguan (2003), dei 189 *taxa* di alghe marine aliene e angiosperme presenti in tutto il mondo, 39

sono state introdotte attraverso il *fouling* degli scafi. Nonostante le misure preventive contro l'inquinamento biologico (Naylor *et al.*, 2001), l'acquacoltura rimane un'altra importante causa dell'alto numero di introduzioni di macroalghe registrate negli ultimi decenni, soprattutto per quanto riguarda gli allevamenti di bivalvi. In particolare, alcune introduzioni algali in Laguna di Venezia si sono verificate come conseguenza della loro associazione con vongole della specie *Ruditapes philippinarum* introdotte massivamente in laguna agli inizi degli anni '80 (Wolf *et al.*, 2011b, 2014; Sfriso *et al.*, 2014b). Inoltre, l'aumento delle temperature medie invernali delle acque marine, osservato nel corso degli ultimi cinquant'anni, facilita la colonizzazione delle specie provenienti da zone tropicali attraverso un aumento dei loro tassi di crescita e di reclutamento (Stachowicz *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2014).

È tuttavia possibile che alcune di queste specie macroalgali fossero già presenti in passato, ma non siano mai state registrate per svariati motivi quali: pochi studi, chiavi tassonomiche non aggiornate, piccola taglia o scarsa distribuzione della specie, metodi di campionamento e identificazione non sempre appropriati (Sfriso *et al.*, 2009).

1.3 Il genere *Ceramium* Roth (Ceramiaceae, Rhodophyta)

Ceramium Roth è uno dei generi con il maggior numero di specie all'interno del phylum Rhodophyta (Cho *et al.*, 2003a; Wolf *et al.*, 2011a). Infatti, attualmente esistono 579 nomi di specie, sottospecie e varietà di *Ceramium*, di cui però solamente 211 sono stati accettati come validi a livello tassonomico (Guiry & Guiry, 2018). Questo genere ha una distribuzione cosmopolita e molte specie sono presenti nelle zone eulitorali o subtidali di aree costiere di climi tropicali e temperati-freddi (Maggs *et al.*, 2002). Probabilmente l'ampia distribuzione delle specie appartenenti a questo genere è dovuta alla loro capacità, in parte di aderire allo scafo delle navi (*fouling*) e ai substrati di vari prodotti ittici, in parte di sopravvivere all'interno delle acque di zavorra. In questo modo le specie di *Ceramium* sono in grado di colonizzare nuovi ambienti al di fuori del loro areale di distribuzione di origine, favorite dai traffici navali e dalle attività di acquacoltura (Boudouresque & Verlaque, 2002; Mineur *et al.*, 2007; Grosholz *et al.*, 2015). Dal momento della costituzione del genere *Ceramium* nel 1797 da parte di A.W. Roth, ci sono state molte modifiche a livello tassonomico e nomenclaturale e, sebbene siano stati effettuati numerosi

studi, la sistematica di questo genere è tuttora molto complessa (Maggs *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003a, 2008; Skage *et al.*, 2005; Barros-Barreto *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2011a).

Le specie di questo genere presentano talli filamentosi di forma cilindrica o leggermente compressa caratterizzati da assi monosifonali circondati da altre cellule a formare una struttura chiamata *cortex*. La corticizzazione può essere limitata ai nodi, oppure le cellule corticali possono avvolgere anche la zona degli internodi dando origine a un tallo completamente corticato (Maggs & Hommersand, 1993) (Fig. 1).

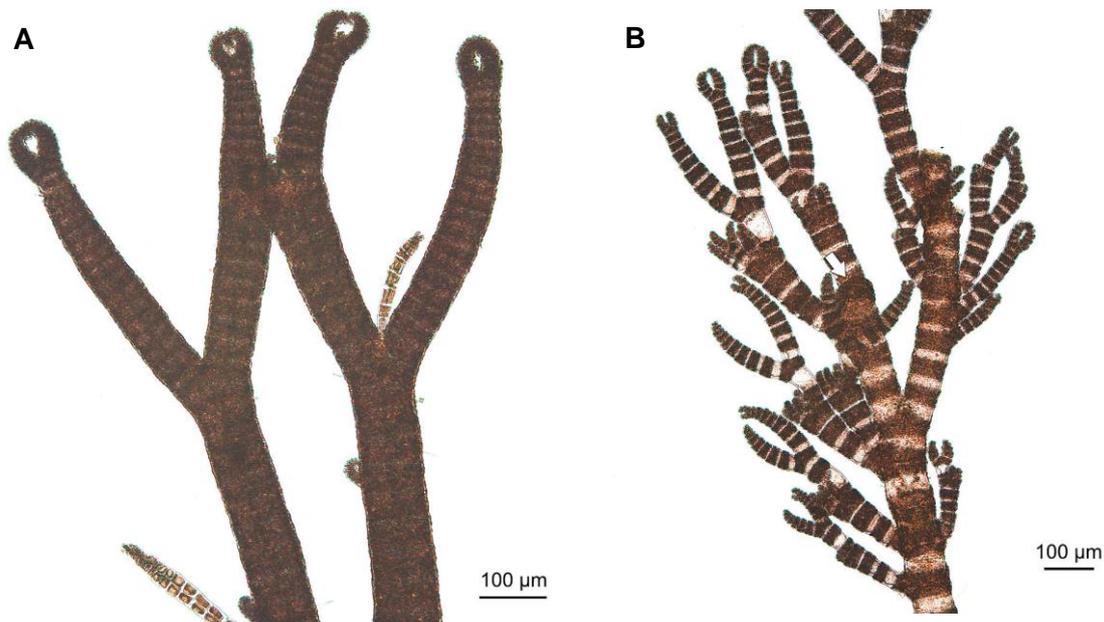


Figura 1. A) Esempio di tallo completamente corticato. B) Esempio di tallo parzialmente corticato. Immagini tratte da Wolf *et al.*, 2011a.

Il tallo può essere eretto, raggiungendo altezze fino a circa 30 cm, o può essere parzialmente o interamente prostrato e aderisce al substrato tramite rizoidi (unicellulari o pluricellulari) che spesso terminano in dischi basali (Maggs & Hommersand, 1993). Le ramificazioni del tallo variano da alternate-distiche a pseudodicotomiche, con le estremità degli assi che possono essere dritte, incurvate o involute (Maggs & Hommersand, 1993).

Le caratteristiche morfologiche che permettono di distinguere una specie da un'altra sono: 1) il *pattern* di ramificazione; 2) la presenza/assenza di spine corticali; 3) il diametro degli assi principali; 4) il numero di cellule periassiali; 5) il grado di corticizzazione; 6) le caratteristiche di alcune strutture riproduttive quali i tetrasporangi (Dixon, 1960; Womersley, 1978; Cribb, 1983;

Millar, 1990; Maggs & Hommersand, 1993; Barros-Barreto & Yoneshigue-Valentin, 2001; Cho *et al.*, 2001).

1.4 Caratteri diagnostici vegetativi

I *patterns* di ramificazione dei filamenti sono uno dei fondamentali caratteri morfologici utilizzati per discriminare tra le specie di questo genere. Le ramificazioni di numerose specie, come abbiamo detto, variano da alternate a pseudo-dicotomiche (Dixon, 1960; Maggs & Hommersand, 1993), ma non esiste una vera dicotomia (South & Skelton, 2000). La crescita degli assi è monopodiale ed avviene da una divisione obliqua delle cellule apicali seguita da un allungamento della cellula assiale (Maggs & Hommersand, 1993). Le ramificazioni laterali si originano abassialmente a intervalli più o meno regolari (Maggs & Hommersand, 1993). Molte specie presentano ramificazioni complanari nelle parti giovani ed in attiva crescita, e tale *pattern* può essere mantenuto indefinitamente in alcune specie, mentre in altre molti rami laterali nascono occasionalmente da cellule periassiali e danno origine a ramificazioni casuali (Womersley, 1978).

Le spine, qualora presenti, sono utili caratteri diagnostici poiché la forma e il numero delle cellule che le compongono risulta differente tra le varie specie (Dixon, 1960; Womersley, 1978) (Fig. 2). Alcuni studi, però, hanno suggerito che la presenza di spine corticali non è un carattere diagnostico che può essere usato per dedurre le relazioni tra le specie di *Ceramium* (Skage *et al.*, 2005).

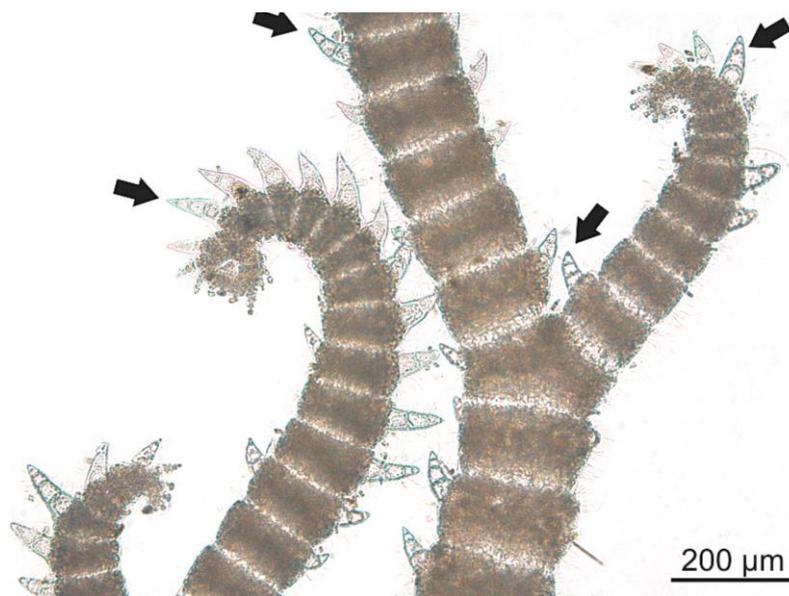


Figura 2. Esempio di tallo con spine corticali formate da 4 cellule. Immagine tratta da Wolf *et al.*, 2011a.

Anche lo spessore dell'asse principale, pur variando considerabilmente nella maggior parte delle specie, è spesso stato usato come carattere utile a livello tassonomico (Womersley, 1978).

Un altro importante carattere diagnostico è il numero delle cellule periassiali da cui si sviluppano le cellule corticali (Womersley, 1978). In generale, nelle diverse specie di *Ceramium*, vengono formate tra 3 e 10 cellule periassiali e normalmente, all'interno della stessa specie, il loro numero non può variare che per più di una cellula (Womersley, 1978). Le cellule periassiali solitamente producono 2 cellule corticali anteriori e da 1 a 3 (solitamente 2) posteriori (Maggs & Hommersand, 1993) (Fig. 3).

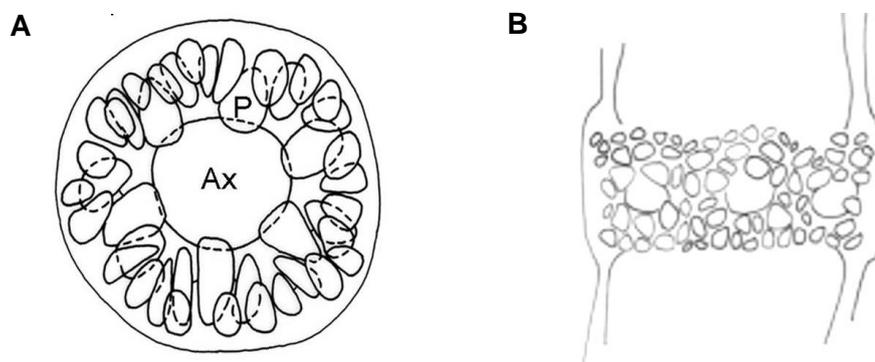


Figura 3. A) Sezione trasversale del tallo. Cellule assiali (Ax) e cellule periassiali (P). B) Sezione longitudinale del tallo a livello della corticizzazione. Immagini tratte da Cho *et al.*, 2003a e Barros-Barreto *et al.*, 2006.

In molte specie di *Ceramium*, il filamento corticale forma bande nodali separate ma in altre specie esso copre gli assi completamente (Barros-Barreto *et al.*, 2006) (Fig. 1). La struttura e il grado di corticizzazione sono, infatti, altri importanti caratteri utili nella discriminazione tra le specie di *Ceramium* (Womersley, 1978; Cho *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002). È interessante notare però che il grado di corticizzazione, in alcune specie, può dipendere dalla stagione di crescita e dal microhabitat (Garbary *et al.*, 1978; Cormaci & Motta, 1987). La corticizzazione è spessa da 1 a 3 cellule e può essere continua sopra le cellule assiali, o discontinua, formando delle bande ai nodi, e le cellule corticali possono essere più o meno aderenti alla cellula assiale (Maggs & Hommersand, 1993). Secondo South & Skelton (2000) e Maggs & Hommersand (1993) anche la curvatura degli apici è un importante carattere diagnostico, sebbene Womersley (1978) affermi che questo carattere debba essere usato con attenzione. Infatti, gli apici, che crescono attivamente, nella maggior parte delle specie sono involuti, spesso nettamente, ma se la crescita è lenta, o è cessata, gli apici possono diventare praticamente dritti (Womersley, 1978).

1.5 Ciclo vitale e caratteri diagnostici riproduttivi

Generalmente le alghe hanno un ciclo vitale bifasico, o quello che viene chiamato un ciclo aploide-diploide. Questi organismi alternano una fase sessuata dove le cellule sono aploidi (n) ed una fase asessuata dove le cellule sono diploidi ($2n$). Per meiosi, gli individui diploidi producono spore aploidi, che, successivamente, si sviluppano in adulti maschili e femminili aploidi chiamati gametofiti. I gametofiti adulti producono gameti femminili e maschili, la cui fusione produce adulti diploidi, gli sporofiti, completando il ciclo vitale. *Ceramium*, come le altre alghe rosse, ha un ciclo bifasico modificato – ciclo trifasico (Fig. 4) – con l'aggiunta di un breve stadio diploide chiamato carposporofito che si forma dall'unione dei gameti aploidi (Edwards, 1973; Garbary, 1988; Thornber, 2006). Questo carposporofito vive sul tallo femminile, dal quale acquisisce i nutrienti. Esso produce spore diploidi, chiamate carpospore, che sono rilasciate nell'acqua, e si sviluppano in tetrasporofiti maturi, che vivono liberi. I tetrasporofiti, per meiosi, producono tetraspore (ciascuna spora è formata in un gruppo di quattro) che sono rilasciate nella colonna d'acqua, dove si sviluppano in gametofiti maschili e femminili.

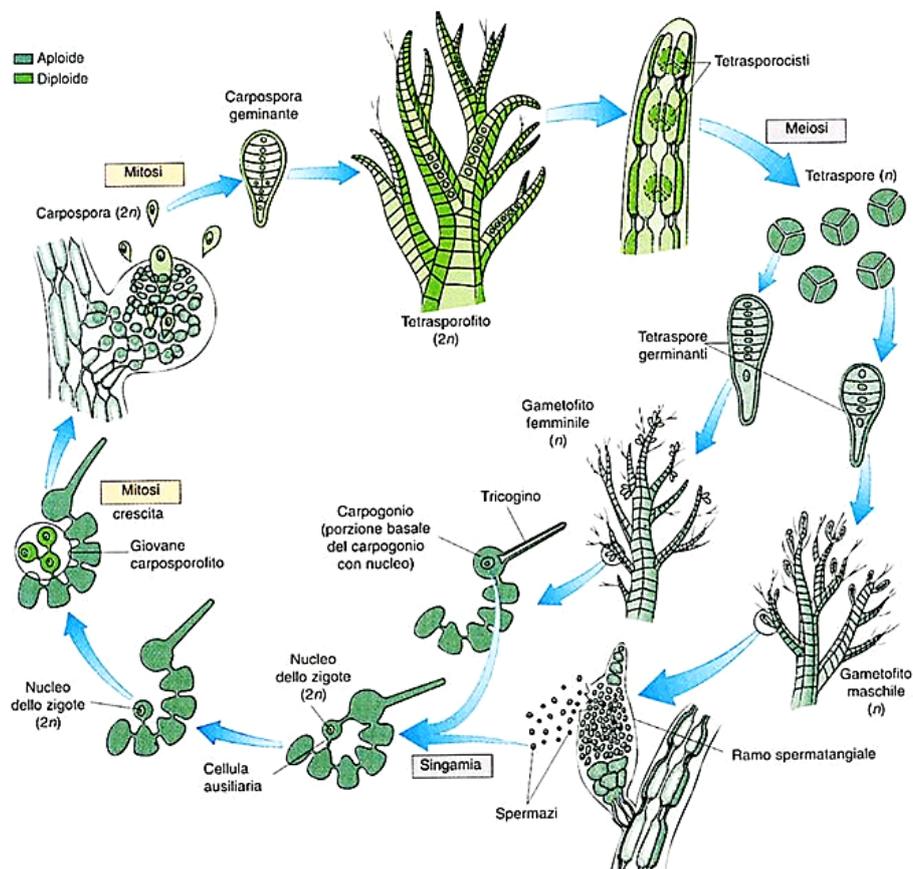


Figura 4. Schema del ciclo trigenetico. Immagine tratta da Karleskint et al., 2009.

I tetrasporangi, le strutture riproduttive che, per meiosi, originano le tetraspore, offrono caratteri tassonomici utili in molte specie (Womersley, 1978). Nelle specie non completamente corticate i tetrasporangi sono prodotti solo dalle cellule periassiali e due o tre tetrasporangi si originano da una singola cellula parentale (Nakamura, 1965; Cho *et al.*, 2001, 2003a), mentre nelle specie più corticate i tetrasporangi possono originarsi anche dalle cellule corticali e un singolo tetrasporangio si origina da ogni cellula parentale (Cho *et al.*, 2003b). Il grado di protezione involucreale dato dai filamenti corticali varia nelle diverse specie da molto leggera a quasi completa (Womersley, 1978). Ad esempio, nelle specie con una completa corticizzazione, i tetrasporangi sono solitamente immersi completamente all'interno della *cortex* (Womersley, 1978).

C'è una considerevole variabilità anche nel numero e nella disposizione dei tetrasporangi nella banda corticale (South & Skelton, 2000). Mentre nella maggioranza delle specie i tetrasporangi sono prodotti in spirali (South & Skelton, 2000), in alcune specie con filamenti molto sottili, invece, i tetrasporangi si trovano normalmente in singola fila ed in altre ancora sono disposti in verticilli (Womersley, 1978) (Fig. 5). I tetrasporangi maturi possono considerevolmente variare per dimensioni e per la modalità di divisione anche all'interno di una stessa specie (Womersley, 1978). Per questo motivo tale carattere deve essere considerato in combinazione ad altri caratteri diagnostici per una corretta discriminazione tra specie (South & Skelton, 2000).

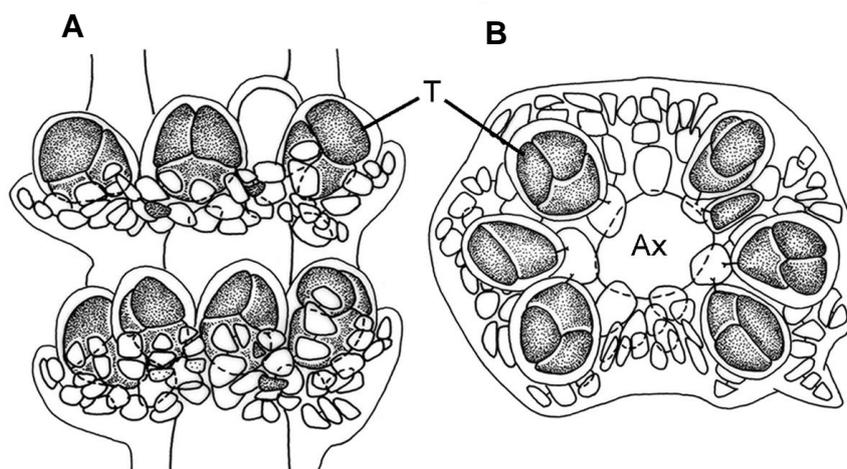


Figura 5. Sezione longitudinale (A) e trasversale (B) del tallo in cui sono visibili i tetrasporangi (T) nella corticizzazione. Immagine tratta da Cho *et al.*, 2003a.

Il carposporangio, la struttura riproduttiva in cui, dopo la fecondazione, si formano le carpospore, per la maggior parte degli autori non fornisce informazioni che possono essere utili a livello tassonomico (Womersley, 1978; Maggs & Hommersand, 1993; Boo & Lee, 1994).

I caratteri morfologici utilizzati per discriminare tra specie sono quindi molteplici, ma non tutti sono riconosciuti unanimemente validi dagli esperti, causando confusione a livello sistematico.

1.6 Problematiche nella sistematica del genere *Ceramium*

Classicamente, le specie di *Ceramium* sono state identificate tramite l'osservazione di strutture come l'assetto dei filamenti corticali, la morfologia e lo sviluppo dei tetrasporangi (Hommersand, 1963; Abbott, 1999) ed altri caratteri tassonomici appena descritti. In generale, però, l'utilizzo delle caratteristiche morfologiche per discriminare tra le specie di questo genere mostra alcuni limiti.

Secondo numerosi autori questi problemi sono collegati all'alto grado di variabilità dei caratteri morfologici usati classicamente per il riconoscimento delle specie (Dixon, 1960; Boo & Lee, 1994; Maggs *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003b). Inoltre, alcuni di questi caratteri presentano delle difficoltà di interpretazione a causa della loro complessità e non sono sempre ritenuti validi da tutti gli autori. Così, utilizzando criteri diversi, la discriminazione delle specie non può risultare univoca.

Per quanto riguarda le difficoltà di interpretazione dei caratteri tassonomici possiamo riportare un esempio prendendo spunto da uno studio di Dixon (1960). Egli ha osservato che l'unico modo per determinare il corretto numero di cellule periassiali è sezionando il tallo, ma anche allora la determinazione può essere difficoltosa se la sezione non passa lungo la parte superiore della cellula assiale. Per individuare il corretto numero di cellule periassiali, dunque, è fondamentale operare una sezione nel punto esatto. Un lieve discostamento da questo punto può quindi portare ad una errata determinazione del carattere tassonomico, che può a sua volta essere causa di una scorretta classificazione a livello di specie.

Ci sono poi altri fattori che concorrono ai problemi tassonomici del genere *Ceramium*. Infatti, studi colturali hanno evidenziato che le condizioni ambientali possono notevolmente influire sulla morfologia delle specie di questo genere. Questo fa sì che una stessa specie, in condizioni ambientali diverse, possa sviluppare fenotipi piuttosto differenti. Ad esempio, il grado di

corticazione, la curvatura degli apici e i *patterns* di ramificazione vengono influenzati dalle condizioni colturali quali la temperatura, la luce e il fotoperiodo (Garbary *et al.*, 1978; Suh & Lee, 1984; Cormaci & Motta, 1987; South & Skelton, 2000).

Per alcune specie un altro problema consiste nella mancanza di campioni tipo, cioè campioni su cui la specie è stata descritta per la prima volta dall'autore. Molto spesso, infatti, gli autori non depositavano il materiale originale in Musei o Orti Botanici ma possedevano collezioni private, che nel tempo si sono perse, o descrivevano la specie attraverso illustrazioni fatte a mano. Questo rende spesso difficile paragonare i campioni freschi con quelli originali di riferimento (Maggs *et al.*, 2002).

In aggiunta, spesso le specie di *Ceramium* hanno dimensioni contenute (Womersley, 1978) e si possono presentare in forma epifitica (South & Skelton, 2000). Va poi ricordato che ci sono specie criptiche all'interno di questo genere. Infatti, alcune specie sono talmente simili morfologicamente da non poter essere discriminate tra loro se non a livello genetico.

Sebbene eccellenti flore algali regionali forniscano delle guide accurate per l'identificazione basate sulla morfologia, la validità delle specie riconosciute può essere questionata (Maggs *et al.*, 2002). Il problema principale, secondo Maggs *et al.* (2002), sta nella mancanza di criteri oggettivi in grado di stabilire se i differenti fenotipi rappresentino forme di crescita influenzate dall'ambiente o se rappresentino diversi genotipi.

Come è già stato accennato, il numero di specie registrate attualmente è 211, ma esistono 579 nomi per le specie del genere *Ceramium* (Guiry & Guiry, 2018). Fino al 2011 il numero totale di specie, sottospecie e varietà arrivava addirittura a 893 nomi (con soli 177 nomi accettati) (Wolf *et al.*, 2011a). L'evidente discrepanza tra il numero di specie accettate e quelle esistenti è dovuta all'esistenza di moltissimi nomi invalidi e sinonimi, con la conseguente presenza di più nomi per una stessa specie o di un unico nome per più specie in realtà distinte. Era infatti possibile che una stessa specie presentasse fenotipi diversi ma che questi fossero, in realtà, geneticamente identici e che vi venissero attribuiti più nomi; come era pure possibile identificare sotto lo stesso nome più specie, geneticamente diverse ma fenotipicamente simili. Era anche comune il caso in cui un gruppo di specie venisse riunito sotto un unico nome, come ad esempio il “*C. rubrum species complex*” ed il “*C. strictum species complex*” (Garbary *et al.*, 1978; Rueness, 1978; Maggs & Hommersand, 1993; Maggs *et al.*, 2002; Gabrielsen *et al.*, 2003).

Poiché le alghe rosse marine, come il *Ceramium*, sono morfologicamente molto variabili, per una corretta identificazione e descrizione dei diversi *taxa* risulta necessario uno studio combinato della morfologia e delle sequenze genetiche (Cho *et al.*, 2003a). In generale, infatti, la validità di alcune caratteristiche morfologiche per discriminare le specie di *Ceramium* è stata messa in dubbio da risultati di analisi molecolari (Maggs *et al.*, 2002). L'utilizzo di *marker* molecolari per delimitare le specie, dunque, ha sempre più importanza per studiare la biodiversità del genere *Ceramium* (Maggs *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003a, 2008; Gabrielsen *et al.*, 2003; Skage *et al.*, 2005; Barros-Barreto *et al.*, 2006, Wolf *et al.*, 2011a).

1.7 Metodo del DNA *Barcoding* per l'identificazione delle specie macroalgali

Il metodo del DNA *Barcoding* è stato proposto da Hebert e collaboratori nel 2003 per far fronte ai problemi tassonomici derivati dalla difficoltà di una corretta identificazione delle specie. Egli sostiene, infatti, che per qualsiasi specie, sia animale che vegetale, l'identificazione basata sull'analisi dei soli caratteri morfologici presenta quattro significanti limitazioni: 1) la plasticità fenotipica dei caratteri diagnostici impiegati nel riconoscimento, 2) la presenza di *taxa* criptici, comuni in molti gruppi (Knowlton, 1993; Jarman & Elliott, 2000), 3) la complessità delle chiavi dicotomiche in uso che le rendono spesso uno strumento alla portata di soli esperti sistematici, e 4) la non completezza delle chiavi morfologiche che spesso sono limitate ad un particolare stadio di sviluppo per cui molti individui non possono venire identificati.

Più in particolare, per quanto riguarda le alghe rosse, la difficoltà di identificazione dei *taxa* è legata a fattori quali la presenza di morfologie molto semplici, la variabilità fenotipica influenzata dalle condizioni ambientali e i cicli vitali con alternanza di generazioni eteromorfe (Saunders, 2005, 2008; Walker *et al.*, 2009; Clarkston & Saunders, 2010). È ormai chiaro, quindi, che la distinzione tra specie effettuata utilizzando dati morfologici vegetativi e/o riproduttivi è spesso problematica (Leliaert *et al.*, 2014). Secondo molti autori, infatti, per la descrizione di una specie dovrebbe venire usato un approccio polifasico che includa una combinazione di caratteri morfologici, ecologici e molecolari (Saunders, 2008, 2009; Destombe *et al.*, 2010).

Da ormai qualche anno, quindi, molti ricercatori si avvalgono del metodo del DNA *Barcoding* che si basa sull'analisi di una breve sequenza di DNA da una regione standardizzata del genoma

(*marker* molecolare) come ulteriore strumento diagnostico. La tecnica di base del DNA *Barcoding* prevede l'estrazione del DNA da una piccola porzione di campione, la successiva amplificazione tramite la tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR) del *marker* molecolare scelto e il sequenziamento del prodotto ottenuto (Nielsen & Matz, 2006).

Uno dei vantaggi di questo metodo è che, mentre anche la più completa analisi morfologica esamina, al massimo, solo poche decine di caratteri, un *marker* molecolare contiene da centinaia a migliaia di caratteri (Clarkston & Saunders, 2010).

Queste sequenze nucleotidiche o “*barcodes*” genetici possono essere immaginate come dei veri e propri codici a barre, in grado di identificare univocamente a livello di specie il campione in esame (Clarkston & Saunders, 2010). A sostegno di tale metodo è stato creato il *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), un consorzio internazionale di vari enti di ricerca che supporta lo sviluppo del DNA *Barcoding* come uno standard internazionale per l'identificazione delle specie (Marshall, 2005).

È importante notare che per l'utilizzo di questa tecnica il campione può essere in qualsiasi stadio di sviluppo o essere costituito anche solo da un piccolo frammento (Nielsen & Matz, 2006). In questo modo è possibile analizzare anche individui che non presentano chiari caratteri diagnostici.

Per utilizzare questo metodo (Fig. 6) è essenziale avere a disposizione una banca dati di sequenze di riferimento, generata a partire da campioni tipo accuratamente identificati (Newmaster *et al.*, 2006). Attualmente esistono diverse banche dati di sequenze nucleotidiche che vengono costantemente aggiornate e fanno parte del progetto [International Nucleotide Sequence Database Collaboration](#), quali *GenBank* prodotta e mantenuta dal *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) statunitense, la *DNA DataBank* (DDBJ) giapponese e la *European Nucleotide Archive* (ENA) europea. Oltre a queste è stata fondata in Canada nel 2005 una banca dati che raccoglie solamente sequenze di determinati *marker* selezionati per il metodo del DNA *Barcoding*: la *Barcode of Life Data System* (BOLD).

Queste banche dati vengono poi utilizzate per confrontare le sequenze di *barcode* ottenute dagli organismi in esame con quelle note (Saunders, 2005; Robba *et al.*, 2006; Maggs *et al.*, 2007). Il campione viene identificato in base alla sua percentuale di identità nucleotidica con le sequenze

presenti nella banca dati (Hajibabaei *et al.*, 2007) tramite il programma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

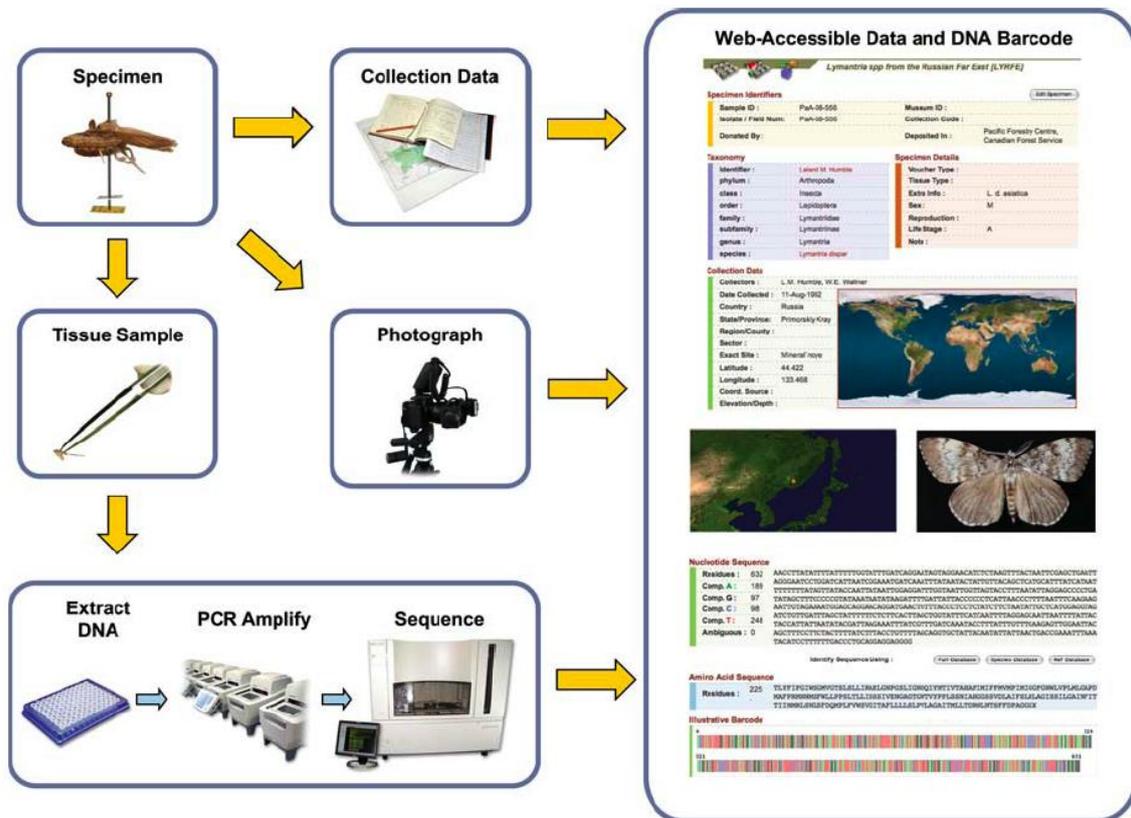


Figura 6. Fasi principali del metodo del DNA Barcoding. Immagine tratta da Floyd *et al.*, 2010.

Sebbene questa tecnica sia un elemento chiave per le ricerche tassonomiche (Stoeckle, 2003; Tautz *et al.*, 2003), essa non può sostituire completamente la tassonomia descrittiva tradizionale (Dunn, 2003; Lipscomb *et al.*, 2003; Seberg *et al.*, 2003). Ad esempio, quando un campione sconosciuto non trova corrispondenza nella banca dati delle sequenze, è necessaria un'accurata analisi morfologica per l'assegnazione di questo campione a una nuova specie (Hajibabaei *et al.*, 2007).

1.8 Marker molecolari utilizzati

Molte regioni geniche sono state impiegate per la sistematica a livello di specie e dai primi anni Novanta il numero degli studi sulla validità delle diverse regioni come *barcode markers* sono aumentati costantemente (Hajibabaei *et al.*, 2007; Maggs *et al.*, 2007). Il CBOL, periodicamente, si riunisce per valutare, alla luce dei più recenti studi, quali siano i *marker* migliori. Un *barcode marker*,

per poter essere valido, deve possedere alcune caratteristiche fondamentali. Per prima cosa deve essere universale, cioè deve essere presente nel genoma di tutti gli organismi presi in esame, deve poi essere sufficientemente variabile per poter discriminare tra le specie e deve essere presente in singola copia all'interno del genoma. Per quanto riguarda gli animali è stato selezionato un *marker* universale, un frammento di circa 600 paia di basi del gene mitocondriale citocromo c ossidasi 1 (COI), mentre per quanto riguarda le piante è stato più difficile definire un unico *marker* e per ora sono state approvate due regioni di geni plastidiali, la maturasi K (*matK*) e la subunità grande dell'enzima RuBisCO (*rbcL*) (www.ibol.org).

Per le alghe, sono stati usati molti *markers* di differenti organelli della cellula (DNA nucleare, plastidiale, mitocondriale) per studiare le relazioni filogenetiche a livello interspecifico e intraspecifico (Wolf *et al.*, 2012). Tra questi, la subunità grande della ribulosio-1,5-bifosfato carbossilasi/ossigenasi (*rbcL*) è uno dei *markers* usati più comunemente (Freshwater *et al.*, 1994). Non ci sono inserzioni o delezioni nell'*rbcL* delle alghe rosse, così l'allineamento delle sequenze non è ambiguo, facilitando l'uso di questo gene nelle analisi filogenetiche (Freshwater & Rueness, 1994; Freshwater *et al.*, 1994; Kamiya *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001; Maggs *et al.*, 2002; Yang & Boo, 2004). Inoltre, l'*rbcL* è il *marker* per il quale è stato prodotto il maggior numero di sequenze di riferimento disponibili nella banca dati *GenBank*.

Per quanto riguarda le macroalghe rosse è stato proposto come *marker standard* anche il COI-5P, la regione 5' del gene mitocondriale citocromo c ossidasi I, poiché la sua elevata variabilità lo rende efficace anche per la discriminazione tra specie strettamente correlate a livello genetico (Saunders, 2005, 2008). Il CBOL ha accettato il COI-5P come regione *barcode standard*, dato il suo successo nella maggior parte delle linee evolutive animali; comunque, l'efficacia del COI-5P in altre linee evolutive eucariotiche deve ancora venire valutata (Clarkston & Saunders, 2010). Per le alghe rosse, il COI-5P è stato usato molto spesso in studi tassonomici ma non è ancora stato validato come *marker di barcode* (Saunders, 2005, 2008; Robba *et al.*, 2006; Le Gall & Saunders, 2010).

Altri *marker* utilizzati per studi di sistematica ma non ancora accettati dal CBOL sono: l'ITS, ovvero *Internal transcribed spacer* dell'operone ribosomiale nucleare, molto usato per studi di filogeografia e di ecologia molecolare (Hayden & Waaland, 2004; Moniz & Kaczmarek, 2010); lo spaziatore intergenico plastidiale *rbcL-rbcS* tra il gene *rbcL* e il gene *rbcS* (codifica per la subunità

piccola della ribulosio-1,5-bifosfato carbossilasi/ossigenasi) che è stato dimostrato essere un buon *marker* per la discriminazione delle specie, essendo invariato all'interno di una specie, ma estremamente variabile a livello interspecifico (Cho *et al.*, 2003a; Skage *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2011a); e il *marker* plastidiale *tufA* che codifica per il fattore di elongazione Tu, molto usato per discriminare tra le specie di alghe verdi (Famà *et al.*, 2002; Zuccarello *et al.*, 2009; Händeler *et al.*, 2010).

1.9 Analisi filogenetiche

Tutti gli studi di sistematica molecolare hanno lo scopo di dedurre le relazioni tra specie sulla base dei *pattern* di sostituzione di basi nucleotidiche omologhe che variano all'interno di determinati gruppi tassonomici. Il risultato di queste analisi è un albero filogenetico (Swofford *et al.*, 1996). Un albero filogenetico è un grafico che mette in evidenza le relazioni a livello evolutivo tra specie e il grado di divergenza che separa i diversi *taxa*. In particolare, all'interno di un albero filogenetico un *clade* è rappresentato da un gruppo di due o più *taxa* che si sono evoluti da un progenitore comune e la lunghezza dei rami rappresenta il grado di divergenza che separa una specie dall'altra (Erickson & Driskell, 2012).

Le ricostruzioni filogenetiche sono di grande aiuto nel caso in cui si voglia assegnare un campione sconosciuto a una determinata specie o gruppo tassonomico. Infatti, l'identificazione di nuove specie è resa più semplice e veloce tramite l'inclusione delle rispettive sequenze di *barcode* in un albero filogenetico contenente sequenze appartenenti a specie note (Erickson & Driskell, 2012).

Per la costruzione di un albero filogenetico possono essere usati diversi metodi e nel caso di dati di DNA *Barcoding* viene utilizzato il metodo del *Neighbour Joining* (NJ) (Kumar & Gadagkar 2000; Hebert *et al.*, 2003). L'algoritmo alla base è stato creato da Saitou & Nei (1987) ed ha il compito di individuare l'albero che minimizzi la somma delle lunghezze dei vari rami. Questo metodo utilizza una matrice di distanza per la costruzione dell'albero filogenetico. La distanza è, in genere, il numero di mutazioni che occorrono per passare da una specie ancestrale alla specie in questione oppure da una specie ad un'altra. Le mutazioni in questione avvengono nelle sequenze di genoma molto spesso in modo poco prevedibile. La distanza viene ricavata attraverso l'allineamento di sequenze di genoma. Sulla base delle distanze tra le sequenze si costruisce una matrice delle distanze dove vengono segnati tutti i valori tra i possibili nodi dell'albero. Ci sono

diversi modelli evolutivi per il calcolo della matrice delle distanze che differiscono per il numero di parametri utilizzati e per la frequenza delle basi. Nel caso del DNA *Barcoding* viene usato il modello Kimura con due parametri (K2) (Hebert *et al.*, 2003).

1.10 Biodiversità del genere *Ceramium* in Laguna di Venezia

Fino al 2011 le specie di *Ceramium* riportate nelle *check-lists* locali erano state identificate tramite analisi morfologiche (Sfriso *et al.*, 2009). Solamente di recente è stato condotto uno studio di tipo molecolare sulla biodiversità di questo genere in Laguna di Venezia, limitato tuttavia alle aree delle bocche di porto di San Nicolò e Malamocco (Wolf *et al.*, 2011a).

Ad oggi, integrando i dati morfologici con quelli molecolari, risulta che in Laguna di Venezia sono presenti 12 specie di *Ceramium* di seguito elencate:

- *Ceramium ciliatum* (J. Ellis) Ducluzeau;
- *Ceramium cimbricum* H.E. Petersen;
- *Ceramium circinatum* (Kützing) J. Agardh;
- *Ceramium codii* (H. Richards) Feldmann-Mazoyer;
- *Ceramium derbesii* Solier ex Kützing (identificato in precedenza come *Ceramium secundatum* o *Ceramium rubrum* var. *barbatum*);
- *Ceramium deslongchampsii* Chauvin ex Duby;
- *Ceramium diaphanum* (Lightfoot) Roth;
- *Ceramium nudiusculum* (Kützing) Rabenhorst (identificato in precedenza come *Ceramium ciliatum* var. *robustum*);
- *Ceramium polyceras* (Kützing) Zanardini (identificato in precedenza come *Ceramium diaphanum* sensu Harvey);
- *Ceramium siliquosum* (Kützing) Maggs *et* Hommersand;
- *Ceramium tenerimum* (G. Martens) Okamura;
- *Ceramium virgatum* Roth.

2. SCOPO

Ceramium Roth è uno dei generi di alghe rosse (Rhodophyta) con il maggior numero di specie. Presenta una vasta distribuzione geografica che si estende dalle coste dei mari tropicali a quelle di climi temperati-freddi. Il genere è caratterizzato da un'elevata variabilità morfologica spesso influenzata dalle condizioni ambientali di crescita. Questo rende l'identificazione delle diverse specie molto difficile. Il problema di una corretta identificazione di queste specie algali è ancora maggiore in aree con un intenso traffico navale, come la Laguna di Venezia, in cui nuove specie alloctone possono essere facilmente introdotte da aree extra-mediterranee. Inoltre, fino al 2011, le specie di *Ceramium* riportate nelle *check-lists* locali erano state identificate solamente tramite analisi morfologiche e tuttora è stato condotto un unico studio molecolare confinato ad un areale ristretto della Laguna di Venezia. Lo scopo di questa tesi è stato, perciò, ampliare l'areale di monitoraggio includendo più siti di campionamento e analizzare i campioni di *Ceramium* sia da un punto di vista morfologico sia usando un approccio di tipo molecolare. Questo per avere un quadro di come è cambiata la biodiversità di questo genere negli ultimi anni nell'ambiente lagunare e monitorare l'introduzione di eventuali nuove specie alloctone. In particolare, è stato usato il metodo del DNA *Barcoding* che, tramite l'analisi di brevi frammenti del genoma, permette una rapida e univoca identificazione dei campioni in esame. È stato possibile, quindi, determinare alcune delle specie presenti nell'ambiente lagunare e litorale di Venezia e confrontarle con quelle segnalate in letteratura fino ad oggi. Oltre a specie comunemente presenti, è stato possibile individuare quattro specie nuove finora mai segnalate in queste aree. Un ulteriore scopo di questa tesi è stato, dunque, quello di ampliare le conoscenze a livello sistematico di questo genere e rendere disponibili alla comunità scientifica le sequenze nucleotidiche relative ai nuovi *taxa* per facilitarne l'identificazione anche in altre aree geografiche.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamenti

I campioni algali di *Ceramium* sono stati raccolti in 6 siti di campionamento, a partire dal mese di maggio 2017 fino al mese di ottobre 2017, nell'area del bacino centrale e del bacino meridionale della Laguna di Venezia (Fig. 7). Le stazioni di campionamento sono state scelte sia in punti interni alla laguna sia lungo il litorale marino in base alla distribuzione del genere *Ceramium* in Laguna di Venezia. Le località e le coordinate geografiche dei vari siti sono riportate in tabella A.



Figura 7. Laguna di Venezia e siti di campionamento.

Tabella A. Elenco delle stazioni di campionamento.

Stazione	Località	Coordinate geografiche
Stazione 1	Ca' Roman, Pellestrina	45°14'26.88"N 12°17'24.56"E
Stazione 2	Santa Maria del Mare, Pellestrina	45°19'56.00"N 12°19'2.89"E
Stazione 3	Diga Alberoni Faro, Lido di Venezia	45°20'8.35"N 12°20'14.16"E
Stazione 4	Torson di Sotto, Venezia	45°20'55.81"N 12°14'56.63"E
Stazione 5	Murazzi, Lido di Venezia	45°23'35.22"N 12°21'31.23"E
Stazione 6	Diga Faro di San Nicolò, Lido di Venezia	45°25'21.87"N 12°25'10.86"E

Gli esemplari algali sono stati raccolti a profondità comprese tra -1 e -2 m attraverso attività di *snorkeling*. In condizioni di bassa marea i campioni sono stati prelevati dagli scogli nella zona intertidale a pochi centimetri dalla superficie del mare. Oltre a campioni attaccati al substrato duro, quali rocce e gusci di animali, sono stati raccolti diversi esemplari presenti in forma epifitica su fanerogame marine quali *Zostera marina* Linnaeus.

3.2 Sorting e conservazione del materiale algale

Una volta raccolto, il materiale è stato mantenuto refrigerato durante il trasporto in laboratorio ed è stato poi selezionato attraverso un'attenta osservazione morfologica per mezzo di uno stereomicroscopio (Euromex, Olanda). Questa prima analisi morfologica mi ha permesso di separare i campioni appartenenti al genere *Ceramium* da specie all'apparenza molto simili come, ad esempio, quelle del genere *Centroceras* Kützing. Dopo aver opportunamente liberato il campione da impurità e da alghe epifite che avrebbero compromesso le analisi genetiche, una parte di ogni campione è stata conservata in gel di silice, per le analisi molecolari, mentre una parte è stata conservata in una soluzione al 4% formaldeide/acqua di mare, in modo da poter effettuare, qualora si fosse reso necessario, ulteriori osservazioni morfologiche più dettagliate.

3.3 Estrazione del DNA genomico

Per l'estrazione del DNA dai campioni è stato utilizzato un kit commerciale, il *Genomic DNA purification kit* (Thermo Scientific™). La prima fase dell'estrazione prevedeva la frantumazione del campione disidratato in gel di silice (5-15 mg di materiale algale) in un mortaio per mezzo di un pestello. Una volta ottenuta una polvere omogenea, sono stati aggiunti 200 µl di tampone fisiologico TE (Tris/HCl 10 mM pH 8 e EDTA 1mM pH 8) e si è mescolato fino ad ottenere un omogeneizzato privo di frammenti visibili. A questo punto sono stati aggiunti al composto 400 µl di *Lysis Solution* (fornita dal kit) e si è continuato a mescolare. Questa soluzione a base di detergenti ha la funzione di lisare il plasmalemma e denaturare le proteine di membrana. Si è dunque proceduto incubando il campione in un bagnetto termostatico a 65°C per 30 minuti e si sono aggiunti 600 µl di cloroformio. Entrambe le operazioni hanno lo scopo di denaturare le proteine eventualmente rimaste in soluzione. A questo punto, si è centrifugato il campione per 5 minuti ad una velocità di 11.000 giri al minuto (rpm). In questo modo si formano tre fasi: la fase

superiore è una fase acquosa, contenente il DNA, la fase intermedia contiene le proteine denaturate, mentre la terza fase, quella inferiore, è una fase organica composta da cloroformio, proteine e composti aromatici. Nel frattempo, è stata preparata la soluzione di precipitazione, mescolando 720 µl di H₂O milliQ con 80 µl di *Precipitation Solution* (fornita dal kit). La *Precipitation solution* a base di isopropanolo e sali serve a purificare ulteriormente e concentrare gli acidi nucleici, che precipitano insieme a parte dei sali e possono essere efficacemente separati da altri componenti cellulari più solubili. A questi 800 µl è stata aggiunta la fase acquosa superiore, contenente il DNA, e si è mescolato il tutto, capovolgendo numerose volte a temperatura ambiente per circa 1-2 minuti. Al termine di questa fase, si è centrifugato ulteriormente a 12.000 rpm per 10 minuti. Dopo questa operazione sul fondo dell'epENDORF si è formato un pellet bianco costituito dal DNA. Si è eliminato, a questo punto, il surnatante e si è sciolto il pellet in 100 µl di soluzione NaCl 1,2M (fornita dal kit), con la funzione di rompere i legami idrogeno tra il DNA e l'acqua. Successivamente sono stati aggiunti 300 µl di etanolo assoluto che, in presenza di cationi, induce modifiche strutturali nelle molecole di DNA, le quali si aggregano e tendono a precipitare, e si è incubato il campione a -20°C per tutta la notte. Si è proceduto poi a una nuova centrifugazione a 12.000 rpm per 10 minuti. L'etanolo assoluto è stato eliminato e sono stati aggiunti 300 µl di etanolo 70% che elimina i sali e le impurità rimaste e prepara il DNA alla reidratazione successiva. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 12.000 rpm per 5 minuti l'etanolo al 70% è stato eliminato ed il pellet ottenuto è stato sciolto in 20 µl di tampone TE. Al termine di questa operazione il DNA estratto è stato conservato a -20°C.

3.4 Amplificazione del DNA mediante PCR

La reazione a catena della polimerasi (*polymerase chain reaction*, PCR) è una tecnica di biologia molecolare condotta *in vitro* che permette di ottenere molteplici copie di specifiche regioni del genoma (amplificazione).

Per la reazione di amplificazione del DNA è necessaria una coppia di oligonucleotidi a singolo filamento (*primer*), che devono avere una sequenza nucleotidica complementare alle sequenze adiacenti al frammento di DNA da amplificare. I *primer* si ibridano ai filamenti opposti della doppia elica, in posizioni adiacenti alla sequenza *target*.

L'allungamento dei *primer* è catalizzato dalla *Taq* DNA polimerasi, un enzima termostabile isolato dall'eubatterio termofilo *Thermus aquaticus* Brock & Freeze (Saiki *et al.*, 1988), che utilizza i *dNTPs* liberi per estendere i due filamenti. Questo enzima è costituito da una singola catena polipeptidica, con un peso molecolare approssimativo di 95 kD, ed è caratterizzato da un'alta velocità per quanto riguarda l'attività polimerasica 5'→3', ma manca di attività esonucleasica 3'→5' (entrambe caratteristiche che rendono la *Taq* DNA polimerasi un enzima utile al sequenziamento del DNA). L'enzima è maggiormente attivo ad una temperatura attorno a 72°C. All'interno di un termociclatore, con una serie ripetitiva di cicli (25-35) durante i quali varia la temperatura, avvengono i tre passaggi fondamentali della reazione di PCR (Fig. 8). Questo strumento è necessario per mantenere in modo accurato le temperature di incubazione del campione e per passare rapidamente da una temperatura all'altra. I frammenti che vengono sintetizzati ad ogni ciclo serviranno a loro volta da template nei cicli successivi; in questo modo le copie della sequenza *target* raddoppiano ad ogni ciclo.

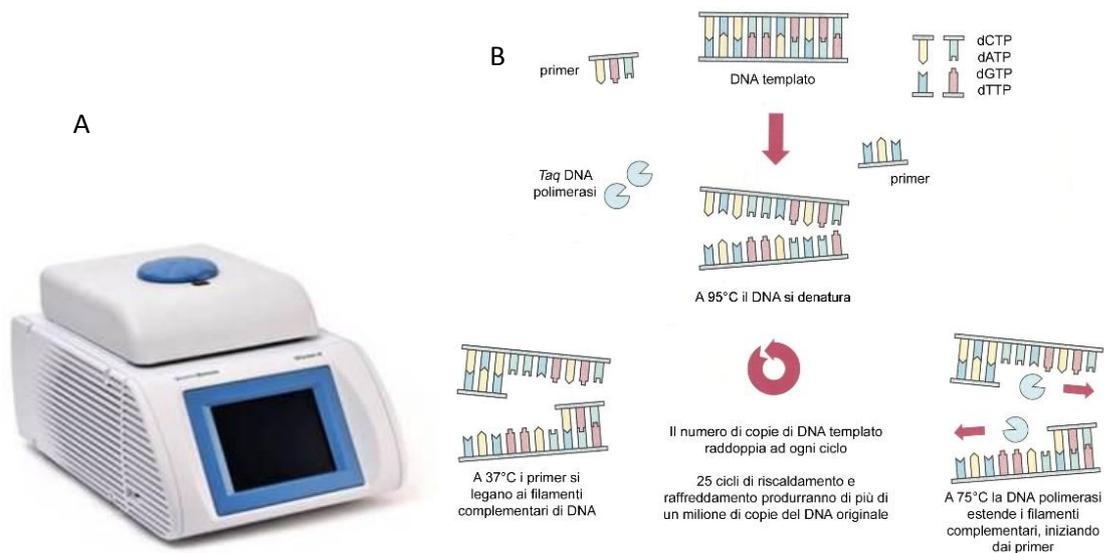


Figura 8. A) Immagine di termociclatore. B) Schema dei passaggi della reazione di PCR. Immagine tratta da Roche Molecular Biochemicals: PCR Application Manual.

- **Denaturazione della doppia elica di DNA.** Per questa reazione è necessaria una temperatura compresa tra i 92-95°C, tale da rompere i legami idrogeno tra i filamenti di DNA. È necessario impostare una temperatura così alta perché il template si denaturi completamente: in caso contrario c'è il rischio che il DNA si denaturi solo parzialmente; a questo punto tenderebbe a ricongiungersi rapidamente, impedendo un efficiente allineamento ed estensione dei *primer*.

- **Appaiamento dei *primer***, cioè l'attacco dei *primer* alle sequenze complementari. La temperatura a cui avviene l'allineamento va impostata a seconda dei *primer* utilizzati (l'intervallo entro cui varia è piuttosto ampio, dai 40°C ai 65°C). L'attacco dei *primer* è un momento critico per l'intera reazione, per questo è importante che la temperatura sia corretta, in quanto temperature troppo basse favoriscono l'appaiamento a sequenze non specifiche, mentre temperature elevate impediscono l'appaiamento (Wu *et al.*, 1991). Spesso quindi può essere necessario determinare empiricamente la temperatura di *annealing*, utilizzando nello stesso programma di PCR un gradiente di temperature diverse.
- **Estensione del nuovo filamento complementare di DNA** grazie alla *Taq* DNA polimerasi, a partire dai *primer*, con una temperatura di 72°C, ottimale per il funzionamento del catalizzatore.

Per l'amplificazione del gene plastidiale *rbcL*, che codifica per la subunità grande della ribulosio-1,5-bifosfato carbossilasi/ossigenasi, è stata preparata una miscela (mix per PRC) secondo le quantità riportate in tabella B per un volume totale di 50 µl. È stato utilizzato il kit di reagenti per PCR della Sigma-Aldrich.

Tabella B. Elenco dei reagenti della mix per PCR e le relative quantità.

H₂O	33,5 µl
10X	5 µl
MgCl₂	3 µl
Primer For	2,5 µl
Primer Rev	2,5 µl
dNTPs	1 µl
Taq	0,5 µl
DNA	2 µl
Totale	50 µl

Come riportato in tabella B, la mix per PCR conteneva, oltre ai *primer*, alla *Taq* polimerasi e al DNA del campione analizzato, altri reagenti di cui la composizione è elencata di seguito:

- 10X: tampone costituito da KCl (500 mM) e da Tris-HCl a pH 8,3 (200 mM);
- MgCl₂: il coenzima per la *Taq polimerasi*; lo ione Mg²⁺ forma un complesso solubile con i *dNTPs*, producendo il substrato che viene riconosciuto dalla *Taq DNA polimerasi*. Mg²⁺ è perciò un cofattore metallico che influenza l'attività dell'enzima e aumenta la temperatura di fusione (T_m) della doppia elica del DNA.
- *dNTPs*: una miscela equimolare di *dATP*, *dGTP*, *dCTP* e *dTTP*.

È stata infine aggiunta una quantità di H₂O tale da portare il volume totale a 50 µl, in base alla quantità (µl) di DNA inserita nella mix.

Per l'amplificazione del gene è stata scelta la coppia di primer F57 e R753 che amplifica un frammento di circa 700 paia di basi e di cui la sequenza nucleotidica è riportata da Freshwater *et al.* (1994). Una volta preparata la mix per PCR il tubino è stato collocato nell'apposito spazio all'interno del termociclatore QCyler II (Quanta Biotech).

I parametri fisici della reazione di PCR usati per l'amplificazione del gene *rbtL* sono stati tratti da Wolf *et al.* (2011a) e sono riportati in tabella C.

Tabella C. Parametri fisici della reazione di PCR.

Fase	Temperatura (°C)	Durata
Denaturazione iniziale	94	2'
	30 cicli	
Denaturazione	94	40"
Appaiamento	50	40"
Estensione	72	40"
	1 ciclo	
Estensione finale	72	5'

3.5 Elettroforesi su gel d'agarosio

I prodotti di PCR sono stati quantificati tramite elettroforesi su gel d'agarosio. L'agarosio è un polimero lineare che forma una matrice semisolida avente pori di dimensione diversa in funzione della concentrazione utilizzata. Questa tecnica impiega una matrice di agarosio immersa in una soluzione acquosa attraverso la quale, applicando un campo elettrico, il DNA, carico negativamente, migra verso il polo positivo (Fig. 9). La velocità di migrazione e conseguentemente la distanza percorsa all'interno del gel dipendono dalla dimensione del frammento di DNA. Infatti, più lunga è la molecola di DNA e più l'ingombro sterico renderà difficoltosa la migrazione del frammento attraverso i pori del gel.

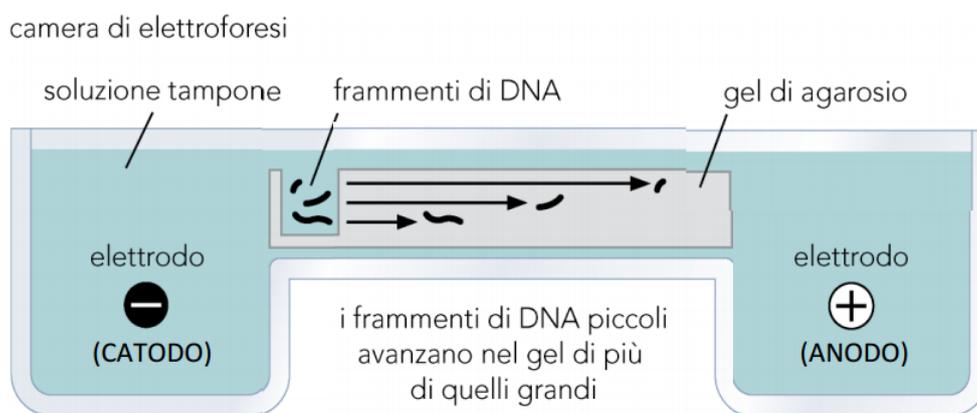
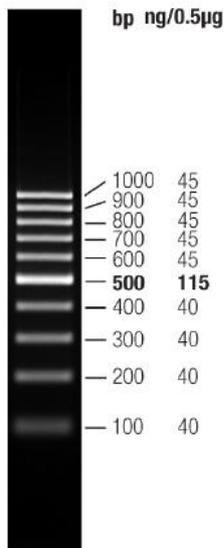


Figura 9. Schema dell'elettroforesi su gel d'agarosio. Immagine tratta da <http://elettroforesi.weebly.com>.

Il gel di agarosio 1% è stato preparato sciogliendo 0,8 g di agarosio in 80 ml di tampone Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (40 mM Tris (pH 7,6), 20 mM acido acetico, 1 mM EDTA), scaldando la soluzione per favorire lo scioglimento dell'agarosio. Una volta sciolto, sono stati aggiunti 8 μ l di SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (1 μ l per ogni 10 ml di gel). Questo composto è un intercalante che legandosi tra le basi viene usato per evidenziare la presenza del DNA alla luce UV, in quanto emette fluorescenza a 250-320 nm. A questo punto, dopo aver mescolato il tutto fino ad ottenere una soluzione omogenea, si è versata la soluzione nella vaschetta per la corsa elettroforetica, opportunamente sigillata e dotata di pettinino dentellato per permettere la formazione dei pozzetti, dove verrà caricato il DNA. In ogni pozzetto sono stati trasferiti 4 μ l del prodotto di

PCR e 1 μ l di tampone di caricamento 6X (Blu di bromofenolo in polvere 0,25% + 5ml di glicerolo + 5 ml di H₂O).



In un altro pozzetto, invece, sono stati caricati 5 μ l di uno standard di DNA (*Mass Ladder*) (*Thermo Scientific O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder*), di concentrazione e dimensioni note (Fig. 10) in modo da poter ricavare, attraverso l'altezza e l'intensità delle bande ottenute, la lunghezza e la concentrazione dei frammenti di DNA amplificati.

Figura 10. *Thermo Scientific O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder*.

A questo punto si è applicato un campo elettrico di 80 V e si è lasciato correre il DNA per 50 minuti. Una volta completata la corsa elettroforetica, il gel è stato rimosso dalla vaschetta e posizionato su un transilluminatore a raggi UV (250-320 nm) per evidenziare le bande di DNA e quantificare i prodotti di PCR ottenuti (Fig. 11).

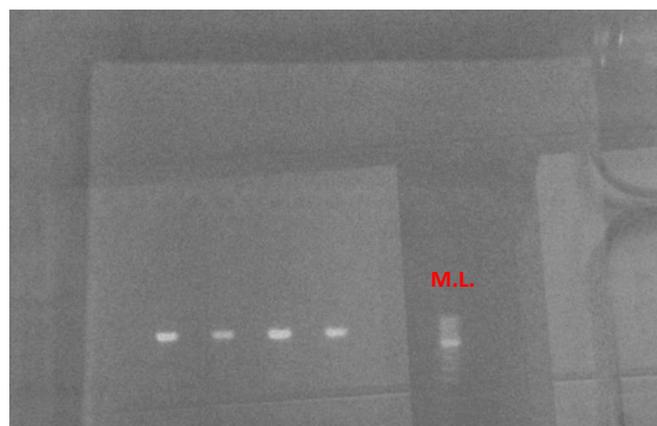


Figura 11. Esempio di elettroforesi su gel d'agarosio. Le prime quattro bande visibili agli UV rappresentano i prodotti di PCR amplificati confrontati con il Mass Ladder (M.L.) di riferimento (ultima banda).

3.6 Reazione enzimatica per la purificazione del DNA amplificato

La purificazione del DNA amplificato è fondamentale per ottenere un prodotto di PCR idoneo alla fase di sequenziamento. Questa procedura comporta l'eliminazione di *primer*, *dNTPs*, sali ed enzimi ancora presenti nella soluzione.

La purificazione è stata ottenuta tramite due enzimi: l'Esonucleasi I e la Fosfatasi alcalina usando il kit commerciale HT ExoSAP-IT (*Applied Biosystems*TM). Prima di procedere è stata determinata la dimensione (in pb) e la concentrazione (in ng/ μ l) del DNA amplificato, confrontandolo con il DNA standard. Questo è necessario per poter inviare al centro di sequenziamento scelto la quantità necessaria di prodotto di PCR purificato (in questo caso 1-2 ng di DNA ogni 100 pb dell'amplificato).

Sono stati quindi prelevati i microlitri necessari dal prodotto di PCR, in base alla stima effettuata mediante la comparazione con lo standard *Mass Ladder*, e riposti in appositi tubini per il sequenziamento. Ad un prodotto di PCR pari a 5 μ l sono stati aggiunti 2 μ l di HT ExoSAP-IT. I tubini sono stati inseriti nel termociclatore e sottoposti ad un apposito programma: 37°C per 15'; 80°C per 15'; 8°C per 5'.

Nel primo passaggio a 37°C i due enzimi eliminano i DNA a singola elica, i *dNTPs* e i *primer* ancora presenti. Nella seconda fase a 80°C i due enzimi vengono inattivati affinché non interferiscano con le reazioni di sequenziamento e, infine, l'ultimo passaggio a 8°C prevede il raffreddamento rapido dei campioni.

3.7 Sequenziamento del DNA

In seguito alla purificazione enzimatica sono stati aggiunti i *primer* di sequenziamento (1 μ l) che, in questo caso, erano uguali a quelli usati per l'amplificazione (F57 e R753). I campioni sono poi stati fatti seccare nel termociclatore a coperchio aperto ad una temperatura di 65°C fino all'evaporazione della componente acquosa. A questo punto i prodotti sono stati mandati al centro di sequenziamento *BMR Genomics* (Università degli Studi di Padova). La determinazione della sequenza è automatica ed è stata effettuata mediante l'uso del kit "*ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Core*" (Perkin Elmer); l'elettroforesi delle reazioni di sequenziamento è stata eseguita con il sequenziatore automatico *ABI PRISM 377*, versione 2.1.1.

3.8 Analisi delle sequenze e ricostruzione filogenetica

Il risultato della reazione di sequenziamento consiste in un cromatogramma o elettroferogramma in cui sono visibili i picchi di ciascuna base nucleotidica di cui è costituito il frammento di gene analizzato. Questi cromatogrammi sono stati visualizzati con il programma *Chromas 2.6* (*Technelysium*) (Fig. 12).

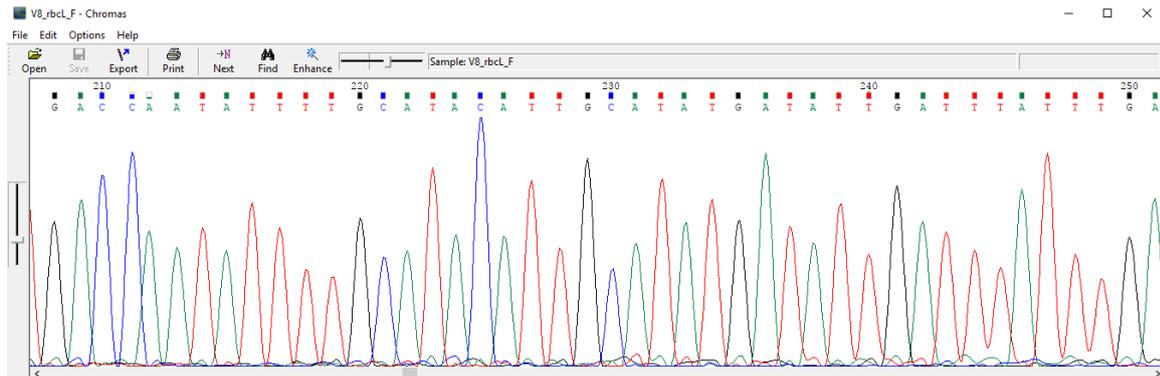


Figura 12. Cromatogramma della sequenza visualizzato tramite il programma *Chromas 2.6*.

Dopo questo passaggio le sequenze sono state esportate nel formato FASTA e confrontate con quelle disponibili presso la banca dati *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) attraverso il programma BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Sono state scaricate in formato FASTA tutte le sequenze del gene *rbcL* disponibili nella banca dati *GenBank* relative a specie del genere *Ceramium*. Successivamente è stato costruito un *dataset* di 61 sequenze totali delle diverse specie presenti in banca dati assieme a quelle ottenute in questo studio. La sequenza della specie *Spyridia filamentosa* (Wulfen) Harvey (*GenBank accession number* DQ787579) è stata scelta come *outgroup*.

L'allineamento multiplo delle sequenze è stato effettuato tramite il programma Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) disponibile on-line al sito <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>. Le analisi filogenetiche sono state condotte tramite il programma MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) utilizzando il metodo *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou e Nei, 1987) secondo il modello evolutivo *Kimura 2-parameter* (K2) (Kimura, 1980). Per valutare la robustezza dei nodi della topologia ottenuta è stato utilizzato il test di Bootstrap (BT) (Felsenstein, 1985) effettuando 1000 repliche.

3.9 Osservazione al microscopio ottico

Tutti i campioni di ciascuna specie sono stati osservati utilizzando un microscopio ottico Leica 5000B (Wetzlar, Germania) dotato di un *software* per l'acquisizione delle immagini. Sono stati osservati e fotografati i caratteri diagnostici principali: la presenza di spine corticali, il *pattern* di ramificazione degli assi, la forma degli apici, la forma e le dimensioni di elementi riproduttivi quali tetrasporangi e cistocarpi. I valori dei caratteri morfologici misurabili (come ad esempio le misure del tallo e delle strutture riproduttive) sono stati riportati per ciascuna specie come *range* tra i valori minimi e quelli massimi osservati.

3.10 Inclusione dei campioni in resina epossidica

Per poter effettuare osservazioni più dettagliate delle strutture interne del tallo, i campioni di interesse sono stati inclusi in resina. Le resine sono sostanze che polimerizzano in opportune condizioni e una volta che sono entrate nel campione induriscono il tessuto e lo rendono sezionabile. Le resine usate per la microscopia convenzionale sono epossidiche (costituite da miscele di aldeidi) termoindurenti (polimerizzano a 60°C).

Per prima cosa il materiale algale è stato fissato chimicamente in glutaraldeide al 6% in tampone cacodilato 0.1 M (pH 6.9) e conservato a 4°C per 24 ore. Questa fase serve alla stabilizzazione delle proteine del tessuto. I campioni sono stati successivamente post-fissati in tetrossido d'osmio 1% in tampone cacodilato 0.1 M (pH 6.9) per 8 ore a 4°C al buio per la fissazione dei lipidi.

Al termine di questa fase, è seguita la fase di disidratazione, la quale serve per rimuovere completamente i liquidi presenti nei tessuti e sostituirli con un solvente organico compatibile con la resina che verrà utilizzata. La disidratazione è stata realizzata in soluzioni acquose di etanolo a concentrazioni crescenti, secondo il protocollo seguente:

- etanolo 25%, 3 cambi da 5 minuti;
- etanolo 50%, 3 cambi da 5 minuti;
- etanolo 75%, 3 cambi da 5 minuti;
- etanolo 100%, 3 cambi da 20 minuti.

Successivamente l'etanolo assoluto è stato sostituito con un solvente intermedio, l'ossido di propilene, eseguendo 3 cambi da 5 minuti ciascuno. L'ossido di propilene è un eccellente solvente di transizione che si miscela sia con l'etanolo che con la resina epossidica.

La resina per l'inclusione è stata preparata mescolando tre componenti, precedentemente riscaldati in stufa per qualche minuto a 40°C:

- Araldite (AM): 27 ml;
- Anidride dodecil-succinica (DDSA): 23 ml;
- Acceleratore (C): 0,75 ml.

Con questa resina sono state dapprima ottenute tre diluizioni in ossido di propilene a concentrazioni crescenti di resina. Il campione è stato quindi posto in successione nelle seguenti miscele:

- ossido di propilene : resina 3:1 in stufa a 40°C per 60 minuti;
- ossido di propilene : resina 1:1 in stufa a 40°C per 60 minuti;
- ossido di propilene : resina 1:3 in stufa a 40°C per tutta la notte.

Il giorno successivo la miscela ossido di propilene : resina è stata sostituita con resina pura. La provetta con il campione è stata posta in stufa a 40°C per 1 ora a tappo aperto in modo da favorire l'evaporazione dei residui di ossido di propilene. Successivamente si è provveduto a trasferire il campione in cellette, contenenti resina pura, che sono state poste in stufa, prima a 40°C per 24 ore e successivamente a 60°C per tre giorni per permettere la polimerizzazione della resina.

3.11 Allestimento delle sezioni semifini

Una volta polimerizzate le resine, è stato possibile tagliare i campioni per ottenere le sezioni desiderate. Per il taglio dei blocchetti di resina è stato utilizzato un ultramicrotomo (Reichert Ultracut S) e delle lame di vetro (Fig. 13).

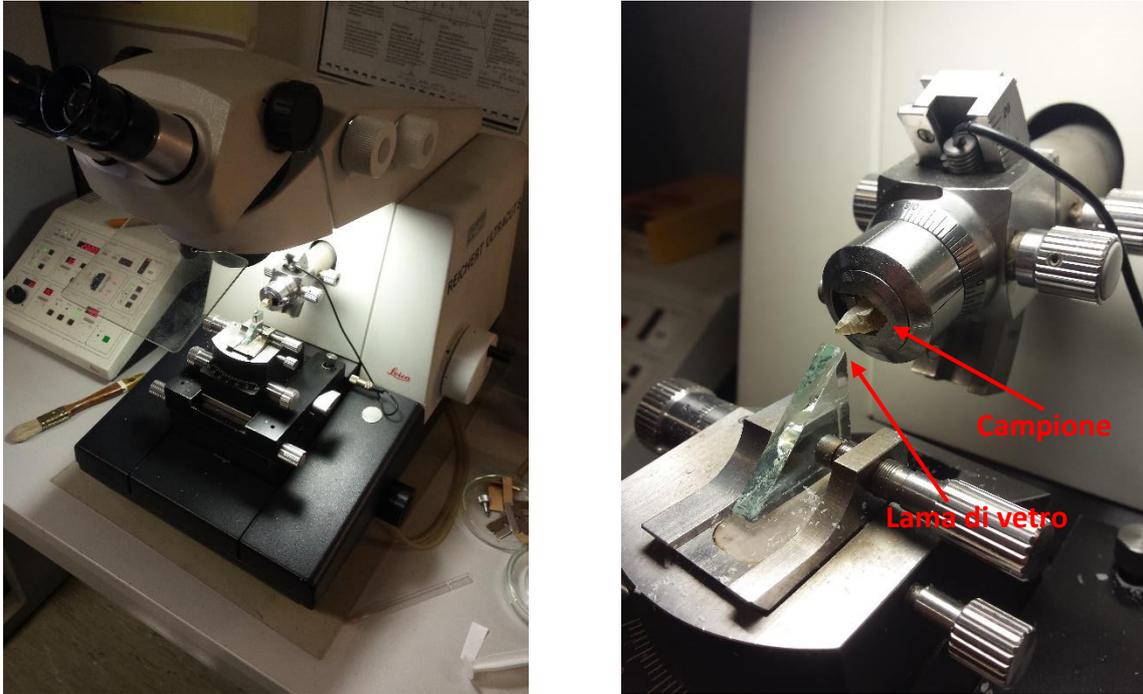


Figura 13. Immagini di un ultramicrotomo.

Sono state realizzate delle sezioni di 1 μm di spessore che sono state contrastate con Blu di Toluidina 1% per evidenziare le strutture interne. I campioni così preparati sono stati osservati al microscopio ottico.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Identificazione dei campioni tramite il confronto con sequenze di specie note

Durante questo studio riguardante il monitoraggio della biodiversità del genere *Ceramium* in Laguna di Venezia, sono stati analizzati 61 campioni raccolti nel bacino centrale e meridionale della laguna, sia lungo il suo litorale marino che in acque più interne. Per ciascuno di questi campioni, è stata condotta un'analisi molecolare utilizzando il metodo del DNA *Barcoding* ed è stata ottenuta una sequenza nucleotidica corrispondente al frammento 5P del gene plastidiale *rbcL* che è stata depositata nella banca dati internazionale *GenBank*.

Le sequenze ottenute sono state confrontate tramite il programma BLAST con tutte le sequenze depositate nella stessa banca dati. Questo confronto permette, infatti, di ricavare una percentuale di identità tra la sequenza che viene inserita e le sequenze di specie note. Con una percentuale di identità nucleotidica del 100% è stato possibile identificare 29 dei campioni esaminati come appartenenti a due specie note: *C. derbesii* e *C. nudiusculum*.

Per quanto riguarda i restanti 32 campioni le percentuali ottenute non risultavano abbastanza elevate da permettere un'identificazione sicura con nessuna delle specie depositate in *GenBank*. Per il *marker rbcL* la soglia di identità deve, infatti, superare il valore di 99,2% affinché due specie appartenenti a questo genere possano essere considerate conspecifiche (Wolf *et al.*, 2011a).

Tramite l'allineamento multiplo delle 32 sequenze, utilizzando il programma MUSCLE, sono state individuate 4 diverse unità tassonomiche mai sequenziate finora. I campioni esaminati e le relative identificazioni ottenute tramite questa analisi sono riportate in tabella D.

Tabella D. Unità tassonomiche identificate e dati relativi al campionamento.

Specie	Stazione	Data	N° di campioni	Note
<i>Ceramium derbesii</i>	Stazione 3	05.07.2017	1	Epilitico, -1m
	Stazione 6	18.07.2017	3	Epilitici, -2m
<i>Ceramium nudiusculum</i>	Stazione 1	11.10.2017	2	Epifiti su <i>Zostera marina</i>
	Stazione 3	05.07.2017	8	Epilitici, -1m
	Stazione 5	08.06.2017	10	Epilitici, -2m
	Stazione 6	18.07.2017	5	Epilitici, -2m
<i>Ceramium</i> sp. #1	Stazione 1	11.10.2017	1	Epifita su <i>Zostera marina</i>
<i>Ceramium</i> sp. #2	Stazione 1	11.10.2017	5	Epifiti su <i>Zostera marina</i>
	Stazione 2	15.06.2017	4	Epifiti su <i>Zostera marina</i>
	Stazione 4	05.05.2017	4	Epifiti su <i>Zostera marina</i>
<i>Ceramium</i> sp. #3	Stazione 1	11.10.2017	13	Epifiti su <i>Zostera marina</i>
	Stazione 4	05.05.2017	3	Epifiti su <i>Zostera marina</i>
<i>Ceramium</i> sp. #4	Stazione 3	05.07.2017	2	Epilitici, -2m
Totale			61	

Le prime due specie così identificate, *C. derbesii* e *C. nudiusculum*, risultavano essere *taxa* già segnalati per le acque lagunari venete. Infatti, oltre all'identità genetica, i campioni presentavano caratteri morfologici molto simili a quelli descritti in Wolf *et al.* (2011a).

***Ceramium derbesii*.** I campioni di *Ceramium derbesii* sono stati raccolti in due diverse stazioni del litorale marino del Lido di Venezia, Diga Faro degli Alberoni (St. 3) e Diga Faro di San Nicolò (St. 6), in vicinanza delle bocche di porto di Malamocco e del Lido, caratterizzate da elevate escursioni di marea e da intenso moto ondoso. Tutti i campioni sono stati rinvenuti attaccati tramite un disco basale a un substrato duro quale la superficie degli scogli. I siti in cui sono stati rinvenuti i campioni appartenenti a questa specie coincidono con quelli riportati in Wolf *et al.* (2011a).

Il tallo degli esemplari di questa specie era di circa 4-10 cm, di colore marrone-rosso e si presentava in ciuffi di forma irregolare, con uno o più assi eretti, attaccati ad una densa massa di filamenti rizoidali multicellulari. Dagli assi principali si sviluppavano numerose ramificazioni laterali. Gli assi, di circa 500 µm di diametro, si presentavano completamente corticati con rare

zone alla base del tallo caratterizzate da una corticazione parziale. Gli assi presentavano dei restringimenti internodali e apici strettamente incurvati. Le ramificazioni si sviluppavano ad intervalli di 13-23 segmenti e ogni nodo era costituito da 7 cellule periassiali. I cistocarpi si presentavano in posizione laterale o in posizione terminale ed erano formati da gonimoblasti globosi, sessili, di circa 400 µm di diametro, circondati da 5 o 6 corti assi involucri, con una corticazione continua. I carposporangi erano angolari e misuravano circa 30-35 µm di diametro.

Le specie di *Ceramium* completamente corticate e prive di spine rientravano fino al 2002 nel complesso del *C. rubrum* C. Agardh, per cui tutti i campioni che presentavano una morfologia simile venivano identificati come appartenenti a questa specie (Boo & Lee, 1994). Da uno studio molecolare di Maggs *et al.* (2002) si è scoperto che in realtà erano presenti più *taxa* distinti a livello genetico, *C. virgatum*, *C. secundatum* Lyngbye e *C. botryocarpum* A.W. Griffiths ex Harvey, alle quali si aggiunsero anche *C. barbatum* (J.E. Smith) Duby e *C. derbesii* (Wolf *et al.*, 2011a). Fino al 2011 in Laguna di Venezia le specie completamente corticate erano state assegnate alla specie *C. virgatum*. Questa specie non è stata tuttavia mai segnalata tramite un'analisi genetica e tutti i campioni con tale morfologia, sia campionati nel 2011 che durante questo studio, sono stati identificati come *C. derbesii*. È quindi probabile che la specie da sempre presente in laguna sia in realtà *C. derbesii* e non *C. virgatum*.

***Ceramium nudiusculum*.** Nelle stesse due stazioni in cui sono stati raccolti gli esemplari di *C. derbesii* sono stati campionati anche 13 esemplari appartenenti alla specie *Ceramium nudiusculum*. Inoltre, 12 esemplari appartenenti a questa specie sono stati trovati anche nelle stazioni 1 e 5 (Ca' Roman, Pellestrina e Murazzi, Lido di Venezia) (Tabella D). Le stazioni 3, 5 e 6 si trovavano lungo il litorale marino dell'isola del Lido di Venezia. Al contrario, la stazione 1 si trovava sul lato lagunare dell'isola di Pellestrina, nelle vicinanze della bocca di porto di Chioggia. I siti lungo il versante adriatico erano caratterizzati da condizioni ambientali marine. La salinità, il moto ondoso e l'escursione mareale, infatti, erano quelle proprie dell'alto Adriatico. Per quanto riguarda il campionamento effettuato in acque lagunari (Staz. 1), la raccolta dei campioni algali è stata fatta nei pressi di una prateria di fanerogame marine, dove la profondità delle acque era non superiore al mezzo metro. Due dei campioni raccolti si presentavano in forma epifitica di *Zostera marina*, gli

altri 23 campioni, invece, erano attaccati tramite un disco basale a un substrato duro in associazione con altri generi di Rhodophyta quali *Polysiphonia* Greville e *Centroceras*.

Il tallo, circa 3-7 cm, si presentava di colore marrone-rosso con assi intrecciati prostrati da cui si originavano gruppi di assi eretti, ramificati pseudodicotomicamente. La corticizzazione era parziale e limitata ai nodi. Gli assi principali, circa 700 μm di diametro, presentavano apici fortemente involuti e numerose ramificazioni irregolari. I nodi erano costituiti da 6 cellule periassiali da cui si originavano le cellule corticali. Nelle bande nodali degli assi più giovani erano presenti delle spine, normalmente singole ma occasionalmente doppie, costituite da 4 cellule. I tetrasporangi avevano forma ellissoidale (65-70 x 40-56 μm) e si presentavano in spirali, interamente coperti da cellule corticali. I cistocarpi consistevano di gonimolobi globulari, di circa 400 μm di diametro, inclusi in una membrana e circondati da una spirale di 6 corti assi involucri. I carposporangi erano angolari con un diametro di 20-40 μm .

I campioni che presentavano una morfologia parzialmente corticata con la presenza di spine in Laguna di Venezia erano state classificate come *C. ciliatum*. Nel 2011 è stata aggiunta un'altra specie con tale morfologia, *C. nudiusculum* (Wolf *et al.*, 2011a), che si differenziava da *C. ciliatum* solo per il numero di cellule che componevano le spine (3 in *C. ciliatum* e 4 in *C. nudiusculum*). Alcuni studi, però, hanno suggerito che la presenza di spine corticali non è un carattere diagnostico che può essere usato per dedurre le relazioni tra le specie di *Ceramium* (Skage *et al.*, 2005). *C. ciliatum* e *C. nudiusculum* possono essere quindi ritenute specie criptiche che non presentano chiari caratteri morfologici che le differenziano. Poiché dalle indagini molecolari condotte sia nel 2011 che durante questo studio non sono emersi campioni appartenenti alla specie *C. ciliatum*, possiamo supporre che, come nel caso del *C. derbesii*, la specie parzialmente corticata con spine presente in Laguna di Venezia sia *C. nudiusculum* e non *C. ciliatum*.

4.2 Analisi filogenetica dei *taxa* non presenti in *GenBank*

Per quanto riguarda le altre quattro unità tassonomiche corrispondenti ai restanti campioni non è stata trovata una corrispondenza che fosse discriminante a livello di specie con le sequenze depositate in *GenBank*. Per quanto riguarda *Ceramium* sp.#1, tramite BLAST, è risultata un'identità nucleotidica del 98% con due specie, *Ceramium secundatum* e *Ceramium botryocarpum*; per *Ceramium* sp.#2 del 98% con *Ceramium tenuicorne* (Kützinger) Waern; per *Ceramium* sp.#3 del 98% con tre diverse specie *Ceramium tenuicorne*, *Ceramium polyceras* e *Ceramium diaphanum*; per *Ceramium* sp.#4 del 94% con due specie, *Ceramium brasiliense* A.B. Joly e *Ceramium dumosertum* R.E. Norris & Abbott.

Per questo motivo è stata condotta un'ulteriore analisi per individuare le relazioni filogenetiche di queste quattro specie non identificate con tutte le altre specie di *Ceramium* note di cui le sequenze del gene *rbcL* fossero già disponibili. Il risultato dell'analisi è rappresentato dall'albero filogenetico in figura 14.

Le specie di *Ceramium* segnalate in Laguna di Venezia sono state evidenziate in azzurro secondo i dati presenti in letteratura (Sfriso *et al.*, 2009; Wolf *et al.*, 2011a). Le specie non presenti in laguna ma segnalate nel resto del Mediterraneo sono state evidenziate in verde sulla base dei dati disponibili in letteratura (Gómez Garreta *et al.*, 2001; Sartoni & Boddi, 2002; Serio *et al.*, 2011).

Come si può vedere nell'albero filogenetico, le unità tassonomiche denominate *Ceramium* sp.#1, *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 facevano parte di due *cladi* ben supportati (valori di Bootstrap superiori a 50) mentre *Ceramium* sp.#4 non ricadeva in un clade supportato statisticamente.

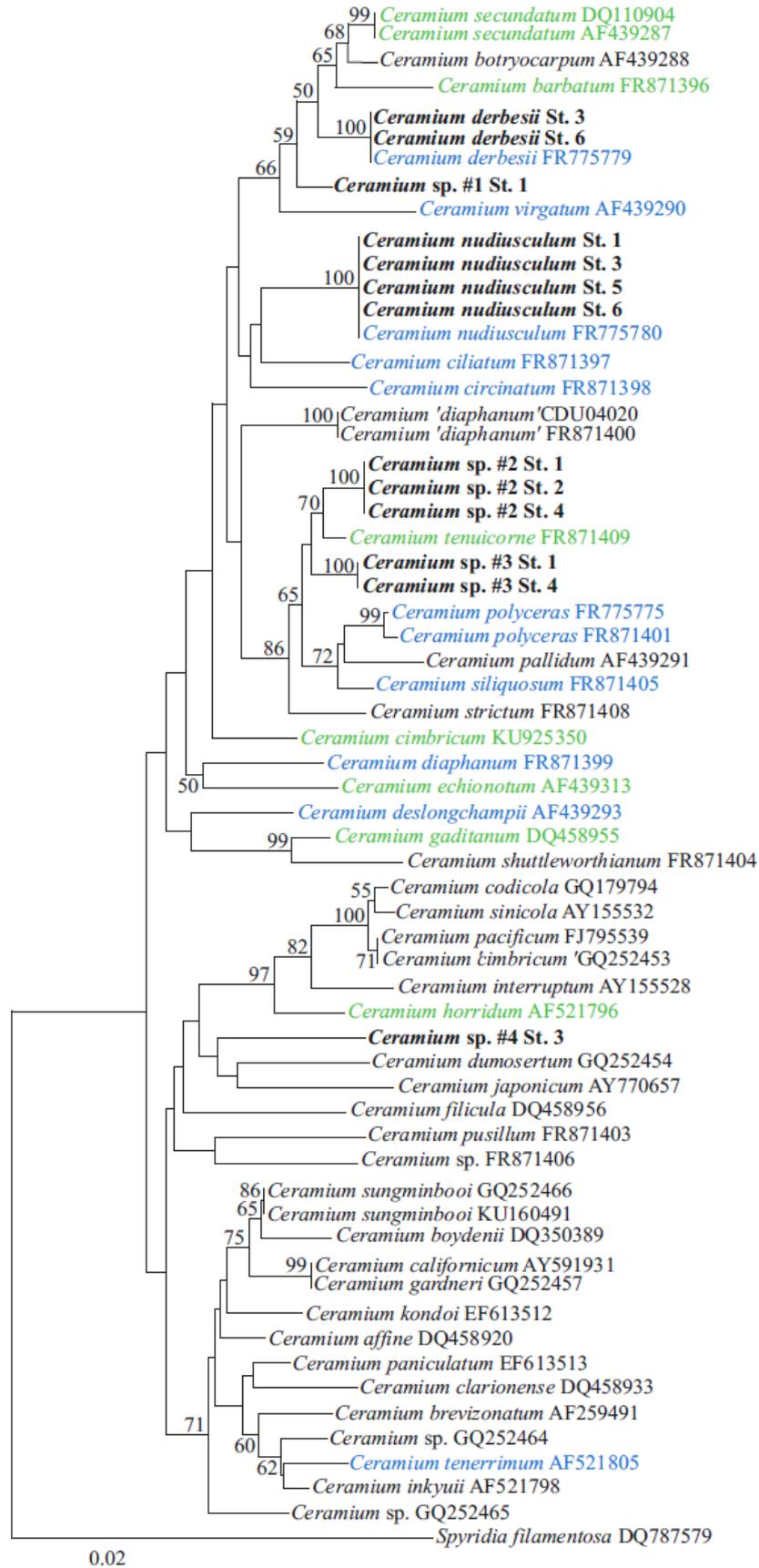


Figura 24. Albero filogenetico (NJ) delle sequenze di specie del genere *Ceramium*. I valori di Bootstrap maggiori di 50 sono riportati vicino ai nodi. Le sequenze delle specie ottenute in questo studio sono evidenziate in grassetto.

Più nel dettaglio (Fig.15), *Ceramium* sp.#1 si trovava vicina filogeneticamente alle specie *C. virgatum* e *C. derbesii*, già segnalate in Laguna di Venezia, alle specie *C. secundatum* e *C. barbatum*, presenti nel Mar Mediterraneo e a *C. botryocarpum*, non segnalata nel bacino mediterraneo.

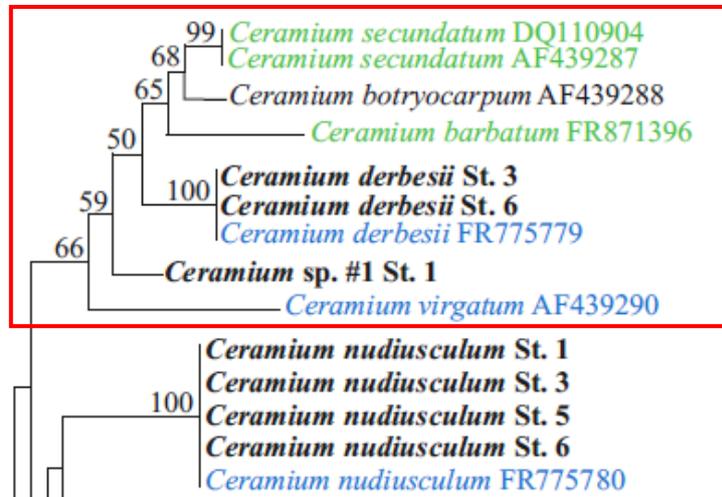


Figura 15. Particolare dell'albero filogenetico del genere *Ceramium* rappresentante il clade di appartenenza di *Ceramium* sp.#1 (riquadro rosso).

Ceramium sp.#2 e *Ceramium* sp.#3, invece, si trovavano in posizioni molto vicine all'interno dell'albero filogenetico (Fig. 16). Infatti, entrambe risultavano filogeneticamente vicine alle specie *C. polyceras* e *C. siliquosum*, presenti in Laguna di Venezia, a *C. tenuicorne*, presente nel Mar Mediterraneo, e a *C. pallidum* (Kützinger) Maggs & Hommersand e *C. strictum* Roth, non segnalate per le acque mediterranee.

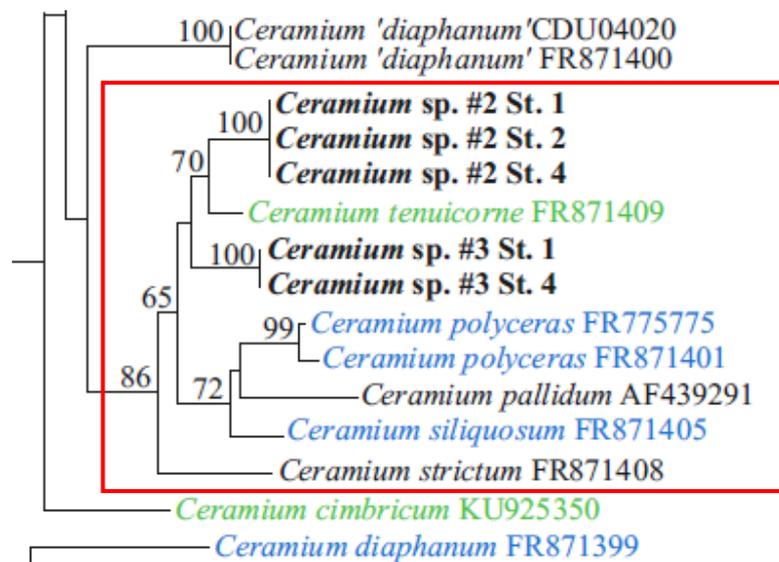


Figura 16. Particolare dell'albero filogenetico del genere *Ceramium* rappresentante il clade di appartenenza di *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 (riquadro rosso).

Al contrario delle precedenti tre unità tassonomiche, *Ceramium* sp.#4 non apparteneva ad un clade ben supportato statisticamente. Questo gruppo di specie comprendeva soprattutto *taxa* non presenti né nelle acque venete lagunari né nel Mar Mediterraneo, quali *C. codicola* J. Agardh, *C. sinicola* Setchell & Gardner, *C. pacificum* (Collins) Kylin, *C. 'imbricum'*, *C. interruptum* Setchell & Gardner, *C. dumosertum* e *C. japonicum* Okamura, a parte una specie, *C. horridum* Meneghini (presente nel bacino mediterraneo) (Fig.17).

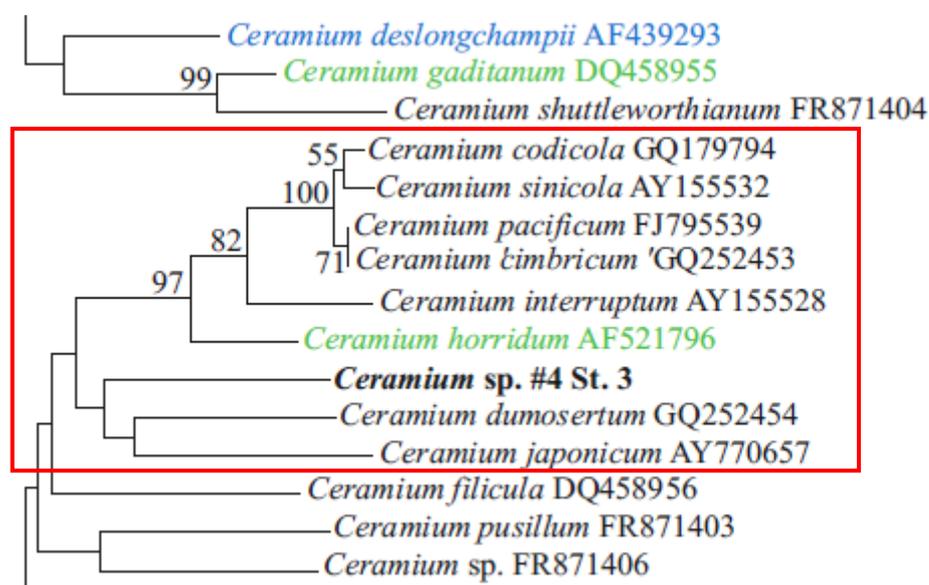


Figura 17. Particolare dell'albero filogenetico del genere *Ceramium* rappresentante il gruppo di specie cui appartiene *Ceramium* sp.#4 (riquadro rosso).

Come si può vedere dalla ricostruzione filogenetica riportata in Fig. 14, tutte e quattro le nuove unità tassonomiche esaminate in questo studio occupano una posizione filogenetica ben distinta dalle altre specie di *Ceramium* inserite nell'analisi. Questo supporta l'ipotesi che si tratti di quattro nuove specie mai sequenziate fino ad oggi.

4.3 Analisi della divergenza nucleotidica

Per dare ulteriore supporto all'ipotesi che le unità tassonomiche *Ceramium* sp.#1, *Ceramium* sp.#2, *Ceramium* sp.#3 e *Ceramium* sp.#4 rappresentassero specie distinte, è stata calcolata anche la divergenza nucleotidica tra queste quattro unità e le specie che fanno parte dei rispettivi *cladi*. La percentuale di divergenza nucleotidica è stata ricavata dalla matrice di identità nucleotidica ottenuta tramite il programma MUSCLE.

Clade comprendente *Ceramium* sp.#1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>C.virgatum</i>	100.00	93.69	94.62	94.25	94.25	94.25	95.18	95.18	95.18
2 <i>C.barbatum</i>	93.69	100.00	95.73	95.73	95.73	95.73	96.47	96.47	96.29
3 Sp1_St1	94.62	95.73	100.00	97.40	97.40	97.40	97.77	97.77	97.59
4 <i>C.derbesii</i> _St3	94.25	95.73	97.40	100.00	100.00	100.00	97.77	97.77	97.22
5 <i>C.derbesii</i> _St6	94.25	95.73	97.40	100.00	100.00	100.00	97.77	97.77	97.22
6 <i>C.derbesii</i>	94.25	95.73	97.40	100.00	100.00	100.00	97.77	97.77	97.22
7 <i>C.secundatum</i>	95.18	96.47	97.77	97.77	97.77	97.77	100.00	100.00	98.70
8 <i>C.secundatum</i>	95.18	96.47	97.77	97.77	97.77	97.77	100.00	100.00	98.70
9 <i>C.botryocarpum</i>	95.18	96.29	97.59	97.22	97.22	97.22	98.70	98.70	100.00

Matrice 1. Percentuali di identità nucleotidica delle specie appartenenti al clade in cui rientra *Ceramium* sp.#1.

Clade comprendente *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>C.strictum</i>	100.00	94.25	95.73	95.55	95.36	96.47	96.47	96.47	96.47	96.47	96.29
2 <i>C.siloquosum</i>	94.25	100.00	96.47	96.29	96.29	95.55	95.55	94.99	94.99	94.99	94.81
3 <i>C.polyceras</i>	95.73	96.47	100.00	99.63	98.14	97.59	97.59	97.22	97.22	97.22	97.03
4 <i>C.polyceras</i>	95.55	96.29	99.63	100.00	98.14	97.40	97.40	97.22	97.22	97.22	97.03
5 <i>C.pallidum</i>	95.36	96.29	98.14	98.14	100.00	96.66	96.66	96.85	96.85	96.85	96.66
6 Sp3_St1	96.47	95.55	97.59	97.40	96.66	100.00	100.00	97.59	97.59	97.59	97.77
7 Sp3_St4	96.47	95.55	97.59	97.40	96.66	100.00	100.00	97.59	97.59	97.59	97.77
8 Sp2_St1	96.47	94.99	97.22	97.22	96.85	97.59	97.59	100.00	100.00	100.00	98.33
9 Sp2_St2	96.47	94.99	97.22	97.22	96.85	97.59	97.59	100.00	100.00	100.00	98.33
10 Sp2_St4	96.47	94.99	97.22	97.22	96.85	97.59	97.59	100.00	100.00	100.00	98.33
11 <i>C.tenuicorne</i>	96.29	94.81	97.03	97.03	96.66	97.77	97.77	98.33	98.33	98.33	100.00

Matrice 2. Percentuali di identità nucleotidica delle specie appartenenti al clade cui rientrano *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3.

Gruppo di specie comprendente *Ceramium* sp.#4:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>C.horridum</i>	100.00	94.99	95.73	95.92	95.92	96.10	92.76	92.95	92.21
2 <i>C.interruptum</i>	94.99	100.00	95.92	96.10	96.10	96.29	91.09	92.39	91.47
3 <i>C.cimbricum</i>	95.73	95.92	100.00	98.33	98.70	99.26	90.91	91.84	91.47
4 <i>C.codicola</i>	95.92	96.10	98.33	100.00	99.26	99.07	91.47	92.02	92.21
5 <i>C.sinicola</i>	95.92	96.10	98.70	99.26	100.00	99.44	91.09	92.02	91.47
6 <i>C.pacificum</i>	96.10	96.29	99.26	99.07	99.44	100.00	91.28	92.21	91.65
7 <i>C.japonicum</i>	92.76	91.09	90.91	91.47	91.09	91.28	100.00	93.14	92.58
8 Sp4_St3	92.95	92.39	91.84	92.02	92.02	92.21	93.14	100.00	93.51
9 <i>C.dumosertum</i>	92.21	91.47	91.47	92.21	91.47	91.65	92.58	93.51	100.00

Matrice 3. Percentuali di identità nucleotidica delle specie appartenenti al gruppo di specie cui fa parte *Ceramium* sp.#4.

Come si può osservare dalle matrici, campioni appartenenti alla stessa specie presentavano un range di divergenza intraspecifica che variava da un valore minimo di 0%, come nel caso di *C. derbesii* St.3-*C. derbesii* St.6 (matrice 1), a un massimo di 0,37%, valore calcolato tra due campioni

di *C. polyceras* (matrice 2). Di seguito viene riportata la soglia minima di divergenza nucleotidica calcolata per ogni nuova unità tassonomica a confronto con le specie presenti nello stesso *clade*.

- *Ceramium* sp.#1: 2,23% (*Ceramium* sp.#1-*C. secundatum*)
- *Ceramium* sp.#2: 1,67% (*Ceramium* sp.#2-*C. tenuicorne*)
- *Ceramium* sp.#3: 2,23% (*Ceramium* sp.#3-*C. tenuicorne*)
- *Ceramium* sp.#4: 6,49% (*Ceramium* sp.#2-*C. dumosertum*)

Le soglie minime così calcolate risultavano essere maggiori della soglia massima di divergenza intraspecifica (0.37%) e maggiori o uguali alle percentuali di divergenza interspecifica calcolate tra altre specie di *Ceramium*: *C. secundatum*-*C. botryocarpum* (1,3%), *C. derbesii*-*C. secundatum* (2,23%), *C. polyceras*-*C. pallidum* (1,86%), *C. sinicola*-*C. cimbricum* (1,3%).

Questo risultato, assieme all'analisi filogenetica, conferma il fatto che le quattro nuove entità tassonomiche siano, in effetti, specie a sé stanti. Dal momento, però, che non tutte le specie esistenti di *Ceramium*, che ricordiamo essere, al momento, 211 (Guiry & Guiry, 2018), sono state sequenziate, non possiamo affermare con certezza che si tratti di specie nuove per il Mar Mediterraneo. Per questo motivo, per questi quattro *taxa* sono state effettuate delle analisi morfologiche dettagliate, per poter operare un confronto morfologico con le specie presenti in Laguna di Venezia e in Mar Mediterraneo di cui non è disponibile la sequenza nucleotidica.

4.4 Caratterizzazione morfologica

***Ceramium* sp.#1.** Per quanto riguarda questa specie, è stato trovato un unico esemplare durante il campionamento nella stazione 1 (area lagunare Ca' Roman, Pellestrina). Questo campione si presentava in forma epifitica, in particolare epifita di *Zostera marina*.

Il tallo, completamente corticato, era di dimensioni ridotte, misurando all'incirca 2-3 cm di altezza, ed era di colore rosso-marrone (Fig. 18A). Gli assi nella parte apicale del tallo presentavano una ramificazione di tipo dicotomico ad intervalli regolari di circa 12 segmenti (Fig. 18A, B), anche se in altre zone questo *pattern* di ramificazione variava, fino a presentare ramificazioni casuali (Fig 18C). Per questo motivo è possibile affermare che le ramificazioni di

questa specie erano di tipo pseudodicotomico, confermando il fatto che non esista una vera dicotomia per questo genere, come affermato da South & Skelton (2000). Lungo il tallo di questo campione non sono state trovate spine corticali, ma erano presenti ramificazioni laterali giovani che si originavano dalle zone nodali (Fig. 18D). La misura del diametro degli assi era di circa 125-250 μm . Per quanto riguarda le zone nodali, è possibile osservare come lo strato di cellule corticali non fosse molto spesso, presentando circa uno o due strati di cellule e misurando circa 25 μm (Figura 18F). Nella zona basale del tallo le zone internodali erano più evidenti (Fig. 18E). Alla base del tallo era evidente il disco basale circondato da rizoidi, i quali si distribuivano anche lungo l'asse principale fino alla prima ramificazione (Fig. 18E). Gli apici, marcatamente rivolti verso l'interno, presentavano una forma particolarmente incurvata (Fig. 18B). Essendo un tallo vegetativo, non è stato possibile osservare le caratteristiche delle strutture riproduttive quali tetrasporangi e cistocarpi. Mediante una sezione trasversale del tallo, però, è stato possibile osservare la struttura interna: in particolare, il numero di cellule periassiali all'interno della corticizzazione risultava essere di 7 cellule (Fig. 18F).

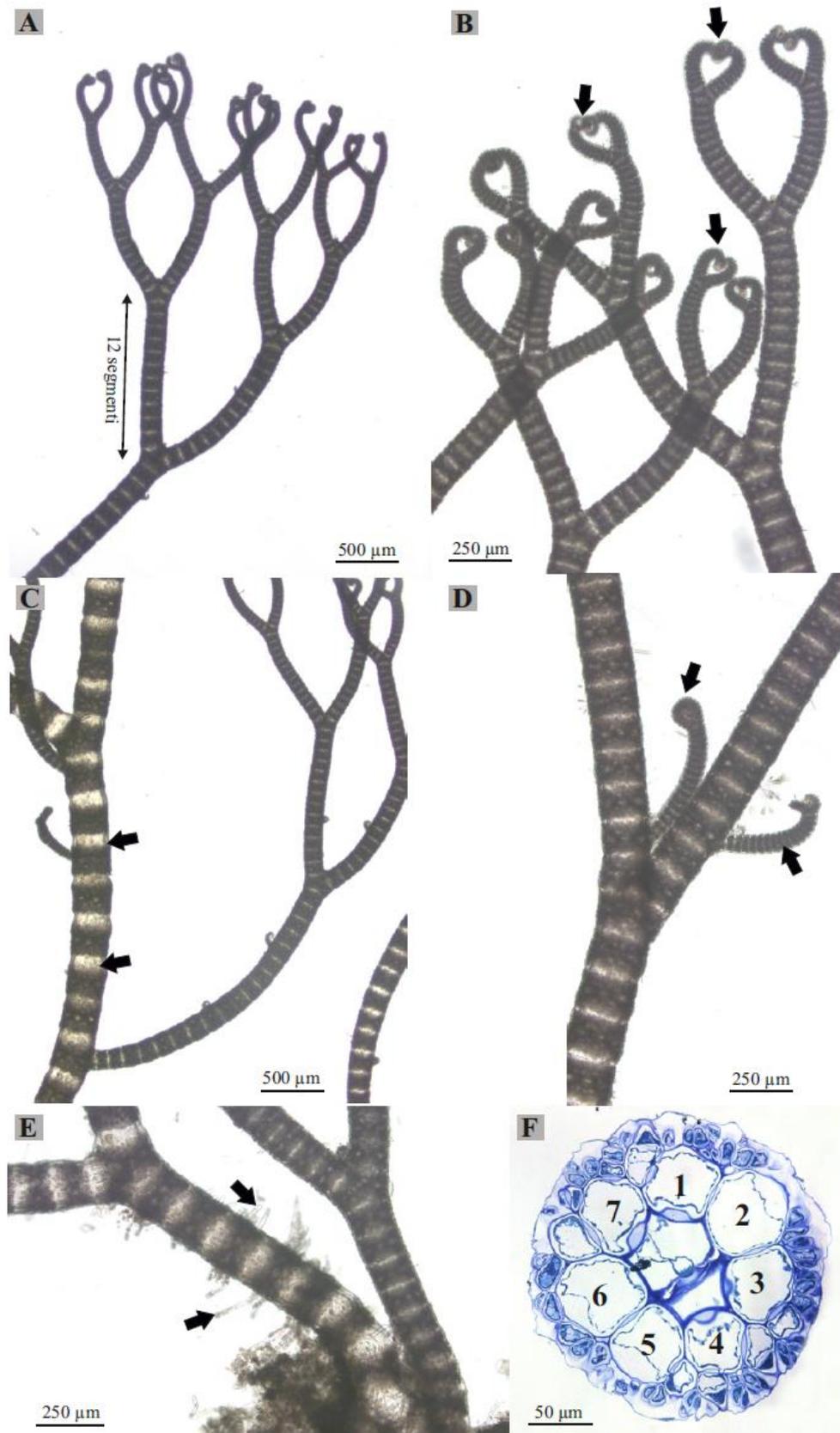


Figura 18. Morfologia del tallo di *Ceramium* sp.#1. A) Ramificazione dicotomica del tallo. B) Particolare della parte apicale con apici marcatamente incurvati (freccie). C) Parte basale in cui è visibile una corticazione meno marcata (freccie) e ramo laterale non dicotomico. D) Assi laterali originatisi dalla corticazione (freccie). E) Parte basale in cui sono presenti sia rizoidi (freccie) che il disco basale. F) Sezione trasversale del tallo a livello della corticazione con 7 cellule periaxiali.

***Ceramium* sp.#2.** I campioni corrispondenti a questa specie sono stati raccolti in tre aree lagunari: la stazione 1 (Ca' Roman, Pellestrina), la stazione 2 (Santa Maria del Mare, Pellestrina) e la stazione 4 (Torson di Sotto, Venezia), per un totale di 13 campioni. Quest'ultima stazione era il sito più interno fra quelli interessati dai nostri campionamenti mentre la stazione 2 si trovava nei pressi della bocca di porto di Malamocco. Tutti e tre i siti di campionamento (Staz. 1, 2 e 4) erano caratterizzati dalla presenza di praterie di fanerogame marine. Infatti, tutti gli esemplari si presentavano in forma epifitica, in particolare epifiti di *Zostera marina*, una specie di fanerogama marina dell'ambiente lagunare veneto (Fig. 19). Le praterie di angiosperme giocano un ruolo importante nell'ecologia della Laguna di Venezia, poiché, oltre a favorire la stabilizzazione dei sedimenti (Sfriso *et al.*, 2004, 2005), forniscono anche protezione e substrato per molte altre specie (den Hartog, 1977; Fonseca, 1990), tra cui una serie di Rhodophyta che vivono in forma epifitica sulle foglie di queste piante acquatiche.



Figura 19. *Ceramium* epifiti su foglie di fanerogama marina.

Il tallo dei campioni appartenenti a questa specie, come per *Ceramium* sp.#1, era molto piccolo, circa 1-3 cm, e presentava la corticazione solo ai nodi, manifestando il tipico bandeggio degli esemplari parzialmente corticati di questo genere (Fig. 20A). Il colore era quello tipico delle specie di *Ceramium*, rosso marrone. Il tallo presentava ramificazioni pseudodicotomiche, ogni 5-12 segmenti con un'angolazione di circa 45° (Fig. 20A, B). Le corticazioni risultavano più distanziate nei rami più maturi rispetto alla distanza internodale presente per le zone più giovani. La dimensione del diametro degli assi variava da 100 a 200 µm circa ma è evidente come, ai nodi, il diametro sia maggiore rispetto alla zona non corticata, diversamente da quanto presentato da *Ceramium* sp.#1. Rispetto a quest'ultima specie, l'introflessione degli apici era meno marcata ma

era tuttavia presente un chiaro incurvamento verso l'interno (Fig. 20C). Anche in questa specie, le spine corticali non erano presenti. Questa specie presentava 6 cellule periassiali nella corticizzazione, come è possibile vedere dalle immagini 20D e 20E. Le cellule corticali formavano una banda con uno spessore di circa 15-20 μm (Fig. 20E). Per quanto riguarda le strutture riproduttive sono stati campionati sia esemplari che presentavano tetrasporangi (Fig. 20F, G) sia esemplari con cistocarpi (Fig. 20H, I). I tetrasporangi a divisione crociata si trovavano sulla parte superiore della corticizzazione, avevano forma sferica-ellissoidale e misuravano circa 40-50 μm di diametro. I cistocarpi, invece, di forma globulare, misuravano circa 200-300 μm di diametro e si trovano all'ascella degli assi, circondati da una serie di corti assi protettivi.

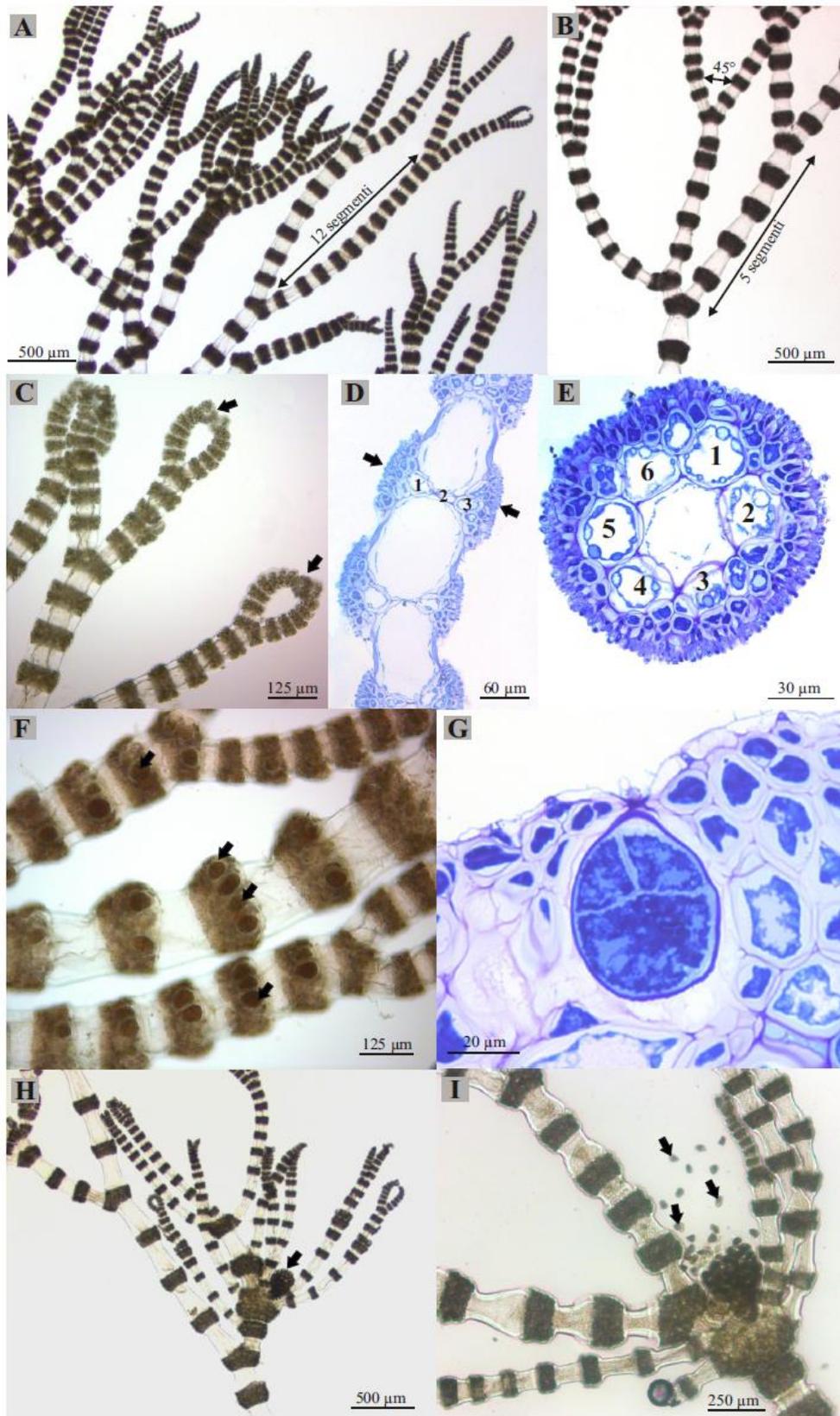


Figura 20. Morfologia del tallo di *Ceramium* sp.#2. A) Ramificazione pseudodicotomica del tallo. B) Particolare del tallo con evidenti bandeggi. C) Particolare della zona apicale con apici incurvati (freccie). D) Sezione longitudinale di un asse in cui sono visibili le cellule corticali (freccie) e le cellule periaxiali. E) Sezione trasversale del tallo a livello della corticizzazione con 6 cellule periaxiali. F) Tetrasporangi all'interno della corticizzazione (freccie). G) Tetrasporangio a divisione crociata in sezione trasversale a livello della corticizzazione. H) Tallo con cistocarpi, posizionati alle ascelle degli assi (freccia). I) Cistocarpo che rilascia le carpospore (freccie).

***Ceramium* sp.#3.** Sono stati campionati 16 esemplari appartenenti a questa specie nella stazione 1 (Ca' Roman, Pellestrina) e nella stazione 4 (Torson di Sotto, Venezia). Tutti i campioni raccolti erano epifiti di *Zostera marina*.

Il tallo di questa specie era di dimensioni contenute, circa 0,5-1 cm, e manifestava anch'esso una colorazione marrone-rossastra. Anche in questa specie la corticizzazione era presente solo a livello dei nodi (corticizzazione parziale) e le ramificazioni erano di tipo pseudodicotomico, ogni 8-10 segmenti circa (Fig. 21A, B). Gli assi misuravano circa 100-200 μm di diametro. Da una sezione trasversale a livello della corticizzazione, all'interno dei nodi sono state contate 7 cellule periassiali (Fig. 21D). La banda di cellule corticali, in questo caso, era spessa 20-30 μm circa ed era formata da circa 1-2 strati di cellule. Gli apici si presentavano meno involuti rispetto alle altre specie osservate, alcuni addirittura erano rivolti verso l'esterno (Fig. 21B). Le spine corticali erano assenti anche in questa specie. Avendo a disposizione esemplari con caratteri riproduttivi, è stato possibile descrivere queste strutture. I tetrasporangi avevano forma sferica, di circa 40-50 μm di diametro, e si trovavano nella parte superiore della corticizzazione (Fig. 21C). I cistocarpi di forma sferica-ellissoidale (Fig. 21E, F) misuravano circa 200-300 μm di diametro. Anche in questo caso, a protezione di questa struttura riproduttiva, si trovavano una serie di corti assi laterali.

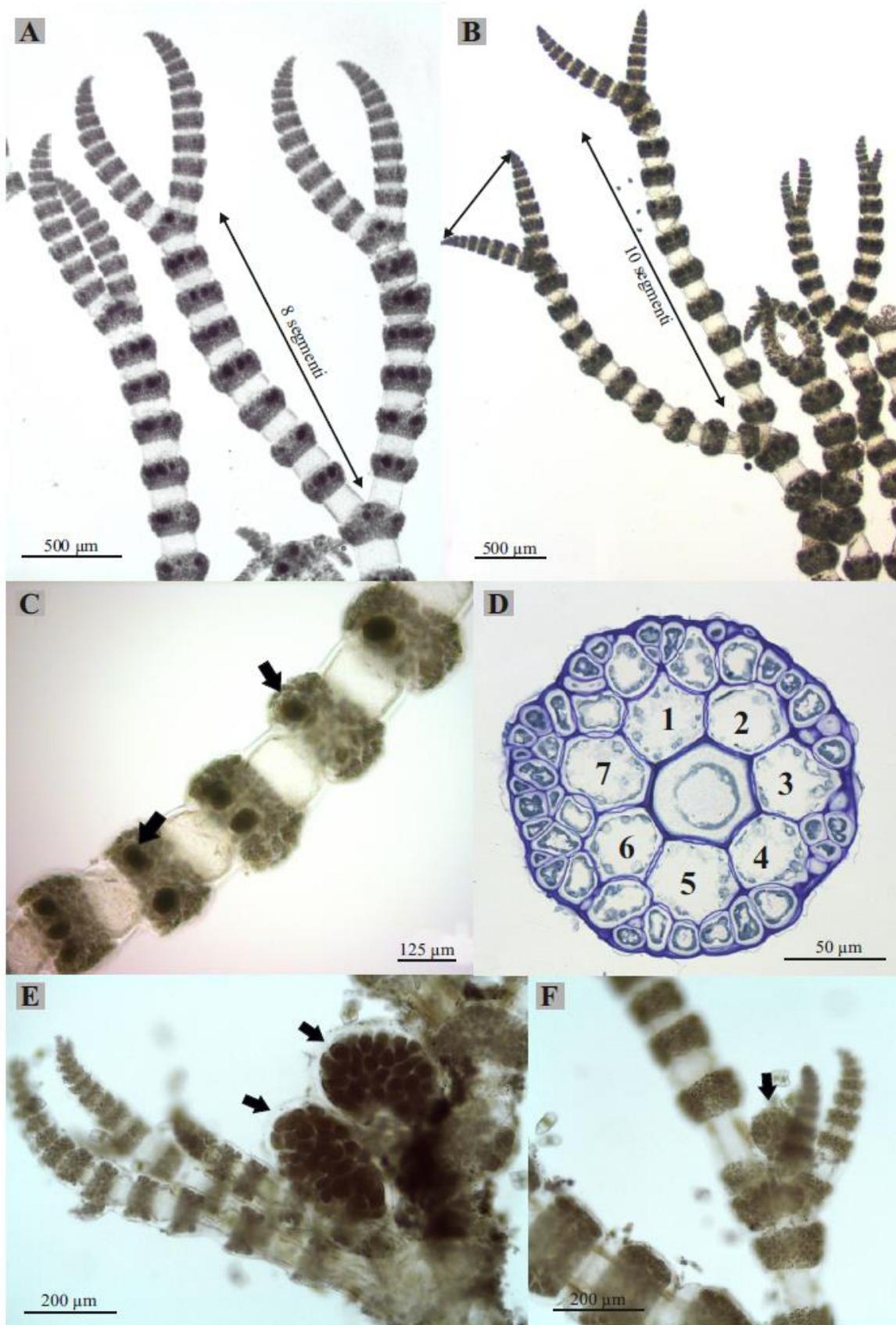


Figura 21. A) Morfologia del tallo di *Ceramium* sp.#3. A) Ramificazione pseudodicotomica del tallo. B) Particolare della zona apicale con apici rivolti verso l'esterno. C) Tetrasporangi all'interno della cortex (freccie). D) Sezione trasversale del tallo a livello della cortizzazione con 7 cellule periaassiali. E) Cistocarpi (freccie) in cui sono visibili le carpospore, posizionati all'ascella degli assi. F) Cistocarpio non maturo protetto da assi laterali (freccia).

***Ceramium* sp.#4.** Questa specie è stata raccolta durante il campionamento della stazione 3 (Diga Alberoni Faro, Lido di Venezia) lungo il litorale marino e ne sono stati raccolti due esemplari. Al contrario delle tre specie appena descritte, *Ceramium* sp.#4 non si trovava in forma epifitica ma in forma epilitica, attaccata agli scogli della diga.

Il tallo si presentava prostrato e misurava 1-2 cm. Gli assi erano molto sottili, con un diametro di circa 80-100 μm , e presentavano una corticizzazione incompleta (Fig. 22A). Il *pattern* corticale è risultato essere piuttosto diversificato: nelle zone apicali le bande erano alquanto ravvicinate lungo il tallo (Fig. 22B) mentre nelle zone intermedie e basali gli internodi risultavano 4-5 volte più lunghi dei nodi (Fig. 22A). Le ramificazioni erano pseudodicotomiche nelle zone apicali e irregolari nelle zone intermedie e basali, con molti giovani assi laterali che si originavano dalle corticizzazioni (Fig. 22B). Anche gli apici presentavano morfologie piuttosto differenti, da diritti nei talli sterili (Fig. 22B) a incurvati e rivolti verso l'interno nei talli fertili (Fig. 22C). Lungo il tallo erano presenti molti rizoidi lunghi circa 300-500 μm (Fig. 22E). Il numero di cellule periassiali all'interno della corticizzazione era di 7 (Fig. 22F). La forma delle cellule periassiali di questa specie era meno sferica e più triangolare, con un vertice rivolto verso l'esterno della corticizzazione (Fig. 22F). La banda di cellule corticali in questo caso era spessa circa 10-20 μm . Negli esemplari campionati erano presenti anche talli con tetrasporangi (Fig. 22D, F, G). I tetrasporangi di questa specie non erano completamente immersi nella *cortex* ma erano disposti in verticilli e ricoperti da una membrana protettiva nella zona che sporgeva dalla *cortex* (Fig. 22D). I tetrasporangi a divisione zonata erano di forma ellissoidale e misuravano circa 30 x 50 μm di diametro (Fig. 22G).

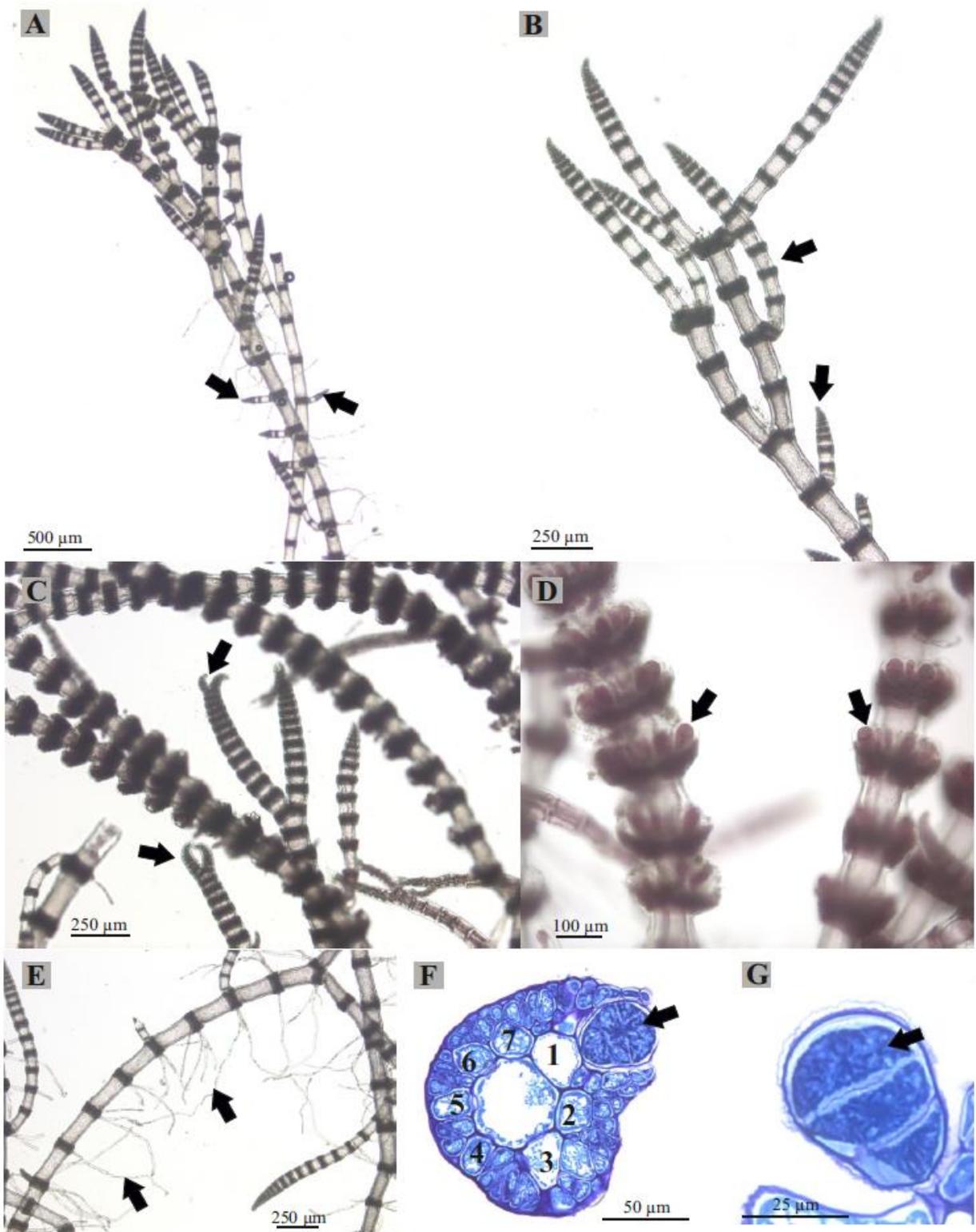


Figura 22. Morfologia del tallo di *Ceramium* sp.#4. A) Pattern di ramificazione del tallo. B) Particolare della zona apicale del tallo con giovani ramificazioni laterali (freccie). C) Tallo con tetrasporangi e apici incurvati (freccie). D) Tetrasporangi nella parte superiore della corticazione (freccie). E) Rizoidi originatisi dalle corticazioni (freccie). F) Sezione trasversale a livello della corticazione in cui sono visibili 7 cellule periaxiali ed un tetrasporangio (freccia). G). Particolare di un tetrasporangio a divisione zonata (freccia).

4.5 Confronto con le specie note presenti in Laguna di Venezia e in Mar Mediterraneo

Per poter determinare se i *taxa* descritti nel paragrafo precedente rappresentino delle nuove segnalazioni per la Laguna di Venezia e per il Mediterraneo, è stato effettuato un confronto di queste quattro specie con quelle segnalate per queste aree basandoci sulle *check-lists* e sulle segnalazioni presenti in letteratura. Per la laguna di Venezia sono stati usati gli studi di Sfriso *et al.* (2009) e Wolf *et al.* (2011a) mentre per quanto riguarda la biodiversità del genere in Mar Mediterraneo ci siamo basati su Gómez Garreta *et al.* (2001), Sartoni & Boddi (2002) e Serio *et al.* (2011).

***Ceramium* sp.#1.** Questa specie, caratterizzata da un tallo completamente corticato e dall'assenza di spine, è filogeneticamente vicina a specie note che presentano la stessa morfologia, *C. secundatum*, *C. botryocarpum*, *C. barbatum*, *C. derbesii* e *C. virgatum* (Fig. 15). Queste specie fino al 2002 erano attribuite illegittimamente a un'unica specie, *C. rubrum*, definita ora "*C. rubrum complex*". Tutte le specie presenti in questo *clade* mostrano quindi fenotipi molto simili ed è stato possibile identificarle solo avvalendosi di tecniche molecolari.

Per quanto riguarda la Laguna di Venezia le specie con questa morfologia sono *C. derbesii* e *C. virgatum*, entrambe distinte a livello genetico da *Ceramium* sp.#1. Possiamo quindi affermare che questo nuovo *taxon* rappresenta una nuova segnalazione per l'ambiente lagunare.

Per quanto riguarda il Mar Mediterraneo sono presenti ulteriori specie completamente corticate: *C. secundatum*, *C. barbatum* e *C. giacconeii* Cormaci & G. Furnari. Per le prime due è stato possibile eseguire un confronto utilizzando i dati molecolari mentre per *C. giacconeii* non è disponibile la sequenza nucleotidica ed è stato effettuato un confronto morfologico. Dalla descrizione di *C. giacconeii* riportata in Cho *et al.* (2003b) (Fig. 23A, B), nonostante la corticizzazione sia molto simile a quella di *Ceramium* sp.#1, incompleta nella parte basale e completa nel resto del tallo, le due specie risultano distinte per la forma degli apici, che in *C. giacconeii* risultano dritti mentre in *Ceramium* sp.#1 fortemente involuti, e per il *pattern* di ramificazione, che in *C. giacconeii* è irregolare mentre in *Ceramium* sp.#1 è pseudodicotomica.

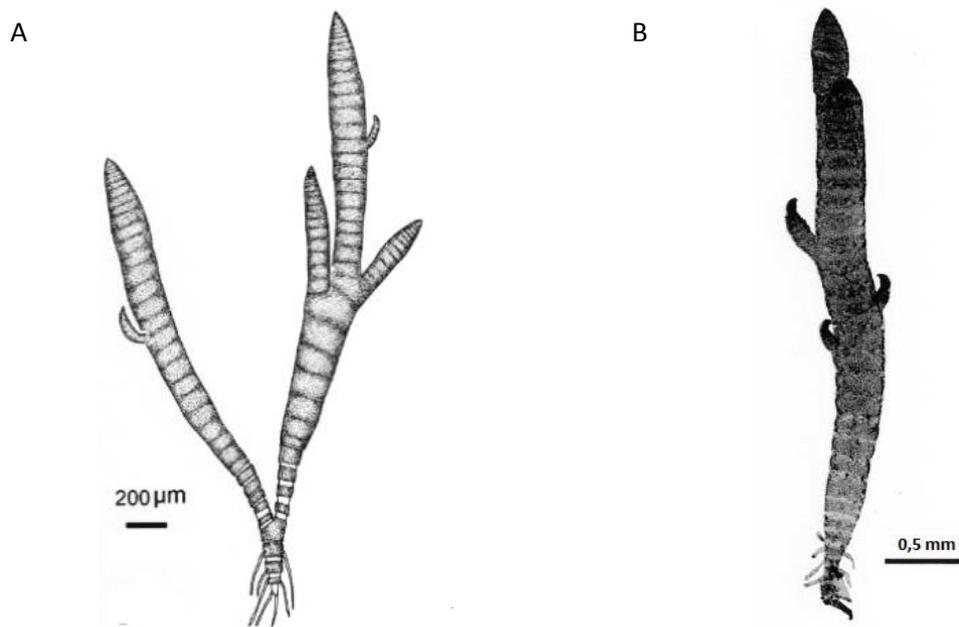


Fig. 23. A) Illustrazione (A) e foto (B) di un tallo di *C. giacconeii*. Immagini tratte da Cho et al., 2003b.

Inoltre il numero di cellule periassiali presenti in *C. giacconeii* è 9 mentre in *Ceramium* sp.#1 è 7. Possiamo quindi affermare che *Ceramium* sp.#1 rappresenta una nuova segnalazione anche per il Mar Mediterraneo.

***Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3.** Queste specie, caratterizzate da un tallo parzialmente corticato privo di spine, sono filogeneticamente vicine a specie con morfologia simile (Fig. 16) quali *C. tenuicorne*, *C. polyceras* e *C. siliquosum*. Anche queste specie fanno parte di un *complex*, in particolare del *Ceramium diaphanum complex* sensu Feldmann-Mazoyer (1941). Il nome *Ceramium diaphanum* è stato assegnato in modo erroneo negli scorsi due secoli ad un ampio numero di *taxa* del genere *Ceramium* (Wolf et al., 2011a). Come per *Ceramium* sp.#1, quindi, anche per queste due specie l'identificazione sarebbe risultata alquanto complicata, proprio per la complessità a livello tassonomico e nomenclaturale, mettendo in evidenza l'utilità di integrare i dati morfologici con quelli molecolari.

Per quanto riguarda la Laguna di Venezia le specie parzialmente corticate e prive di spine sono: *C. cimbricum*, *C. circinatum*, *C. codii*, *C. deslongchampsii*, *C. diaphanum*, *C. polyceras*, *C. siliquosum* e *C. tenerrimum*. A livello genetico *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 sono distinte da tutte queste specie tranne che da *C. codii* per cui non è disponibile la sequenza nucleotidica. *C. codii*, descritta in South & Skelton (2000) (Fig. 24A), presenta 4 cellule periassiali mentre le specie *Ceramium*

sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 sono caratterizzate rispettivamente da 6 e 7 cellule periassiali. Inoltre, anche per quanto riguarda i tetrasporangi, è possibile individuare delle differenze: i tetrasporangi di *C. codii* si originano in coppie lungo le bande nodali (Fig. 24B) mentre nelle specie da noi individuate i tetrasporangi sono sempre più di due per corticazione. Anche per queste due specie possiamo affermare che non sono mai state segnalate prima nell'ambiente della Laguna di Venezia.

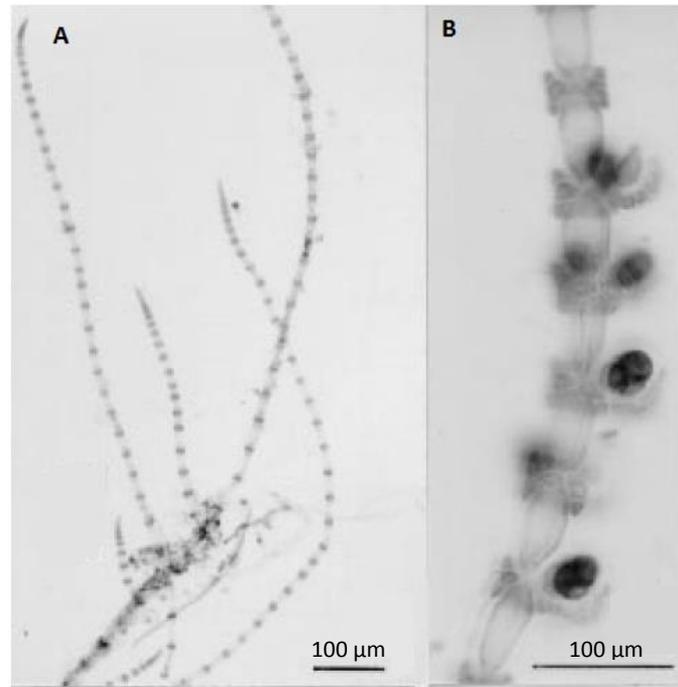


Figura 34. Porzione di tallo (A) e particolare di tetrasporangi (B) di *C. codii*. Immagini tratte da South & Skelton, 2000.

Per quanto riguarda il Mar Mediterraneo le altre specie che presentano talli parzialmente corticati privi di spine sono: *C. bertholdii* Funk, *C. comptum* Borgesen, *C. graecum* Lazaridou & Boudouresque, *C. inconspicuum* Zanardini, *C. petiti* G. Feldmann, *C. bisporum* D.L. Ballantine, *C. cormacii* Serio, Catra, Collodoro & Nisi, *C. strobiliforme* G.W. Lawson & D.M. John. Per la maggior parte di queste è stato possibile effettuare il confronto tramite l'analisi molecolare mentre per altre è stato necessario analizzare i dati morfologici riportati in letteratura.

Ceramium sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 risultano distinte da *C. comptum* (descrizione presente in Serio *et al.*, 2011) per la misura del diametro dei tetrasporangi, che in *C. comptum* è di circa 60 µm mentre nelle due specie risultano di dimensioni minori (40 µm), per l'*habitus* del tallo che in *C. comptum* è di natura prostrata mentre in *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 è eretto e per il numero di cellule periassiali che in *C. comptum* è minore (4).

C. cormacii differisce da *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 per il numero e la posizione dei tetrasporangi presenti in ciascuna banda corticale (Serio *et al.*, 2011). Infatti, il loro numero risulta di 1-2 per nodo in *C. cormacii* mentre in *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 sono presenti in numero maggiore. Inoltre, mentre nelle nostre due specie i tetrasporangi risultano essere completamente immersi all'interno della *cortex*, in *C. cormacii* sono parzialmente esposti, in particolare nella parte superiore della corticizzazione (Fig. 25).

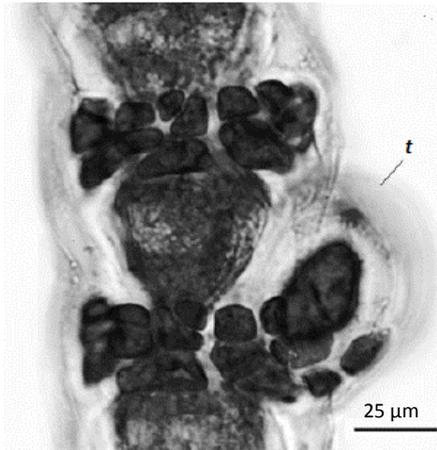


Figura 25. Dettaglio di un tallo di *C. cormacii* in cui è visibile la posizione del tetrasporangio (t). Immagine tratta da Serio *et al.*, 2011.

C. graecum (descrizione tratta da Lazaridou & Boudouresque, 1992), differisce dalle due specie per l'elevato numero di cellule periassiali (in media 10). *C. strobiliforme*, invece, è distinta da *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 per le dimensioni molto contenute del tallo (da 1 a 3 mm) e per la posizione apicale dei tetrasporangi (Cormaci *et al.*, 1992) (Fig. 26).

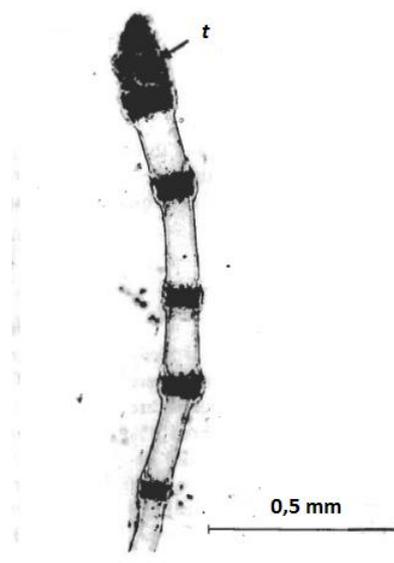


Figura 26. Tetrasporangi (t) di *C. strobiliforme* nella zona apicale. Immagine tratta da Cormaci *et al.*, 1992.

Per quanto riguarda le specie *C. bertholdii* (Funk, 1922) e *C. petitii* (Hauck, 1875) non è stata trovata una descrizione che presenti chiari caratteri diagnostici. Per questo motivo non è stato possibile escludere che *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 possano essere conspecifiche con queste due specie.

***Ceramium* sp.#4.** Questa specie, caratterizzata da un tallo parzialmente prostrato da cui si originano assi eretti parzialmente corticati e privi di spine, non rientra in un *clade* statisticamente supportato (Fig. 17) e le specie filogeneticamente vicine non presentano caratteri morfologici che le accomunano. Ad esempio, *C. dumosertum* presenta un tallo solo parzialmente corticato dotato di spine (Norris & Abbott, 1992) mentre *C. japonicum* risulta completamente corticato e privo di spine (Nakamura, 1965).

In Laguna di Venezia non sono state segnalate specie di *Ceramium* che presentino una morfologia simile a quella di *Ceramium* sp.#4, per cui possiamo affermare che anche in questo caso si tratta di una nuova segnalazione per l'ambiente lagunare. Per quanto riguarda il Mar Mediterraneo, *C. bisporum*, descritto in Sartoni & Boddi (2002) (Fig. 27A), potrebbe essere simile a questa specie per la natura prostrata del tallo. Risulta, però, distinto per il numero di cellule periassiali (4) e per la presenza di bisporangi (Fig. 27B). Allo stesso modo, *C. comptum* si differenzia da *Ceramium* sp.#4 per la forma degli apici (incurvati), il minor numero di cellule periassiali (4) e per la divisione crociata dei tetrasporangi.

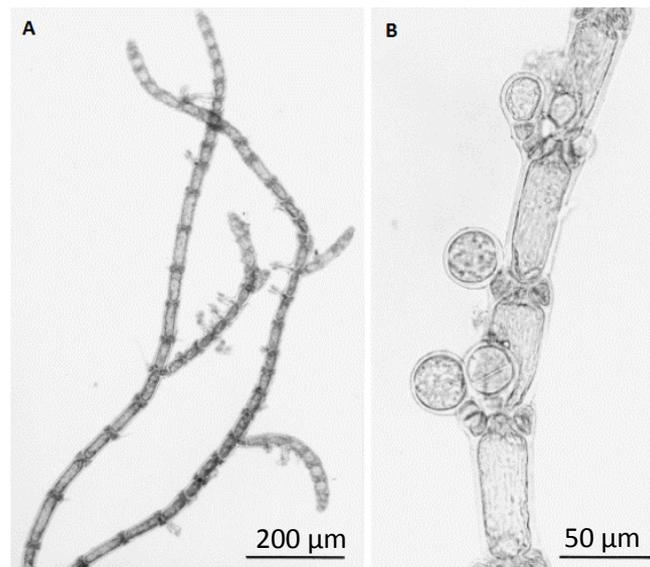


Figura 27. Filamenti prostrati (A) e bisporangi in diverse fasi di sviluppo (B) di *C. bisporum*. Immagini tratte da Sartoni & Boddi, 2002.

C. inconspicuum (descrizione tratta da Cormaci *et al.*, 1994), invece, è una specie poco conosciuta, la cui descrizione risulta molto esigua. La specie è stata descritta per la prima volta da Zanardini (1839) su esemplari raccolti in Dalmazia (attuale regione costiera estesa tra Croazia, Montenegro e Bosnia ed Erzegovina) con le seguenti parole: “*Ceramium filis simplicibus tenuissimis apice rectis, articulis nudis roseis, geniculis cellulosis saturate purpureis.*”. Non essendoci chiari caratteri diagnostici da confrontare, se non alcune immagini dei campioni tipo riportate in Cormaci *et al.* (1994) (Fig. 28), e vista la vicinanza geografica, non possiamo escludere che *Ceramium* sp.#4 possa essere conspecifico con questa specie rara e poco conosciuta.

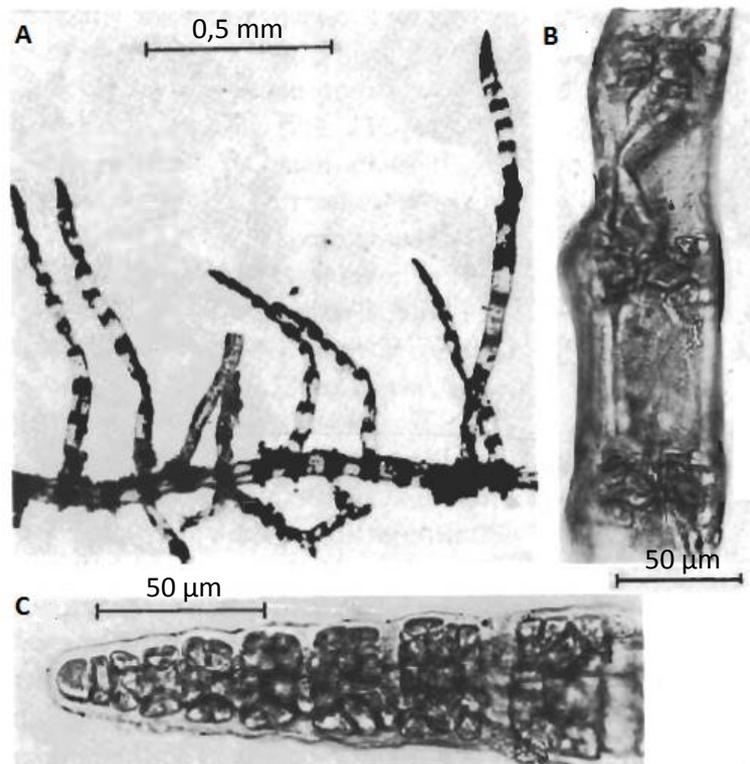


Figura 28. Immagini dei campioni tipo di *C. inconspicuum*. A) Porzione di tallo; B) Porzione di un asse in cui è visibile la corticizzazione parziale; C) Dettaglio di un apice. Immagini tratte da Cormaci *et al.*, 1994.

5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata studiata la biodiversità del genere *Ceramium* Roth all'interno della Laguna di Venezia e dei suoi litorali marini. Sono stati raccolti 61 esemplari di questo genere in sei diverse stazioni di campionamento comprendenti sia aree marine che aree lagunari. Tramite il metodo del DNA *Barcoding*, basato sull'analisi di frammenti selezionati del genoma, è stato possibile identificare in maniera veloce e univoca 29 campioni tra quelli raccolti come appartenenti alle specie note *C. derbesii* e *C. nudiusculum*.

C. derbesii è una specie completamente corticata priva di spine, difficile da identificare e morfologicamente molto simile ad un'altra specie segnalata in laguna con le stesse caratteristiche: *C. virgatum*. Poiché quest'ultima specie non è mai stata segnalata tramite un'analisi genetica e tutti i campioni con tale morfologia sono stati identificati come *C. derbesii*, è probabile che la specie da sempre presente in laguna sia in realtà *C. derbesii* e non *C. virgatum*.

Allo stesso modo, *C. nudiusculum*, una specie parzialmente corticata con spine, risulta essere una forma criptica di un'altra specie segnalata per la laguna: *C. ciliatum*. Poiché dalle indagini molecolari condotte non sono emersi campioni appartenenti alla specie *C. ciliatum*, possiamo supporre che, come nel caso di *C. derbesii*, la specie parzialmente corticata con spine presente in Laguna di Venezia sia *C. nudiusculum* e non *C. ciliatum*.

Per i restanti 32 campioni, invece, non è stato trovato un riscontro a livello di specie all'interno della banca dati *GenBank*. È stato quindi necessario approfondire lo studio di queste specie effettuando un'analisi filogenetica e morfologica. Dal risultato dell'analisi filogenetica sono state identificate quattro specie distinte mai sequenziate fino ad ora.

- *Ceramium* sp.#1, caratterizzata da un tallo completamente corticato e dall'assenza di spine, è filogeneticamente vicina a specie note che presentano la stessa morfologia, *C. secundatum*, *C. botryocarpum*, *C. barbatum*, *C. derbesii* e *C. virgatum*. Si tratta di una specie rara, dato che durante i campionamenti è stato rinvenuto un solo campione e che fino ad oggi non era mai stata segnalata probabilmente per la sua natura criptica. Dal confronto sia genetico che morfologico con le specie note è stato possibile affermare che questa specie

rappresenta una nuova segnalazione sia per la Laguna di Venezia sia per il Mar Mediterraneo.

- *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3, caratterizzate da un tallo parzialmente corticato privo di spine, sono filogeneticamente vicine a specie con morfologia simile quali *C. tenuicorne*, *C. polyceras* e *C. siliquosum*. Come per *Ceramium* sp.#1, anche per queste due specie l'identificazione è risultata alquanto complicata per la presenza di specie criptiche. Dal confronto molecolare e morfologico con specie note, possiamo affermare che esse non sono mai state segnalate prima nell'ambiente della Laguna di Venezia. Invece, per quanto riguarda il Mar Mediterraneo, sono presenti due specie, *C. bertholdii* e *C. petitii*, di cui non è disponibile una descrizione esaustiva dei caratteri diagnostici. Per questo motivo non è stato possibile escludere che *Ceramium* sp.#2 e *Ceramium* sp.#3 possano essere conspecifiche con queste due specie.
- *Ceramium* sp.#4, è una specie caratterizzata da un tallo parzialmente prostrato da cui si originano assi eretti parzialmente corticati e privi di spine. In Laguna di Venezia non sono state segnalate specie di *Ceramium* che presentano una morfologia simile, perciò possiamo affermare che anche in questo caso si tratta di una nuova segnalazione per l'ambiente lagunare. Anche in questo caso si tratta di una specie rara, essendo stati trovati solo due campioni. Questa specie presenta delle caratteristiche morfologiche simili ad una specie poco conosciuta del Mar Mediterraneo, *C. incospicuum*, la cui descrizione risulta molto esigua. Non essendoci chiari caratteri diagnostici da confrontare, se non alcune immagini dei campioni tipo, non possiamo escludere che *Ceramium* sp.#4 possa essere conspecifico con questa specie rara e poco conosciuta.

Tramite queste analisi è possibile affermare che, per quanto riguarda le acque della Laguna di Venezia e dei suoi litorali marini, le quattro specie rappresentano dei nuovi ritrovamenti, andando ad aggiungersi alla lista delle specie già segnalate. La biodiversità di questo genere algale nelle acque lagunari venete è, quindi, maggiore di quanto verificato fino a questo momento. Purtroppo, non è possibile verificare se queste specie fossero già presenti in laguna e non siano state

identificate per la loro natura criptica o se, invece, si tratti di specie introdotte da Paesi extra-mediterranei poiché non è stata trovata nessuna corrispondenza genetica con specie esotiche.

Questo sottolinea l'importanza di integrare le tecniche molecolari alle tradizionali analisi morfologiche per rendere più veloce l'identificazione di nuovi *taxa* algali e permettere monitoraggi più accurati della biodiversità di questi organismi. Infatti, le nuove sequenze nucleotidiche ottenute durante questo studio sono state depositate in *GenBank* e renderanno l'identificazione di queste specie più rapida per le ricerche future anche in altre aree geografiche.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, I.A. 1999.** *Marine Red Algae of the Hawaiian Islands*. Bishop Museum Press, Honolulu.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Barros-Barreto, M.B. & Yoneshigue-Valentin, Y. 2001.** Aspectos morfológicos do gênero *Ceramium* (Ceramiaceae-Rhodophyta) no Estado do Rio de Janeiro. *Hoehnea* 28: 77-110.
- Barros-Barreto, M.B., McIvor, L., Maggs, C.A. & Ferreira, P.C.G. 2006.** Molecular systematics of *Ceramium* and *Centroceras* (Ceramiaceae, Rhodophyta) from Brazil. *J. Phycol.* 42: 905-921.
- Boo, S.M. & Lee, I.K. 1994.** *Ceramium* and *Campylaeophora* (Ceramiaceae, Rhodophyta). In: Akatsuka, I. [Ed.] *Biology of Economic Algae*. SPB Academic Publ. bv., The Hague. Pp. 1-33.
- Boudouresque, C.F. & Verlaque, M. 2002.** Assessing scale and impact of ship-transported alien macrophytes in the Mediterranean Sea. Alien marine organisms introduced by ships in the Mediterranean and Black Seas. *CIESM Workshop Monographs* 20: 53-62.
- Carlton, J.T. & Hodder, J. 1995.** Biogeography and dispersal of coastal marine organisms: experimental studies on a replica of a 16th-century sailing vessel. *Mar. Biol.* 121: 721-730.
- Cecere, E., Moro, I., Wolf, M.A., Petrocelli, A., Verlaque, M. & Sfriso, A. 2011.** The introduced seaweed *Grateloupia turuturu* (Rhodophyta, Halymeniales) in two Mediterranean transitional water systems. *Bot. Mar.* 54: 23-33.
- Cho, T.O., Boo, S.M. & Hansen, G.I. 2001.** Structure and reproduction of the genus *Ceramium* (Ceramiaceae, Rhodophyta) from Oregon, USA. *Phycologia* 40: 547-571.
- Cho, T.O., Boo, S.M., Hommersand, M.H., Maggs, C.A., McIvor, L.J. & Fredericq, S. 2008.** *Gayliella* gen. nov. in the tribe Ceramiaceae (Ceramiaceae, Rhodophyta) based on molecular and morphological evidence. *J. Phycol.* 44: 721-738.
- Cho, T.O., Fredericq, S. & Boo, S.M. 2003a.** *Ceramium inkyuui* sp. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta) from Korea: a new species based on morphological and molecular evidence. *J. Phycol.* 39: 236-247.

- Cho, T.O., Riosmena-Rodriguez, R. & Boo, S.M. 2002.** Developmental morphology of a poorly documented alga, *Ceramium reticorticum* (Ceramiaceae, Rhodophyta), from the Gulf of California, Mexico. *Cryptogamie, Algol.* 23: 277-289.
- Cho, T.O., Riosmena-Rodriguez, R. & Boo, S.M. 2003b.** First Record of *Ceramium giacconeii* (Ceramiaceae, Rhodophyta) in the North Pacific: Developmental Morphology of Vegetative and Reproductive Structures. *Bot. Mar.* 46: 548-554.
- Clarkston, B.E. & Saunders, G.W. 2010.** A Comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany* 88: 119-131.
- Cormaci, M. & Motta, G. 1987.** Osservazioni sulla morfologia di *Ceramium rubrum* (Hudson) C. Agardh (Rhodophyta, Ceramiales) in coltura e considerazioni sulla sua tassonomia. *Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat. Catania* 20: 239-251.
- Cormaci, M., Furnari, G., Alongi, G., Dinaro, R. & Pizzuto, F. 1992.** On the Occurrence in Sicily of Three Florideophyceae New to the Mediterranean Sea. *Bot. Mar.* 35: 447-449.
- Cormaci, M., Furnari, G., Alongi, G. & Serio, D. 1994. On three interesting marine red algae (Ceramiaceae, Rhodophyta) from the Mediterranean Sea. *Giorn. Bot. Ital.* 128: 1001-1006.
- Cribb, A.B. 1983.** *Marine Algae of the Southern Great Barrier Reef-Part I Rhodophyta. Handbook No.2.* Australian Coral Reef Society, Brisbane.
- Curiel, D., Bellemo, G., La Rocca, B., Scattolin, M. & Marzocchi, M. 2005.** First Report of *Polysiphonia morrowii* Harvey (Ceramiaceae, Rhodophyta) in the Mediterranean Sea. *Bot. Mar.* 45: 66-70.
- Curiel, D., Guidetti, P., Bellemo, G., Scattolin, M. & Marzocchi, M. 2002.** The introduced alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae) in the lagoon of Venice. *Hydrobiologia* 477: 209-219.
- Curiel, D., Rismondo, A., Bellemo, G. & Marzocchi, M. 2004.** Macroalgal biomass and species variations in the Lagoon of Venice (Northern Adriatic Sea, Italy): 1981-1998. *Sci. Mar.* 68: 57-67.
- den Hartog, C. 1977.** Structure, function and classification in seagrass communities. In: McRoy, C.P. & Helfferich, C. [Eds] *Marine Science Volume 4: Seagrass Ecosystems, A Scientific Perspective.* Marcel Dekker, Inc., New York. Pp. 89-122.

- Destombe, C., Valero, M. & Guillemin, M.L. 2010.** Delineation of two sibling red algal species, *Gracilaria gracilis* and *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta), using multiple DNA markers: resurrection of the species *G. dura* previously described in the northern Atlantic 200 years ago. *J. Phycol.* 46: 720-727.
- Dixon, P.S. 1960.** Studies on marine algae of the British Isles: the genus *Ceramium*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 39: 331-374.
- Dunn, C.P. 2003.** Keeping taxonomy based in morphology. *Trends Ecol. Evol.* 18: 270-271.
- Edwards, P. 1973.** Life history studies of selected British *Ceramium* species. *J. Phycol.* 9: 181-184.
- Erickson, D.L. & Driskell, A.C. 2012.** Construction and Analysis of Phylogenetic Trees Using DNA Barcode Data. *Methods Mol. Biol.* 858: 395-408.
- Facca, C., Sfriso, A. & Socal, G. 2002a.** Temporal and spatial distribution of diatoms in the surface sediment of the central part of the Venice Lagoon. *Bot. Mar.* 45: 170-183.
- Facca, C., Sfriso, A. & Socal, G. 2002b.** Changes in abundance and composition of phytoplankton and microphytobenthos due to increased sediment fluxes in the Venice Lagoon, Italy. *Est. Coast. Shelf Sci.* 54: 773-792.
- Famà, P., Wysor, B., Kooistra, W. & Zuccarello, G.C. 2002.** Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. *J. Phycol.* 38: 1040-1050.
- Feldmann-Mazoyer, G. 1941.** *Recherches sur les Céramiacées de la Méditerranée occidentale*. Imprimerie Minerva, Paris. Pp. 510.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Floyd, R., Lima, J., deWaard, J., Humble, L. & Hanner, R. 2010.** Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. *Biol. Invasions* 12: 2947-2954.
- Fonseca, M.S. 1990.** Regional analysis of the creation and restoration of seagrass systems. In: Kusler, J.A. & Kentula, M.E. [Eds] *Wetland creation and restoration*. Island Pres, Washington D.C. Pp. 171-194

- Freshwater, D.W. & Rueness, J. 1994.** Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33: 187-94.
- Freshwater, D.W., Fredericq, S., Butler, B.S., Hommersand, M.H. & Chase, M.W. 1994.** A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7281-7285.
- Funk, G. 1922.** Über einige Ceramiaceen aus dem Golf von Neapel. *Beibefte zum botanischen Centralblatt* 39: 223-247.
- Gabrielsen, T.M., Brochmann, C. & Rueness, J. 2003.** Phylogeny and interfertility of North Atlantic populations of “*Ceramium strictum*” (Ceramilales, Rhodophyta): How many species? *Eur. J. Phycol.* 38: 1-13.
- Garbary, D. 1988.** Interoceanic hybridization in fully corticated *Ceramium* isolates (Rhodophyta) from Nova Scotia and Washington. *The Korean Journal of Phycology* 3: 89-93.
- Garbary, D.J., Grund, D. & McLachlan, J. 1978.** The taxonomic status of *Ceramium rubrum* (Huds.) C. Ag. (Ceramilales, Rhodophyceae) based on culture experiments. *Phycologia* 17: 85-94.
- Gómez Garreta, A., Gallardo, T., Ribera, M.A., Cormaci, M., Furnari, G., Giaccone, G. & Boudouresque, C.F. 2001.** Checklist of Mediterranean Seaweeds. III. Rhodophyceae Rabenh. 1. Ceramilales Oltm. *Bot. Mar.* 44: 425-460.
- Grosholz, E.D., Crafton, R.E., Fontana, R.E., Pasari, J.R., Williams, S.L. & Zabin, C.J. 2015.** Aquaculture as a vector for marine invasions in California. *Biol. Invasions* 17: 1471-1484.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2018.** *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 10 February 2018.
- Händeler, K., Wägele, H., Wahrmund, U., Rüdinger, M. & Knoop, V. 2010.** Slugs’ last meals: molecular identification of sequestered chloroplast from different algal origins in Sacoglossa (Opisthobranchia, Gastropoda). *Mol. Ecol. Resour.* 10: 968-978.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. & Hickey, D.A. 2007.** DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* 23: 167-172.
- Hayden, H.S. & Waaland, J.R. 2004.** A molecular systematic study of *Ulva* (Ulvaceae, Ulvales) from the northeast Pacific. *Phycologia* 43: 364-382.

- Hauck, F. 1875.** Verzeichniss der im Golfe von Triest gesammelten Meeralgeln. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 25: 245-248, 283-287, 316-318, 348-352, 386-390.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard J.R. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 313-321.
- Hommersand, M.H. 1963.** The morphology and classification of some Ceramiaceae and Rhodomelaceae. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 35: 165-366.
- Jarman, S.N. & Elliott, N.G. 2000.** DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, “living fossils” from the Triassic. *J. Evol. Biol.* 13: 624-633.
- Kamiya, M., King, R.J., Zuccarello, G.C., Tanaka, J. & Hara, Y. 1998.** Evolutionary divergence in the red algae *Caloglossa leprieurii* and *C. apomeiotica*. *J. Phycol.* 34: 361-370.
- Karleskint, G., Turner, R. & Small, J. 2009.** *Introduction to Marine Biology*. Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, CA.
- Kimura, M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Knowlton, N. 1993.** Sibling species in the sea. *A. Rev. Ecol. Syst.* 24: 189-216.
- Kumar, S. & Gadagkar, S.R. 2000.** Efficiency of the neighbour-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *J. Mol. Evol.* 51: 544-553.
- La Rocca, B. 1976.** *Il libro delle alghe*. Muzzio Editore, Padova.
- Lazaridou, E. & Boudouresque, C.F. 1992.** On a New Species of *Ceramium*, *C. graecum* (Rhodophyta: Ceramiaceae) from Greece. *Bot. Mar.* 35: 561-565.
- Lee, S.R., Suh, Y. & Lee, I.K. 2001.** Phylogenetic utility of *rbcS* sequences: an example from *Antithamnion* and related genera (Ceramiaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* 37: 1083-1090.
- Le Gall, L. & Saunders, G.W. 2010.** DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *J. Phycol.* 46: 374-389.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J.M., Zuccarello, G.C. & De Clerck, O. 2014.** DNA-based species delimitation in algae. *Eur. J. Phycol.* 49: 179-196.

- Lipscomb, D., Platnick, N. & Wheeler, Q. 2003.** The intellectual content of taxonomy: A comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18: 65-66.
- Maggs, C.A. & Hommersand, M.H. 1993.** Seaweeds of the British Isles, vol.1, Rhodophyta, part 3A, Ceramiales. London: HMSO. Pp. 444.
- Maggs, C.A., Verbruggen, H. & de Clerck, O. 2007.** Molecular systematics of red algae: building future structures on firm foundations. In: Brodie, J.*et al.* [Eds] *Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics*. The Systematics Association Special Volume Series 75: pp. 103-121.
- Maggs, C.A., Ward, B.A., McIvor, L.M., Evans, C.M., Rueness J. & Stanhope M.J. 2002.** Molecular analyses elucidate the taxonomy of fully corticated, nonspiny species of *Ceramium* (Ceramiaceae, Rhodophyta) in the British Isles. *Phycologia* 41: 409-420.
- Marchini, A, Ferrario, J., Sfriso A. & Occhipinti-Ambrogi, A. 2015.** Current status and trends of biological invasions in the Lagoon of Venice, a hotspot of marine NIS introductions in the Mediterranean Sea. *Biol. Invasions* 17: 2943-2962.
- Marshall, E. 2005.** Taxonomy. Will DNA bar codes breathe life into classification? *Science* 307: 1037.
- Millar, A.J.K. 1990.** Marine red algae of the Coffs Harbour regions, northern New South Wales. *Aust. Syst. Bot.* 3: 293-593.
- Mineur, F., Johnson, M.P., Maggs, C.A. & Stegenga, H. 2007.** Hull fouling on commercial ships as a vector of macroalgal introduction. *Mar. Biol.* 151: 1299-1307.
- Moniz, M.B.J. & Kaczmarska, I. 2010.** Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. *Protist* 161: 7-34.
- Nakamura, Y. 1965.** Species of the genera *Ceramium* and *Campylaeophora*, especially those of northern Japan. *Sci. Pap. Inst. Algal. Res., Fac. Sci., Hokkaido Univ.* 5: 119-180.
- Naylor, R., Williams, S. & Strong, D. 2001.** Aquaculture: a gateway for exotic species. *Science* 294: 1655–1656.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J. & Ragupathy, S. 2006.** DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Can. J. Bot.*, 84: 335-341.
- Nielsen, R. & Matz, M. 2006.** Statistical approaches for DNA barcoding. *Syst. Biol.* 55: 162-169.

- Norris, R.E. & Abbott, I.A. 1992.** New Taxa of Ceramieae (Rhodophyta) from Hawaii. *Pac. Sci.* 46: 453-465.
- Occhipinti-Ambrogi, A., Marchini, A., Cantone, G., Castelli, A., Chimenz, C., Cormaci, M., Froggia, C., Furnari, G., Gambi, M.C., Giaccone, G., Giangrande, A., Gravili, C., Mastrototaro, F., Mazziotti, C., Orsi-Relini, L. & Piraino, S. 2011.** Alien species along the Italian coasts: an overview. *Biol. Invasions* 13: 215-237.
- Olivi, G. 1794.** Sopra una nuova specie di Ulva delle Lagune Venete. *Saggi Scientifici e letterali dell'Accademia di Padova* 3:1.
- Orel, G., Boatto, V., Sfriso, A. & Pellizzato, M. 2000.** *Piano per la gestione delle risorse alieutiche delle lagune della Provincia di Venezia*. Provincia di Venezia. Sannioprint, Benevento.
- Pignatti, S. 1962.** Associazioni di alghe marine sulla costa Veneziana. *Mem. Ist. Veneto Sci, Lett. Arti, Cl. Sci. Mat. Nat.* 32: 1-134.
- Pignatti, S. & Pignatti, E. 1966.** Anthropogene meeresalgen-gesellschaften an der Adriatischen Küste. In: Tüxen, R. [Ed.] *Anthropogene Vegetation*, Verlag Dr. Junk W., Den Haag. Pp 1-7
- Pignatti, S. & Wikus, E. 1962.** Descrizione di *Sargassum hornschuchii* un'alga bruna recentemente ritrovata presso Venezia. *Atti Ist. Ven. Sci. Lett. Arti, Cl. Sci. Mat. Nat.* 120: 215-225.
- Pirazzoli, P. 1974.** Dati storici sul medio mare a Venezia. *Atti Acc. Sci. Istituto Bologna* 13: 125-148.
- Ribera Siguan, M.A. 2003.** Pathways of biological invasions of marine plants. In: Ruiz, G.M. & Carlton, J.T. [Eds.] *Invasive species: vectors and management strategies*. Washington, DC, Island Press. Pp. 183-226.
- Robba, L., Russell, S.J., Barker, G.L. & Brodie, J. 2006.** Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *Am. J. Bot.* 93: 1101-1108.
- Roth, A.W. 1797.** *Catalecta botanica quibus plantae novae et minus cognitae describuntur atque illustrantur*. Bibliopolo I.G. Mülleriano, Lipsia. Pp. 244.
- Rueness, J. 1978.** Hybridization in red alga. In: Irvine, D.E.G. & Price, J.H. [Eds] *Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae*. Academic press, London. Pp. 247-262.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

- Saitou, N. & Nei, M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sartoni, G. & Boddi, S. 2002.** *Ceramium bisporum* (Ceramiaceae, Rhodophyta), a New Record for the Mediterranean Algal Flora. *Bot. Mar.* 45: 566-570.
- Saunders, G.W. 2005.** Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 360: 1879-1888.
- Saunders, G.W. 2008.** A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea-Neodilsea* complex and *Weeksia*. *Botany* 86: 773-789.
- Saunders, G.W. 2009.** Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* in British Columbia. *Mol. Ecol. Resour.* 9: 140-150.
- Seberg, O., Humphries, C.J., Knapp, S., Stevenson, D.W., Petersen, G., Scharff, N. & Andersen, N.M. 2003.** Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18: 63-65.
- Serio, D., Catra, M., Collodoro, D. & Nisi, A. 2011.** *Ceramium cormacii* sp. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta), a new Mediterranean species epizoic on loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Bot. Mar.* 54: 545-550.
- Sfriso, A. 1987.** Flora and vertical distribution of macroalgae in the lagoon of Venice: a comparison with previous studies. *Giorn. Bot. Ital.* 121: 69-85.
- Sfriso, A. & Curiel, D. 2007.** Check-list of marine seaweeds recorded in the last 20 years in Venice Lagoon and a comparison with the previous records. *Bot. Mar.* 50: 22-58.
- Sfriso, A. & Facca, C. 2011.** Macrophytes in the anthropic constructions of the Venice littorals and their ecological assessment by an integration of the “CARLIT” index. *Ecol. Indic.* 11: 772-781.
- Sfriso, A. & Facca, C. 2013.** Annual growth and environmental relationships of the invasive species *Sargassum muticum* and *Undaria pinnatifida* in the lagoon of Venice. *Estuar. Coast. Shelf S.* 129: 162-172.
- Sfriso, A. & Marchini, A. 2014.** Updating of non-native macroalgae in the Italian coasts: new introductions and cryptic species. In: *Atti 45° Congresso SIBM*, Venezia. Pp. 38-41.

- Sfriso, A., Buosi, A. & Sfriso A.A. 2014a.** On the occurrence of *Uronema marinum* Womersley (Chaetophorales, Chlorophyta) in the north-western lagoons of the Adriatic Sea, Mediterranean Sea (Italy). *Mediterr. Mar. Sci.* 15: 101-105.
- Sfriso, A., Campolin, M., Sfriso, A.A., Buosi, A. & Facca, C. 2012a.** Cambio della flora e della vegetazione acquatica in gradienti ecologici dalle bocche di porto ad alcune valli da pesca della laguna veneta. *Biol. Mar. Mediterr.* 19: 53-56.
- Sfriso, A., Curiel, D. & Rismondo, A. 2009.** The Lagoon of Venice. In: Cecere, E., Petrocelli, A., Izzo, G. & Sfriso A. [Eds] *Flora and Vegetation of the Italian Transitional Water Systems*, Corila, Multigraf, Spinea. Pp. 17-80.
- Sfriso, A., Facca, C. & Ceoldo, S. 2004.** Growth and production of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson in the Venice Lagoon. In: Campostrini, P. [Ed.] *Scientific Research and Safeguarding of Venice. CoRiLa. Research Programme 2001-2003. 2002 Results*. Multigraf, Spinea. Pp. 229-236.
- Sfriso, A., Facca, C. & Raccanelli, S. 2014b.** PCDD/F and dioxin-like PCB bioaccumulation by Manila clam from polluted areas of Venice lagoon (Italy). *Environ. Pollut.* 184: 290-297.
- Sfriso, A., Facca, C. & Tibaldo, M. 2005.** Macrophyte biomass updating in the lagoon of Venice. In Lasserre, P., Viaroli, P. & Campostrini P. [Eds] *Lagoons and Coastal Wetlands in the Global Change Context: Impacts and Management Issues*. IOC Integrated Coastal Area Management (ICAM), Dossier N°3. UNESCO. Pp. 224-231.
- Sfriso, A., Maistro, S., Andreoli, C. & Moro, I. 2010.** First record of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Po Delta Lagoons, Mediterranean Sea (Italy). *J. Phycol.* 46: 1024-1027.
- Sfriso, A., Wolf, M.A., Maistro, S., Sciuto, K. & Moro, I. 2012b.** Spreading and autoecology of the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta) in the lagoons of the north-western Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy). *Estuar. Coast. Shelf S.* 114: 192-198.
- Skage, M., Gabrielsen, T.M. & Rueness, J. 2005.** A molecular approach to investigate the phylogenetic basis of three widely used species groups in the red algal genus *Ceramium* (Cerariales, Rhodophyta). *Phycologia* 44: 353-360.
- South, G.R. & Skelton, P.A. 2000.** A Review of *Ceramium* (Rhodophyceae, Cerariales) from Fiji and Samoa, South Pacific. *Micronesica* 33: 45-98.

- Stachowicz, J.J., Terwin, J.R., Whitlatch, R.B. & Osman, R.W. 2002.** Linking climate change and biological invasions: ocean warming facilitates non-indigenous species invasion. *PNAS USA* 99: 15497-15500.
- Stoeckle, M. 2003.** Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *Bioscience* 53: 796-797.
- Suh, Y. & Lee, I.K. 1984.** Morphology and reproduction of some species of *Ceramium* (Rhodophyta) in culture. *Korean Journal of Botany* 27: 163-171.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. & Hillis, D.M. 1996.** Phylogenetic inference. In: Hillis D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. [Eds] *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Boston. Pp. 407-514.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H. & Vogler, A.P. 2003.** A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18: 70-74.
- Thornber, C.S. 2006.** Functional properties of the isomorphic biphasic algal life cycle. *Integr. Comp. Biol.* 46: 605-614.
- Walker, R.H., Brodie, J., Russell, S., Irvine, L.M. & Orfanidis, S. 2009.** Biodiversity of coralline algae in the Northeast Atlantic including *Corallina caespitosa* sp. nov. (Corallinoideae, Rhodophyta). *J. Phycol.* 45: 287-297.
- Wallentinus, I. 2002.** Introduced Marine Algae and Vascular Plants in European Aquatic Environments. In: Leppäkoski, E., Gollasch, S. & Olenin, S. [Eds] *Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management*. Springer, Dordrecht. Pp. 27-52.
- Williams, S.L. & Smith, J. 2007.** A Global Review of the Distribution, Taxonomy, and Impacts of Introduced Seaweeds. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S* 38: 327-359.
- Wolf, M.A., Sciuto, K., Andreoli, C. & Moro, I. 2012.** *Ulva* (Chlorophyta, Ulvales) Biodiversity in the North Adriatic Sea (Mediterranean, Italy): Cryptic Species and New Introductions. *J. Phycol.* 48: 1510-1521.
- Wolf, M.A., Sciuto, K., Maggs, C.A., Barros-Barreto, M.B., Andreoli, C. & Moro, I. 2011a.** *Ceramium* Roth (Ceramiales, Rhodophyta) from Venice lagoon (Adriatic Sea, Italy): Comparative studies of Mediterranean and Atlantic taxa. *Taxon* 60: 1584-1595.

- Wolf, M.A., Sfriso, A., Andreoli, C. & Moro, I. 2011b.** The presence of exotic *Hypnea flexicaulis* (Rhodophyta) in the Mediterranean Sea as indicated by morphology, *rbcL* and *cox1* analyses. *Aquat. Bot.* 95: 55-58.
- Wolf, M.A., Sfriso, A. & Moro, I. 2014.** Thermal pollution and settlement of new tropical alien species: The case of *Grateloupia yinggehaiensis* (Rhodophyta) in the Venice Lagoon. *Estuar. Coast. Shelf S.* 147: 11-16.
- Womersley, H.B.S. 1978.** Southern Australian Species of *Ceramium* Roth (Rhodophyta). *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 29: 205-257.
- Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Qian, J. & Wallace, R.B. 1991.** The Effect of Temperature and Oligonucleotide Primer Length on the Specificity and Efficiency of Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *DNA Cell Biol.* 10: 233-238.
- Yang, E.C. & Boo, S.M. 2004.** Evidence for two independent lineages of *Griffithsia* (Ceramiales, Rhodophyta) based on plastid protein-coding *psaA*, *psbA* and *rbcL* gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 680-688.
- Zanardini, G. 1839.** Sulle alghe. *Lettera alla Direzione della "Biblioteca italiana"* 96: 131-137.
- Zanardini, G. 1841.** Synopsis algarum in Mari Adriatico hucusque collectarum cui accedunt monographia siphoniarum nec non generales de algarum vita et structura disquisitiones cum tabulis auctoris manu ad vivum depictis. *Mem. Reale Accad. Sci. Torino. Ser. II, Tomo IV:* 105-255.
- Zanardini, G. 1846.** Delle Callitamniee e di alcune nuove specie del genere *Callithamnion* Ag. *Giorn. Bot. Ital.* 2: 28-40.
- Zanardini, G. 1847.** Notizie intorno alle cellulari marine delle lagune e de' litorali di Venezia. *Atti Reale Ist. Veneto Sci. Lett. Arti. Ser.1, 6:* 185-262.
- Zanardini, G. 1860-1871.** *Iconografia Phycologica Adriatica ossia scelta di Ficee nuove o più rare del Mare Adriatico. Vol. I-III.* Antonelli, Venezia.
- Zuccarello, G., Price, N., Verbruggen, H. & Leliaert, F. 2009.** Analysis of plastid multigene dataset and the phylogenetic position of the marine macroalga *Caulerpa filiformis* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 45: 1206-1212.
- Zuliani, A., Zaggia, L., Collavini, F. & Zonta, R. 2005.** Freshwater discharge from the drainage basin to the Venice Lagoon (Italy). *Environ. Int.* 31: 929-938.