



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

Dipartimento di Biologia Ambientale e Biodiversità

Settore Scientifico Disciplinare: Zoologia BIO/05

Dottorato di Ricerca in Biologia Animale

XXIII Ciclo

Anno Accademico 2011

Filogenesi e Filogeografia del Sistema

Brachidontes pharaonis-variabilis

(Bivalvia, Mytiloidea, Mytilidae)

Coordinatore:

Prof. Nicolò Parrinello

Dottoranda:

Tiziana Curatolo

Tutor:

Prof. Marco Arculeo

INDICE

Introduzione	pag.4
1.1. Obiettivo dello studio	pag.7
1.2. Specie Criptiche	pag.8
1.3. Biologia della Specie	pag.12
2. Materiali e Metodi	pag.16
2.1. Campioni e Siti di Campionamento	pag.16
2.2. Tecniche morfologiche e morfometriche	pag.23
2.2.1. Morfologia	pag.23
2.2.2. Morfometria Geometrica	pag.26
2.3. Tecniche Molecolari	pag.33
2.3.1. Marcatori Molecolari	pag.35
2.3.2. PCR	pag.38
2.3.3. Metodologie Molecolari	pag.41
<i>a.</i> Amplificazione: il 16S	pag.42
<i>b.</i> Amplificazione: la COI	pag.42
<i>c.</i> Amplificazione: il 28S	pag.43
<i>d.</i> Amplificazione: ITS	pag.44
2.3.4. Analisi Filogenetiche	pag.52
3. Risultati	pag.54
3.1. Risultati Nucleari	pag.54
3.2. Risultati Mitocondriali	pag.57
3.2.1. Mar Mediterraneo-Mar Rosso, Oceano Indiano e Oceano Pacifico	pag.57
3.2.2. Mar Mediterraneo-Mar Rosso	pag.65
3.3. Risultati di Morfometria Geometrica	pag.72
3.3.1. Mar Mediterraneo-Mar Rosso, Oceano Indiano e Oceano Pacifico	pag.72

3.3.2. Mar Mediterraneo-Mar Rosso

pag.79

4. Discussioni e Conclusioni

pag.85

5. Bibliografia

pag.92

Introduzione

L'interesse per il genere *Brachidontes* (Swainson, 1840) nasce dalla mancanza di caratteri morfologici chiave, per la distinzione tra specie al suo interno. Questa difficoltà sull'identificazione di specie è stata aggravata nel tempo dalle diverse interpretazioni dei caratteri morfologici data da diversi autori, che hanno contribuito ad aumentare il numero di sinonimi.

Secondo l'American Museum of Natural History le specie appartenenti al genere *Brachidontes* sono 27 (Tab.I), ma come si evince dalla tabella mancano sicuramente dei binomi, quali: il *Brachidontes purpuratus* (Lamarck, 1819), *Brachidontes darwinianus* (d'Orbigny, 1846), *Brachidontes houstonius* (Bartsch & Rehder, 1939), *Brachidontes senegalensis* (Smith, 1891), e *Brachidontes pharaonis* (Fisher, 1870). Questi potrebbero non essere stati considerati, poiché ritenuti sinonimi di altre specie già presenti. Probabilmente ad oggi è difficile sapere quante specie di *Brachidontes* sono realmente esistenti.

L'evoluzione del cambiamento morfologico e dei caratteri fisiologici nel genere *Brachidontes*, così come in tutti gli organismi, è così complessa che l'approccio basato solo sull'esame di questi aspetti non produce un chiaro quadro della storia evolutiva.

A peggiorare la situazione si aggiunge l'introduzione del concetto di insieme di specie criptiche (vedi paragrafo 1.2). Infatti come si è visto in uno studio sul *Brachidontes exustus* è possibile che siano state raggruppare in una sola specie più gruppi di specie che hanno caratteristiche morfologiche indistinguibili ma che presentano una chiara separazione al livello genetico.

In questo lavoro si è cercato di rivisitare le conoscenze sul *Brachidontes variabilis* (Krauss, 1848). La vasta area di distribuzione e la difficile interpretazione dei caratteri morfologici della conchiglia attribuirono a questa specie vari nomi tutti considerati sinonimi, come ad esempio: *Mytilus exustus* Linnaeus, 1827, *Mytilus* (o *Hormomya*) *variabilis* Krauss, 1848, *Brachidontes semistriatus* Krauss (1848), *Mytilus* (o *Brachidontes pharaonis*) (Fisher, 1870), *Mytilus senegalensis* Lamarck (1889), *Mytilus arabicus* Jousseaume (1919).

<i>Specie</i>	<i>Autore</i>	<i>Areale</i>
<i>Brachidontes adamansianus</i>	Dunker (1857)	America Occidentale
<i>Brachidontes arborescens</i>	Dillwyn (1817)	Giappone
<i>Brachidontes australis</i>	Sowerby	Oceano Indiano
<i>Brachidontes citrina</i>	Röding (1798)	Mar dei Caraibi
<i>Brachidontes crebricostatus</i>	Conrad (1837)	Indo-Pacifico
<i>Brachidontes domingensis</i>	Lamarck (1819)	America
<i>Brachidontes erosus</i>	Lamarck (1819)	Australia
<i>Brachidontes exustus</i>	Linnaeus (1758)	America
<i>Brachidontes granulata</i>	Hanley (1843)	Cile
<i>Brachidontes multiformis</i>	Carpenter (1855)	America
<i>Brachidontes niger</i>	Gmelin (1791)	Africa Occidentale
<i>Brachidontes playasensis</i>	Pilsbry & Olsson (1935)	America Occidentale
<i>Brachidontes puniceus</i>	Gmelin (1791)	Africa Occidentale
<i>Brachidontes puntarenensis</i>	Pilsbry & Olsson (1932)	America Occidentale
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	d'Orbigny (1846)	America Orientale
<i>Brachidontes rostratus</i>	Dunker (1856)	Australia
<i>Brachidontes semilaevis</i>	Menke (1849)	America Occidentale
<i>Brachidontes semistriatus</i>	Krauss (1848)	Sud-Africa
<i>Brachidontes setiger</i>	Dunker (1856)	Indo-Pacifico
<i>Brachidontes solisianus</i>	d'Orbigny (1846)	America Orientale
<i>Brachidontes striatulus</i>	Hanley (1853)	Cina-Giappone
<i>Brachidontes subramosus</i>	Hanley (1850)	Cina
<i>Brachidontes sulcata=citrina*</i>	Lamarck (1819)	Mar dei Caraibi
<i>Brachidontes ustulatus</i>	Lamarck (1819)	Australia
<i>Brachidontes variabilis</i>	Krauss (1848)	Indo-Pacifico
<i>Brachidontes virgiliae</i>	Barnard (1964)	Sud-Africa
<i>Brachidontes watsoni</i>	Smith (1885)	Indo-Pacifico

Tab. I: Lista delle specie del genere *Brachidontes* e loro distribuzione geografica secondo l'American Museum of Natural History.* Specie considerata sinonima.

Visto che il range di distribuzione del *B. variabilis* si ascrive all'area occidentale dell'Oceano Pacifico, all'Oceano Indiano, al Mar Rosso e al Mar Mediterraneo (Taylor 1971; Sasekumar 1974; Barash and Danin 1986; Morton 1988) e che quindi occupa un territorio molto vasto, è legittimo pensare, anche in questo caso, di essere in presenza di un potenziale gruppo di specie criptiche.

La biologia molecolare ha permesso uno studio più preciso dell'evoluzione delle relazioni tra organismi, grazie al raffronto del loro DNA. Nell'indagine sul

Brachidontes variabilis l'integrazione delle informazioni genetiche con nuove tecniche di analisi della forma prospetta l'ottenimento di un quadro più preciso.

Queste tecniche sono state ritenute idonee per il raggiungimento dei nostri scopi, infatti l'analisi della variazione genetica a livello di marcatore molecolare è un valido strumento per definire i livelli di diversità, accertare eventuali frammentazioni delle popolazioni, risalire alle modalità di colonizzazione, chiarire l'esatta posizione sistematica delle specie (Arculeo et al., 1996), inoltre lavori di morfometria geometrica di Baylac et al. (2003), Catalano et al. (2010) e Dvorak et al. (2006), dimostrano che questa tecnica può anche essere un utile supporto per la discriminazione tra taxon.

L'interesse inoltre è stato focalizzato sulle ricostruzioni della recente colonizzazione del Mar Mediterraneo da parte di questa specie sotto le veci del sinonimo *B. pharaonis*. Poiché conoscere i meccanismi adattativi di specie, fornisce importanti informazioni da utilizzare per predire eventuali effetti sugli ecosistemi.

Il mollusco *B. pharaonis* (Fisher, 1870) è un colonizzatore lessepsiano (Ben Tuvia, 1970, 1985; Por, 1978) del Mar Rosso che con successo si sta diffondendo nel Mar Mediterraneo, a partire dai primi anni 60 con una velocità di diffusione di circa 10 Km /anno (Gruvell & Moazzo, 1931) e aumentando poi tale velocità fino a circa 50 Km/anno (Di Geronimo, 1971). Tale immigrazione, frenata inizialmente dopo l'apertura del Canale dall'alta salinità (oltre 50‰ nei primi metri) dei Laghi Amari, è andata progressivamente aumentando, forse favorita, oltre che dal dissalamento di questi Laghi, anche dal riscaldamento superficiale delle acque del Mediterraneo (Astrali et al., 1995; Bianchi & Morri, 2000). Pur essendo il Canale di Suez, per le sue condizioni (lungo, stretto, povero di diversità di habitat e con condizioni ambientali difficili), una barriera e pur essendo che il biota del Mar Rosso è inconfondibilmente Indo-Pacifico mentre quello del Mar Mediterraneo è più Atlantico, l'alta plasticità ecologica di questa specie ha permesso la sua colonizzazione. Infatti questa specie presenta le caratteristiche ecologiche che Safriel e Lipkin (1964) e Por (1977) hanno riscontrato nelle specie lessepsiane: alta capacità di dispersione larvale, plasticità ecologica (eurialina, euriterma, generalista, opportunista nei confronti di habitat e dell'alimentazione), crescita rapida, maturità sessuale precoce, alta fecondità e un periodo di vita breve. Il *Brachidontes pharaonis* è uno dei 131 molluschi del Mar Rosso che fino a oggi ha colonizzato il Mar Mediterraneo, viceversa poche sono le specie mediterranee che si sono diffuse nel Mar Rosso; questi dati rispecchiano il

flusso della corrente marina che va da sud verso nord lungo il canale (Safriel et al., 1980). La colonizzazione di specie lessepsiane del Mar Mediterraneo più tropicali che atlantiche sta apportando cambiamenti profondi nelle caratteristiche delle comunità in esso presenti. L'aumento iniziale della biodiversità potrebbe in futuro mantenersi o diminuire portando nuovi equilibri e la supremazia di nuove specie a discapito di altre. Noi abbiamo usato analisi molecolari e morfometriche per uno studio filogeografico della specie.

L'interesse sull'area del Mar Mediterraneo era alto anche per la presenza di due forme (L-M), caratterizzate da un diverso aminoacido in posizione 30 nella COI del mtDNA, individuate nel 2007 dal mio gruppo di lavoro. Si è voluto effettuare un approfondimento di indagine aggiungendo ai dati genetici informazioni sulle possibili differenziazioni fenotipiche tramite la morfometria geometrica.

1.1 Obiettivo dello studio

Obiettivo di questo studio è contribuire a chiarire alcuni aspetti poco chiari della sistematica e della filogeografia del sistema *Brachidontes pharaonis-variabilis*. In particolare intenzione dello studio è, ricorrendo ad un approccio combinato di natura morfo-molecolare, il seguente:

- ☞ Indagare la struttura genetica del sistema *Brachidontes pharaonis-variabilis* testando l'ipotesi che al suo interno siano racchiuse più linee evolutive indipendenti
- ☞ Ricostruire le relazioni filogenetiche tra le linee riscontrate all'interno del gruppo ed individuarne il rango tassonomico
- ☞ Ricostruire la storia biogeografica che sta alla base della diversità attuale del gruppo
- ☞ Indagare la strutturazione del taxon nel Mar Mediterraneo e nel Mar Rosso, sia dal punto di vista genetico sia dal punto di vista morfometrico.

Per ottenere i nostri scopi si è adoperato un approccio combinato di tecniche di morfometria geometrica e molecolari, in modo da poter confrontare i risultati ottenuti indipendentemente a supporto della solidità dello studio.

1.2 Specie Criptiche

Le specie criptiche sono specie morfologicamente indistinguibili che rappresentano però delle linee evolutive indipendenti, basate su evidenze molecolari e filogeografiche (Bickford et al., 2006).

La speciazione non è sempre accompagnata da cambiamenti morfologici, il vero numero di specie biologiche è probabilmente più grande che l'attuale conteggio di specie nominali.

La più comune assunzione, vuole che la maggior parte delle specie criptiche sia dovuta a speciazione recente, che non ha ancora portato a modifiche nelle caratteristiche morfologiche o in altri caratteri visivamente diagnosticabili, per cui, in condizioni di simpatria esse risultano separate solo su base molecolare. Sebbene questo è vero per alcuni taxa, la visione che le specie criptiche sono recenti è cambiata, poiché studi ne dimostrano l'antica divergenza (es.: studi su anfibi (Lefebvre, T. et al., 2006), copepodi (Rocha-Olivares, A. et al., 2001)).

La maggior parte degli autori considerano le specie criptiche come sinonimi delle specie sorelle, ma altri specificano che quelle sorelle, in realtà, sono connotate da un più recente comune antenato ancestrale rispetto a quelle criptiche.

La distribuzione delle specie criptiche non è casuale nei gruppi tassonomici e nei biomi, esse sono più comuni in particolari habitat, latitudini o gruppi tassonomici. Ciò può essere sostanziale nella valutazione della biodiversità, della macroecologia, della biogeografia, delle gestioni della conservazione e delle teorie evolutive (Bickford et al., 2007). Attività tassonomiche più accentuate in particolari gruppi, appaiono influire sulla velocità alla quale specie criptiche vengono trovate. Sebbene 2/3 delle specie descritte risiede nei tropici pressappoco metà delle specie criptiche e sorelle studiate sono messe a fuoco in organismi temperati, questo solo perché la maggior parte degli studi condotti da biologi sono localizzati in zone dal clima temperato e non nei tropici. La scoperta di una simile tendenza nei tropici potrebbe rigonfiare le stime della diversità dei tropici e, così, rifletterebbe la vera diversità di vita della terra.

Le conchiglie di molluschi marini, i quali sono facilmente collezionati e manifestano un alto grado di plasticità, hanno a lungo attratto l'attenzione della tassonomia. L'investigazione molecolare di specie di molluschi ha la tendenza a invalidare le specie che sono state descritte con i soli caratteri morfologici che

potrebbero risultare ambigui. Una tra le più semplici spiegazioni è che molte specie criptiche sono “austere” morfologicamente, cioè mancano di caratteri che possono essere usati per distinguerle effettivamente in specie (Klautau et al., 1999; Shofield & Crum, 1972).

Per identificare specie biologiche è necessaria la tassonomia integrativa che esamina i cambiamenti in più che un carattere nell'organismo, e da la conferma da dati indipendenti (morfologici, molecolari, acustici, ecc.). Comunque, ci sono parecchie ragioni perché i cambiamenti morfologici da soli non possono essere usati come discriminanti di specie, infatti le specie criptiche sono differenziate da non visivi segnali (acustici, molecolari, chimici) e appaiono essere sotto selezione che promuove la stasi morfologica.

Estreme condizioni ambientali impongono una selezione stabilizzante sulla morfologia, riducendo o eliminando cambiamenti morfologici che possono accompagnare la speciazione, aumentando il numero di specie criptiche (es. tundra artica, parassiti di specifici ospiti, ambienti marini profondi ecc.).

In realtà non si sono ancora esplicitamente identificati i meccanismi che sono responsabili per la speciazione criptica, l'analisi di andamenti evolutivi nell'evoluzione di specie criptiche è un campo che è maturo per studi e potrebbe rivelare preventivamente incompresi caratteri che sono motore nella formazione delle specie criptiche.

L'importanza di registrare le specie criptiche sta nel riconoscere le specie invasive, pianificare la conservazione, controllare la prospettiva biologica e capire il trattamento di malattie (specie criptiche parassite). Per quanto riguarda l'introduzione di specie invasive criptiche è da notare l'importanza relativa al possibile declino, a seguito di questi eventi, delle popolazioni delle specie native negli habitat selvatici. Inoltre la scoperta di adattamento delle specie criptiche a particolari habitat potrebbe rivalutarne il valore di questi ultimi come siti per la conservazione di fondamentali endemismi e diversità biologiche ancora sconosciute.

Le specie criptiche esigono speciali considerazioni nel piano della conservazione perché la maggior parte dei complessi criptici è per il momento compresa in specie nominali già in pericolo di estinzione o minacciato; per cui le specie criptiche saranno ancor più in pericolo di estinzione dato che potranno, inoltre, richiedere differenti strategie di conservazione tra di loro e rispetto la specie nominale che le include.

Le tecniche molecolari hanno permesso una maggiore abilità agli scienziati per descrivere e definire la diversità biologica. (Sebbene loro non sono il totale rimedio per la delimitazione delle specie i dati molecolari sono importanti e sono utilizzati quando sono combinati con altri dati).

La frequenza con la quale le specie criptiche sono scoperte, grazie all'avvento di relativamente rapide e poco costose analisi di sequenziamento del DNA, hanno dato ai biologi un nuovo attrezzo per indagare e differenziare specie simili morfologicamente.

Le specie criptiche sono in genere largamente sottostimate come si vede da studi sulla bibliografia al riguardo (Penninger & Schwenk, 2007), in particolare sono state scoperte sinora più specie criptiche in mammiferi, anfibi e artropodi; mentre gli aracnidi e i bivalvi, in particolare nella loro classe dei molluschi, mostrano una deficienza di specie criptiche, ma ciò si verifica per la scarsa quantità di studi su di essi elaborata. Per questo motivo diviene interessante proprio lo studio della classe dei molluschi che, per la loro plasticità morfologica, hanno quelle caratteristiche di morfologia austera sopra citata; per cui è possibile che specie nominali, appartenenti a questa classe, abbiano la prerogativa di essere complessi specie criptiche.

Tra i vari lavori che si sono occupati di specie criptiche esempio al riguardo è un lavoro sul mollusco *Dendropoma petraeum* (Mollusca: Caenogastropoda) che vive proprio nelle acque del Mar Mediterraneo e che tramite studi molecolari è stato dimostrato suddividersi in quattro distinti gruppi filogenetici che differivano solo minimamente a livello morfologico, ciò supportato anche dalla distribuzione geografica, infatti una linea era presente nel mediterraneo sud-occidentale (Atlantico-Tunisia), una seconda linea si trovava nel Mar Tirreno, una terza linea si trovava tra il sud-est dell'Italia e Creta e un'ultima nelle coste Israeliane. La distribuzione allopatrica di questa specie criptica motiva la cladogenesi su basi vicarianti per il genere *Dendropoma* nel Mar mediterraneo (Calvo et al., 2008).

Per quanto riguarda il genere oggetto di studio del dottorato già in altri casi si è visto che il genere *Brachidontes* accoglie specie criptiche complex. Per esempio nel lavoro di Lee & O' Foighil (2005), il *Brachidontes exustus* presenta disgiunzioni genetiche latenti all'interno di una morfospécie, comprendendo 4 specie criptiche dovute a una lunga storia di cladogenesi regionale in distinte aree geografiche di dominanza ecologica presenti lungo la linea di costa nei due versanti (Golfo e Atlantico) della penisola della Florida.

Ancor più nello specifico studi precedenti sul *Brachidontes pharaonis-variabilis* (Sirna Terranova et al., 2007) hanno rilevato 3 cladi monofiletici collocati geograficamente nell'Oceano Pacifico, nell'Oceano Indiano, e nel Mar Rosso-Mar Mediterraneo. Sebbene i 3 cladi non hanno differenze morfologiche visibili potrebbero, grazie a studi molecolari, essere elevati al rango di specie. L'ipotesi considerata, attraverso questi primi studi, è che le tre linee del sistema *Brachidontes pharaonis-variabilis* possano avere avuto un antenato comune presumibilmente a distribuzione Indo-Pacifica e che a causa di eventi vicarianti collegati alla prima glaciazione pleistocenica e all'apertura del Mar Rosso, abbiano prodotto le tre linee (Sirna Terranova et al. 2007).

1.3 Biologia della Specie

Phylum: *Mollusca*

Classe : *Bivalvia*

Ordine: *Mytiloidea*

Famiglia: *Mytilidae*

Genere: *Brachidontes*

Il *Brachidontes pharaonis* (= *B. variabilis*) (Fig.1) è uno dei più comuni mitili indo-pacifici, comunemente reperibile nel Mar Rosso è stato avvistato per la prima volta nelle coste africane e nel Mar Mediterraneo orientale dopo l'apertura del canale di Suez. Questa sembra essere l'unica specie appartenente al genere *Brachidontes* presente nel bacino mediterraneo.

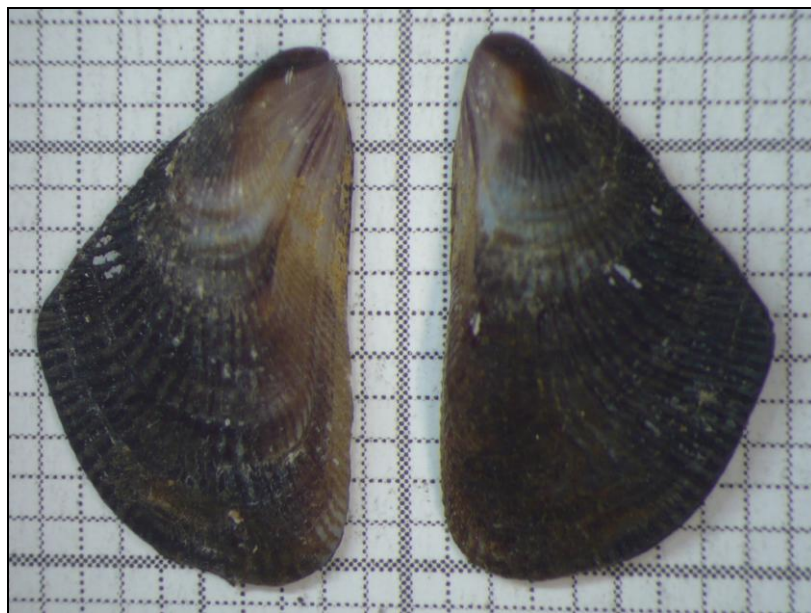


Fig.1 *Brachidontes pharaonis-variabilis*

Questo piccolo bivalve è distribuito prevalentemente nel medio-mesolitorale, è più raro nel sopra-mesolitorale e, qualche volta è abbastanza comune nell'infra-mesolitorale. E' meno frequente nella frangia infralitorale per l'abbondanza di altri organismi sessili (Safriel et al 1980) (per la terminologia di zonazione vedere Safriel e Lipkin, 1964.)

I bivalvi o Lamellibranchi sono organismi acquatici con corpo molle e testa indifferenziata (acefali), racchiusi in una conchiglia a 2 valve. Sulla conchiglia esterna è possibile individuare l'umbone, che è il vertice della stessa, delle strie concentriche, che segnalano l'accrescimento, e delle strie radiali. Dal lato interno la conchiglia è liscia ma è possibile individuare la linea Palleale o del Mantello, l'impronta dei muscoli adduttori, una o due per valva, il seno Palleale, il legamento e la cerniera. Questi bivalvi sono detti equivalvi, perché presentano due valve simmetriche. La conchiglia è costituita da carbonato di calcio e presenta una colorazione esterna che va dal nero al marrone e una colorazione interna madreperlacea. La valva ha la forma di un ovale allungato, lievemente squadrato e cuneiforme, con un bordo appiattito e ben arrotondato e l'altro appuntito e uncinato. Il mantello costituito da tre strati è una sottile massa di tessuto che include l'intera parte molle nella cavità palleale che è responsabile del legamento e di tutte le parti della conchiglia. Il corpo è ospitato nella cavità palleale ed è formato da 2 lobi simmetrici, un lobo per valva, saldati dorsalmente a formare la massa viscerale. Come organi si distinguono le branchie, il cuore, i centri nervosi, l'intestino, i muscoli adduttori, gli organi riproduttivi, i palpi labiali, il sifone inalante ed esalante, lo stomaco, il piede. Il piede, particolarmente modificato, detto pelecipode, è largo e a forma d'ascia ed è un organo muscolare mobile situato ventralmente alla massa viscerale e contiene la ghiandola bissogena da cui si produce il bisso. Quest'ultimo è un secreto cheratinico che solidifica a contatto con l'acqua formando un insieme di filamenti elastici e divergenti, che servono per l'ancoraggio al substrato. Le branchie hanno principalmente la funzione respiratoria, ma si occupano anche della filtrazione dell'acqua per la captazione e selezione dell'alimento, infatti, la superficie branchiale è molto superiore alla necessità respiratoria. La filtrazione dell'acqua avviene grazie alla corrente idrica generata dal movimento delle ciglia delle branchie e del mantello. L'ingresso dell'acqua avviene attraverso l'apertura delle valve, mentre l'espulsione avviene attraverso il sifone. L'alimentazione è prevalentemente costituita da particelle organiche in sospensione (batteri, uova, larve, alghe, residui animali e vegetali).

Il *B. pharaonis-variabilis* è una specie dioica che raggiunge la maturità sessuale dopo il primo anno di vita con una lunghezza della conchiglia di circa 7,5 mm. Ha una tendenza ad avere un numero maggiore di femmine (59% della popolazione). Nelle popolazioni di mangrovieti di Hong Kong (Cina) le gonadi maturano in primavera e i gameti vengono rilasciati in estate, possibilmente in due periodi di *spawning*, a giugno e a settembre; dopo le gonadi regrediscono (Morton, 1988). Si ha quindi fecondazione

esterna. Le larve, sono di tipo planctotrofico. I giovani nati crescono rapidamente per diventare, in termini di biomassa, la classe di età dominante ad un anno di età. Gli individui possono probabilmente vivere tra i 2 e i 3 anni. La conchiglia presenta una lunghezza massima di 35-40 mm. Questa specie non tollera un elevato idrodinamismo e un'eccessiva o nulla sedimentazione; si fissa con bisso a substrati duri, rocciosi o pietrosi e forma dei banchi molto compatti ed estesi (Safriel et al 1980).

Definita specie eurialina da Morton, dopo l'apertura del Canale di Suez, il *B. pharaonis-variabilis* si è spinto più a nord dell'imboccatura dello stesso, colonizzando in breve tempo le coste israeliane (Barash & Danin, 1973), della penisola del Sinai (Ghisotti, 1974, Barash & Danin, 1982), libanesi (Barash & Danin, 1982), giordane e siriane (Pallary 1938), turche (Tringali & Villa, 1990; Enzengros & Niederhofer, 1991; Engl, 1995; Micali & Palazzi, 1992) e Sicilia. In Sicilia il taxon è noto per le coste di Vendicari, Capo Passero, Noto Marina, Punta del Faro e Taormina, Golfo di Gela, Torre Normanna, Termini Imerese, Capo Gallo, Capo Zafferano e lo Stagnone di Marsala (Gianguzza et al., 1997). Ha anche colonizzato le coste tirreniche e ioniche della Calabria (Zanca 1976). Nella fig. 2 viene riportata la distribuzione geografica del *Brachidontes variabilis-pharaonis*, così come descritta da Barash & Danin (1986).



Fig. 2: Distribuzione geografica del *Brachidontes variabilis-pharaonis* (Barash & Danin, 1986).

Nel mediterraneo orientale il *B. pharaonis-variabilis* incontra un mitile intertidale, più piccolo nella dimensione del corpo, il *Mytilaster minimum* che è il suo equivalente ecologico mediterraneo e che forma banchi estesi, soprattutto in aree inquinate ed esposte

(Safriel e al 1980). Il *B. pharaonis* e il *Mytilaster minimum* si distribuiscono lungo la stessa fascia costiera, occupando gli stessi habitat intertidali, mescolandosi in pattern spaziali randomici, ma con una densità relativa differente che dipende dall'esposizione al moto ondoso: la specie colonizzatrice è più abbondante lungo le coste riparate, mentre quella indigena in quelle più battute dalle onde (Safriel 1988). In un recente studio è stato inoltre dimostrato che il gasteropode *Stramonita haemastoma*, usuale predatore del *M. minimum*, sembra preferire come preda il *B. pharaonis* là dove esso diventa abbondante (Rilov *et al.* 2002).

All'inizio della colonizzazione del Mar Mediterraneo orientale il *B. pharaonis-variabilis* non formava quasi mai veri e propri letti che invece comunemente forma nel Mar Rosso; tuttavia oggi riesce a raggiungere elevate densità in piattaforme rocciose nel bacino orientale così come lungo le coste siciliane (es. piattaforme rocciose di Torre Normanna) e banchi molto compatti in vasche (es. vasca fredda delle Saline di Marsala). La dinamica di popolazione del *B. pharaonis-variabilis* nel Mar Mediterraneo sembra caratterizzata da tre fasi: colonizzazione di un nuovo habitat raggiunto seguendo le correnti marine o per trasporto antropico durante la sua fase pelagica, esplosione numerica con la formazione di *mytilid beds* nei seguenti 3-5 anni, infine totale scomparsa da quel luogo nell'arco di pochi anni. Così per esempio non lo si trova più lungo le coste siciliane che per prime erano state da lui raggiunte. Questo comportamento sembra riflettere la strategia di diffusione tipica degli invasori lessepsiani, modello di dispersione "island-jumping" proposto da Chemello & Olivero (1995) per spiegare come questo piccolo bivalve si sposti nel bacino mediterraneo colonizzando coste sempre più distanti dal canale di Suez.

Sono stati suggeriti molti possibili veicoli di invasione tra i quali il trasporto nello strato di organismi aderenti alla parete immersa delle navi commerciali, il commercio dei prodotti di e per la maricoltura e le acque di zavorra (*ballast water*). Quest'ultima è attualmente una delle ipotesi maggiormente accreditate per spiegare spostamenti strettamente legati agli spostamenti commerciali. Le *ballast waters* sono acque di zavorra che in enormi quantità vengono prelevate in un porto e rilasciate in un altro, entro le quali sono state trovate larve viventi e capaci di sviluppo completo (Schormann *et al.*, 1990).

CAPITOLO 2

Materiali e Metodi

2.1 Campioni e Siti di Campionamento

Per questo studio sono stati inclusi 500 individui di *Brachidontes pharaonis-variabilis* per le indagini morfometriche e 272 individui per le indagini molecolari. Inoltre durante l'analisi del materiale ricevuto sono stati individuati e catalogati campioni appartenenti ad altri generi e specie, riconosciuti tramite caratteri morfologici e con l'aiuto di esperti malacologi.

Gli individui appartenenti ad altre specie del genere *Brachidontes* erano: 13 individui di *Brachidontes rostratus* [Kennett River Victoria, Australia (38°39'56" S- 143°51'53" E), Mallacoota Victoria, Australia (37°42'22" S- 149°45'55" E)], e 3 individui di *Brachidontes erosus* [Oceano Pacifico, Australia]; mentre i campioni di individui appartenenti a specie di altri generi erano: 11 individui di *Mytilaster minimum* [Mar Mediterraneo, Italia], 3 di *Mytilus galloprovincialis* [Mar Mediterraneo, Italia] e 10 di *Modiolus auriculatus* [Mar Rosso, Egitto].

Dei 500 individui di *Brachidontes pharaonis-variabilis* 415 erano stati campionati nel Mar Mediterraneo-Mar Rosso, 8 nell'Oceano Indiano e 77 nell'Oceano Pacifico (Fig. 3).

Degli individui appartenenti al Mar Mediterraneo-Mar Rosso: 248 provenivano dalla costa della Sicilia (Fig. 4), nell'Italia meridionale – ITA [86 di Torre Normanna (38°01'34" N - 13°35'45" E), 81 della salina Ettore di Marsala (37°48'08" N-12°25'45" E), 61 di Termini Imerese (37°58'14" N - 13°45'11" E), 16 di Capo d'Orlando (39°09'47" N - 14°44'46" E), 4 di Vendicari (36°48'10" N - 15°05'57" E)]; 12 dalla Turchia –TU [Marjin Bay (36°48'05" N - 34°45'36" E)], 130 dall'Israele (Fig. 5) –IS [11 di Achziv (33°02'47" N - 35°06'02" E), 30 di Ashkelon (31°40'37" N - 34°33'12" E), 17 Caesarea (32°31'08" N - 34°54'16" E), 24 Palmahim (31°56'11" N - 34°42'17" E), 15 Rosh Hanikra (33°05'37" N - 35°06'13" E), 33 Tel Aviv (32°04'17" N- 34°46'01" E)], e 25 dall'Egitto –EG [Dahab (28°30'36" N - 34°31'19" E)].

Gli 8 individui campionati nell'Oceano Indiano –OI provengono dal Madagascar [Isole Reunion Rocks (21°02'12" S-55°12'59" E)] e dal SudAfrica [KwaZulu-Natal, Pennington (29°05'48" S-31°40'50" E)] (Fig. 7), mentre i 77 individui dell'Oceano Pacifico –OP provengono dalla Cina [Hong Kong (22°13'04" N-114°10'05" E), Ting Kok (22°27'25" N-114°12'08" E) e Starfish bay (22°25'10" N-114°13'23" E)] (Fig. 8) (Tab.II).

Specie	Nazione	Sito	Coordinate
<i>Brachidontes pharaonis-variabilis</i>	Italia	Torre Normanna	38°01'34" N - 13°35'45" E
	Italia	Salina Ettore di Marsala	37°48'08" N - 12°25'45" E
	Italia	Termini Imerese	37°58'14" N - 13°45'11" E
	Italia	Capo d'Orlando	39°09'47" N - 14°44'46" E
	Italia	Vendicari	36°48'10" N - 15°05'57" E
	Turchia	Marjin Bay	36°48'05" N - 34°45'36" E
	Israele	Achziv	33°02'47" N - 35°06'02" E
	Israele	Ashkelon	31°40'37" N - 34°33'12" E
	Israele	Caesarea	32°31'08" N - 34°54'16" E
	Israele	Palmahim	31°56'11" N - 34°42'17" E
	Israele	Rosh Hanikra	33°05'37" N - 35°06'13" E
	Israele	Tel Aviv	32°04'17" N - 34°46'01" E
	Egitto	Dahab	28°30'36" N - 34°31'19" E
	Madagasr	Isole Reunion Rocks	21°02'12" S - 55°12'59" E
	SudAfrica	KwaZulu-Natal, Pennington	29°05'48" S - 31°40'50" E
	Cina	Hong Kong	22°13'04" N - 114°10'05" E
Cina	Ting Kok	22°27'25" N - 114°12'08" E	
Cina	Starfish bay	22°25'10" N - 114°13'23" E	
<i>Modiolus auriculatus</i>	Egitto	n.r.	n.r.
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Italia	n.r.	n.r.
<i>Mytilaster minimum</i>	Italia	n.r.	n.r.
<i>Brachidontes virgiliae</i>	Sud Africa	n.r.	n.r.
<i>Brachidontes erosus</i>	Australia	n.r.	n.r.
<i>Brachidontes rostratus</i>	Australia	Kennett River Victoria	38°39'56" S - 143°51'53" E
	Australia	Mallacoota Victoria	37°42'22" S - 149°45'55" E

Tab. II: Lista delle popolazioni esaminate nelle analisi

Per l'analisi genetica tramite il marcatore molecolare 16S-rDNA sono state integrate, alle sequenze ottenute dal lavoro di Sirna Terranova et al. (2007) nuove sequenze. Sono state esaminate un totale di 76 sequenze appartenenti alle 3 aree geografiche: 51 Mar Mediterraneo-Mar Rosso (MM+MR) [26 Italia, 16 Israele, 5 Turchia e 4 Egitto], 18 Oceano Indiano (OI) [12 Madagascar e 6 Sud Africa] e 7 Oceano Pacifico (OP) [7 Cina].

Anche per il marcatore molecolare COI alle sequenze ottenute da Sirna Terranova sono state aggiunte nuove sequenze, per un totale 186 individui, tra cui 154 individui del Mar Mediterraneo-Mar Rosso (MM+MR) [97 Italia, 37 Israele, 9 Turchia e 11 Egitto]; 27 del Oceano Indiano (OI) [17 Madagascar, 10 Sud Africa] e 5 del Oceano Pacifico (OP) [5 Cina].

Per il marcatore nucleare 28S sono state amplificate 3 sequenze per del Mar Mediterraneo-Mar Rosso (MM+MR) [1 Israele, 1 Italia e 1 Egitto] e 2 sequenze sia per l'Oceano Indiano [2 Sud Africa] che per l'Oceano Pacifico [2 Cina].

Due individui Australiani di *B. rostratus* sono stati usati come *outgroup* nelle analisi con questi marcatori. Sono state quindi anche in questo caso amplificate e sequenziale le sequenze parziali del 16S, della COI e del 28S.

L'analisi della porzione del ITS è stata condotta su 3 individui appartenenti al sistema *Brachidontes pharaonis-variabilis*, nel particolare appartenenti ognuno ad un'area geografica differente (Mediterranea-Indiana-Pacifica). Un individuo di *Mytilus galloprovincialis* è stato utilizzato come outgroup.

È possibile ritrovare una sintesi dei dati in **Tab.III**.

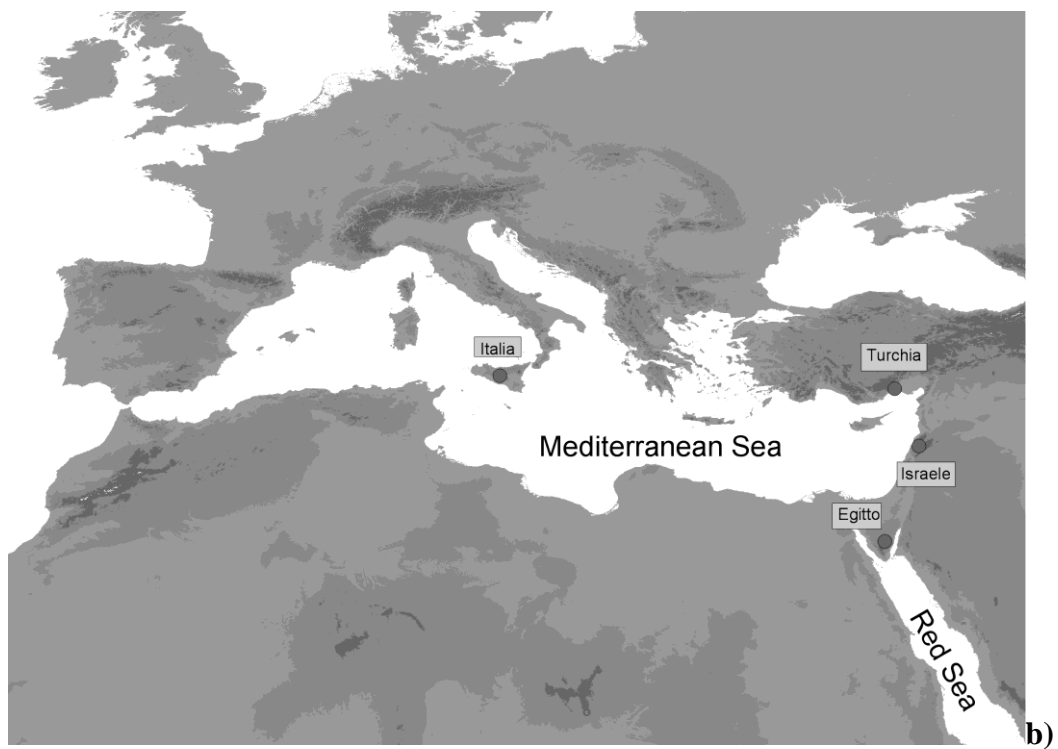
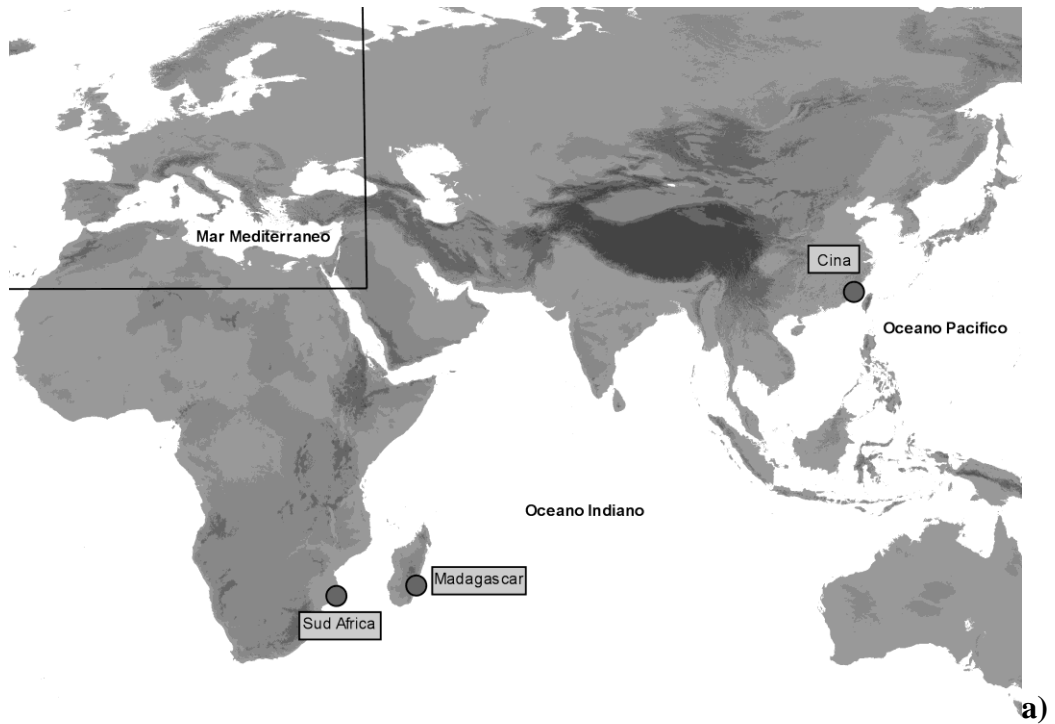


Fig. 3: a) Siti di campionamento: individui di *Brachidontes pharaonis-variabilis* nel Mar Mediterraneo e nel Mar Rosso, nell'Oceano Indiano e nell'Oceano Pacifico; b) Dettaglio dei siti di campionamento nel Mar Mediterraneo - Mar Rosso.

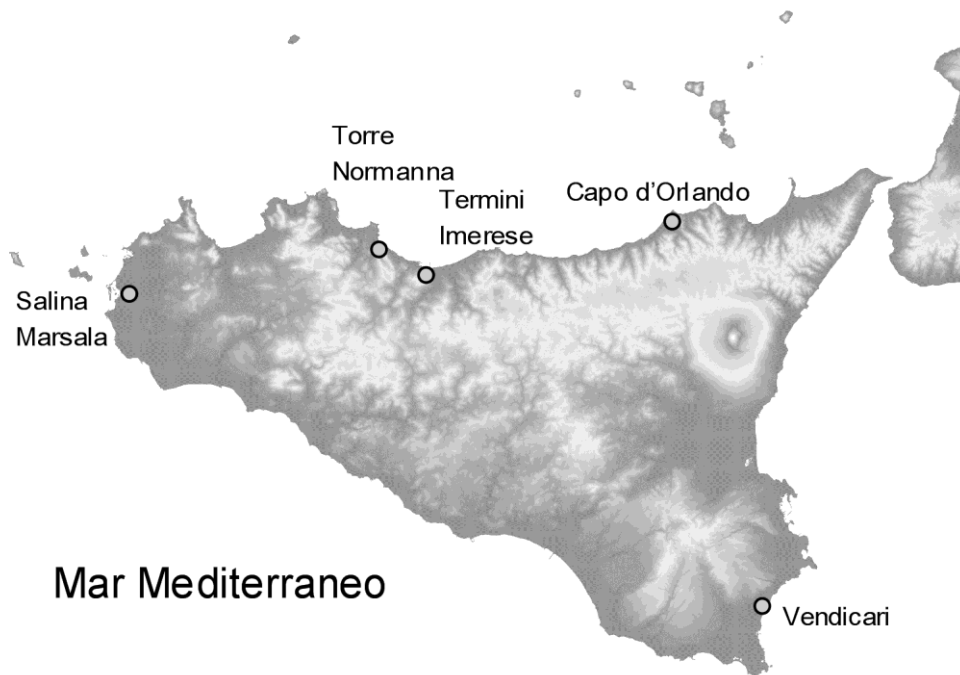


Fig. 4: Siti di campionamento di *Brachidontes pharaonis-variabilis* in Sicilia

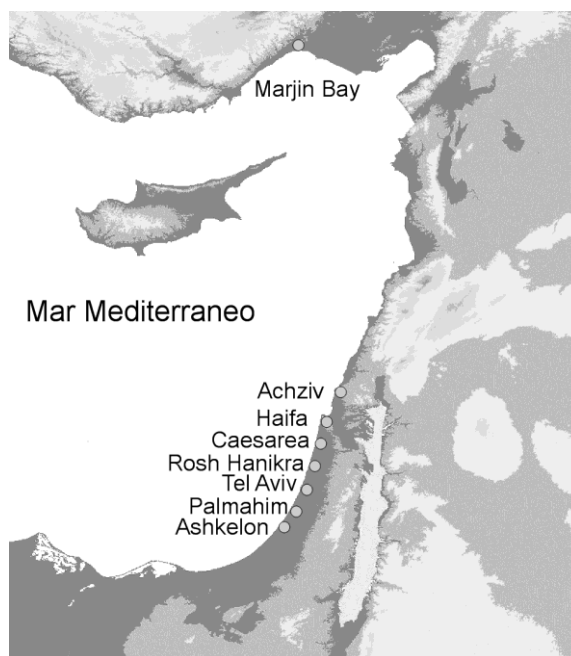


Fig. 5: Siti di campionamento di *Brachidontes pharaonis-variabilis* in Israele

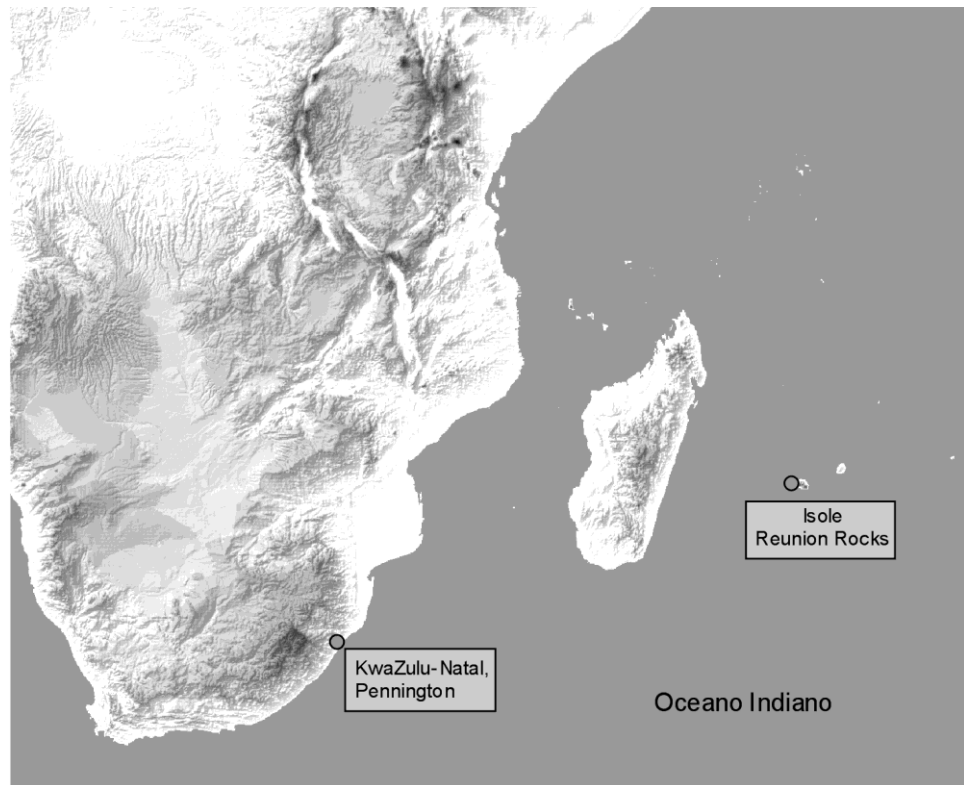


Fig. 6: Siti di campionamento di *Brachidontes pharaonis-variabilis* in Oceano Indiano

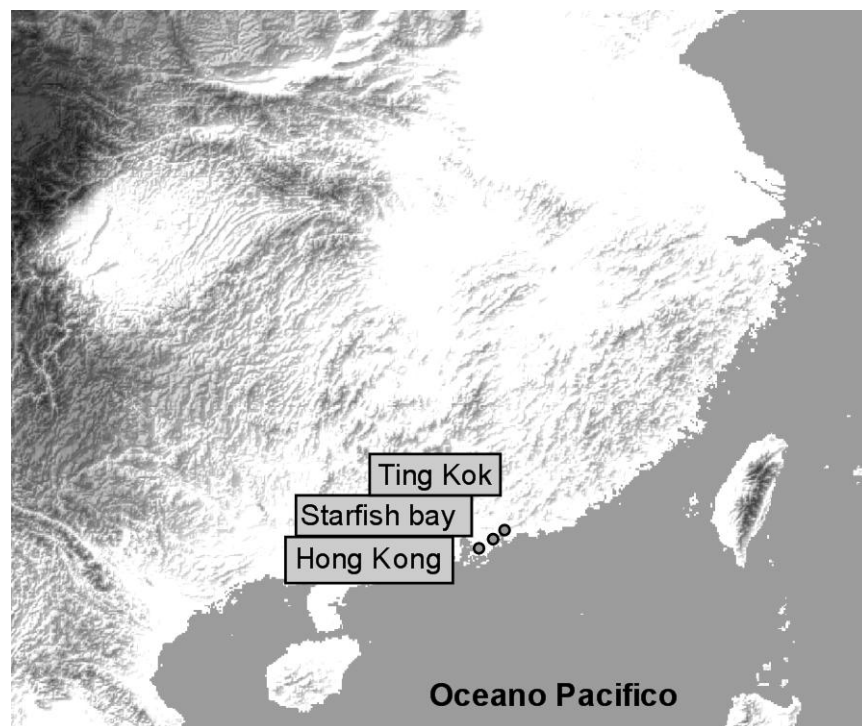


Fig. 7: Siti di campionamento di *Brachidontes pharaonis-variabilis* in Cina

<i>Sito di Provenienza</i>	<i>N° Sequenze di 16S-rDNA</i>	<i>N° Sequenze di COI-rDNA</i>	<i>N° Sequenze di 28S-nDNA</i>	<i>N° Sequenze di ITS-nDNA</i>	<i>N° Campioni Analizzati con la Morfometria</i>
Italia	26	97	1	-	248
Torre Normanna	7	25	-	-	86
Salina Marsala	9	27	1	-	81
Termini Imerese	6	28	-	-	61
Capo d'Orlando	-	9	-	-	16
Vendicari	4	8	-	-	4
Turchia	5	9	-	-	12
Marjin Bay	5	9	-	-	12
Israele	16	37	1	1	130
Achziv	-	1	-	-	11
Ashkelon	4	8	-	-	30
Caesarea	6	9	1	-	17
Palmahim	-	2	-	-	24
Rosh Hanikra	-	1	-	-	15
Tel Aviv	6	16	-	1	33
Egitto	4	11	1	-	25
Dahab	4	11	-	-	25
Madagascar	12	17	2	1	-
Isole Reunion Rocks	12	17	2	1	-
Sud Africa	6	10	-	-	8
KwaZulu-Natal, Pennington	6	10	-	-	8
Cina	7	5	2	1	77
Hong Kong	7	5	-	1	-
Tink Kok	-	-	2	-	38
Starfish Bay	-	-	-	-	39
<i>B. rostratus</i>	2	2	2	-	13
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	-	-	-	1	-

Tab. III: Campioni utilizzati per le differenti analisi

2.2 Tecniche Morfologiche e Morfometriche

2.2.1 Morfologia

La prima identificazione degli individui è stata fatta su base morfologica.

Le parti molli sono state dissezionate dalla conchiglia per essere usate per le analisi genetiche, e conservati in etanolo a -20°C. Dopo la dissezione le conchiglie sono state ben conservate, così che le loro proprietà morfologiche potevano essere accuratamente esaminate.

Per l'identificazione della specie *Brachidontes pharaonis-variabilis* sono stati utilizzati i caratteri morfologici che Fischer nel 1980 riportò per la descrizione del "*Mytilus pharaonis*" (poi *Brachidontes pharaonis*): "Conchiglia triangolare, allungata, sommità appuntita, poco gonfia, assai solida, colore olivastro, ornata di costole radiali, numerose, ravvicinate, divergenti, intervalli di striature trasversali e piccole; margine dorsale fortemente arcuato; il bordo della cerniera obliquo e rettilineo; l'interno delle valve violaceo; bordi finemente crenati; cerniera dentellata. Diametro antero-posteriore (lunghezza) circa 35 mm, larghezza circa 16 mm, spessore circa 13 mm".

Questa descrizione è stata utilizzata per distinguere, tra i nostri campioni, individui di differenti generi che condividono lo stesso habitat. Un esempio è la contemporanea presenza del *Mytilaster minimum* e del *Brachidontes pharaonis* in alcuni siti siciliani, quali Torre Normanna e Capo D'Orlando. L'elemento distintivo più chiaro, in questo caso, è dato dall'assenza nel *Mytilaster minimum* delle crenulazioni, presenti invece nel *Brachidontes pharaonis*, che erano sostituite da una superficie della conchiglia liscia e solcata solo da strie di accrescimento. Inoltre, mentre il *Brachidontes pharaonis* presenta un colore nero-marrone, la conchiglia del *Mytilaster minimum* era resa lucida dal periostraco nero e lucente. A confermare questa identificazione è stato analizzato, in alcuni individui, il gene mitocondriale 16S. Tramite il confronto del 16S ottenuto e la raccolta dati del GenBank, nel sito <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, si è data conferma dello stato degli individui identificati morfologicamente come *Mytilaster minimum*.

Nel Mar Mediterraneo si è riscontrata la presenza del *Mytilus galloprovincialis*, che presenta delle dimensioni dell'individuo adulto sicuramente maggiori, un colore del

periostraco nero-blu e l'assenza di crenulazioni. Mentre nel Mar Rosso si è poi riscontrata la presenza del *Modiolus auriculatus* che risulta distinguibile dal *Brachidontes* a causa del margine dorsale frastagliato, del periostraco di colore arancio-marrone e del guscio interno con sfumature di viola (Fig.8).

Successivamente si è proceduto all'analisi delle specie congeneriche: il *Brachidontes rostratus*, il *Brachidontes erosus*. Quest'ultimi campioni sono stati identificati da esperti malacologi (Fig. 9).



Fig. 8: Confronto tra le conchiglie dei campioni di generi differenti [a) *Mytilaster minimum*; b) *Modiolus auriculatus*; c) *Mytilus galloprovincialis*]



d)



e)



f)

Fig. 9: Confronto tra le conchiglie dei campioni di specie differenti [d) *Brachidontes erosus*; e) *Brachidontes rostratus*; f) *Brachidontes pharaonis-variabilis*]

All'interno del sistema *Brachidontes pharaonis-variabilis* in base alle caratteristiche generali della conchiglia non si evidenziano grosse differenze: il colore esterno della conchiglia varia da marrone scuro a olivastro, quello interno è violaceo (solo un po' più

scuro negli individui del Madagascar e della Cina); la forma della conchiglia presenta sottili differenze non valutabili ad occhi nudo; la cerniera appare simile ma il numero dei dentelli di essa è estremamente variabile anche all'interno di una stessa popolazione per cui non può essere utilizzato come carattere distintivo; una certa differenza si notava nelle scanalature esterne della conchiglia, molto meno pronunziate per esempio nelle conchiglie del Madagascar, e non tanto seghettate, interrotte, come appaiono nelle conchiglie del Mediterraneo. Ciò è dovuto all'alta plasticità che rende le caratteristiche morfometriche indistinguibili all'interno del sistema *B.pharaonis-variabilis*, in linea con quello che ci aspettavamo in presenza di un presunto complesso di specie criptiche.

2.2.2 Morfometria Geometrica

Date le caratteristiche della specie oggetto di studio e le problematiche di indagine si è pensato di esaminare la forma per cogliere meglio le variazioni.

I dati di morfometria tradizionale (lunghezza, larghezza e spessore), contengono relativamente poca informazione circa la forma, perché molte misure sono sovrapposte o corrono nella stessa direzione o sono radiate dallo stesso punto, per cui non sono indipendenti.

Lo schema di misure classiche può grandemente essere arricchito, senza alterare la sua struttura matematica di base, dalla travatura reticolare proposta da Bookstein e colleghi. Il set di queste misure va in più direzioni dell'organismo e misura più spazi. I punti di fine di tutte le misure sono dei loci biologici anatomicamente omologhi tra individui della stessa specie (*landmarks*). Queste sono le basi per gli studi di morfometria geometrica.

La morfometria geometrica cattura la geometria della struttura di interesse, e rende queste informazioni disponibili per essere utilizzate in un'analisi statistica multivariata, basata su coordinate cartesiane bi- o tri- dimensionali dette *landmarks*. I *landmarks* sono dei punti sulla forma dell'oggetto che hanno delle corrispondenze preservate in tutti gli individui delle popolazioni appartenenti a quel taxon. I *landmarks* possono essere definiti manualmente o automaticamente con dei programmi al computer. Ci sono tre tipi di *landmarks*: *landmarks* anatomici, *landmarks* matematici e *pseudo-*

landmarks. Un *landmark* anatomico è un punto biologicamente significativo in un organismo. Usualmente esperti definiscono i punti anatomici per assicurarsi la loro corrispondenza in alcune specie. I *landmarks* matematici sono punti su di un oggetto che sono localizzati in accordo con alcune proprietà matematiche e geometriche, per esempio, un punto di curvatura o un punto estremo può essere considerato tale. Nel lavoro sulla morfometria del *Brachidontes* di Aguirre et al. (2006), si nota che il *landmark* è il punto estremo del margine anteriore. I *pseudo-landmarks* sono punti costruiti, localizzati tra i *landmarks* anatomici e/o i *landmarks* matematici. I *pseudo-landmarks* sono usati durante l'adattamento alla forma dell'oggetto, quando questo processo richiede un largo numero di punti. I *pseudo-landmarks* possono essere considerati *semi-landmarks* quando sono visti come punti di scivolamento lungo una tangente adiacente alla linea di contorno curva. Questa mobilità dei punti *semi-landmarks* permette di definire la curva in maniera il più simile possibile nei vari individui, così da ridurre errori dovuti alla forzata rigidità di punti non perfettamente definiti. La diretta analisi delle coordinate di *landmarks* e *semi-landmarks* potrebbe essere inappropriata per studiare le differenze di forma tra individui. Il metodo di "*procrustes superimposition analysis*" elimina le variazioni non dovute alla forma nella configurazione dei *landmarks* e dei *semi-landmarks* con la sovrapposizione secondo alcuni criteri di ottimizzazione (GPA). Dopo la GPA le differenze di forma sono descritte con reali differenti coordinate di corrispondenza di *landmarks* nei differenti individui. Queste differenze sono usate come dati nella comparazione multivariata di variazioni di forma (Bookstein,1996). In alternativa, il *Thin-Plate Spline* può essere usato per capire la deformazione di forma da un oggetto all'altro (Bookstein,1991). Le differenze in forma rappresentate in questa maniera sono realizzazioni matematiche di D'Arcy Thompson (1917) che presentano l'idea delle griglie di deformazione, dove è visibile la deformazione di un oggetto in un altro. Le differenze in forma fra oggetti possono così essere descritte come differenze nelle griglie di deformazione. I parametri che descrivono queste deformazioni possono essere usati come variabili di forma per paragoni statistici di variazione di forma tra popolazioni.

Fondamentale nella programmazione di un lavoro di morfometria geometrica è mettere in chiaro le problematiche da chiarire.

Nel nostro caso verranno affrontate:

- la discriminazione nella forma della conchiglia tra possibili entità distinte a livello di specie oggi incluse all'interno del complesso di specie criptiche *Brachidontes pharaonis-variabilis*, per cercare una corrispondenza morfometrica ai dati genetici;
- la discriminazione intra-clade all'interno del gruppo proprio dell'area geografica Mar Mediterraneo-Mar Rosso, per capire se sono presenti degli eventuali sottogruppi morfometrici corrispondenti alle forme –M ed –L.

L'analisi morfometrica integrerà l'analisi molecolare, per confermare l'affidabilità della discriminazione di specie o di forme con l'utilizzo di più metodi. Le analisi sono, quindi, state impostate usando il metodo per la comparazione della forma geometrica degli organismi (Rohlf & Marcus, 1993; Adams et al., 2004; Zelditch et al., 2004). Le valve sono state fotografate con una macchina fotografica Leica D-Lux 3 << LMS >> attraverso il stereoscopio ottico Wild M3. Per ogni individuo sono state fatte quattro foto ritraenti rispettivamente la parte esterna ed interna di ogni valva.

Anche la collocazione dei punti *landmarks* e *semilandmarks* dipende dalle problematiche da esaminare. Inizialmente si è esaminata la valva sia in visione ventrale che dorsale. Basandoci sul lavoro di Sousa et al. (2007), si è tentato di posizionare i punti di indagine nella parte ventrale della singola valva nella quale era possibile prendere in esame la cerniera, la conformazione dell'umbone, il seno palleale e l'impronta del muscolo del *Brachidontes pharaonis-variabilis*. Si è visto, però, che questi parametri danno informazioni ecologiche sulla specie in esame. L'interesse nel definire le differenze tra esemplari di specie diverse o forme diverse ci ha fatto propendere per l'utilizzo della linea di contorno della valva in visione dorsale, efficace

nello stabilire rapporti filogenetici (e.g.: Baylac et al., 2003; Catalano et al., 2010; Dvorak et al., 2006).

Per questi motivi sono state usate solo le foto delle valve in visione dorsale posizionate su un piano orizzontale. In particolare, per ogni individuo, è stata studiata la linea di contorno della valva sinistra per dare uniformità all'analisi. Le immagini sono state processate separate con il software MakeFan 6 (Sheets, 2003).

Il software MakeFan6 è un attrezzo che permette di sovrapporre all'immagine del campione fasci allineati con uguale angolazione. Il punto di incontro tra ogni retta e la linea di contorno della valva dà il posizionamento, più oggettivo possibile, del *landmark* e dei *semi-landmarks* (Fig.: 10).

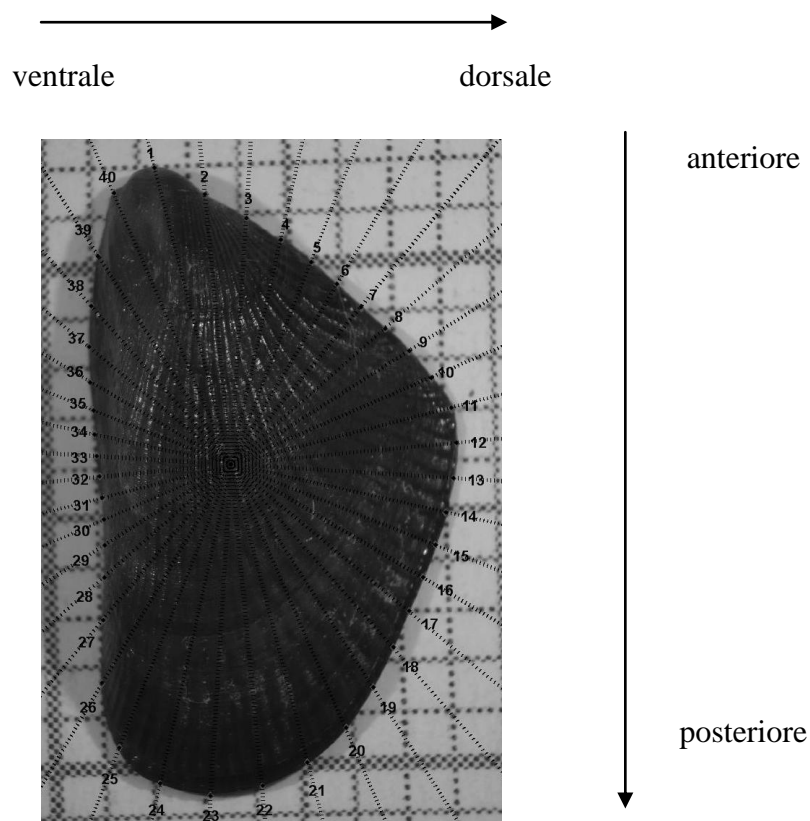


Fig. 10: Landmarks ($N = 1$) e semi-landmarks ($N = 2-40$) sulla conchiglia

Un *landmark* e 39 *semi-landmarks* sono stati posizionati come in figura 10, in accordo con quanto descritto da Aguirre et al. (2006). Le coordinate bidimensionali di

landmarks e di *semi-landmarks* sulla linea di contorno in visione dorsale della conchiglia era registrata e digitalizzata con il tpsDIG 2 software (Rohlf, 2004) (Fig.11). Inoltre per preformare le analisi statistiche *landmark* e *semi-landmarks* sono stati successivamente riconosciuti con il software tpsUtil 1.45 (Rohlf, 2008).



Fig.11: 1 *landmark* e 39 *semi-landmarks*, digitalizzati attraverso il software tpsDig 2 e riconosciuti con il software tpsUtil 1.45

Una possibile sorgente di errore era valutata come errore di digitalizzazione. Per questo presupposto, un subset di 5 individui è stato registrato e digitalizzato in 3 tempi. Il subset era scelto tra individui della stessa popolazione, presi a caso. Nondimeno, dopo il risultato delle tre analisi, l'errore di digitalizzazione non era tale da perturbare l'assegnazione di differenti forme a differenti individui. Questo ci ha fatto procedere senza dubbi con l'analisi dei dati raccolti.

Le coordinate risultanti erano soggette alla *Generalized Procrustes Analysis* (GPA) (Fig. 12), la quale rimuove tutte le informazioni non dovute alla forma (Rohlf & Slice, 1990).

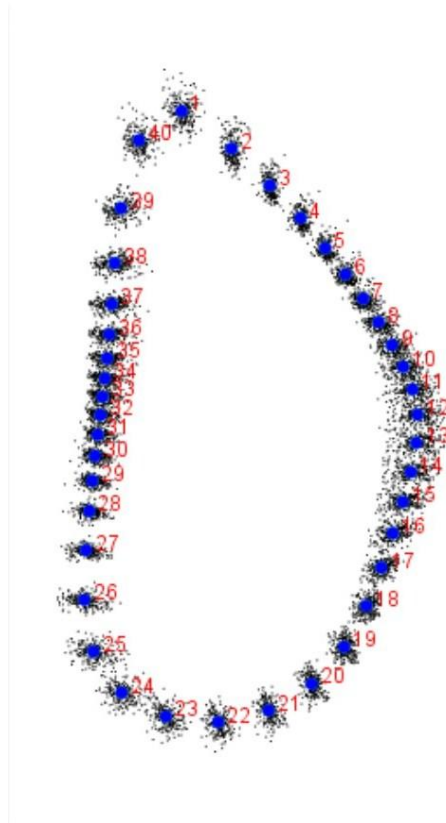


Fig.12: *Generalized Procrustes Analysis* (GPA), coordinate reali del *landmark* (N° 1) e dei *semi-landmarks* (N° 2-40) dopo la rimozione di parametri non dovuti alla forma

Per la comparazione della configurazione di *landmark* e *semi-landmarks* è stato usato il metodo delle Relative Warps (Bookstein, 1991; Rohlf, 1993). Le Relative Warps sono vettori delle componenti principali delle *partial warps*, variabili generate per la trasformazione del *thin-plane spine* (Bookstein, 1989), ed erano usate per descrivere il maggior trend nella variazione tra individui nel campione (Rohlf, 1993, 1996). Le griglie di deformazione del *thin-pate spline* sono state generate per facilitare la descrizione della variazione di forma. Le analisi sono state prodotte per mezzo del software tpsRelw 1.39 (Rohlf, 2004). L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) e l'analisi Canonica Variata (CVA) dei dati morfometrici è stata effettuata con il software MorphoJ 1.01 (Klingenberg, 2008). Il risultato statistico della PCA potrebbe essere espresso come una deformazione

della forma reale di ogni individuo dalla "forma consensus" (Bookstein, 1989, 1991; Rohlf, 1993, 1996). La differenza di forma tra gruppi è stata valutata usando l'Analisi Discriminante o Analisi Canonica Variata (CVA). La CVA è stata utilizzata per semplificare la descrizione di differenze tra la media dei gruppi imposti (Zelditch et al., 2004). Nell'esame CVA sul *Brachidontes pharaonis-variabilis* i raggruppamenti sono stati imposti sulla sola base della distribuzione geografica degli individui. Successivamente, è stato realizzato con Mega versione 4.0 (Tamura et al. 2008) un dendrogramma secondo il modello matematico UPGMA in funzione della matrice delle distanze *Procrustes* (Bookstein, 1996) che è stato graficamente espresso con il software FigTree 1.3.1 (Rambaut 2009). Le distanze di Procrustes sono espressione metrica della distanza reale tra la forma media dei raggruppamenti imposti e la forma consensus.

2.3 Tecniche molecolari

Lo studio della variazione genetica nel corso dei decenni è stato condotto con metodologie diverse; in linea generale si può dire che dagli anni '80 in poi i principali marcatori molecolari utilizzati si trovano a livello delle proteine (isoenzimi) e a livello del DNA. I *markers* genetici esaminano le variazioni genetiche all'interno e tra le popolazioni di una o più specie e forniscono informazioni a diversi livelli: struttura di popolazione, valori di flusso genico, relazioni filogenetiche, filogeografici. Le tecniche molecolari prendono in considerazione solo una piccola porzione del patrimonio genetico, infatti con questo mezzo non si intende esaminare l'intero patrimonio genetico della popolazione ma solo quei *marker* molecolari che meglio rispondono ai quesiti iniziali. Ovviamente più sono i *marker* molecolari utilizzati più è possibile avere un quadro della diversità genetica di una specie. Lo schema di Feral (2002) (Tab. IV), è una buona sintesi della quantità e qualità di informazioni genetiche che diverse tecniche molecolari, applicate a diversi *marker* genetici, riescono a fornire in relazione al livello di divergenza evolutiva tra i taxa sottoposti ad esame.

	Crescente tasso di mutazione del target molecolare ----->					
Target molecolare	Alloenzimi	DNA / RNA	mtDNA / scnDNA / introni		DNA fingerprinting	Crescente livello di divergenza tra i taxa -----↓
Tecniche di analisi	Elettroforesi	Sequenziamento	RFLP	Sequenziamento	VNTR-RAPD-AFLP	
Identità / Non identità genetica	◇	◇	◇	◇	×	
Grado di parentela	◇	◇	◇	×	×	
Popolazioni cospecifiche	×	◇	×	×	◇	
Specie strettamente correlate	×	◇	◇	◇	—	
Livelli tassonomici intermedi	◇	×	—	—	—	
Profonde Separazioni (>50 Myrs)	—	×	—	—	—	
	×	◇	—			
	Adeguatezza altamente informativa	Marginalmente informativo	Inadeguato			

Tab. IV: Schema di Feral

Questi studi hanno trovato applicazioni diverse a seconda delle specie oggetto di studio.

L'elettroforesi delle proteine è stata fino agli anni '80 la tecnica più diffusa per lo studio della variazione genetica nelle popolazioni naturali e consiste nell'analisi degli isoenzimi, cioè varianti proteiche dello stesso enzima, diverse ovvero polimorfiche, tra gli individui di una stessa popolazione. Gli isoenzimi, cioè prodotti di alleli diversi dello stesso *locus*, sono detti alloenzimi. Quest'ultimi presentano delle differenze amminoacidiche che portano a una struttura e a una conformazione diversa che si può notare attraverso una migrazione elettroforetica con una data colorazione che individua la posizione dell'enzima sul gel. Questa tecnica fornisce dati su alleli normalmente codominanti di loci autosomici e quindi analizza solo una piccola parte dell'effettiva variabilità genetica di una popolazione (Arculeo et al., 1997): a causa della ridondanza del codice genetico i cambiamenti a livello del gene possono non cambiare la conformazione della proteina. L'uso degli alloenzimi come *marker* molecolari dipende dal loro grado di neutralità: talora alcuni loci potrebbero essere neutri mentre altri potrebbero fornire la base su cui agisce la selezione naturale. In genere l'eterozigosità multilocus per gli alloenzimi aumenta la fitness negli individui.

L'eterogeneità degli acidi nucleici, invece, è messa in evidenza con metodi che analizzano il DNA mitocondriale o quello genomico. IL DNA genomico spesso è utilizzato per la presenza di regioni non codificate, caratterizzate da piccole sequenze ripetute in tandem, chiamate VNTR (Variable Number Tandem Repeated).

Esse possono essere distinte fondamentalmente in due categorie: i minisatelliti, contenenti unità ripetute lunghe da parecchie decine a poche centinaia, molto polimorfiche (Jeffreys et al., 1985; Nakamura et al., 1987), e i microsatelliti, unità ripetute più piccole, lunghe di solito da uno a quattro nucleoidi, anch'esse variabili (Litt & Luty, 1989).

Per quanto riguarda il DNA mitocondriale, esso oggi è ampiamente utilizzato come strumento per studiare la struttura e l'evoluzione delle popolazioni di parecchi animali. Si tratta di una doppia elica di DNA circolare di circa 16 kilobasi (kb), contenuta in molteplici copie all'interno dei mitocondri. Ogni individuo ne contiene un solo tipo. I mitocondri sono ereditati citoplasmaticamente e poiché il citoplasma dello zigote deriva dall'uovo, il mtDNA è principalmente ereditato dalla madre, per questo motivo è un buon *marker* filogenetico della microevoluzione che presenta una rapida evoluzione a livello di sequenze nucleotidiche e numerosi polimorfismi intraspecifici tra individui.

Dato che non ci sono fenomeni di ricombinazione tra genomi mitocondriali, il mtDNA all'interno di uno stesso individuo rappresenta un clone.

Tuttavia ci possono essere dei casi di eteroplasmia, in altre parole la presenza di più di un tipo di mtDNA in un individuo, trovati occasionalmente in un gruppo abbastanza ampio di organismi. Il diffuso livello di polimorfismo presente è da attribuire a un elevato tasso di mutazione; i geni contenuti in esso evolvono più velocemente (5-10 volte maggiore) di quelli contenuti nel DNA nucleare. Proprio per l'ereditarietà uniparentale del mtDNA il tempo di divergenza dal comune antenore è $\frac{1}{4}$ di quello atteso per i geni nucleari, quindi il mtDNA rivelerà più repentinamente la struttura di una popolazione (Avisé, 1994).

Per l'alta frequenza di mutazione e per le ridotte dimensioni è più sensibile del DNA nucleare e degli alloenzimi.

Un'altra tecnica molecolare, che ha trovato applicazioni in diversi studi, consiste nell'analisi di polimorfismi nella sequenza di DNA a livello di siti di restrizione (RFLP). Questa utilizza particolari enzimi, come le endonucleasi di restrizione, in grado di tagliare le eliche di DNA in precisi punti. Altamente specifici, quindi, questi tagliano il DNA dovunque sia presente una particolare sequenza nucleotidica di circa 4-8 nucleotidi (Avisé, 1994). Quando il DNA è digerito con tal enzima, esso viene tagliato in frammenti. Il pattern di frammenti di più individui è chiamato restriction fragment length polymorphisms (RFLP). Un pattern di polimorfismo RFLP può essere il risultato della sostituzione di una base o di una mutazione per inserzione/delezione che causa l'aggiunta o la perdita di un sito di restrizione.

2.3.1 Marcatori molecolari

Nel nostro studio è stata scelta la tecnica di indagine tramite sequenziamento di marcatori molecolari. Il processo di scelta di una regione che sia probabilmente appropriata per una particolare questione sistematica è forse il punto più critico nell'analisi filogenetica. L'inappropriata applicazione di marcatori molecolari può essere causata da una cattiva comprensione delle proprietà del marcatore. Per selezionare il più appropriato marcatore molecolare sono necessarie una serie di considerazioni a riguardo. Intanto per studi su relazioni relative a specie strettamente imparentate l'uso di regioni nucleari può essere problematico. In altro modo per profondi livelli di divergenza le regioni altamente conservate del rDNA ritornano utili.

Nella tabella V vengono sintetizzati gli appropriati livelli di categoria che vengono indagati con i marcatori molecolari rDNA e mtDNA (Hwang & Kim, 1999).

	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Population
Nuclear rDNA								
SSU (16-18S)	—————				-----			
LSU (23-28S)			—————	-----				
5.8S	—————			-----				
IGS							—————	—————
ITS						—————	—————	—————
MtDNA								
rDNA								
12S		—————	-----					
16S					—————	-----		
Protein								
Coding genes								
ND1				-----	—————	—————	—————	-----
ND2				-----	—————	—————	—————	-----
COI				-----	—————	—————	—————	-----
COII				-----	—————	—————	—————	-----
Cytb				-----	—————	—————	—————	-----
Control region							—————	—————
Gene arrangement	-----	—————	-----					

The bold lines indicate mainly applicable categorical levels of each molecular marker or gene region while the dot lines indicate less frequently applicable categorical levels.

Tab. V: Possibili applicazioni di ogni marcatore molecolare o di regione genetica in base ai livelli di categoria

Le caratteristiche ideali di un marcatore genetico sono:

- l'essere polimorfico
- l'aver un'espressione stabile
- l'essere disperso nel genoma
- l'essere di facile determinazione o facile osservazione
- l'essere ereditabile in modo semplice (mendeliano o uniparentale)
- l'essere codominante o dominante
- l'essere riproducibile entro e fra diversi laboratori
- l'essere determinabile con metodologia applicabile a molte specie diverse

La maggior parte dei marcatori utilizzati in filogenesi molecolare per lo studio di taxa separatisi in tempi relativamente recenti o per studi della variabilità intraspecifica sono di origine mitocondriale. Al fine di ottenere informazioni per le finalità che ci si è posti, si è tentata l'amplificazione di alcuni geni mitocondriali dalle diverse velocità evolutive: la citocromo ossidasi I (COI) e il gene 16 S della subunità ribosomale piccola. La variazione della subunità I della citocromo ossidasi del mtDNA (mtCOI), è

stata utilizzata in maniera proficua sia per studi filogenetici che per quelli filogeografici, risolvendo rapporti evolutivi tra specie strettamente correlate per un largo numero di taxa, inoltre è stata utilizzata anche per studi di genetica di popolazione in tanti organismi marini (Avise, 1994). Questo gene può essere messo in correlazione con la variazione ambientale e con variazioni della fitness degli individui; infatti la citocromo ossidasi c, codificata da due geni mitocondriali COI e COII, ha un ruolo centrale nella produzione di energia cellulare; una riduzione della sua attività si riflette in una riduzione della fitness in molti meccanismi fisiologici dell'individuo. In particolare, la funzione di questo enzima è quella di catalizzare lo *step* finale nel sistema di trasporto di elettroni a livello mitocondriale, in maniera che gli elettroni vengano trasferiti dal ridotto citocromo c (codificato da un gene nucleare) alle molecole d'ossigeno.

Un altro gene mitocondriale di frequente usato come *marker* genetico negli studi di genetica di popolazione è il 16S rDNA. Il gene 16S è uno dei geni più comuni nell'uso delle ricostruzioni filogenetiche sia nei vertebrati che degli invertebrati poiché presenta un basso tasso di mutazione e regioni conservate con regioni variabili intersperse. Le sostituzioni nucleotidiche vi si accumulano ad un tasso analogo a quello medio dell'intero DNA mitocondriale (Simon et al., 1994) e, di conseguenza, gli alberi filogenetici che se ne ricavano rispecchiano fedelmente quelli che si otterrebbero basandosi sull'intero mtDNA.

Shearer et al. (2002) hanno calcolato, per i bivalvi, il *range* di variazione dei due geni mitocondriali sopra citati a livello intraspecifico e interspecifico, tenendo presente i risultati di diversi lavori fatti su questo taxa: la COI presenta una diversità genetica intraspecifica fino al 5 % e interspecifica fino al 24 %; mentre il 16S rDNA presenta una diversità genetica intraspecifica fino al 21 % e interspecifica che varia dal 1 al 21 %.

Per comprendere meglio la suddivisione del sistema *Brachidontes pharaonis-variabilis*, specie complex, in tre linee appartenenti a tre aree geografiche differenti (Oceano Pacifico, Oceano Indiano e Mar Mediterraneo-Mar Rosso) si è estesa l'analisi al livello dei geni nucleari, caratterizzati da un minore tasso evolutivo, per verificare lo status di specie delle tre linee individuate.

Uno dei geni presi in esame per questo scopo è il 28S. Il gene 28S fa parte della large subunit (LSU) del DNA ribosomale nucleare è solitamente usato per studiare le relazioni filogenetiche tra taxa di rango sopraspecifico (Friedrich and Tautz, 1997; Hwang et al. , 1998; Whiting, 1998). Il gene 28S è stato sequenziato per intero in *Mus musculus* dove si è appurata una lunghezza totale del gene di 4712 bp. Esso si è dimostrato altamente conservativo se analizzato in maniera parziale, per cui si è tentato

di sequenziare un frammento genico più lungo possibile che potesse contenere una maggiore informazione.

In supporto alle analisi tramite il 28S, per capire la natura di *species-complex* del sistema *B. pharaonis-variabilis*, si è utilizzata la porzione ITS. A causa dell'alta variabilità, come già detto, le regioni spaziali del rDNA IGS e ITS sono state comunemente impiegate per risolvere i problemi filogenetici in più bassi livelli di categoria circa i generi, le specie, o le popolazioni. Le regioni ITS, però, sono preferite agli IGS nell'approccio filogenetico poiché hanno una lunghezza inferiore.

2.3.2 PCR

Di fondamentale importanza per lo sviluppo dell'analisi di marcatori molecolari a livello del DNA è la PCR, reazione a catena della polimerasi.

Verso la metà degli anni '80 fu messa appunto la tecnica di reazione a catena della polimerasi (PCR) che ha rivoluzionato l'analisi dei geni. La PCR è un metodo per produrre un numero estremamente grande di copie di una specifica sequenza da una miscela di DNA. Questo avviene mediante un processo chiamato amplificazione. La PCR (Polymerase Chain Reaction) è la tecnica d'amplificazione che usa specifici oligonucleotidi per amplificare molte migliaia di volte uno specifico segmento di DNA con una procedura automatizzata. Non è necessario che la sequenza da sintetizzare sia presente in forma pura; essa può anche essere una frazione minoritaria di una miscela complessa, come un segmento di un gene. Tali oligonucleotidi, detti primers, vengono fatti sinteticamente, perciò è necessario avere alcuni dati relativi alla sequenza target, per poterla amplificare; essi fiancheggiano il segmento di DNA e permettono l'aggancio di una speciale DNA polimerasi, che non fa altro che copiare ripetutamente il segmento. Ogni copia fatta servirà nuovamente da stampo ("*template*") per la duplicazione successiva, in questo modo il numero di copie della sequenza target crescerà esponenzialmente. La reazione prevede essenzialmente tre passaggi: denaturazione del DNA, associazione dei primers ed estensione dei primers per opera della taq polimerasi (o polimerasi termostabile). La denaturazione del DNA in singole eliche viene effettuata incubando a temperature di circa 94°C; a essa segue un certo raffreddamento, in maniera graduale dalla temperatura di *annealing* alla temperatura di estensione, che permette l'associazione alla specifica coppia di inneschi che fiancheggiano la sequenza di DNA in questione e l'allungamento dagli inneschi che usano una speciale DNA

polimerasi resistente al calore chiamata Taq polimerasi, ottenuta da un batterio termoresistente. A ciò segue una ripetizione del ciclo di denaturazione del DNA, associazione con gli inneschi e ripetizione dell'allungamento degli inneschi con la Taq polimerasi, che ci fa ottenere due molecole a doppia elica formate ognuna da un'elica di lunghezza unitaria o bersaglio e da un'elica più lunga della lunghezza unitaria. In seguito sarà necessario un altro ciclo di denaturazione, associazione di inneschi e allungamento per produrre del DNA a doppia elica di lunghezza bersaglio. Quindi sono necessari tre cicli per ottenere un DNA di due molecole a lunghezza unitaria (Fig.13).

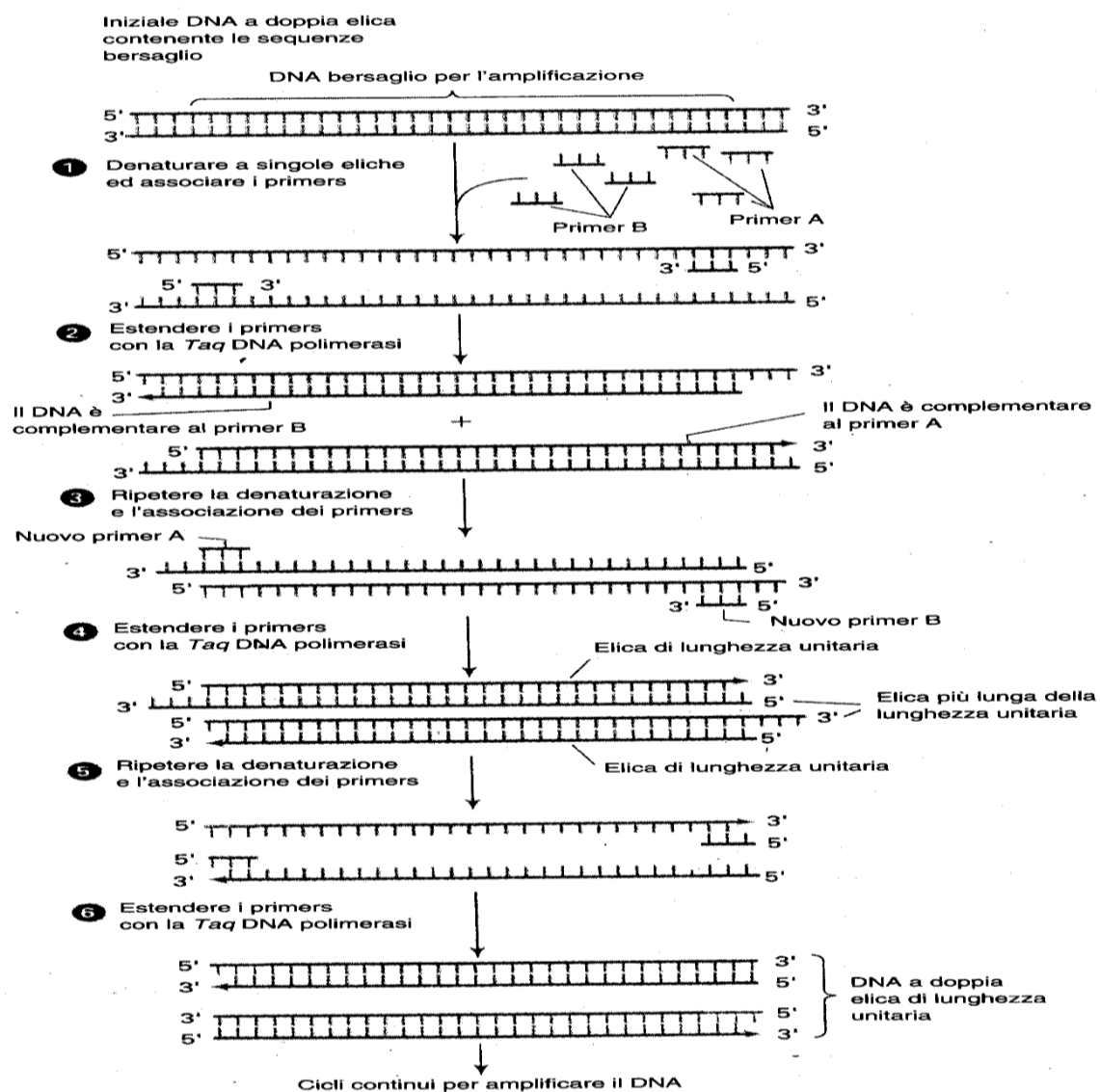


Fig. 13: La relazione a catena della polimerasi (PCR) usata per l'amplificazione selettiva

Usando la PCR la quantità di DNA neosintetizzata aumenta in modo geometrico, cioè 2 elevato (n-2), dove n è il numero dei cicli e -2 sta a indicare che i primi due cicli sono nulli. Il numero dei cicli comunque non deve mai superare la cinquantina, perché dopo un certo numero di cicli l'amplificazione non è più esponenziale ma raggiunge un plateau dovuto a carenza di *primers*, a carenza di dNTP, a aumento dell'anione pirofosfato ($P_2O_7^{4-}$, detto PPI) e comparsa di DNA parassita amplificato. Il procedimento di amplificazione è rapido, in quanto ogni ciclo dura pochi minuti, usando un programmatore ciclico termico, una macchina che automaticamente esegue in modo ciclico i cambiamenti di temperatura programmati.



Fig. 14: “Mini-Protean II electrophoresis Cell” e “Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems”

La quantità di DNA amplificata può essere poi visualizzata direttamente sul gel. Il materiale utilizzato può essere l'agarosio o la poliacrilammide secondo le dimensioni del frammento. Il gel d'agarosio è quello maggiormente utilizzato visto che la sua realizzazione e successiva migrazione dei campioni mediante elettroforesi (Fig. 14) impiega meno tempo rispetto a quello che si verifica col gel di poliacrilammide. L'agarosio è un polisaccaride lineare neutro purificato dall'agar-agar delle alghe rosse. Esso, a contatto con un tampone di scorrimento, TBE, contenente tris glicina, acido borico, EDTA e acqua, si scioglie perché viene fatto riscaldare. Prima che la soluzione si raffreddi e si gelifichi, si aggiunge un colorante, l'etidio bromuro. Si forma, dunque

un gel a causa della formazione di legami idrogeno crociati tra le catene polimeriche dell'agarosio. A questo punto sul gel, in particolari pozzetti, vengono caricati i campioni di PCR e fatti migrare mediante elettroforesi. L'elettroforesi di DNA si basa sullo stesso principio di quelle delle proteine; è la separazione di macromolecole in soluzione acquosa in presenza di un campo elettrico. In questo caso però, la discriminazione delle diverse molecole viene fatta solo in base alla grandezza e alla forma, visto che la carica è la stessa (le molecole di DNA sono tutte cariche negativamente per la presenza dei fosfati e quindi migreranno verso il polo positivo). Frammenti piccoli di DNA possono districarsi più rapidamente attraverso i pori del gel cosicchè essi compiono una migrazione più veloce rispetto ai formati più grandi che raggiungono una distanza maggiore rispetto a essi. La posizione del DNA amplificato è determinata sul gel grazie all'etidio bromuro che s'intercala fra i filamenti del DNA e lo rende fluorescente, se irradiato con luce ultravioletta.

Il prodotto di PCR purificato viene sequenziato con il metodo di Sanger, chiamato metodo della dideossi-terminazione: viene usato un solo primer per iniziare la sintesi di nuove eliche di DNA; in aggiunta ai normali nucleotidi ne vengono messi alcuni modificati (dideossi-) che non permettono il proseguimento della duplicazione. La sintesi termina con l'aggiunta di un nucleotide modificato e la migrazione su gel dei frammenti di DNA così ottenuti permette di individuare l'esatta successione dei nucleotidi lungo la sequenza di DNA.

2.3.3 Metodologie molecolari

Dai campioni è stata prelevata una porzione di tessuto dal peso di 25 mg in seguito trasferita in una provetta contenente 180 µl di buffer ATL e 20 µl di Proteinasi K. Il campione è stato sminuzzato meccanicamente e posto in incubazione a 37 °C per tutta la notte. L'estrazione prosegue utilizzando il protocollo standard del QIAGEN DNEASY® BLOOD & TISSUE KIT, tramite diversi lavaggi e centrifugazioni, finalizzati a legare il DNA ad una apposita membrana della colonna di estrazione, purificarlo e rilasciarlo infine in un buffer adeguato alla sua conservazione. Il DNA totale estratto è stato in seguito in parte utilizzato come DNA-stampo per l'amplificazione dei marcatori scelti ed in parte conservato in freezer a -20°C.

2.3.3.a Amplificazione: il 16S

E' stata fatta l' amplificazione del gene 16S in individui estratti con il QIAGEN DNEASY BLOOD & TISSUE KIT utilizzando i primers universali 16Sar-L (5' –CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT- 3') e 16Sbr-H (5' –CCG GTC TGA ACT CAA TCA CG- 3') disegnati da Palumbi *et al.* (1991).

La PCR è stata effettuata in un thermocycler '2720' (Applied Biosystems) utilizzando differenti tempi e temperature di annealing, e processi ad un singolo o a due *steps*. Questo sino a determinare un protocollo standart. In questo caso il processo di amplificazione è stato effettuato in un volume di reazione di 50 µl contenente 2 unità di *Taq* polimerasi (THERMOSCIENTIFIC), 1X Buffer di reazione [200 mM (NH₄)SO₄, 100 mM Tris HCl pH 8.8, 0.1% (v/v) Tween] (THERMOSCIENTIFIC), 2 mM MgCl₂, 40 mM dNTPs, 10 pmol di ogni primer e approssimativamente 200 ng di DNA. L'amplificazione si sviluppava attraverso una fase di riscaldamento iniziale a 95°C per 9 minuti, seguita da 30 cicli costituiti dalle tre fasi dell'amplificazione. La temperatura di denaturazione è 93 °C e viene mantenuta per un minuto, a essa segue la temperatura di '*annealing*' di 54°C per un minuto, infine si ha la fase di estensione per un minuto a 70°C. La PCR si conclude con una fase finale di 10 minuti a 70°C (Tab. VI). La purificazione del prodotto PCR è stata effettuata utilizzando il protocollo QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT e i campioni sono stati in seguito spediti per il sequenziamento alla BMR-Genomics (Padova).

2.3.3.b Amplificazione: la COI

Al fine di amplificare la COI, si è ricorso all'utilizzo dei primers standard LCO1490 (5' –GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G- 3') e HCO2198 (5' –TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA- 3') descritti da Folmer *et al.* (1994)

La PCR è stata effettuata in un thermocycler '2720' (Applied Biosystems) utilizzando diverse condizioni di amplificazione, variando il numero di *steps* e di cicli e le temperature di *annealing*. Il controllo mediante scorrimento su gel dell'esito del processo di amplificazione ha mostrato delle bande nette dopo più tentativi. Utilizzando i primers di Folmer, la PCR è stata effettuata in un volume totale di reazione di 50 µl il quale conteneva 2 unità di *Taq* polimerasi, 1X di Buffer per reazione[200 mM (NH₄)SO₄, 100 mM Tris HCl pH 8.8, 0.1% (v/v) Tween], 2 mM MgCl₂, 40mM

dNTPs, 10 pmol di ogni primers e approssimativamente 200 ng di DNA. Le condizioni per la PCR erano le seguenti: dopo un hot start a 95°C per 9 minuti, 30 cicli di denaturazione a 93°C per un minuto, annealing a 50°C per 1 minuto e estensione a 70°C per 1 minuto. L'amplificazione era stata completata con un'estensione finale a 70°C per 10 minuti (Tab. VI).

Il prodotto PCR era separato in 2% w/v di gel orizzontale di agarosio con etidio bromuro; la banda singola è stata tagliata dallo standard gel di agarosio; il DNA è stato estratto e purificato usando il Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany). Il prodotto della PCR è stato sequenziato con il sequenziatore automatico ABI 3730XL, presso la BMR-Genomics (Padova).

Talora il prodotto PCR si è fatto scorrere sul gel solo come prova dell'avvenuta amplificazione del frammento-target e l'amplificato non purificato è stato inviato alla "Macrogen Europe" che si è occupata sia della purificazione che del sequenziamento. È stato utilizzato il '*forward primer*' per il sequenziamento diretto del prodotto del processo di amplificazione e, quando le sequenze ottenute non erano di qualità sufficiente per consentirne una interpretazione univoca, si è richiesta l'amplificazione anche del filamento complementare.

2.3.3.c Amplificazione: il 28S

È stata condotta l'analisi del gene nucleare ribosomale 28S-rDNA. Quest'ultimo è stato esaminato in tre regioni, la prima lunga 348 bp, amplificata con i primer D9/10F (5'-CGGCGGGAGTAACTATGACTCTCTTAAGGT-3') e D9/10R (5'-CCGCCCCAGCCAACTCCCCA-3') (Zardoya et al. 1995), la seconda lunga 388 bp, amplificata con i primer 28F4 (5'-CGCAGCAGGTCTCCAAGGTGMACAGCCTC-3') e 28GG (5'-GACGAGGCATTTGGCTACCTTAAG-3') (Hillis & Dixon 1991) e infine l'ultima lunga 668 bp amplificata con i primer D23F (5'-GAGAGTTCAAGAGTACGTG-3') e D6R (5'-CCAGCTATCCTGAGGGAACTTCG-3') (Park & Ó Foighil 2000). La PCR è stata effettuata in un thermocycler '2720' (Applied Biosystems).

La PCR mix conteneva, Buffer di reazione 1X [100 mM tris HCl, pH 8.3 (at 25°C); 500mM KCl], 30 mM MgCl₂, il MgCl₂ non era presente nella mix per il secondo segmento di 28S perché in questo caso era presente un Buffer di reazione 1X con MgCl₂ [100mM tris HCl (at 25°C); 500mM KCl; 25mM MgCl₂], 0.2 mM di ogni dNTP, ad

eccezione che nel secondo segmento amplificato dove ci sono 0.8 mM di ogni dNTP, 1 μ M di ogni primer, 0.03 U/ μ l di Red Hot *Taq* Polymerase, 80 ng di DNA, per un totale di volume di reazione, insieme all'acqua bidistillata, di 25 μ l. Le condizioni di amplificazione PCR erano le seguenti: dopo un hot start a 94°C per 2 minuti, 32 (per il terzo segmento di 28S) o 35 (per il primo e il secondo segmento di 28S) cicli di denaturazione a 95°C per 1 minuto, annealing a 44°- 48°- 64 °C (rispettivamente per il terzo, primo e secondo segmento di 28S) per 1 minuto, e l'estensione a 72°C per 1 minuto. L'amplificazione era completata con un estensione finale a 72°C per 7 minuti (Tab. VI). La purificazione del prodotto PCR è stata effettuata utilizzando il protocollo QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT e i campioni sono stati in seguito spediti per il sequenziamento alla BMR-Genomics (Padova).

2.3.3.d Amplificazione: ITS

I geni sono stati clonati prelevando un segmento di DNA da un organismo ed inserendolo in un vettore di clonaggio per produrre una molecola di DNA ricombinante. Un vettore di clonaggio è una molecola costruita artificialmente, capace di replicarsi in un organismo ospite, per esempio un batterio, in cui può essere inserito, in un punto specifico, un segmento di DNA che si vuole studiare. In genere l'organismo ospite dove viene introdotto il DNA ricombinante è l'*Escherichia coli* (Fig.15).

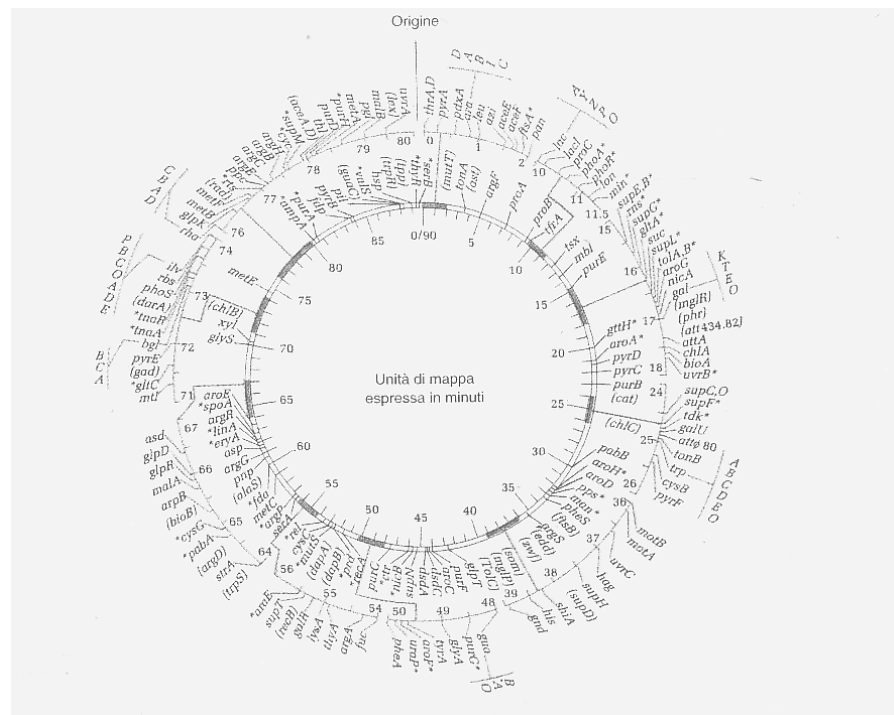


Fig.15: Mappa genetica di *E. coli*

La riproduzione della cellula ospite comporta la replicazione della molecola di DNA ricombinante (clonaggio molecolare) e la produzione di molte sue copie identiche, cioè mediante il clonaggio è possibile ottenere un numero praticamente illimitato di copie. I tipi di vettori che vengono comunemente usati per clonare sequenze di DNA nelle cellule batteriche sono essenzialmente tre: plasmidi, batteriofagi e cosmidi. Ognuno si diversifica dall'altro per le tecniche di manipolazione utilizzate per clonare i frammenti di DNA e per la dimensione massima del DNA che può essere clonato. Consideriamo i plasmidi come vettori di clonaggio. Essi sono elementi genetici extracromosomici che si replicano nelle cellule batteriche autonomamente. Il loro DNA è circolare e a doppia elica. I plasmidi usati negli esperimenti derivano tutti da plasmidi trovati in natura che sono stati ingegnerizzati in modo da presentare caratteristiche che facilitino il clonaggio di geni. I più usati, come già ricordato, sono i plasmidi di *E. coli*. Un vettore plasmidico di *E. coli* deve avere tre caratteristiche:

- Una sequenza *ori*, che permetta al plasmide di replicarsi nelle cellule di *E. coli*, in quanto viene riconosciuta dagli enzimi di replicazione della cellula ospite.
- Un marcatore selettivo, che renda le cellule di *E. coli* contenenti il plasmide facilmente distinguibili dalle cellule che non lo contengono. Uno dei marcatori più usati è il gene *amp^r* che conferisce la resistenza all'ampicillina. Infatti quando un plasmide con il gene *amp^r* viene introdotto per trasformazione in una cellula di *E. coli* senza plasmidi, il batterio diventerà automaticamente resistente all'ampicillina e potrà facilmente essere identificato perché crescerà in un terreno a cui è stata aggiunta ampicillina.
- Siti unici di taglio per gli enzimi di restrizione per l'inserzione nel plasmide delle sequenze di DNA che devono essere clonate. Gli enzimi di restrizione in natura si trovano soltanto nei batteri, dove hanno la funzione di proteggere la cellula batterica dall'infezione dei virus (Il batterio è infatti capace di modificare i siti di restrizione del suo genoma in modo che l'enzima di restrizione da esso prodotto non possa tagliare il proprio DNA, quindi nel momento in cui il virus inietta il proprio DNA nella cellula batterica l'enzima di restrizione è in grado di tagliare il DNA virale ma non quello della cellula batterica).

Nella figura 16 è indicato, nella mappa totale del vettore pCR 4-TOPO, il sito preciso di inserzione dei prodotti di PCR.

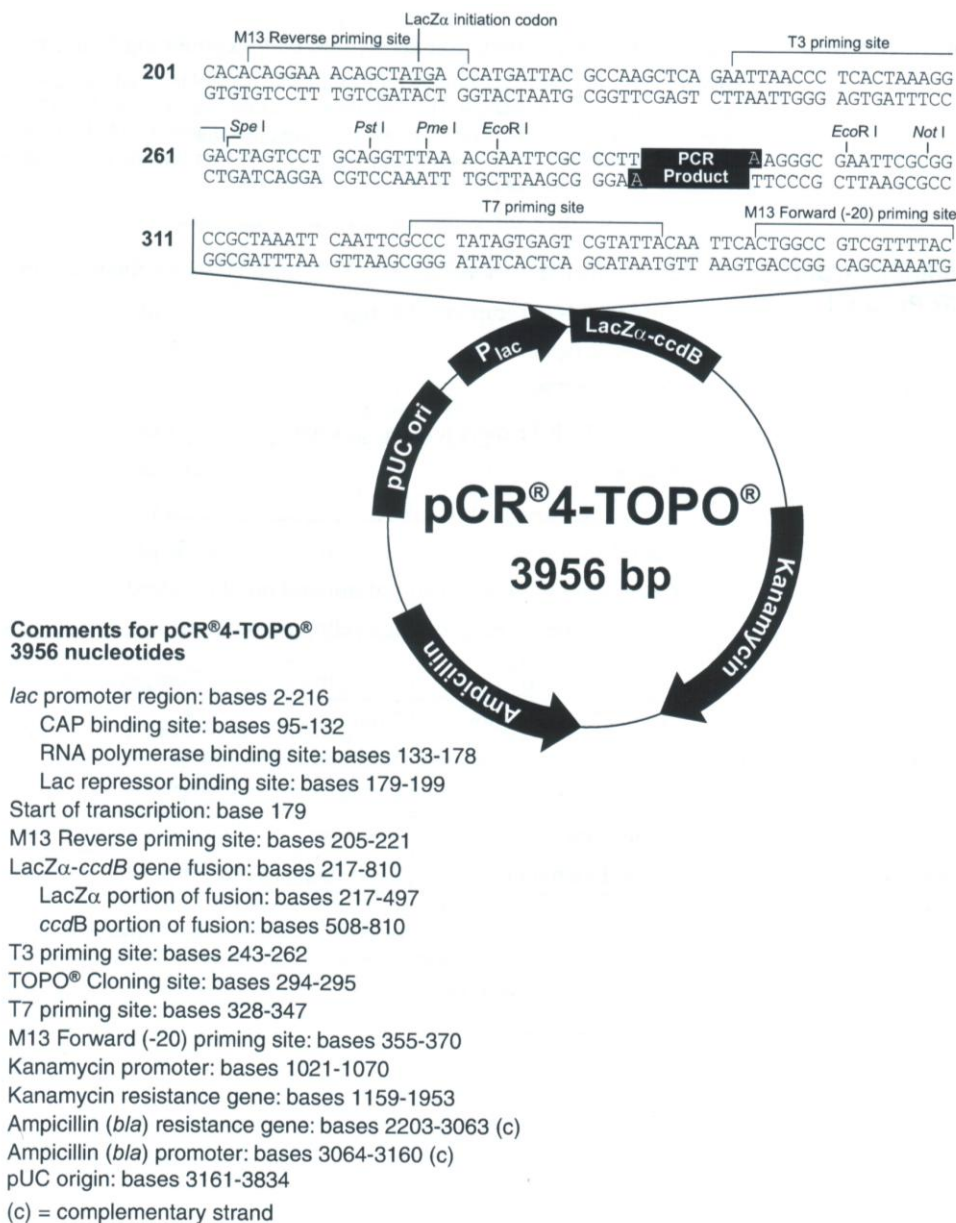


Fig. 16: Descrizione del vettore pCR 4-TOPO .

Il vettore plasmide utilizzato nel TOPO TA Cloning kit è il vettore pCR 4-TOPO. In esso viene introdotto il prodotto di PCR che presenta alle estremità 3' l'aggiunta di una deossiadenosina trasferita attivamente dalla *Taq* polimerasi. Il vettore linearizzato fornito nel kit ha residui di deossitimina all'estremità 3' . Questo permette agli inserti di legarsi efficacemente al vettore. Infatti, la topoisomerasi I, che deriva dal virus di vaccina, si lega al DNA del vettore in specifici siti e scinde la struttura di legami fosfodiesterici dopo la sequenza 5'-CCCTT. L'energia generata dalla rottura del legame fosfodiesterico è riutilizzata nella formazione di un legame covalente tra il fosfato all'estremità 3' del filamento scisso e un residuo di tirosina. Il legame fosfato-tirosina

può successivamente essere attaccato dal gruppo OH all'estremità 5' del prodotto di PCR capovolgendo la reazione e rilasciando la topoisomerasi.

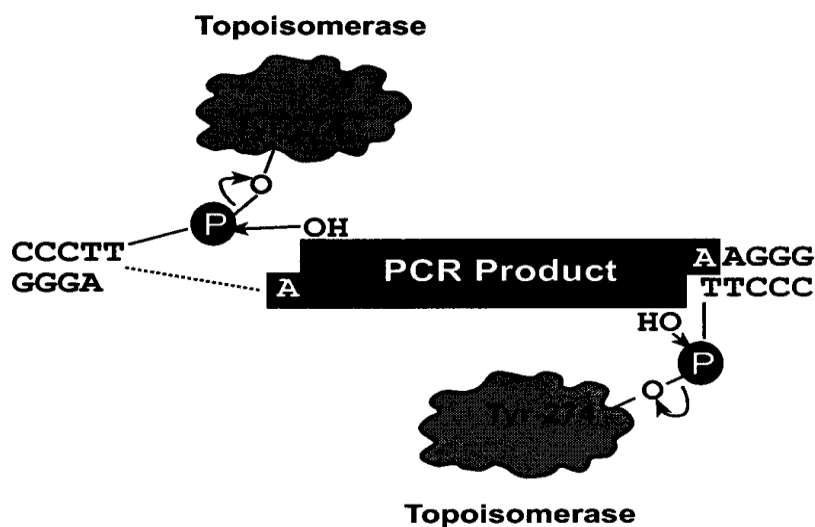


Fig. 17: Reazione di legame con il prodotto di PCR

Il vettore contiene il gene letale dell'*E.coli* unito alla C-terminale del frammento LacZ α , quest'ultimo viene interrotto dal legame con il prodotto di PCR (Fig. 17) permettendo alle cellule TOP 10 del batterio di sopravvivere poiché viene negata l'espressività del gene letale. Viceversa se il ricombinante non fosse presente i batteri non potrebbero sopravvivere, così è facile avere conferma della presenza del prodotto di PCR senza bisogno dello screening blu/bianco.

Tramite la prima PCR si è riusciti ad identificare la porzione ITS1. Questa PCR è stata eseguita utilizzando i primer ITS-1for (5'-AAAAGCTTCCGTAGGTGAACCTG-3') e ITS-1rev (5'-AGCTTGCTGCGTTCATCG-3') (King et al., 1999).

L'amplificazione è stata effettuata in una mix contenente Buffer di reazione 1X [100 mM tris HCl, pH 8.3 (at 25°C); 500mM KCl] (THERMOSCIENTIFIC), 40 mM MgCl₂, 0.5mM di ogni dNTP, 1.5 μ M di ogni primer, 0.04U/ μ l of Red Hot *Taq* Polymerase (THERMOSCIENTIFIC), 80 ng of DNA, per un totale di volume di reazione, insieme all'acqua bidistillata, di 25 μ l.

Il profilo termico utilizzato, è stato calcolato dalla temperatura di *melting*, per cui si è utilizzato un ciclo del tipo:

- Un *hot start* di 30 secondi a 95°C, per consentire l'attivazione della taq
- Una fase intermedia costituita da due *step*:

1. nel primo *step* la temperatura di denaturazione è 95°C e viene mantenuta per 30 secondi, a essa segue la temperatura di ‘*annealing*’ di 52°C per un minuto, infine si ha un minuto a 72°C per l’estensione, il tutto viene ripetuto per i primi 10 cicli;

2. nel secondo *step* la temperatura di denaturazione è 95°C e viene mantenuta per 30 secondi, a essa segue la temperatura di ‘*annealing*’ di 54°C per un minuto, infine si ha un minuto a 72°C per l’estensione, in questo caso le tre fasi dell’amplificazione sono state ripetute per 20 cicli;

- Una fase di elongazione finale di 7 minuti a 72°C (Tab.VI)

I frammenti amplificati sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2% con etil bromuro al 1%. La banda registrata 657 paia di basi contiene il DNA diploide, cioè si ha la presenza di DNA proveniente da 2 cromosomi.

Si è effettuato il taglio delle bande per poi eseguire l’estrazione dal gel seguendo il protocollo del kit. Il materiale così ottenuto viene messo in contatto con il plasmide, o vettore, mediante il processo di ligazione. La ligazione è costituita da 1 µl di salt solution, 1 µl del vettore topo e 1 µl di acqua, il tutto messo a contatto con 3 µl di DNA. Ottenuto un volume finale di 6 µl si tiene per almeno 30 minuti a temperatura ambiente (se poi si deve conservare è necessario conservarlo a -20°C). Questo processo di ligazione è utilizzato per far inglobare i frammenti di DNA, attraverso l’enzima ligasi, nel DNA circolare del plasmide attaccandosi agli estremi M13. A questo punto siamo già in presenza di un DNA aploide. Ora si deve permettere che il plasmide entri a far parte dei batteri, ciò è possibile grazie a procedimenti di shock termico. La ligazione deve essere addizionata, in quantità di 2 µl, ai batteri, che normalmente conservati a temperature di meno 80°C, devono essere posti in un becker contenente ghiaccio, e ivi mantenuti per 30 minuti. Per permettere lo shock termico si passano nel termoblok a 42°C per 45 secondi e poi si ripongono nel ghiaccio per 3 minuti. In seguito si addiziona 250 µl di S.O.C. (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) e si ripongono nel bagnetto per 1 ora a 37°C. Ogni batterio verrà piastrato sotto cappa a 2 densità differenti, corrispondenti a 50 µl e 150 µl per aumentare la probabilità di crescita, in un terreno di coltura solido. La procedura per creare il terreno di coltura solido dei batteri è la seguente:

- ✓ 20 gr di LB Broth e 20 gr di Agar sciolti per agitazione meccanica, tramite magnete, in un 1 l di acqua distillata.
- ✓ Portare a 7.3 il ph tramite tamponi.

- ✓ Autoclavare il brodo e al raggiungimento di 55°C di temperatura aggiungere 0.05 µl di Ampicillina.

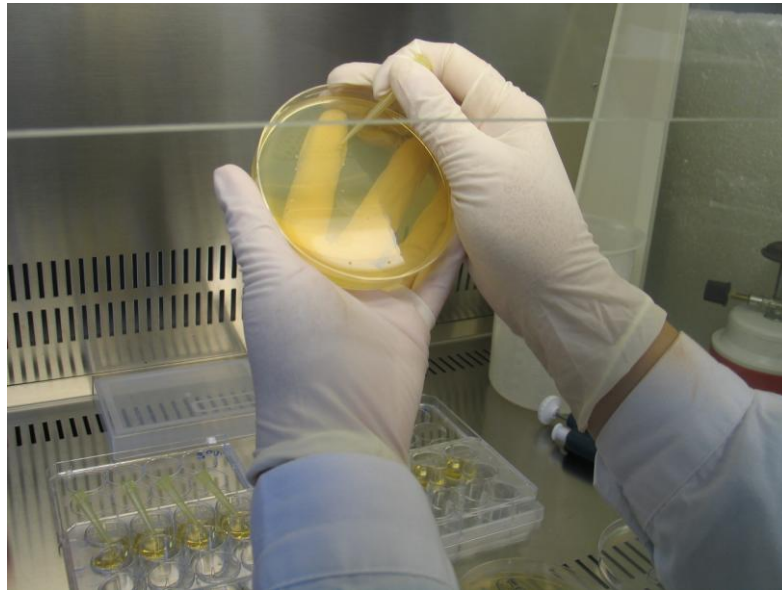


Fig. 18: batteri di *E.coli* durante la procedura di prelievo delle colonie.

Dato che il terreno di coltura contiene l'ampicillina i batteri che si svilupperanno, durante la notte a temperatura di 37° C, saranno unicamente quelli che contengono il plasmide perché essi presentano resistenza grazie all'antibiotico (Fig. 18). Dalla cultura batterica dovrà essere estratto il plasmide, e per evitare la perdita del campione si prelevano un numero superiore a uno di batteri. A tal proposito, per verificare la correttezza del procedimento si può eseguire una PCR di prova, con i primer forniti dal kit M13 For (3'-CTGGCCGTCGTTTAC-5') e M13 Rev (3'-CAGGAAACAGCTATGAC-5'), per verificare che i plasmidi siano presenti.

Questa PCR, fatta su 25 µl di volume finale, ha:

- un hot start di 10 minuti a 95°C
- un fase intermedia costituita da: 45 secondi a 94°C, 45 secondi a 55° C e 2 minuti a 72° C; ripetuti per 40 cicli
- una fase di elongazione finale di 5 minuti a 72°C (Tab.VI)

L'amplificazione è stata effettuata in un volume totale di mix per campione di 25 µl contenente 14.4 µl di acqua sterile bidistillata, 2.5 µl di Buffer 10X (THERMOSCIENTIFIC), 2 µl di MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl di NTPs 1.25 mM, 0.2 µl di *Taq* 5U/µl (THERMOSCIENTIFIC), 0.2 µl di ogni primer 10 µM e 5 µl di DNA stampo.

Esaminando il gel tramite l'elettroforesi la banda compare a 700 paia di basi netta e pulita, a testimoniare la correttezza del procedimento.

I batteri vengono fatti crescere un'altra notte in un agitatore a 37°C in un terreno di coltura liquido, preparato seguendo i seguenti parametri:

- ✓ 5 gr LB Broth e 250 ml di acqua bidistillata il tutto autoclavato
- ✓ l'aggiunta di 12.5 mg di ampicillina una volta raggiunti i 55° C.

Da qui si adopera il “ PURE LINK QUICK PLASMID MINIPREP KIT “che ci permette di estrarre il plasmide, uno per ogni presunto clade, e dopo essere stato controllato tramite elettroforesi in gel d'agarosio colorato con etidio bromuro (Fig. 19), è stato spedito per il sequenziamento, con entrambi i primer, dalla BMR GENOMICS SERVIZIO SEQUENZIAMENTO DNA. In esse è stata riconosciuta la porzione ITS di interesse come parametro di confronto tra individui.

In Fig. 20 è riportato uno schema riassuntivo del processo di clonaggio.

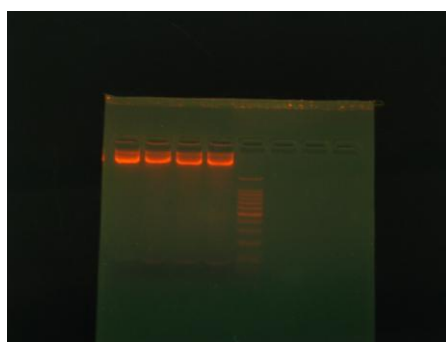


Fig. 19: Foto del gel che mostra il risultato della PCR di prova per verificare il buon esito del clonaggio prima del sequenziamento del plasmide.

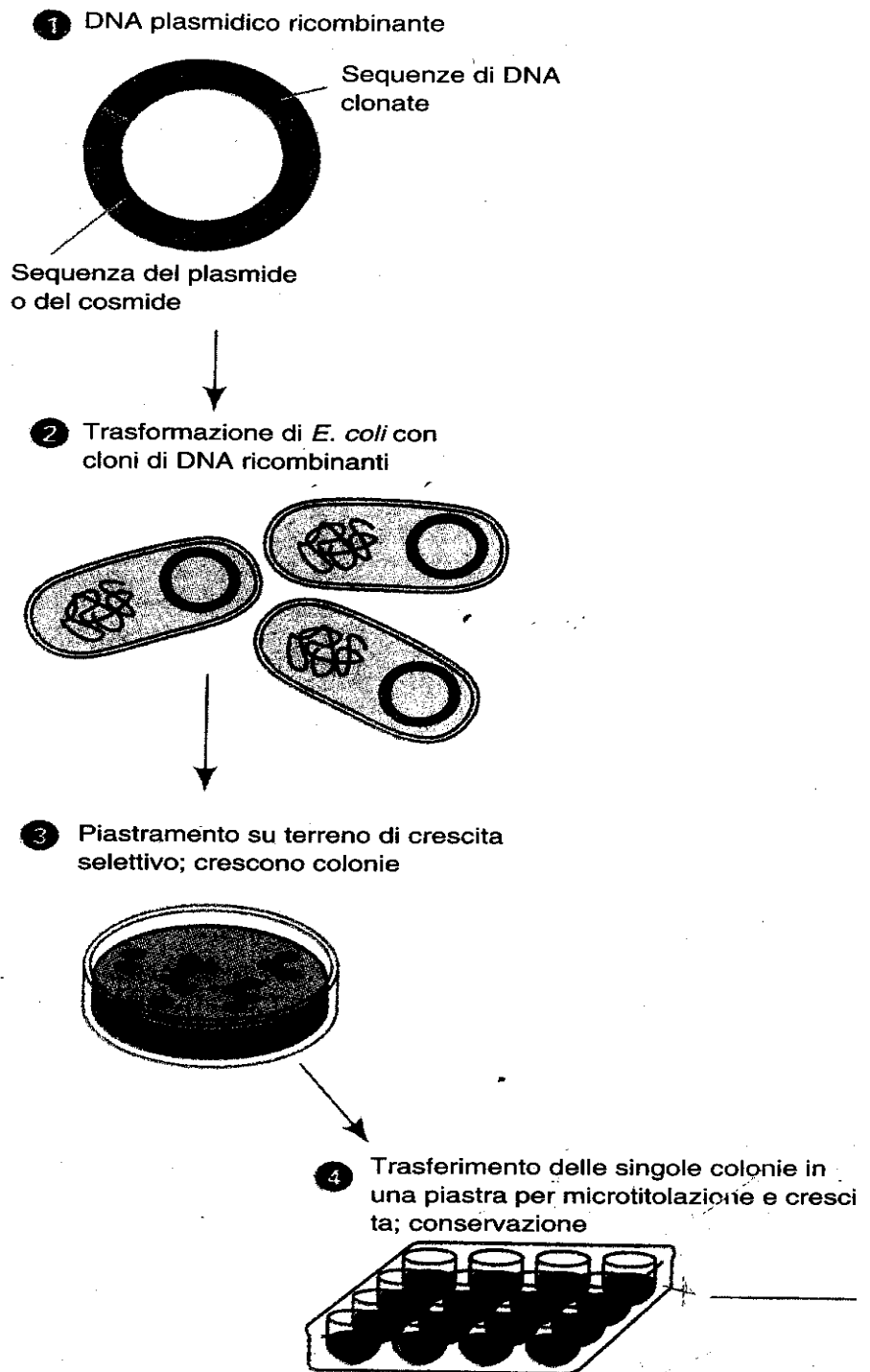


Fig.20: Descrizione riassuntiva del processo di clonaggio

<i>Primer</i>	<i>Hot start</i>	<i>Step I</i>			<i>Step II</i>			<i>Final Extension</i>
16Sar-L	95°	93°	54°	70°				70°
16Sbr-H	9'	1'	1'	1'				10'
LCO1490	95°	93°	50°	70°				70°
HCO2198	9'	1'	1'	1'				10'
D9/10F	94°	95°	48°	72°				72°
D9/10R	2'	1'	1'	1'				7'
28F4	94°	95°	64°	72°				72°
28GG	2'	1'	1'	1'				7'
D23F	94°	95°	44°	72°				72°
D6R	2'	1'	1'	1'				7'
ITS-1for	95°	95°	52°	72°	95°	54°	72°	72°
ITS-1rev	30"	30"	1'	1'	30"	1'	1'	7'
M13 For	95°	94°	55°	72°				72°
M13 Rev	10'	45"	45"	2'				5'

Tab. VI: Cicli di amplificazione per i differenti primers. Il numero dei cicli effettuati per ogni *step* è descritto nel testo.

2.3.4 Analisi filogenetiche

Per tutte le analisi i cromatogrammi ottenuti dal sequenziamento sono stati controllati e ripuliti dalle code ove fossero presenti picchi non univoci con il software Chromas 1.45 (McCarthy, 1996). L'identità delle sequenze ottenute sono state determinate con la comparazione con dati di sequenze dal database nucleotidico usando il programma BLAST (Altschul et al., 1997). Le sequenze ricavate sono state allineate con il software CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) attraverso MEGA 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) che è poi stato utilizzato per un primo studio dei rapporti tra le sequenze. Dal software MEGA sono stati ottenuti il file di output in formato Nexus (.nex) e in formato Philip (.phy) da cui con PHYML v.3 (Guindon & Gascuel, 2003) è stata fatta l'analisi di *Maximum likelihood* (ML), e con Paup 4.0 (Swofford, 2002) è stata fatta l'analisi *Neighbour-Joining* e la *Maximum Parsimony* (MP), il tutto sotto le assunzioni di distanza. Dettagli sulle impostazioni utilizzate caso per caso sono riportati in seguito. Gli alberi di output, in formato nexus, sono stati convertiti in formato grafico tramite i programmi TreeView 1.6.6 (Roderic, 2001) e FigTree 1.3.1 (Rambaut, 2009; <http://tree.bio.ed.ac.uk/>) che ci ha consentito la manipolazione grafica. Il modello evolutivo da applicare ai differenti dataset è stato ricavato tramite MrModeltest 2.3 (Posada, 2008).

Al fine di verificare se due o più frammenti del 28S rDNA potessero essere combinati in un *dataset* unico è stato condotto l' "Incongruence Length Difference test" (ILD; Farris et al., 1995), implementato in PAUP come "Partition Homogeneity test". In accordo a Cunningham (1997), quando $P > 0.01$, l'unione dei frammenti migliora o, al più, non riduce l'accuratezza della ricostruzione filogenetica ed è quindi giustificabile unirli in una unica matrice per condurre una analisi di "Total Evidence" (TE). Le sequenze di 28S essendo contigue sono state unite trovando i nucleotidi di sovrapposizione con il BioEdit (Hall, 1999).

Un *minimum spanning network* (MSN) è stato realizzato usando Arlequin 2.0 (Schneider & Excoffier, 1999) & Network versione 4.6.0.0 (Polzin & Vandati Deneshmand, 2011), per rappresentare graficamente le relazioni filogenetiche tra haplotipi del frammento COI mtDNA degli individui mediterranei.

CAPITOLO 3

Risultati

3.1 Risultati Nucleari

L'analisi delle sequenze della larga subunità nucleare ribosomale 28S è stata condotta su 3 porzioni distinte di questo marcatore nucleare, questo perché essendo il 28S un marcatore altamente conservativo si è cercato di esaminare un numero più alto di paia di basi, che potessero dare una maggiore informazione. Le singole porzioni presentavano rispettivamente una lunghezza di 348 bp (primer D9/10F-R), 388 bp (primer F4-GG) e 668 bp (D23F-D6R), queste unite ed esclusi i siti di sovrapposizione arrivavano a coprire un totale di 1365 bp. I 3 frammenti di 28S sono stati riuniti per effettuare un esame monovalente. Al fine di verificare se i 3 frammenti del 28S potessero essere combinati in un unico *dataset* è stato condotto l' "*Incongruence Length Difference test*" (ILD; Farris et al., 1995), implementato in PAUP come "*Partition Homogeneity test*". In accordo a Cunningham (1997), quando $P > 0.01$, l'unione dei frammenti migliora o, al più, non riduce la accuratezza della ricostruzione filogenetica. Dal risultato ottenuto ($p > 0.01$) è stato quindi giustificabile unire le porzioni di 28S in una unica matrice per condurre una analisi di "*Total Evidence*" (TE). Sul totale di 1365 bp, comprendente i tre frammenti solo uno di essi presenta una certa variabilità, infatti riconosciamo 1305 siti conservati e 15 siti variabili. Le distanze genetiche (*p-distance*) tra i 3 gruppi (MM + MR; OI; OP) hanno il valore presentato in Tab. VII.

	1.	2.
1. Clade "OP"		
2. Clade "OI"	0.008	
3. Clade "MM+MR"	0.011	0.004

Tab. VII: Distanza molecolare media tra i cladi (*p-distance*) in riferimento al marcatore nucleare 28S.

La ricostruzione filogenetica è stata condotta con la *Maximum Likelihood* (ML) e *Neighbor Joining* (NJ) con il modello di sostituzione nucleotidica “HKY” e con la *Maximum Parsimony* (MP). Dagli alberi ottenuti, che danno la stessa topologia, con valore di *bootstrap* alti ai nodi, si supporta ancora la tesi della distinzione nei tre cladi (Fig. 21).

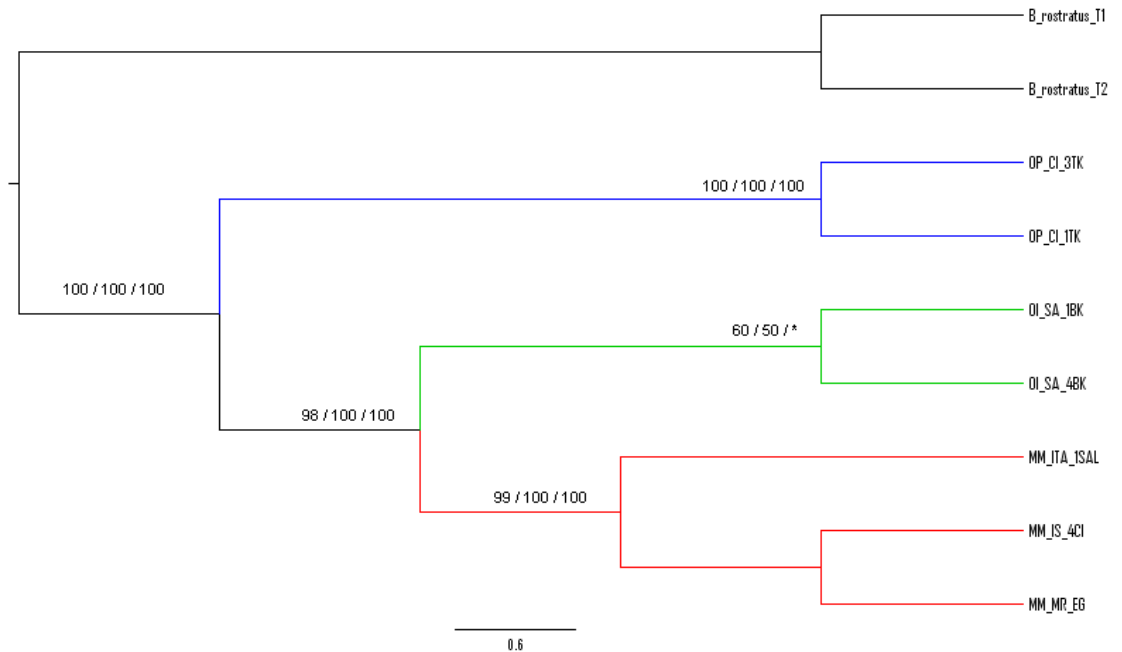


Fig. 21: Albero riassuntivo basato su un frammento di 1365 bp del 28S; NJ (HKY), ML (HKY), MP. Sui nodi sono riportati i valori di *bootstrap* basati su 1,000 repliche per NJ/ML/MP. Valori di supporto bootstrap inferiori a 50 sono rappresentati con un asterisco.

Un altro gene nucleare è stato utilizzato per l’identificazione delle presunte specie criptiche. Questa regione era già stata usata per l’identificazione di specie di bivalvi in un lavoro di Santaclara et al., 2006. La porzione del ITS amplificata all’interno del plasmide è risultata lungo 654 paia di basi. Di queste 466 sono risultate conservate tra tutti gli individui, 108 variabili. Le distanze genetiche tra i campioni appartenenti alle 3 aree geografiche sono presentate in tabella VIII.

	1.	2.
1. Clade "MM+MR"		
2. Clade "OI"	0.099	
3. Clade "OP"	0.146	0.142

Tab. VIII: Distanza molecolare media tra i cladi (*p-distance*) in riferimento al marcatore nucleare ITS.

La ricostruzione filogenetica è stata condotta con la *Maximum Likelihood* (ML) e *Neighbor Joining* (NJ) con il modello di sostituzione nucleotidica "GTR" e con la *Maximum Parsimony* (MP). Gli alberi mostrano tutti la stessa topologia (Fig.22).

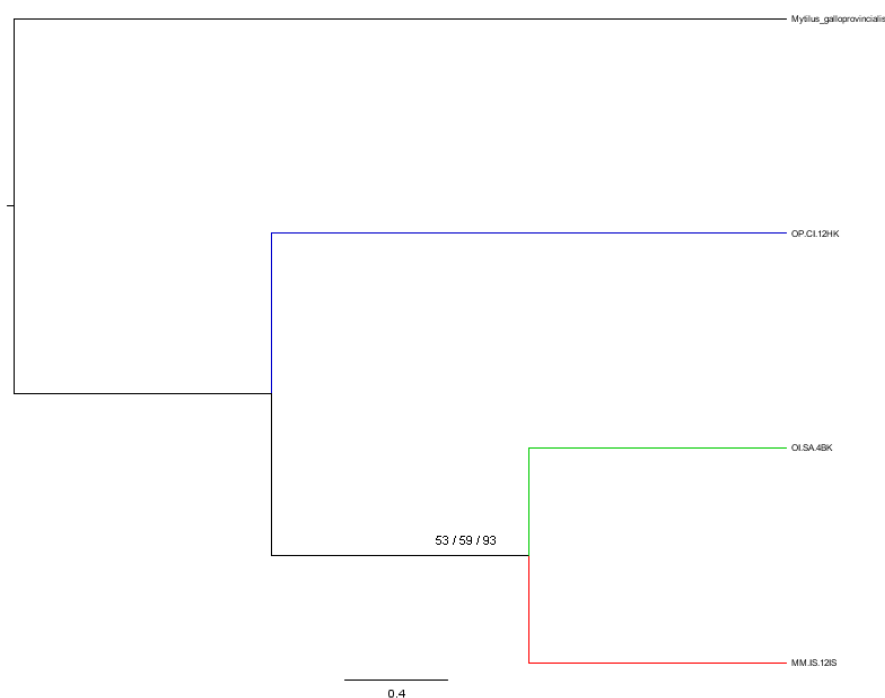


Fig. 22: Alberi ITS; NJ (GTR), ML (GTR), MP che presentano un'unica topologia; basati su un frammento di 654 bp. Sui nodi sono riportati i valori di *bootstrap* basati su 1,000 repliche per NJ/ML/MP.

3.2 Risultati Mitocondriali

3.2.1 Mar Mediterraneo-Mar Rosso, Oceano Indiano e Oceano Pacifico

E' stato sequenziato un frammento della COI che, una volta ripulito, mostra una lunghezza di 618 bp. Nell'allineamento, contenente tutte le sequenze, su 618 bp: 409 siti sono risultati conservativi, 209 variabili e 182 informativi. La diversità aplotipica e la diversità nucleotidica indicano il grado di variabilità di una specie. Questi valori sono riportati in Tab. IX sia per il set totale di individui sia per il set di individui legati alle aree geografiche.

	<i>N° di individui</i>	<i>N° di aplotipi</i>	<i>Diversità Aplotipica (h)</i>	<i>Diversità Nucleotidica (π)</i>
<i>Mar Mediterraneo – Mar Rosso</i>	154	102	0.9859	0.03768
<i>Oceano Indiano</i>	27	18	0.957	0.02042
<i>Oceano Pacifico</i>	5	5	1	0.00615
<i>Intero dataset</i>	186	125	0.9895	0.07419

Tab. IX: Variabilità genetica di *Brachidontes pharaonis-variabilis* osservata per il gene mitocondriale COI su tutto l'areale.

Con modello di sostituzione nucleotidica “GTR+G” sono stati costruiti gli alberi *Neighbor-Joining* (NJ) (Fig. 23) e *Maximum Likelihood* (ML) (Fig. 24), inoltre è stato costruito l'albero *Maximum Parsimony* (MP) (Fig.25). Gli alberi della COI mostrano simile topologia, definendo tre cladi nell'insieme *Brachidontes pharaonis-variabilis* appartenenti rispettivamente all'area del Mar Mediterraneo-Mar Rosso (MM+MR), all'area dell'Oceano Indiano (OI) e infine all'area dell'Oceano Pacifico (OP).

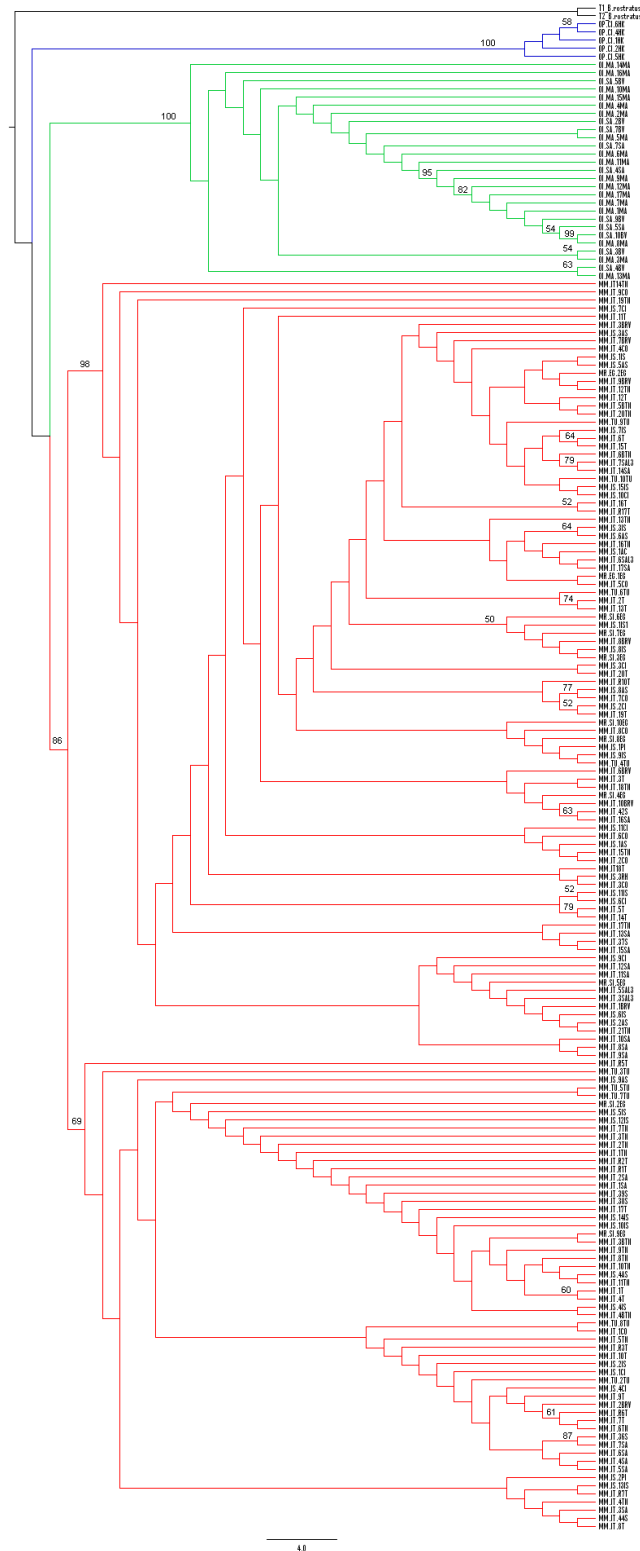


Fig. 23: Albero NJ (GTR+ G) basato su un frammento di 618 bp del COI in 186 individui: 154 Mar Mediterraneo-Mar Rosso (MM+MR) (Rosso); 27 Oceano Indiano (OI) (Verde); 5 Oceano Pacifico (OP) (Blu) e 2 *outgroups* (Nero).Sui nodi sono riportati i valori di *bootstrap* basati su 1,000 repliche.

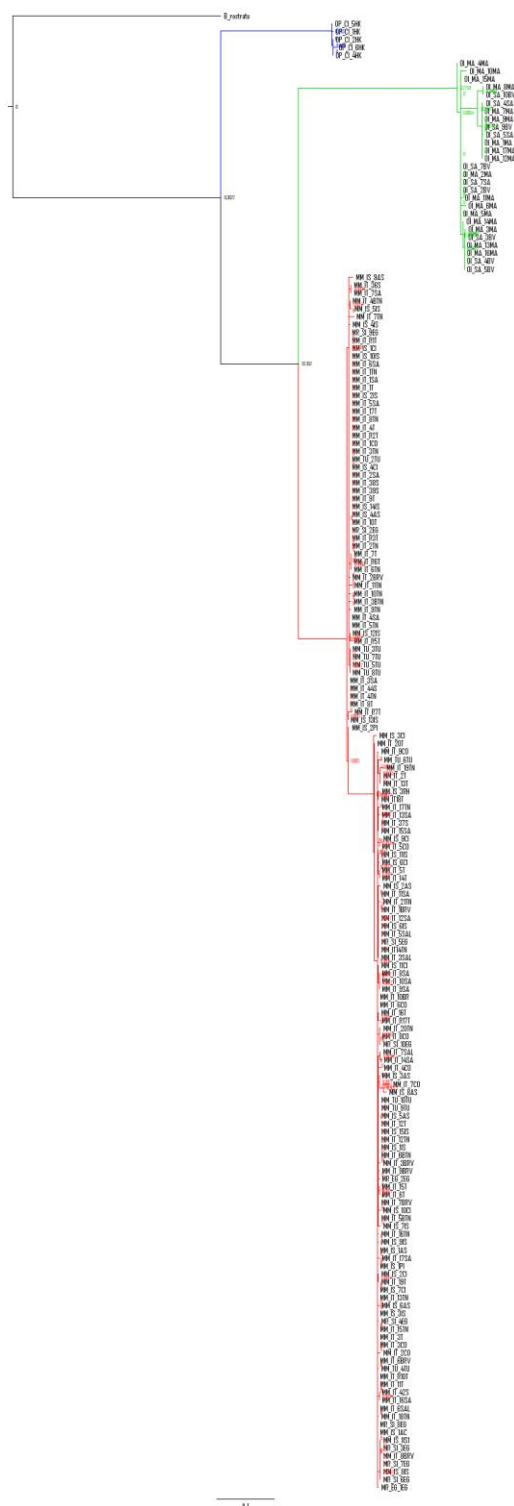


Fig. 24: Albero ML (GTR+ G) basato su un frammento di 618 bp del COI in 186 individui: 154 Mar Mediterraneo-Mar Rosso (MM+MR) (Rosso); 27 Oceano Indiano (OI) (Verde); 5 Oceano Pacifico (OP) (Blu) e 2 *outgroups* (Nero). Sui nodi sono riportati i valori di *bootstrap* basati su 1,000 repliche.

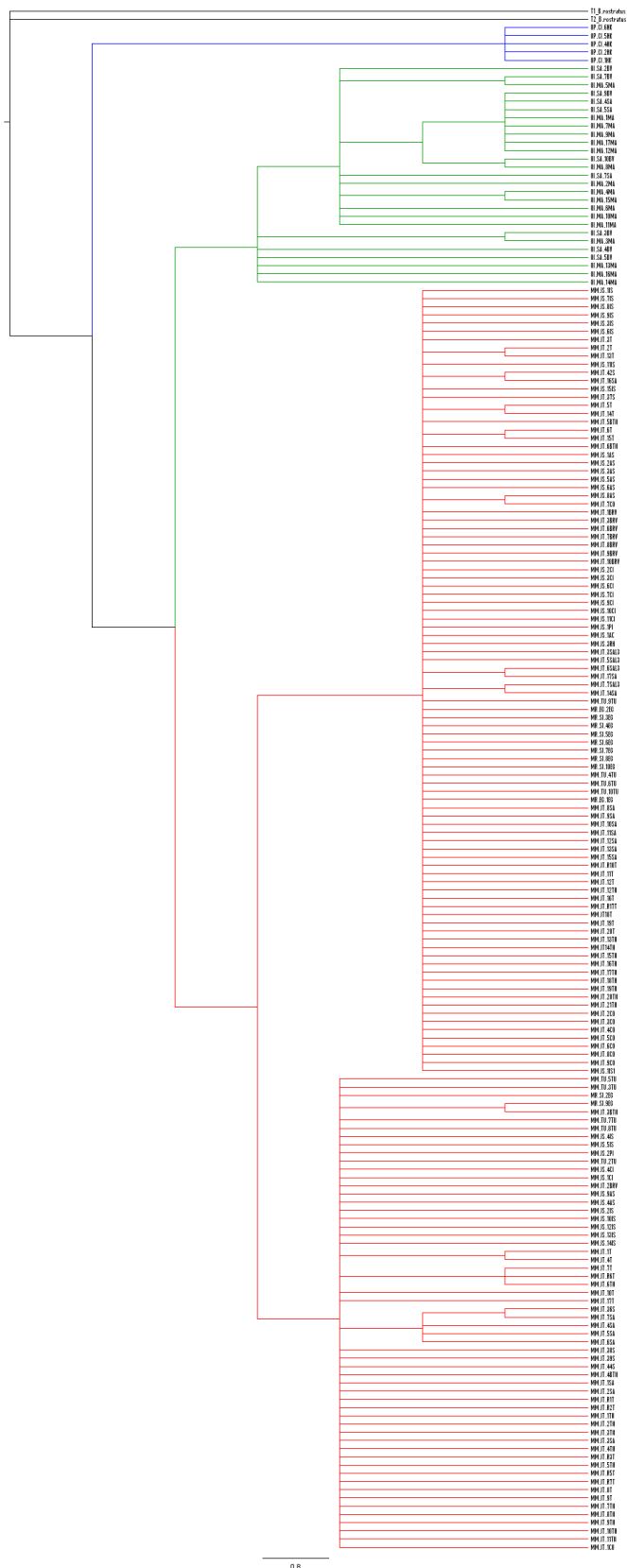


Fig. 25: Albero 50 % “majority-rule consensus” di 918481 alberi egualmente parsimoniosi sul segmento COI di 618 bp.

A supporto degli alberi filogenetici ottenuti in cui si presentano tre linee monofiletiche e per chiarire se questa separazione è avvenuta per speciazione indipendente o per casi di *random drif* è stata utilizzata la “*Four time rule*” (Birky et al., 2005; Birky & Barraclough, 2010; Birky et al., 2010). Questa analisi considera due cladi come specie indipendenti quando il valore di divergenza molecolare tra i due cladi è troppo alto per essere dovuto a casi di deriva genetica casuali. Quindi, quando la divergenza molecolare media tra le sequenze appartenenti a due presunti cladi differenti è superiore a 4 volte il polimorfismo nucleotidico all’interno di ciascuno dei due cladi, allora si può sostenere con una confidenza del 95% che i due cladi siano unità reciprocamente monofiletiche e che si evolvono indipendentemente, quindi specie valide ai sensi del "concetto evolutivo di specie".

d	4 Θ p-dist	4 Θ ml-dist (GTR)
1. Clade Mediterraneo- Mar Rosso "MM + MR"	0.1598	0.1736
2. Clade Oceano Indiano "OI"	0.0873	0.0901
3. Clade Oceano Pacifico "OP"	0.0311	0.0313

Tab. X: Polimorfismo nucleotidico intraclade basato su un frammento del gene mitocondriale COI moltiplicato per quattro "4 Θ " (cf. testo).

	1.	2.	3.
1. Clade "MM+MR"		0.1816	0.2308
2. Clade "OI"	0.1568		0.2201
3. Clade "OP"	0.1923	0.1864	

Tab. XI: Polimorfismo nucleotidico interclade "K". Sotto la diagonale: p-distance; sopra la diagonale: ml-distance (GTR+G) (COI mtDNA).

In Tab. X sono riportati i valori di polimorfismo nucleotidico intraclade (Theta) già moltiplicato per 4, mentre in Tab. XI è stata riportata la distanza inter-clade (K), considerata sia calcolandola con le distanze 'p' non corrette, sia per le distanze corrette per sostituzioni multiple secondo il modello evolutivo indicato da MrModel Test, ovvero 'GTR+G'. Questo perchè i valori calcolati con la distanza p sono valori che vanno tra il 15% e il 20% per cui sono valori troppo elevati per trascurare la possibile insorgenza di fenomeni di saturazione: se per i valori di distanza intraclade i fenomeni di saturazione e sostituzione multipla sono trascurabili non si può dire la stessa cosa per le distanze inter-clade per cui si è voluta ripetere l'analisi utilizzando il modello evolutivo suggerito come maggiormente idoneo sulla base del nostro set di dati. Seguendo la regola:

$$K > 4 \Theta$$

Si è visto che tutti i valori rispettano la legge e che quindi l'applicazione della '4x rule' ha dato un esito coerente su entrambe le matrici, mostrando come i tre cladi siano effettivamente delle linee evolutive monofiletiche e reciprocamente indipendenti, le cui differenze non possono essere spiegati da fenomeni di deriva casuale.

Inoltre, considerando i valori di divergenza genetica nel confronto a coppie tra le popolazioni di *Brachidontes pharaonis-variabilis* presenti nelle tre aree geografiche, espressi in percentuale che vanno dal 15 % al 19 %, possiamo dire che essi non si discostano molto dai valori del 25% di divergenza interspecifica trovata in letteratura per la mtCOI nei bivalvi (Shearer et al., 2002). Ciò supporta ulteriormente la separazioni in tre linee monofiletiche.

Per indagare sulla separazione in tre cladi si è aggiunto un altro marcatore mitocondriale il 16S. La sequenza parziale del gene mitocondriale 16S-rDNA del *Brachidontes pharaonis-variabilis* ottenuta per questa analisi era lunga 496 bp (paia di basi). Nell'allineamento di tutte le sequenze ottenute, relative alle tre macroaree di campionamento, 147 erano i siti conservativi, 337 erano i siti nucleotidici variabili e 133 quelli informativi. Le sequenze di 16S-rDNA, sono state usate per calcolare la distanza media tra le popolazioni (*p-distance*) (Tab. XII).

	1.	2.
1. Clade "MM+MR"		
2. Clade "OI"	0.135	
3. Clade "OP"	0.156	0.122

Tab. XII: Distanza molecolare media tra i cladi (*p-distance*) (16S mtDNA).

Inoltre esaminando la diversità nucleotidica all'interno delle singole popolazioni si è visto che le popolazioni dell'Oceano Indiano mostrano la più alta variabilità in termini di diversità nucleotidica rispetto all'area del Mar Mediterraneo-Mar Rosso e all'area dell'Oceano Pacifico (Tab. XIII). L'alta diversità nucleotidica trovata nei campioni dell'Oceano Indiano, già vista nei campioni di COI, e ripetuta nell'analisi del 16S, era dovuta alla presenza anche qui di due forme mitocondriali, rappresentate i due *sister group* scoperti nel raggruppamento di *Brachidontes pharaonis-variabilis* dell'Oceano Indiano, non legati però al 30° aminoacido che presenta mutazioni solo nell'area del Mar Mediterraneo-Mar Rosso.

	<i>N° di individui</i>	<i>N° di aplotipi</i>	<i>Diversità Aplotipica (h)</i>	<i>Diversità Nucleotidica (π)</i>
<i>Mar Mediterraneo – Mar Rosso</i>	51	17	0.824	0.00805
<i>Oceano Indiano</i>	18	13	0.902	0.03978
<i>Oceano Pacifico</i>	7	3	0.714	0.00180
<i>Totale</i>	76	32	0.913	0.07417

Tab. XIII: Variabilità genetica di *Brachidontes variabilis* osservata per il gene mitocondriale 16S su tutto l'areale.

Gli alberi *Neighbor-Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML), con il modello di sostituzione nucleotidica "GTR+I+G" e *Maximum Parsimony* (MP), esibiscono una

simile topologia (Fig. 26). Tutti gli alberi discriminano il *Brachidontes sp.* nelle tre aree: Mar Mediterraneo-Mar Rosso (MM+MR), Oceano Indiano (OI) e Oceano Pacifico (OP).

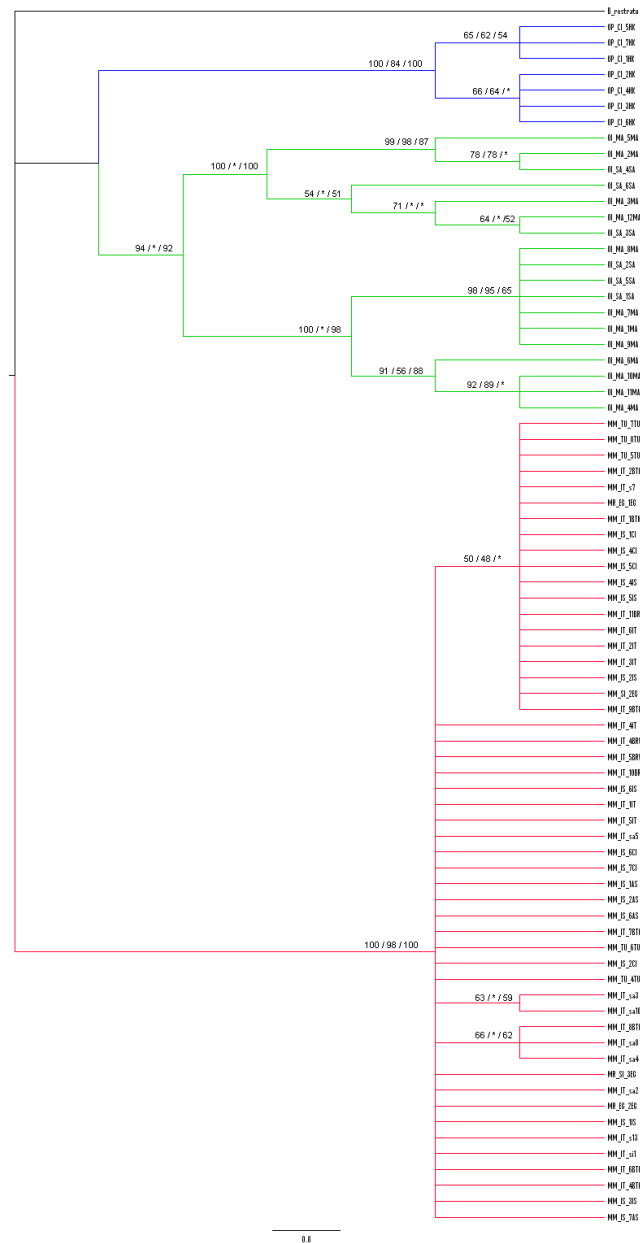


Fig. 26: Albero basato su un frammento di 496 bp del 16S in 76 individui (51 Mar Mediterraneo-Mar Rosso (MM+MR) (Rosso); 18 Oceano Indiano (OI) (Verde); 7 Oceano Pacifico (OP) (Blu) e 2 outgroups (Nero)); NJ (GTR+I+G), ML (GTR+I+G), MP. Sui nodi sono riportati i valori di *bootstrap* basati su 1,000 repliche per NJ/ML/MP. Valori di supporto bootstrap inferiori a 50 sono rappresentati con un asterisco.

3.2.2 Mar Mediterraneo-Mar Rosso

Sono state analizzate e confrontate le sequenze di 618 bp del gene COI del mtDNA di 154 individui. Sono stati identificati un totale di 497 siti conservativi, 121 siti variabili, delle quali 114 erano mutazioni silenti e 7 portavano un cambiamento amminoacidico (Tab. XIV), e 77 siti informativi. Il numero di transizioni (111) è risultato più alto delle trasversioni (16): 79 T-C e 32 A-G, contro 6 G-T, 3 T-A, 3 C-A ed 4 G-C. Il rapporto tra transizioni e trasversioni (r) è di 10.966. Questo risultato rispecchia quello che si riscontra normalmente in natura, dal momento che le transizioni sono delle sostituzioni meno radicali delle trasversioni e non disturbano eccessivamente la conformazione spaziale della proteina.

<i>Mutazione Nucleotidica</i>	<i>Posizione nella sequenza</i>	<i>Posizione nel codone</i>	<i>Mutazione amminoacidica</i>	<i>Numero individui</i>
G -> A (Ti)	19° bp	1°	V -> M	153/1 (8TN)
C -> A (Tv)	88° bp	1°	L -> M	96/58
A -> G (Ti)	220° bp	1°	I -> V	153/1 (8TU)
A -> G (Ti)	331° bp	1°	T -> A	152/2 (6AS-9TN)
G -> C (Tv)	448° bp	1°	V -> L	153/1 (10BRV)
T -> G (Tv)	500° bp	2°	V -> G	153/1 (9IS)
C -> G (Tv)	600° bp	3°	I ->M	153/1 (7TN)

Tab. XIV: le 7 mutazioni nucleotidiche che danno 7 aminoacidi diversi, riscontrati nelle sequenze della mtCOI del *Brachidontes pharaonis* nel Mar Mediterraneo. [Ti= transizioni; Tv= trasversioni; V= valina, M= metionina, L= leucina, T= treonina, A= alanina, V= valina, G=glicina, I= isoleucina; TU= Turchia, AS= , TN= Torre Normanna, BRV= Vendicari, IS= Tel Aviv].

	<i>N° individui</i>	<i>N° aplotipi</i>	<i>Diversità Aplotipica (h)</i>	<i>Diversità Nucleotidica (π)</i>	<i>N° Siti Polimorfici in totale/Siti Polimorfici che segregano</i>
Italia	97	61	0.980	0.03826	99/96
Israele	37	32	0.992	0.03679	77/75
Turchia	9	9	1	0.04360	55/55
Egitto	11	11	1	0.02821	57/56
MM	143	93	0.985	0.03812	124/116
MM+MR	154	102	0.986	0.03768	130/121
Tel Aviv	16	14	0.983	0.04106	57/56
Ashkelon	8	8	1	0.03693	57/56
Caesarea	9	9	1	0.03317	55/55
Palmahim	2	2	1	0.07282	45/45
Termini Imerese	28	18	0.968	0.04010	59/58
Saline di Marsala	27	13	0.937	0.03780	52/52
Torre Normanna	25	21	0.980	0.04146	73/71
Vendicari	8	8	1	0.02144	49/49
Capo d'Orlando	9	9	1	0.02346	56/56

Tab. XV: Variabilità genetica di *Brachidontes pharaonis-variabilis* osservata per il gene mitocondriale COI nel Mar Mediterraneo.

La tabella XV sintetizza come la variabilità genetica del *Brachidontes pharaonis-variabilis* dell'area mediterranea si distribuisce all'interno dei campioni, riportando i valori di numero di aplotipi e di diversità aplotipica, diversità nucleotidica. A parte i casi di diversità aplotipica pari ad uno (probabilmente dovuto al basso numero di campioni), la variabilità di questo gene resta comunque alta.

È stata calcolata la distanza nucleotidica tra le stazioni (Tab. XVI) e tra le due Forme mitocondriali del COI, in cui valore medio di distanza tra le due forme corrisponde in percentuale a 0.080.

	<i>Israele</i>	<i>Italia</i>	<i>Turchia</i>
<i>Italia</i>	0.040		
<i>Turchia</i>	0.044	0.043	
<i>Egitto</i>	0.035	0.038	0.045

Tab. XVI: Valori medi di distanza nucleotidica riferiti alle stazioni

Le mutazioni sono quasi tutte sinonime tranne 7 che danno luogo ad aminoacidi diversi. Cinque dei cambiamenti aminoacidici si sono riscontrati solo in individui singoli, una è riscontrata in due individui, mentre la mutazione nucleotidica della citosina in adenina (88° bp) era presente in molti individui, così che ogni popolazione presentava, come 30° aminoacido, una leucina o una metionina. Il grado di divergenza nucleotidica tra le due forme mitocondriali M e L (chiamate così dall'iniziale dell'aminoacido che presentavano) è 8 % mentre la forma L ha una differenza nucleotidica del 0.6 % e la forma M del 0.5 %. I valori di polimorfismo tra le due forme e all'interno di esse si avvicinano a quelli trovati nei bivalvi (9-10%; Fisher & Skibiniski, 1990). La separazione degli individui nei due gruppi non è correlabile a una distribuzione geografica. Osservando la distribuzione aplotipica si evidenzia che quasi tutte le popolazioni presentano un aplotipo comune che individua la forma M, mentre in tutte le popolazioni numerosi sono gli aplotipi unici, cioè presenti in singoli individui (Tab. XVII). In ogni popolazione è presente perciò un alto numero di aplotipi che si differenziano per un basso numero di mutazioni nucleotidiche.

	<i>N° individui Italia</i>	<i>N° individui Israele</i>	<i>N° individui Turchia</i>	<i>N° individui Egitto</i>	<i>N° individui totale</i>
<i>Forma_M</i>	12	39	5	2	58
<i>Forma_L</i>	25	58	4	9	96

Tab. XVII: Numero di individui per popolazione appartenenti alle 2 forme.

Sono stati, poi, ricavati degli alberi filogenetici delle 154 sequenze di *Brachidontes pharaonis-variabilis* e due sequenze di *Brachidontes rostratus*, utilizzando diversi metodi *Neighbor-Joining* (NJ), *Maximum Likelihood* (ML), con il modello di sostituzione nucleotidica “K2P” e *Maximum Parsimony* (MP), sono stati costruiti gli alberi. Su tutti gli alberi NJ e ML è stata eseguita l’analisi *bootstrap* (con 1000 repliche), per verificare la solidità dei nodi. Il risultato presenta una netta biforcazione all’interno dei campioni dell’area Mediterraneo-Mar Rosso senza nessun raggruppamento geografico (Fig. 27-28).

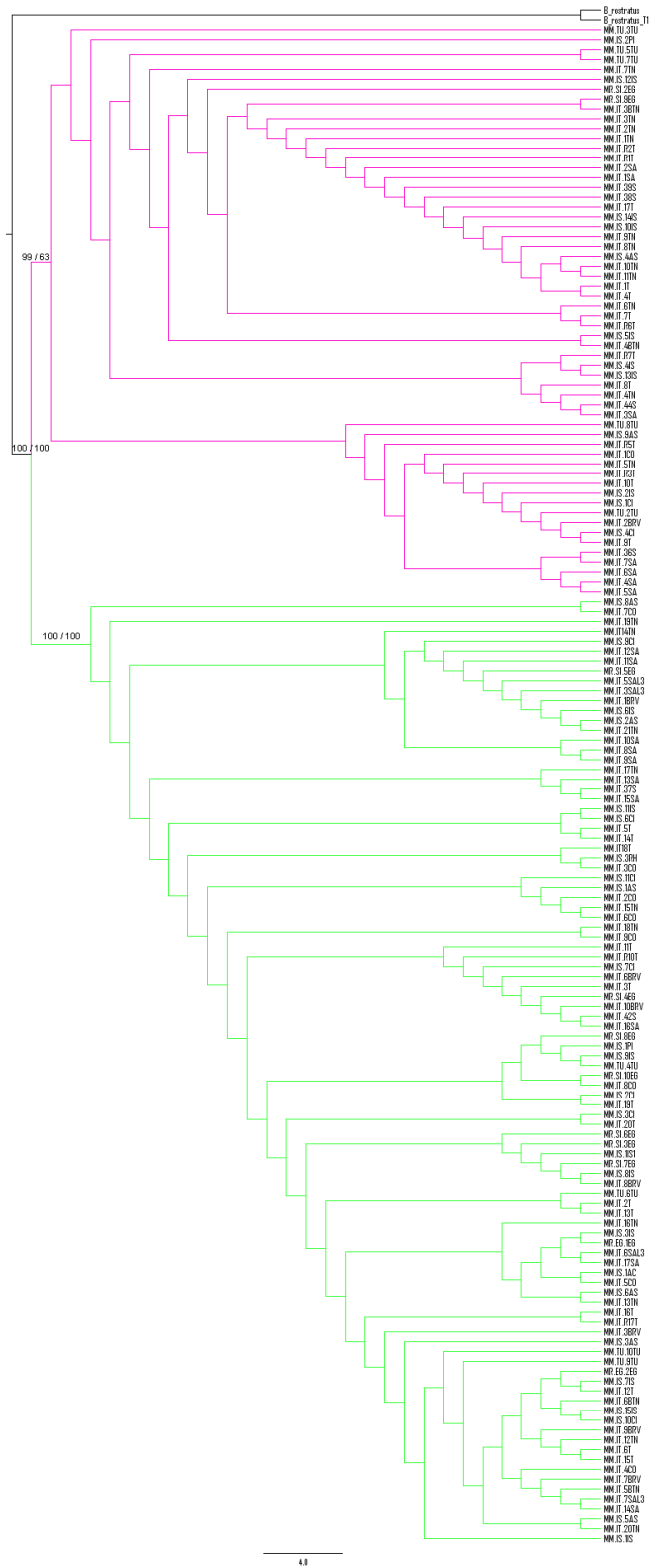


Fig. 27: Alberi NJ (K2P), ML (K2P) su un segmento COI di 618 bp per gli individui della macroarea Mar Mediterraneo-Mar Rosso. Sui nodi principali sono riportati i valori di *bootstrap* basati su 1,000 repliche per NJ/ML. In Rosa sono selezionati gli individui appartenenti alla Forma M, mentre in verde gli individui appartenenti alla Forma L.

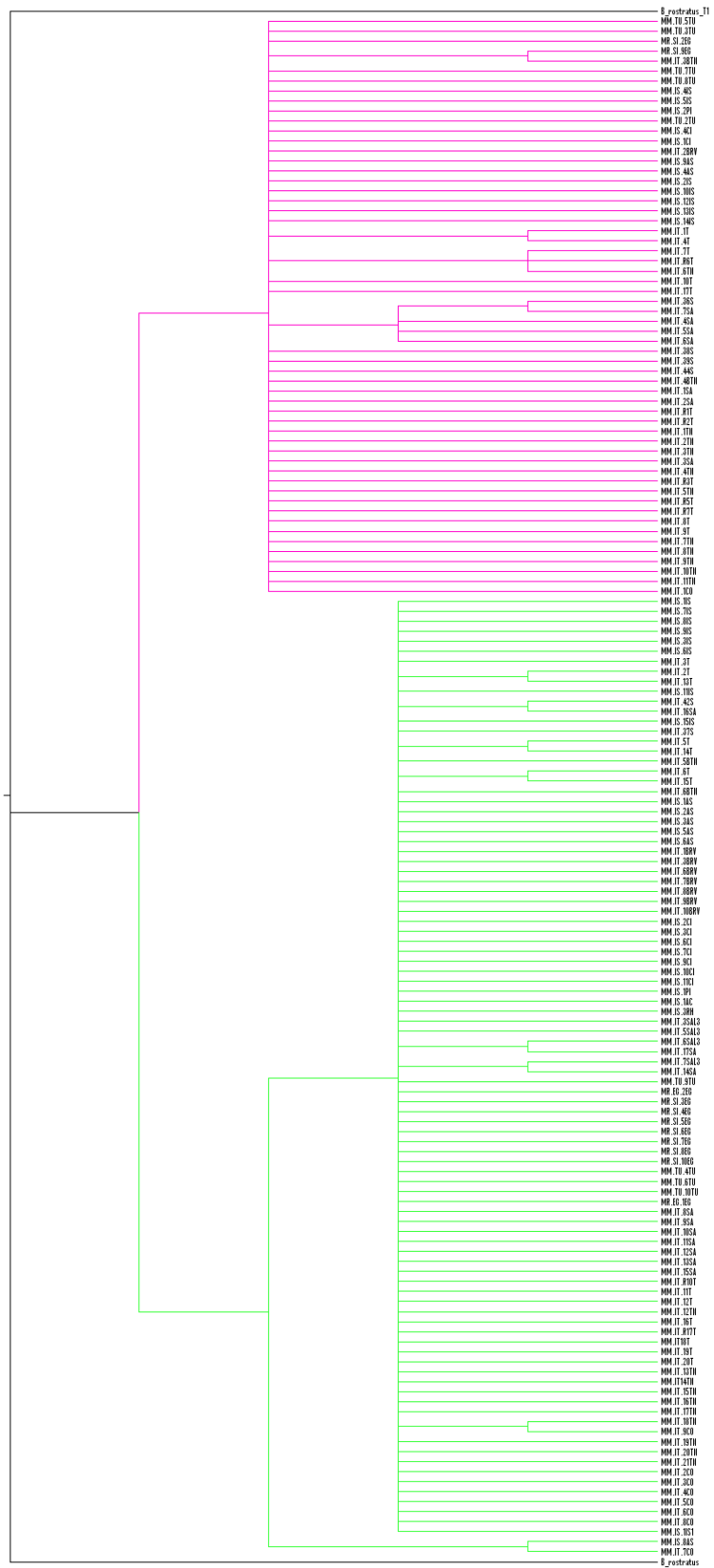


Fig. 28: Albero 50 % “majority-rule consensus” di 1031908 alberi egualmente parsimoniosi sul segmento COI di 618 bp per gli individui della macroarea Mediterranea.

Infine è stato prodotto l'albero del Minimum Spanning Network (Fig. 29), disegnato con il software Network sulla base del minimo numero di sostituzioni che legano tra loro i 102 aplotipi della COI nel Mediterraneo. La rete ottenuta mostra la separazione tra le due forme di COI, L e M, per 39 mutazioni; mentre all'interno di esse si possono notare pochi aplotipi comuni con una forma a stella poiché molti aplotipi unici sono connessi ad essi per pochissime sostituzioni. Dalla rete si vede che anche se il numero di aplotipi è molto alto, la divergenza tra le sequenze degli aplotipi è bassa.

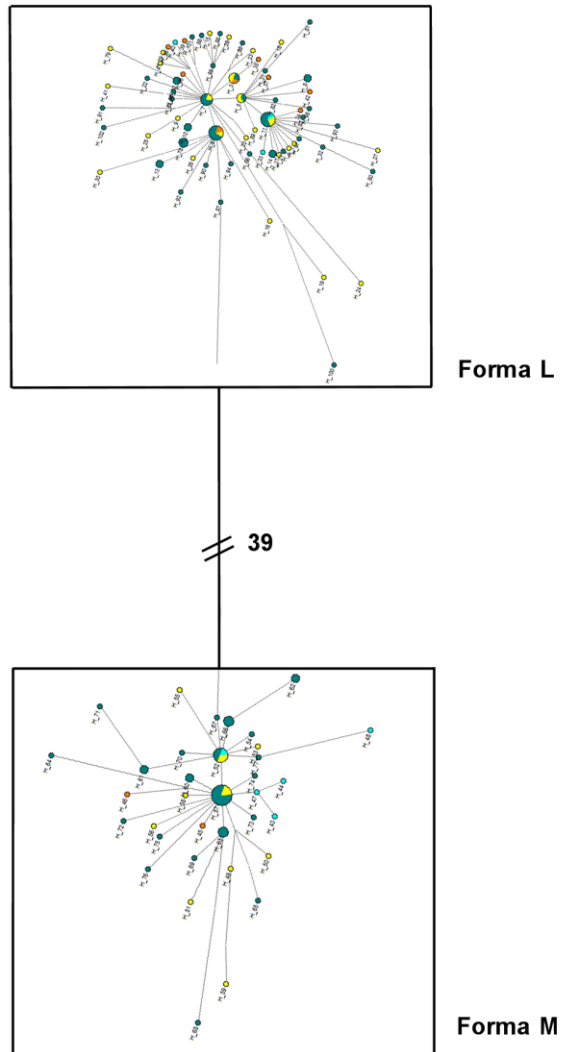


Fig. 29: Minimum Spanning Network delle relazioni filogenetiche tra tutti gli aplotipi trovati nel *Brachidontes pharaonis-variabilis* nel Mar Mediterraneo e nel Mar Rosso. I cerchi rappresentano gli aplotipi; il diametro dei cerchi è proporzionale alla frequenza. I cerchi più piccoli rappresentano singoli individui. Gli aplotipi (cerchi) sono collegati in base al minor numero di sostituzioni; le barre verticali sono proporzionali al numero di sostituzioni che separano due aplotipi. La forma mitocondriale L ed M sono circondate da una linea piena.

3.3 Risultati di Morfometria Geometrica

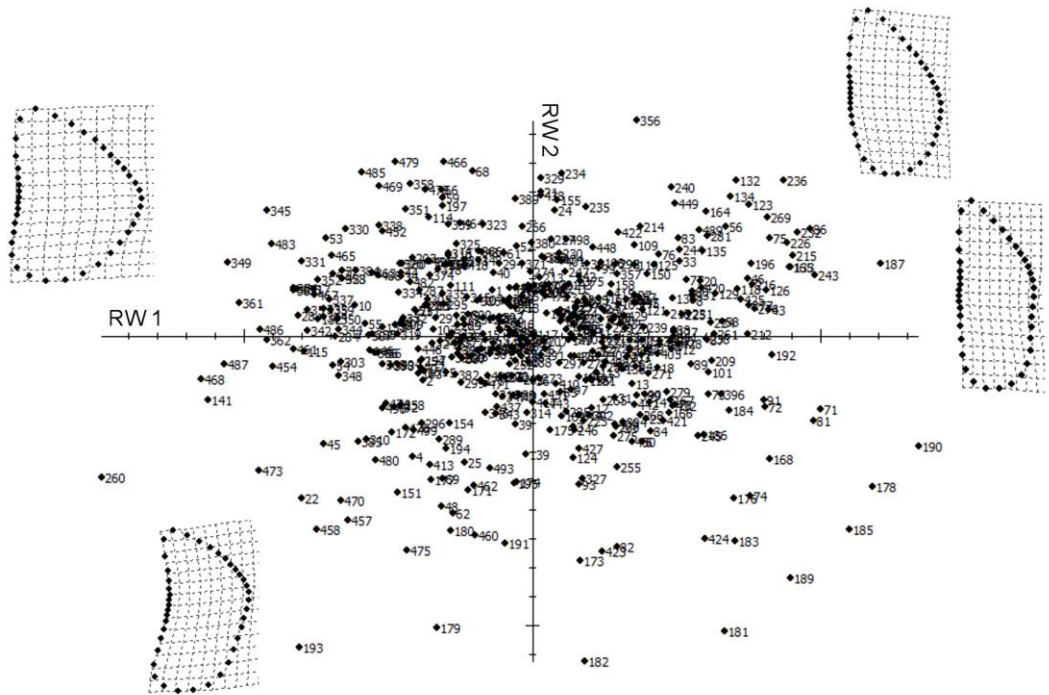
3.3.1 Mar Mediterraneo-Mar Rosso, Oceano Indiano e Oceano Pacifico

L'analisi morfologica, mediante l'approccio con la morfometria geometrica, è stata effettuata, inizialmente, su un set di 500 campioni di cui 415 dall'area Mar Mediterraneo-Mar Rosso, 8 dall'Oceano Indiano e 77 dall'Oceano Pacifico. A questi campioni, poi, sono stati aggiunti 13 individui di *Brachidontes rostratus* provenienti dall'Australia.

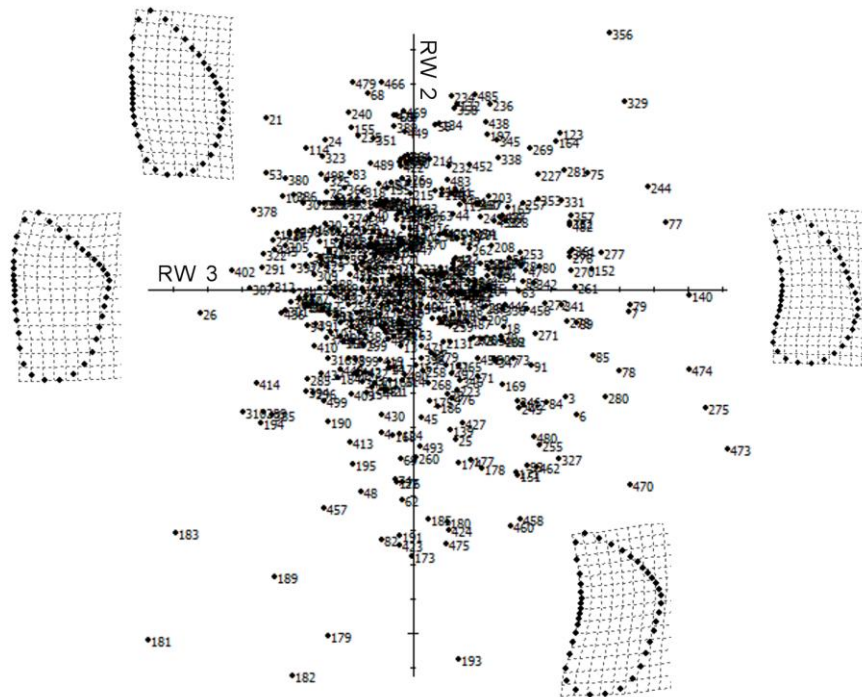
L'analisi "Relative Warps" (RWA) dei campioni del sistema *Brachidontes pharaonis-variabilis* senza l'inclusione degli individui di *Brachidontes rostratus*, ha evidenziato che il primo *relative warp scores* (RW1) mostra una varianza di circa il 48.24 %, il secondo (RW2) di circa il 18.78 % e il terzo *relative warp scores* (RW3) di circa 14.39 %, sommando si ha una varianza cumulativa di circa 81.41 %.

L'RWA ci da informazioni, tramite le griglie di deformazione, sulle variazioni reali di forma che avvengono principalmente sulla larghezza della valva, sul margine ventrale e sul margine antero-dorsale. Sulla base di questi caratteri diremo che le valve dell'area geografica Mar Mediterraneo-Mar Rosso, con una maggiore varianza di forma rispetto le altre, tendenzialmente si presentano più larghe e con il margine antero-dorsale più angolato; le valve dell'area geografica dell'Oceano Indiano sono tendenzialmente larghe e con poca curvatura del margine ventrale e che le valve dell'Oceano Pacifico sono allungate e con il margine antero-dorsale poco angolato (Fig. 30). Questa analisi è stata confermata tramite l'analisi delle componenti principali (PCA).

In seguito è stato fatto un raggruppamento degli individui studiati, in accordo con le aree geografiche di appartenenza, che dovrebbero individuare i tre distinti cladi riconosciuti con le analisi molecolari. I raggruppamenti imposti sono stati utilizzati nel preformare l'analisi canonica variata (CVA) che mostra una varianza cumulativa per i primi due assi del 100% ($p > 0.001$) (Fig. 31). Per confermare l'esattezza dei raggruppamenti è stata poi effettuata l'analisi della funzione discriminante (DFA) che conferma la separazione dei raggruppamenti imposti come mostrato in figura 32.



a)



b)

Fig. 30: a) Scatterplots dei primi due *relative warps scores* ottenuta dalla *Relative Warp Analysis* (RWA) della forma delle strutture morfologiche esterne. b) Scatterplots ottenuto dal secondo *relative warps scores* rispetto al terzo *relative warps scores*. I grafici risultano dall'analisi della forma della conchiglia e mostrano le griglie di deformazione relative agli assi.

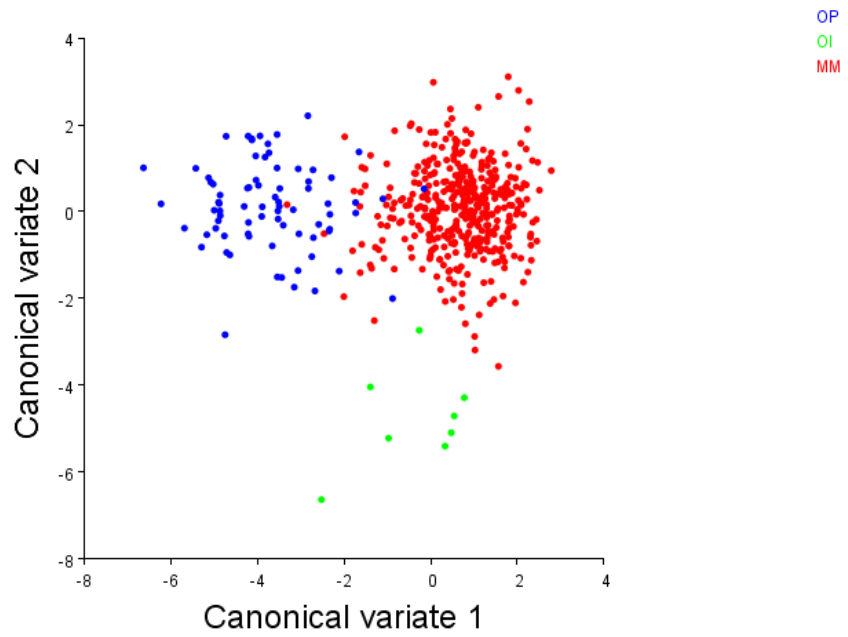


Fig. 31: La CVA mostra una varianza cumulativa del 100% ($p < 0.0001$); MM individua il clade Mar Mediterraneo-Mar Rosso (Rosso), OI il clade dell'Oceano Indiano (Verde), OP il clade dell'Oceano Pacifico (Blu).

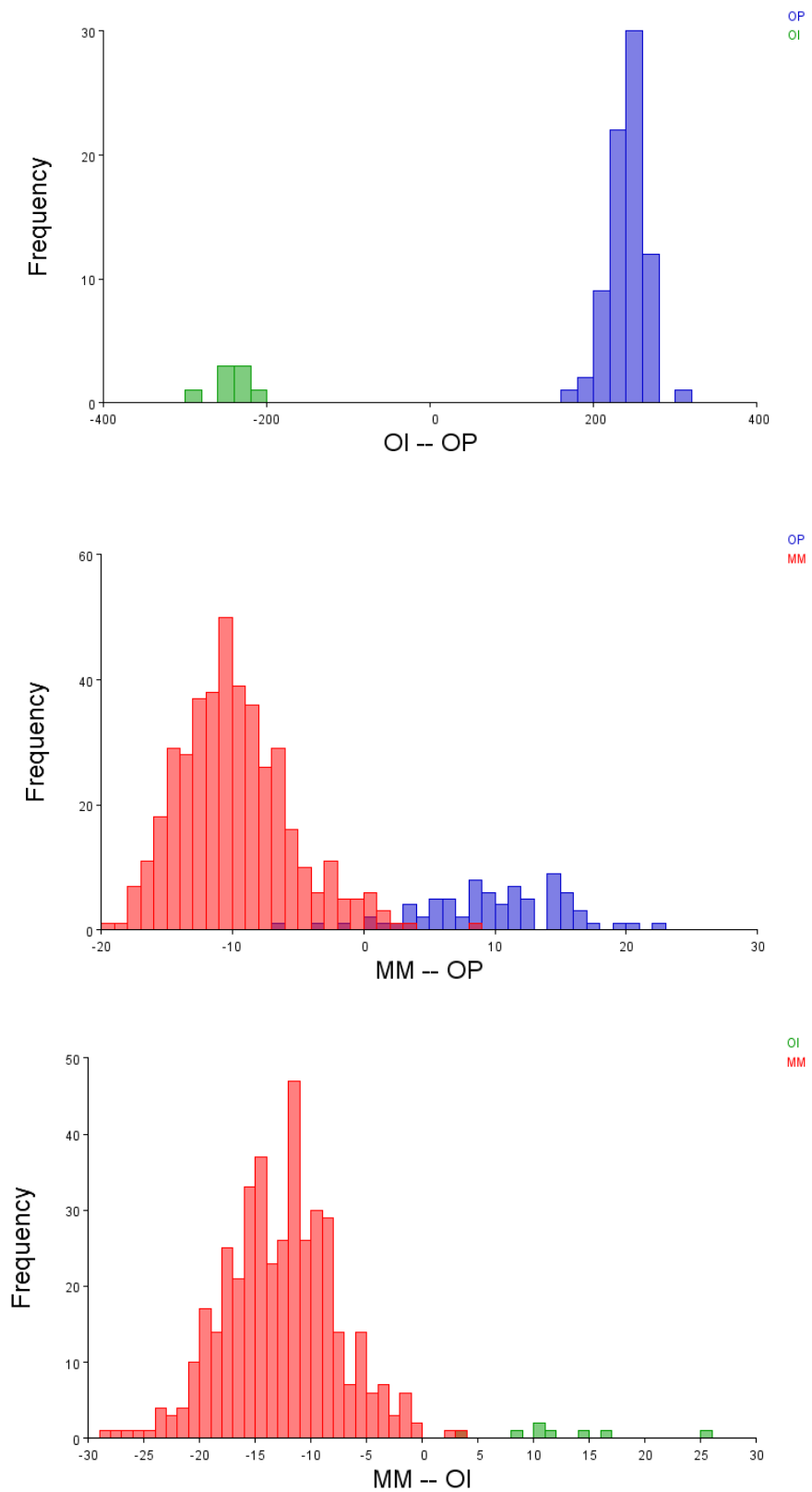


Fig. 32: Analisi delle funzioni discriminanti (DFA) tra cladi (MM, Mar Mediterraneo-MarRosso; OI, Oceano Indiano; OP, Oceano Pacifico).

Successivamente sono stati inseriti nel dataset da analizzare 13 individui appartenenti alla specie *Brachidontes rostratus*. Con l'RWA si riscontrano percentuali di varianza simili all'analisi precedente, inoltre gli individui di *B. rostratus*, all'esame dei reticoli di deformazione, si mostrano tendenzialmente con una forma della valva più larga e con il margine ventrale retto. Successivamente è stata fatta un'analisi canonica variata (CVA), anche qui, i primi tre raggruppamenti imposti raccolgono gli individui secondo l'appartenenza geografica alle aree corrispondenti all'areale di distribuzione dei 3 cladi, il quarto raggruppamento contiene gli individui appartenenti al *B. rostratus*. La varianza cumulativa nel grafico CVA a due assi è ancora circa del 100% ($p > 0.001$) (Fig. 33). Inoltre in tabella XVIII è stata riportata la matrice delle distanze di *Procrustes*, riconosciute come altamente significative ($p > 0.0001$). Si è proceduto, poi, all'DFA tra i singoli cladi e gli individui appartenenti al raggruppamento di *Brachidontes rostratus* come si vede in figura 34. Infine si è ottenuto un dendrogramma, costruito usando la matrice delle distanze morfometriche (distanze di *Procrustes*) e l'UPGMA (vedi Materiali e Metodi) che mostra le relazioni fenetiche (Fig. 35).

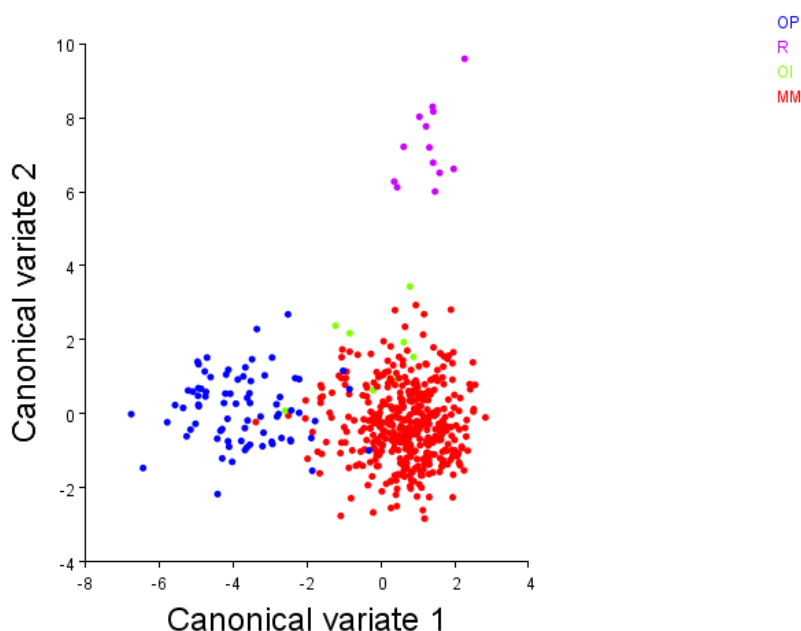


Fig. 33: La CVA mostra una varianza cumulativa del 100% ($p < 0.0001$); MM, individua il clade Mar Mediterraneo-Mar Rosso (Rosso), OI, il clade dell'Oceano Indiano (Verde), OP il clade dell'Oceano Pacifico (Blu) e R, la specie *Brachidontes rostratus* (Viola).

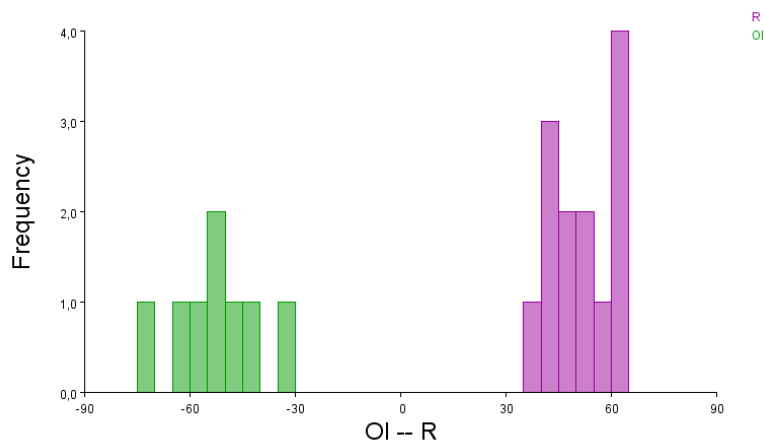
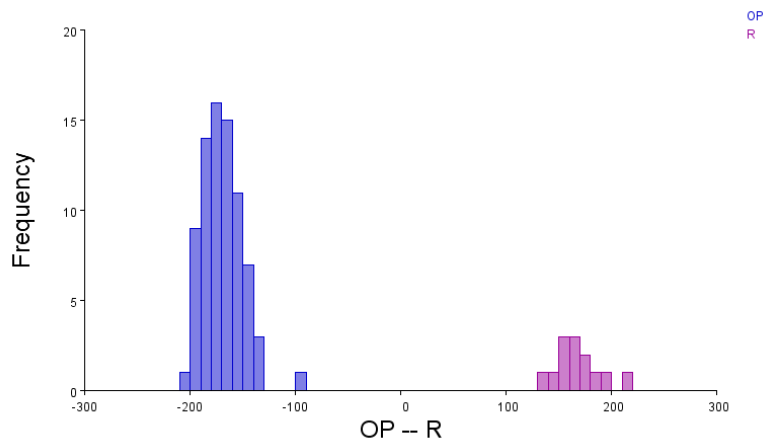
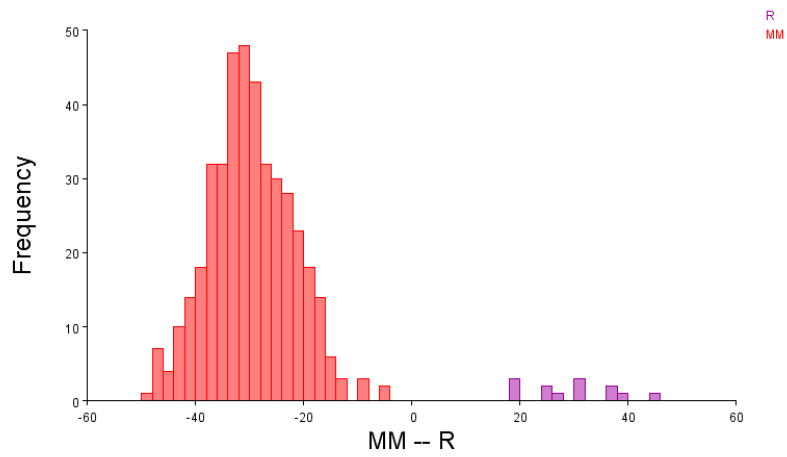


Fig. 34: Analisi delle funzioni discriminanti (DFA) tra ogni clade e il *Brachidontes rostratus*.

	<i>MM</i>	<i>OI</i>	<i>OP</i>
<i>OI</i>	0.0420		
<i>OP</i>	0.0644	0.0910	
<i>BR</i>	0.0931	0.0705	0.1309

Tab. XVIII: Matrice di distanze *Procrustes*: *MM*, individua il clade Mar Mediterraneo-Mar Rosso, *OI*, il clade dell'Oceano Indiano, *OP*, il clade dell'Oceano Pacifico e *BR* la specie *Brachidontes rostratus*

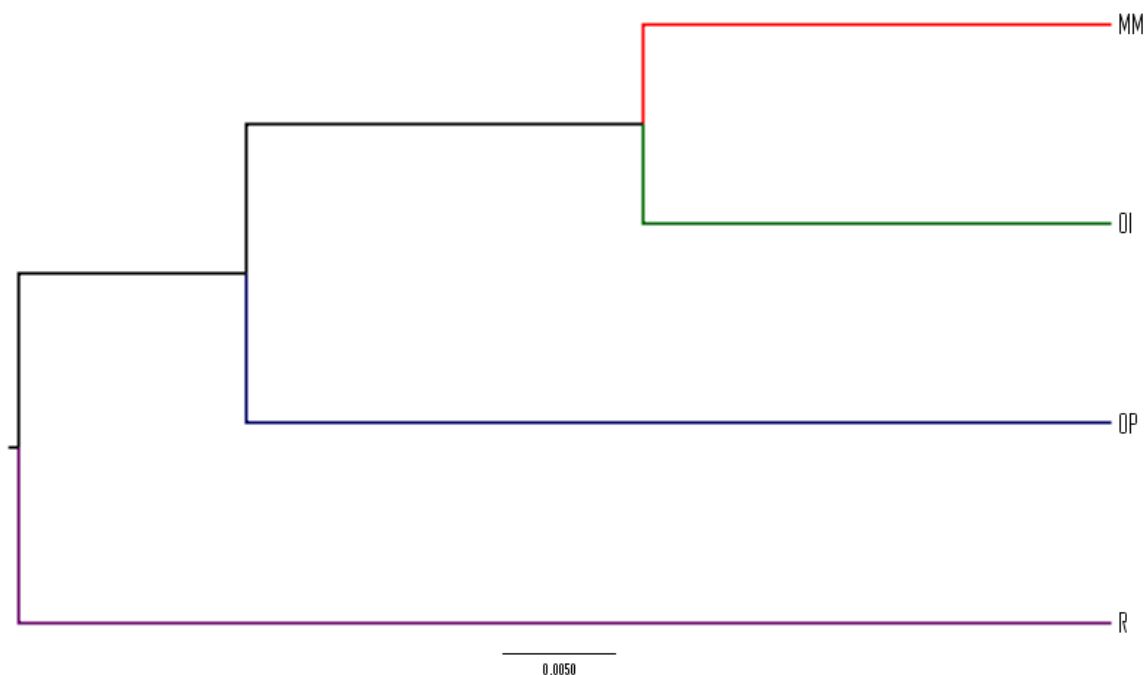


Fig. 35: UPGMA Dendrogramma ottenuto in funzione delle distanze morfometriche (*Procrustes*, UPGMA) (*MM*, Mar Mediterraneo-Mar Rosso; *OI*, Oceano Indiano; *OP*, Oceano Pacifico).

3.3.2 Mar Mediterraneo-Mar Rosso

Anche per esaminare le caratteristiche dei 415 individui del Mar Mediterraneo-Mar Rosso sono stati mantenuti gli stessi *landmark* e *semi-landmarks* poiché l'indagine verteva all'individuazione di forme diverse all'interno di questo sottogruppo.

In relazione alle analisi *Relative Warps*, abbiamo verificato che il primo *relative warp scores* (RW1) esprime circa il 45.88% di varianza, il secondo (RW2) circa il 19.78% e il terzo (RW3) circa il 14.98%, sommandoli si ha l'80.64% di varianza espressa (Fig. 36). Le griglie di deformazione del *thin-plate spline* mostrate in figura 36 a-b rappresentano le forme più estreme, relative agli assi, in questo trend di variazione. Il primo *relative warp scores* distingueva gli individui per la variazione nella larghezza della conchiglia, il secondo distingueva gli individui per la variazione nel margine ventrale più o meno cospicuamente concavo, mentre il terzo *relative warp scores* distingueva per la variazione nel margine antero-dorsale che può essere curvo o angolato (come visto nell'analisi relativa ai 3 cladi). L'analisi *Relative Warp* rivela l'assenza di un chiaro raggruppamento in entrambi i grafici (RWs1-2 / RWs 2-3). L'assenza di un chiaro raggruppamento è anche stata mostrata nell'analisi delle componenti principali (PCA). Anche se non c'è un chiaro raggruppamento, è chiaro che la forma della conchiglia degli individui egiziani, oltre a essere più larga, ha un margine ventrale concavo e un margine antero-dorsale angolato.

In seguito è stato impostato un raggruppamento degli individui studiati in accordo ai loro siti di raccolta. I gruppi erano stati creati in accordo con la posizione geografica e suddivisi in 4 macroaree: Italia (ITA), Turchia (TU), Israele (IS), Egitto (EG). La CVA mostrava una varianza cumulativa nei primi 2 assi di circa il 90.75% ($p > 0.001$). Nel grafico CVA, 2 gruppi possono essere chiaramente distinti (Fig. 37). Il primo gruppo include gli individui del Mar Mediterraneo [ITA-TU-IS], mentre il secondo gruppo include gli individui del Mar Rosso [EG]. Infine è stata fatta DFA tra le popolazioni mediterranee e tra queste e la popolazione del Mar Rosso, come si può vedere da i grafici in figura 38-39.

Un dendrogramma UPGMA era stato costruito usando la matrice delle distanze metriche di *Procrustes* (Tab. XIX) ed è stata valutata la relazione fenetica (Fig. 40),

essa era congruente con il pattern mostrato nella CVA, dove il raggruppamento degli individui dell'Egitto risulta morfologicamente differente.

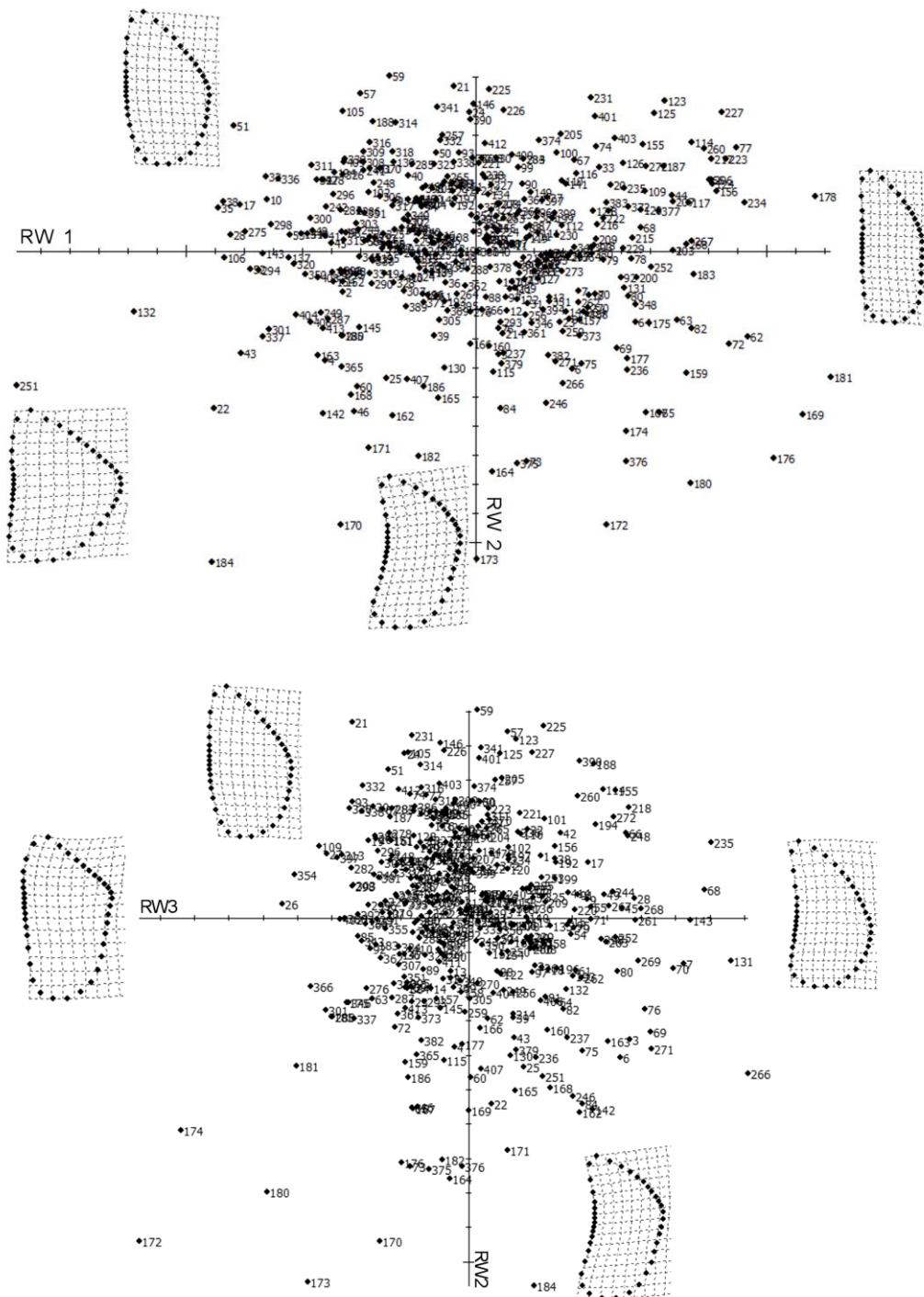


Fig. 36: a) Scatterplots dei primi due *relative warps scores* ottenuta dalla *Relative Warp Analysis* (RWA) della forma delle strutture morfologiche esterne. b) Scatterplots ottenuto dal secondo *relative warps scores* rispetto al terzo *relative warps scores*. I grafici risultano dall'analisi della forma della conchiglia e mostrano le griglie di deformazione relative agli assi.

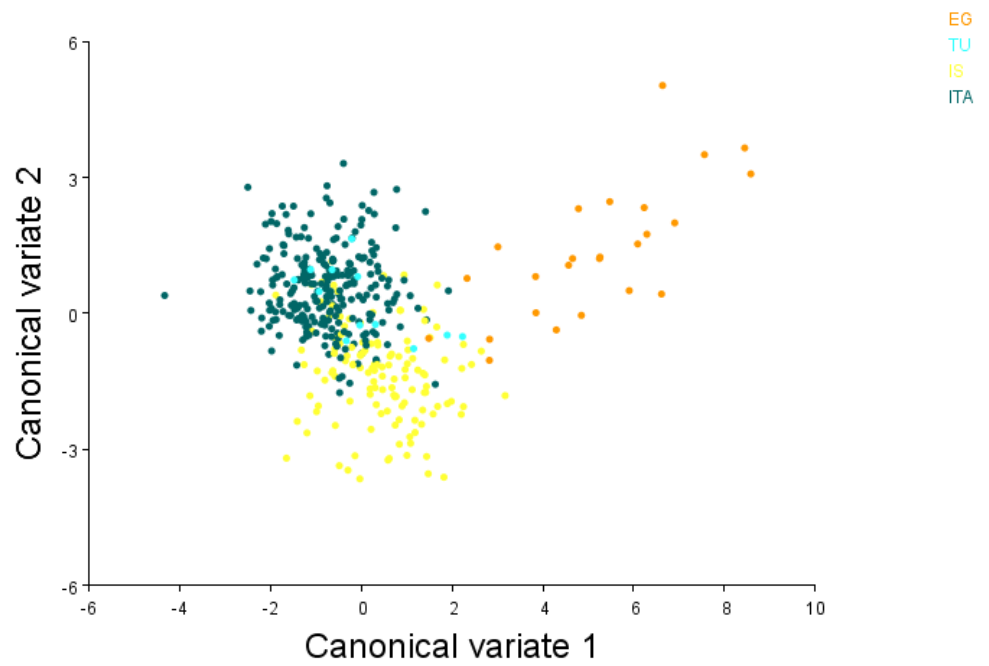


Fig. 37: Analisi canonica variata (CVA), grafico della canonica variata 1 contro 2. Il grafico risultante dall'analisi della forma della conchiglia in relazione ai siti: Italia (ITA); Turchia (TU); Israele (IS) and Egitto (EG).

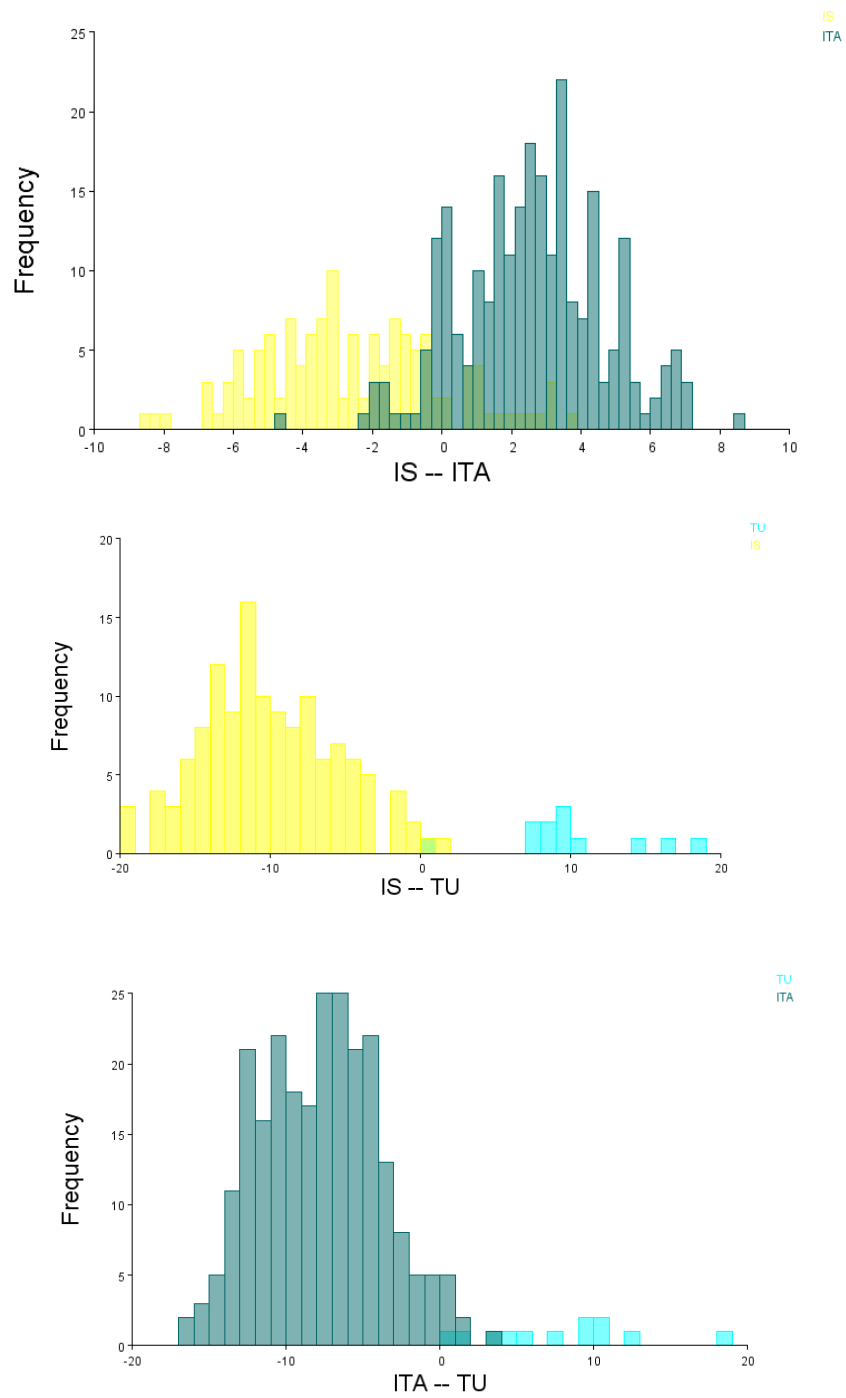


Fig. 38: Analisi delle funzioni discriminanti (DFA) tra le popolazioni del Mar Mediterraneo (ITA, Italia; TU, Turchia; IS, Israele).

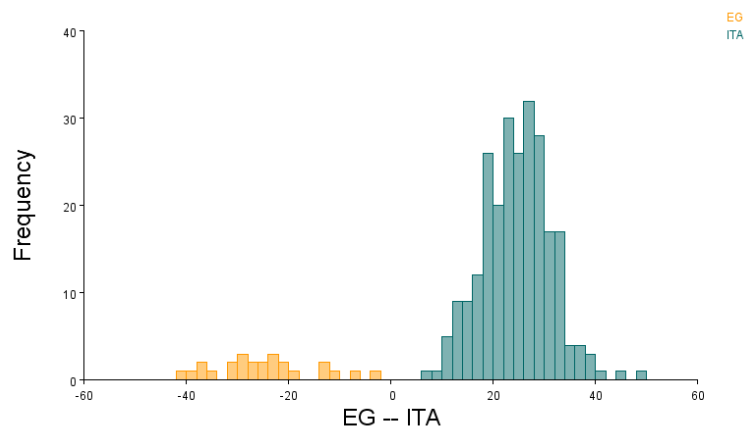
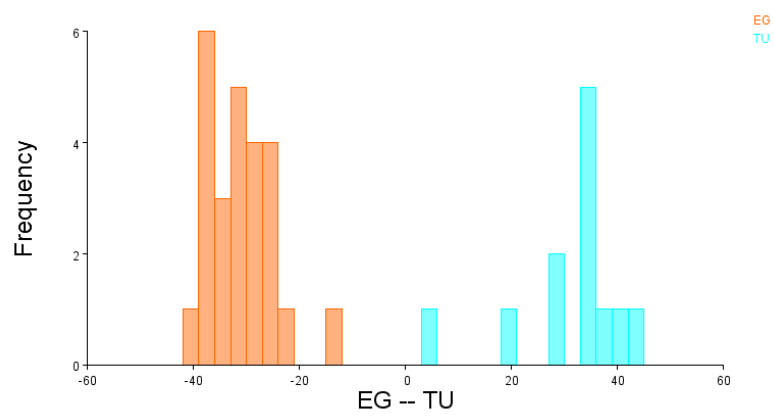
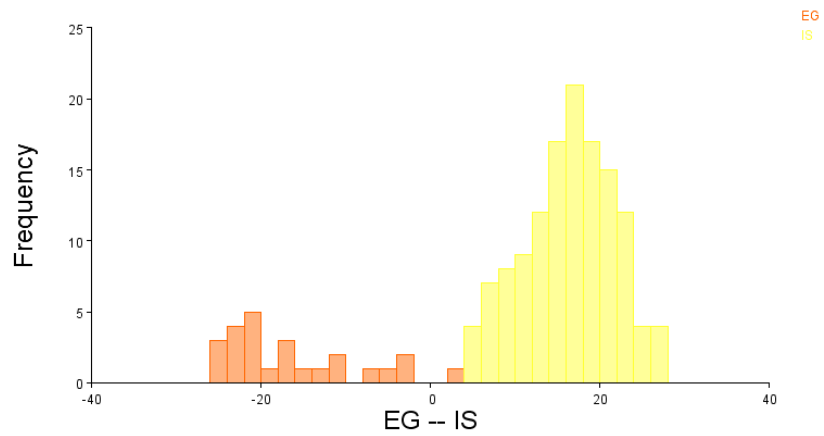


Fig. 39: Analisi delle funzioni discriminanti (DFA) tra la popolazione del Mar Rosso (EG, Egitto) e le popolazioni del Mar Mediterraneo (ITA, Italia; TU, Turchia; IS, Israele).

	<i>EG</i>	<i>IS</i>	<i>ITA</i>
<i>IS</i>	0.0662		
<i>ITA</i>	0.0643	0.0264	
<i>TU</i>	0.0698	0.0249	0.0305

Tab. XIX: Matrice di distanze *Procrustes*: EG (Egitto), IS (Israele), ITA (Italia) e TU (Turchia).

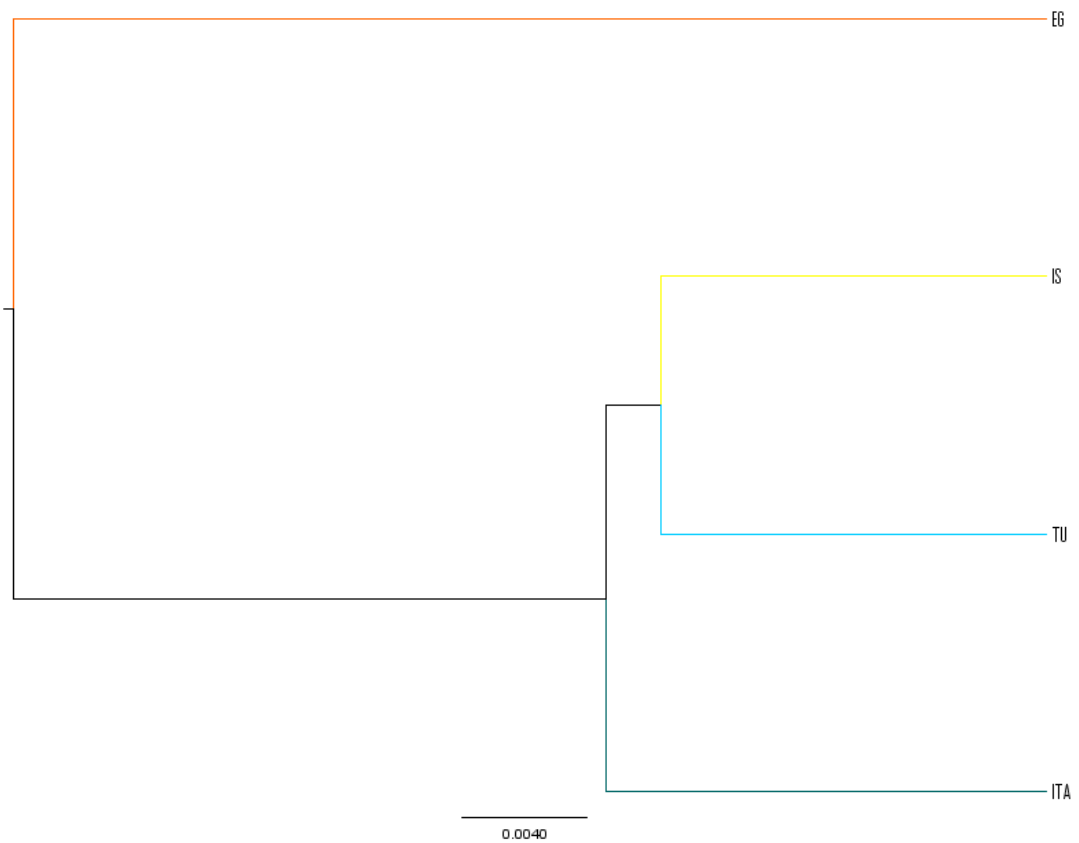


Fig. 40: UPGMA Dendrogramma ottenuto in funzione delle distanze morfometriche (*Procrustes*, UPGMA) (IS, Israele; TU, Turchia; ITA, Italia; EG, Egitto).

CAPITOLO 4

Discussioni e Conclusioni

L'analisi condotta sugli individui di *Brachidontes variabilis* s.l. provenienti da tutta l'area di distribuzione (Oceano Pacifico, Oceano Indiano e Mar Mediterraneo-Mar Rosso), evidenzia che non si può parlare di un'unica specie come si è fatto sino ad ora.

Al fine di investigare sulla strutturazione della specie sono state utilizzate ricostruzioni filogenetiche basate sulla morfometria, sul nDNA (28S e ITS) e sul mtDNA (COI e 16S). Le ricostruzioni, sia molecolari sia morfometriche, mostrano una topologia congruente: il *Brachidontes variabilis* s.l., è composto da almeno 3 entità a distribuzione mediterraneo-pacifica. Sembra quindi che all'interno del *Brachidontes variabilis*, specie presunta monotipica, siano presenti tre linee evolutive (cladi) ben caratterizzate.

Significative conclusioni si hanno attraverso l'analisi morfometrica della forma; tre taxa si possono effettivamente trovare all'interno dell'intero dataset esaminato. La variabilità morfologica nel complesso di specie *Brachidontes "pharaonis-variabilis"* è stata largamente sottostimata poiché considerava la specie unica ed altamente plastica. Le analisi morfometriche, supportate da test statistici significativi, hanno apportato nuovi dati relativi alla descrizione della forma di questo complex permettendo una discriminazione delle tre macroaree studiate e in accordo con la divisione in tre cladi ottenuta con le analisi molecolari. Quindi, le caratteristiche qualitative identificano il *Brachidontes variabilis* s.l. come un insieme di specie criptiche, già preliminarmente ipotizzato da Sirna Terranova et al. 2007. L'analisi della funzione discriminante (DFA) ha reso ulteriormente evidenziabile la separazione dei 3 raggruppamenti, in cui la leggera sovrapposizione dei campioni dell'area Mediterranea con quelli degli altri raggruppamenti è solo dovuta al numero di individui esaminati e dal fatto di ricoprire un vasto range geografico ed ambientale. L'aggiunta nell'analisi degli individui di *Brachidontes rostratus* ha permesso di esaminare e meglio valutare i valori di discriminazione tramite l'osservazione delle distanze *Procrustes*, che presentano valori abbastanza alti e significativi. Nell'DFA tra i singoli cladi e gli individui di

Brachidontes rostratus vi è una alta separazione, questo mostra che il confronto fenetico continua a confermare e a essere proporzionale alle distanze genetiche. Dai valori delle distanze *Procrustes* si giunge alla rappresentazione grafica del dendrogramma che rispecchia perfettamente, con le relazioni fenetiche, i rapporti filogenetici riscontrati con i dati molecolari.

La divergenza nucleotidica tra le tre linee di *Brachidontes* per i marcatori nucleari varia tra 0.4 % e 1.1 % nel 28S e tra 9.9 % e 14 % nel ITS. Il marcatore nrITS è stato utilizzato in molti altri lavori sui bivalvi, in cui, all'interno delle specie esaminate, sono state riconosciute delle linee indipendenti; ad esempio nel lavoro di Jun Liu et al., (2011) si riporta un valore di diversità genetica tra le 5 linee interne alla specie *Atrina pectinata* corrisponde a valori compresi tra 3.7 % e 30.3 %. Questo range permette di collocare all'interno i nostri valori ritenendo valida la percentuale per una separazione in cladi di rango specifico. Anche i dati ottenuti per il 28S, che presentano una diversità genetica tra 0.4 e 1.1 %, sono vicini ai valori calcolati tra *Crassostrea gigas* e *Crassostrea nippona* (Boudry, 2003), che risultano compresi tra 1.2 e 1.6 %; quindi, i dati nDNA supportano una reale separazione in 3 entità separate.

Per i marcatori mitocondriali la divergenza interspecifica calcolata sui nostri tre cladi era compresa tra 15.7 % e 19.23 % per la COI e tra il 12.2 % e il 15.6 % per il 16S e, in base a questi valori, possiamo dire che essi non si discostano molto da quelli riportati in letteratura che risultano del 24% e del 21% rispettivamente per la COI e per il 16S.

Al fine di verificare se i cladi intraspecifici individuati all'interno di *Brachidontes variabilis* costituiscono delle linee evolutive monofiletiche evolventi indipendentemente è stata applicata la “4x rules” (Birky et al., 2005; Birky & Barraclough, 2010; Birky et al., 2010). La “4x rule” si basa sull'idea che una linea evolutiva monofiletica raggiunge lo status di “specie indipendente” quando le differenze molecolari con il suo ‘sister lineage’ sono troppo grandi per essere attribuite semplicemente a fenomeni casuali di deriva genetica.

I geni mitocondriali diventano reciprocamente monofiletici prima dei geni nucleari, dando così la più precoce evidenza di un evento di speciazione allopatrica (Palumbi et

al., 2001; Birky et al., 2010); per questo si è proceduto all'applicazione della "4x rule", sul gene mitocondriale COI.

Il test della "4x rule" ha dato un esito coerente, mostrando come i tre cladi erano effettivamente delle linee evolutive monofiletiche e reciprocamente indipendenti, le cui differenze non possono essere spiegate da fenomeni di deriva casuale.

In seguito utilizzando il tasso evolutivo, che convenzionalmente viene applicato ai valori di divergenza genetica di geni mitocondriali (2% di divergenza per milione di anni), si sono ricavati tempi di divergenza corrispondenti a 6–9 milioni di anni tra i cladi dell'Oceano Indiano e dell'Oceano Pacifico, e a 6.5–7.5 milioni di anni tra il clade del Mar Rosso e quello dell'Oceano Indiano.

Le tre linee evolutive sembrano essersi separate durante il Miocene a partire da una unica specie a distribuzione Indo-pacifica. La teoria proposta da Sirna Terranova, convalidata da queste ulteriori analisi, propone che il continente asiatico e l'Australia crearono una restrizione dell'area marina tra il Pacifico nord-orientale e l'Oceano Indiano sud-occidentale, dando luogo a quella che viene chiamata "Zona di Wallace" determinando, così, una separazione della originaria popolazione Indo-pacifica in due popolazioni separate. Inoltre, alcuni propaguli delle popolazioni dell'Oceano Indiano avrebbero poi colonizzato il Mare Rosso. È probabile che le fluttuazioni del livello del mare causate dai cicli di glaciazione abbiano isolato il Mare Rosso dall'Oceano Indiano. Questo sarebbe accaduto in corrispondenza di Bab el-Mandeb, una piattaforma stretta e poco profonda tra il Mare Rosso ed il Golfo di Aden. Infine l'apertura del canale di Suez avrebbe permesso agli individui del Mar Rosso la colonizzazione del Mar Mediterraneo.

Tutte le linee di evidenza sono quindi compatibili con l'individuazione di tre cladi di rango specifico all'interno di *Brachidontes variabilis* s.l..

Alla luce di questi risultati ci si è chiesti come nominare le tre specie criptiche, alle quali tramite gli alberi è stato attribuito un areale ben chiaro. Dal momento che molti malacologi ritengono che l'originale areale del *Brachidontes variabilis* sia l'Oceano Indiano (Stephenson & Stephenson, 1972; Plate, 1963; Taylor 1968) è giusto lasciare questo nome agli individui di quest'area geografica ed attribuire il nome *B. pharaonis* a

quello dell'area Mediterranea-Mar Rosso. Rimane irrisolto il binomio per l'area pacifica che al momento continua a chiamarsi *Brachidontes gr. variabilis*.

Gli alberi della sequenza mitocondriale della COI, inoltre, indicano nel clade dell'area "Mar Mediterraneo-Mar Rosso", che conserva tuttavia in tutte le ricostruzioni una natura monofiletica, una forte strutturazione con una divisione in due linee.

Le analisi genetiche sulle popolazioni dell'area "Mar Mediterraneo-Mar Rosso" non hanno rivelato alcuna strutturazione geografica, ma hanno dato importanti informazioni sulla struttura genetica del *Brachidontes pharaonis*. Nell'area "Mar Mediterraneo-Mar Rosso" il grado di polimorfismo è risultato molto alto e sia il Network che gli alberi filogenetici, con tutti gli algoritmi utilizzati, mostrano sempre una dicotomia. Le due linee sono caratterizzate da 2 aminoacidi differenti in posizione 30° (L, leucina; M, Metionina). Questa strutturazione nel *Brachidontes pharaonis* non ha riscontro in una parallela differenziazione morfometrica tra le due forme ad oggi individuate. La morfometria struttura il taxon monofiletico dell'area Mar Mediterraneo-Mar Rosso, al più in popolazioni segregate geograficamente a causa di condizioni ecologiche differenti. Dall'analisi canonica variata (CVA) e tramite l'analisi della funzione discriminante (DFA) si evince che gli individui del Mar Mediterraneo hanno simili morfotipi, derivati probabilmente da vicine condizioni ambientali, mentre gli individui del Mar Rosso sia nel grafico CVA che nell'DFA si separano nettamente dai campioni mediterranei. Ciò fa supporre che questi morfotipi siano molto differenti da quelli mediterranei, poiché esposti a diverse condizioni ambientali; infatti, i campioni del Mar Rosso provengono da baie sabbiose e con scarso idrodinamismo (Fig.41).

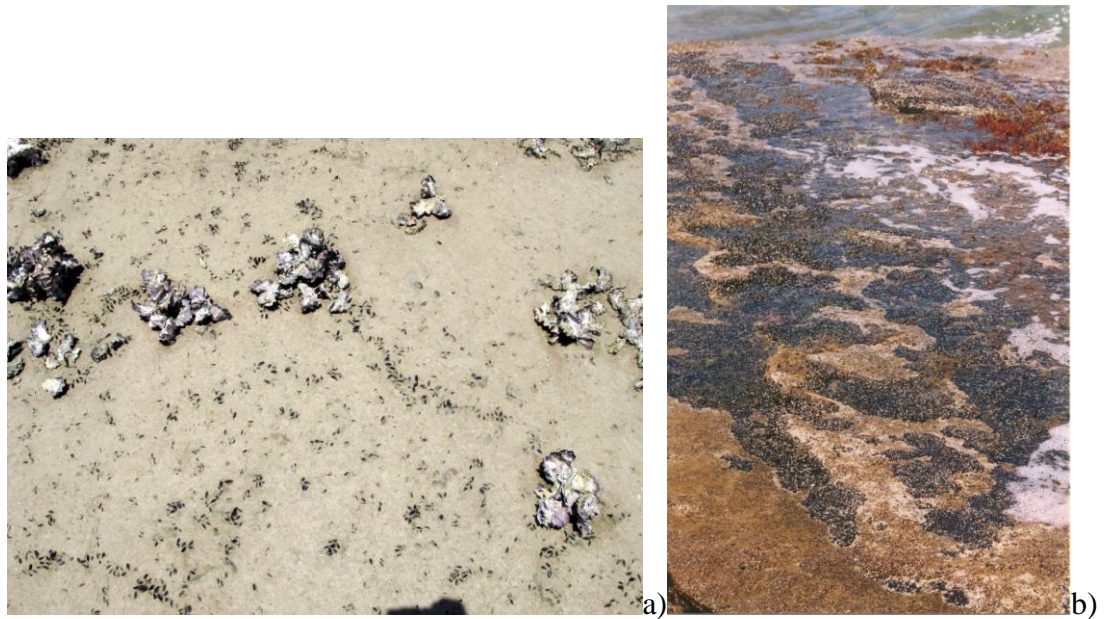


Fig. 41: “MYTILID BED” : a) Dahab, Egitto; b) Torre Normanna, Italia

Le conchiglie dei bivalvi hanno alta plasticità che gli permette di adattarsi alle differenti condizioni ambientali ed ecologiche (ecomorfotipi). Studi comparativi hanno mostrato che diverse specie di bivalvi presentano differenti caratteristiche morfologiche per evitare la predazione, il parassitismo, per mantenersi aderenti al substrato nonostante l'esposizione alle correnti dovute al flusso d'acqua, per la natura del substrato, per la salinità e la disponibilità di calcio, per la profondità e per la densità di popolazione (Guinñez & Castilla 1999; Stanley, 1983; Gardner and Skibinski, 1991; Willis and Skibinski, 1992; Norberg and Tendengren, 1995; Baker et al., 2003). Il presente studio mostra un'alta differenziazione nel trend morfometrico della conchiglia, in relazione all'esame degli individui dell'area Mar Mediterraneo-Mar Rosso.

I mitili che si legano al substrato duro (pietre, gusci), sabbia o su fondi di ghiaia (e.g., Tebble 1966; Stanley 1972; Poppe and Goto 1993) sono caratterizzati comunemente da un margine del guscio antero-ventrale dritto, eccetto piccole modifiche dovute all'adattamento ad una superficie irregolare (Stanley 1972). Una forma triangolare, il guscio relativamente sottile e possibilmente una grande taglia può essere vantaggiosa in ambienti di laguna quieta, come osservato per il genere *Mytilus* (Akester and Martel 2000), e come osservato nei nostri campioni provenienti dall'Egitto.

La grande variabilità in forma del guscio e lo sviluppo di morfemi fortemente triangolari può essere provocata anche da competizione per il cibo, poiché questi individui possono avere un migliore accesso alla colonna d'acqua. In ambienti favorevoli sono capaci di costruire strutture a grappoli composti da numerosi individui. Una causa supplementare per la variabilità di forma nel *Brachidontes pharaonis* può essere la competizione per lo spazio (Leinfelder 1986; Aguirre et al. 2006). Di solito, i grappoli di bivalvi sono composti di individui della stessa generazione e perciò di taglia quasi uguale. Come tutti gli individui crescono alla stessa percentuale, lo spazio può risultare limitato all'interno del grappolo, provocando gusci irregolari plasmati che rafforzano la crescita verso zone di fondo marino non occupate. I Mitili generalmente possono sostituire i fili bissali lasciando spazio ad una limitata mobilità (Cox et al. 1969). Questo può spiegare perché individui di forme estreme hanno proporzioni normali. Proprio per questo l'influenza della competizione per lo spazio sulla variabilità della forma è bassa in *Mytilus* (Akester and Martel 2000), così come in *Brachidontes*.

Arcidiacono & Di Geronimo (1976) avevano ipotizzato che le 2 forme (genetiche) identificate da Sirna Terranova et al. 2006 derivate dall'aminoacido in 30° posizione che conferì il nome di forma M, legata alla Metionina, e forma L, legata alla Leucina, erano da imputare ad una convergenza nel Mediterraneo di due popolazioni che pur avendo un'origine comune si fossero poi differenziate ed evolute separatamente. Ipotizzarono che i luoghi di differenziazione potessero essere l'Oceano Pacifico e l'Oceano Indiano o l'area indo-pacifica e l'area Atlantica. Ma visto che in Oceano Atlantico non è mai stata riscontrata questa specie, si pensa più verosimilmente che le due forme si siano separate nel Mar Rosso, dove nel corso dei millenni si è andati incontro a profondi cambiamenti che hanno portato per esempio a profonde fluttuazioni del livello del mare e al conseguente isolamento di popolazioni in pozze o lagune isolate. Dal confronto delle sequenze della COI con l'area Indiana e Pacifica si è visto che tutti presentano la forma L ma non la forma M, che dovrebbe essere la sua derivata.

A conferma della teoria dell'ingresso in Mar Mediterraneo, tramite il Canale di Suez, dal Mar Rosso ci sono i valori di diversità aplo-tipica. Questi si presentano più alti nel Mar Rosso, dove la diversità aplo-tipica accumulata nel corso dell'evoluzione è pari a 1 e diminuiscono nel Mar Mediterraneo dove si riscontra solo una parte della variabilità presente nel Mar Rosso. Si ha quindi un trend decrescente dal Mar Rosso, Egitto,

attraverso il Mar Mediterraneo Orientale, Israele, al Mar Mediterraneo medio-occidentale, Italia. Esistono però delle eccezioni, la Turchia presenta una sopravvalutazione della diversità questo probabilmente è dovuto all'esiguo numero di campioni. Si presuppone, così, che la colonizzazione dell'area mediterranea sia avvenuta in maniera naturale.

CAPITOLO 5

Bibliografia

- Abele L.G., Kim W., Felegenhauer B.E., (1989) *Molecular evidence for inclusion of the phylum Pentastomida in the Crustacea. Mol. Biol. Evol.* **6**: 685-691.
- Adams D.C., Rohlf F.J., Slice D.E., (2004) *Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. Italian Journal of Zoology* **71**: 5-16.
- Aguinaldo A.M.A., Turbeville J.M., Linford L.S., et al., (1997) *Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. Nature* **387**: 489-493.
- Aguirre M.L., Perez S.I., Sirch Y.N., (2006) *Morphological variability of Brachidontes Swainson (Bivalvia, Mytilidae) in the marine Quaternary of Argentina (SW Atlantic). Elsevier* **239**: 100-125.
- Akester, R.J. and Martel, A.L., (2000) *Shell shape, dysodont tooth morphology, and hinge–ligament thickness in the bay mussel Mytilus trossulus correlate with wave exposure. Canadian Journal of Zoology* **78**: 240–253. <http://dx.doi.org/10.1139/cjz-78-2-240>
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., (1997) *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Astrali M., Bianchi C.N., Gasparini G.P., Morri C., (1995) *Climatic fluctuations, current variability and marine species distribution: a case study in the Ligurian Sea (north-west Mediterranean). Oceanologica Acta* **18**: 139-149.
- Arculeo M., Mauro A., Scelsa G., Lo Brutto S., Cammarata M., Parrinello N., (1996) *Protein differences among the Mediterranean species of the genus Spicara. J. Fish. Biol.*, **49**: 1317-1322.
- Arculeo M., Lo Brutto S., Cammarata M., Mazzola M., Parrinello N., (1997) *Lack of biochemical polymorphism in the Mediterranean amberjack (Seriola dumerili) (pisces, Carangidae). In: Island Aquaculture and Tropical Aquaculture. Martinique.* pp.28-29.
- Avise J.C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York, NY*, pp. 511.
- Baker, A.M., Bartlett, C., Bunn, S.E., Goudkamp, K., Sheldon, F., Hughes, J.M., (2003) *Cryptic species and morphological plasticity in long-lived bivalves (Unionoida: Hyriidae) from inland Australia. Molecular Ecology* **12**: 2707-2717.
- Baylac M., Villemant C. and Simbolotti G., (2003) *Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. Biological Journal of the Linnean Society*, **80**: 89–98.
- Barash A. & Danin Z., (1982) *Mediterranean Mollusca of Isdrael and Sinai: composition and distribution. Israel Journal Zoology*, **31**: 86-118.
- Barash A. & Danin Z., (1986) *Further additions to the knowledge of Indo-Pacific Mollusca in the Mediterranean Sea. Spixiana*, (**9, 2**): 117-141.
- Ben Tuvia A., (1970) *Man-made changes in the eastern Mediterranean and their effect on the fishery resources. Journèes ichthyologique*, pp. 179-185. CIESM, Rome.

- Ben Tuvia A., (1985) *The impact of the Lessepsian (Suez Canal) fish migration on the eastern Mediterranean ecosystem. In: Moraitou-Apostolopoulou M., Kiotosis V. (eds), Mediterranean Marine Ecosystem*, pp. 367-375. Plenum Press, New York.
- Bermingham, E., Lamb, T., and Avise, J.C., (1986) *Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. J. Hered.*, **77**: 249-252.
- Bianchi C.N., Morri C., (2000) *Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. Marine Pollution Bulletin*, **40**: 367-376.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Dohdi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K. et al., (2006) *Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in Ecology and Evolution*, **22**: 148-155.
- Bickford D., Lohman D.I., Sohdi N.S., Ng PKL, Meier R., Winker K., Ingram R.R., Das I., (2007) *Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends Ecol Evol*, **22 (3)**: 148-155.
- Birky C.W. Jr. & T. Barraclough, (2010) *Asexual Speciation*. In Schon, I., K. Martens, & P. van Dijk (eds), *Lost Sex*. Springer, New York pp. 201–216.
- Birky C.W. Jr., Wolf C., Maughan H., Herbertson L. & E. Henry, (2005) *Speciation and selection without sex. Hydrobiologia*, **546**: 29–45.
- Birky C.W. Jr., Adams J., Gemmel M. & Perry J., (2010) *Using Population genetic theory and DNA sequences for species detection and identification in asexual organisms. PLoS One*. (in stampa).
- Blackith R.E., Reyment R.A., (1971) *Multivariate morphometrics. Academic Press, London*.
- Bookstein F.L., (1989) *Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations. I.E.E.E. Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, **11**: 567-585.
- Bookstein F.L., (1991) *Morphometric tools for Landmark data: geometry and biology. Biology Cambridge University Press, Cambridge*.
- Boudry P., Heurtebise S., Lape`gue S., (2003) *Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed Crassostrea gigas and Crassostrea angulata specimens: a new oyster species in Hong Kong? Aquaculture*, **228**: 15–25.
- Brown, G.G., Gadaleta, G., Pepe, G., Saccone, C. and Sbordoni, V., (1987) *Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. J. Mol. Evol.*, **26**: 205-211.
- Calvo M., Templado J., Oliverio M., Machordom A., (2008) *Hidden Mediterranean biodiversity: molecular evidence for a cryptic species complex within the reef building vermetid gastropod Dendropoma petraeum (Mollusca: Caenogastropoda). Biol J of the Linnean Soc* pp.1167.
- Catalano S. A., Goloboffa P.A., and Gianninia N.P., (2010) *Phylogenetic morphometrics (I): the use of landmark data in a phylogenetic framework. Cladistics*, **26**: 539–549.
- Chemello R., Oliverio M., (1995) *Lessepsian migrations: a theoretical 'island-jumping' model. Biol Mar Medit*, **3**: 444-446.
- Chang D. and Clayton, D.A., (1985) *Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light strand promoter. Proc. Natl. Accad. Sci. USA*, **82**: 351-355.
- Clayton, D.A., (1982) *Replication of animal mitochondrial DNA. Cell*, **2**: 693-705.
- Cunningham C.W., (1997) *Can three incongruence tests predict when data should be combined? Mol. Biol. Evol.*, **14**: 733-740.

- Di Geronimo, I., (1971) *Prima segnalazione nelle coste Italiane di Brachidontes variabilis (Krauss)*. *Boll. Sedute. Accad. Gioenia Sci. Nat. Catania*, **10**: 847-852.
- Dvorak V., Aytakin A. M., Alten B., Skarupova S., Votycka J., and Volf P., (2006) *A comparison of the intraspecific variability of Phlebotomus sergenti Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae)*. *Journal of Vector Ecology*, Vol. **31**, no. 2: 229-239.
- Engl W., (1995) *Specie prevalentemente lessepsiane attestate lungo le coste turche*. *Boll. Malacol.*, **31 (1-4)**: 43-50.
- Enzengros L. & Niederhofer H.I., (1991) *Neue Erkenntnisse über die Ausbreitung von "Lesseps'schen Einwanderern" (mollusca) an der türkischen Mittelmeerküste*. *Club Conchilia Inf.*, **23 (3-4)**: 94-108.
- Farris J.S., Källersjö M., Kluge A.G. & Bult C., (1995) *Testing significance of incongruence*. *Cladistics*, **10**: 315-319.
- Feral J.P., (2002) *How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity?* *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **268**: 121-145.
- Field K.G., Olsen G.J., Lane D.J., et al. (1988) *Molecular phylogeny of the animal kingdom*. *Science* **239**: 748-753.
- Fisher P., (1870) *Sur la Faune conchyliologique marine des baies de Suez et de l'Akabah*. *Journal de Conchyliologie*, t. **XIII**: 178-179.
- Fisher C. & Skibinski D.O.F., (1990) *Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel Mytilus*. *Proc.R. Soc. Lond.*, **242**: 149-156.
- Folmer O., Black M., Hoen W., Lutz R., and Vrijenhoek, (1994) *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, **3**: 294-299.
- Friedrich M., Tautz D., (1995) *Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods*. *Nature*, **376**: 165-167.
- Friedrich M., Tautz D., (1997) *Evolution and phylogeny of the Diptera: a molecular phylogenetic analysis using 28S rDNA sequences*. *Syst. Biol.*, **46**: 674-698.
- Gardner, J.P.A., Skibinski, D.O.F., (1991). *Biological and physical factors influencing genotype-dependent mortality in hybrid mussel populations*. *Marine Ecology Progress Series*, **71**: 235-243.
- Ghisotti F., (1974) *Recente penetrazione in Mediterraneo di molluschi marini di provenienza Indo-Pacifico*. *Quad. Civ. Staz. Idro-biol. Milano*, **5**: 7-22.
- Gianguzza P., Chemello R. & Riggio S., (1997) *Segnalazione di (P. Fischer, 1870) (Bivalvia, Mytilidae) nella salina di Marsala e considerazioni sulla distribuzione della specie in Mediterraneo*. *Bollettino Malacologico, Roma*, **33 (9-12)**: 169-172.
- Gruvell, A. & Moazzo, G., (1931) *Contribution a la fauna Malacologique marine des cotes Libano-Syriennes*. *Geogr. Marittime Coloniales (ed. by A. Gruvell)*, pp.437-453.
- Guinñez R. & Castilla J.C., (1999) *A tridimensional self-thinning model for multilayered intertidal mussels*. *The American Naturalist*, **154**, 341-357.
- Guindon S. & O. Gascuel, (2003) *A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood*. *Systematic Biology*, **52**: 696-704.

- Hall T.A., (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl. Acide. Symp. Ser., **41**: 95-98.
- Hillis D.M., Dixon M.T., (1991) *Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference*. *Quart Rev Biol.*, **66**: 411-453.
- Horai, S. and Hayasaka, K., (1990) *Intraspecific nucleotide sequence differences in the major non coding region of human mitochondrial DNA*. *Am. J. Hum. Genet.*, **46**: 828-842.
- Hwang U.W., Kim W, Tautz D., Friedrich M., (1998) *Molecular phylogenetics at the Felsenstein zone: approaching the Strepsiptera problem using 5.8S and 28S rDNA sequences*. *Mol. Phylogen. Evol.*, **9**: 470-480.
- Hwang U.W., (1998) *The complete nucleotide sequence of mitochondrial DNA of a centipede Lithobius forficatus and its application to arthropod phylogeny*. Ph.D. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.
- Jeffreys, A.J., Wilson, Thein, S.L., (1985) *Hypervariable "minisatellite" region in Human DNA*. *Nature*, **314**: 67-73.
- Klautau, M. et al., (1999) *Does cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge Chondrilla nucula*. *Evolution*, **53**: 1414-1422.
- Klingenberg C., (2008). *MorphoJ*. Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK. http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M., (2004). *MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment*. *Briefings in Bioinformatics*, **5**: 150-163.
- Lee T., O' Foighil D., (2004) *Hidden Floridian biodiversity: mitochondrial and nuclear gene tree reveal four cryptic species within the scorched mussel, Brachidontes exustus, species complex*. *Mol. Ecol.*, **13**: 3527-3542.
- Lee T., O' Foighil D., (2005) *Placing the floridian marine genetic disjunction into a regional evolutionary context using the scorched mussel, Brachidontes exustus, species complex*. *Evolution*, **59 (10)**: 2139-2158.
- Lefe'ebure, T. et al., (2006) *Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments*. *Mol. Ecol.*, **15**: 1797-180.
- Leinfelder, R.R., (1986) *Facies, stratigraphy and paleogeographic analysis of Upper? Kimmeridgian to Upper Portlandian sediments in the environs of Arruda dos Vinhos, Estremadura, Portugal*. *Münchner Geowissenschaftliche Abhandlungen A*, **7**: 1-215.
- Litt, M., Luty, J.A., (1989) *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. *Am. J. Hum. Genet.* **44**: 397-401.
- Liu J., Li Q. , Kong L. and Zheng X., (2011) *Cryptic diversity in the pen shell Atrina pectinata (Bivalvia: Pinnidae): high divergence and hybridization revealed by molecular and morphological data* , *Molecular Ecology*, **20**: 4332-4345.
- McCarthy, C. (1996) Chromas. <http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm>.
- Micali P. & Palazzi S., (1992) *Contributo alla conoscenza dei Pyramidellidae della Turchia con segnalazione di due nuove immigrazioni dal Mar Rosso*. *Boll.Malac., Milano*, **28 (1-4)**: 83-90.
- Mitteroecker P., Gunz P., (2009) *Advances in geometric morphometrics*. *Evol. Biol.*, **36**: 235-247.

- Morton B., (1988) *The population dynamics and reproductive cycle of Brachidontes variabilis (Bivalvia: Mytilidae) in a Hong Kong Mangrove. Malacological Review, 21:* 109-117.
- Moritz, C., and Brown, W.M., (1997) *Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs; variation in incidence and gene content among lizards. Proc. Natl. Accad. Sci. USA, 84:* 7183-7187.
- Nakamura T., Leppert M, O'connel P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kulmin E., White R.L., (1987) *Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science, 235:* 1616-1622.
- Nielsen, J.L., Fountain, M.C., and wright, J.M., (1997) *Biogeographic analysis of pacific trout (Oncorhynchus mykiss) in California and Mexico based on mitochondrial DNA and nuclear microsatellites.* In “molecular systematic of fishes” (T.D Kocher and C.A. Stepien, Eds), pp 53-74, Academic press, San Diego.
- Norberg, J., Tendengren, M., (1995). *Attack behaviour and predatory success of Asterias rubens L. related to differences in size and morphology of the prey mussel Mytilus edulis. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 186,* 207-220.
- Pallary P., (1938) *Les Mollusques marins de la Syrie. J. Conchyl, Paris, 82:* 5-57.
- Palumbi S., Martin A., Roman S., McMillan W.O., Stice L.and Grabowski G., (1991) *The simple fool's guide to PCR. (version 2). University of Hawaii Zoology Department, Honolulu.*
- Palumbi S.R., (1996) *Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hills DM, Moritz C, Mable BK (eds), Molecular Systematics. Sinauer associates, Inc., Sunderland, pp. 205-248.*
- Park, J.-K., O' Foighil, D., (2000) *Sphaeriid and corbiculid clams represent separate heterodont bivalve radiations into freshwater environments. Mol. Phylogenet. Evol., 14:* 75–88.
- Penninger M. & Schwenk K., (2007) *Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. BMC Evoluzionary Biology, 7:*121.
- Phillips, R.B., and Carley, T.H., (1997) *Phylogenetic relationship among the salmonidae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences.* In “molecular systematic of fishes” (T.D Kocher and C.A. Stepien, Eds), pp. 145-162, Academic press, San Diego.
- Polzin & Vandati Deneshmand (2011) <http://www.fluxus-engineering.com/>
- Poppe, G.T. and Goto, Y., (1993) *European seashells. Scaphopoda, Bivalvia, Cephalopoda. Vol. 2:* pp. 221, Christa Hemmen, Wiesbaden.
- Por F.D., (1978) *Lessepsian Migration – the influx of Red Sea Biota into the Mediterranean by way of the Suez Canal. Ecological Studies 23:* pp. 228, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- PosadaD., (2008) *versione modificata di Modeltest 3.6 (cfr. [Modeltest homepage](#)) di MrModeltest da 2,3 Johan A. A. Nylander, Dipartimento di Zoologia sistematica, EBC, Università di Uppsala, in Svezia.*
- Rambaut (2006-2009) <http://tree.bio.ed.ac.uk/>
- Rilov G., Gasith A., Benayahu Y., (2002) *Effect o fan exotic prey on the feeding pattern of a predatory snail. Mar. Env. Res., 54:* 85-98.
- Ryu S.H., Do Y.K., Hwang U.W., Choe C.P., Kim W., (1999) *Ribosomal DNA intergenic spacer of the swimming crab, Charybdis japonica. J. Mol. Evol. X:* (in press).

- Rocha-Olivares, A. et al., (2001) *Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod*. *Mol. Biol. Evol.*, **18**: 1088–1102.
- Roderic D. M., (2001) <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Rolf, F.J. e Slice, D., (1990) *Estensioni del metodo di Procuste per la sovrapposizione ottimale dei punti di riferimento*. *Zoologia sistematica*, **39** (1): 40-59.
- Rohlf F.J., (2004) tpsDIG 2 software, available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Rohlf F.J., (1993) *Relative warps analysis and an example of its application to Mosquito wings*. In: *Marcus LF, Bello E, Garcia-Valdecasas A (Eds), Contributions to Morphometrics, Monografias del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid*, pp. 132-159.
- Rohlf F.J., (1996) *Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations*. In: L.F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor & D.E. Slice (eds), *Advances in morphometrics*.
- Rohlf F., (2008) tpsUtil , available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Safriel U.N. & Lavee D., (1988) *Weight changes of cross-desert migrants at an oasis - do energetic considerations alone determine the length of stopover?* *Oecologia* **76**: 611-619.
- Safriel U., Gilboa F., Felsenburg D., (1980) *Distribution of rocky intertidal mussels in the Red Sea coasts of Sinai, the Suez Canal and the Mediterranean coast of Israel, with special reference to recent colonizers*. *J. Biog.* **7**: 39-62.
- Safriel U. and Lipkin Y., (1964) *Note on the intertidal zonation of the rocky shores at Elat (Red Sea, Israel)*. *Israel Journal Zoology*, **13**: 1187-1190.
- Sasekumar, A., (1974). *Distribution of the macro fauna on a Malayan mangrove shore*. *J. Anim. Ecol.*, **43**: 51-69.
- Shearer T.L., Van Oppen M.J.H., Romano S.L., Wörheide R., (2002) *Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria)*, *Mol. Ecol.* **11**: 2475-2487.
- Sheets H.D., (2003) Makefan6 software, IMP software series, available at <http://www.canisius.edu/sheets/morphsoft.html/>.
- Shofield W.B. & Crum H.A. (1972) *Disjunctions in brvoohvtes*. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **59**: 174-202.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. & Flook P., (1994) *Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **87** (6): 651-701.
- Sirna Terranova M., Lo Brutto S., Arculeo M., Mitton J.B., (2006) *Population structure of Brachdantes pharaonis (P.Fisher,1870) (Bivalvia,Mytilidae) in the Mediterranean Sea, and evolution of a novel mtDNA polymorphism*. *Mar. Biol.*, **150**: 89-101.
- Sirna Terranova M, Lo Brutto S., Arculeo M., Mitton J.B., (2007) *A mitochondrial phylogeography of Brachidontes variabilis (Bivalvia: Mytilidae) reveals three cryptic species*. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, **45**(4): 289-298.
- Schneider, S. & Excoffier, L., (1999) *Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA*. *Genetics*, **152**: 1079–1089.
- Schormann J., Carlton J.T. Dochoda M.R., (1990) *The ship as a vector in biotic invasion*, *Trans. Inst. Mar. Engineers* © **102**: 147-152.

- Santaclara, F. J., Montserrat Espiñeira, Ana G. Cabado, Arrate Aldasoro, Nerea Gonzalez-Lavín, and Juan M. Vieites, (2006) *Development of a Method for the Genetic Identification of Mussel Species Belonging to Mytilus, Perna, Aulacomya, and Other Genera*; *J. Agric. Food Chem.*, **54** (22): 8461–8470.
- Sousa R., Freire R., Rufino M., Mèndez J., Gaspar M., Antunes C., Guilhermino L., (2007) *Genetic and shell morphological variability of the invasive bivalve Corbicula fluminea (Müller, 1774) in two Portuguese estuaries*; *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **74**: 166-174.
- Stanley, S.M., (1972). *Functional morphology and evolution of byssally attached bivalve mollusks*. *Journal of Paleontology*, **46**: 165–212.
- Stanley, S.M., (1983). *Adaptative morphology of the shell in bivalves and gastropods*. In: Trueman, E.R., Clarke, M.R. (Eds.), *The Mollusca*, vol. II. Academic Press, New York, pp. 105-141.
- Stepien, C.A., (1995) *Population genetic divergence and geographic pattern from DNA sequences: examples from marine and freshwater fishes*. In “evolution and aquatic ecosystems: defining unique units in population conservation”(J. L Nielsen, Ed) pp. 263-282.
- Stepien C.A., Kocher T.D., (1997) *Molecules and morphology in studies of fish evolution*. In: Kocher TD, Stepien CA (eds), *Molecular Systematics of Fishes*, Ch,1, Academic Press, San Diego, CA, pp.1-11.
- Sturmbauer, C., Verheyen, E., Ruber, L., and Meyer, A., (1997) *Phylogeographic patterns in populations of cichlid fishes from rocky habitats in lake Tanganyika*. In “molecular systematic of fishes”(T.D Kocher and C.A. Stepien, Eds) pp. 97-112, Academic press, San Diego.
- Swofford, D.L., (2002) *PAUP. Utilizzando l'analisi filogenetica Parsimonia (* e altri metodi)*. *Sinauer Associates, MA Sunderland*.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & S. Kumar, (2007) *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596-1599.
- Taylor A. L. and Trotter C. D., (1971) *Linkage map of Escherichia coli strain* *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1972, **36**(4): 504.
- Tebble, N., (1966) *British Bivalve Seashells*. pp. 212 HMSO, Edinburgh.
- Tringali L. & Villa R., (1990) *Rinvenimenti malacologici delle coste turche*. *Notiz. CISM*, Roma, **12**: 33-41.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G., (1997) *The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. *Nucleic Acids Research*, **24**: 4876-4882.
- Turner, T.F., (1997) *Mitochondrial DNA control region sequences and phylogenetic systematic of darters (Teleostei: Percidae)*. *Copeia* (2): 319-338.
- Vigilant, L., Stoneking, H., Harpending, K., Hawkes, K. and Wilson, A.C., (1991) *African populations and the evolution of human mitochondrial DNA*. *Science*, **253**: 1503-1507.
- Whiting M.F., (1998) *Phylogenetic position of the Strepsiptera: review of molecular and morphological evidence*. *Int J. Morphol. Embryol.*, **27**: 53-60.

- Wheeler W.C., (1989) *The systematics of insect ribosomal DNA. In The Hierarchy of life, Fernholm B, Bremer K, Brundin L, Jornvall H, Rutberg L and Wanntorp HE (eds.).* pp. 307-321, Elsevier, Amsterdam. Netherlands.
- Willis, G.L., Skibinski, D.O.F., (1992) *Variation in strength of attachment to the substrate explains differential mortality in hybrid mussel (Mytilus galloprovincialis and M. edulis) populations. Marine Biology, 112, 403-408*
- Zanca M., (1976) *Rinvenimenti di esemplari di Brachidontes variabilis (Krauss, 1848) lungo la costa ionica della Calabria. Conchiglie, Milano, 12 (7-8): 161-162.*
- Zardoya R., Garrido-Pertierra A., Bautista J.M., (1995) *The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. J. Mol. Evol. 1 dicembre; 41 (6): 942-51.*
- Zelditch M., Swiderski D., Sheets H., Fink W., (2004) *Geometric morphometrics for biologists: A primer.* Elsevier Academic Press, London.