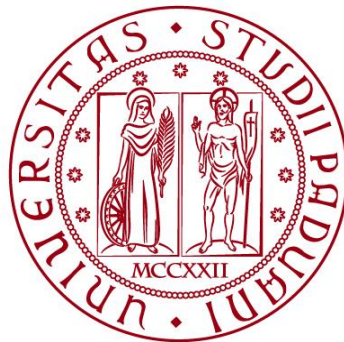


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Evoluzionistica



TESI DI LAUREA

**Utilizzo di marcatori microsatellite per lo
studio del differenziamento genetico di
Carcinus aestuarii nell'Alto Adriatico**

Relatore: Prof. Lorenzo Zane
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Ilaria Anna Maria Marino
Dipartimento di Biologia

Laureando: Bannò Salvatore

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1. <u>Variabilità genetica delle specie marine e degli ambienti di transizione</u>	4
1.2. <u>Carcinus aestuarii</u>	8
1.2.1. Specie, denominazione e biologia	8
1.2.2. <i>C. aestuarii</i> e <i>C. maenas</i>: distinzione morfologica e genetica	11
1.2.3. Speciazione e distribuzione geografica	12
1.2.4. Pattern biogeografici e filogeografici	13
1.3. <u>Ecosistemi lagunari e Laguna di Venezia</u>	15
2. SCOPO DELLA TESI	18
3. MATERIALI E METODI	20
3.1. <u>Il campionamento</u>	20
3.2. <u>Conservazione dei campioni</u>	21
3.3. <u>Estrazione del DNA</u>	22
3.4. <u>I marcatori microsatellite</u>	24
3.5. <u>La PCR</u>	26
3.6. <u>Il Genotyping</u>	30
3.7. <u>Lo Scoring</u>	31
3.8. <u>Il Binning</u>	32
3.9. <u>Analisi dei dati</u>	34
3.9.1. <i>Linkage Disequilibrium</i>	34
3.9.2. Hardy-Weinberg Equilibrium	36
3.9.3. Eterozigosità osservata e attesa	37

3.9.4. <i>Allelic richness</i>	38
3.9.5. Differenze tra campioni	38
3.9.6. Test di <i>Isolation by Time</i>	41
3.9.7. Confronto della variabilità genetica	42
3.9.8. Stima della dimensione effettiva di popolazione	42
3.9.9. Stima dei rapporti di parentela tra individui	43
4. RISULTATI	44
4.1. <u>Estrazione del DNA</u>	44
4.2. <u>Amplificazione tramite PCR</u>	45
4.3. <u>Analisi dei dati</u>	46
4.3.1. Test di <i>Linkage Disequilibrium</i>	47
4.3.2. Equilibrio di Hardy-Weinberg, numero di alleli, <i>allelic richness</i> , eterozigosità attesa e osservata	47
4.3.3. Differenze tra campioni	50
4.3.4. Confronto della variabilità genetica	56
4.3.5. Test di <i>Isolation by Time</i>	57
4.3.6. Stima della dimensione effettiva di popolazione	58
4.3.7. Stima dei rapporti di parentela tra individui	59
5. DISCUSSIONE	60
6. CONCLUSIONE	66
7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	67

1. INTRODUZIONE

In questo lavoro di tesi è stato effettuato uno studio di genetica di popolazione mediante marcatori genetici microsatellite sul granchio *Carcinus aestuarii*, utilizzando campioni prelevati nella Laguna di Venezia e in altre due lagune limitrofe dell'Alto Adriatico (Marano e Goro) per testare la possibile presenza di differenziamento spaziale e temporale su piccola scala geografica.

La tesi si inserisce all'interno del progetto di ricerca Venezia 2021, con lo scopo di studiare la variazione genetica temporale e geografica su piccola scala delle popolazioni di quattro specie target, due di pesci (il Gò, *Zosterisessor ophiocephalus*, ed il latterino, *Atherina boyeri*) e due di invertebrati (il granchio verde, *C. aestuarii*, e il mitilo, *Mytilus galloprovincialis*). La variabilità genetica di una specie riflette il potenziale evolutivo di una popolazione e quindi una maggiore o minore capacità di adattamento in seguito a cambiamenti delle condizioni ambientali. Alla luce della recente attivazione delle paratoie mobili del sistema MOSE, si ipotizza che una possibile alterazione degli scambi di organismi tra laguna e mare possa avere nel futuro un notevole impatto sulle dinamiche biologiche ed ecologiche della Laguna di Venezia, determinando effetti significativi a livello di comunità e di popolazione. In particolare, l'alterazione della connettività tra popolazioni e delle dinamiche di reclutamento potrebbe determinare una riduzione della variabilità genetica con potenziali effetti negativi. Per questo motivo risulta essenziale monitorare costantemente le popolazioni residenti, anche a livello genetico, in modo tale da ottenere delle indicazioni sui possibili impatti futuri.

1.1. Variabilità genetica delle specie marine e di ambienti di transizione

La grande maggioranza delle specie marine e degli ambienti di transizione ha un ciclo vitale che prevede una fase relativamente sedentaria, tipicamente legata allo stadio adulto, e una fase con una grande capacità di dispersione a livello giovanile (Hilbish, 1996). Per decenni, si è pensato che le popolazioni di queste specie fossero caratterizzate da una notevole omogeneità genetica dovuta alla estesa capacità di

dispersione degli stadi larvali e alla mancanza di ovvie barriere al flusso genico nell'ambiente marino (Vermeij, 1987; Ward et al., 1994; Hauser & Carvalho, 2008). Un gran numero di specie marine e lagunari presenta grandi dimensioni della popolazione, fecondazione esterna ed un'elevata fecondità, unite ad una prolungata fase larvale pelagica e, in molti casi, uno stadio adulto bentonico. Queste caratteristiche hanno portato ad ipotizzare la presenza di una bassa divergenza genetica tra le popolazioni, a causa dell'esteso flusso genico associato allo stadio larvale e dello scarso effetto della deriva genetica atteso in popolazioni ideali di grandi dimensioni (Ward et al., 1994). Tuttavia, nonostante sia spesso stata osservata una generale omogeneità genetica e un differenziamento geografico relativamente ridotto tra le popolazioni di specie marine caratterizzate da un'elevata dispersione (Hauser & Carvalho, 2008), in molti casi, è stata osservata un'elevata divergenza sulla piccola scala geografica o temporale (Burton, 1983). Ad esempio, Vergara-Chen et al. (2013) hanno rilevato la presenza di differenziamento genetico su piccola scala tra le popolazioni di una specie di mollusco (*Cerastoderma glaucum*) residenti nella laguna costiera del Mar Menor, dovuto probabilmente alla presenza di barriere ecologiche che rendono discontinui gli habitat e alle variazioni dei parametri ambientali che causano una riduzione del flusso genico tra le popolazioni vicine. Un altro esempio è dato dai risultati ottenuti da Taylor & Hellberg (2003) nel loro studio sulla ritenzione larvale locale nelle popolazioni di *Elacatinus evelynae*, un pesce che vive nelle barriere coralline caraibiche. In questo caso, l'elevata struttura genetica rilevata non sembra essere la conseguenza della presenza di barriere al flusso genico, suggerendo quindi la presenza di meccanismi ecologici e comportamentali che possono causare ritenzione larvale locale. Inoltre, in numerosi studi che hanno rilevato livelli bassi ma significativi di struttura genetica tra campioni prelevati a distanze di poche decine o centinaia di km (Johnson & Black 1982; Arnaud-Haond et al., 2008), si è osservata una struttura microgeografica instabile che non segue uno specifico andamento e mostra spesso rapide fluttuazioni nel tempo. Tali fluttuazioni sono evidenziate da cambiamenti nel tempo della struttura genetica spaziale o delle frequenze alleliche osservate ad uno stesso sito. Queste osservazioni hanno portato a coniare i termini "*chaotic genetic patchiness*" (Johnson & Black, 1982), e "*fluctuating genetic mosaics*" (David et al., 1997) per indicare il fenomeno ed hanno sollevato alcuni interrogativi sui processi

microevolutivi che operano negli ecosistemi marini. Cercare di comprendere l'origine di questa divergenza è importante nei casi in cui i dati genetici devono essere applicati a questioni di ecologia e conservazione (ad esempio, come utilizzare i dati molecolari per rispondere a domande riguardanti le dinamiche demografiche, per stimare la dispersione e la connettività della popolazione, o per rilevare la presenza di selezione) (Broquet et al., 2013). Tralasciando possibili artefatti dovuti all'effetto del campionamento casuale, sono state proposte tre possibili ipotesi per spiegare l'origine del *chaotic genetic patchiness*.

In primo luogo, condizioni ambientali eterogenee potrebbero guidare la selezione di alleli localmente vantaggiosi attraverso la sopravvivenza differenziale delle reclute (denominata selezione post-settlement) (Johnson & Black, 1982). Questa idea è stata supportata da studi classici basati sulle frequenze alleliche di geni codificanti enzimi, la cui variazione risultava essere correlata con la variazione di parametri come temperatura o salinità lungo un gradiente ambientale (Koehn et al., 1980). Tuttavia, l'osservazione di pattern genetici caotici supportati da più *loci* contemporaneamente risulta essere fortemente in contrasto con questa ipotesi, visto che la selezione naturale opera in modo gene-specifico. L'ipotesi di selezione sembra anche difficile da conciliare con le rapide fluttuazioni temporali della struttura genetica osservate e nel caso di assenza di un'eterogeneità ambientale a livello microgeografico (David et al., 1997). Lo stesso vale per l'ipotesi che coinvolge la selezione pre-insediamento durante la fase di dispersione (Johnson & Black, 1984a). In conclusione, nonostante la selezione diretta o indiretta generi differenziazione genetica spaziale in *loci* specifici (Toonen & Grosberg, 2010), difficilmente può essere considerata la causa dei pattern multilocus generalmente descritti come *chaotic genetic patchiness*. La seconda ipotesi che è stata proposta per spiegare il fenomeno prende il nome di “*sweepstakes reproductive success*” (Hedgecock, 1994) e propone che gruppi geneticamente diversi siano prodotti attraverso processi demografici neutrali, partendo dal presupposto che la riproduzione nelle popolazioni bentoniche avviene all'interno di piccoli gruppi (Johnson & Black, 1984b), limitati per dimensioni ed estensione spaziale dalla mobilità degli individui adulti e dalla vita generalmente breve dei gameti (Levitan & Petersen, 1995). Questa suddivisione della popolazione in gruppi riproduttivi circoscritti fa sì che individui provenienti da aree geografiche distinte differiscano

per l'effetto della deriva genetica (Li & Hedgecock, 1998). In alcune specie che presentano popolazioni che formano piccoli gruppi riproduttivi, l'effetto della deriva genetica può essere molto forte e la variazione del successo riproduttivo degli individui può contribuire notevolmente a ridurre la dimensioni effettiva di popolazione (Broquet et al., 2013). La dimensione effettiva della popolazione può essere definita come la dimensione di una popolazione ideale che perde variabilità genetica con la stessa intensità rispetto alla popolazione reale. Il successo riproduttivo può essere estremamente sbilanciato nelle specie marine con alta fecondità ed elevata mortalità nei primi stadi vitali, dove solo una piccola frazione di una coorte larvale trova condizioni oceanografiche favorevoli per la sopravvivenza e il reclutamento (Hedgecock, 1994). Ciò nonostante, il flusso genico e i nuovi alleli introdotti dalla dispersione larvale dovrebbero comunque omogeneizzare le differenze. Se i gruppi locali formati dagli individui adulti sessualmente maturi sono effettivamente campioni casuali del pool di individui in pre-dispersione, allora non si dovrebbero riscontrare differenze genetiche maggiori di quelle previste dall'errore di campionamento. Quindi la deriva da sola non basta per spiegare la divergenza genetica degli adulti se queste coorti riescono a diffondersi casualmente nello spazio prima dell'insediamento. Il *chaotic genetic patchiness* presuppone che la deriva genetica che agisce a livello locale sia seguita da un mescolamento incompleto delle reclute larvali. Ciò può essere ottenuto, anche considerando una distanza di dispersione illimitata, se le larve rilasciate da un gruppo circoscritto non diffondono in modo casuale ma rimangono aggregate durante la dispersione e l'insediamento. (Shapiro, 1983; Selkoe et al., 2006).

Questo fenomeno prende il nome di "*collective dispersal*" e rappresenta la terza ipotesi che viene utilizzata per spiegare la presenza di *chaotic genetic patchiness*. In generale, si viene a generare "*collective dispersal*" quando i migranti che raggiungono una popolazione hanno un'alta probabilità di provenire dalla stessa fonte (Eldon et al., 2016). Questo può succedere per motivi legati alle strategie di dispersione della specie (Clotuche et al., 2013) o potrebbe essere la conseguenza di condizioni ambientali che in qualche modo mantengono coesi i migranti durante la dispersione (Siegel et al., 2018). In questi casi, la deriva genetica contribuirà meno efficientemente all'omogeneizzazione delle differenze genetiche di diverse coorti riproduttive.

In sintesi, non c'è dubbio che la dispersione e il flusso genico siano maggiori nelle specie che presentano uno stadio larvale pelagico rispetto a specie che non lo presentano. Tuttavia, le larve pelagiche possono incontrare delle barriere che ne impediscono la dispersione e, anche quando raggiungono popolazioni distanti, il loro contributo genetico a tali popolazioni potrebbe essere ridotto al minimo da una ridotta vitalità o fecondità o dal basso successo riproduttivo atteso in generale (Hedgecock, 1986).

In questa tesi, sono state utilizzate diverse popolazioni della specie *C. aestuarii* della Laguna di Venezia e di due lagune limitrofe (Marano e Goro) per verificare la possibile presenza di struttura genetica su piccola scala geografica e temporale. La specie utilizzata presenta una fase di vita larvale planctonica di lunga durata (circa 6 settimane, Deli et al., 2018), che potrebbe determinare un alto livello di panmissia tra gruppi riproduttivi provenienti da aree geografiche distinte.

1.2. *Carcinus aestuarii*

1.2.1. Specie, denominazione e biologia

Carcinus aestuarii (Nardo, 1847), più comunemente conosciuto come granchio verde Mediterraneo, è una specie di granchio che vive negli estuari e nelle lagune del Mar Mediterraneo e del Mar Nero (Mori et al., 1990, Yamada & Hauck, 2001). Appartiene all'ordine Decapoda, infraordine Brachiura, famiglia Portunidae (Aydin, 2013) e genere *Carcinus* (Figura 1.1) Esso può essere trovato in molti habitat, che comprendono ambienti intertidali caratterizzati da un fondale fangoso o roccioso, ambienti subtidali sabbiosi o fangosi, barene e praterie di fanerogame marine (Ray, 2005). Si tratta di una specie onnivora, vorace e molto competitiva, capace di avere un forte impatto a livello ecologico e sulla pesca. Grazie alla notevole capacità di tollerare l'esposizione aerea, la fame e forti variazioni di temperatura e salinità (Yamada & Hauck, 2001), questa specie ha colonizzato diverse regioni al di fuori della sua area natale (Mar Mediterraneo) (Carlton & Cohen, 2003) ed è considerata un "global intruder".



Figura 1.1. Esemplare adulto di *C. aestuarii*.

C. aestuarii può essere distinto dagli altri granchi per il suo carapace a forma di ventaglio, cinque denti aguzzi nella regione antero-laterale, situati dietro gli occhi e 3 lobi tra gli orbitali (Yamada & Hauck, 2001). La superficie dorsale del carapace è molto piatta e granulata e la sua larghezza è maggiore della lunghezza. I suoi colori sono verde scuro e marrone; presenta inoltre bande semicircolari su entrambi i lati del carapace, tappezzate da macchie bianche (Bilgin & Çelik, 2004). Le femmine producono fino a 370.000 embrioni/nidiata (Leignel et al., 2014), che si schiudono durante l'estate o l'inverno. La durata pelagica larvale è di circa 6 settimane (Deli et al., 2018) e comprende quattro stadi planctonici zoali, che mostrano un comportamento migratorio verticale in ambienti pelagici, e uno stadio megalopale, che si stabilisce in habitat bentonici prima della metamorfosi al primo stadio di granchio (Rice & Ingle, 1975; Dos Santos et al., 2008). Una volta completata la metamorfosi, gli individui raggiungono la maturità sessuale entro un anno dalla nascita (Aydin, 2013). Per quanto riguarda il dimorfismo sessuale, a parità di età, le femmine appaiono più piccole dei maschi, ma a parte le dimensioni ridotte e una forma del carapace leggermente diversa (più affusolata nei maschi e più tondeggianti nelle femmine), l'unico tratto morfologico sessualmente dimorfico tra i sessi è la forma dell'addome, più propriamente del telson che in questo gruppo tassonomico è ripiegato sul ventre, che è a forma appuntita nei maschi e più rotondeggianta nelle femmine (Figura 1.2).



Figura 1.2. Nella foto, in alto, è riportato un esemplare maschio adulto di *C. aestuarii*, in basso invece una femmina. È possibile apprezzare le differenze dimensionali e la diversa morfologia del ventre che caratterizza i due sessi.

Le femmine raggiungono le dimensioni maggiori durante la primavera, periodo che coincide con il picco riproduttivo (maggio/giugno) nella Laguna di Venezia. Dopo la riproduzione, le femmine migrano dalla laguna al mare, dove rilasciano le uova. Durante questo periodo i maschi, più sedentari rispetto alle femmine, rimangono in laguna (Matozzo et al., 2013). Secondo Lyons et al. (2012) e Juanes et al. (2008), l'aumento della taglia dei maschi che si osserva in particolari stagioni potrebbe essere correlata alla messa in atto di comportamenti sessualmente dimorfici; in particolare, questo aumento della taglia può essere necessario nelle specie in cui la taglia del corpo maschile è importante per la competizione intra-sessuale e inter-sessuale, che si manifesta in comportamenti quali il combattimento, l'esibizione e il corteggiamento. Nella Laguna di Venezia, la pesca e l'allevamento di *C. aestuarii* sono importanti attività economiche. Durante la muta del granchio, i pescatori locali selezionano i granchi che hanno perso il carapace e sono diventati morbidi. I granchi in questa fase della muta sono chiamati “moleche” o “moeche” e sono considerati dopo la frittura una prelibatezza gastronomica. Le moleche sono vendute ad un prezzo elevato, rappresentando quindi un importante fonte di reddito per i pescatori. Questa è un'attività stagionale (si svolge principalmente in primavera e in autunno) che segue il tasso di crescita del granchio (Matozzo et al., 2013).

1.2.2. *C. aestuarii* e *C. maenas*: distinzione morfologica e genetica

Il genere *Carcinus* comprende due specie originarie dell'Europa: *C. aestuarii* (specie mediterranea) e *C. maenas* (specie atlantica). Nel 1814 Leach definì il genere *Carcinus*, comprendente una specie unica: *C. maenas*, precedentemente descritta come *Cancer maenas* (Linneaus 1758), e talvolta scritto come *Carcinoides maenas* o *Carcinides maenas*. I caratteri morfologici di *C. maenas* che ne consentono una facile identificazione includono cinque denti sul margine anterolaterale del carapace, una leggera sporgenza della parte anteriore del carapace con l'area rostrale arrotondata, l'orbita con una fessura dorsale e una quinta gamba con un dattilo non spatolato più ampio. L'addome ha dai tre ai cinque somiti fusi; la sua forma è triangolare per i maschi, ma circolare per le femmine (Leignel et al., 2014). Esistono due principali morfologie di colore: verde e rosso (Crothers, 1967), che rappresentano diverse fasi del ciclo di muta. Sebbene *C. maenas* sia comunemente osservato negli estuari e nelle zone rocciose, esso è in grado di colonizzare un'ampia gamma di habitat (paludi salmastre, detriti legnosi, substrato roccioso e fanerogame). *Carcinus maenas* è distribuito nel Nord Europa (Mar Baltico, Islanda e Norvegia centrale) nelle coste nordafricane (Marocco e Mauritania) e nel Mar Mediterraneo (Leignel et al., 2014).

Tuttavia, nel 1847, Nardo stabilì una distinzione morfologica tra i granchi verdi dell'Atlantico e del Mediterraneo, descrivendo la specie *C. aestuarii* (noto anche come *C. mediterraneus*) che presenta una distribuzione geografica circoscritta al Mediterraneo e al Mar Nero (Yamada & Hauck, 2001). Anche se le due specie sono molto simili, Cohen et al. (1995) e Yamada & Hauck (2001) hanno confermato la discriminazione di *C. aestuarii*/*C. maenas* attraverso l'utilizzo di criteri morfologici. I caratteri usati per differenziare queste specie includono diversi parametri e rapporti dimensionali del carapace come: il rapporto larghezza/lunghezza, il rapporto larghezza/profondità, aspetto della superficie dorsale, margine dell'area frontale in mezzo agli occhi e la segmentazione della prima e della seconda antenna. Inoltre, in *C. maenas*, i pleopodi del maschio sono a forma di mezzaluna e curvi verso l'esterno con il centro delle mezzelune che si toccano, mentre in *C. aestuarii* sono diritti e paralleli; infine, in *C. aestuarii*, la zona frontale è piatta ed è delimitata da tre lobi smerlati con protuberanze non sporgenti

(Yamada & Hauck, 2001). Tuttavia, Clark et al. (2001) hanno riscontrato una sovrapposizione morfologica tra individui provenienti da siti atlantici e mediterranei, suggerendo la mancanza di separazione completa dei granchi costieri europei, con potenziale zona di ibridazione nel sud-ovest iberico che è stata anche confermata da Carlton & Cohen (2003).

Le analisi delle sequenze geniche ribosomiali (16S) e mitocondriali (subunità I della citocromo ossidasi) hanno confermato la suddivisione in due specie (Geller et al., 1997; Roman & Palumbi, 2004). Questa distinzione genetica è stata dimostrata anche nelle larve planctoniche (Darling & Tepolt, 2008). La variazione della sequenza della citocromo ossidasi I (COI) ha rivelato inoltre l'esistenza di tre gruppi genetici di *C. aestuarii* (Adriatico, Ionio e il gruppo che comprende Tirreno e Mediterraneo occidentale), spiegato dalla topografia e dalle circolazioni delle correnti del Mar Mediterraneo, che formano barriere fisiche, favorendo la ritenzione larvale locale (Marino et al., 2011). In *C. maenas*, la variabilità nella sequenza della COI ha rivelato tre gruppi genetici separati (off-shelf, Nord Europa ed Europa Occidentale) che si sono venuti a creare a causa della ritenzione larvale locale associata alla circolazione stagionale nel Mare del Nord (Roman & Palumbi, 2004; Darling et al., 2008; Domingues et al., 2010; Marino et al., 2011).

1.2.3. Speciazione e distribuzione geografica

Il Mar Mediterraneo comprende solo lo 0,82% della superficie marina globale e lo 0,3% del suo intero volume. Tuttavia, ospita tra il 4% e il 18% delle specie marine conosciute, a seconda del phylum considerato (Bianchi & Morri, 2000) e rappresenta un hotspot di biodiversità. L'elevata diversità di specie che si osserva è il risultato della sua storia geologica e della varietà delle condizioni climatiche e idrologiche che l'hanno contraddistinta (Patarnello et al., 2007). Questi fattori possono aver contribuito contemporaneamente alla formazione di habitat molto diversificati all'interno del Mar Mediterraneo, con una conseguente produzione di un alto tasso di endemismo. La complessa storia geologica del Mar Mediterraneo e la sua geografia semichiusa hanno dato luogo a periodi di completo isolamento dall'Oceano Atlantico, come durante la Crisi di Salinità Messiniana (5,3 Milioni), che potrebbe non essere durata più di 0,01 milioni di anni (Krijgsman et al., 1999). Durante questo periodo, il Mar Mediterraneo ha subito un drastico abbassamento

del livello dell'acqua e un aumento di salinità a causa della forte evaporazione. Successivamente, la riapertura dello Stretto di Gibilterra ha consentito la ricolonizzazione del Mar Mediterraneo da parte di specie atlantiche (Briggs, 1974). L'interruzione della connessione atlantico-mediterranea è stata responsabile dell'evoluzione di molte nuove specie, tra cui molte sister species (Schubart et al., 2001; Wilke, 2003). Demeusia (1958) ha suggerito che l'isolamento tra le popolazioni Atlantiche e mediterranee del genere *Carcinus* durante la Crisi di Salinità Messiniana potrebbe averne favorito la speciazione allopatrica. Questa ipotesi è stata successivamente verificata da Geller et al. (1997) e Roman & Palumbi (2004), che hanno studiato le relazioni filogenetiche e filogeografiche tra le due sister species del genere *Carcinus*. La distribuzione geografica nativa dell'antenato comune si trova molto probabilmente nell'area orientale Atlantico-Mediterranea secondo Geller et al. (1997), Roman & Palumbi (2004) e Darling et al. (2008). Oggi, le popolazioni autoctone di *C. maenas* si trovano distribuite lungo la costa Nord-orientale dell'Atlantico e nel Mar di Alboran, mentre *C. aestuarii* è presente in tutto il Mar Mediterraneo. Queste due specie sorelle si sono probabilmente separate tra i 5 e gli 8 milioni di anni fa e questa separazione è attualmente mantenuta vicino al Fronte Almería-Oran (Geller et al., 1997; Roman & Palumbi, 2004; Marino et al., 2011).

1.2.4. Pattern biogeografici e filogeografici

Valutare e confermare la presenza di confini biogeografici nell'ambiente marino è un compito difficile a causa della mancanza di evidenti barriere alla mobilità degli stadi di vita pelagici. Come riportato in precedenza, per molti anni è stato ipotizzato che le specie che presentano una fase di dispersione larvale hanno una grande capacità di diffondersi su grandi distanze, determinando un'elevata connettività tra popolazioni anche lontanamente imparentate (Ragionieri & Schubart, 2013). Tuttavia, il flusso genico nelle specie marine può essere limitato da barriere alla dispersione come salinità e gradienti di temperatura, correnti e meccanismi di ritenzione che possono portare alla struttura della popolazione anche in specie altamente dispersive (Di Bacco et al., 2006). L'evoluzione paleoclimatica e paleogeografica del Mediterraneo durante i periodi glaciali del Pleistocene e il conseguente cambiamento dei fattori abiotici e biotici, ha portato all'isolamento e

alla divergenza di molte popolazioni, a seguito di eventi locali di estinzione e ricolonizzazione (Deli et al., 2018) Ciò a sua volta ha portato alla formazione di unità genetiche intraspecifiche all'interno di vari taxa marini, a causa delle barriere idrografiche che nel corso dei millenni hanno ostacolato il flusso genico (Patarnello et al., 2007). Per quanto riguarda la specie di questo elaborato di tesi, Marino et al. (2011) e Ragionieri & Schubart (2013) hanno riscontrato differenze genetiche consistenti tra le popolazioni delle coste del Mediterraneo occidentale e orientale in Europa. Questa non omogeneità nella struttura genetica della specie è stata successivamente confermata lungo la costa mediterranea dell'Africa centrale, quando Deli et al. (2015) hanno rilevato una netta differenza a livello genetico tra gli individui campionati nei siti orientali e occidentali della Tunisia, tra lo stretto siculo-tunisino (Deli et al., 2014; Deli et al., 2015). Le oscillazioni del livello del mare durante il Pleistocene sono state la potenziale causa dell'isolamento totale o parziale del Mar Nero, del Mar Egeo e del bacino del Mediterraneo orientale (Svitoch et al., 2000). Questi processi sono stati mantenuti dall'impatto dell'attuale isolamento idrografico dei mari Adriatico, Ionio ed Egeo (Patarnello et al., 2007), portando alla formazione di queste popolazioni geneticamente distinte.

Le popolazioni del Mediterraneo occidentale e del Mar Tirreno presentano una stabilità demografica nel tempo, mentre le popolazioni del Mar Adriatico e del Mar Ionio mostrano i segni di un'espansione demografica avvenuta tra i 10000 e i 20000 anni fa (Marino et al., 2011). Durante l'ultima glaciazione, in particolare, si verificarono drastiche alterazioni all'interno del Mediterraneo (Thiede, 1978), tra cui un drastico abbassamento del livello del mare in corrispondenza del picco glaciale avvenuto circa 18000 anni fa. In corrispondenza di questo picco, il Mar Adriatico aveva un'estensione molto più limitata e si estendeva a Nord solo sino all'area del Gargano, per raggiungere poi l'attuale configurazione in seguito all'innalzamento del livello delle acque nel periodo postglaciale. Alla luce di questo scenario, Marino et al. (2011) hanno ipotizzato che il Mar Adriatico possa essere stato colonizzato da popolazioni di *C. aestuarii* probabilmente originarie dell'adiacente Mar Ionio. L'espansione demografica riscontrata sarebbe quindi dovuta alla colonizzazione e formazione della nuova popolazione da parte degli individui colonizzatori in seguito alla nuova disponibilità di habitat.

La storia geologica e paleoclimatica recente del Mar Mediterraneo ha quindi avuto un impatto notevole a livello degli ecosistemi costieri e di transizione, influenzando le dinamiche evolutive e di popolazione di specie, come *C. aestuarii*, che vivono negli ambienti lagunari. Per quanto riguarda le lagune dell'Alto Adriatico, si tratta pertanto di ecosistemi altamente dinamici e di recente formazione.

1.3. Ecosistemi lagunari e Laguna di Venezia

Le lagune sono zone di transizione tra terra e mare e possono essere definite come corpi idrici poco profondi, situati lungo la costa o un bacino costiero, separati dal mare da un cordone litorale, ma comunicante con esso attraverso bocche lagunari. (Kjerfve, 1994). Le lagune costiere si formano e si mantengono attraverso il trasporto e l'accumulo dei sedimenti. I sedimenti trasportati da fiumi, onde, correnti, vento e maree (Nichols & Boon, 1994) si accumulano nei delta fluviali di paludi e pianure dove la vegetazione acquatica rallenta le correnti. Se il processo di sedimentazione è intenso e si protrae nel tempo può portare eventualmente alla formazione delle lagune (Nichols & Boon, 1994). Le barriere lagunari sono costantemente erose dalle onde e dal vento e richiedono una continua deposizione di sedimenti per il loro mantenimento (Bird, 1994). La quantità e la qualità dell'acqua in una laguna è influenzata dalla velocità con cui essa perde o guadagna acqua per evaporazione, precipitazione, immissione di acque sotterranee, deflusso superficiale e scambio con l'oceano/mare. Lo scambio laguna-oceano/mare è guidato dalle maree e dall'azione delle onde (Zimmerman, 1981) ed è spesso la componente più importante del bilancio idrico lagunare (Smith, 1994). Il "flushing rate", ossia la velocità con cui l'acqua entra, circola ed esce dalla laguna, è una proprietà fisica fondamentale e controlla il tempo di ritenzione dei costituenti idrici. Le lagune tendono ad avere bassi valori di "flushing rate" a causa dello scambio idrico limitato con l'esterno, contribuendo a un'elevata produttività primaria e a concentrazioni potenzialmente elevate di inquinanti (Spaulding, 1994). Questi ambienti supportano una vasta gamma di servizi ecosistemici di alto valore e che sono indispensabili per la società, tra cui la pesca, la protezione dalle tempeste, il turismo e altri ancora, quindi risulta necessaria la loro salvaguardia. Il cambiamento climatico è solo una delle tante fonti di stress in grado di compromettere negativamente il normale funzionamento degli ecosistemi lagunari e, mentre i suoi

effetti si manifestano lentamente nel corso di decenni e su scala spaziale regionale e continentale, i fattori di stress locali e antropogenici possono agire contemporaneamente a più scale temporali e spaziali e avere impatti profondi e improvvisi (Anthony et al., 2009).

Per quanto riguarda questo lavoro di tesi, l'attenzione si è focalizzata su campioni provenienti dall'Alto Adriatico, con una particolare attenzione alla Laguna di Venezia. I sistemi lagunari dell'Alto Adriatico si sono originati in seguito alla trasgressione marina avvenuta durante l'Olocene all'incirca 6000 anni fa, che ha portato ad un aumento sostanziale del livello del mare e all'inondazione dell'Adriatico settentrionale. In seguito, all'incirca 2000 anni fa, questo grande sistema lagunare si è separato in una serie di sottosistemi più piccoli, portando alla formazione della Laguna di Venezia (Brambati, 1992).

La Laguna di Venezia è situata a nord-ovest del Mar Adriatico. Si estende per 50 km di lunghezza, con una superficie di 500 km² ed è caratterizzata da una complessa rete di canali, piane e secche (Molinari et al., 2007). Lo scambio idrico tra la laguna e il Mar Adriatico settentrionale avviene attraverso le tre bocche di porto poste sul versante orientale della laguna: Lido, Malamocco e Chioggia (Figura 1.3). Il primo è largo circa 1000 m, e gli altri circa 500 m. La profondità massima del fondale è di circa 8 m per Chioggia e 14 m per Malamocco e Lido. In generale, i fondali della laguna sono poco profondi, con profondità medie dell'ordine di 1 m, ma sono presenti anche alcuni canali profondi (profondità massima 20 m) che conducono verso l'interno da ciascuna bocca, diramandosi all'interno del bacino (Ghezzi et al., 2010). Tradizionalmente la laguna è suddivisa in tre sottobacini, uno per ogni bocca, separati da due bacini idrografici (Solidoro et al., 2004). Lo scambio di acqua che avviene attraverso le bocche di porto per ogni ciclo di marea è circa un terzo del volume totale della laguna (Gacic & Solidoro, 2004). La stratificazione delle masse d'acqua è visibile solo a una certa distanza dall'ingresso delle bocche, dove l'energia delle maree è bassa. All'interno della laguna, in prossimità delle bocche, la velocità dell'acqua è elevate (oltre 1 ms⁻¹) e il taglio verticale crea una turbolenza sufficiente per mescolare la colonna d'acqua. Di conseguenza, gli scambi d'acqua tra laguna e mare sono essenzialmente barotropici (Gacic et al., 2002). Circa un quarto (140 km²) della superficie totale lagunare è occupato da distese

fangose che formano zone paludose (barene), che affiorano dall'acqua solo durante la bassa marea. La barena è un ecosistema caratterizzato da specie vegetali e animali adattate alla continua variazione di parametri ambientali quali la salinità, l'umidità e la siccità. Durante l'alta marea la barena assorbe un enorme volume d'acqua che viene in parte rilasciato durante il periodo di bassa marea. Di conseguenza, la barena esercita un effetto regolatorio sul livello dell'acqua della laguna (Ravera, 2000). Dal punto di vista idrodinamico, la laguna è governata dalle maree dell'Alto Adriatico che due volte al giorno entrano ed escono dalla laguna, attraverso le bocche di porto, raggiungendo due punte massime e due punte minime (maree semidiurne). Le variazioni dei livelli massimi e minimi di marea sono determinate da fattori astronomici e meteorologici: la bassa pressione, i venti di scirocco e di bora sono i responsabili del fenomeno dell'alta marea, mentre l'alta pressione e la presenza di forti venti provenienti da nord-ovest sono responsabili del fenomeno della bassa marea (www.mosevenezia.eu/ecosistema/).



Figura 1.3. In figura è possibile apprezzare una visione dall'alto della Laguna di Venezia e delle tre bocche di porto: Lido, Malamocco e Chioggia. (www.mosevenezia.eu/progetto)

2. SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi si vuole studiare il differenziamento genetico della specie di granchio *Carcinus aestuarii* in tre lagune dell'Alto Adriatico: Venezia, Marano e Goro, attraverso l'utilizzo dei marcatori microsatellite, con lo scopo di testare la possibile presenza di eventuali differenze geografiche e temporali. Dal 2019 al 2021, sono stati effettuati 6 campionamenti, 2 per ogni anno: il primo in primavera-estate e il secondo in autunno-inverno. Sono quindi stati utilizzati in totale 2116 individui genotipizzati mediante 11 *loci* microsatellite. A questi sono stati aggiunti 482 campioni provenienti dagli stessi siti geografici campionati negli anni 2005, 2006 e 2007 ed utilizzati in uno studio realizzato da Marino et al. nel 2010, per un totale di 2560 individui. Il dataset definitivo è stato utilizzato per condurre analisi di genetica di popolazione della specie in esame, con l'intento di indagare la possibile presenza di un differenziamento geografico all'interno della Laguna di Venezia e tra Venezia e le due lagune limitrofe, Marano e Goro. Inoltre, si è voluto testare la possibile esistenza di differenziamento genetico tra i campioni della Laguna di Venezia dei due diversi periodi temporali (2005-2006-2007 e 2019-2020-2021). È stato anche stimato il valore della dimensione effettiva di popolazione di *C. aestuarii* nella Laguna di Venezia, a partire dalle frequenze alleliche rilevate nelle diverse popolazioni.

Questo progetto di tesi si inserisce all'interno del programma di ricerca scientifica Venezia 2021, coordinato da CORILA (<http://www.corila.it/it/Venezia2021>), che prevede un complesso integrato di strumenti osservativi e di elaborazione dei dati raccolti, al fine di contribuire a tenere sotto controllo il corretto equilibrio dell'ecosistema lagunare. In questo modo sarà possibile proteggere il naturale funzionamento ecologico lagunare e allo stesso tempo salvaguardare i servizi ecosistemici forniti dalla laguna. Il programma di ricerca Venezia2021 è stato avviato il 1° novembre 2018 ed è terminato il 30 giugno 2022 e ha coinvolto l'Università Ca' Foscari di Venezia, l'Università IUAV di Venezia, l'Università di Padova, il Consiglio Nazionale delle Ricerche e l'Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale. La laguna è un ambiente di transizione complesso, frutto dell'interazione fra terra e mare e, secondo quanto affermato nel programma di ricerca, la gestione del sistema lagunare non può prescindere dalla

conoscenza dei processi che accadono alle interfacce terra-laguna e laguna-mare, i cui effetti coinvolgono l'intero ecosistema lagunare. La recente attivazione del sistema MOSE, (www.mosevenezia.eu/progetto), un sistema di paratoie mobili costruite all'altezza delle tre bocche di porto del Lido, Malamocco e Chioggia per proteggere la città di Venezia dall'allagamento dovuto all'innalzamento della marea, potrebbe introdurre importanti modificazioni nel trasporto di sedimenti lungo il litorale e nelle interazioni con i flussi in entrata e in uscita dalla laguna. A causa dell'innalzamento del livello delle acque marine, nei prossimi anni la frequenza degli interventi di chiusura potrebbe aumentare significativamente (Mel et al., 2021). In questa prospettiva, investigare gli effetti dell'attivazione delle paratoie mobili sui flussi di sostanza organica e inorganica è fondamentale per la gestione dell'ecosistema. È importante ricordare che la laguna ha un'importanza fondamentale nel ciclo vitale di molte specie marine. Risulta quindi necessario anche conoscere gli effetti delle regolazioni sui movimenti di organismi chiave/indice per l'ecosistema (<http://venezia2021.corila.it/tematiche/>). Il progetto Venezia 2021 verte a migliorare la comprensione degli scambi di organismi mare-laguna in prossimità delle paratoie del sistema MOSE, anche attraverso lo studio delle variazioni temporali e spaziali nella composizione genetica di specie lagunari potenzialmente interessate. Questo consentirà di stimare, attraverso l'utilizzo di modelli analitici e numerici, i trend evolutivi nel medio e lungo periodo e gli impatti sull'ecosistema.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Il campionamento

In questo lavoro di tesi sono stati analizzati 2116 esemplari di *Carcinus aestuarii*, campionati negli anni 2019, 2020 e 2021 nell'ambito del progetto Venezia 2021 in diversi siti della Laguna di Venezia e nelle lagune di Marano e Goro (Tabella 3.1). I campioni estratti e amplificati personalmente durante il periodo di internato svolto presso il Dipartimento di Biologia dell'Università degli studi di Padova, sono stati 440, e corrispondono al campionamento dell'autunno 2021 e al sito LN5 della primavera 2021. Della rimanente parte, erano già presenti i genotipi, grazie al lavoro svolto precedentemente da altri operatori. Per questa tesi sono invece state svolte integralmente le analisi dei dati.

In totale, nel progetto Venezia 2021, sono stati effettuati 6 campionamenti, 2 per ogni anno: il primo in primavera-estate (tra maggio e luglio), il secondo in autunno (tra fine ottobre e dicembre).

Per quanto riguarda la Laguna di Venezia, i campionamenti sono stati eseguiti in 6 siti distribuiti in diverse zone della laguna, con lo scopo di ottenere un campione rappresentativo che catturasse il più possibile la variabilità degli ambienti che la caratterizzano, nelle sue zone più interne e nelle zone più esterne a diretto contatto con l'ambiente marino. Sono dunque stati selezionati due siti nella laguna nord (LN5 e LN6), due nella laguna centrale (LC3 e LC4) e due della laguna sud (LS1 e LS2) (Tabella 3.1).

Tabella 3.1. Sono riportati da sinistra verso destra: le sigle di riconoscimento delle popolazioni campionate, il sito, l'anno e la stagione di campionamento e il numero di individui campionati per ogni popolazione.

SIGLA	SITO DI CAMPIONAMENTO	ANNO	STAGIONE	N° CAMPIONI
MA 19P	Marano	2019	Primavera	80
MA 19A			Autunno	54
MA 20P		2020	Primavera	50
MA 20A			Autunno	50
MA 21P		2021	Primavera	50
MA 21A			Autunno	50

SIGLA	SITO DI CAMPIONAMENTO	ANNO	STAGIONE	N° CAMPIONI
LN5 19P	Laguna nord di Venezia: Ca' Zane	2019	Primavera	47
LN5 19A			Autunno	48
LN5 20P		2020	Primavera	50
LN5 20A			Autunno	49
LN5 21P		2021	Primavera	50
LN5 21A			Autunno	43
LN6 19P	Laguna nord di Venezia: bocca di porto di Lido	2019	Primavera	50
LN6 19A			Autunno	46
LN6 20A		2020	Autunno	49
LN6 21A		2021	Autunno	50
LC3 19P	Laguna centrale di Venezia: Poveglia	2019	Primavera	49
LC3 19A			Autunno	52
LC3 20P		2020	Primavera	49
LC3 20A			Autunno	48
LC3 21P		2021	Primavera	50
LC3 21A			Autunno	47
LC4 19P	Laguna centrale di Venezia: Malamocco	2019	Primavera	50
LC4 20P		2020	Primavera	48
LC4 20A			Autunno	49
LC4 21P		2021	Primavera	50
LC4 21A			Autunno	50
LS1 19P	Laguna sud di Venezia: Motta Bombae	2019	Primavera	50
LS1 19A			Autunno	53
LS1 20P		2020	Primavera	48
LS1 20A			Autunno	49
LS1 21A		2021	Autunno	50
LS2 19P	Laguna sud di Venezia: Baia dei porci	2019	Primavera	50
LS2 19A			Autunno	48
LS2 20P		2020	Primavera	53
LS2 20A			Autunno	49
LS2 21P		2021	Primavera	50
LS2 21A			Autunno	50
FE 19P	Sacca degli Scardovari	2019	Primavera	54
GO 20P	Goro	2020	Primavera	54
GO 20A			Autunno	50
GO 21A			Autunno	50

3.2. Conservazione dei campioni

I campioni di *C. aestuarii* raccolti sono stati conservati temporaneamente in freezer a -20°C . Successivamente si è proceduto a prelevare da ogni esemplare i chelipedi ed eventualmente anche uno o più pereopodi, in relazione alle dimensioni e allo stato di conservazione dell'animale. Il materiale prelevato è stato conservato in etanolo assoluto in provette falcon da 15 ml, correttamente etichettate per permettere l'identificazione univoca del campione.

3.3. Estrazione del DNA

Come protocollo per l'estrazione del DNA da tessuto è stato scelto il metodo *Salting out* (Patwary et al., 1994), un metodo di estrazione a base di sali ad alta resa. Questo metodo prevede la lisi delle cellule mediante tampone di lisi cellulare e il trattamento con proteinasi K allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare proteine e contaminanti presenti, che vengono allontanati mediante precipitazioni con i sali. Infine, mediante trattamento con isopropanolo ed etanolo si ottiene la precipitazione del DNA. La solubilità delle proteine dipende fortemente dalla concentrazione salina (forza ionica) della soluzione. Esse sono scarsamente solubili nell'acqua pura e la loro solubilità aumenta man mano che si instaurano delle interazioni tra gli ioni e la superficie delle proteine. Ad elevate concentrazioni di sali, a causa delle interazioni tra gli ioni salini e l'acqua diminuisce l'idratazione sulla superficie delle proteine, portando alla loro aggregazione e precipitazione (Garret & Grisham, 2014). Il metodo *Salting out* sfrutta questa proprietà per separare proteine e contaminanti in soluzione dal DNA che si vuole isolare.

La prima fase dell'estrazione del DNA, che è comune a tutti i metodi di isolamento degli acidi nucleici, è la lisi cellulare, attraverso l'uso della proteinasi K, detergenti e agenti chelanti (Nasiri et al., 2005). Pochi milligrammi di muscolo (circa 30 mg) sono stati prelevati da chelipedi o pereiopodi, con pinzette e bisturi sterili, ed introdotti in una provetta da 2 ml, contenente 300 µl di tampone di lisi (EDTA 0.1 M, TRIS 0,05 M, pH 8) e 37,5 µl di SDS 10 %. Ad ogni campione sono poi stati aggiunti 12 µl di proteinasi K (20 mg/ml), ed il tutto è stato mescolato per inversione. L'SDS facilita la disgregazione della membrana cellulare e la denaturazione delle proteine, la proteinasi K agisce digerendo le proteine in maniera enzimatica e gli agenti chelanti contenuti nel tampone di lisi si legano ai cationi bivalenti dei cofattori della nucleasi e previene così la degradazione del DNA da parte di questi enzimi. A questo punto le provette sono state miscelate tramite *vortex* per pochi secondi, per poi essere successivamente incubate in un termoblocco dotato di agitazione (ThermoMixer modello F2.0, Eppendorf®) ad una temperatura di 56 °C per almeno 1 ora, fino a completa dissoluzione dei tessuti, con sospensione tramite *vortex* ogni 30 min.

Lo step successivo è stato quello di aggiungere 90 µl di soluzione satura di NaCl (>6 M) ad ogni campione. La soluzione è stata messa in agitazione in *vortex* per 15 min circa per permettere la precipitazione delle proteine in soluzione che poi, mediante centrifugazione a freddo (4 °C per 30 minuti alla massima velocità, Eppendorf® modello 5424R), vengono separate formando un pellet sul fondo della provetta, mentre il DNA rimane in fase liquida (surnatante). Il surnatante viene prelevato e trasferito in una nuova provetta da 1,5 ml contenente un uguale volume di isopropanolo freddo (450 µl) e centrifugato a freddo alla massima velocità per 20 minuti. Questo passaggio permette la deposizione del DNA sotto forma di pellet. L'isopropanolo agisce determinando una riduzione delle molecole d'acqua libere responsabili della solvatazione della biomolecola in soluzione. Di conseguenza, aumenteranno le forze idrofobiche ed elettrostatiche che agiranno portando all'aggregazione e precipitazione delle molecole di DNA (Freitas et al., 2006). Il surnatante viene nuovamente prelevato e nella stessa provetta vengono aggiunti 500 µl di etanolo 70 %, il tutto centrifugato a temperatura ambiente alla massima velocità per 5 minuti. L'utilizzo dell'etanolo permette un'ulteriore purificazione del prodotto desiderato attraverso l'eliminazione di contaminanti residui come sali e detergenti. Una volta rimossa la soluzione contenente etanolo, i campioni vengono lasciati ad essiccare in termoblocco alla temperatura di 37 °C per permettere l'evaporazione dell'etanolo residuo. Completato il protocollo, il pellet è risospeso in 100 µl di acqua sterile.

Il DNA genomico proveniente da ogni campione è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 1% in buffer TBE 1X con GelRed (Biotium®) come intercalante, per avere una verifica qualitativa della corretta riuscita dell'estrazione.

È stato anche utilizzato uno spettrofotometro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™) per la quantificazione del DNA. È uno strumento in grado di misurare la quantità di radiazione assorbita dalla materia che è proporzionale alla quantità di materia stessa. Viene rilevata l'assorbanza a diverse lunghezze d'onda da cui è possibile estrapolare informazioni sulla quantità e qualità del DNA che è stato estratto.

Si rilevano:

- Assorbanza a 260 nm = fornisce l'informazione relativa alla concentrazione del DNA poiché è la lunghezza d'onda corrispondente al picco di assorbimento delle basi azotate che compongono i nucleotidi.
- Assorbanza a 280 nm = lunghezza d'onda corrispondente ai picchi di assorbimento di proteine e fenoli presenti nel campione (Teare et al., 1997).
- Assorbanza a 230 nm = lunghezza d'onda che fornisce informazione sul grado di contaminazione da carboidrati, composti aromatici, fenoli e EDTA.
- Rapporto A260/A280 = superiori a 1,8 per DNA o 2,0 per RNA indicano campioni puri; valori di rapporto inferiori indicano la presenza di proteine o altri contaminanti.
- Rapporto A260/A230 = fornisce un'indicazione del livello di contaminazione da sali del DNA purificato. Più basso è il rapporto, minore sarà la purezza del DNA. Come linea guida, il rapporto A260/A230 dovrebbe essere maggiore di 1,5, idealmente vicino a 1,8 (Gallagher, 1989;).

Queste informazioni, insieme alla valutazione del profilo osservato nella corsa elettroforetica (qualità della banda), sono state importanti per determinare come diluire efficacemente i campioni per la successiva amplificazione. In generale i campioni sono stati diluiti 1:10; tuttavia, per quelli poco concentrati le diluizioni sono state fatte a 1:5 o in rari casi non sono state fatte. Rari sono stati anche i casi in cui si è resa necessaria una diluizione 1:15 per i campioni molto concentrati.

3.4. I marcatori microsatellite

Per lo studio del differenziamento genetico di *C. aestuarii* nell'Alto Adriatico sono stati utilizzati i microsatelliti, marcatori genetici che vengono utilizzati spesso in studi di evoluzione e genetica di popolazione (Estoup & Angers, 1998). Si tratta di brevi sequenze di DNA ripetute in tandem di 1-6 nucleotidi, anche conosciute come Simple Sequence Repeats (SSR), Variable Number Tandem Repeats (VNTR) e Short Tandem Repeats (STR) (Selkoe & Toonen, 2006). I microsatelliti sono marcatori codominanti ereditati in modo mendeliano (Wright et al., 1994). In una specie diploide, come *C. aestuarii*, ogni marcatore codominante identificherà un allele in un individuo omozigote e due alleli in un individuo eterozigote. Grazie a

questa loro proprietà, è possibile calcolare facilmente le frequenze alleliche del campione di popolazione in esame (Freeland, 2011). Se si possiedono informazioni sulle regioni fiancheggianti di un *locus* microsatellite, che si presentano conservate tra individui della stessa specie, è possibile progettare brevi tratti di DNA, chiamati oligonucleotidi o *primer*, in grado di legarsi in maniera specifica alla regione fiancheggiante e guidare l'amplificazione del *locus* attraverso la reazione a catena della polimerasi (PCR). A causa dello slittamento e degli errori di correttore di bozze durante la replicazione del DNA, le sequenze ripetute dei microsatelliti sono soggette ad un alto tasso di mutazione. Le mutazioni cambiano principalmente il numero di ripetizioni della sequenza, facendo sì che gli alleli in un *locus* differiscano soprattutto in base alla lunghezza. Gli alti livelli di diversità allelica che contraddistinguono questi marcatori li rende particolarmente idonei per condurre studi genetici di processi che agiscono su scale temporali ecologiche (Schloëtterer, 2000).

Durante la fase di amplificazione dei microsatelliti possono tuttavia sorgere diversi problemi (Guichoux et al., 2011), che possono compromettere il *genotyping* e il *binning*, con conseguente aumento dei tassi di errore:

- *Stuttering*: ciò corrisponde all'amplificazione di frammenti più corti di una o poche ripetizioni rispetto al frammento originale dei prodotti di PCR (Shinde et al., 2003). Per ridurre lo *stuttering*, un'opzione consiste nel ridurre la temperatura di denaturazione a 83 °C (Olejniczak & Krzyzosiak, 2006), un'altra consiste nell'utilizzare polimerasi di nuova generazione, come gli enzimi di fusione (Fazekas et al., 2010). Tuttavia, la soluzione migliore è selezionare *loci* che presentano uno *stuttering* ridotto sin dall'inizio (O'Reilly et al., 2000).
- *Split peaks*: è causato dall'aggiunta di un nucleotide (generalmente un'adenina) ai frammenti di PCR da parte della Taq polimerasi (Clark, 1988; Esselink et al., 2003). Quando questa adenilazione è incompleta, provoca la formazione di doppi picchi, compromettendo particolarmente il riconoscimento di genotipi eterozigoti con alleli vicini.
- Alleli nulli: sono alleli che non vengono rilevati in individui eterozigoti e che portano erroneamente a considerare omozigoti individui eterozigoti a causa della loro mancata amplificazione (Guichoux et al., 2011). Una

potenziale causa che porta alla generazione di alleli nulli nei microsatelliti è la scarsa capacità di *annealing* del *primer* dovuta alla divergenza della sequenza nucleotidica (ad esempio che coinvolge mutazioni puntiformi, inserzioni e delezioni) in una o entrambe le regioni fiancheggianti (Dakin & Avise, 2004). Una soluzione al problema potrebbe essere quella di progettare *primer* specifici nelle regioni polimorfiche, utilizzando informazioni preliminari riguardo la variabilità della sequenza in esame (Megléczy et al., 2010). Gli alleli nulli possono anche essere generati quando vengono amplificati alleli di dimensione molto diversa (Wattier et al., 1998). Questo succede poiché gli alleli di breve lunghezza spesso si amplificano in modo più efficiente di quelli più grandi, determinando un *bias* a favore dell'allele più piccolo nella fase di rilevazione in un individuo eterozigote. Tale problema potrebbe essere parzialmente risolto aumentando la quantità di campione da caricare. Una terza fonte di alleli nulli potrebbe dipendere da una scarsa riuscita della PCR, a causa della bassa qualità o quantità del DNA utilizzato. In una tale situazione, solo uno o pochi *loci* (o alleli) potrebbero non venire amplificati in maniera adeguata, mentre gli altri si amplificherebbero con relativa facilità. Quando la quantità di DNA amplificato per un *locus* è poca in alcuni campioni ma non in altri, alcuni individui potrebbero apparire "omozigoti" piuttosto che eterozigoti per l'allele nullo. (Gagneux et al., 1997; Garcia de Leon et al., 1998).

Nel presente lavoro di tesi sono stati amplificati e analizzati 11 *loci* microsatellite. Di questi, 8 sono stati isolati dalla specie oggetto di studio, *C. aestuarii*: Cae01, Cae07, Cae14, Cae17, Cae30, Cae33, Cae71, Cae86 (Marino et al., 2008); e 3 isolati dalla sua *sister species*, *C. maenas*: Cma02, Cma04, Cma14 (Tepolt et al., 2006).

3.5. La PCR

Gli 11 *loci* microsatellite analizzati in questo lavoro di tesi sono stati amplificati tramite PCR, ideata nel 1983 da Kary B. Mullis. Questa tecnica permette di selezionare e amplificare esponenzialmente ed in poco tempo, da una miscela eterogenea di DNA, una particolare sequenza di interesse. In sostanza, si tratta di una replicazione *in vitro* del frammento di DNA ottenuta mediante l'utilizzo di una

DNA polimerasi termoresistente, *d*NTPs, ioni magnesio, buffer di reazione contenente altri sali e due oligonucleotidi lunghi 20-30 nucleotidi che fungono da inneschi (*primer*) per la replicazione e che sono responsabili della specificità della reazione. Per poter fare una PCR, se non si hanno informazioni sulla sequenza che si vuole amplificare, è necessario conoscere almeno le sequenze fiancheggianti, così da poter progettare i *primer* (Pierce, 2016; Amaldi et al., 2021). Un ciclo di PCR consiste di tre fasi, che vengono ripetute numerose volte (circa 30):

- Denaturazione: la temperatura deve essere portata sopra i 90 °C per permettere la denaturazione della doppia elica DNA. Spesso nel primo ciclo, il DNA è denaturato per un periodo di tempo prolungato così da garantire la completa separazione dei due filamenti. Il tempo è 1-2 minuti fino a 5 minuti. Anche la Taq polimerasi viene attivata da questo passaggio.
- *Annealing*: dopo la separazione dei filamenti di DNA, la temperatura viene abbassata in modo tale che i *primer* possano attaccarsi ai singoli filamenti di DNA. Una temperatura inappropriata durante la fase di *annealing* può risultare in un appaiamento incorretto tra i *primer* e il DNA stampo portando alla formazione di aspecifici.
- Estensione: la DNA polimerasi procede attraverso il riempimento delle parti mancanti portando alla formazione di filamenti di nuova sintesi. La sintesi ha inizio partendo dal sito di *annealing*, percorrendo il filamento di DNA per tutta la sua estensione. Il tempo di estensione dipende sia dalla DNA polimerasi che dalla lunghezza del frammento di DNA da amplificare. Come regola generale, 1 minuto per 1 kbp (Rahman et al., 2013).

Una volta raggiunto il *plateau* la reazione va verso l'esaurimento, e non si accumuleranno più prodotti di amplificazione a causa della disponibilità limitata dei reagenti e degli enzimi utilizzati (Rahman et al., 2013). I parametri (temperatura, tempi e concentrazioni) delle tre fasi della PCR possono essere modificati per tenere conto di vari fattori, tra cui la quantità di materiale di partenza, la presenza di aspecifici, la composizione in basi, la lunghezza del tratto da amplificare.

Un aspetto importante da considerare quando si vogliono ottenere degli amplificati di una sequenza specifica è la possibilità di contaminazione del prodotto desiderato. Questo problema si viene a creare a causa della capacità intrinseca della PCR di amplificare anche quantità estremamente piccole di DNA. Per ovviare parzialmente

al problema è necessario adottare in laboratorio le giuste precauzioni e l'utilizzo di controlli negativi di amplificazione (Pierce, 2016).

Gli 11 *loci* microsatellite scelti per lo studio del differenziamento genetico di *C. aestuarii* sono stati amplificati tramite PCR multiplex. Questa è una variante della PCR in cui 2 o più sequenze possono essere amplificate contemporaneamente attraverso l'utilizzo di più coppie di *primer* nella stessa reazione. I *primer* forward sono marcati con un fluoroforo, una molecola che emette fluorescenza dopo aver assorbito fotoni di una certa lunghezza d'onda, e che permette la discriminazione dei singoli *loci* quando sottoposti a *genotyping*. La PCR multiplex è stata descritta per la prima volta da Chamberlain et al. (1988) ed ha il vantaggio di ridurre notevolmente denaro e tempi di lavoro (Markoulatos et al., 2002).

La PCR in multiplex è stata allestita utilizzando i seguenti reagenti:

- Multiplex PCR Master Mix (MMM, Qiagen), contenente la HotStartTaq DNA polimerasi, i *dNTPs*, il buffer di reazione e il MgCl₂, il tutto ad una concentrazione 2X.
- *Primer* mix. Essa contiene i due *primer* forward e reverse, ad una concentrazione di 2 µM, per ognuno dei singoli *loci* che verranno amplificati nella multiplex corrispondente.
- DNA templatato (diluito 1:10) da amplificare.
- H₂O

Ad ogni campione verranno aliquotati i seguenti volumi:

- 5 µl di Master Mix (concentrata 1X)
- 1 µl di *primer* mix (concentrazione 0,2 µM).
- 2 µl di H₂O.
- 2 µl di DNA (50 ng/µl).

Per un totale di 10 µl.

In totale, sono state allestite tre multiplex (Tabella 3.2), utilizzando un termociclatore modello SimpliAmp™ (Applied Biosystems). Il profilo di amplificazione utilizzato è qui riportato ed è identico per tutte le multiplex:

denaturazione	95 °C	15 minuti	
annealing	94 °C	30 secondi	30 cicli
	57 °C	1.30 minuti	
	72 °C	1 minuto	
estensione	60 °C	30 minuti	

Tabella 3.2. In tabella sono riportate le tre multiplex utilizzate per questo lavoro di tesi. Da sinistra verso destra sono riportati: la multiplex, il nome del *locus* con il relativo fluoroforo utilizzato per il *genotyping*, la sequenza dei *primer forward* e *reverse*, il modulo che viene ripetuto, il range dimensionale e la referenza della pubblicazione dove per la prima volta sono stati isolati e caratterizzati i *loci* utilizzati.

MULTIPLEX	Locus	Primer (sequenza 5'-3')	Modulo	Range di dimensione (bp)	Referenza
M1	Cae01 (FAM)	F: CCTAACCTATCTCAACAGTG R: CTGCTTGCCTTGTTTCGTA	(CAT) ₁₂ CGT(CAT) ₈	144-188	(Marino et al., 2008)
	Cae07 (VIC)	F: TGGCTCTTTTCACCTTCTGT R: CTATCGGAAGAGACGCAAGA	(GA) ₂₈	223-367	(Marino et al., 2008)
	Cae14 (NED)	F: AACACATCAGTGAGTGCCAC R: CTAAGCCATCTGGAATCACG	(CACAGA) ₉ CAGA(CACAGA) ₂ GAGA(CACAGA)	197-239	(Marino et al., 2008)
	Cae33 (PET)	F: CCATACAGGGCTGTACAGAAA R: CGGAATCTCGGTTATATGGCTT	(AC) ₁₃ TTT T(AC) ₉	267-335	(Marino et al., 2008)
M2	Cma02 (FAM)	F: TTGATCCATATATCTATTCTTTCTTGC R: TTTGGGGGAAATACTTATCTCTT	(TAGA) ₇	208-314	(Tepolt et al., 2006)
	Cma04 (VIC)	F: GAGCTCCAGGAAACTGTATCTGA R: GCCCTCTATCTCGCTTTATATCTC	(TAGA) ₁₀	127-201	(Tepolt et al., 2006)
	Cma14 (NED)	F: ACGGCTCACCTACGTGCACT R: GGCTGTGGTCTCTGTGTTTCATT	(GGT) ₈	234-270	(Tepolt et al., 2006)
M3	Cae17 (FAM)	F: ACTCACCTCCGTCATCACC R: TCCTGAGCTCCATCAAGACT	(CA) ₄ GC(CA) ₁₃ GC(CA) ₈	145-165	(Marino et al., 2008)
	Cae71 (VIC)	F: CCAGGACTAACAGTGGGTGA R: TGCATGTTAGCCACTCCTCT	(GT) ₁₇	200-276	(Marino et al., 2008)
	Cae86 (NED)	F: GCGGTGAAGAAGATGGAGTA R: GCGAGCTCAAATGAATAATGGT	(GA) ₂₂	198-236	(Marino et al., 2008)
	Cae30 (PET)	F: TACAGGGTAAGCCACAGTCC R: GCAGAAGAGGTCACGAGAAG	(GT) ₉	243-249	(Marino et al., 2008)

Per avere un riscontro qualitativo del successo dell'amplificazione, tutti i prodotti di PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1,8 % in buffer TBE 1X utilizzando GelRed (Biotium) come intercalante.

I *loci* che non sono stati amplificati con successo attraverso le reazioni in multiplex sono stati recuperati allestendo PCR singole con profilo *locus* – specifico (Figura 3.1) Inoltre, per aumentare le probabilità di successo dell'amplificazione, ogni campione è stato diluito tenendo in considerazione la qualità e quantità rilevate attraverso Nanodrop e corsa elettroforetica.

Cae01				Cae07				Cae14				Cae33			
denaturazione	94°C	2 min		denaturazione	94°C	2 min		denaturazione	94°C	2 min		denaturazione	94°C	2 min	
annealing	94°C	30 sec	35 cicli	annealing	94°C	30 sec	35 cicli	annealing	94°C	30 sec	35 cicli	annealing	94°C	30 sec	30 cicli
	53°C	40 sec			50°C	40 sec			57°C	40 sec			52°C	40 sec	
	72°C	1 min			72°C	1 min			72°C	1 min			72°C	1 min	
estensione	72°C	5 min		estensione	72°C	5 min		estensione	72°C	5 min		estensione	72°C	5 min	
Cma04				Cma04				Cma14							
denaturazione	94°C	2 min		denaturazione	94°C	2 min		denaturazione	94°C	2 min					
annealing	94°C	30 sec	30 cicli	annealing	94°C	30 sec	30 cicli	annealing	94°C	30 sec	35 cicli				
	52°C	40 sec			56°C	40 sec			59°C	40 sec					
	72°C	1 min			72°C	1 min			72°C	1 min					
estensione	72°C	5 min		estensione	72°C	5 min		estensione	72°C	5 min					
Cae17				Cae71				Cae86				Cae30			
denaturazione	94°C	2 min		denaturazione	94°C	2 min		denaturazione	94°C	2 min		denaturazione	94°C	2 min	
annealing	94°C	30 sec	30 cicli	annealing	94°C	30 sec	30 cicli	annealing	94°C	30 sec	35 cicli	annealing	94°C	30 sec	30 cicli
	55°C	40 sec			56°C	40 sec			51°C	40 sec			55°C	40 sec	
	72°C	1 min			72°C	1 min			72°C	1 min			72°C	1 min	
estensione	72°C	5 min		estensione	72°C	5 min		estensione	72°C	5 min		estensione	72°C	5 min	

Figura 3.1. Profilo di amplificazione *locus* – specifico per ognuno degli 11 *loci* microsatellite utilizzati. Essi sono riportati in tre righe suddivisi per multiplex 1, 2 e 3

3.6. Il Genotyping

I campioni amplificati sono stati diluiti ad una concentrazione indicativa di 1:3 e le piastre allestite sono state mandate al centro BMR-Genomics di Padova (www.bmr-genomics.it) per essere sottoposti a elettroforesi capillare (*genotyping*). I campioni che non sono stati genotipizzati correttamente sono stati riamplicati cercando di considerare tutti i possibili parametri che avrebbero contribuito all'insuccesso (profilo di amplificazione, qualità e quantità del DNA di estratti e amplificati).

L'elettroforesi capillare (CE) è uno strumento che permette la separazione dei frammenti di DNA all'interno di un piccolo capillare di quarzo (diametro da 50 a 100 µm), in presenza di un'alta tensione di voltaggio (kilovolt). I capillari vengono riempiti con una matrice setacciata e i frammenti di DNA vengono separati in base

alla loro lunghezza, analogamente alla normale elettroforesi su gel. Il DNA viene rilevato attraverso l'assorbimento di luce ultravioletta o dall'utilizzo di sonde fluorescenti. La quantità di DNA richiesta per la separazione è nell'ordine del nanogrammo e la risoluzione della singola base nucleotidica può essere facilmente ottenuta da frammenti di DNA lunghi centinaia di basi. L'utilizzo di standard appropriati è inoltre necessario per definire accuratamente la dimensione dei frammenti (Smith & Nelson, 2004). Per permetterne la rilevazione, in questo lavoro di tesi sono stati utilizzati i fluorofori, legati al *primer forward* di ogni coppia di *primer*. Il file output che viene restituito una volta avvenuta la rilevazione e l'elaborazione dei dati è sotto forma di elettroferogramma, che restituisce il segnale della molecola sotto forma di picco. Per ogni campione sono stati utilizzati più fluorofori con diversi spettri di emissione, per permettere la rilevazione di più *loci* contemporaneamente. Questo è possibile se i *loci* da genotipizzare hanno un fluoroforo diverso o, nel caso in cui abbiano lo stesso fluoroforo, il range di lunghezza sia non sovrapponibile.

3.7. Lo Scoring

Lo *scoring* degli alleli per ogni *locus* ed individuo è stato effettuato manualmente utilizzando il software Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems). Questo programma permette di visualizzare assieme o singolarmente i fluorofori relativi ad un determinato *locus*. La determinazione della lunghezza dei singoli alleli avviene attraverso la rilevazione dei picchi. Quando in un individuo viene rilevato soltanto un picco, vuol dire che è omozigote per quel *locus* (Figura 3.2); se invece vengono rilevati due picchi, l'individuo sarà eterozigote (Figura 3.3). Se non viene rilevato nessun picco oppure ne vengono rilevati più di due vuol dire che ci sono stati problemi durante l'amplificazione (ad esempio, il *locus* non è stato amplificato correttamente), oppure durante l'allestimento delle piastre che sono state mandate a genotipizzare (ad esempio, i pozzetti potrebbero essere stati contaminati dall'operatore a causa dell'erronea aggiunta di materiale genetico derivante da altri individui).

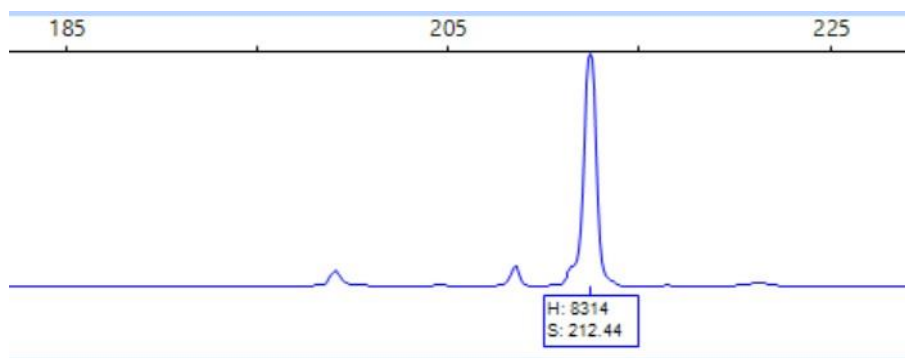


Figura 3.2. *Scoring* del locus Cae01, marcato con fluoroforo FAM. Esempio di individuo omozigote, con un solo picco di 212,44 bp.

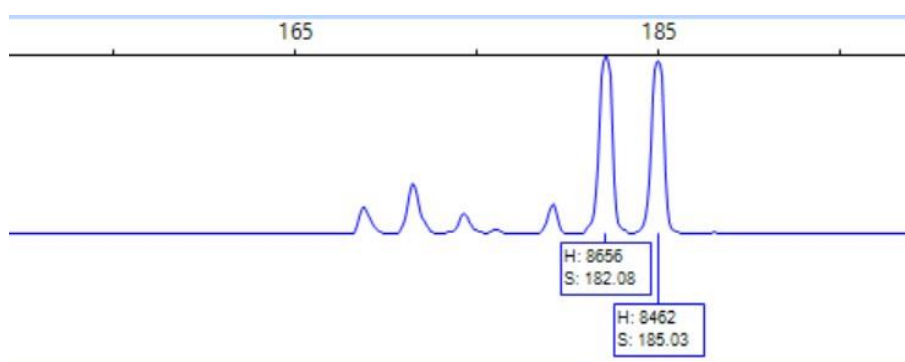


Figura 3.3. *Scoring* del locus Cae01, marcato con fluoroforo FAM. Esempio di individuo eterozigote, con due picchi ben distinti di 182,08 e 185,03 bp.

3.8. Il Binning

Lo *scoring* su questo dataset è stato fatto manualmente da tre operatori diversi in modo tale da poter valutare e correggere possibili discrepanze nei risultati ottenuti. Nei suddetti casi si è proceduto attraverso un ulteriore controllo e verifica su Peak Scanner. Insieme ai dati raccolti nel 2019, 2020 e 2021, sono stati utilizzati anche 482 dei 601 genotipi (Tabella 3.3), provenienti da un lavoro analogo precedente di Marino et al. (2010), campionati negli anni 2005-2006-2007, per valutare, attraverso le successive analisi, se fosse presente un segnale di differenziamento genetico temporale. Dalle analisi sono stati esclusi i siti CE_2006 e CI_2006, perché mancavano del locus Cae33, e i campioni con meno di 8 *loci* informativi sugli 11 utilizzati. Tuttavia, a causa delle differenze nei metodi di analisi utilizzati tra i campioni nuovi e vecchi e per evitare di rilevare più classi alleliche di quelle esistenti, si è deciso di normalizzare il dataset completo, utilizzando il software Allelogram versione 2.2 (Morin et al., 2009). Questo software permette di rilevare

errori nel *genotyping* uniformando le variazioni dimensionali di alleli in realtà identici.

Il *binning* permette la conversione degli alleli da un valore di dimensione di frammenti di DNA in unità discrete a cui è assegnato un numero intero (Idury & Cardon, 1997). Gli alleli, quindi, sono assegnati a categorie alleliche (*bins*) in relazione alla loro lunghezza, riducendone la variabilità (Amos et al., 2007). Poiché le etichette di numeri interi potrebbero non riflettere direttamente le dimensioni reali degli alleli, le dimensioni degli alleli grezzi devono poter essere archiviate per riferimenti e confronti successivi. Una procedura semplice ed efficiente consiste nell'esportare i dati grezzi sulle dimensioni del frammento in un foglio di calcolo e utilizzarlo per compilare grafici di frequenze cumulative delle distribuzioni dimensionali (Jayashree et al., 2006). Il *binning* è stato fatto utilizzando una macro di Microsoft Excel (Amos et al., 2007) ispirata a FLEXIBIN, programma che utilizza una procedura di minimizzazione dei minimi tenendo conto della deriva allelica (Idury & Cardon, 1997; Amos et al., 2007).

Tabella 3.3. Tabella riassuntiva dei campioni provenienti dal lavoro di Marino et al. (2010). Da sinistra verso destra sono riportati: le sigle di riconoscimento delle popolazioni, il sito, l'anno e il mese di campionamento, il numero di individui campionati da Marino et al. (2010) e il numero di genotipi utilizzati in questo lavoro di tesi per fare il confronto temporale.

SIGLA	SITO DI CAMPIONAMENTO	ANNO	MESE	N° CAMPIONI	N° GENOTIPI ANALIZZATI
FU_2005	Laguna centrale: Fusina	2005	Aprile	50	50
CI_2005	Laguna sud: Ca' Roman lato laguna	2005	Aprile	32	31
CE_2005	Laguna sud: Ca' Roman lato mare	2005	Aprile	37	37
MA_2006	Marano	2006	Aprile	55	55
PC_2006	Laguna nord: Paludi della Centrega	2006	Aprile	20	19
CZ_2006	Laguna nord: Ca' Zane	2006	Aprile	47	45
SAL_2006	Laguna nord: Saline	2006	Aprile	40	38
FU_2006	Laguna centrale: Fusina	2006	Maggio	47	47
CI_2006	Laguna sud: Ca' Roman lato laguna	2006	Maggio	44	0
CE_2006	Laguna sud: Ca' Roman lato mare	2006	Maggio	69	0

SIGLA	SITO DI CAMPIONAMENTO	ANNO	MESE	N° CAMPIONI	N° GENOTIPI ANALIZZATI
GO_2006	Goro	2006	Aprile	60	60
FU_2007	Laguna centrale: Fusina	2007	Giugno	25	25
CA_2007	Laguna centrale: Campalto	2007	Giugno	25	25
SC_2007	Laguna centrale: San Clemente	2007	Giugno	25	25
CI_2007	Laguna sud: Ca' Roman lato laguna	2007	Giugno	25	25

3.9. Analisi dei dati

3.9.1. *Linkage Disequilibrium*

Il *Linkage Disequilibrium* (LD) è definito come la non casuale associazione gametica di alleli di diversi *loci* in una popolazione ed è considerato una misura di vicinanza cromosomica o di collegamento tra *loci* genetici (Mueller, 2004).

Fattori che possono causare *Linkage Disequilibrium* possono essere ricondotti a:

- vicinanza cromosomica = se due *loci* si trovano sullo stesso cromosoma la loro ricombinazione sarà molto rara
- Selezione naturale = se gli alleli di due *loci* influenzano entrambi il potenziale riproduttivo, la risposta alla selezione potrebbe favorire l'associazione allelica tra quei due *loci*, creando LD (Slatkin, 2008);
- Deriva genetica = può creare LD tra *loci* strettamente collegati, l'effetto è simile a quello che si ha quando si estrae un piccolo campione da una grande popolazione. Anche se due *loci* sono in *Linkage Equilibrium*, il campionamento di pochi individui potrebbe ugualmente causare *Linkage Disequilibrium*. Tuttavia, i risultati ottenuti per la prima volta alla fine degli anni 60 suggerivano che l'effetto della deriva genetica, bilanciata da mutazione e ricombinazione manterrebbe solo bassi livelli di LD (Hill & Robertson, 1968; Ohta & Kimura, 1969).
- Flusso genico = il movimento di individui o gameti tra sottopopolazioni provoca flusso genico, che aumenta LD in ciascuna sottopopolazione ogni volta che le frequenze degli alleli differiscono tra le sottopopolazioni. Il

decadimento di LD sotto la sola ricombinazione può essere notevolmente ritardato (Nei & Li, 1973).

- Inbreeding e fluttuazioni della dimensione di popolazione = entrambi possono far aumentare LD.

Il coefficiente di *Linkage Disequilibrium* D è il più utilizzato per la maggior parte dei calcoli di LD. Considerati due *loci* A e B, ogni *locus* avente due possibili alleli: A1 e A2 al *locus* A e B1 e B2 al *locus* B, D sarà uguale a

$$D_{AB} = p_{AB} - p_A p_B$$

che è la differenza tra la frequenza dei gameti che portano entrambi gli alleli A e B dei due *loci* (p_{AB}) e il prodotto delle frequenze di questi alleli (p_A and p_B). Ogni coppia di alleli ha il proprio D, e non dipende da quanti altri alleli sono presenti ai due *loci* (Mueller, 2004; Slatkin, 2008).

Per verificare se vi fosse la presenza di un eventuale *Linkage Disequilibrium* tra gli 11 *loci* microsatellite utilizzati è stato usato il software Genepop versione 4.7.2. (Rousset, 2008).

È calcolato il coefficiente D per ogni coppia di *loci* in tutte le popolazioni. Il programma crea delle tabelle di contingenza; successivamente per ogni tabella viene condotto un test di probabilità tramite l'utilizzo delle catene di Markov implementate nell'algoritmo di Raymond e Rousset (1995). È inoltre stimato il *p-value* con il corrispondente errore standard. Alla fine viene condotto un test globale attraverso il metodo di Fisher per ogni coppia di *loci* presente nel dataset.

Essendo la probabilità di rifiutare l'ipotesi nulla molto alta per i numerosi confronti a coppie condotti, i *p-value* ottenuti sono stati sottoposti a correzione per test multipli di Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995)

Se tutti i *loci* risultano in *Linkage Equilibrium* significa che non vi è associazione e sono tra loro indipendenti, di conseguenza possono essere tutti utilizzati per le analisi. Nel caso in cui si dovesse verificare *Linkage Disequilibrium* tra due *loci*, sarà necessario controllare nel dataset quale dei due *loci* causa frequentemente questo fenomeno ed eventualmente eliminarlo dalle successive analisi.

3.9.2. Hardy-Weinberg Equilibrium

L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato calcolato per tutti i campioni di popolazione del dataset suddivisi per sito e stagione di campionamento (55 campioni di popolazione totali).

In un sistema biallelico, la somma della frequenza p dell'allele dominante (A) e della frequenza q dell'allele recessivo (a) sarà uguale a 1. Se si conoscono le frequenze degli alleli, possiamo calcolare la frequenza di ciascun genotipo (in questo caso AA, Aa e aa) all'interno di una popolazione, a condizione che siano soddisfatte una serie di ipotesi. Queste ipotesi includono:

- accoppiamento casuale all'interno della popolazione (panmissia)
- mancanza di selezione
- gli effetti della migrazione o della mutazione sulle frequenze alleliche sono trascurabili
- la dimensione della popolazione può essere considerata infinita
- gli alleli segregano secondo il modello di ereditarietà mendeliano.

Se queste condizioni vengono soddisfatte, allora ci si aspetta che la popolazione sia in equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE), e le frequenze genotipiche possono essere calcolate dalle frequenze alleliche, tramite la seguente formula (Freeland, 2011):

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Il test è stato condotto tramite il software Genepop 4.7.2 (Rousset, 2008), utilizzando, tra le opzioni disponibili, il Test esatto. L'algoritmo che permette di ottenere i *p-value* si basa sulle catene di Markov Monte Carlo (Guo & Thompson, 1992). Per le analisi, sono inoltre stati settati i seguenti parametri: 500 *batches* e 10000 *iterations per batch*.

Una volta ottenuti i *p-value*, essi sono stati sottoposti a correzione per test multipli di Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995).

3.9.3. Eterozigosità osservata e attesa

L'eterozigosità osservata (H_o) e attesa (H_e), quest'ultima indicata anche in alcuni lavori come *gene diversity* (h), sono state calcolate con il software Arlequin versione 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

L'eterozigosità osservata (H_o) è ottenuta dividendo il numero di individui eterozigoti per un particolare *locus* per il totale di individui campionati. Questa misura di variabilità genetica è tuttavia influenzata dal numero di individui che vengono campionati (Freeland, 2011).

La *gene diversity* (h ; Nei, 1973), o eterozigosità attesa (H_e) è calcolata con la formula descritta da Excoffier & Lischer (2015):

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

Dove:

- n = numero di copie del *locus* nel campione
- k = numero di aplotipi di quel particolare *locus*
- p_i = frequenza campionaria dell'aplotipo i - esimo

La *gene diversity* è meno sensibile all'effetto del campionamento rispetto all'eterozigosità osservata; inoltre può essere facilmente calcolata anche se gli unici dati conosciuti sono le frequenze alleliche della popolazione che si vuole studiare. Per ogni dato *locus*, “ h ” rappresenta la probabilità che due alleli campionati casualmente dalla popolazione siano diversi l'uno dall'altro. In una popolazione ideale, “ h ” è equivalente all'eterozigosità attesa (H_e), in altre parole la frequenza degli eterozigoti che ci si aspetterebbe se una popolazione fosse in HWE; per questo motivo “ h ” è spesso presentato come H_e .

Dal confronto di H_o e H_e , possiamo determinare se l'eterozigosità all'interno di una popolazione è significativamente diversa da quella prevista in caso di HWE. Questa deviazione potrebbe derivare da uno o più fattori tra cui: l'accoppiamento non casuale, la selezione naturale o una piccola dimensione della popolazione (Freeland, 2011).

Questi indici sono calcolati separatamente per ognuno degli 11 *loci*, ma è possibile poi fare una media per ottenere un valore di eterozigosità complessiva delle popolazioni in esame.

3.9.4. Allelic richness

L'*allelic richness* è calcolata come il numero medio di alleli per *locus* (Hughes et al., 2008), pesata per la numerosità campionaria della popolazione. Una diminuzione dell'*allelic richness* potrebbe portare a una riduzione del potenziale adattativo di una popolazione ai futuri cambiamenti ambientali, e quindi all'evoluzione per selezione naturale (Fisher, 1930).

Dato il numero totale di alleli osservati in un *locus* su un insieme di popolazioni, il numero osservato in ogni popolazione varia a causa delle differenze nella distribuzione delle frequenze alleliche da una popolazione all'altra, e anche a causa delle differenze nel numero di individui campionati in ciascuna popolazione (Foulley et al., 2006). Al fine di ottenere misure comparabili dell'*allelic richness*, tra popolazioni con un campionamento differente, El Mousadik & Petit (1996) hanno proposto di stimare il numero di alleli attesi in campioni di dimensioni specifiche utilizzando come metodo la rarefazione (Sanders, 1968; Hurlbert, 1971). In tale approccio, El Mousadik & Petit (1996) hanno scelto la dimensione del campione di riferimento come il numero di geni esaminati in un campione più piccolo di dimensione specificata.

Per il calcolo dell'*allelic richness* è stato utilizzato il software FSTAT versione 2.9.4 (Goudet, 2003), attraverso l'approccio messo a punto da El Mousadik & Petit (1996).

3.9.5. Differenze tra campioni

Gli indici FST e l'AMOVA sono stati calcolati con il software Arlequin versione 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Il metodo più comune per quantificare il livello di differenziamento genetico tra le popolazioni si basa sulla statistica F, sviluppata da Wright (1951). La statistica F utilizza i coefficienti di inbreeding per descrivere la partizione della variazione

genetica all'interno e tra le popolazioni. La statistica F può essere calcolata a tre diversi livelli.

La prima statistica F, FIS, misura il grado di consanguineità degli individui rispetto al resto della loro sottopopolazione. Ciò riflette la probabilità che due alleli all'interno dello stesso individuo siano identici per discendenza. È calcolata come:

$$FIS = \frac{\overline{HS} - \overline{HI}}{\overline{HS}}$$

in cui HI è l'eterozigosità media osservata nella sottopopolazione e HS è l'eterozigosità media che ci si aspetterebbe se la sottopopolazione fosse in HWE.

La seconda statistica F, FST (nota anche come indice di fissazione), fornisce una stima del livello di differenziamento genetico tra le sottopopolazioni; in altre parole, dice quanto siano geneticamente simili due popolazioni tra loro. È una misura del grado di consanguineità all'interno di una sottopopolazione rispetto alla popolazione totale e riflette la probabilità che due alleli estratti a caso da una sottopopolazione siano identici per discendenza. FST è calcolata come:

$$FST = \frac{HT - \overline{HS}}{HT}$$

in cui HS è lo stesso dell'equazione di FIS e HT è l'eterozigosità attesa della popolazione totale.

La terza statistica F è FIT. Essa fornisce un coefficiente di consanguineità complessivo di un individuo misurandone l'eterozigosità rispetto alla popolazione totale. FIT è quindi influenzata sia dagli accoppiamenti non casuali all'interno di una sottopopolazione, sia dalla suddivisione della popolazione, ed è calcolato come:

$$FIT = \frac{HT - \overline{HI}}{HT}$$

in cui HT e HI sono uguali a quelli delle equazioni precedenti.

Se due popolazioni hanno frequenze alleliche identiche saranno geneticamente omogenee e quindi l'indice FST sarà zero. All'altro estremo, se due popolazioni sono fissate per alleli diversi, FST sarà uguale a 1. All'interno di tale intervallo, i valori FST compresi tra 0 e 0,05 sono generalmente considerati indicativi di uno

scarso differenziamento genetico. Tuttavia, la presenza di differenziamento genetico nelle popolazioni può essere rilevata anche da valori molto bassi di FST (Freeland, 2011).

Per determinare la significatività del valore di FST ottenuto dal dataset effettivo, molti software utilizzano dei test basati su procedure di permutazione. Ad ogni permutazione, i genotipi vengono mescolati casualmente e viene calcolato il valore di FST corrispondente. Alla fine, il test restituirà un *p-value* che dipenderà dal numero di volte in cui i valori degli FST simulati saranno uguali o maggiori rispetto a quello calcolato utilizzando il dataset effettivo.

In questo lavoro, per il calcolo degli FST, è stata utilizzata l'*FST locus by locus* per ogni coppia di popolazione poiché più idonea se presenti dati mancanti. Essa restituisce un'informazione di differenziamento genetico considerando separatamente ogni *locus* nelle due popolazioni. I *p-value* ottenuti sono stati confrontati sia con una soglia non corretta di 0,05, sia con la soglia corretta per test multipli utilizzando l'approccio di Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995).

Un altro metodo per calcolare le statistiche F è tramite l'Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA), (Excoffier et al., 1992). Essa può facilmente incorporare livelli gerarchici aggiuntivi nella struttura della popolazione. Con l'AMOVA (Excoffier et al., 1992), le statistiche F sono calcolate a partire da un insieme di componenti di covarianza, corrispondenti ai diversi livelli gerarchici che si assume siano presenti nella struttura della popolazione (Cockerham, 1973; Weir & Cockerham, 1984). Quindi, sotto un semplice modello in cui gli individui sono distribuiti in diverse popolazioni, possiamo scomporre la varianza genetica totale in componenti di covarianza: varianza tra popolazioni, tra gli individui all'interno delle popolazioni e all'interno degli individui. Le statistiche F possono quindi essere calcolate come rapporti di queste componenti di covarianza. Quando le popolazioni possono essere raggruppate in più gruppi, viene aggiunto un livello gerarchico aggiuntivo e la varianza genetica totale viene scomposta in: varianza tra gruppi, tra popolazioni all'interno dei gruppi, tra individui all'interno delle popolazioni e all'interno degli individui. Ciò si basa sull'analisi della varianza che è stata sviluppata in precedenza da Cockerham (1973) e Weir & Cockerham (1984).

Tuttavia, mentre Weir & Cockerham (1984) hanno calcolato queste componenti di covarianza attraverso un vettore lineare delle frequenze alleliche, l'AMOVA le calcola utilizzando una matrice di distanze quadratiche euclidee a coppie. Questo si basa sul lavoro precedente di Li (1976).

Per testare l'omogeneità tra gruppi di popolazioni, sempre a causa della presenza di dati mancanti, si è preferito utilizzare l'AMOVA *locus by locus* rispetto a quella standard. L'output fornirà la statistica FST con un *p-value* associato. L'ipotesi H0 da testare è se i gruppi tra loro confrontati sono geneticamente omogenei e quindi possono essere considerati appartenente ad un'unica popolazione. In questo caso si potrà procedere con l'accorpamento delle singole popolazioni in una popolazione più grande. Nel caso in cui il *p-value* risulti significativo vuol dire che è presente un segnale di differenziamento genetico e le popolazioni confrontate non sono tra loro omogenee. L'AMOVA è stata utilizzata per effettuare dei confronti geografici e temporali.

3.9.6. Test di *Isolation by Time*

È stata effettuata un'analisi di *Isolation by Time* tramite il software ISOLDE implementato nella versione Genepop on the web. Il programma è stato sviluppato per fare analisi di *Isolation by Distance*, utilizzando delle distanze geografiche. In questo lavoro di tesi sono invece state utilizzate distanze temporali. Lo scopo è quello di verificare l'eventuale presenza di una correlazione tra distanze genetiche e distanze temporali, in particolare se con il passare del tempo, aumenta anche la divergenza genetica tra le popolazioni analizzate.

Prima di far partire l'analisi, è stato creato l'inputfile contenente due semimatrici: una avente i valori degli FST calcolati tra le coppie di popolazioni della Laguna di Venezia suddivise per stagioni, l'altra contenente i mesi intercorsi tra un campionamento e l'altro.

Il programma calcola il valore $FST/(1-FST)$ attraverso una regressione degli indici FST e i logaritmi naturali delle distanze temporali. Viene inoltre applicato un Mantel Test (1967) che consiste nel permutare le righe (o colonne) della (semi)matrice. Questo programma esegue tali permutazioni, che possono fornire la

distribuzione di eventuali statistiche sotto l'ipotesi nulla di indipendenza tra le due variabili (FST e distanze temporali).

3.9.7. Confronto della variabilità genetica

Con il software FSTAT versione 2.9.4. (Goudet, 2003), sono stati calcolati l'*allelic richness*, l'eterozigosità osservata, la *gene diversity* e l'indice di fissazione FIS delle popolazioni di Venezia suddivise per stagione di campionamento.

Sono stati creati due gruppi, contenenti rispettivamente le popolazioni campionate nel 2005, 2006 e 2007 e quelle campionate dal 2019 al 2021, sempre suddivise per stagione di campionamento. Su questi 2 gruppi è stato calcolato il T-test ad una coda per verificare se gli indici di variabilità genetica sopra riportati fossero significativamente diversi tra loro. Il T-test è stato calcolato due volte, in un primo momento considerando come gruppo 1 i campioni vecchi, e successivamente come gruppo 1 quelli nuovi. Questo è stato necessario perché le ipotesi H1 da testare per i 4 indici sono 2, ossia:

- Vecchi > Nuovi
- Nuovi > Vecchi

3.9.8. Stima della dimensione effettiva di popolazione

La dimensione effettiva di popolazione (N_e), concetto introdotto da Wright (1931) e sviluppato da molti altri, principalmente da Crow & Kimura (1970), viene definita come la dimensione di una popolazione ideale che avrebbe lo stesso effetto di campionamento casuale delle frequenze alleliche della popolazione reale. Essa riflette il tasso di perdita della variabilità genetica in seguito alla deriva genetica e questo tasso è inversamente proporzionale alla N_e di una popolazione (Freeland, 2011). Una popolazione reale può discostarsi dalla popolazione idealizzata di Wright-Fisher in molti modi diversi e di conseguenza, il suo N_e può essere molto diverso dalle dimensioni del censimento. Oltre alla dimensione del censimento, molti altri parametri demografici e genetici, come il rapporto tra i sessi, la variazione del successo riproduttivo tra gli individui e il sistema di accoppiamento, influenzano la dimensione effettiva di una popolazione. Se si conoscono gli effetti

di questi parametri, questi possono essere utilizzati per stimare l'Ne di una popolazione (Caballero, 1994; Wang & Caballero, 1999).

Per il calcolo di Ne è stato utilizzato il software NeEstimator, versione 2.1. (Do et al., 2013) attraverso il metodo temporale messo a punto da Nei & Tajima (Nei & Tajima, 1981). Il metodo temporale per calcolare Ne richiede campioni di due o più periodi di tempo separati da almeno una generazione. Per *C. aestuarii* il tempo di generazione è di tre anni; quindi, per due popolazioni campionate nell'arco di 1 anno è stato impostato come tempo di generazione 0,33. Oltre a Ne, sono stati stimati il valore minimo e massimo del range della dimensione effettiva tramite l'approccio parametrico.

Questo metodo si basa sul fatto che la deriva genetica modifica le frequenze alleliche più rapidamente nelle popolazioni con un piccolo Ne, e quindi cambiamenti pronunciati nelle frequenze alleliche nel tempo suggeriscono piccole dimensioni effettive di popolazione.

3.9.9. Stima dei rapporti di parentela tra individui

Per stimare i possibili rapporti di parentela tra gli individui è stato utilizzato il software COLONY Versione 2.0.6.7 (Jones & Wang, 2010). Per fare ciò, il programma implementa metodi di verosimiglianza per l'intera configurazione dell'albero genealogico utilizzando dati di genotipo multilocus. Ci sono un numero enorme di potenziali configurazioni genealogiche, anche con un piccolo campione di individui. Quindi, partendo da una configurazione iniziale, il metodo utilizza un algoritmo di *annealing* simulato (Kirkpatrick et al., 1983) per cercare una configurazione diversa dalla precedente. La *likelihood* della nuova configurazione viene confrontata con quella vecchia. Se la nuova configurazione è migliore della vecchia, essa viene mantenuta e la vecchia viene accantonata. Tuttavia, per evitare di rimanere bloccati in un valore di massimo locale, l'algoritmo permette con una certa probabilità (determinata da temperatura di *annealing*) di accettare una configurazione peggiore. Questo processo di ricerca continua finché non viene trovata la soluzione migliore.

Sono state condotte due analisi distinte, tenendo separati gli individui campioni nel 2005, 2006 e 2007 e quelli campionati dal 2019 al 2021. Questo confronto temporale, insieme ai risultati ottenuti dal calcolo del T-test ad una coda per gli

indici FIS, potrà fornire ulteriori informazioni sui livelli di inbreeding della popolazione. Come parametri sono stati settati: specie diploide e poligama, la presenza di inbreeding, un'alta precisione di verosomiglianza e 'Long' per la lunghezza della corsa. Di tutti gli output che restituisce il programma, quello di maggiore interesse per il presente lavoro di tesi è il file relativo alle stime dei rapporti di fratellanza tra gli individui con la relativa probabilità associata.

4. RISULTATI

4.1. Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA da tutti i 2116 campioni raccolti negli anni 2019, 2020, 2021, di cui 440 personalmente estratti e amplificati e corrispondenti ai campionamenti primaverile e autunnale del 2021, è stato utilizzato il protocollo *Salting out* (Patwary et al., 1994). Questo metodo di estrazione è risultato efficace per quasi tutti gli individui campionati, consentendo la successiva amplificazione degli 11 *loci* microsatellite di interesse. In figura 4.1 è riportato un esempio dei prodotti di estrazione sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% in TBE 1X. Ogni colonna rappresenta un individuo e la banda che permette di dare conferma del successo dell'estrazione è quella in corrispondenza della banda da 10kb del marcatore 25kb (SMOBIO).

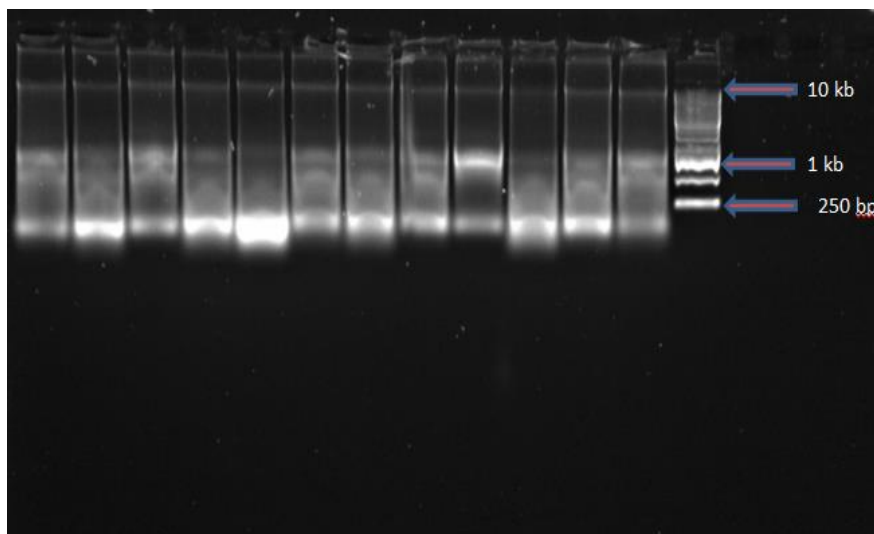


Figura 4.1 Foto dell'elettroforesi su gel d'agarosio all'1% in TBE all'1X per la verifica dell'estrazione, intercalante GelRed (BIOTIUM). La foto è ottenuta tramite il sistema di acquisizione di immagini (GelDoc™ XR+, BioRad). Partendo dall'estremità destra è possibile visualizzare il marcatore di peso molecolare 25 kb (SMOBIO) e a seguire il DNA estratto dei singoli individui. Le bande di DNA estratto ad alto peso molecolare sono visibili in prossimità della freccia che indica la banda da 10kb del marcatore; all'altezza della banda del marcatore indicata come 1kb sono visibili le bande corrispondenti agli RNA, tutte le bande al di sotto della freccia che indica la banda 250 bp del marcatore indicano la presenza di DNA degradato composto da piccoli frammenti.

4.2. Amplificazione tramite PCR

Per 2078 dei 2116 campioni estratti è stato possibile amplificare, tramite PCR in multiplex o singola, almeno 8 *loci* su 11, che sono poi stati utilizzati per le successive analisi. È stata scelta una soglia di 8 *loci* su 11 per ridurre la quantità di dati mancanti nel dataset finale e si è quindi deciso di escludere dal dataset finale i 38 campioni che non rispettavano i parametri scelti per i quali non era stato possibile amplificare più di 7 *loci*, né tramite PCR in multiplex, né con amplificazione singola utilizzando un profilo specifico di amplificazione per quel determinato *locus* e modificando in alcuni casi anche le diluizioni dell'estratto di DNA. In figura 4.2 è riportato un esempio di prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando PCR in multiplex, visualizzati dopo essere stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1,8% in TBE 1X. Sono visibili le bande dei *loci* amplificati.

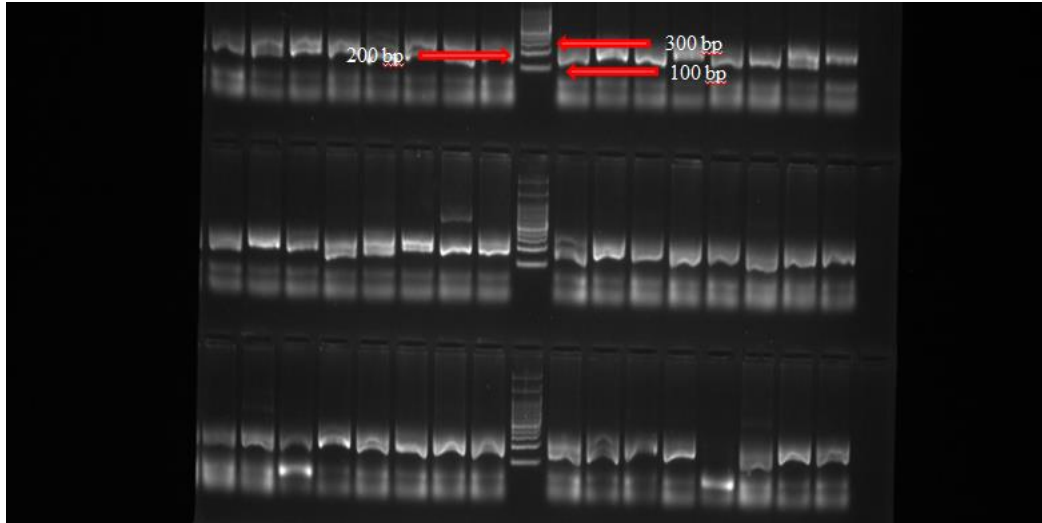


Figura 4.2 Foto dell'elettroforesi su gel d'agarosio all'1,8% in TBE all'1X per la verifica dell'avvenuta amplificazione, intercalante GelRed (BIOTIUM), di una piastra amplificata con PCR in multiplex. Al centro, tra i 16 pozzetti di ogni riga, è indicato il marcatore di peso molecolare 100 bp (SMOBIO). È possibile visualizzare nella maggior parte dei campioni due bande, di 100 e 200 bp, e in alcuni casi anche quella da 300 bp, corrispondenti agli alleli dei *loci* amplificati.

4.3. Analisi dei dati

Ai 2078 campioni corrispondenti agli anni 2019-2020-2021 sono stati aggiunti 482 genotipi dei 601 totali utilizzati nel lavoro di Marino et al. (2010), e campionati negli anni 2005-2006-2007. I genotipi che non sono stati inclusi nel dataset finale sono quelli che presentano meno di 8 *loci* informativi e tutti quelli delle due popolazioni CI_2006 e CE_2006, i quali non presentano informazioni sul *locus* Cae33. In totale sono quindi stati analizzati 2560 individui.

Prima di procedere con le analisi, il dataset completo è stato normalizzato utilizzando il software Allelogram versione 2.2 (Morin et al., 2009). Una volta normalizzati, i dati sono stati sottoposti a *binning* attraverso una macro di Microsoft Excel (Amos et al., 2007) ispirata a FLEXIBIN. Questa procedura ha permesso di ridurre la variabilità dei dati, convertendo i dati grezzi da un valore di dimensione di frammenti di DNA in *bins* contraddistinti da un numero intero (classi alleliche). Inizialmente non è stato possibile attuare la procedura a causa della grandezza eccessiva del dataset utilizzato. Tuttavia, grazie ai suggerimenti ricevuti dall'autore del programma sulle modifiche di alcuni parametri da apportare, è stato possibile effettuare il *binning* con successo.

4.3.1. Test di *Linkage Disequilibrium*

Il test di *Linkage Disequilibrium* è stato eseguito tra tutte le coppie di *loci* in tutte le 55 popolazioni incluse nel dataset finale con il software Genepop versione 4.7.2. (Rousset, 2008). Il test, dopo la correzione di Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) per test multipli, non ha prodotto valori significativi. Quindi gli 11 *loci* microsatellite sono risultati indipendenti tra di loro e sono stati tutti utilizzati per le successive analisi.

4.3.2. Equilibrio di Hardy-Weinberg, numero di alleli, *allelic richness*, eterozigotà attesa e osservata

È stato calcolato l'equilibrio di Hardy-Weinberg utilizzando il software Genepop versione 4.7.2. (Rousset, 2008), per tutti i *loci* e per tutte le popolazioni. Applicando la correzione per test multipli di Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) su 605 confronti (11 *loci* per 55 popolazioni) 217 sono risultati in disequilibrio di Hardy-Weinberg. In generale, la deviazione dall'equilibrio non è distribuita uniformemente tra gli 11 *loci*, e questo poiché ben 182 test significativi coinvolgono soltanto i *loci* Cae07, Cae14, Cae33 e Cma02. Questo si può vedere nella tabella 4.1, dove sono riportati i valori complessivi facendo la media dei valori di tutte le popolazioni per ognuno degli 11 *loci*. In questi confronti non è stata applicata la correzione per test multipli e si è considerato il valore di 0,05 come soglia di significatività. Come si può vedere in tabella 4.2, i valori complessivi calcolati facendo la media dei valori di tutti i *loci* per ogni popolazione non sono risultati significativi; quindi si può dedurre che le popolazioni si trovino in equilibrio di Hardy-Weinberg. Anche in questo caso non è stata applicata la correzione di Benjamini-Hochberg ed è stata scelta la soglia di significatività dello 0,05.

Utilizzando la stessa suddivisione del dataset (55 popolazioni) per il calcolo dell'equilibrio di Hardy-Weinberg, sono state calcolate l'eterozigotà osservata (H_o) e attesa (H_e) con il software Arlequin versione 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Con il software FSTAT versione 2.9.4. (Goudet, 2003) è stata calcolata

anche l'allelic *richness*, il numero di alleli pesato per la dimensione minima di popolazione. I valori medi per ogni popolazione considerando tutti i *loci* sono riportati in tabella 4.2; i valori medi di ogni *locus* per tutte le popolazioni sono riportati nella tabella 4.1.

Osservando i valori medi per popolazione (Tabella 4.2), si vede che il numero medio di alleli è 16,5, con un range che va da 10,9 alleli nella popolazione PC_2006 a 18,8 in MA_19P. L'*allelic richness* media è 10,296, con un range che va da 9,523 in LS1_19P a 11,016 in SC_2007. L'eterozigosità attesa media (*He*) tra le popolazioni del dataset è di 0,793, con un range che va da 0,770 in LC4_20P a 0,818 in SC_2007, mentre l'eterozigosità osservata (*Ho*) media è di 0,686 con un minimo di 0,577 in LC4_20P a un massimo di 0,827 in CA_2007. Dal confronto dei valori medi di *He* e *Ho*, si evidenzia un deficit di eterozigoti nel dataset.

Considerando invece i valori medi per ogni locus (Tabella 4.1), tutti i loci risultano essere polimorfici. Il locus meno variabile è il Cae30, con un numero medio di alleli pari a 3,2 e con un valore di 2,048 per l'allelic *richness*. Il locus più variabile è invece il Cae33, con un numero medio di alleli pari a 29,2 e l'allelic *richness* di 16,523. L'eterozigosità attesa ha un range che va da un minimo di 0,099 in Cae30 a un massimo di 0,955 in Cae33. L'eterozigosità osservata invece presenta il valore massimo in Cae71 (0,927) e il valore minimo in Cae30 (0,112).

Tabella 4.1. In tabella da sinistra verso destra sono riportati: gli 11 *loci* analizzati, il numero medio di alleli per *locus*, l'*allelic richness* media, l'eterozigosità media attesa (*He*) e osservata (*Ho*) per *locus* e l'equilibrio di Hardy-Weinberg medio per ogni *locus* per tutte le popolazioni. In grassetto sono riportati i valori significativi.

<i>Locus</i>	Numero di alleli	<i>Allelic richness</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	Equilibrio di Hardy-Weinberg
Cae01	12,2	8,509	0,841	0,806	0,343
Cae07	29,1	15,752	0,948	0,715	0,002
Cae14	9,8	6,598	0,627	0,455	0,003
Cae17	12,5	8,931	0,863	0,825	0,574
Cae30	3,2	2,048	0,099	0,112	1,000
Cae33	29,2	16,523	0,955	0,630	0,000
Cae71	27,0	15,260	0,944	0,927	0,482
Cae86	19,1	13,179	0,932	0,890	0,348
Cma02	18,6	11,850	0,908	0,676	0,002
Cma04	11,1	7,462	0,812	0,795	0,321
Cma14	9,6	7,137	0,790	0,712	0,403

Tabella 4.2. In tabella sono riportate da sinistra a destra: la sigla della popolazione, il numero medio di alleli, l'*allelic richness* media, l'eterozigosità attesa (He) media, l'eterozigosità osservata (Ho) media e il valore medio dell'equilibrio di Hardy-Weinberg di tutti i *loci* per ogni popolazione. Più dettagli sulle sigle sono riportati nella tabella 3.1 in "Materiali e Metodi".

Popolazione	Numero di alleli	<i>Allelic Richness</i>	He	Ho	Equilibrio di Hardy-Weinberg
CE 2005	16,0	10,791	0,818	0,748	0,348
CI 2005	14,0	10,203	0,800	0,716	0,356
CZ 2006	17,1	10,366	0,787	0,689	0,174
FU 2005	17,8	10,370	0,790	0,722	0,306
FU 2006	17,5	10,521	0,796	0,725	0,230
PC 2006	10,9	9,656	0,793	0,695	0,255
SAL 2006	16,5	10,741	0,803	0,724	0,253
GO 2006	18,7	10,384	0,787	0,708	0,322
MA 2006	18,1	10,209	0,805	0,714	0,211
CA 2007	14,4	10,869	0,785	0,827	0,373
CI 2007	12,9	10,016	0,795	0,751	0,509
FU 2007	13,9	10,271	0,779	0,745	0,396
SC 2007	14,3	11,016	0,818	0,754	0,474
MA 19P	18,8	10,384	0,796	0,687	0,307
LN5 19P	17,2	10,588	0,789	0,684	0,106
LN6 19P	15,8	9,764	0,783	0,598	0,146
LC3 19P	15,5	9,850	0,793	0,691	0,394
LC4 19P	16,2	10,089	0,789	0,671	0,337
LS1 19P	14,6	9,523	0,782	0,598	0,146
LS2 19P	16,8	10,296	0,783	0,680	0,280
FER 19P	17,1	10,257	0,787	0,682	0,276
MA 19A	17,7	10,354	0,789	0,661	0,322
LN5 19A	17,5	10,543	0,783	0,646	0,222
LN6 19A	17,0	10,452	0,809	0,701	0,358
LC3 19A	17,1	10,063	0,775	0,672	0,278
LS1 19A	18,1	10,476	0,796	0,669	0,220
LS2 19A	17,5	10,578	0,784	0,690	0,352
MA 20P	14,9	9,779	0,782	0,632	0,189
LN5 20P	16,3	10,280	0,789	0,610	0,181
LC3 20P	15,7	10,079	0,790	0,640	0,271
LC4 20P	15,4	9,726	0,770	0,577	0,172
LS1 20P	16,5	10,377	0,789	0,617	0,236
LS2 20P	15,5	9,853	0,787	0,645	0,208
GO 20P	16,5	10,168	0,800	0,649	0,308
MA 20A	16,8	10,142	0,803	0,683	0,330
LN5 20A	18,1	10,503	0,806	0,718	0,370
LN6 20A	17,6	10,648	0,804	0,687	0,434
LC3 20A	17,5	10,439	0,797	0,712	0,315
LC4 20A	16,5	10,287	0,792	0,693	0,333
LS1 20A	16,2	10,172	0,792	0,685	0,301
LS2 20A	17,0	10,510	0,810	0,692	0,298
GO 20A	17,0	10,130	0,789	0,690	0,194

Popolazione	Numero di alleli	<i>Allelic Richness</i>	He	Ho	Equilibrio di Hardy-Weinberg
MA 21P	17,5	10,527	0,799	0,677	0,321
LS2 21P	16,5	10,338	0,794	0,676	0,213
LC4 21P	17,8	10,440	0,783	0,714	0,396
LC3 21P	14,1	9,634	0,786	0,630	0,187
LN5 21P	17,4	10,292	0,788	0,725	0,269
GO 21A	17,7	10,659	0,797	0,724	0,352
MA 21A	16,9	10,287	0,799	0,724	0,289
LS1 21A	17,2	10,481	0,797	0,675	0,285
LS2 21A	17,7	10,603	0,801	0,683	0,179
LC3 21A	16,6	10,550	0,813	0,683	0,346
LC4 21A	16,9	10,143	0,787	0,678	0,258
LN5 21A	17,2	10,311	0,786	0,678	0,353
LN6 21A	17,0	10,265	0,777	0,672	0,285

4.3.3. Differenze tra campioni

Con il software Arlequin versione 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) sono stati condotti dei test di AMOVA *locus by locus* per testare la presenza di gruppi omogenei all'interno del dataset con una soglia di significatività dello 0,05. Si è scelto di utilizzare l'AMOVA *locus by locus* per evitare di ottenere risultati incorretti a causa della presenza di dati mancanti nel dataset. Si è voluto testare la presenza di omogeneità interna tra le 3 lagune di Venezia, Marano e Goro e per la sola Laguna di Venezia, per le popolazioni campionate tra il 2019 e il 2021. Per condurre queste analisi è stato usato il dataset con tutte le popolazioni separate per sito e stagione di campionamento, poi accorpate tramite il programma in un unico gruppo per il calcolo dell'indice FST.

Come si può vedere nella tabella 4.3, entrambi gli FST globali risultano significativi. Tuttavia, l'FST ottenuto raggruppando le 32 popolazioni della sola Laguna di Venezia risulta maggiore (FST=0,00266) di quello ottenuto raggruppando tutte le 42 popolazioni (FST= 0,00245). Dal confronto tra i due valori si può dedurre che la significatività trovata non dipende da un presunto differenziamento geografico tra le 3 lagune, ma è dovuto alla non omogeneità interna della Laguna di Venezia.

Tabella 4.3. Da sinistra verso destra sono riportati i gruppi testati, l'indice di fissazione FST, il *p-value* associato, il numero di popolazioni raggruppate e il numero di individui corrispondenti. In grassetto sono riportati i *p-value* significativi.

Gruppo	FST	<i>p-value</i>	Numero di popolazioni	Numero di individui
Venezia 2019-2020-2021	0,00266	0,00238	32	1550
Venezia_Marano_Goro 2019-2020-2021	0,00245	0,00119	42	2078

Per confermare l'assenza di differenziamento geografico tra le tre lagune, le popolazioni campionate tra il 2019 e il 2021 sono state raggruppate nei tre gruppi rappresentativi di Venezia, Marano e Goro. Come si può vedere nella tabella 4.4, il confronto non è risultato significativo (FCT = -0,00011, *p-value* = 0,61267). Quindi si è deciso di continuare le analisi considerando soltanto le popolazioni della Laguna di Venezia.

Tabella 4.4. Da sinistra verso destra sono riportati i gruppi testati, l'indice FCT e il *p-value* associato.

Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	FCT	<i>p-value</i>
Venezia 2019-2020-2021	Marano 2019-2020-2021	Goro 2019-2020-2021	-0,00011	0,61267

Sono stati condotti dei test raggruppando le popolazioni in gruppi corrispondenti alle singole stagioni di campionamento (Tabella 4.5). Nessun confronto è risultato significativo e quindi si può dedurre che non sia presente un segnale di differenziamento tra le singole popolazioni campionate nei diversi siti della Laguna di Venezia.

Tabella 4.5. Da sinistra verso destra sono riportati i gruppi che si è scelto di testare, l'indice di fissazione FST, il *p-value* associato, il numero di popolazioni raggruppate e il numero di individui corrispondente.

Gruppo	FST	<i>p-value</i>	Numero di popolazioni	Numero di individui
Ve_19P	0,00274	0,13366	6	295
Ve_19A	0,00222	0,21119	5	246
Ve_20P	0,00191	0,69426	5	241
Ve_20A	0,00125	0,54703	6	285
Ve_21P	0,00268	0,10525	4	195
Ve_21A	0,00293	0,05475	6	288

Si è deciso di procedere attraverso il confronto a coppie tra i 6 gruppi formati dalle singole stagioni, per vedere quali fossero quelli significativamente diversi tra loro e quali fossero la causa della significatività del valore di FST osservata unendo tutte le popolazioni di Venezia 2019-2020-2021 in un unico gruppo. In tabella 4.6 sono riportati solo i confronti che sono risultati tra loro significativi.

Tabella 4.6. Da sinistra verso destra sono riportati i gruppi testati, l'indice FCT, il *p-value* associato e il numero di popolazioni raggruppate. In grassetto sono riportati i *p-value* risultati significativi.

Gruppo 1	Gruppo 2	FCT	<i>P-value</i>	N° popolazioni Gruppo 1	N° popolazioni Gruppo 2
Ve 19P	Ve 20A	0,00089	0,01267	6	6
Ve 20P	Ve 19A	0,00075	0,04911	5	5
Ve 20P	Ve 20A	0,00124	0,00327	5	6
Ve 20P	Ve 21A	0,00087	0,02307	5	6

Sempre utilizzando il dataset con tutte le popolazioni divise si è voluto testare la potenziale presenza di omogeneità interna nel tempo intercorso tra i campionamenti del 2019 e 2021 nei diversi siti della Laguna di Venezia. Come si può vedere nella tabella 4.7, il sito LC3 mostra un segnale di differenziamento temporale, con un FST di 0,00447 che risulta essere statisticamente significativo (*p-value* = 0,00089). Anche il sito LN6 risulta statisticamente significativo con un *p-value* di 0,04248.

Tabella 4.7. Da sinistra verso destra sono riportati i gruppi testati, l'indice di fissazione FST, il *p-value* associato e il numero di popolazioni raggruppate. In grassetto sono riportati i *p-value* significativi.

Gruppo	FST	<i>p-value</i>	Numero di popolazioni
LS1	0,00112	0,79743	6
LS2	0,00230	0,17248	6
LC3	0,00447	0,00089	6
LC4	0,00138	0,58198	5
LN5	0,00266	0,09485	6
LN6	0,00369	0,04248	4

Per concludere le analisi fatte utilizzando il file con tutte le pop separate, sono stati calcolati gli indici FCT confrontando tra loro diversi gruppi. Come si può vedere

nella tabella 4.8, ogni riga rappresenta un'analisi AMOVA condotta indipendentemente:

-prima riga: sono confrontati i gruppi che rappresentano le popolazioni della Laguna di Venezia per le 6 stagioni di campionamento;

-seconda riga: sono confrontati i 6 siti della laguna che accorpano ognuno le popolazioni dal 2019 al 2021;

-terza riga: il gruppo comprendente le popolazioni di Venezia dal 2019 al 2021 è confrontato il gruppo comprendente le popolazioni di Venezia dal 2005 al 2007.

I confronti risultati significativi sono quelli tra le 6 stagioni e tra Venezia_Nuovi e Venezia_Vecchi, confermando la presenza di differenziamento temporale e l'assenza di differenziamento geografico.

Tabella 4.8. Da sinistra verso destra sono riportati i gruppi testati, l'indice FCT, e il *p-value* associato. In grassetto sono riportati i *p-value* significativi.

Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	Gruppo 4	Gruppo 5	Gruppo 6	FCT	<i>p-value</i>
Ve_19P	Ve_19A	Ve_20P	Ve_20A	Ve_21P	Ve_21A	0,00046	0,00911
LS1	LS2	LC3	LC4	LN5	LN6	0,00262	0,36347
Ve_Nuovi	Ve_Vecchi					0,00063	0,00030

Si è deciso quindi di continuare le analisi suddividendo il dataset in popolazioni più grandi che accorpavano più individui, per aumentare il potere statistico dei test. Nella tabella 4.9 sono riportati i valori di FST e FCT con i rispettivi *p-value* dei test AMOVA *locus by locus* condotte utilizzando il dataset con le popolazioni di Venezia suddivise per anno o per anno o stagione. Sono stati prima calcolati gli FST singoli raggruppando le popolazioni nei gruppi Ve_Nuovi e Ve_Vecchi; successivamente è stato calcolato l'FCT confrontando entrambi i gruppi in un unico test. Come si può vedere, tutti i test sono risultati significativi.

Tabella 4.9. Da sinistra verso destra sono riportati i gruppi testati, l'indice di fissazione FST, l'indice FCT, il *p-value* associato e il numero di popolazioni raggruppate. In grassetto sono riportati i *p-value* significativi.

Gruppo 1	Gruppo 2	FST	FCT	<i>p-value</i>	Numero di popolazioni
Ve Nuovi		0,00089		0,00020	6
Ve Vecchi		0,00134		0,02960	3
Ve Nuovi	Ve Vecchi		0,00055	0,00139	

Sono stati calcolati gli FST a coppie *locus by locus* utilizzando il dataset suddiviso in 4 grandi popolazioni. Nella tabella 4.10 sono riportati i valori dei *p-value* sotto la diagonale e i valori degli FST sopra la diagonale. Dai confronti è stata confermata la presenza di differenziamento temporale poiché tutti i confronti a coppie tra le popolazioni rappresentative dei campioni 2005-2006-2007 di Venezia con le popolazioni rappresentative delle tre lagune dei campioni 2019-2020-2021 sono risultati significativi. Invece, come si può vedere nella tabella 4.10, i confronti a coppie tra le tre lagune (Ve_Nuovi, Marano_Nuovi, Goro_Nuovi) non sono risultati significativi confermandone l'omogeneità trovate nelle precedenti analisi.

Tabella 4.10. Nella matrice sono riportati i confronti a coppie tra le popolazioni accorpate in base alla laguna di appartenenza, tenendo separate però le popolazioni di Venezia in base al periodo temporale considerato (2005-2006-2007 e 2019-2020-2021). Sono riportati sopra la diagonale gli indici FST dei confronti a coppie e sotto la diagonale i *p-value* corrispondenti. In grassetto sono riportati i *p-value* significativi dopo la correzione per test multipli (Benjamini & Hochberg, 1995). In corsivo sono riportati i *p-value* significativi con la soglia non corretta di 0,05.

	Ve_Vecchi	Ve_Nuovi	Marano_Nuovi	Goro_Nuovi
Ve_Vecchi		0,00079	0,00093	0,00093
Ve_Nuovi	0,00030		0,00010	-0,00017
Marano_Nuovi	0,00495	0,58713		-0,00013
Goro_Nuovi	<i>0,03267</i>	0,94168	0,89317	

Per concludere sono stati calcolati gli FST a coppie *locus by locus* tra le popolazioni della sola Laguna di Venezia, suddivise per anno e per anno e stagione di campionamento. Come si vede nella tabella 4.11, la maggioranza degli FST con un *p-value* significativo sono quelli ottenuti facendo i confronti tra le popolazioni del primo periodo temporale (2005, 2006 e 2007) e quelle del secondo periodo temporale (2019, 2020 e 2021). Confrontando invece le popolazioni corrispondenti alle 6 stagioni del nuovo campionamento non si osserva un pattern regolare poiché alcuni confronti risultano significativi e altri no.

Tabella 4.11. Nella matrice sono riportati i confronti a coppie tra le popolazioni della Laguna di Venezia accorpate in base all'anno o alla stagione e l'anno di campionamento. Sono riportati sopra la diagonale gli indici FST dei confronti a coppie e sotto la diagonale i *p-value* corrispondenti. In grassetto sono riportati i *p-value* significativi dopo la correzione per test multipli (Benjamini & Hochberg, 1995). In corsivo sono riportati i *p-value* significativi con la soglia non corretta di 0,05.

	Ve_2005	Ve_2006	Ve_2007	Ve_19P	Ve_19A	Ve_20P	Ve_20A	Ve_21P	Ve_21A
Ve_2005		0,00044	0,0021	0,00289	0,00186	0,00232	0,00148	0,00187	0,00165
Ve_2006	0,44723		0,00178	0,0024	0,00196	0,00216	0,00116	0,00164	0,00162
Ve_2007	0,01792	<i>0,02752</i>		0,001	0,00009	0,00197	0,00038	0,00127	0,00059
Ve_19P	0,00020	0,00010	0,18822		0,0011	0,00058	0,00122	0,00087	0,00079
Ve_19A	0,01089	0,00267	0,70297	0,01782		0,00116	0,00085	0,00123	0,00065
Ve_20P	0,00307	0,00218	0,02337	0,26396	<i>0,02871</i>		0,00152	0,00048	0,00132
Ve_20A	<i>0,02634</i>	<i>0,04218</i>	0,46644	0,00307	<i>0,04416</i>	0,00188		0,00048	0,00047
Ve_21P	0,01158	0,01208	0,08554	0,08960	0,01960	0,42891	0,27653		0,00052
Ve_21A	0,01693	0,00842	0,35703	0,05347	0,12891	0,0097	0,20733	0,26337	

Anche suddividendo le popolazioni della Laguna di Venezia soltanto in base all'anno di campionamento, si osserva la presenza del differenziamento temporale che era emerso nelle precedenti analisi. Infatti, i confronti a coppie che risultano essere significativi sono quelli ottenuti confrontando le popolazioni del primo periodo temporale con quelli del secondo (Tabella 4.12).

Tabella 4.12. Nella matrice sono riportati i confronti a coppie tra le popolazioni della Laguna di Venezia accorpate in base all'anno di campionamento. Sono riportati sopra la diagonale gli indici FST dei confronti a coppie e sotto la diagonale i *p-value* corrispondenti. In grassetto sono riportati i *p-value* significativi dopo la correzione per test multipli (Benjamini & Hochberg, 1995). In corsivo sono riportati i *p-value* significativi con la soglia non corretta di 0,05.

	Ve_2005	Ve_2006	Ve_2007	Ve_2019	Ve_2020	Ve_2021
Ve_2005		0,00044	0,00210	0,00215	0,00149	0,00163
Ve_2006	0,44277		0,00178	0,00193	0,00123	0,00151
Ve_2007	0,01911	<i>0,03287</i>		0,00031	0,00072	0,00024
Ve_2019	0,00099	0,00030	0,56950		0,00031	0,00045
Ve_2020	0,01703	0,01941	0,27733	0,17624		0,00020
Ve_2021	0,00782	0,00426	0,22653	0,05139	0,37960	

4.3.4. Confronto della variabilità genetica

I test di AMOVA *locus by locus* hanno suggerito la presenza di un possibile segnale di differenziamento temporale nella Laguna di Venezia tra i campioni del periodo compreso tra il 2005 e il 2007 e quelli degli anni 2019-2020-2021. Quindi per ottenere un'ulteriore conferma, si è voluto testare tramite il *software* FSTAT versione 2.9.4 (Goudet, 2003) la possibile presenza di differenze significative in termini di *allelic richness*, eterozigosità attesa e osservata e FIS tra i campioni corrispondenti ai due diversi periodi temporali. I campioni dal 2005 al 2007 (*VECCHI*) sono stati suddivisi per anno in 3 popolazioni, senza considerare la stagione poiché sono stati raccolti tutti in primavera, formando il gruppo rappresentativo del primo periodo temporale. I campioni dal 2019 al 2021 sono invece stati suddivisi per stagione di campionamento e comprendono 6 popolazioni (*NUOVI* = Ve_19P, Ve_19A, Ve_20P, Ve_20A, Ve_21P, Ve_21). Una volta formati i due gruppi viene condotto un T-test a una coda, con lo scopo di testare la significatività dei confronti tra i valori delle statistiche descrittive sopra citate. Il test si basa sull'ipotesi nulla che i 2 gruppi siano uguali e sull'ipotesi alternativa che il gruppo definito come primo abbia un valore statisticamente maggiore del secondo. Quindi il test è stato ripetuto una seconda volta, invertendo l'ordine dei gruppi.

Come si può osservare in tabella 4.13, soltanto l'*allelic richness* risulta essere non significativa. La variazione osservata invece nei valori di FIS, Ho e He risulta essere statisticamente significativa, confermando quindi la presenza di un differenziamento genetico tra i campioni dei 2 diversi periodi temporali. FIS è aumentato da 0,088 a 0,156 con un *p-value* di 0,006, suggerendo un aumento dell'inbreeding con il passare del tempo. Ho suggerisce una diminuzione dell'eterozigosità osservata da 0,728 a 0,669 con un *p-value* di 0,012 e quindi un aumento del numero di individui omozigoti nella popolazione. Anche la diminuzione dell'eterozigosità attesa, seppur mostrando una piccola variazione (da 0,798 a 0,792), risulta essere statisticamente significativa con un *p-value* di 0,032.

Tabella 4.13. Nella tabella sono riportate da sinistra verso destra: i gruppi di appartenenza, le popolazioni raggruppate, l'*allelic richness* media, FIS medio, l'eterozigosità osservata media e l'eterozigosità attesa media per tutti i *loci*. Sono inoltre riportate in corsivo le medie dei valori, per ogni indice statistico, dei due gruppi Vecchi e Nuovi. Nell'ultima riga sono riportati in grassetto i *p-value* significati del T-test a una coda.

Gruppo	Popolazione	<i>Allelic Richness</i>	FIS	Ho	He
VECCHI	Ve_2005	21,638	0,091	0,730	0,802
	Ve_2006	21,418	0,109	0,710	0,797
	Ve_2007	20,648	0,055	0,751	0,794
NUOVI	Ve_19P	20,653	0,170	0,654	0,788
	Ve_19A	21,376	0,146	0,675	0,791
	Ve_20P	20,182	0,214	0,618	0,786
	Ve_20A	21,168	0,129	0,698	0,801
	Ve_21P	20,984	0,124	0,691	0,789
	Ve_21A	21,383	0,148	0,678	0,796
	<i>VECCHI</i>	21,235	0,088	0,728	0,798
	<i>NUOVI</i>	20,958	0,155	0,666	0,789
	<i>p-value</i>	0,246	0,006	0,012	0,032

4.3.5. Test di *Isolation by Time*

Per ottenere un'ulteriore conferma delle differenze temporali riscontrate dalle analisi di FST a coppie *locus by locus*, e data la significatività dei confronti tra le statistiche descrittive FIS, eterozigosità osservata e attesa tra i gruppi rappresentativi dei due diversi periodi temporali, si è voluto verificare l'eventuale presenza di una correlazione tra distanze genetiche e distanze temporali. Quindi è stata effettuata un'analisi di *Isolation by Time* tramite il software ISOLDE implementato nella versione Genepop on the web. In particolare, si è voluto testare se con il passare del tempo aumentasse anche la divergenza genetica tra le popolazioni. Per condurre l'analisi è stata utilizzata la suddivisione dei campioni per anni e per stagioni per anno (Tabella 4.10), quindi è stata testata la correlazione tra la matrice degli FST a coppie linearizzati (distanze genetiche) e la distanza temporale tra le popolazioni espressa in Ln (mesi). Come si vede dal grafico (Figura 4.3), la correlazione è calcolata facendo una regressione tra il logaritmo delle distanze temporali e il valore linearizzato di FST ed è risultata significativa con un *p-value* di 0,02500: quindi con il passare degli anni, aumenta anche la distanza genetica.

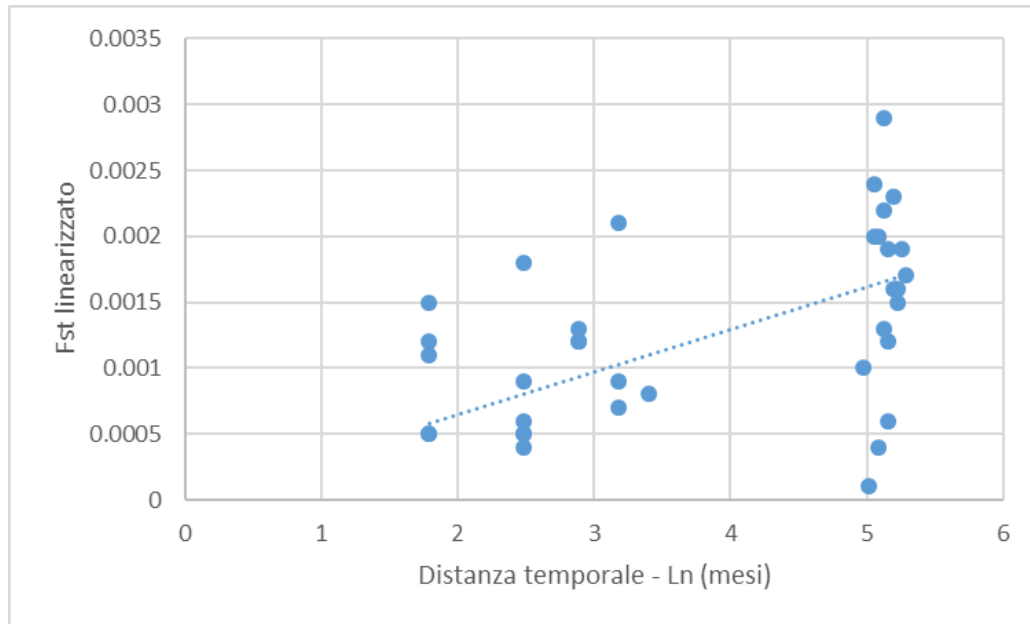


Figura 4.3 In ascissa sono indicati i logaritmi naturali delle distanze temporali espresse in mesi, in ordinata sono invece riportati gli FST linearizzati. La retta di regressione è calcolata come $y=0.0004x + 0,0002$.

4.3.6. Stima della dimensione effettiva di popolazione

La stima della dimensione effettiva di popolazione è stata calcolata utilizzando il software NeEstimator versione 2.1. (Do et al., 2013). Il calcolo è stato effettuato suddividendo il dataset in 6 popolazioni, che comprendono rispettivamente i campioni della Laguna di Venezia degli anni 2005, 2006, 2007, 2019, 2020 e 2021. Essa è stata stimata per tutte le possibili coppie di popolazioni, considerando il tempo di generazione intercorso tra due popolazioni. Essendo il tempo di generazione di *C. aestuarii* di 3 anni, tra un anno e l'altro si è scelto 0,33. Quindi tra il 2005 e il 2006 sono intercorse 0,33 generazioni, mentre tra 2005 e 2021, che rappresentano le popolazioni più distanziate nel tempo, sono trascorse 5,28 generazioni. Successivamente la dimensione effettiva è stata calcolata suddividendo il dataset in 2 popolazioni: la prima corrispondente al periodo 2005-2006-2007 e la seconda al periodo 2019-2020-2021 (Tabella 4.14). In questo caso ci viene restituito un valore di N_e pari a 912,4, con un range che va da 723,5 a 1123,0. In generale, considerando anche i singoli confronti, si può ritenere che la dimensione effettiva di popolazione per questa specie sia compresa tra i 621 e i 958 individui.

Tabella 4.14. Da sinistra verso destra sono riportate: le 2 generazioni, la più vecchia e la più nuova a confronto; la stima della dimensione effettiva di popolazione calcolata attraverso il metodo temporale messo a punto da Nei e Tajima (Nei & Tajima, 1981); il valore minimo e massimo del range della dimensione effettiva stimata tramite approccio parametrico.

Generazione 1	Generazione 2	Ne	minimo	massimo
2005	2019	352,4	288,1	433,0
2005	2020	524,8	416,4	643,5
2005	2021	492,2	391,7	603,9
2006	2019	347,1	275,8	426,4
2006	2020	578,8	460,0	711,0
2006	2021	687,4	547,9	842,5
2007	2019	1143,2	909,9	1402,8
2007	2020	1255,3	995,3	1544,9
2007	2021	1511,6	1205,7	1851,6
2005-2006-2007	2019-2020-2021	912,4	723,5	1123,0

4.3.7. Stima dei rapporti di parentela tra individui

Le stime dei rapporti di fratellanza tra gli individui con la relativa probabilità associata sono state calcolate utilizzando il software COLONY Versione 2.0.6.7 (Jones & Wang, 2010). Le popolazioni della sola Laguna di Venezia sono state raggruppate in due gruppi distinti; un gruppo formato dai campioni degli anni 2005-2006-2007 (*VECCHI*), e l'altro dai campioni degli anni 2019-2020-2021 (*NUOVI*). Sono state eseguite 2 analisi distinte, una per ogni gruppo. Come si può vedere in tabella 4.15, sono state trovati solo 8 individui fratelli/sorelle per il gruppo dei Vecchi e solo 34 per il gruppo dei Nuovi.

Successivamente, per verificare se i rapporti tra imparentati/non imparentati fossero significativamente diversi tra i due gruppi, è stato applicato un test chi-quadro.

Il test ha restituito un *p-value* con un valore non significativo; quindi si può dedurre che non ci sono differenze tra i rapporti dei due gruppi confrontati.

Tabella 4.15. Da sinistra verso destra sono riportati: il nome del gruppo, la rispettiva numerosità campionaria, il numero di individui fratelli/sorelle e il rapporto imparentati/non imparentati.

Gruppo	Numerosità campionaria	fratelli/sorelle	$\frac{\text{Imparentati}}{\text{non imparentati}}$
<i>VECCHI</i>	367	8	$\frac{8}{359}$
<i>NUOVI</i>	1550	34	$\frac{34}{1516}$

5. DISCUSSIONE

Le popolazioni di specie marine e lagunari sono spesso caratterizzate da una grande dimensione e da una elevata connettività dovuta alla presenza di uno stadio larvale planctonico capace di disperdere su lunghe distanze e dall'assenza di ovvie barriere geografiche. Per questo motivo risultano spesso omogenee a livello genetico e queste specie sono caratterizzate da panmissia su un'ampia scala geografica (Ward et al., 1994). Tuttavia, anche in queste specie, il flusso genico può essere limitato a causa di eventi stocastici che influenzano la dispersione o per la presenza di barriere non evidenti e la dimensione della popolazione dal punto di vista genetico può essere molto più piccola di quella attesa sulla base dell'abbondanza. Questi fattori possono generare significative differenze genetiche anche su piccola scala geografica e temporale.

In questa tesi è stata studiata la struttura genetica di tre popolazioni dell'alto Adriatico di *Carcinus aestuarii*, una specie molto diffusa e abbondante di granchio, presente negli ambienti di transizione e caratterizzata da uno stadio di vita larvale altamente dispersivo. I campioni, analizzati mediante 11 *loci* microsatellite, provenivano da diversi siti della Laguna di Venezia e dalle lagune limitrofe di Marano e Goro ed hanno permesso di valutare la possibile presenza di differenziamento geografico su piccola scala e, grazie all'utilizzo di campioni prelevati nei periodi temporali 2005-2007 e 2019-2021, di rilevare l'eventuale presenza di variazioni genetiche temporali.

Complessivamente sono state evidenziate differenze genetiche, piccole ma significative, tra i campioni di popolazione analizzati. Tali differenze non sono dovute alla presenza di differenziamento geografico, ma alla presenza di significative variazioni temporali. Infatti, non sono state rilevate differenze significative all'interno della Laguna di Venezia e nei confronti tra campioni delle lagune di Venezia, Marano e Goro, indicando la presenza di omogeneità su una scala spaziale di circa 150 chilometri. Sono state invece identificate differenze significative tra campioni prelevati nella laguna di Venezia in diversi anni e in diverse stagioni. In particolare, le differenze temporali sono state evidenziate non solo nei confronti tra i campioni più vecchi ed i più recenti, ma anche tra campioni prelevati in stagioni o anni vicini (Tabella 4.11), anche se sono decisamente più elevate nel primo caso. Nel loro insieme, infatti, le variazioni temporali osservate

in laguna di Venezia sono caratterizzate da un andamento di *IBT* (*Isolation By Time*), in cui la distanza genetica tra campioni aumenta all'aumentare del tempo che separa i diversi campionamenti. Le differenze rilevate sono inoltre accompagnate da una riduzione nei campioni più recenti della variabilità genetica e da un parallelo aumento dell'inbreeding. Infine, le variazioni temporali osservate a livello di frequenze alleliche sono riconducibili alla presenza di una dimensione di popolazione effettiva relativamente piccola (Tabella 4.14).

Nel loro insieme, i risultati ottenuti indicano che le popolazioni analizzate non si comportano come atteso, in generale, per grandi popolazioni di specie marine e lagunari e mostrano invece una significativa variazione a livello locale. La variazione locale è legata alle fluttuazioni, in diversi anni e stagioni, delle frequenze alleliche nelle popolazioni campionate, piuttosto che alla reale presenza di differenziamento geografico tra le popolazioni delle tre lagune. I risultati ottenuti relativamente all'assenza di differenziamento geografico concordano con l'attesa generale di omogeneità genetica e scarso differenziamento su piccola scala in popolazioni di specie marine caratterizzate da un'elevata dispersione larvale.

L'omogeneità genetica complessiva trovata tra le popolazioni delle tre lagune concorda con quanto si conosce riguardo all'oceanografia del Mar Adriatico settentrionale. La circolazione generale è antioraria, di tipo ciclonico, caratterizzata da correnti che spostano le masse d'acqua da Sud a Nord percorrendo le coste della Croazia, per poi riscendere lungo la costa italiana toccando il Golfo di Trieste, la Laguna di Marano, La laguna di Venezia, raggiungendo infine il Delta del Po e la Laguna di Goro (Giani et al., 2012). Tale andamento generale comporta potenzialmente un flusso genico elevato, in particolare se si considera il fatto che *C. aestuarii* si riproduce all'interno delle lagune, ma dopo l'accoppiamento le femmine migrano verso il mare per liberare le uova embrionate da cui si formeranno le larve (Aydin, 2013), con un rilascio che avviene in corrispondenza delle basse maree (Marta-Almeida et al., 2006). Questa particolare strategia è legata al fatto che le larve sono caratterizzate da una minor tolleranza alla bassa salinità rispetto agli adulti (Hines et al., 2004). Le larve, quindi, una volta raggiunto il mare, sarebbero trasportate principalmente da Nord a Sud lungo la costa Adriatica italiana, connettendo geneticamente le popolazioni delle lagune di Marano, Venezia e Goro. Inoltre, grazie al fatto che specifiche condizioni meteorologiche e

climatiche possono determinare un flusso in direzione inversa, ed alla presenza di sub-gyres ciclonici che connettono le due sponde dell'Adriatico (Carlson et al., 2016), anche le popolazioni più a sud potrebbero rifornire almeno sporadicamente o nel corso di diverse generazioni le popolazioni di Marano e Venezia, determinando così una completa omogeneità. Da questo punto di vista, il risultato conferma l'indicazione della presenza di una singola popolazione omogenea nel Nord Adriatico (Schiavina et al., 2014), nonostante sia necessaria una conferma per quanto riguarda la costa croata che, sebbene principalmente rocciosa, ospita alcune popolazioni di questa specie che non sono mai state analizzate geneticamente.

Allo stesso modo, la presenza di omogeneità genetica all'interno della Laguna di Venezia può essere spiegata guardando alla biologia della specie e alla strategia di dispersione larvale. Infatti, gli adulti, per quanto sedentari, sono in grado di spostarsi tra aree diverse, come testimoniato anche dalla presenza di migrazioni delle femmine per il rilascio delle uova embrionate; uno studio di marcatura/ricattura, effettuato sulla specie sorella *C. maenas* e relativo ad entrambi i sessi, indica una capacità di spostamento attivo degli adulti che può raggiungere i 400 metri (la massima distanza rilevabile nello studio) in soli quattro giorni (Young et al., 1999). Inoltre, le uova rilasciate all'esterno della laguna (Aydin, 2013) e le larve possono essere trasportate dalle correnti marine e dalle maree, tramite le bocche di porto, nuovamente all'interno della laguna stessa, raggiungendo anche aree diverse rispetto a quelle di provenienza dei genitori e trovando, per quanto riguarda la laguna di Venezia, delle condizioni di salinità nelle aree meno interne che ne consentono agevolmente la sopravvivenza (Hines et al. 2004; si veda il sito <https://issos.ve.ismar.cnr.it/> per le condizioni di salinità e l'andamento delle correnti in laguna di Venezia e nel mare antistante). In modo simile, le larve provenienti dalle altre lagune potrebbero entrare dalle diverse bocche di porto, contribuendo ulteriormente all'omogeneità osservata entro laguna di Venezia. È importante notare, come non sia possibile, con le metodiche genetiche utilizzate in questa tesi, discriminare tra il contributo dovuto a larve provenienti dalle altre lagune e quello dovuto alle larve locali, in quanto le diverse popolazioni sono geneticamente indistinguibili. In altre parole, non è possibile stimare l'importanza dell'auto-reclutamento dovuto alla ritenzione larvale rispetto al reclutamento nella popolazione di individui provenienti da altre aree. Tuttavia, attraverso una

simulazione Lagrangiana della dispersione larvale, effettuata in uno studio precedente, è stato possibile stimare, per *C. aestuarii* nell'Alto Adriatico, una ritenzione larvale molto bassa (inferiore a 1%), ma comunque superiore al contributo dovuto alle lagune limitrofe (Schiavina et al., 2014).

La biologia della specie e la strategia di dispersione larvale, pertanto, suggeriscono un elevato rimescolamento a livello genetico e l'impossibilità di sviluppare e mantenere un differenziamento genetico stabile alla scala geografica considerata.

È interessante notare, tuttavia, come la dispersione larvale e il reclutamento locale siano soggetti a eventi stocastici che possono generare significative differenze a livello temporale (David et al., 1997). Le differenze temporali su piccola scala riscontrate tra i campioni della Laguna di Venezia potrebbero infatti essere ricondotte al fenomeno indicato come *chaotic genetic patchiness*, termine coniato da Johnson e Black (1982), per descrivere la presenza di differenziamento genetico inatteso e instabile nel tempo tra coorti di individui poco distanziati nello spazio. Come suggerito anche in un lavoro analogo da Marino et al. (2011), il differenziamento osservato potrebbe essere causato dal cambiamento delle frequenze alleliche nelle nuove reclute per effetto della deriva genetica, che agirebbe in maniera istantanea su pool larvali prodotti da gruppi di individui di dimensione non infinita. Come riportato nell'introduzione, anche in popolazioni di grandi dimensioni, l'accoppiamento avviene necessariamente all'interno di gruppi più piccoli (Johnson & Black, 1984b), formati da individui limitati nello spazio da una ridotta mobilità degli individui adulti. Ogni gruppetto di riproduttori, per effetto della forte deriva genetica legata alla piccola dimensione, può produrre un pool larvale geneticamente distinto. Questa suddivisione della popolazione in piccoli gruppi riproduttivi circoscritti potrebbe creare delle differenze temporali casuali a livello locale, nel caso in cui vi sia un incompleto mescolamento delle larve prodotte da diversi gruppi o vi sia un reclutamento nella popolazione adulta di uno o pochi dei pool larvali prodotti (Hedgcock, 1994). Infine, anche la sopravvivenza preferenziale di larve appartenenti ad una stessa famiglia e quindi simili geneticamente potrebbe creare differenze temporali nelle generazioni successive.

Le analisi condotte in questa tesi hanno indicato differenze genetiche temporali consistenti e più pronunciate nel confronto tra le popolazioni dei due diversi periodi temporali (2005-2007 vs 2019-2021). La significatività trovata attraverso il test *di*

isolation by time invece ha infatti evidenziato una correlazione positiva tra distanze genetiche e temporali. Questo significa che con il passare del tempo aumentano le differenze genetiche tra le popolazioni campionate e che quindi la popolazione di *C. aestuarii* “attuale” ha subito dei cambiamenti nelle frequenze alleliche che si sono accumulati nel corso degli anni. Questa modificazione nella composizione allelica è stata accompagnata da un cambiamento a livello di variabilità genetica e di inbreeding. In particolare, il coefficiente di inbreeding è risultato statisticamente maggiore nei campioni del periodo 2019-2021 rispetto ai campioni del periodo 2005-2007, mentre l’eterozigosità osservata e attesa è significativamente più bassa nei campioni più recenti. Questi risultati suggeriscono che la popolazione sia andata incontro ad una perdita di variabilità genetica nel tempo, con un’apparente erosione genetica.

La perdita di variabilità genetica potrebbe essere legata ad una dimensione effettiva genetica relativamente piccola. In questa tesi è stata stimata, attraverso un approccio temporale, una dimensione effettiva compresa in un range tra i 600 e i 1000 individui circa (Tabella 4.14). Come riportato nello studio di Hauser et al. (2002), la dimensione effettiva in una popolazione dovrebbe essere di 50 individui per evitare gli effetti negativi della consanguineità a livello di fitness e garantire la sopravvivenza della popolazione nel breve termine. Popolazioni con un N_e così piccola devono essere costantemente monitorate perché molto suscettibili rispetto a eventi drastici che potrebbero causarne anche l’estinzione. Popolazioni con una dimensione effettiva di 500-1000 individui circa (Lynch & Lande, 1998) sarebbero comunque soggette a perdita di variabilità genetica e quindi ad una riduzione del potenziale adattativo nel medio o lungo termine. Solitamente ci si aspetta un valore elevato di dimensione effettiva in popolazioni naturali molto grandi, tuttavia diversi fattori possono determinare una dimensione effettiva di popolazione ridotta rispetto alla dimensione totale basata sul numero complessivo di individui (Hauser et al., 2002). In questo lavoro di tesi, il valore di dimensione effettiva di popolazione è stato confrontato, per una prima indicazione, con il numero medio di granchi pescati in laguna di Venezia e sbarcati nel mercato ittico di Chioggia dal 2005 e al 2021. Sulla base delle tonnellate di pescato medio annuale di questa specie registrate nella banca dati del pescato di Chioggia (23,8 tonnellate circa) e ipotizzando conservativamente un peso medio degli individui di 75 g circa, come nel lavoro di

Aydin et al. (2013), è stato possibile stimare il numero medio di individui pescati, che corrisponde a circa 320000 individui. Quindi, considerando anche che i granchi pescati costituiscono una piccola frazione della popolazione totale dei granchi presente nella laguna di Venezia, il rapporto tra dimensione effettiva e dimensione totale della popolazione risulta essere molto piccolo. In natura sono stati osservati molti casi di popolazioni grandi che presentano valori bassi nel rapporto tra la dimensione effettiva e la dimensione censita, che sono stati spiegati da fenomeni demografici, come il sovra-sfruttamento a causa della pesca eccessiva, o biologici nel caso in cui vi sia una elevata varianza nel successo riproduttivo individuale e solo una piccola parte degli individui contribuisce geneticamente alle generazioni successive (Hauser et al., 2022). Tuttavia, nel caso specifico delle popolazioni di *C. aestuarii*, sarebbe interessante investigare in futuro se questo valore basso di dimensione effettiva possa essere legato ad un possibile collo di bottiglia che ha interessato gli individui colonizzatori in seguito all'innalzamento del livello del mare dell'Alto Adriatico.

6. CONCLUSIONE

Dalle analisi del differenziamento geografico tra le popolazioni di *Carcinus aestuari* di Venezia, Marano e Goro dell'Alto Adriatico non sono emerse differenze significative, confermando la previsione di omogeneità genetica tra popolazioni di specie che presentano una fase di vita larvale altamente dispersiva.

Per quanto riguarda il confronto temporale, le differenze trovate tra le popolazioni della laguna di Venezia dei due diversi periodi temporali e i risultati ottenuti dal confronto degli indici di variabilità genetica, sembrerebbero indicare una situazione dinamica con una perdita di variabilità genetica nella popolazione attuale. Questa riduzione della variabilità genetica, unita ad una dimensione effettiva di popolazione modesta, potrebbero indicare un potenziale impatto negativo sulle popolazioni di *C. aestuari* a seguito di cambiamenti futuri delle condizioni ambientali.

In un'ottica di salvaguardia della biodiversità e delle dinamiche ecologiche esistenti nella laguna di Venezia, potrebbe essere necessario in futuro studiare l'effetto del MOSE sugli scambi mare-laguna e sulla composizione genetica di questa e altre specie modello.

7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

AMALDI F., BENEDETTI P., PESOLE G. (2021). Tecniche e metodi per la biologia molecolare. CEA, 4, 64-65.

AMOS W., HOFFMAN J. I., FRODSHAM A., ZHANG L., BEST S., HILL A. V. S. (2007). Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes*, 7, 10-14.

ANTHONY A., ATWOOD J., AUGUST P., BYRON C., COBB S., FOSTER C., FRY C., GOLD A., HAGOS K., HEFFNER L., KELLOGG D. Q., LELLIS-DIBBLE K., OPALUCH J. J., OVIATT C., PFEIFFER-HERBERT A., ROHR N., SMITH L., SMYTHE T., SWIFT J., VINHATEIRO N. (2009). Coastal lagoons and climate change: ecological and social ramifications in U.S. Atlantic and Gulf coast ecosystems. *Ecology and Society*, 14, 8.

ARNAUD-HAOND S., VONAU V., ROUXEL C., BONHOMME F., PROU J., GOYARD E., BOUDRY P. (2008). Genetic structure at different spatial scales in the pearl oyster (*Pinctada margaritifera cumingii*) in French Polynesian lagoons: beware of sampling strategy and genetic patchiness. *Marine Biology*, 155, 147-157.

AYDIN M. (2013). Length-weight relationship and reproductive features of the Mediterranean Green Crab, *Carcinus aestuarii* Nardo, 1847 (Decapoda: Brachyura) in the Eastern Black Sea, Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*. 45, 1615-1622.

BENJAMINI Y., HOCHBERG Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 57, 289-300.

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.

BILGIN S., ÇELİK E.Ş. (2004). The crabs of the Sinop Coasts of the Black Sea (Turkey). *Fırat University Journal of Engineering Science*, 16, 337-345.

BIRD E. C. F. (1994). Physical setting and geomorphology of coastal lagoons. In *Coastal lagoon processes*. Kjerfve B., (ed). Elsevier Oceanography Series, 2, 9-40.

- BRAMBATI A. (1992). Origin and evolution of the Adriatic Sea. Marine Eutrophication and Population Dynamics: 25th European Marine Biology Symposium, Ferrara (Italy). International Symposium Series, 327-346.
- BRIGGS J.C. (1974). Marine zoogeography. McGraw-Hill Book Company, New York.
- BROQUET T., VIARD F., YEARSLEY, J. M. (2013). Genetic drift and collective dispersal can result in *chaotic genetic patchiness*. *Evolution*, 67, 1660-1675.
- BURTON R.S. (1983). Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. *Marine Biology*, 1, 193-206.
- CABALLERO A. (1994). Developments in the prediction of effective population size. *Heredity*, 73, 657-679.
- CARLSON D., GRIFFA A., ZAMBIANCHI E., SUARIA G., CORGNATI L., MAGALDI M., POULAIN P. M., RUSSO A., BELLOMO L., MANTOVANI C., CELENTANO P., MOLCARD A., BORGHINI M. (2016). Observed and modeled surface Lagrangian transport between coastal regions in the Adriatic Sea with implications for marine protected areas. *Continental Shelf Research*, 118, 23-48.
- CARLTON J. T., COHEN A. N. (2003). Episodic global dispersal in shallow water marine organisms: the case history of the European shore crabs *Carcinus maenas* and *C. aestuarii*. *Journal of Biogeography*, 30, 1809-1820.
- CHAMBERLAIN J. S., GIBBS R. A., RANIER J. E., NGUYEN P. N., CASKEY C. T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy *locus* via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16, 11141-11156.
- CLARK J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition-reactions catalyzed by procaryotic and eukaryotic DNA-polymerases. *Nucleic Acids Research*, 16, 9677-9686.
- CLARK P. F., NEALE M., RAINBOW P. S. (2001). A morphometric analysis of regional variation in *Carcinus* Leach, 1814 (Brachyura: Portunidae: Carcininae) with particular reference to the status of the two species *C. maenas* (Linnaeus, 1758) and *C. aestuarii* (Nardo, 1847). *Journal of Crustacean Biology*, 21, 288-303.
- CLOTUCHE G., NAVAJAS M MAILLEUX A. M. HANCE T. (2013). Reaching the ball or missing the flight? Collective dispersal in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *PLoS ONE*, 8, e77573.
- COCKERHAM C. (1973). Analysis of gene frequencies. *Genetics*, 74, 679-700.

- COHEN A. N., CARLTON J. T, FOUNTAIN M.C. (1995). Introduction, dispersal and potential impacts of the green crab *Carcinus maenas* in San Francisco Bay, California. *Marine Biology* 122, 225-237.
- CROTHERS J.H. (1967). The biology of the shore crab *Carcinus maenas*. The background - anatomy, growth and life history. *Field Studies*, 2, 407-434.
- CROW J. F., KIMURA M. (1970). An introduction in Population Genetics Theory. Harper and Row, New York
- DAKIN E. E., AVISE J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504-509.
- DARLING J. A., TEPOLT C. K. (2008). Highly sensitive detection of invasive shore crab (*Carcinus maenas* and *Carcinus aestuarii*) larvae in mixed plankton samples using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). *Aquatic Invasions*, 3, 141-152.
- DAVID P., PERDIEU M. A., PERNOT A. F., JARNE P. (1997). Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution*, 51, 1318-1322.
- DELI T., KALKAN E., KARHAN S.Ü. ET AL. (2018). Parapatric genetic divergence among deep evolutionary lineages in the Mediterranean green crab, *C. aestuarii* (Brachyura, Portunoidea, Carcinidae), accounts for a sharp phylogeographic break in the Eastern Mediterranean. *BMC Evolutionary Biology*, 18, 53.
- DELI T., SAID K., CHATTI N. (2014). Morphological differentiation among geographically close populations of the green crab *C. aestuarii* Nardo, 1847 (Brachyura, Carcinidae) from the Tunisian coast. *Crustaceana*, 87, 257-283.
- DELI T., SAID K., CHATTI N. (2015). Genetic differentiation among populations of the green crab *Carcinus aestuarii* (Brachyura, Carcinidae) from the eastern and western Mediterranean coasts of Tunisia. *Acta Zoologica Bulgarica*, 67, 327-335.
- DEMEUSY N. (1958). Recherches sur la mue de puberté du décapoda brachyoure *Carcinus maenas*. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 95, 253-492.
- DI BACCO C., LEVIN L. A., SALA E. (2006). Connectivity in marine ecosystems: the importance of larval and spore dispersal In *Connectivity conservation*. Crooks K. R., Sanjayan M., (eds). Cambridge: Cambridge University Press, 184-212.

- DO C., WAPLES R. S., PEEL D., MACBETH G. M., TILLET B. J., OVENDEN J. R. (2013). NeEstimator v2: re-implementation of software for estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14, 209-214.
- DOMINGUES C. P., CREER S., TAYLOR M. I., QUEIROGA H., CARVALHO G. R. (2010). Genetic structure of *Carcinus maenas* within its native range: larval dispersal and oceanographic variability. *Marine Ecology Progress Series*, 410, 111-123.
- DOS SANTOS A., SANTOS A. M. P., CONWAY D.V. P., BARTILOTTI C., LOURENCO P. (2008). Diel vertical migration of decapod larvae in the Portuguese coastal upwelling ecosystem: implications for offshore transport. *Marine Ecology Progress Series*, 359, 171-183.
- EL MOUSADIK A., PETIT R. J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L. Skeels)] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 832-836.
- ELDON B., RIQUET F., YEARSLEY J., JOLLIVET D., BROQUET T. (2016). Current hypotheses to explain genetic chaos under the sea. *Current Zoology*, 62, 551-566.
- ESSELINK G. D., SMULDERS M. J. M., VOSMAN B. (2003). Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 277-286.
- ESTOUP A., ANGERS B. (1998). Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations In *Advances in molecular ecology*. Carvalho G., (ed). Amsterdam: IOS Press, 55-86.
- EXCOFFIER L., LISCHER H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- EXCOFFIER L., LISHER H. (2015). An integrated software package for population genetics data analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Ecology and Evolution. University of Berne.
- EXCOFFIER L., SMOUSE P. E., QUATTRO J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.

- FAZEKAS A. J., STEEVES R., NEWMASER S.G. (2010). Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *BioTechniques*, 48, 277-281.
- FISHER R. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Oxford University Press.
- FOULLEY J. L., OLLIVIER L. (2006). Estimating allelic richness and its diversity. *Livestock Production Science*, 101, 150-158.
- FREELAND J.R. (2011) *Molecular Ecology*, Second edition. Wiley, South Sussex.
- FREITAS S.S., SANTOS J. A. L., PRAZERES D.M.F. (2006). Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA. *Biotechnology Progress*, 22, 1179-1186.
- GACIC M., KOVACEVIC V., MAZZOLDI A., PADUAN J., ARENA F., MOSQUERA I., GELSI G., ARCARI G. (2002). Measuring water exchange between the Venetian Lagoon and the open sea. *Eos*, 83, 217-221.
- GACIC M., SOLIDORO C. (2004). Lagoon of Venice — circulation, water exchange and ecosystem functioning — introduction. *Journal of Marine Systems*, 51, 1-3.
- GAGNEUX P., BOESCH C., WOODRUFF D. S. (1997). Microsatellite scoring errors associated with non invasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, 6, 861-868.
- GALLAGHER, S.R. (1989). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel F. A., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D, Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds), A.3.9-A.3.15.
- GARCIA DE LEON F.J., CANONNE M., QUILLET E., BONHOMME F., CHATAIN B. (1998). The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 159, 303-316.
- GARRET R. H., GRISHAM C. M. N. (2014). *BIOCHIMICA*. Quinta edizione. Piccin.
- GELLER J. B., WALTON E. D., GROSHOLZ E. D., RUIZ G. M. (1997). Cryptic invasions of the crab *Carcinus* detected by molecular phylogeography. *Molecular Ecology*, 6, 901-906.

- GHEZZO M., GUERZONI S., CUCCO A., UMGIESSER G. (2010). Changes in Venice Lagoon dynamics due to construction of mobile barriers. *Coastal Engineering*, 57, 694-708.
- GIANI M., DJAKOVAC T., DEGOBBIS D., COZZI S., SOLIDORO C., FONDA UMANI S. (2012). Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 1-13.
- GOUDET J (2003). FSTAT version 2. 9. 4: a program to estimate and test population genetics parameters. Updated from Goudet [1995].
- GUICHOUX E., LAGACHE L., WAGNER S., CHAUMEIL P., LÉGER P., LEPAIS O., LEPOITTEVIN C., MALAUSA T., REVARDEL E., SALIN F., PETIT R. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11, 591-611.
- GUO S. W., THOMPSON E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-72.
- HAUSER L., ADCOCK G. J., SMITH P. J., RAMIREZ J. H. B., CARVALHO G. R. (2002). Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 11742-11747.
- HAUSER L., CARVALHO G. R. (2008). Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. *Fish and Fisheries*, 9, 333-362.
- HEDGECOCK D. (1986). Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bulletin of Marine Science*, 39, 550-564.
- HEDGECOCK D. (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In *Genetics and evolution of marine organisms*. Beaumont A. R., (ed). Chapman and Hall, London, 122-134.
- HILBISH T. J. (1996). Population genetics of marine species: the interaction of natural selection and historically differentiated populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200, 67-83.
- HILL W. G., ROBERTSON A. (1968). Linkage Disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 38, 226-231.
- HINES A., RUIZ G., HITCHCOCK N. G., DE RIVERA C. E. (2004). Projecting Range Expansion of Invasive European Green Crabs (*Carcinus maenas*) to Alaska: Temperature

and Salinity Tolerance of Larvae. Environmental Science and Management Faculty Publications and Presentations, 77.

HUGHES R. A., INOUE B. D., JOHNSON M. T. J., UNDERWOOD N., VELLEND M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11, 609-623.

HURLBERT S.H. (1971). The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, 52, 577-586.

IDURY R. M., CARDON L. R. (1997) A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Research*, 7, 1104-1109

JAYASHREE B., REDDY P. T., LEELADEVI Y., CROUCH J. H., MAHALAKSHMI V., BUHARIWALLA H. K., ESHWAR K. E., MACE E., FOLKSTERMA R., SENTHILVEL S., VARSHNEY R. K., SEETHA K., RAJALAKSHMI R., PRASANTH V. P., CHANDRA S., SWARUPA L., SRIKALYANI P., HOISINGTON D. A. (2006). Laboratory Information Management Software for genotyping workflows: applications in high throughput crop genotyping. *BMC bioinformatics*, 7, 383.

JOHNSON M. S., BLACK R. (1982). Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria sp.* *Marine Biology*, 70,157-164.

JOHNSON M. S., BLACK R. (1984a.) Pattern beneath the chaos: the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. *Evolution*, 38, 1371-1383.

JOHNSON M. S., BLACK R. (1984b.) The Wahlund effect and the geographical scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria sp.* *Marine Biology*, 79, 295-302.

JONES O. R., WANG J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, 10, 551-555.

JUANES F., LEE K.T., MCKNIGHT A., KELLOGG K. (2008). Claw allometry in green crabs, *Carcinus maenas*: heterochely, handedness, and sex. *Marine Biology*, 153, 523-528.

KIRKPATRICK S., GELLATT C. D., VECCHI M. P. (1983). Optimization by simulated annealing. *Science*, 220, 671-680.

KJERFVE B. (ed). (1994). Coastal Lagoon Processes. Elsevier Oceanographic Series.

KOEHN R. K., NEWELL R. I. E., IMMERMANN F. (1980). Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77, 5385-5389

- KRIJGSMAN W., HILGEN F.J., RAFFI I., SIERRO F. J., WILSON D. S. (1999). Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 400, 652-655.
- LEIGNEL V., STILLMAN J. H, BARINGOU S., THABET R., METAIS I. (2014). Overview on the European green crab *Carcinus spp.* (Portunidae, Decapoda), one of the most famous marine invaders and ecotoxicological models. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 9129-9144.
- LEVITAN D. R., C PETERSEN. (1995). Sperm limitation in the sea. *Trends in Ecology and Evolution*, 10, 228-231.
- LI C. (1976). *Population Genetics*. Pacific Grove, CA: Boxwood Press
- LI G., HEDGECOCK D. (1998). Genetic heterogeneity, detected by PCRSSCP, among samples of larval pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 55, 1025-1033.
- LYNCH M., LANDE R. (1998). The critical effective size for a genetically secure population. *Animal Conservation*, 1, 70-72.
- LYONS L. J., O'RIORDAN R.M., CROSS T.F., CULLOTY S.C. (2012). Reproductive biology of the shore crab *Carcinus maenas* (Decapoda, Portunidae): a macroscopic and histological view. *Invertebrate Reproduction and Development*, 56, 144-156.
- MANTEL N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized Regression Approach. *American Association for Cancer Research*, 27, 209-220.
- MARINO I. A. M., BARBISAN F., GENNARI M., BISOL P. M., ZANE L. (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Mediterranean shore crab *Carcinus aestuarii* (Decapoda, Portunidae). *Molecular Ecology Resources* 8, 370-372.
- MARINO I. A. M., PUJOLAR J. M., ZANE L. (2011) Reconciling deep calibration and demographic history: Bayesian inference of post glacial colonization patterns in *Carcinus aestuarii* (Nardo, 1847) and *C. maenas* (Linnaeus, 1758). *Plos ONE*, 6, e28567.
- MARKOULATOS P., SIAFAKAS N., MONCANY M. (2002), Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16, 47-51.
- MARTA-ALMEIDA M., DUBERT J. PELIZ, Á., QUEIROGA H. (2006). Influence of vertical migration pattern on retention of crab larvae in a seasonal upwelling system. *Marine Ecology Progress Series*, 307, 1-19.

- MATOZZO V., BOSCOLO A., MARIN M. G. (2013). Seasonal and gender-related differences in morphometric features and cellular and biochemical parameters of *Carcinus aestuarii* from the Lagoon of Venice. *Marine Environmental Research*, 89, 21-28.
- MEGLÉCZ E., COSTEDOAT C., DUBUT V., GILLES A., MALAUSA T., PECH N., MARTIN J. F. (2010). QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design *primers* from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26, 403-404.
- MEL. R., CARNIELLO L., D'ALPAOS L. (2021). How long the Mo.S.E. barriers will be effective in protecting all urban settlements within the Venice Lagoon? The wind setup constraint, *Coastal Engineering*, 168, 103923.
- MORI M., MANCONI R., FANCIULLI G. (1990). Notes on the reproductive biology of *Carcinus aestuarii* Nardo (Crustacea, Decapoda) from the lagoon of San Teodoro (Island of Sardinia, Italy). *Rivista di Idrobiologia*, 29, 763-774.
- MORIN P. A., MANASTER C., MESNIK S. L., HOLLAND R. (2009). Normalisation and *binning* of historical and multi-source microsatellite data: overcoming the problems of allele size shift with ALLELOGRAM. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1451-1455.
- MUELLER J. C. (2004). Linkage Disequilibrium for different scales and applications. *Briefing in Bioinformatics*, 5, 355-364.
- NASIRI H., FOROUZANDEH M., RASAEI M. J., RAHBARIZADEH F. (2005). Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 19, 229-232.
- NEI M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 3321-3323.
- NEI M., LI W. (1973). Linkage Disequilibrium in subdivided populations. *Genetics*, 75, 213-219.
- NEI M., TAJIMA F. (1981). Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics*, 98, 625-640.
- NICHOLS M. M., BOON J. D. (1994). Sediment transport processes in coastal lagoons. In *Coastal lagoon processes*. Kjerfve B., (ed). Elsevier Oceanography Series, 7, 157-219.
- O'REILLY P. T., CANINO M. F., BAILEY K. M., BENTZEN P. (2000). Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye pollock and other gadoids. *Journal of Fish Biology*, 56, 1074-1086.

- OHTA T., KIMURA M. (1969). Linkage Disequilibrium at steady state determined by random genetic drift and recurrent mutation. *Genetics*, 63, 229-238.
- OLEJNICZAK M., KRZYZOSIAK W.J. (2006). Genotyping of simple sequence repeats factors implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis*, 27, 3724-3734.
- PATARNELLO T., VOLCKAERT F. A. M., and CASTILHO R. (2007). Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, 16, 4426-4444.
- PATWARY M. U., KENCHINGTIN E. L., BIRD C. J., ZOUROS E. (1994). The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in genetic studies of the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1971). *Journal of Shellfish Research*, 13, 547-553.
- PIERCE B. A. (2016). *Genetica*, Seconda edizione. Zanichelli.
- RAGONIERI L., SCHUBART C. D. (2013). Population genetics, gene flow and biogeographic boundaries of *Carcinus aestuarii* (Crustacea: Brachyura: Carcinidae) along the European Mediterranean coast. *Biological Journal of the Linnean society*, 109, 771-790.
- RAHMAN M. T., UDDIN M. S., SULTANA R., MOUE A., SETU M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4, 30-36.
- RAVERA O. (2000). The Lagoon of Venice: The result of both natural factors and human influence. *Journal of Limnology*, 59, 19-30.
- RAY G. L. (2005.) *Invasive animal species in marine and estuarine environments: biology and ecology*. Aquatic Nuisance Species Research Program, U.S. Army Corps of Engineers.
- RAYMOND M., ROUSSET, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49, 1280-1283.
- RICE A. L., INGLE R. W. (1975). The larval development of *Carcinus maenas* (L.) and *C. mediterraneus* Czerniavsky (Crustacea, Brachyura, Portunidae) reared in the laboratory. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology*, 28, 103-119.
- ROMAN J., PALUMBI S. R. (2004). A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Molecular Ecology*, 13, 2891-2898.
- ROUSSET F. (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145, 1219-1228.

- ROUSSET F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-106.
- SANDERS H. L. (1968). Marine benthic diversity: a comparison study. *The American Naturalist*, 102, 243- 282.
- SCHIAVINA M., MARINO I. A. M., ZANE L., MELIÀ, P. (2014), Matching oceanography and genetics at the basin scale. Seascape connectivity of the Mediterranean shore crab in the Adriatic Sea. *Molecular Ecology*, 23, 5496-5507.
- SCHLÖTTERER C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365-371.
- SCHUBART C. D., CUESTA J. A., RODRÍGUEZ A. (2001). Molecular phylogeny of the crab genus *Brachynotus* (Brachyura: Varunidae) based on the 16S rRNA gene. *Hydrobiologia*, 449, 41-46.
- SELKOE K. A., GAINES S. D., CASELLE J. E., WARNER R. R. (2006). Current shifts and kin aggregation explain genetic patchiness in fish recruits. *Ecology*, 87, 3082-3094.
- SELKOE K. A., TOONEN R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9, 615-629.
- SHAPIRO D. Y. (1983). On the possibility of kin groups in coral reef fishes. Reaka M. L., (ed). *Ecology of deep and shallow coral reefs*. Symposia Series for Undersea Research. National Oceanic and Atmospheric Administration, Washington, DC., 39-45.
- SHINDE D., LAI Y., SUN F., ARNHEIM N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 31, 974-980.
- SIEGEL D. A., MITARAI S., COSTELLO C. J., GAINES S. D., KENDALL B. E., WARNER R. R., WINTERS K. B. (2008). The stochastic nature of larval connectivity among nearshore marine populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 8974-8979.
- SLATKIN M. (2008). Linkage Disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*, 9, 477-485.
- SMITH A., NELSON R. J. (2004). Capillary electrophoresis of DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*, 68, 2.8.1-2.8.17.

- SMITH N. P. (1994). Water, salt, and heat balances of coastal lagoons. In Coastal lagoon processes. Kjerfve B., (ed). Elsevier Oceanography Series, 4, 69-101.
- SOLIDORO C., CANU D. CUCCO A., UMGIESSER G. (2004). A partition of the Venice Lagoon based on physical properties and analysis of general circulation. Journal of Marine Systems, 51, 147-160.
- SPAULDING M. L. (1994). Modeling of circulation and dispersion in coastal lagoons. In *Coastal lagoon processes*. Kjerfve B., (ed).. Elsevier Oceanography Series, 5, 103-131.
- SVITICH A. A., SELIVANOV A. O., YANINA T. A. (2000). The Pont-Caspian and Mediterranean basins in the Pleistocene (paleogeography and correlation). *Oceanology*, 40, 868-881.
- TAYLOR M. S., HELLBERG M. E. (2003). Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science*, 299, 107-109.
- TEARE J. M., ISLAM R., FLANAGAN R., GALLAGHER S., DAVIES M. G., GRABAU C. (1997). Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. *Biotechniques*, 22, 1170-1174.
- TEPOLT C. K., BAGLEY M. J., GELLER J. B., BLUM M. J. (2006). Characterization of microsatellite *loci* in European green crab (*Carcinus maenas*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 343-345.
- THIEDE J. (1978) A glacial Mediterranean. *Nature*, 276, 680-683.
- TOONEN R. J., GROSBERG R. K. (2010). Causes of chaos: spatial and temporal genetic heterogeneity in the intertidal anomuran crab *Petrolisthes cinctipes*. In *Phylogeography and population genetics in Crustacea*. Koenemann S., Held C., Schubart C., (eds). CRC Press, 75-107.
- VERGARA-CHEN C., GONZÁLEZ-WANGÜEMERT M., MARCOS C., PÉREZ-RUZAFÀ À. (2013). Small-scale genetic structure of *Cerastoderma glaucum* in a lagoonal environment: potential significance of habitat discontinuity and unstable population dynamics. *Journal of Molluscan Studies*, 79, 230-240.
- VERMEIJ G. J., (1987). The dispersal barrier in the tropical Pacific: implications for molluscan speciation and extinction. *Evolution*, 41, 1046-1058.
- WANG, J. L., CABALLERO A. (1999), Developments in predicting the effective size of subdivided populations. *Heredity*, 82, 212-226.

WARD R. D., WOODWARK M., SKIBINSKI D. O. F. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44, 213-232.

WATTIER R., ENGEL C. R., SAUMITOU-LAPRADE P., VALERO M. (1998). Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite *loci*: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, 7, 1569-1573.

WEIR B. S., COCKERHAM, C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

WILKE T. (2003). *Salenthydrobia* gen. nov. (Rissooidea: Hydrobiidae): a potential relict of the Messinian salinity crisis. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137, 319-336.

WRIGHT J.M., BENTZEN P., (1994). Microsatellites: Genetic markers for the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4, 384-388.

WRIGHT S. (1931). Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16, 97-159.

WRIGHT S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.

YAMADA S.B., HAUCK L., (2001). Field identification of the European green crab species. *Carcinus maenas* and *Carcinus aestuarii*. *Journal of Shellfish Research*, 20, 905-912.

YOUNG T., KOMAROW S., DEEGAN L., GARRITT R. (1999). Population Size and Summer Home Range of the Green Crab, *Carcinus Maenas*, in Salt Marsh Tidal Creeks. *Biological Bulletin*, 197, 297-299.

ZIMMERMAN, J. T. F. (1981). The flushing of well mixed tidal lagoons and its seasonal fluctuation, UNESCO Technical Papers in Marine Science, 33, 15-26.

<http://venezia2021.corila.it/tematiche>

<http://www.corila.it/it/Venezia2021>

<https://issos.ve.ismar.cnr.it/>

www.mosevenezia.eu/ecosistema

www.mosevenezia.eu/progetto

