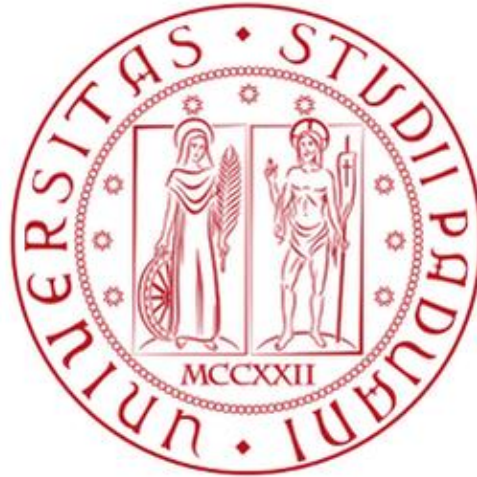


Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



DNA barcoding e biodiversità vegetale nella Laguna di Venezia

Relatore: Prof. Cristiano De Pittà
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dr. Filippo Drigo
Dipartimento di Biologia

Controrelatore: Prof. Paola Venier
Dipartimento di Biologia

Laureando: Ahmad Saba

Anno Accademico 2025/2026

Sommario

ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	4
<i>1.1 Storia e formazione della Laguna di Venezia</i>	4
<i>1.2 L'ecosistema della Laguna di Venezia</i>	5
<i>1.3 L'importanza di studi di monitoraggio e le diverse tecniche di identificazione delle specie</i>	6
2. MATERIALI E METODI	9
<i>2.1 Campionamento e conservazione del campione</i>	9
<i>2.2 Analisi morfologica</i>	10
<i>2.3 Analisi molecolare</i>	12
<i>2.3.1 Estrazione del DNA genomico</i>	12
<i>2.3.2 Analisi quantitativa e qualitativa del DNA estratto</i>	14
<i>2.3.3 Amplificazione dei barcode</i>	15
<i>2.3.4 Gel elettroforesi degli ampliconi di PCR</i>	18
<i>2.3.5 Purificazione degli amplificati di PCR</i>	18
<i>2.4 Sequenziamento dei marcatori molecolari e analisi delle sequenze</i>	19
<i>2.5 Delimitazione delle specie e analisi filogenetica</i>	19
3. RISULTATI	23
<i>3.1 Estrazione del gDNA</i>	23
<i>3.2 Amplificazione dei marcatori molecolari (DNA barcoding)</i>	26
<i>3.3 Sequenziamento</i>	29
<i>3.4 Identificazione delle specie</i>	29
DISCUSSIONE	46
CONCLUSIONI	50
BIBLIOGRAFIA	51
APPENDICE	54

ABSTRACT

La corretta identificazione delle specie è fondamentale per il monitoraggio della biodiversità, soprattutto in ambienti complessi e ricchi di taxa come la Laguna di Venezia, dove le analisi morfologiche possono risultare difficoltose o ambigue. In questo contesto, le tecniche molecolari, come il DNA *barcoding*, rappresentano uno strumento efficace per facilitare e velocizzare il processo di classificazione.

Questa tesi si concentra sull'identificazione di specie vegetali della Laguna di Venezia, con particolare attenzione a piante e macroalghe. I campioni, raccolti durante attività di monitoraggio, sono stati sottoposti ad analisi molecolare mediante amplificazione di specifici marcatori genetici, selezionati in base al *taxa* studiato, e successivo confronto delle sequenze ottenute con *database* di riferimento.

Per rafforzare i risultati dell'identificazione sono state, inoltre, condotte analisi di ricostruzione filogenetica e applicati due algoritmi per la delimitazione delle specie, *ASAP* e *GMYC*. L'approccio integrato ha consentito di migliorare l'identificazione nell'84% dei casi.

Complessivamente sono state identificate 76 specie vegetali, sebbene in alcuni casi la classificazione si sia fermata al livello di genere. I risultati evidenziano l'efficacia dell'integrazione tra approcci molecolari e analisi filogenetiche, particolarmente utile per risolvere ambiguità derivanti dall'identificazione morfologica e da informazioni talvolta imprecise presenti nei database pubblici.

1. INTRODUZIONE

1.1 Storia e formazione della Laguna di Venezia

La Laguna di Venezia, con una superficie di 550 Km², è il più grande ecosistema costiero di transizione del Mar Mediterraneo. Caratterizzata da un dedalo di canali, la profondità media è di circa 1 m, con l'eccezione della bocca di porto di Malamocco che è il sito più profondo del Mar Adriatico settentrionale, raggiungendo una profondità di circa 50 m (Sfriso *et al.*, 2009).

La sua origine risale a 12'000 anni fa, derivante dall'effetto combinato di correnti marine su sedimenti fluviali in aggiunta all'abbassamento del livello del mare durante la glaciazione Würm (Pavoni *et al.*, 1992). Al termine della glaciazione ci fu un innalzamento del livello delle acque che coprì quella determinata zona nord del Mar Adriatico, modellando la costa a formare la laguna come la conosciamo oggi.

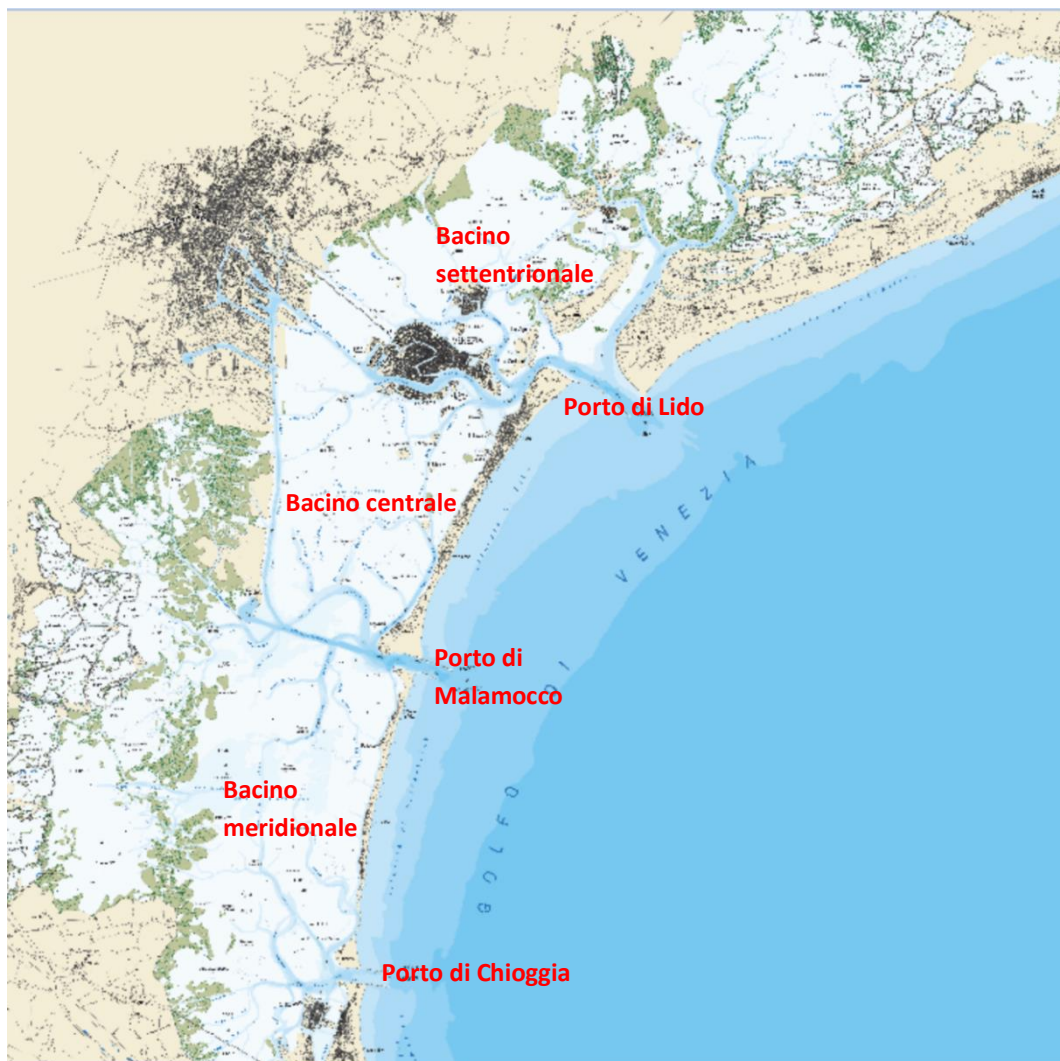


Figura 1. Immagine della Laguna di Venezia nel 2003. In figura si osservano i tre bacini idrologici (nord, centro, sud) che formano l'apparato lagunare e le tre bocche di porto, da nord a sud rispettivamente Lido, Malamocco e Chioggia. (Immagine presa da <https://cigno.atlantedellalaguna.it/maps/29/view>)

La laguna (Figura 1) è divisa in tre bacini idrologici principali (settentrionale, centrale e meridionale), delimitati dagli spartiacque di Lido e Pellestrina (Sfriso *et al.*, 2009). Il collegamento con il mare è garantito dalle bocche di porto di Lido, Malamocco e Chioggia, rispettivamente da nord a sud (Madricardo *et al.*, 2019).

La Laguna di Venezia è un sistema complesso, eterogeneo e dinamico, fortemente influenzato dal mare, dagli apporti fluviali e da fattori atmosferici quali venti e temperatura dell'aria. Infatti, viene definito come ecosistema di transizione, ed è mantenuto da influenze continue dall'ambiente terrestre/fluviale e quello marino. Questo delicato bilanciamento fa sì che la durata geologica di questo ambiente sia normalmente ridotta. Tuttavia, le attività umane hanno cercato di preservare questo territorio nei secoli in modo da mantenere i vantaggi che questo ambiente fornisce alla popolazione del luogo (Ravera, 2000). Pertanto, tra il XV e il XVII secolo i corsi dei principali tributari in laguna (Bacchiglione, Brenta, Piave, Sile) sono stati rediretti in mare, riducendo l'apporto di nutrienti e sedimenti. In aggiunta, la costruzione di due canali, Vittorio Emanuele III (1920-1930) e il Canale dei Petroli (1962-1969), hanno aumentato l'influenza delle maree favorendo la trasformazione della laguna in una baia marina (Fogarín *et al.*, 2019). Tutte queste attività hanno portato alla riduzione delle barene da 12'000 a 3'500 ettari tra il 1900 e il 2019 (Day *et al.*, 2019). La barena è una porzione di terreno tipico delle lagune, periodicamente sommersa dall'alta marea e poi riemmersa con la bassa marea. Formate principalmente da sedimenti come fango e sabbia, le barene sono un ecosistema minacciato dall'innalzamento dei mari.

1.2 L'ecosistema della Laguna di Venezia

La Laguna di Venezia, essendo classificata come ecosistema di transizione, è caratterizzata da apporti di acque dolci dalla terraferma e da ingressi di acqua marina dalle bocche di porto. Ciò determina la presenza di un marcato gradiente di salinità crescente verso il mare e una distribuzione dei nutrienti in senso opposto. La granulometria dei sedimenti è prevalentemente fine per l'apporto di particolato fluviale, di conseguenza si osserva la predominanza di fondali molli (Drigo *et al.*, 2024). Pertanto, la combinazione di dinamiche mareali, morfologia articolata e variabilità chimico-fisica genera un mosaico di microambienti che sostiene un'elevata biodiversità di organismi, potendo classificare questo ambiente come *hot-spot* di biodiversità, importante dal punto di vista della conservazione delle specie. Tra gli organismi che lo popolano, le specie vegetali possiedono dei ruoli di sostegno che apportano benefici all'ecosistema. Fra queste funzioni troviamo la fissazione del carbonio, la regolazione del clima, le aree di *nursery*, il ciclo dei nutrienti e non solo (Drigo *et al.*, 2024). La ricerca su cui si basa questo elaborato si è concentrata su briccole e barene. I principali *taxa* fotosintetici presenti in queste aree sono principalmente macroalghe (*Rhodophyta*, *Heterokontophyta*, *Chlorophyta*), fanerogame marine e piante alofite (*Tracheophyta*). Trattandosi di

produttori primari, queste specie vegetali sostengono l'intera rete trofica della laguna (Drigo *et al.*, 2024). Questo sostegno si traduce in fenomeni come la generazione di zone di alimentazione per numerose specie animali piuttosto che il compattamento e la stabilizzazione del suolo grazie alle piante dotate di apparato radicale. In particolare, quest'ultima caratteristica risulta fondamentale dal momento che il vasto impatto antropico e la natura medio-fina dei sedimenti naturali di questo luogo sono motivo di risospensione del particolato ed erosione delle barene. In conseguenza a ciò, l'aumento della torbidità dell'acqua può compromettere la sopravvivenza del *phytobentos*, ossia l'insieme di quelle specie vegetali che vivono sui fondali adesi a rocce, sedimenti o ad altri organismi (Drigo *et al.*, 2024).

Visto il delicato equilibrio naturale che intercorre tra numerose nicchie ecologiche, la riduzione o addirittura la perdita di alcune specie vegetali può compromettere l'intero sistema, lasciando lacune nel ciclo trofico: queste mancanze possono essere rimpiazzate da specie non indigene che, in seguito a determinati cambiamenti ambientali, trovano un habitat favorevole alla riproduzione. Queste specie aliene possono rimanere innocue nei confronti degli altri organismi locali o entrare in competizione con essi, diventando così invasive (Drigo *et al.*, 2024).

1.3 L'importanza di studi di monitoraggio e le diverse tecniche di identificazione delle specie

Vista l'elevata presenza antropica nella Laguna di Venezia e le modifiche che l'uomo ha apportato nel corso del tempo, gli studi di monitoraggio consentono di comprendere come l'ecosistema stia rispondendo ai cambiamenti e di individuare eventuali nuove specie. Alla base di un monitoraggio efficace vi è una corretta identificazione delle specie.

L'identificazione di specie vegetali può essere eseguita tramite un'analisi morfologica mediante chiavi dicotomiche, un metodo basato su domande binarie ad esclusione relative a caratteri osservabili macroscopicamente: attraverso questo metodo di analisi è possibile risalire alla classificazione dei *taxa* sulla base di caratteri tassonomici. Tuttavia, alcuni fattori rendono questo metodo molto limitato: (1) l'analisi con chiavi dicotomiche è molto complessa, richiede un certo grado di esperienza e c'è alto rischio di un'interpretazione errata delle caratteristiche osservabili; (2) questa tecnica può risultare efficace solo in una particolare fase della vita dell'organismo: in particolare, il ciclo riproduttivo delle macroalghe è molto articolato, talvolta poco chiaro e lineare; (3) la plasticità fenotipica, il fenomeno per il quale lo stesso genotipo, può portare a fenotipi differenti in risposta a condizioni ambientali variabili. Questo fenomeno complica in particolare la valutazione morfologica in quanto la stessa specie può assumere caratteri tassonomici differenti tra i diversi bacini idrologici della laguna e tra le varie stagioni di raccolta. Inoltre,

è anche possibile che specie differenti, se stimolate dalle stesse condizioni esterne, possano assumere un aspetto molto simile, complicando ulteriormente l'analisi.

Nel tentativo di ovviare ai limiti imposti dall'osservazione morfologica, si utilizza anche un approccio più specifico mediante tecniche molecolari, in modo tale da arricchire e/o correggere l'identificazione delle specie.

Una possibile tecnica è il *DNA barcoding*: questo processo sfrutta brevi sequenze genetiche, denominate *barcode* o *barcoding markers*. Tali regioni devono essere presenti nel genoma degli organismi analizzati, ma al contempo devono presentare una variabilità sufficiente tra specie differenti in modo da consentire la discriminazione.

Anche il *barcoding* presenta alcuni limiti principali. Il primo è l'assenza di un marcatore universale valido per tutti i gruppi tassonomici. In ambito vegetale, la scelta del barcode ricade generalmente sul genoma plastidiale, che è più abbondante nelle cellule vegetali e quindi più facilmente analizzabile (Kowalska *et al.*, 2019). Il DNA nucleare, infatti, è meno utilizzato perché presente in un basso numero di copie e difficile da analizzare in campioni degradati, mentre il DNA mitocondriale è spesso soggetto a riarrangiamenti strutturali che ne alterano l'identità (Kowalska *et al.*, 2019). Il secondo limite riguarda l'uso di database pubblici per confrontare le sequenze e identificare gli organismi analizzati: le informazioni presenti in questi archivi non sono sempre affidabili (Robuchon *et al.*, 2014) e possono quindi portare a identificazioni errate.

I *markers* vengono amplificati mediante PCR e sono diversi per i diversi *taxa* di organismi vegetali che troviamo in laguna. Per le *Tracheophyta* è possibile usare il gene plastidiale *rcbL*, codificante per la subunità maggiore della ribulosio-1,5-bifosfato carbossilasi/ossigenasi (De Vere *et al.*, 2015). Esso consente generalmente un'identificazione affidabile, ma non è applicabile a organismi privi di plastidi funzionali, come gli eterotrofi obbligati, specie che durante l'evoluzione hanno perso le capacità fotosintetiche. *rcbL* è presente anche nelle macroalghe: nelle *Rhodophyta* presenta, però, una bassa divergenza tra *taxa* correlati, mentre mostra una variabilità moderata nelle *Chlorophyta*. Tuttavia, in quest'ultimo caso il gene possiede delle sequenze introniche che limitano l'universalità del *marker* (Kowalska *et al.*, 2019).

Per le *Chlorophyta* è diffuso l'utilizzo di un altro marcatore, il *tufA*, gene plastidiale codificante per il fattore di elongazione Tu (Saunders & McDevit, 2012). Questo gene è considerato facilmente amplificabile e con una buona capacità discriminante tra specie affini. Tuttavia, in alcune linee evolutive è avvenuto il trasferimento del gene nel nucleo, con possibile comparsa di sequenze paraloghe (Kowalska *et al.*, 2019), ossia sequenze simili o identiche presenti all'interno dello stesso genoma e che derivano da eventi di duplicazione genica.

Per *Rhodophyta* e *Heterokontophyta* si utilizza frequentemente la porzione 5' del gene mitocondriale *cox1* (*COI*), codificante per la subunità 1 della citocromo c ossidasi, efficace nella distinzione di specie associate (Saunders & McDevit, 2012). Questo marcatore non è adatto alle *Chlorophyta* per la presenza di introni nella sequenza.

Anche la scelta dei primer non è banale. I primer sono brevi sequenze nucleotidiche, lunghe circa 20 paia di basi, che si appaiano alle estremità della regione di DNA da amplificare. Vengono utilizzati in coppia, primer forward e primer reverse, e fungono da inneschi per l'azione della DNA polimerasi. In questo modo, definiscono il punto di inizio della sintesi del nuovo filamento complementare e permettono di amplificare esclusivamente la regione di DNA compresa tra i due primer. Per quanto concerne il gene *rbcL* è possibile lavorare con *primer* universali in quanto la sequenza genica con cui si appaiano nelle *Tracheophyta* è conservata (De Vere *et al.*, 2015); invece, per i geni *tufA* e *COI* è frequente l'utilizzo di *primers* degeneri, i quali presentano sequenze in cui alcuni nucleotidi possono essere variabili (Saunders & McDevit, 2012). Questa caratteristica è importante perché le regioni di *annealing* in questi geni delle macroalghe non sono altrettanto conservate, di conseguenza la variabilità di alcuni nucleotidi permette di aumentare la possibilità di appaiamento.

Con la tecnica del *DNA barcoding* è quindi possibile ottenere sequenze di marcatori specifici per diverse specie che possono essere allineate con database di riferimento, come GenBank. Tuttavia, se non accuratamente controllate o referenziate, anche l'allineamento può condurre a risultati fuorvianti o incompleti.

Per ovviare a ciò, le sequenze ottenute possono essere utilizzate per condurre un'indagine di delimitazione delle specie e ricostruzione filogenetica tramite appositi *software* informatici.

Un'analisi di *Species delimitation* ci permette di definire se un gruppo di sequenze appartiene alla stessa specie, mentre la ricostruzione filogenetica analizza le relazioni evolutive tra le sequenze.

L'integrazione di questi approcci con il *DNA barcoding* può aiutare nella classificazione delle specie, specialmente in contesti in cui i database di riferimento non forniscono un appaiamento con una singola specie.

Questa tesi ha l'obiettivo di analizzare ed identificare a livello molecolare campioni di specie vegetali raccolti in varie briccole e barene distribuite su tutta la superficie lagunare e in periodi differenti dell'anno, comparando il risultato con ciò che è stato ipotizzato in base ai caratteri morfologici. L'attenzione è stata rivolta verso specie di piante del *phylum Tracheophyta* (1) e macroalghe dei *phyla Rhodophyta* (2) (rosse), *Heterokontophyta* (3) (brune) e *Chlorophyta* (4) (verdi).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento e conservazione del campione

Nell'ambito di un progetto di dottorato sono stati campionati organismi vegetali da briccole e barene nei diversi settori della Laguna e in diverse stagioni tra il 2023 e il 2024. I siti campionati sono riportati in Figura 2.

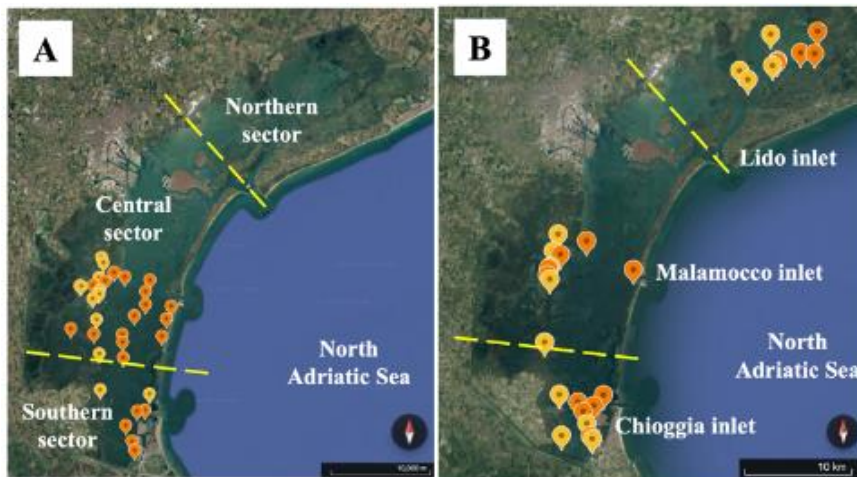


Figura 2. Siti di campionamento. Siti campionati nel: A) 2023 e B) 2024.

I frammenti vegetali di piante e macroalghe sono stati raccolti direttamente in Laguna di Venezia. Sono state scelte le barene in quanto ospitano piante alofite, mentre le briccole sono state campionate per la raccolta di macroalghe. Infine, le fanerogame marine sono state raccolte sia in prossimità della riva delle barene che intorno al fondale delle briccole. Il campionamento delle barene è avvenuto lungo tre transetti paralleli alla riva, lunghi 30 m ciascuno e consecutivamente più interni l'uno dell'altro. Le briccole sono invece state campionate per tutta la profondità e per tutta la circonferenza della struttura.

Per il mantenimento dell'integrità del tessuto vegetale, dopo l'identificazione morfologica (eseguita in laboratorio), i campioni raccolti sono stati inseriti in buste di plastica contenenti delle biglie di silica al fine di essiccare il tessuto per preservare il più possibile il materiale e di conseguenza il DNA. Per catalogare in maniera ordinata le centinaia di campioni così ottenuti, ad ogni campione è stato associato un codice identificativo univoco.

I codici assegnati presentano le seguenti informazioni: la prima lettera (in maiuscolo) indica la stagione di raccolta quindi le alternative sono: P (primavera), E (estate), A (autunno). La seconda lettera, sempre in maiuscolo, indica la zona lagunare quindi N (nord), S (sud), E (est) e C (centro). La terza lettera (in minuscolo) specifica il sito all'interno della zona in questione (a, b, c, d, e). Segue il numero corrispondente all'identificazione morfologica, ossia una cifra progressiva attribuita dal raccoglitore; vengono indicati con lo stesso numero i

frammenti vegetali che si suppone siano della stessa specie o genere. Infine, la lettera che indica se si tratta di una pianta o una macroalga (P, M).

Un esempio di codice è ECa106P, ad indicare un campione di pianta marina (P) che da identificazione morfologica si ipotizza essere della specie *Ruppia maritima* (106 è il numero che è stato scelto per il genere *Ruppia*), raccolta in estate (E), in laguna centrale (C) nel settore a.

2.2 Analisi morfologica

L'identificazione iniziale è di tipo morfologica basata sull'utilizzo di chiavi dicotomiche. Per svolgere questa analisi si utilizzano dei manuali appositi, un esempio è mostrato in Figura 3.

Si parte dall'osservazione di un carattere morfologico generico visibile ad occhio nel campione di interesse, da quel punto si escludono man mano le caratteristiche non presenti nel campione e si seguono, invece, quelle osservate attraverso la numerazione che identifica i singoli tratti tassonomici. In questo modo si collezionano diversi elementi distintivi che, ad un certo punto, conducono all'identificazione della specie che possiede tutte le caratteristiche precedentemente collegate.

Come citato in precedenza, una chiara identificazione morfologica è ostacolata dai limiti caratteristici di questa tecnica: l'operatore deve possedere un certo grado di esperienza per poter riconoscere delle differenze che talvolta possono sembrare impercettibili. Il vincolo maggiore è comunque quello della plasticità fenotipica: è possibile aggirare questa difficoltà conoscendo le varie forme che le stesse specie assumono nei vari distretti lagunari e nei vari periodi dell'anno, tuttavia si tratta di un lavoro estremamente articolato e complesso che richiede molte conoscenze.

Per ovviare a tali criticità si è deciso di associare all'analisi morfologica un approccio molecolare per incrementare il numero di specie identificate con precisione.



Macroalga verde con
morfologia laminare

1 Talli di piccole dimensioni, poco visibili ad occhio nudo

1 Talli macroscopici, generalmente visibili ad occhio nudo

2

6

6 Tallo interamente calcificato

6 Tallo non calcificato o con una parziale calcificazione

7

25

25 Tallo che si espande aderendo totalmente o parzialmente al substrato

25 Tallo non incrostante

26

33

33 Fronda a forma di ombrello

33 Fronda non a forma di ombrello

34 Tallo costituito da filamenti ramificati, fusi tra loro a formare una lamina

34 Tallo non costituito da filamenti fusi tra loro

Acetabularia acetabulum (Linnaeus) P.C. Silva

34

35

37

Figura 3. Immagine di una pagina tratta da un manuale per l'identificazione morfologica con chiavi dicotomiche. In figura si osserva un esempio di indagine morfologica per l'identificazione di una macroalga verde con morfologia laminare. I cerchi indicano le risposte ai quesiti posti dalla chiave sulla base di caratteristiche morfologiche, che proseguendo sono sempre più specifici (immagine presa da Wolf & Moro, 2013).

2.3 Analisi molecolare

La tecnica utilizzata per l'amplificazione di sequenze geniche è quella del *DNA barcoding*. Innanzitutto, è necessario estrarre il DNA genomico dal campione conservato in silica gel.

2.3.1 Estrazione del DNA genomico

In questo lavoro di tesi per l'estrazione si utilizzano kit commerciali e un protocollo basato sul CTAB modificato e sviluppato in collaborazione con il dr. Luca Schiavon (Dip.to Biologia, Università di Padova).

I kit commerciali sono stati scelti in base alla loro efficacia di estrazione. In particolare, è stato utilizzato il *DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen)* per i campioni di piante alofite e fanerogame marine, mentre per le macroalghe è stato scelto il *FastPure Plant DNA Isolation Mini Kit (Vazyme)*. Nei casi in cui l'estrazione non dava risultati positivi, è stato utilizzato il protocollo di estrazione basato sul CTAB.

Il passaggio iniziale, comune a tutti i metodi, è l'omogenizzazione del tessuto secco. Per ogni campione sono stati pesati circa 20 mg che si sono dimostrati essere la quantità ideale per evitare sia la presenza di troppi metaboliti secondari che avrebbero impedito un'estrazione efficiente, sia ottenere concentrazioni di DNA troppo basse.

Per l'omogenizzazione i campioni vengono posti in tubi da 2 mL (*disruption tube*) insieme ad una biglia metallica. Vengono poi inseriti in azoto liquido (-196 °C) per preservare l'integrità del DNA e facilitare la frammentazione del tessuto. Per la polverizzazione è stato utilizzato il *Tissuelyser LT (Qiagen)*. Per frammentare i campioni, l'agitazione è stata impostata a 35 Hz per 30 secondi e i tubi sono stati poi immersi nuovamente in azoto liquido. Questi passaggi sono stati ripetuti varie volte fino ad ottenere la completa polverizzazione del tessuto. Da questo punto in poi sono state seguite le indicazioni fornite dai protocolli dei kit utilizzati.

Per quanto riguarda il *DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen)*, a temperatura ambiente, il tessuto polverizzato viene risospeso nel *buffer CDI*, che serve a disgregare le membrane. Successivamente, viene eseguita una centrifugazione di 2 minuti a 12'000 x g, in modo da precipitare i detriti cellulari. Il surnatante, così ottenuto, viene trasferito in una nuova *ependorf* da 1,5 mL e si aggiunge il *buffer CD2*. La miscela viene poi mescolata tramite *vortex* e successivamente centrifugata per 1 minuto a 12'000 x g. Si recupera nuovamente il surnatante e lo si trasferisce in un nuovo tubo da 1,5 mL. Si aggiunge il *buffer APP*, si mescola la soluzione con il *vortex* e la si carica in una colonnina di purificazione (*MB spin column*) che si trova all'interno di un *collection tube*. Si centrifuga per 1 minuto a 12'000 x g, si scarta l'eluato e si ripete il procedimento fino a esaurimento della soluzione da caricare. Il DNA è ora legato alla matrice della colonnina e si procede con i lavaggi con i

buffer AW1 e *AW2*. Il processo di lavaggio implica il caricamento del primo *buffer* in colonna, segue una centrifugazione per 1 minuto a 12'000 x g, si scarta l'eluato e si ripete per il secondo *buffer*. Per eliminare completamente ogni residuo dei *buffer* si svolge un'ulteriore centrifugazione per 2 minuti a 16'000 x g a vuoto. Infine, per l'eluizione del DNA, si pone la colonnina in una nuova provetta da 1,5 mL e si aggiunge l'H₂O *DNase free* e il campione viene centrifugato per 1 minuto a 12'000 x g. Si ottiene così il DNA in soluzione acquosa.

Per il *FastPure Plant DNA Isolation Mini Kit (Vazyme)*, a temperatura ambiente, si risospinge il campione polverizzato in *buffer A1*; segue l'aggiunta di *RNasi A*. I campioni vengono poi incubati per 10 minuti in un termoblocco a 65 °C in agitazione a 400 rpm. Al termine dell'incubazione si aggiunge il *buffer A2*, seguono 5 minuti in ghiaccio e una centrifugazione di 10 minuti a 18'400 x g che porta alla precipitazione dei detriti cellulari. Il surnatante viene prelevato e posizionato in una nuova provetta insieme al *buffer A3*; questa soluzione viene caricata in una *FastPure gDNA column* inserita in un nuovo tubo in modo da legare il DNA alla membrana di silice. Successivamente, il campione viene centrifugato per 1 minuto a 13'400 x g, si scarta l'eluato e si ripete il processo fino ad esaurimento della soluzione da caricare. Per la successiva fase di lavaggio, si carica in colonna il *buffer AW* si centrifuga per 30 secondi a 13'400 x g e si scarta l'eluato. Si ripete nuovamente il lavaggio. Si svolge poi una centrifugazione a vuoto di 2 minuti a 13'400 x g per eliminare ogni residuo di *buffer* dalla matrice della colonnina. Si procede con l'eluizione del DNA aggiungendo H₂O *DNase free* sul filtro della colonnina. Dopo 5 minuti di incubazione, si centrifuga per 1 min. a 13'400 x g per ottenere il DNA estratto in soluzione acquosa.

Nei pochi casi in cui l'estrazione con i kit commerciali non è risultata efficiente, si è utilizzato il protocollo che prevede l'utilizzo del CTAB, che induce la precipitazione del DNA.

Il CTAB è un detergente cationico costituito da una lunga catena idrocarburica idrofobica e da una testa idrofilica; in acqua forma delle micelle, vista la sua natura anfipatica (Heikrujam *et al.*, 2020). Durante l'estrazione del DNA (in soluzione acquosa), il CTAB entra in contatto con la membrana plasmatica delle cellule, cattura i lipidi e provoca il rilascio del nucleo, il quale rimane privo di membrana. I tessuti vegetali sono ricchi di polisaccaridi e metaboliti secondari, i quali possono interferire e/o co-precipitare con il DNA. Il CTAB, insieme ad altre sostanze (ad esempio il PVP – Polivinilpirrolidone), riduce l'effetto di questi metaboliti (Heikrujam *et al.*, 2020).

Il protocollo utilizzato prevede la medesima fase di preparazione dei campioni (macinazione del tessuto) dei kit commerciali citati, poi, i seguenti passaggi:

- Lisi cellulare tramite aggiunta del *buffer* CTAB (contenente CTAB, NaCl, Tris-HCl, EDTA) e incubazione delle provette a 65°C (bagno termostatico).

In questa fase si ottiene la degradazione delle membrane cellulari e l'inattivazione di *DNasi*

- Separazione delle fasi con cloroformio (solvente organico); per questo passaggio è prevista una centrifugazione a freddo (4°C) di 10 minuti a 11'000 x g e trasferimento del surnatante così ottenuto in un nuovo tubo
- Degradazione dell'RNA con aggiunta di *RNasi A (Sigma)* e successiva incubazione a 37°C per 30 minuti
- Precipitazione del DNA attraverso l'aggiunta di isopropanolo e incubazione *overnight* a -20°C; segue una centrifugazione a 13'500 x g per 15 minuti e lo scarto del surnatante.
- Lavaggio del DNA precipitato con etanolo, centrifugazione per 10 minuti a 13'500 x g ed eliminazione del surnatante
- Asciugatura del pellet e risospensione in H₂O *DNase free*

Al termine di questa procedura si ottiene il DNA estratto in soluzione acquosa.

2.3.2 Analisi quantitativa e qualitativa del DNA estratto

Prima di proseguire con le fasi successive, è necessario eseguire un controllo su quantità e qualità del DNA estratto.

L'analisi spettrofotometrica con il *NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)* ha permesso di stimare concentrazione e purezza degli acidi nucleici. Questi parametri vengono determinati con la misura dell'assorbanza in un microvolume (1 µL) di campione: la quantità di radiazione assorbita è proporzionale alla concentrazione di DNA presente nella goccia. Gli acidi nucleici assorbono alla lunghezza d'onda di 260 nm e a una OD₂₆₀ corrispondono una concentrazione di 50 µg/mL per il *dsDNA*.

Per quanto riguarda la purezza, invece, lo strumento restituisce i rapporti 260/280 e 260/230 che sono indicativi di eventuali contaminazioni da proteine (280 nm) o carboidrati (230 nm). In particolare, una buona preparazione di DNA, priva di contaminazioni, dovrebbe mostrare rapporti 260/280 = 1.8-2.0 e rapporti 260/230 > 2.

L'analisi spettrofotometrica, però, non è in grado di distinguere tra DNA integro e degradato. A tale scopo viene effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio 0,7% (massa/volume) in TAE 1X. Viene utilizzato il *MIDORI Green Advance (NIPPON Genetics EUROPE)* come intercalante e il *Gene Ruler 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)* come marcatore di peso molecolare. Nei pozzetti vengono caricati i campioni, a cui precedentemente è stato aggiunto il *5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega)*, che facilita il caricamento e permette di visualizzare l'avanzamento della corsa. La corsa viene condotta con il *Mupid®- One Electrophoresis System (NIPPON Genetics EUROPE)* applicando 100 V (Volt) di differenza di potenziale. Al termine dell'elettroforesi il gel è stato visualizzato al

transluminatore UV *Molecular Imager Gel Doc XR + System with Image Lab Software (Bio-Rad)*.

2.3.3 Amplificazione dei barcode

Dopo aver verificato le condizioni del DNA estratto, si procede con l'amplificazione dei marcatori selezionati.

In Tabella 2 sono riassunti i marcatori genetici selezionati per i vari gruppi tassonomici: (1) *rbcL*, sequenza plastidiale codificante per la subunità maggiore della ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi per le *Tracheophyta*. (2) il gene mitocondriale *COI-5P*, codificante per la subunità 1 della citocromo c ossidasi per le *Heterokontophyta* e le *Rhodophyta*. Infine, (3) il gene plastidiale *tufA*, rappresentante il fattore di elongazione Tu per le *Chlorophyta*. Come si nota in Tabella 2 e 3, per le *Rhodophyta* è stato considerato anche il marcatore *rbcL*, amplificato, però, con *primer* diversi da quelli utilizzati per le *Tracheophyta*. Questa peculiarità riguarda i campioni ipotizzati appartenere al *taxa Ceramiales* (macroalghe rosse) in quanto, dalla letteratura, è noto che il *DNA barcoding* delle specie di *Ceramium* fornisce ottimi risultati utilizzando il marcatore *rbcL* (Freshwater & Rueness, 1994).

L'amplificazione di questi marcatori genetici avviene mediante PCR. I componenti della mix di reazione, in un volume finale di 50 μ L, si trovano in tabella 1:

Tabella 1. Componenti della mix di reazione per la PCR con i relativi volumi e concentrazioni. L'ordine con cui sono riportati i componenti coincide con quello dell'aggiunta nella mix.

Reagente	Volume (μ L)	Concentrazione finale
H ₂ O DNase free	40.75	/
Buffer 10X	5.00	1X
dNTPs [10 mM]	1.00	200 μ M
<i>Primer</i> Forward [10 μ M]	1.00	0.20 μ M
<i>Primer</i> Reverse [10 μ M]	1.00	0.20 μ M
Taq Polymerase [5 U/ μ L]	0.25	1.25 U
gDNA [10 ng/ μ L]	1.00	10 ng/50 μ L

Per eseguire queste PCR sono stati utilizzati tre diversi termociclatori: (1) *Mastercycler X40 (Eppendorf)*, (2) *Veriti 96 well Thermal Cyclers (Applied Biosystems)* e (3) *2720 Thermal Cyclers (Applied Biosystems)*.

Tabella 2 e 3 riportano rispettivamente i *primer* utilizzati e i profili di amplificazione impostati per i diversi marcatori.

Tabella 2. Sequenze dei primer utilizzati. Per ogni gruppo tassonomico, sono indicati i marcatori genetici selezionati e i *primer* utilizzati per amplificarli. Per i *primer* sono indicate le sequenze, se si tratta di *forward* o *reverse* e le referenze da cui derivano le informazioni. Le lettere non canoniche nelle sequenze indicano le basi degenerate R = G, A; Y = T, C; W = A, T; M = A, C; N = A, T, C, G

TAXA	GENE	PRIME R	F/ R	SEQUENZA 5' --> 3'	RIFERIMENTI
<i>Tracheophyta</i>		<i>rbcLa-F</i>	F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAAGC	De Vere <i>et al.</i> , 2015
		<i>rbcLr590</i>	R	AGTCCACCGCGTAGACATTCAT	
<i>Tracheophyta</i>	<i>rbcL-3P</i>	<i>rbcL F57</i>	F	GTAATTCATATGCTAAAATGGG	Freshwater & Rueness, 1994
		<i>rbcL R753</i>	R	GCTCTTCATACATATCTTCC	
		<i>GWSFn</i>	F	TCAACAAAYCAYAAAGATATYGG	
		<i>GWSFa</i>	F	CAAAYCAYAARGATATYGGAAC	
<i>Rhodophyta</i>		<i>GWSFi</i>	F	CAAAYCAYAARGATATYGGTAC	Saunders & McDevit, 2012
		<i>GWSFi</i>	F	CAAAYCAYAARGATATYGGIAC	
		<i>GWSRx</i>	R	ACTTCTGGRTGICCRAARAAYCA	
		<i>GWSRi</i>	R	GGRTGICCRAARAAYCARAA	
<i>Heterokontophyta</i>	<i>a</i>	<i>GWSRin</i>	R	GGRTGNCCRAARAAYCARAA	Saunders & McDevit, 2012
		<i>GazF2</i>	F	CCAACCAYAAAGATATWGGTAC	
		<i>GazR2</i>	R	GGATGACCAAARAACCAAAA	
<i>Chlorophyta</i>	<i>tufA</i>	<i>tufGF4</i>	F	GGNGCNGCNCAAATGGAYGG	
		<i>tufAF</i>	F	TGAAACAGAAMAWCGTCATT	
		<i>tufAR</i>	R	CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC	

Tabella 3. Profili di amplificazione. *Primer* differenti richiedono condizioni sperimentali diverse, come riportato negli articoli citati.

TAXA	GENE	PRIMER	CONDIZIONI DI PCR			RIFERIMENTI
			denaturazione	cicli	estensione finale	
Tracheophyta	<i>rbcL-3P</i>	<i>rbcLa-F</i>	95°C per 3 min	45 cicli di 95°C per 30 sec, 50°C per 90 sec, 72°C per 40 sec	72°C per 5 min	De Vere <i>et al.</i> , 2015
		<i>rbcLr590</i>				
Rhodophyta	<i>COI-5P</i>	<i>rbcL F57</i>	94°C per 2 min	30 cicli di 94°C per 40 sec, 50°C per 40 sec, 72°C per 40 sec	72°C per 5 min	Wolf <i>et al.</i> , 2018
		<i>rbcL R753</i>				
		<i>GWSFn</i>	95°C per 2 min	5 cicli di 95°C per 30 sec, 45°C per 30 sec, 72°C per 1 min, + 35 cicli di 95°C per 30 sec, 46.5°C per 30 sec, 72°C per 1 min	72°C per 7 min	Saunders & McDevit, 2012
		<i>GWSFa</i>				
		<i>GWSFt</i>				
		<i>GWSFi</i>				
Heterokontophyta		<i>GWSRx</i>				
		<i>GWSRi</i>				
		<i>GWSRin</i>				
		<i>GazF2</i>				
Chlorophyta	<i>tufA</i>	<i>GazR2</i>	94°C per 4 min	38 cicli di 94°C per 1 min, 45°C per 30 sec, 72°C per 1 min	72°C per 7 min	
		<i>tufGF4</i>				
		<i>tufAF</i>				
		<i>tufAR</i>				

2.3.4 Gel elettroforesi degli ampliconi di PCR

Per verificare la riuscita dell'amplificazione, è stata allestita una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 2.3.2.

Nei casi in cui non si osservano bande ben visibili è necessario ripetere la PCR variando le condizioni di amplificazione, come i parametri termici o numero/tempo dei cicli di denaturazione, o coppie di *primer*.

Nel caso in cui, invece, si osserva la banda di interesse, si può procedere alla purificazione degli amplificati.

2.3.5 Purificazione degli amplificati di PCR

La purificazione permette di rimuovere *primer*, nucleotidi, enzimi ed altri componenti della reazione di amplificazione in modo da isolare solamente gli ampliconi ottenuti.

Per questo processo è stato utilizzato il kit commerciale *QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)* per la maggior parte dei campioni, che prevede i seguenti passaggi:

- Si aggiunge il buffer PB alla reazione di PCR e si mescola bene
- Si carica la soluzione in una colonna QIAquick, precedentemente inserita in una provetta da raccolta, per permettere al DNA di legarsi alla membrana
- Si centrifuga per 1 minuto a $18.000 \times g$ e si elimina l'eluato
- Si procede al lavaggio aggiungendo il buffer PE alla colonna
- Si centrifuga nuovamente per 1 minuto a $18.000 \times g$ e si scarta l'eluato
- Si effettua un'ulteriore centrifugazione a vuoto per rimuovere completamente i residui di buffer dalla membrana
- Per l'eluazione finale, si aggiunge H₂O DNase-free direttamente sul filtro della colonna e si centrifuga per 1 minuto a $18.000 \times g$

Al termine di questa procedura si ottiene il DNA purificato in soluzione acquosa.

In alcuni casi, nonostante vari tentativi di amplificazione, si osservavano doppie bande, ma solo quella in prossimità del peso molecolare atteso era quella relativa all'amplificazione del marcatore genico. Per recuperare solo il DNA di interesse, la banda è stata estratta direttamente dalla matrice di agarosio.

In questi casi, si ripete la corsa elettroforetica caricando tutto il volume della reazione di PCR e si taglia la banda d'interesse dal gel di agarosio con un apposito bisturi. Ora si procede utilizzando il *Monarch Spin DNA Gel Extraction Kit (NEB)* per l'estrazione e la purificazione del DNA dal gel. Si posiziona il frammento di gel in una *eppendorf*, si aggiunge il *Monarch Buffer BY* e si incuba per 10 minuti a 50°C, agitando periodicamente la provetta. In questo modo si scioglie il gel e il DNA viene liberato in soluzione; segue il caricamento della soluzione nella

Monarch Spin Column SIA precedentemente collocata all'interno di un *Monarch Spin Collection Tube*. Si centrifuga per 1 minuto a 16'000 x g e si scarta l'eluato. Segue la fase di lavaggio mediante il *Monarch Buffer WZ* che viene aggiunto alla colonna, poi si centrifuga 1 minuto a 16'000 x g e si scarta l'eluato (il lavaggio si ripete due volte). Per l'eluazione si aggiunge *H₂O DNase free* sul filtro della colonnina, segue centrifugazione e si ottiene il DNA purificato in soluzione acquosa.

Terminata la purificazione, si determina concentrazione e purezza mediante analisi spettrofotometrica con il *NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)*.

2.4 Sequenziamento dei marcatori molecolari e analisi delle sequenze

Gli amplificati dei marcatori molecolari sono stati sequenziati con il metodo Sanger dalla ditta Eurofins. Una volta ottenute le sequenze, è possibile allinearle con quelle depositate in *GenBank (NCBI)* mediante l'utilizzo di BLAST. Il *tool* restituisce una serie di risultati sulla base di diversi parametri: in particolare, sono state considerate con maggior attenzione le percentuali di identità e di *query cover*. La prima indica effettivamente quanti nucleotidi siano identici tra la nostra sequenza e quelle della banca dati. La seconda è rappresentativa, invece, di quanto la sequenza sottoposta (*query*) sia sovrapposta a quelle del *database*.

Può succedere che le sequenze dei nostri campioni abbiano valori di allineamento paragonabili con sequenze assegnate a specie diverse, impedendo un'identificazione univoca. Pertanto, sono stati applicati metodi di delimitazione di specie e analisi filogenetiche per incrementare la correttezza dell'identificazione.

2.5 Delimitazione delle specie e analisi filogenetica

Per confermare l'identificazione delle specie tramite *barcoding* molecolare, sono state condotte analisi di delimitazione delle specie e analisi filogenetiche. Queste metodologie permettono di valutare la validità delle identificazioni morfologiche, delle informazioni ottenute dall'allineamento su BLAST e di esplorare le relazioni evolutive tra gli organismi analizzati.

Prima di procedere con le analisi, è stato necessario preparare un dataset completo di sequenze:

1. Raggruppamento delle sequenze: le sequenze ottenute dal *barcoding* sono state organizzate in base ai quattro phyla analizzati nel presente studio.
2. Integrazione con database pubblici: sono state scaricate sequenze aggiuntive dai database GenBank e BOLD, includendo sia specie strettamente correlate a quelle del campionamento, sia *outgroup* (gruppi esterni utilizzati come riferimento

evolutivo, ma filogeneticamente vicini al *taxa* in esame). Questo ha permesso di confrontare i risultati ottenuti con le informazioni già presenti nelle banche dati internazionali. L'elenco completo delle sequenze scaricate è riportato nella Tabella A1 in Appendice.

3. Allineamento multiplo: tutte le sequenze sono state allineate utilizzando il software MEGA (versione 12) (Kumar *et al.*, 2024) con l'algoritmo MUSCLE, mantenendo le impostazioni predefinite. L'allineamento permette di identificare le posizioni omologhe tra le diverse sequenze, fondamentale per i confronti successivi.

Una volta completato l'allineamento, è stato possibile procedere con le analisi di delimitazione delle specie e con la ricostruzione filogenetica.

Delimitazione delle specie

La delimitazione delle specie è un processo che permette di identificare i confini tra diverse entità tassonomiche sulla base di dati molecolari. Sono stati applicati due metodi complementari, che utilizzano approcci differenti:

1. Metodo ASAP (*Assemble Species by Automatic Partitioning*)

ASAP è un metodo basato sulla distanza genetica che identifica gruppi di specie (*cluster*) analizzando le differenze nucleotidiche percentuali tra le sequenze. L'analisi è stata condotta tramite l'interfaccia web di ASAP.

È stato utilizzato il modello di distanza genetica "Kimura-2P (K80)", che corregge le sostituzioni nucleotidiche multiple tenendo conto che transizioni (A↔G, C↔T) e trasversioni (purine↔pirimidine) hanno tassi differenti. Tutte le altre impostazioni sono state mantenute ai valori predefiniti

ASAP genera diverse partizioni possibili (modi alternativi di raggruppare le sequenze in specie); per le analisi successive è stata selezionata la partizione con il punteggio ASAP più basso, che indica la maggiore affidabilità statistica nell'identificazione dei cluster di specie

2. Metodo GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent*)

GMYC è un metodo basato sulla topologia dell'albero filogenetico che identifica gruppi di specie analizzando i pattern di ramificazione in un albero ultrametrico (un albero evolutivo in cui tutte le sequenze terminali sono equidistanti dalla radice, rappresentando il presente). La procedura applicata può essere riassunta in quattro fasi:

Fase 1 - Preparazione del file per BEAST:

L'allineamento è stato importato nel software BEAUti (versione 2), che prepara i file di input per BEAST. È stato selezionato il modello evolutivo HKY+G (Hasegawa-Kishino-Yano con distribuzione Gamma), che tiene conto di:

- Frequenze nucleotidiche diseguali: le quattro basi (A, T, C, G) non sono presenti con la stessa frequenza
- Tassi differenziali tra transizioni e trasversioni: le transizioni avvengono più frequentemente delle trasversioni
- Variazione dei tassi evolutivi tra i siti: la distribuzione Gamma modella il fatto che alcune posizioni della sequenza evolvono più rapidamente di altre
- Il "Subset model" è stato impostato su "HKY" e il "Gamma category count" su 4 (numero di categorie discrete per approssimare la distribuzione continua Gamma)

Fase 2 - Analisi bayesiana con BEAST:

Il file XML generato da BEAUti è stato eseguito in BEAST (versione 2.7.7), un software che utilizza l'approccio bayesiano e l'algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo) per stimare: la topologia dell'albero (le relazioni evolutive tra le sequenze); la lunghezza dei rami (rappresentano il tempo evolutivo o il numero di sostituzioni) e i tempi di divergenza (quando si sono separate le diverse linee evolutive)

L'analisi MCMC è stata condotta con una lunghezza della catena di 10 milioni di generazioni (1×10^7) e una frequenza di campionamento di 1000 (ogni 1000 generazioni viene registrato un albero). La distribuzione a posteriori delle probabilità rappresenta la probabilità che una determinata topologia dell'albero sia corretta, considerati i dati osservati e il modello evolutivo utilizzato.

Fase 3 - Valutazione della convergenza:

Il software Tracer (versione 1.7.2) è stato utilizzato per verificare l'affidabilità statistica dei risultati. È stato controllato che tutti i valori di ESS (*Effective Sample Size*) fossero superiori a 200, soglia che indica una stima affidabile dei parametri. Nei casi in cui l'ESS fosse inferiore a 200, la lunghezza della catena MCMC o la frequenza di campionamento sono state opportunamente modificate e l'analisi ripetuta

Fase 4 - Sintesi degli alberi e analisi GMYC:

Gli alberi campionati durante l'analisi MCMC sono stati riassunti utilizzando TreeAnnotator (versione 2.7.7) (Michonneau, 2016), che genera un albero di consenso rappresentativo della distribuzione a posteriori. L'analisi GMYC vera e

propria è stata successivamente condotta in RStudio (versione 4.5.1), seguendo il protocollo di Michonneau (2016), per identificare i confini tra specie sulla base dei pattern di ramificazione dell'albero ultrametrico.

Analisi filogenetica

L'analisi filogenetica permette di ricostruire le relazioni evolutive tra le specie e di visualizzarle sotto forma di albero filogenetico. La procedura applicata può essere riassunta nelle seguenti tre fasi:

Fase 1 - Ricostruzione dell'albero con Maximum Likelihood:

L'analisi è stata eseguita tramite il server web IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015; Trifinopoulos *et al.*, 2016), mantenendo le impostazioni predefinite. Il software ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) ha selezionato automaticamente il modello evolutivo più adatto per ciascun dataset, basandosi su criteri statistici (AIC, BIC). È stato utilizzato il metodo di Maximum Likelihood (Massima Verosimiglianza), che identifica l'albero filogenetico con la più alta probabilità di aver generato i dati osservati.

Fase 2 - Calcolo delle misure di supporto statistico:

Per valutare l'affidabilità dei rami dell'albero filogenetico, sono state calcolate tre misure di supporto:

- Ultrafast Bootstrap (UFBoot) con 1000 replicati (Minh *et al.*, 2013; Diep *et al.*, 2017): un metodo rapido e accurato che ricampiona i dati per stimare la robustezza di ciascun ramo. Valori $\geq 95\%$ indicano forte supporto.
- SH-aLRT (Shimodaira-Hasegawa-like approximate likelihood ratio test) con 1000 replicati: un test statistico che confronta la verosimiglianza di topologie alternative. Valori $\geq 80\%$ indicano supporto significativo.
- Approximate Bayes test: un test bayesiano approssimato che stima la probabilità a posteriori di ciascun ramo.

Fase 3 - Visualizzazione e annotazione degli alberi:

Tutti gli alberi filogenetici sono stati visualizzati e annotati utilizzando iTOL (Interactive Tree Of Life) (Letunic & Bork, 2024). La rappresentazione grafica è stata integrata con i cluster di specie identificati dai metodi ASAP e GMYC, permettendo un confronto visivo immediato tra i diversi approcci di delimitazione delle specie

3. RISULTATI

Dal campionamento di barene e briccole sono stati raccolti 347 campioni di organismi vegetali.

3.1 Estrazione del gDNA

Per quanto riguarda l'estrazione del DNA genomico, per tutti i campioni il processo è andato a buon fine. In termini di concentrazione di DNA, i valori ottenuti si distribuiscono nell'intervallo 10 - 200 ng/ μ L. Per alcuni campioni sono state ottenute concentrazioni minori che sono comunque state sufficienti per procedere con le PCR.

Per quanto riguarda la purezza del DNA si può affermare che per le piante la media dei rapporti 260/280 si aggira attorno a 2,2 - 2,3 e quella dei rapporti 260/230 è circa 1,1 - 1,2. Per le macroalghe, invece, per i rapporti 260/280 la media si avvicina a 1,8 - 1,9 e per i 260/230 si aggira attorno a 1,0 - 1,1.

In Tabella 4 sono riportate le caratteristiche delle tecniche di estrazione utilizzate, in particolare si notano le differenze fra l'utilizzo dei kit commerciali e del protocollo basato sul *CTAB*.

Tabella 4. Confronto tra le caratteristiche tecniche dei metodi di estrazione utilizzati.

Caratteristiche	<i>Qiagen DNeasy Plant Pro Kit</i>	<i>Vazyme FastPure Plant Kit</i>	Protocollo sperimentale basato sul CTAB
Tipologia	Colonnina di silice	Colonnina di silice	Precipitazione
Campioni ideali	Piante terrestri	Macroalghe	Campioni difficili o fallimenti dei kit
Tempo totale	Qualche ora	Qualche ora	2 giorni (<i>overnight</i>)
Difficoltà operativa	Bassa	Bassa	Medio-alta
Riproducibilità	Molto alta	Alta	Variabile (dipende dall'operatore)
Resa in DNA	Buona	Buona	Molto alta
Purezza DNA	Alta	Alta	Molto alta se eseguito correttamente
Rimozione metaboliti secondari	Discreta	Buona	Ottima (grazie a <i>CTAB</i> e cloroformio)

Dalla Tabella 4 si evince che i risultati migliori si ottengono mediante l'utilizzo del protocollo basato sul *CTAB*. Tuttavia, questo metodo implica tempi lunghi che non erano compatibili con il processamento di circa 350 campioni. Per questo motivo è stato utilizzato in modo mirato per estrarre il gDNA dai campioni in cui i kit avevano fallito.

In Figura 4 e 5 sono riportate le corse elettroforetiche rappresentative di alcuni campioni di gDNA estratti rispettivamente da piante e macroalghe.

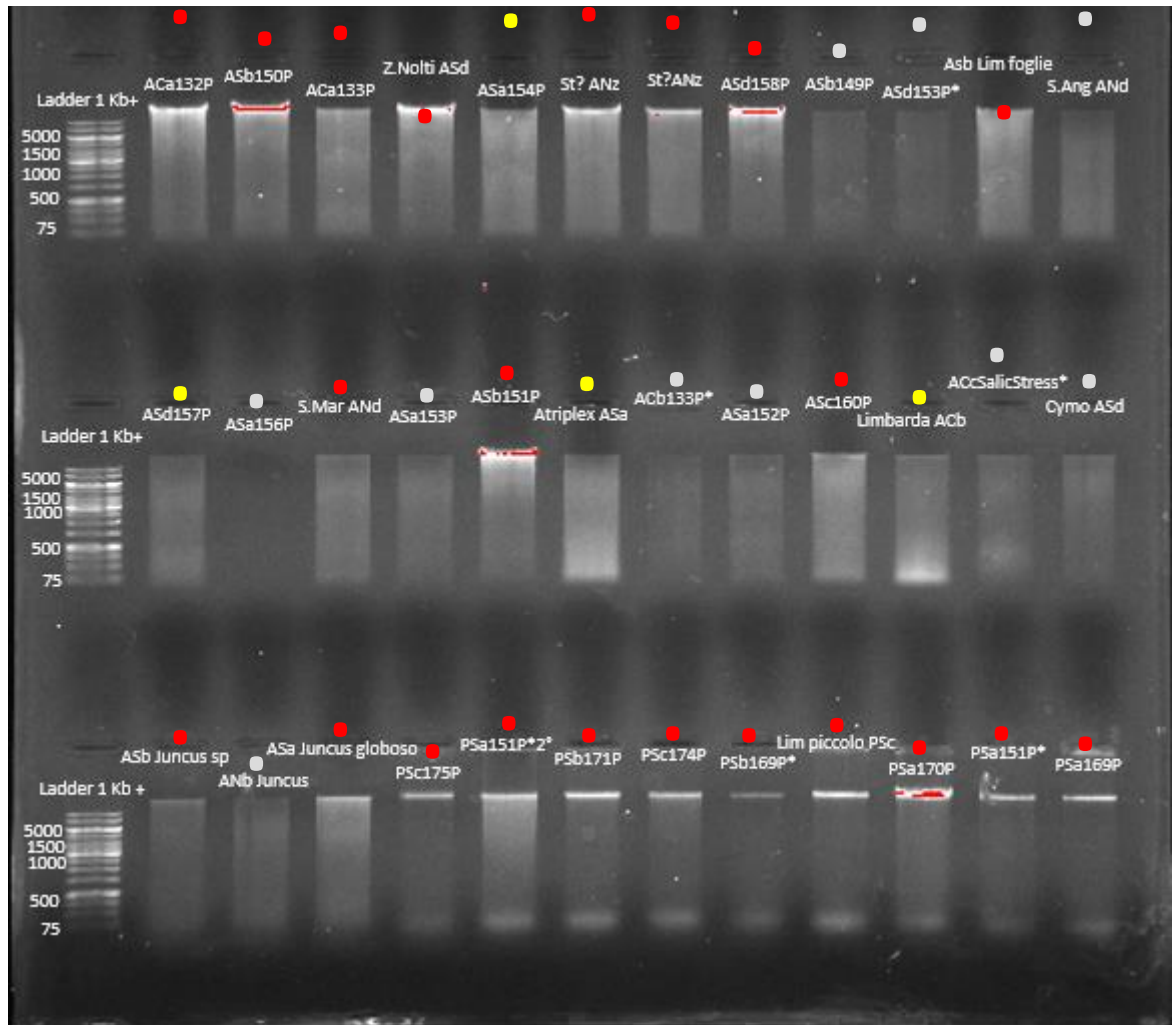


Figura 4. Corsa elettroforetica di gDNA estratto da piante. La corsa è condotta a 100 Volt in gel d'agarosio 0,7% (massa/volume). Nel primo pozzetto di ogni *lane* è stato caricato il *Gene Ruler 1 Kb Plus DNA Ladder* come marcatore di peso molecolare. Per ogni campione sono stati caricati 500 ng di DNA. In figura si osserva la migrazione solo di alcuni dei campioni di piante estratti totali. Per la maggior piante dei campioni si osserva una banda ad alto peso molecolare (●), per altri la banda mostra degradazione (●) e in qualche caso non si visualizza nulla (●).

Questa analisi permette di verificare l'integrità del DNA estratto che non è possibile ricavare dall'analisi spettrofotometrica condotta con il *NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)*, che permette di quantificare la concentrazione del DNA, senza distinguere se si tratti di sequenze integre o frammentate.

È importante valutare l'integrità del DNA per capire se le sequenze dei marcatori molecolari risultano integre e, quindi, amplificabili per PCR. Un gDNA integro si presenta come un'unica banda ad alto peso molecolare. Nei casi in cui erano visibili segni di degradazione (DNA a pesi molecolari bassi) si è deciso di procedere con la PCR solo per quei campioni in cui fossero presenti frammenti di dimensione maggiore a 700 pb in quanto i marcatori molecolari utilizzati avevano una dimensione di circa 700bp (Saunders & McDevit, 2012).

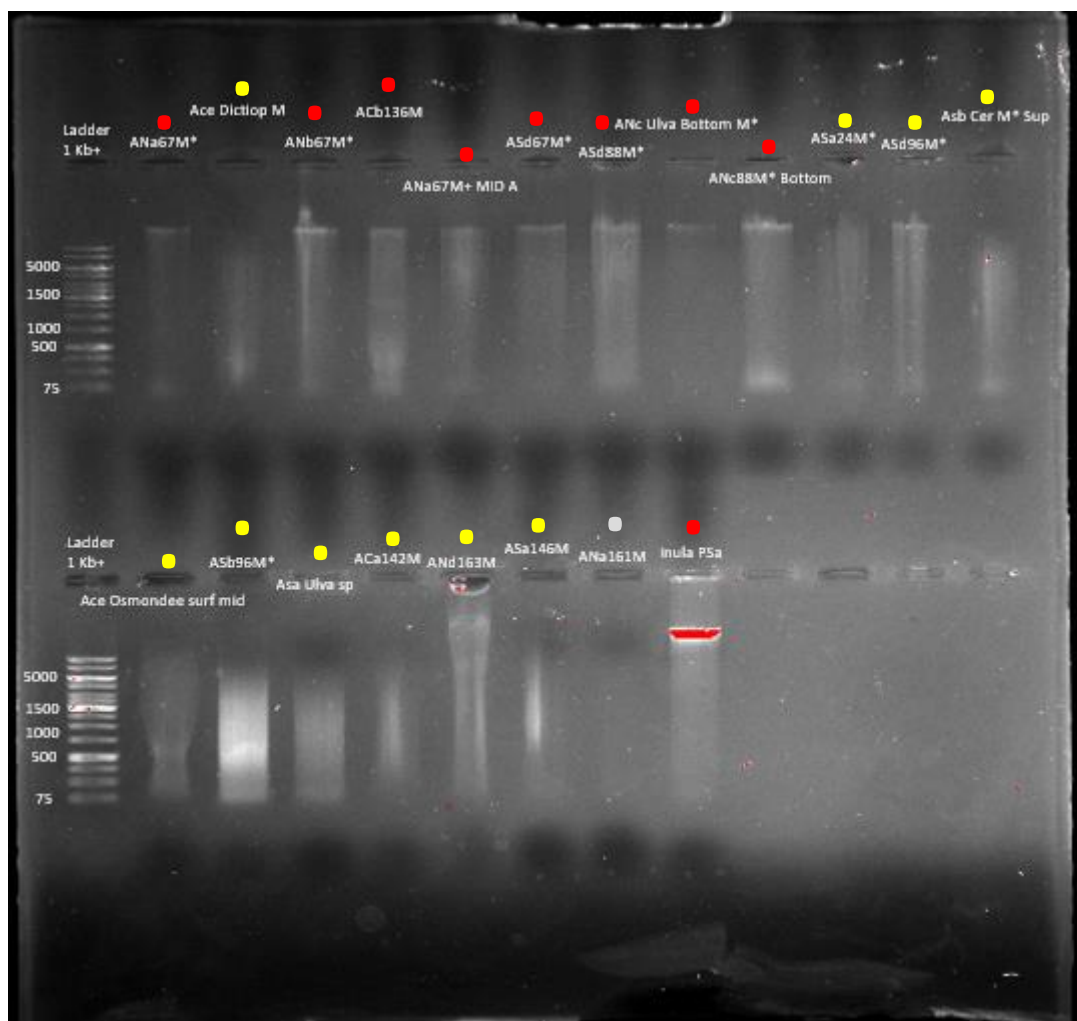


Figura 5. Corsa elettroforetica di gDNA estratto dalle macroalghe. La corsa è condotta a 100 Volt in gel d'agarosio 0,7% (massa/volume). Nel primo pozzetto di ogni *lane* è stato caricato il *Gene Ruler 1 Kb Plus DNA Ladder* come marcatore di peso molecolare. Per ogni campione sono stati caricati 500 ng di DNA. In figura si osserva la migrazione solo di alcuni dei campioni di macroalghe estratti totali. Per la maggior parte dei campioni si osserva una banda ad alto peso molecolare (●), per altri la banda mostra degradazione (●) e in un caso non si visualizza nulla (○).

Per i campioni di piante (Figura 4), in media, si osserva una buona conservazione del DNA. Campioni come ASb150P e ASd158P presentano delle bande ben visibili ad alto peso molecolare. Tuttavia, in alcuni casi non si osservano bande (es. ASb149P) e in altri la banda si trova a pesi molecolari bassi (es. Atriplex ASa),

mostrando segni evidenti di degradazione. Per i campioni in cui non viene visualizzata alcuna banda, il motivo è probabilmente dovuto al fatto che la quantità di materiale estratto era inferiore ai 500 ng che è la quantità minima per riuscire a visualizzare il gDNA in gel di agarosio. Per quanto riguarda i campioni che mostrano segni di degradazione, vi è comunque del gDNA in corrispondenza del peso molecolare atteso.

Per le macroalghe rappresentate in Figura 5 la situazione è più complicata, in quanto il gDNA risulta essere maggiormente degradato. Si osservano campioni, come ANb67M* e ASd88M*, in cui il DNA è integro (bande ad alto peso molecolare). In altri, invece, come il campione Asb96M*, è visibile un chiaro inizio di degradazione, ma è comunque presente del gDNA del peso molecolare atteso (> 700 pb) per permettere l'amplificazione dei marcatori molecolari. Come nel caso delle piante, anche per le macroalghe sono presenti dei campioni, come ad esempio ANa161M, in cui non è visibile alcuna banda probabilmente perché la quantità estratta era inferiore ai 500 ng che consideriamo essere il limite inferiore per una corretta visualizzazione su gel di agarosio.

Nonostante i livelli diversi di integrità genomica, osservati in gel elettroforesi, si è deciso di procedere con l'amplificazione dei marcatori molecolari con tutti i campioni.

3.2 Amplificazione dei marcatori molecolari (DNA barcoding)

Una volta eseguita la PCR è fondamentale verificare in gel elettroforesi (agar 1%) l'avvenuta amplificazione per decidere con quali campioni procedere, poi, con purificazione e sequenziamento (Figura 6).

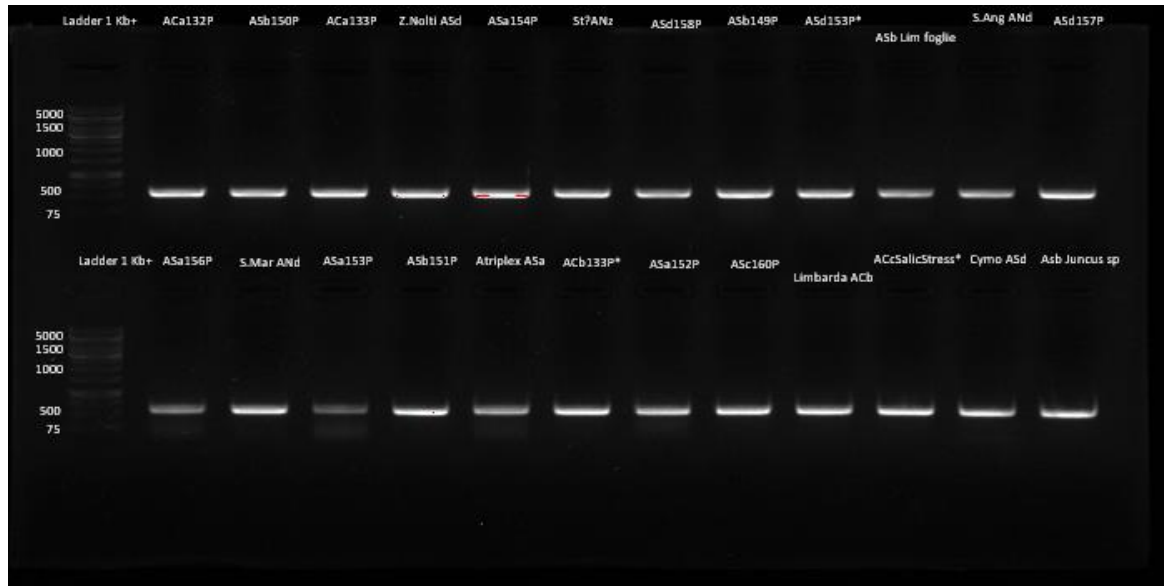


Figura 6. Corsa elettroforetica del marcatore *rbcL-3P* amplificato nelle piante. La corsa è condotta a 50 Volt in gel d'agarosio 1% (massa/volume). Nel primo pozzetto di ogni lane è stato caricato il marcatore di peso molecolare da 1Kb. Per ogni campione sono stati caricati 100 ng di DNA.

In Figura 6 è riportato il risultato dell'amplificazione del marcatore *rbcL-3P* in alcuni campioni di piante che, come si evince dal gel, mostra la banda attesa a 500 pb dimostrando l'ottima riuscita della PCR.

Per quanto concerne le macroalghe, la situazione è decisamente più complessa in quanto sono stati utilizzati diversi marcatori molecolari. Per le *Chlorophyta*, è stato utilizzato il marcatore *tufA* che è stato amplificato utilizzando un unico primer reverse (*tufAR*) e due diversi primer forward (*tufGF4* o *tufAF*), in modo da poter aver a disposizione due coppie distinte di primer nel caso una non dia risultati. Per i campioni di *Rhodophyta* e *Heterokontophyta* è stato amplificato il marcatore *COI-5P*. In particolare, per le macroalghe brune sono stati utilizzati i primer *GazF2* + *GazR2*, invece per quelle rosse è stato necessario utilizzare diverse combinazioni di primer (v. Tabella 2) per ottenere l'amplificazione di *COI-5P*.

Infine, per alcuni campioni di macroalghe brune che, dall'analisi morfologica, sembravano essere specie di *Ceramium*, si è deciso di utilizzare il marcatore *rbcL-3P*, invece di *COI-5P*. La PCR è stata condotta utilizzando le sequenze dei primer sono *rbcL F57* e *rbcL R753* (Freshwater & Rueness, 1994).

In alcuni casi, per ottenere l'amplificato di PCR si è reso necessario non solo utilizzare primer diversi, ma anche variare le condizioni di PCR, come la temperatura di *melting* o il numero di cicli di amplificazione. Ad esempio, quando erano visibili bande molto deboli si è deciso di aumentare il numero di cicli di amplificazione o di abbassare la temperatura di *melting* per favorire il legame tra i primer e le sequenze dei marker selezionati.

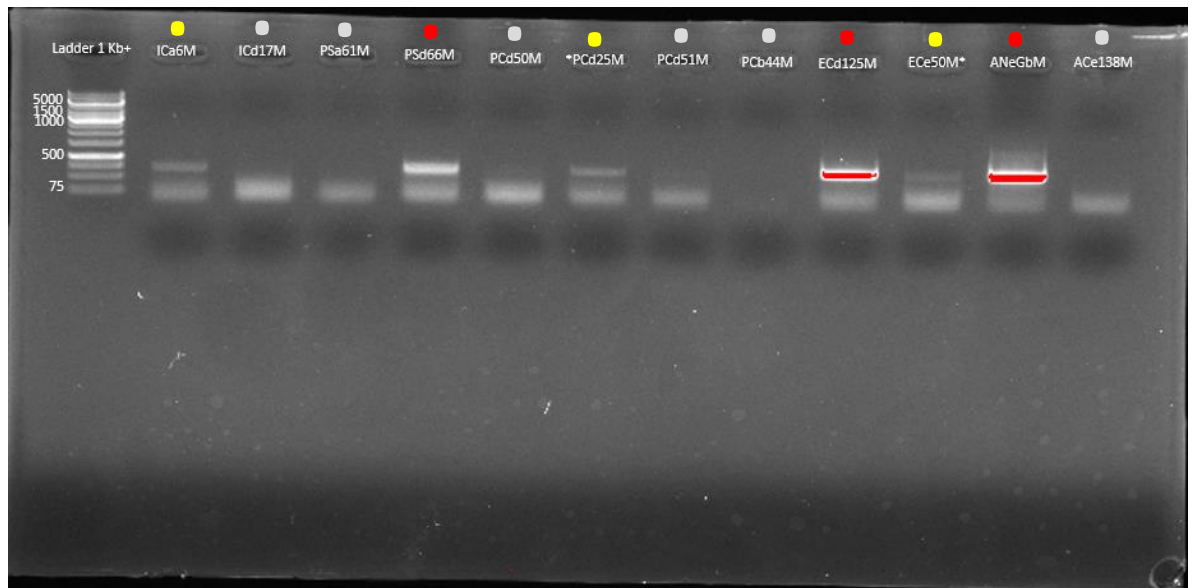


Figura 7. Corsa elettroforetica del marcatore *COI* amplificato nelle macroalghe. La corsa è condotta a 50 Volt in gel d'agarosio 1% (massa/volume). Nel primo pozzetto di ogni *lane* è stato caricato il marcatore di peso molecolare da 1Kb. Per ogni campione sono stati caricati 100 ng di DNA. Si osservano campioni con bande ben visibili (●), alcuni con bande poco intense (●) e altri in cui non si osserva l'amplificazione (●).

In Figura 7 si osservano campioni, come PSd66M e ECd125M, con una banda ben visibile, in altri si nota una banda molto sbiadita (es. ICa6M), mentre per la maggior parte di essi non è visibile alcuna banda (es. PCd50M) dimostrando una mancata amplificazione del marcatore d'interesse (*COI*). Una situazione simile è visibile anche in Figura 8. In generale, possiamo concludere che il tasso di successo nell'amplificazione dei marcatori molecolari è decisamente più basso nelle macroalghe rispetto alle piante. Ciò rispecchia anche la qualità del DNA genomico estratto dalle macroalghe.

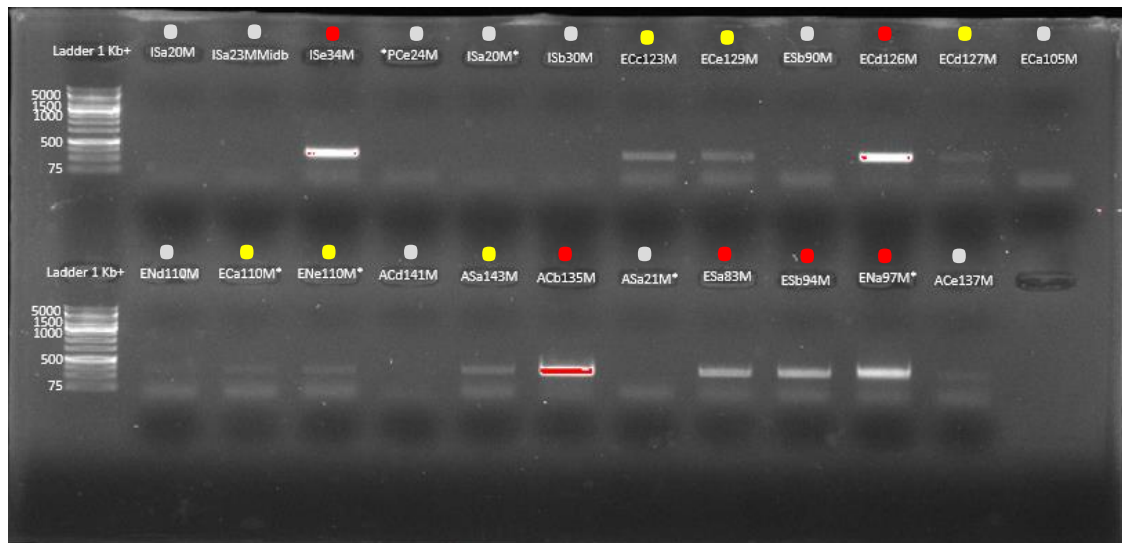


Figura 8. Corsa elettroforetica del marcatore *COI* amplificato nelle macroalghe. La corsa è condotta a 50 Volt in gel d'agarosio 1% (massa/volume). Nel primo pozzetto di ogni lane è stato caricato il marcatore di peso molecolare da 1Kb. Per ogni campione sono stati caricati 100 ng di DNA. Si osservano campioni con bande ben visibili (●), alcuni con bande poco intense (●) e altri in cui non si osserva l'amplificazione (●).

A partire da queste amplificazioni di PCR si è deciso di procedere con la purificazione e successivo sequenziamento anche dei campioni che mostravano bande più deboli.

3.3 Sequenziamento

Una volta purificato, il prodotto di PCR è stato inviato alla ditta *Eurofins* per il sequenziamento Sanger. Il numero delle sequenze di buona qualità, utilizzabili per l'identificazione delle specie, è stato leggermente inferiore al numero dei campioni inviati in quanto, alcuni cromatogrammi, hanno mostrato doppi picchi e, quindi, sono stati scartati per le analisi bioinformatiche successive.

Complessivamente, sono state ottenute sequenze per 197 dei 347 (56,77%) campioni iniziali: 110 *Tracheophyta*, 42 *Rhodophyta*, 9 *Heterokontophyta* e 36 *Chlorophyta*.

3.4 Identificazione delle specie

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti nel *database GenBank* mediante BLAST. Circa un 84% delle sequenze, però, ha mostrato un risultato ambiguo che ha richiesto un ulteriore approfondimento, mediante analisi filogenetica e tecniche di delimitazione della specie, per arrivare a determinare la specie o, in alcuni casi, solo il genere. Questi approcci combinati hanno permesso

di identificare con certezza 76 specie, in particolare: 25 *Tracheophyta*, 27 *Rhodophyta*, 11 *Heterokontophyta* e 13 *Chlorophyta*. In merito al numero di specie identificate, nel 17,1% dei casi l'identificazione ottenuta con l'analisi morfologica e con l'approccio molecolare ha dato lo stesso risultato. Se, invece, consideriamo separatamente i risultati ottenuti con le due tecniche, si può affermare che la sola analisi con chiavi dicotomiche ha portato all'identificazione del 22,4% delle specie in questione contro il 60,5% dello studio molecolare.

Per quanto riguarda la filogenesi, grazie al software *IQ-TREE* è stato possibile ottenere degli alberi che comparassero i *taxa* ricercati tramite l'utilizzo dello stesso marcatore molecolare. Abbiamo ottenuto quattro rappresentazioni, una per ogni genere vegetale (Figure 9-12). Al grafico di filogenesi è stato possibile anche abbinare i valori in output restituiti dai metodi di delimitazione delle specie (applicati sullo stesso gruppo di sequenze). Nelle figure, quindi, ad ogni specie presente negli alberi filogenetici sono associati i valori di supporto ottenuti dalle analisi condotte con *ASAP* e *GMYC*. Ognuna di queste metodologie, sulla base dei propri algoritmi (sezione 2.5), raggruppa le sequenze che ipotizza appartenere alla stessa specie, assegnando ad ogni gruppo un numero univoco. Pertanto, le sequenze che condividono lo stesso numero appartengono allo stesso *cluster*, secondo quell'analisi. Tale numerazione è distinta tra le due metodologie.

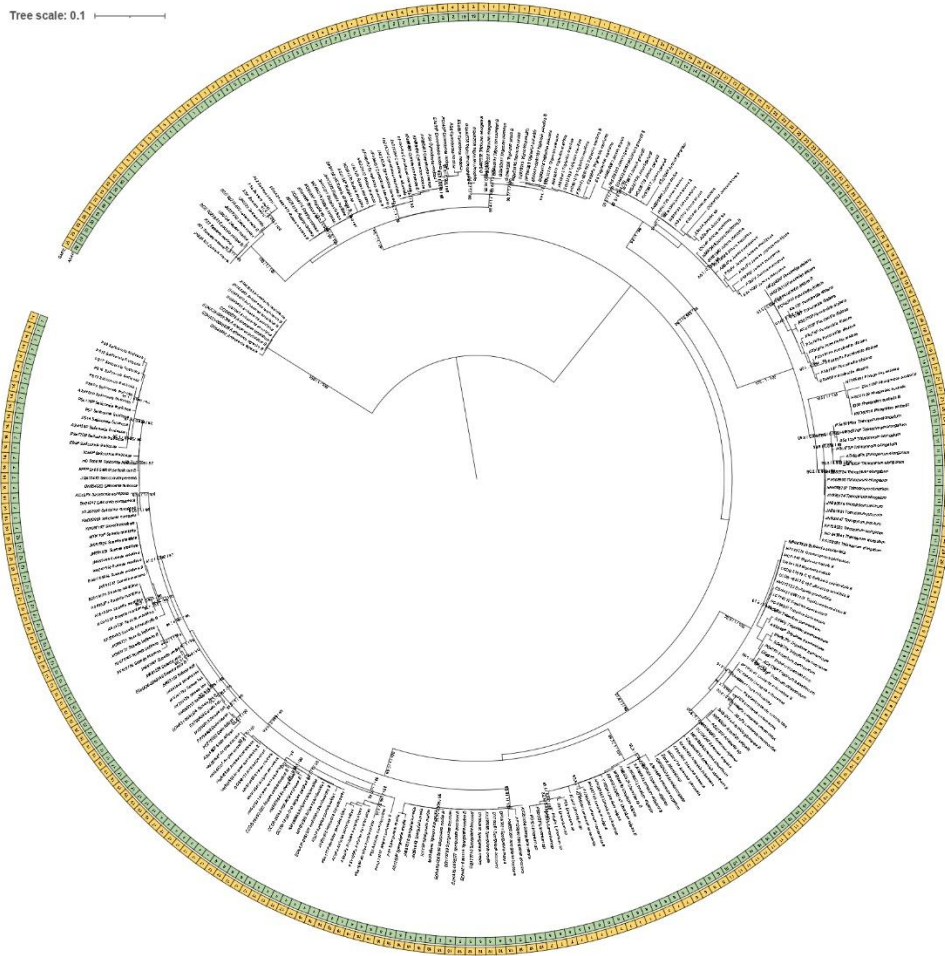


Figura 9. Ricostruzione filogenetica delle *Tracheophyta* della Laguna di Venezia. La filogenesi è basata sul gene *rbcL-3P* ed è stata inferita mediante il metodo di *Maximum Likelihood (ML)* utilizzando *IQTREE*. I valori di supporto dei nodi, indici dell'affidabilità delle relative ramificazioni, sono mostrati quando il supporto *SH-aLRT* (%) $\geq 85\%$ e sono riportati da sinistra a destra nel seguente ordine: *SH-aLRT* / supporto *Bayesiano* / supporto *Bootstrap* (%). I risultati dei metodi di delimitazione delle specie sono riassunti dai cerchi esterni verde (*ASAP*) e giallo (*GMYC*); le sequenze che condividono lo stesso numero formano un *cluster*, ovvero un gruppo di sequenze che appartengono alla stessa specie sulla base della metodologia applicata. Le specie raccolte durante il monitoraggio della biodiversità fotosintetica sono evidenziate in grassetto. Le sequenze ottenute da *GenBank* sono indicate con il numero di identificazione seguito dal nome della specie; allo stesso modo quelle ottenute dal database *Bold* che in aggiunta sono contrassegnate anche con la lettera "B".

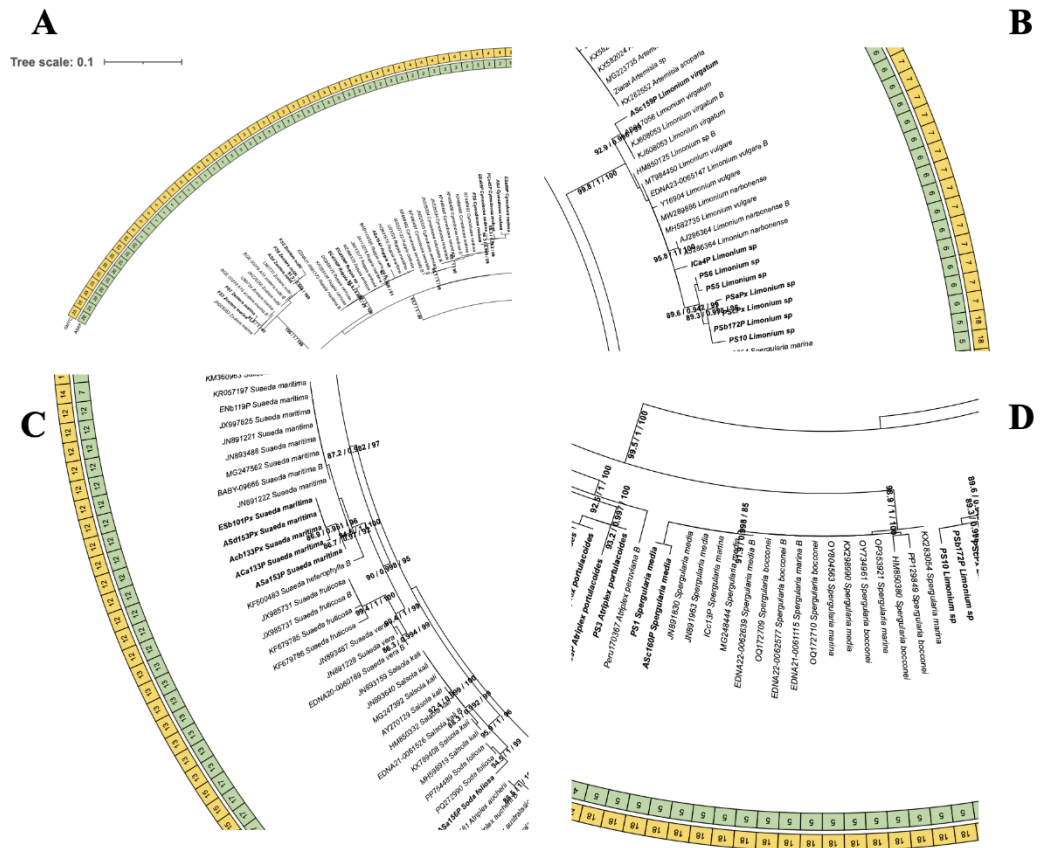


Figura 10. Dettagli della ricostruzione filogenetica delle *Tracheophyta*. Sono riportati i cluster dei generi: (A) *Zostera*, *Ruppia* e *Cymodocea*; (B) *Limonium*; (C) *Suaeda*; (D) *Spergularia*.

La Figura 9 è rappresentativa delle *Tracheophyta* e analizzando le fanerogame marine, ossia le piante appartenenti ai generi *Cymodocea*, *Zostera* e *Ruppia*, è possibile distinguere *Z. marina* e *Z. noltii* (Figura 10A), nonostante la delimitazione delle specie le inserisca nello stesso *cluster*. Anche la ricostruzione filogenetica non restituisce valori di supporto che separano completamente le due specie, anche se comunque si tratta di valori molto vicini alla soglia impostata. Inoltre si nota la formazione di due *cluster* distinti. In questo caso l'identificazione è avvenuta mediante analisi morfologica, in quanto queste due specie di *Zostera* possiedono caratteri fenotipici ben distinguibili.

Per quanto riguarda, invece, il genere *Ruppia*, si osserva la separazione di *R. cirrhosa* e *R. maritima* (Figura 10A), nonostante, dall'analisi del database di riferimento delle alghe “*AlgaeBase*” (Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2026), la specie *cirrhosa* è ora riconosciuta come *maritima*, mentre nel database di riferimento per le piante “*Plants Of the World*” (POWO, 2026) sono ancora separate.

È stato possibile identificare anche la pianta marina appartenente al genere *Cymodocea* (Figura 10A), della quale sono stati individuati vari campioni (ESa85P, ASd, PCc45P, ESa99P, FS5) della specie *nodosa*, che è l'unica riportata in Laguna

di Venezia. Clusterizzano con successo anche i due campioni (ESd98Px, ES) di *Triglochin maritima* e buoni risultati si sono ottenuti per il genere *Juncus*, in cui è stato possibile identificare con successo le specie *gerardii*, *acutus* e *maritimus*.

Sicuramente, interessante è il caso di *Limonium* (Figura 10B) in quanto una delle sequenze, allineate su *GenBank*, mostra omologia con la specie *virgatum* e tale identificazione è sostenuta sia dall'analisi filogenetica che dall'analisi *GMYC*, ma non è confermata dall'analisi *ASAP*. Per tutti gli altri campioni di *Limonium* non è stato possibile definire la specie in quanto le analisi fatte li correla a specie di *Limonium* differenti, senza attribuire una identificazione univoca. Per questo motivo ci siamo limitati a definirle come *Limonium sp.*

Altro caso da sottolineare riguarda il genere *Suaeda* (Figura 10C) in cui l'analisi delle sequenze dei campioni raccolti portano ad identificare la specie *maritima*. Tale dato non è confermato dalla delimitazione della specie, ma unicamente dall'analisi filogenetica, la quale raggruppa tutte le nostre sequenze in un unico *cluster* e lo pone adiacente ad un altro gruppo della stessa specie. Tale risultato ci permette di essere abbastanza confidenti sull'identificazione di *Suaeda maritima*.

Risulta, invece, essere chiara l'identificazione di *Spergularia media* (Figura 10D) nonostante l'allineamento con le sequenze depositate in *GenBank* portasse a dire che si trattasse della specie *marina*, ma la filogenesi, sebbene non supportata dalla delimitazione della specie, conferma la specie *media*. In questo caso si è preferito appoggiarsi ai risultati di filogenesi rispetto all'identificazione stimata con BLAST in quanto la prima si basa su un multiallineamento, mentre il confronto con *GenBank* è limitato al confronto tra due sequenze.

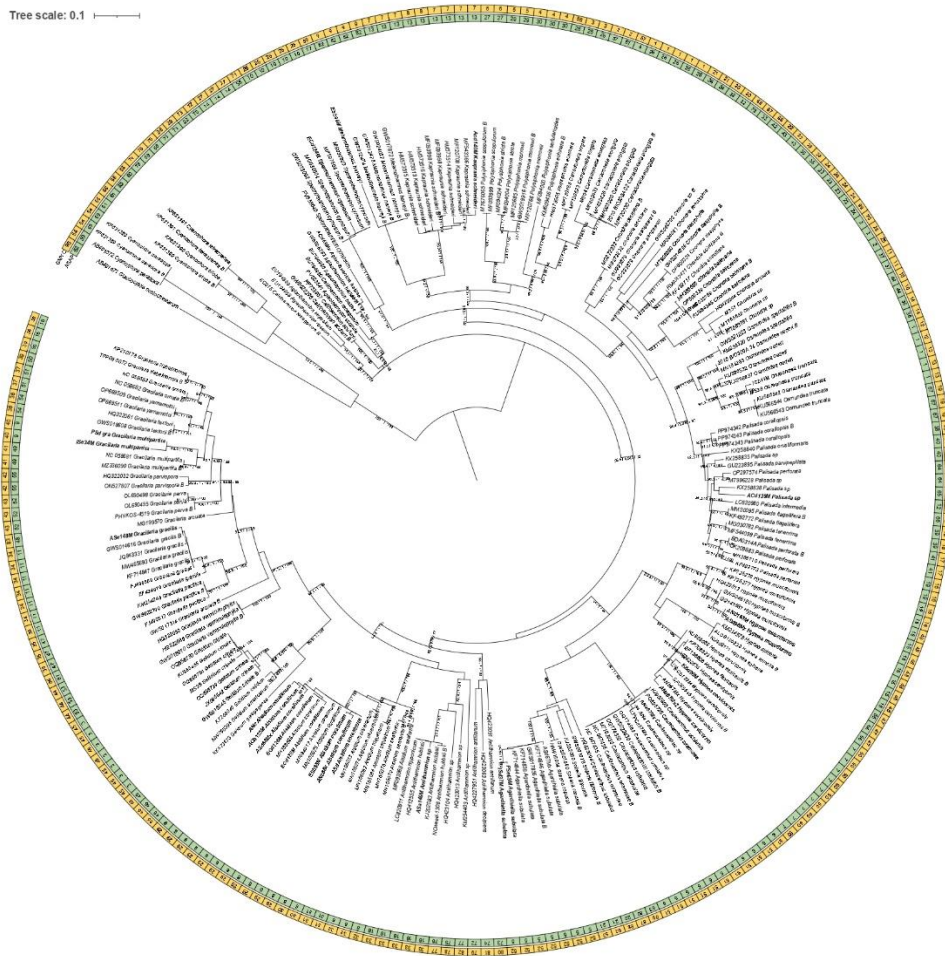


Figura 11. Ricostruzione filogenetica delle *Rhodophyta* della Laguna di Venezia. La filogenesi è basata sul gene *COI-5P* ed è stata inferita mediante il metodo di *Maximum Likelihood (ML)* utilizzando *IQTREE*. I valori di supporto dei nodi, indici dell'affidabilità delle relative ramificazioni, sono mostrati quando il supporto *SH-aLRT* (%) $\geq 85\%$ e sono riportati da sinistra a destra nel seguente ordine: *SH-aLRT* / supporto *Bayesiano* / supporto *Bootstrap* (%). I risultati dei metodi di delimitazione delle specie sono riassunti dai cerchi esterni verde (*ASAP*) e giallo (*GMYC*). Le sequenze che condividono lo stesso numero formano un *cluster*, ovvero un gruppo di sequenze che appartengono alla stessa specie sulla base della metodologia applicata. Le specie raccolte durante il monitoraggio della biodiversità fotosintetica sono evidenziate in grassetto. Le sequenze ottenute da *GenBank* sono indicate con il numero di identificazione seguito dal nome della specie; allo stesso modo quelle ottenute dal database *Bold* che in aggiunta sono contrassegnate anche con la lettera "B".

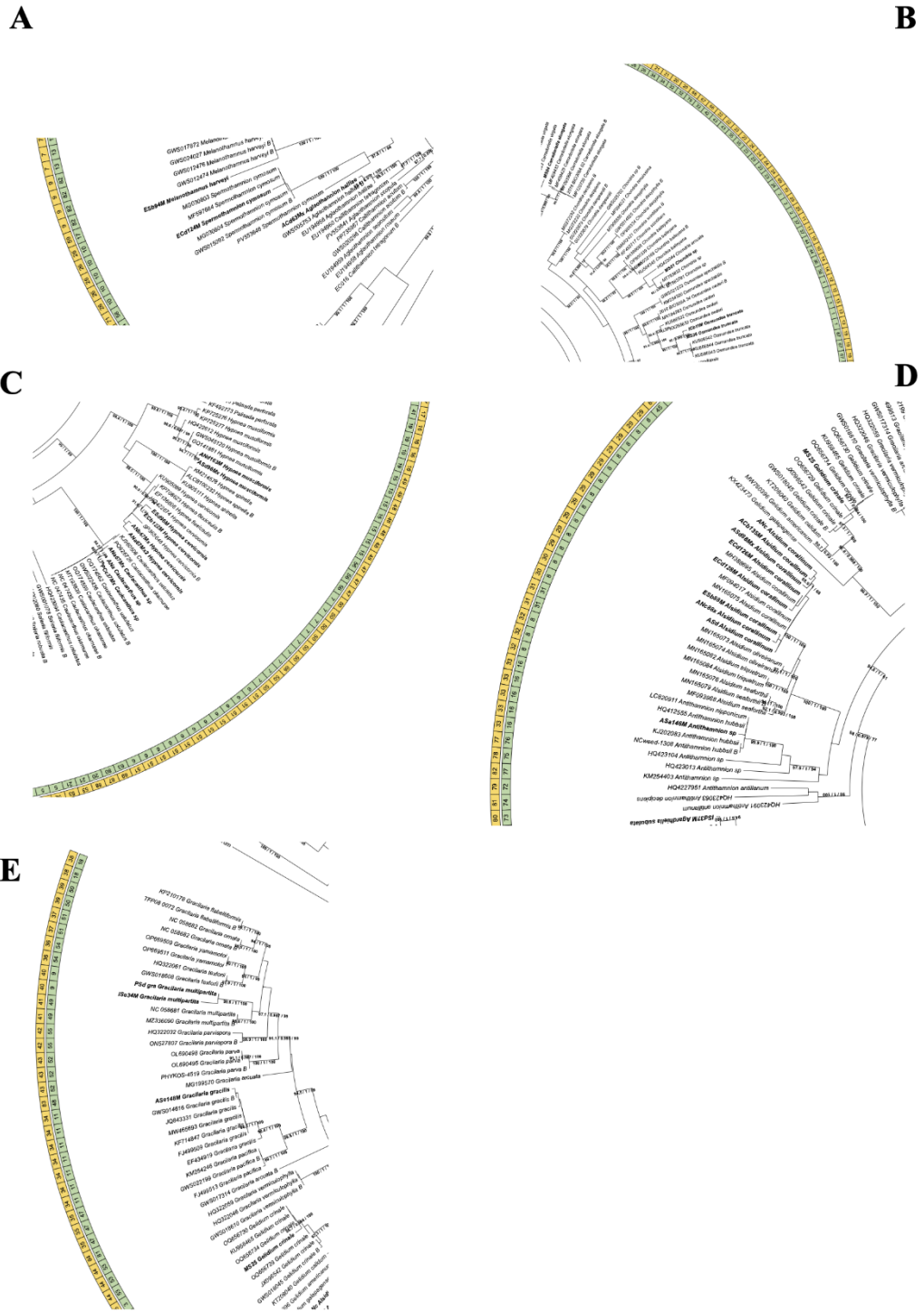


Figura 12. Dettagli della ricostruzione filogenetica delle *Rhodophyta*. Sono riportati i cluster dei generi: (A) *Spermothermion*; (B) *Chondria* e *Osmundea*; (C) *Hypnea* e *Caulacanthus*; (D) *Antithamnion* e *Alsidium*; (E) *Gracilaria*.

La Figura 11 è rappresentativa delle analisi condotte sulle specie appartenenti al phylum *Rhodophyta*. Un campione raccolto in laguna è stato classificato come *Spermothermion cymosum* (Figura 12A), specie riportata come invasiva. Sul

database *GenBank* non sono presenti altre sequenze del genere *Spermothamnion*. La presenza di sequenze di altre specie di questo genere avrebbe probabilmente aiutato nella classificazione. Tuttavia, il fatto che la nostra sequenza sia inserita nel *cluster* insieme alle altre sequenze di *S. cymosum* ci permette di classificare anche il nostro campione come appartenente a questa specie.

Per il genere *Chondria* (Figura 12B), le sequenze ottenute da diversi campioni sono state allineate con quelle depositate in *GenBank* mediante BLAST, ma non è stato possibile ottenere una classificazione fino alla specie. Anche allineando più sequenze, nonostante si aumentino le possibilità di confronto, se la distanza tra specie diverse è la medesima non è possibile determinare con certezza di quale organismo si tratti. Anche la delimitazione della specie non è stata dirimente, di conseguenza si è deciso di limitarsi alla definizione del genere.

Un altro caso in cui l'analisi integrata di ricostruzione filogenetica e delimitazione delle specie non ha permesso di arrivare all'identificazione a livello di specie è quello di *Caulacanthus* (Figura 12C), dove sequenze delle specie *ustulatus* (non invasiva) e *okamurae* (invasiva) formano un *cluster* unico. Non potendo, quindi, identificare la specie in maniera precisa, la denominazione dei tre campioni raccolti è stata limitata al genere (*Caulacanthus sp.*).

Un ultimo esempio è quello di *Antithamnion*. In Figura 12D si osserva che il campione è stato collocato in un *cluster* che presenta sia la specie *hubbsii* che *nipponicum* (entrambe invasive). Anche in questo caso l'identificazione si è limitata al genere (*Antithamnion sp.*) in quanto non vi erano informazioni sufficienti per determinare la specie.

Più incoraggianti, sono invece, i risultati ottenuti con i due campioni di *Osmundea* (Figura 12B). L'analisi iniziale con BLAST aveva restituito la specie *truncata* in un caso (MS36) e *oederi* nell'altro (ICb11M). Tuttavia, i valori di *ASAP* e l'indagine filogenetica, come si evince dalla Figura 12B, hanno permesso di capire che in entrambi i casi si tratta di *Osmundea truncata*.

Anche per il genere *Hypnea* (Figura 12C) l'identificazione ha avuto esito positivo. Sono stati riconosciuti vari campioni sia della specie *musciformis* che di *cervicornis*. I valori di delimitazione della specie riguardanti *H. musciformis* e il *cluster* generato dalla filogenesi separano le nostre sequenze dalle altre specie dello stesso genere. Per quanto riguarda la specie *cervicornis*, nel gruppo vediamo esserci anche delle sequenze della specie *flexicaulis*. Secondo "*AlgaeBase*" (Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2026), *H. flexicaulis* è riconosciuta ora come *H. cervicornis*, di conseguenza possiamo concludere che tutte le sequenze appartengono alla specie *cervicornis*.

Per il genere *Alsidium* si è riusciti a determinare la specie *corallinum* nonostante l'allineamento su *GenBank*, della sequenza ottenuta dal *DNA barcoding*, avesse

restituito *score* di identità simili tra specie diverse. Dal momento che nella Laguna di Venezia è riportata solamente la presenza di *A. corallinum*, che i metodi di delimitazione della specie non sono stati in grado di discriminare la specie *corallinum* da altre, ma l'analisi filogenetica, riportata in Figura 12D, mostra un *cluster* che comprende i nostri campioni e altre sequenze di *A. corallinum*. Siamo riusciti a concludere che i campioni da noi analizzati appartengono a questa specie.

Infine, anche per il genere *Gracilaria*, l'utilizzo sinergico di vari metodi di analisi ha permesso di ottenere risultati promettenti. Inizialmente, l'allineamento con BLAST del campione ISe34M (Figura 12E) aveva identificato la specie *yamamotoi*, la quale, però, non era mai stata descritta nella Laguna di Venezia. Tuttavia, l'analisi filogenetica ha collocato la nostra sequenza vicino ad un campione identificato come *G. multipartita*, permettendo così l'identificazione della specie. Purtroppo, le analisi di determinazione della specie, *ASAP* e *GMYC*, non sono state in grado di confermare la classificazione ottenuta mediante analisi filogenetica. l'inferenza.

In Figura 13 si osserva la classificazione riguardante le *Heterokontophyta*.

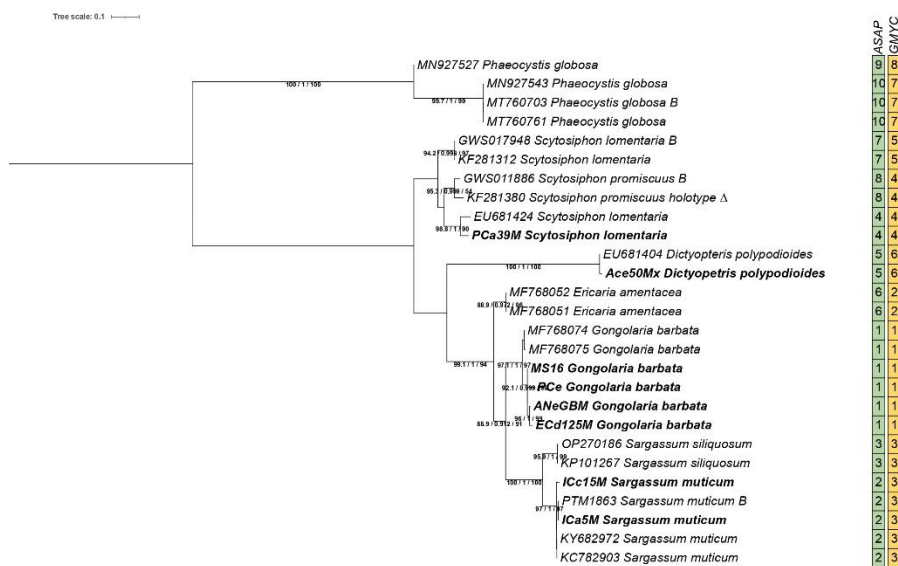


Figura 13. Ricostruzione filogenetica delle *Heterokontophyta* della Laguna di Venezia. La filogenesi è basata sul gene *COI-5P* ed è stata inferita mediante il metodo della Maximum Likelihood (ML) utilizzando *IQTREE*. I valori di supporto dei nodi, indici dell'affidabilità delle relative ramificazioni, sono mostrati quando il supporto *SH-aLRT* (%) $\geq 85\%$ e sono riportati da sinistra a destra nel seguente ordine: *SH-aLRT* / supporto *Bayesiano* / supporto *Bootstrap* (%). I risultati dei metodi di delimitazione delle specie sono riassunti nelle caselle verdi (*ASAP*) e gialle (*GMYC*) sul lato destro; le sequenze che condividono lo stesso numero formano un cluster, ovvero un gruppo di

sequenze che appartengono alla stessa specie sulla base della metodologia applicata. Le specie raccolte durante il monitoraggio della biodiversità fotosintetica sono evidenziate in grassetto. Le sequenze ottenute da *GenBank* sono indicate con il numero di accessione seguito dal nome della specie; allo stesso modo quelle ottenute dal database *Bold* che sono contrassegnate anche con la lettera "B". Il simbolo Δ indica un esemplare tipo.

In Figura 13 è rappresentato il caso di *Scytosiphon* che risulta peculiare rispetto a quelli visti in precedenza, poiché le sequenze della specie *lomentaria* si separano in due rami differenti intermezzati dalla specie *S. promiscuus*. Ciò solleva il dubbio che le sequenze relative a questa specie non siano state depositate correttamente. È sicura, invece, la collocazione delle sequenze di *S. promiscuus*, in quanto si dispone della sequenza tipo. Per tipo si intende un campione di erbario rappresentante di quella specie; nel nostro contesto, le sequenze tipo sono derivate da amplificazioni dei marcatori genetici considerati (in questo caso *COI-5P*).

Per quanto riguarda il genere *Sargassum*, l'allineamento delle sequenze con *GenBank* ha restituito, con gli stessi *score* di identità, le specie *muticum* (invasiva) e *siliquosum*, la cui presenza non era mai stata riportata nella Laguna di Venezia. Allo stesso modo il metodo *GMYC* non è in grado di distinguere le due specie (Figura 13). Invece, l'analisi filogenetica e i valori *ASAP* di delimitazione della specie permettono la separazione tra le due specie, confermando che si tratta di *S. muticum*.

In Figura 14 si osserva la separazione delle specie appartenenti al *phylum Chlorophyta*.

Tree scale: 0.1

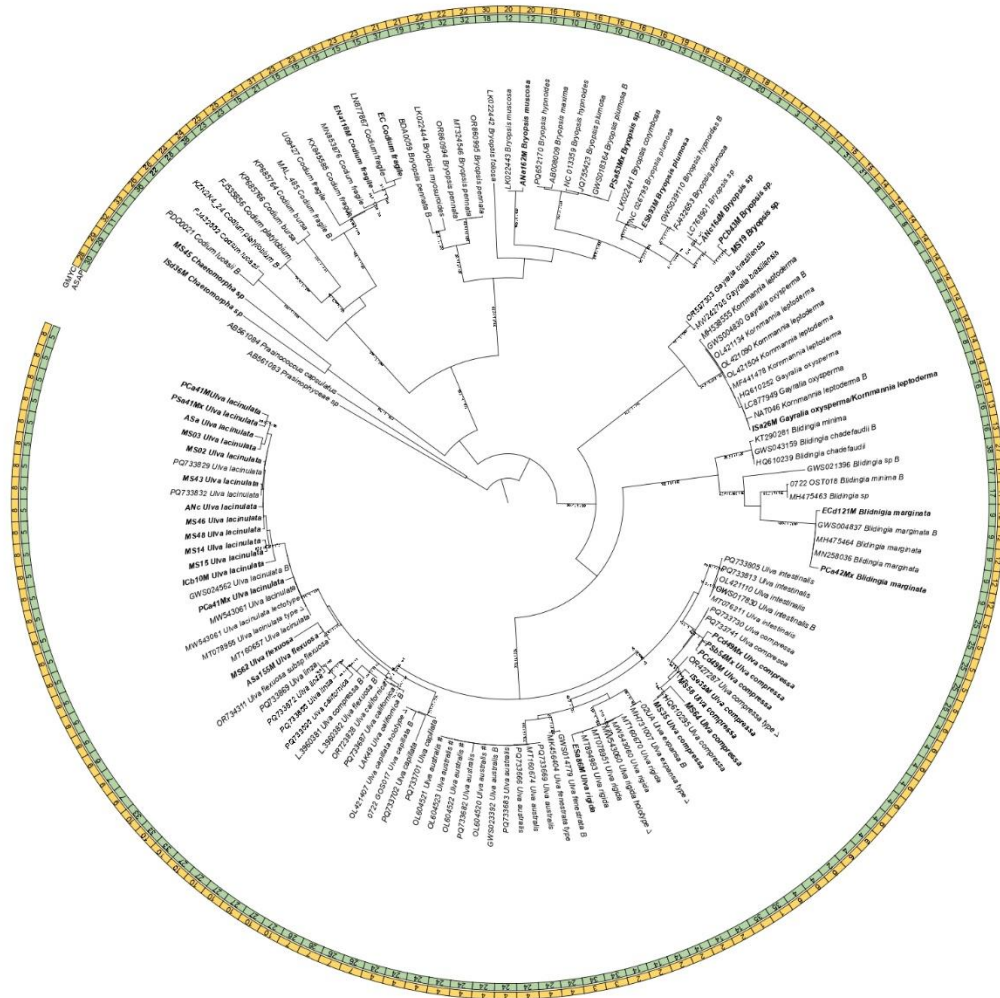


Figura 14. Ricostruzione filogenetica delle *Chlorophyta* della Laguna di Venezia. La filogenesi è basata sul gene *tufA* ed è stata inferita mediante il metodo della *Maximum Likelihood (ML)* utilizzando *IQTREE*. I valori di supporto dei nodi, indici dell'affidabilità delle relative ramificazioni, sono mostrati quando il supporto *SH-aLRT* (%) $\geq 85\%$ e sono riportati da sinistra a destra nel seguente ordine: *SH-aLRT* / supporto *Bayesiano* / supporto *Bootstrap* (%). I risultati dei metodi di delimitazione delle specie sono riassunti dai cerchi esterni verde (*ASAP*) e giallo (*GMYC*); le sequenze che condividono lo stesso numero formano un cluster, ovvero un gruppo di sequenze che appartengono alla stessa specie sulla base della metodologia applicata. Le specie raccolte durante il monitoraggio della biodiversità fotosintetica sono evidenziate in grassetto. Le sequenze ottenute da *GenBank* sono indicate con il numero di accessione seguito dal nome della specie; allo stesso modo quelle ottenute dal database *Bold* che sono contrassegnate anche con la lettera "B". Il simbolo Δ indica un esemplare tipo, mentre il simbolo # indica un'identificazione collegata a una sequenza tipo.

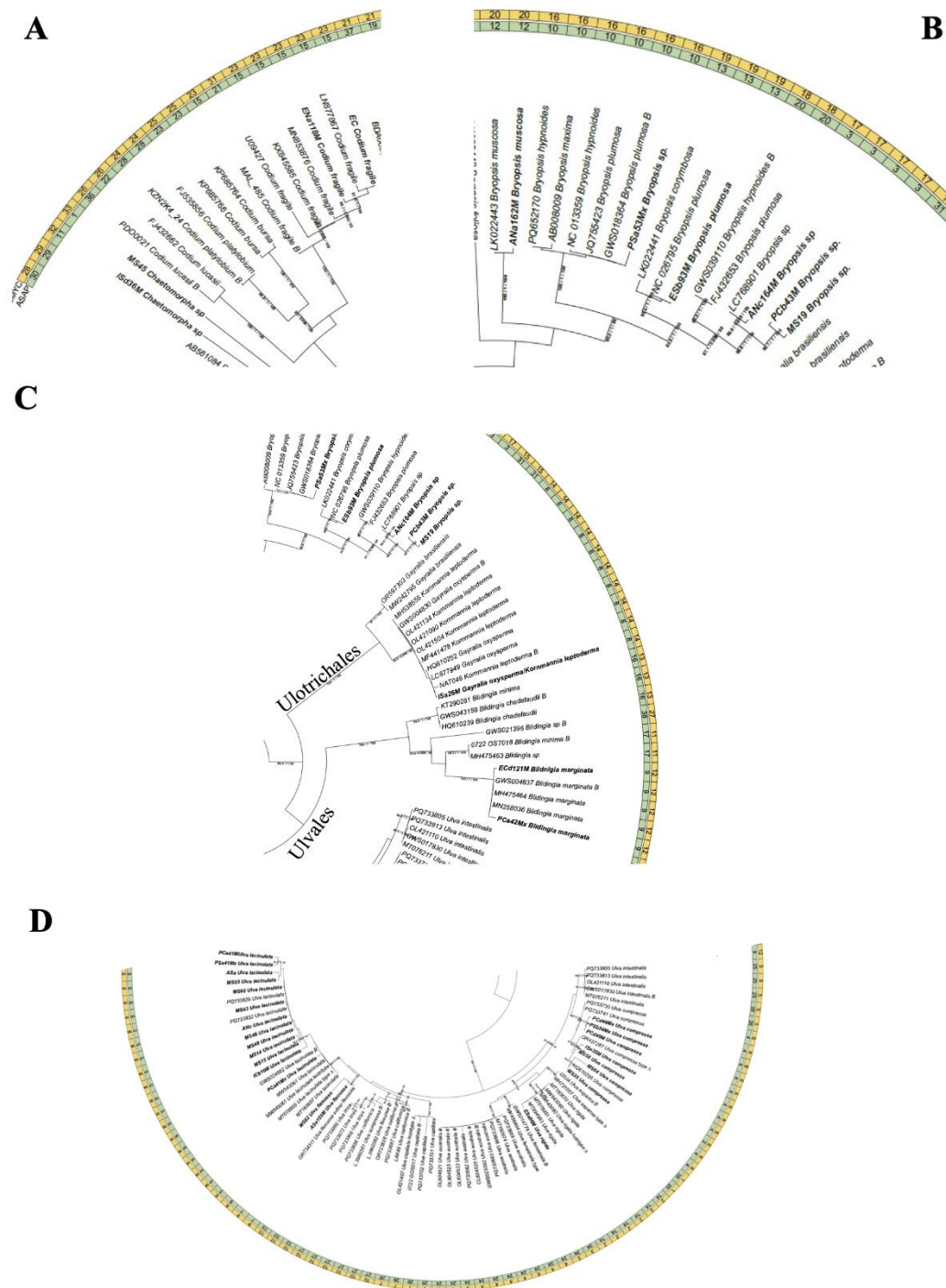


Figura 15. Dettagli della ricostruzione filogenetica delle *Chlorophyta*. Sono riportati i cluster dei generi: (A) *Chaetomorpha* e *Codium*; (B) *Bryopsis*; (C) *Gayralia* e *Blidingia*; (D) *Ulva*.

Per quanto riguarda il genere *Chaetomorpha* (Figura 15A), nell'albero filogenetico sono riportate unicamente le due sequenze derivate dal *DNA barcoding*, a causa

della mancata presenza nelle banche dati di sequenze del gene *tufA* relative a questo organismo. Pertanto, non è stato possibile identificare la specie con certezza con l'approccio molecolare e ci siamo quindi basati sull'osservazione dei caratteri morfologici.

Passando al genere *Codium* (Figura 15A), sono presenti nei database pubblici sia sequenze di *C. fragile* (invasiva) che di *C. bursa* (autoctona). L'analisi filogenetica ha collocato le sequenze dei nostri campioni all'interno del *cluster* di *C. fragile* e tale identificazione è supportata anche dagli *score* di delimitazione delle specie. Non è, invece, stata identificata nella Laguna di Venezia, durante il nostro monitoraggio, la specie *bursa*.

Per il genere *Bryopsis* (Figura 15B) la classificazione è risultata più complessa. I risultati ottenuti dall'allineamento delle nostre sequenze con *GenBank* risultano di difficile interpretazione. Da analisi filogenetica e delimitazione della specie si osserva che la sequenza del campione ESb93M viene inserita in un *cluster* assieme ad una sequenza di *B. plumosa*. Questo campione (NC 026795) deriva da una collezione di colture algali ed è identificato come *B. plumosa* (Leiliaert & Lopez-Bautista, 2015), pertanto anche la sequenza ottenuta dalla Laguna di Venezia può essere classificata come *B. plumosa*. Invece, la sequenza del campione ANa162M si inserisce in un *cluster* con una sequenza di *B. muscosa*. Per le sequenze, ottenute da altri campioni, non è stato possibile determinare la specie a causa dell'ambiguità dei dati disponibili.

In Figura 15C è rappresentato il caso di *Gayralia oxysperma* e *Kornmannia leptoderma*. Come riportato nel *database* di riferimento "*AlgaeBase*" (Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2026), *G. oxysperma* appartiene all'ordine di *Ulotrichales* mentre *K. leptoderma* si trova all'interno dell'ordine *Ulvales*, il quale, è collocato in un altro punto dell'albero. Pertanto, il fatto che le sequenze di queste due specie siano collocate nello stesso ramo delle *Ulotrichales* pone diversi quesiti. Dall'allineamento su *GenBank* la nostra sequenza restituisce *score* di identità molto simili sia con sequenze identificate come *G. oxysperma* che *K. leptoderma*. Tramite l'analisi combinata di ricostruzione filogenetica e delimitazione della specie (Figura 15C) osserviamo che, le sequenze di *GenBank* riferite a *K. leptoderma*, ricadono insieme a sequenze dell'ordine *Ulotrichales*, rappresentate da *G. brasiliensis* e *G. oxysperma*. L'ordine delle *Ulvales*, in cui ci aspetteremmo di osservare le sequenze di *K. leptoderma*, è invece separato e rappresentato dalle sequenze dei generi *Blidingia* e *Ulva*. Considerando ciò, è probabile che le sequenze relative a *K. leptoderma* siano state erroneamente classificate nelle banche dati utilizzate; la nostra sequenza è quindi più probabile che appartenga alla specie *G. oxysperma*.

È chiara, invece, la classificazione dei campioni appartenenti al genere *Blidingia* (Figura 15C). L'analisi filogenetica e i parametri di delimitazione della specie confermano che i nostri campioni (ECd121M e PCa42Mx) siano attribuibili alla

specie *marginata*, nonostante l'allineamento con le sequenze riportate in *GenBank* avesse restituito una omologia con la specie *Blidingia minima*.

I campioni inseriti nel ramo dell'ordine *Ulvales* (Figura 15D) sono di difficile interpretazione, come già evidenziato nello studio morfologico in cui erano emerse delle difficoltà classificative dovute alla rilevante plasticità fenotipica di questi organismi. Durante il ciclo vitale varie specie intraprendono un cambio di forma da laminare a tubulare, quindi l'identificazione morfologica risulta complessa.

Molti dei campioni raccolti presentano delle sequenze che si allineano a *Ulva compressa*. L'analisi filogenetica crea ulteriori *cluster* all'interno della specie, ma *ASAP* e *GMYC* ci permettono di confermare che si tratti di un unico *cluster* supportato dalla presenza della sequenza tipo, ossia la sequenza dell'organismo rappresentante la specie. Inoltre, è stato identificato anche un campione (ESa86M) di *U. rigida*.

Per quanto riguarda la specie non indigena *Ulva australis*, non sono state trovate sequenze che rimandassero a questa macroalga. C'è una buona separazione per la specie *flexuosa*, sostenuta sia dall'analisi filogenetica che da quella relativa alla delimitazione della specie condotta con *GMYC*.

Sono stati caratterizzati molti individui di *Ulva lacinulata* e l'identificazione è sostenuta dalla presenza della sequenza tipo di questa specie.

In Tabella 5 sono riassunte tutte le specie identificate nella Laguna di Venezia durante il monitoraggio biennale e per ognuna di esse è riportata la tecnica utilizzata per la sua classificazione.

Tabella 5. Classificazione delle specie nella Laguna di Venezia. Per ogni specie è indicato il metodo di classificazione utilizzato.

Specie	Morfologia	Analisi molecolare	Phylum
<i>Agardhiella subulata</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Aglaothamnion halliae</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Aglaothamnion sp.</i>	x		<i>Rhodophyta</i>
<i>Alsidium corallinum</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Antithamnion sp.</i>	x	x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Artemisia sp.</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Atriplex portulacoides</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Blidingia marginata</i>		x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Bryopsis muscosa</i>		x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Bryopsis plumosa</i>		x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Bryopsis sp.</i>	x	x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Carradoriella elongata</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Caulacanthus okamuræ</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Caulacanthus sp.</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Chaetomorpha sp.</i>	x	x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Chondria sp.</i>	x	x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Cladophora sp.</i>	x		<i>Chlorophyta</i>
<i>Codium fragile</i>		x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Cymodocea nodosa</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Cystoseira sp.</i>	x		<i>Heterokontophyta</i>
<i>Dasya sp.</i>	x		<i>Rhodophyta</i>
<i>Dictyopteris polypodioides</i>	x	x	<i>Heterokontophyta</i>
<i>Dictyota dichotoma</i>	x		<i>Heterokontophyta</i>
<i>Dictyota fascicola</i>	x		<i>Heterokontophyta</i>
<i>Dictyota sp.</i>	x		<i>Heterokontophyta</i>

<i>Ectocarpus siliculosus</i>	x		<i>Heterokontophyta</i>
<i>Fucus virsoides</i>	x		<i>Heterokontophyta</i>
<i>Gayralia oxysperma</i>		x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Gelidium crinale</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Gongolaria barbata</i>	x	x	<i>Heterokontophyta</i>
<i>Gracilaria gracilis</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Gracilaria multipartita</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Heterosiphonia sp.</i>	x		<i>Rhodophyta</i>
<i>Hypnea flexicaulis</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Hypnea musciformis</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Juncus acutus</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Juncus gerardii</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Juncus maritimus</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Kauprania schneideri</i>	x	x	<i>not found</i>
<i>Limbarda crithmoides</i>	x	x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Limonium sp.</i>	x		<i>Tracheophyta</i>
<i>Limonium virgatum</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Melanothamnus harveiy</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Nitophyllum punctatum</i>	x		<i>Rhodophyta</i>
<i>Osmundea truncata</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Palisada sp.</i>	x	x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Phragmites australis</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Phyllophora sicula</i>	x		<i>Rhodophyta</i>
<i>Carradoriella elongata</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Polysiphonia sp.</i>	x		<i>Rhodophyta</i>
<i>Puccinellia distans</i>	x	x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Pyropia yezoensis</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Radicilingua sp.</i>	x		<i>Rhodophyta</i>

<i>Ruppia sp.</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Salicornia europaea</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Salicornia fruticosa</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Salicornia sp.</i>	x		<i>Tracheophyta</i>
<i>Soda foliosa</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Sargassum muticum</i>		x	<i>Heterokontophyta</i>
<i>Scytosiphon lomentaria</i>		x	<i>Heterokontophyta</i>
<i>Spergularia media</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Spermothamnion cymosum</i>		x	<i>Rhodophyta</i>
<i>Sporobolus anglicus.</i>	x	x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Sporobolus maritimus</i>	x	x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Suaeda maritima</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Thinopyrum elongatum</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Triglochin maritima</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Tripolium pannonicum</i>		x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Ulva compressa</i>		x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Ulva lacinulata</i>		x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Ulva rigida</i>		x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Ulva flexuosa</i>		x	<i>Chlorophyta</i>
<i>Ulva sp.</i>	x		<i>Chlorophyta</i>
<i>Vaucheria litorea</i>		x	<i>Heterokontophyta</i>
<i>Zostera marina</i>	x	x	<i>Tracheophyta</i>
<i>Zostera noltii</i>		x	<i>Tracheophyta</i>

DISCUSSIONE

Un consistente numero di specie è stato identificato grazie a questo lavoro. In particolare, l'approccio molecolare del *DNA barcoding* si è dimostrato essere un ottimo strumento integrativo per l'identificazione morfologica che, individualmente, è molto limitata per l'alta similarità che intercorre tra alcune specie. Come riportato nel paragrafo 3.4, l'analisi con chiavi dicotomiche è stata rilevante per circa il 22% dei casi. Tuttavia, per la maggior parte delle specie (circa il 60%), solo l'analisi di *DNA barcoding* e le analisi integrative hanno permesso una corretta identificazione.

L'analisi molecolare, sui grandi numeri, porta ad una buona percentuale di successo di identificazione, tuttavia, è poco utile per gli organismi da cui è difficile estrarre il DNA genomico o per cui l'amplificazione genica presenta basse rese.

Un esempio è *Fucus virsoides*. Da questa specie di alga bruna è stato possibile estrarre il gDNA, ma il rapporto 260/230 è risultato basso (0,83), nonostante il materiale genetico fosse integro. Infatti, la PCR è ostacolata dall'alta presenza di carboidrati nelle cellule, i quali intralciano l'*annealing* dei *primer* e la sintesi degli ampliconi. Per questo organismo, quindi, non è stato possibile amplificare il marcatore genetico selezionato e l'identificazione è stata basata unicamente sui caratteri morfologici.

La fase di estrazione iniziale non si può comunque definire come il collo di bottiglia del *DNA barcoding* in quanto, sebbene l'utilizzo dei kit commerciali porti a volte a scarsi risultati, la possibilità di utilizzare il protocollo con CTAB permette di recuperare i campioni più problematici.

Si può invece definire limitante il passaggio di amplificazione tramite PCR. Come descritto nel paragrafo 3.3 dei Risultati, solo 197 campioni su 347 sono stati amplificati e sequenziati correttamente. Ciò significa che approssimativamente il 50% del materiale è stato scartato in questa fase. Inoltre, in alcuni casi, la PCR ha restituito bande promettenti, ma il cromatogramma delle sequenze ottenute presentava più picchi che sono indice della plasticità fenotipica. È possibile che frammenti di specie apparentemente identiche siano stati raccolti assieme e, quindi, i rispettivi genomi siano stati estratti e mescolati ottenendo del DNA genomico contenente sequenze di entrambi gli organismi. In questi casi i risultati del sequenziamento non sono stati ritenuti validi e sono stati scartati.

Le difficoltà hanno riguardato per lo più campioni di macroalghe, in particolare *Chlorophyta* e *Rhodophyta*. I marcatori molecolari, utilizzati in questo studio, sono stati scelti sulla base di articoli presenti in letteratura, in particolare De Vere e co-autori (2015) per il *barcoding* di piante e Saunders e McDevit (2012) per l'identificazione di specie macroalgali. Tuttavia, altri geni potevano essere

selezionati; ad esempio, nel lavoro di De Vere e co-autori (2015) si utilizza, oltre a *rbcL*, anche il marcatore plastidiale *matK*, gene ricorrente nelle analisi per l'identificazione di piante. La sequenza codifica per un enzima coinvolto nello *splicing*.

In altri casi, invece, non era disponibile nessuna sequenza associata alla specie d'interesse per quel marcatore, come nel caso del *tufA* per il genere *Chaetomorpha*. Di conseguenza l'analisi comparativa tra risultati ottenuti con *barcode* diversi avrebbe supportato con più forza alcune conclusioni.

Diversi fattori hanno ostacolato un'identificazione completa e approfondita delle sequenze. In alcuni casi, il marcatore genico utilizzato non è sufficiente per distinguere con precisione una determinata specie. Questo porta le sequenze di specie diverse a risultare strettamente correlate sia nella ricostruzione filogenetica che nella delimitazione delle specie, indicando che il marcatore scelto non è il più adatto per definire i confini tra quei gruppi tassonomici. Probabilmente, in quegli organismi, quella specifica sequenza genica è altamente conservata: di conseguenza, le divergenze nucleotidiche sono troppo limitate per permettere una separazione netta tra le specie. Per questo motivo, sulla base degli elevati valori di identità, le sequenze tendono a raggrupparsi molto vicine tra loro, indipendentemente dall'approccio metodologico utilizzato.

È il caso del genere *Artemisia* (Tracheophyta), osservabile in Figura 9: l'identificazione del nostro campione si è fermata al genere (*Artemisia sp.*), in quanto nel clade si trovavano ben 5 specie differenti correlate con la sequenza ottenuta dal *DNA barcoding*. In questo caso appare evidente che, per *Artemisia*, l'analisi di *rbcL-3P* non è utile ai fini di un'identificazione precisa.

Inoltre, un altro fattore limitante è l'incertezza sulla veridicità delle informazioni che vengono depositate nei *database*, come indicato anche nel lavoro di Robuchon e co-autori (2014). Infatti, se consideriamo per esempio i casi di *Scytosiphon lomentaria* e *Kornmannia leptoderma*, si comprende rapidamente che basarsi sui *database* conduce a conclusioni fuorvianti rispetto ad un'identificazione corretta.

Per quanto riguarda *Scytosiphon* (Heterokontophyta, Figura 13), abbiamo visto dall'albero filogenetico che le sequenze di *S. lomentaria* si separano in due rami differenti e separati da *S. promiscuus*. Dalla letteratura (Drigo *et al.*, 2024) sappiamo che in laguna sono state descritte le specie di *S. lomentaria* e *S. dotyi*; inoltre, la morfologia del campione portava a dire che si trattasse di *S. lomentaria*. Non essendo però presente né in *GenBank* né in *Bold* la sequenza *COI-5P* di *S. dotyi*, non è stato possibile confrontare le due specie. In *Bold*, però, è depositata la sequenza *rbcL-3P* di *S. dotyi*; quindi, per queste alghe brune, l'utilizzo di un secondo marcatore potrebbe portare ad una classificazione precisa.

Anche il caso di *Gayralia oxysperma* (*Ulotrichales*) e *Kornmannia leptoderma* (*Ulvales*) (*Chlorophyta*, Figura 14) è stato oggetto di discussione. Il fatto che due specie di ordini diversi clusterizzassero nello stesso ramo suscitava forti dubbi. Osservando l'albero filogenetico, si notano altre sequenze di *Gayralia oxysperma* e due sequenze di *Gayralia brasiliensis* nello stesso ramo, indicando che in quel ramo si collocano le sequenze dell'ordine *Ulotrichales*. Inoltre, verificando che la sezione delle *Ulvales* è separata (rappresentata dai generi *Blidingia* e *Ulva*), è stato ipotizzato che le sequenze di *K. leptoderma* dei database siano errate, o meglio, non appartengono a quella specie. Inoltre, il fatto che, tra le due macroalghe verdi, solo *Gayralia oxysperma* sia riportata in Laguna di Venezia supporta la tesi che la nostra sequenza corrisponda effettivamente a *G. oxysperma*.

Infine, il mancato aggiornamento del nome tassonomico associato a una sequenza può portare a confusione o errori nell'identificazione, soprattutto se ci si limita ad un allineamento con i database di riferimento.

Per esempio, le sequenze che nell'albero di *Chlorophyta* (Figura 14) sono indicate come *Ulva lacinulata*, inizialmente, dal primo allineamento su *GenBank*, rimandavano a *Ulva laetevirens*. Ora, però, *U. laetevirens* è classificata come *U. australis* (Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2026), che nel ramo delle *Ulvales* si trova separata e lontana da *U. lacinulata*. Possiamo, quindi, affermare con sicurezza che i campioni raccolti siano classificabili come *Ulva lacinulata* (e non *U. australis*) perché vengono raggruppati con la sequenza tipo di *U. lacinulata*, è quindi più probabile che siano le sequenze di *GenBank* a non appartenere alla specie *laetevirens/australis*. Da ciò si evince che l'utilizzo della ricostruzione filogenetica e della delimitazione delle specie permetta di chiarire ed ovviare ad errori nelle sequenze depositate. Inoltre, è curioso il fatto che non siano stati trovati campioni di *Ulva australis*, molto diffusa in Laguna di Venezia secondo Sfriso e co-autori (2023) e Drigo e co-autori (2024). Questa circostanza è comunque spiegabile dal fatto che non è stato svolto un campionamento di tipo quantitativo, di conseguenza è possibile che molte specie siano presenti e semplicemente non siano state avvistate.

Anche per quanto riguarda il genere *Ruppia* (*Tracheophyta*, Figura 9) ci sono state alcune perplessità. Nel nostro *dataset* non sono separate e infatti la loro classificazione non è omogenea nelle banche dati di riferimento. Secondo *Plants of the World* (POWO, 2026), queste due specie sono considerate separate, mentre, secondo *AlgaeBase* (Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2026) e Ito e co-autori (2017), *R. cirrhosa* è sinonimo di *R. maritima*. Ulteriori studi sono necessari per meglio definire la classificazione di queste due specie. Pertanto, non è possibile classificare i nostri campioni in modo più specifico di *Ruppia sp.* In ogni caso, aver identificato dei campioni di *Ruppia* è un ottimo risultato perché si tratta di organismi vegetali molto piccoli e molto rari in Laguna di Venezia.

Comunque, nonostante le difficoltà incontrate e le situazioni ambigue che richiederebbero un ulteriore approfondimento, vi sono anche esempi in cui l'approccio utilizzato è risultato fondamentale per l'interpretazione dei dati. Un esempio chiave riguarda l'identificazione di *Alsidium* (*Rhodophyta*, Figura 11). In Laguna di Venezia è riportata solo la specie *corallinum* (Drigo *et al.*, 2024), tuttavia, l'allineamento su *GenBank* restituiva in *output score* di identità molto alti anche per altre specie. Ad esempio, abbiamo riscontrato percentuali di identità pari 95% con *A. oliverianum* e una *query cover* del 99%, rispetto a una percentuale di identità del 99% con *A. corallinum* e una *query cover* dell'89%. Se l'indagine si fosse conclusa a quel punto, avremmo dovuto limitarci a indicare i campioni come *Alsidium sp.* Dal momento che l'analisi filogenetica, sostenuta dalla delimitazione della specie, ha distinto invece le sequenze di *corallinum*, abbiamo potuto confermare che si tratti proprio di *A. corallinum*.

Altro caso emblematico è quello di *Gracilaria* (*Rhodophyta*, Figura 11), che risulta essere molto complessa da riconoscere a livello morfologico. L'allineamento con BLAST del campione ISe34M indicava il maggior punteggio di omologia con la specie *yamamotoi*, non riportata in laguna. L'analisi filogenetica posiziona invece la nostra sequenza adiacente a quelle di *Gracilaria multipartita*. Considerando i risultati ottenuti dalla filogenesi, è ragionevole pensare che l'organismo campionato corrisponda a *G. multipartita*. Tuttavia, osserviamo che le sequenze raccolte in Laguna di Venezia sono separate dalle sequenze di *G. multipartita* disponibili su *GenBank*. Questo può indicare che le nostre sequenze appartengono ad una specie affine di cui non sono disponibili informazioni nei *database*. L'utilizzo di un secondo marcatore permetterebbe di verificare questa ipotesi.

Anche per il genere *Blidingia* (*Chlorophyta*, Figura 14), la clusterizzazione e i parametri di delimitazione della specie hanno confermato l'identificazione della specie *marginata*, nonostante l'allineamento su BLAST avrebbe portato a classificarla come *Blidingia minima*.

Per il genere *Suaeda* (*Tracheophyta*, Figura 9) gli approcci di filogenesi e delimitazione della specie hanno supportato in maniera concorde l'ipotesi che le nostre sequenze si riferissero alla specie *maritima* e non *media*, come invece, era indicato dall'allineamento su BLAST.

Per il genere *Juncus* (*Tracheophyta*, Figura 9), sono stati raccolti diversi campioni. In molti casi l'allineamento delle sequenze dei nostri campioni con quelle depositate in *GenBank* forniva degli *score* di identità simili fra specie differenti. L'analisi filogenetica e i metodi di delimitazione della specie hanno, però, permesso di distinguere le specie *gerardii*, *acutus* e *maritimus*.

CONCLUSIONI

In conclusione, l'approccio molecolare, condotto in questo studio, ha supportato l'analisi morfologica, permettendo l'identificazione di molte specie laddove l'osservazione dei tratti morfologici non era riuscito a portare ad una classificazione definitiva.

Per quanto riguarda le fasi iniziali di estrazione del DNA genomico, è promettente il protocollo basato sul CTAB; la resa in termini di concentrazione di DNA è nettamente maggiore rispetto a quella ottenuta con i kit commerciali. Sarebbe ideale riuscire ad ottimizzare ulteriormente il protocollo cercando di eliminare il passaggio *overnight*, in modo da velocizzare l'estrazione e poter processare più campioni in tempi maggiormente ristretti e con alte rese.

Per quanto concerne l'amplificazione tramite PCR, soprattutto per le macroalghe, risulterebbe utile il disegno di *primer* che si leghino in maniera più efficiente alle sequenze da amplificare oppure selezionare marcatori più facilmente amplificabili, ma altrettanto affidabili nella distinzione delle specie.

Per quanto concerne l'utilizzo delle banche dati, sarebbe opportuno un lavoro di revisione delle sequenze di alcune specie. In questo modo, futuri studi possono appoggiarsi a *database* più affidabili.

BIBLIOGRAFIA

- Day, J. W., Ibáñez, C., Pont, D., and Scarton, F. (2019). Status and sustainability of mediterranean deltas: the case of the Ebro, Rhône, and Po deltas and Venice lagoon. *Coasts Estuaries*, 237–249. doi: 10.1016/B978-0-12-814003-1.00014-9
- De Vere N., Rich, T.C.G., Trinder, S.A., Long, C. (2015). DNA Barcoding for Plants. In: Batley, J. (eds) Plant Genotyping. *Methods in Molecular Biology*, vol 1245. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_8.
- Diep, T. H., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., and Vinh, L. S. (2017). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* 35 (2), 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>.
- Drigo F, Stefanelli C, Moro I and De Pittà C (2024) Evaluation of photosynthetic Taxa in the Venice Lagoon from the nineteenth century to present day. *Front. Mar. Sci.* 11:1433680. doi: 10.3389/fmars.2024.1433680.
- Fogarin, S., Madricardo, F., Zaggia, L., Sigovini, M., Montereale-Gavazzi, G., Kruss, A., et al. (2019). Tidal inlets in the Anthropocene: Geomorphology and benthic habitats of the Chioggia inlet, Venice Lagoon (Italy). *Earth Surf Process. Landf* 44, 2297–2315. doi: 10.1002/esp.4642
- Freshwater, D. W., & Rueness, J. (1994). Phylogenetic relationships of some European Gelidium (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on rbcL nucleotide sequence analysis. *Phycologia*, 33(3), 187-194.
- Guiry, M. D., and Guiry, G. M. (2026). *AlgaeBase* (World-wide electronic publication, University of Galway). Available at: <https://www.algaebase.org>.
- Heikrujam, Jina, Rajkumar Kishor, e Pranab Behari Mazumder. «The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols». In *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*, a cura di Oana-Maria Boldura, Cornel Baltă, e Nasser Sayed Awwad. IntechOpen, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92206>.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. KF, von Haeseler, A. and Jermin, L. S. (2017) ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14, 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
- Kowalska, Zuzanna, Filip Pniewski, e Adam Latała. «DNA Barcoding – A New Device in Phycologist’s Toolbox». *Ecohydrology & Hydrobiology* 19, fasc. 3 (2019): 417–27. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2019.01.002>.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., and Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular Biology and Evolution* 41, 1-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>.

- Leliaert, F., Lopez-Bautista, J.M. The chloroplast genomes of *Bryopsis plumosa* and *Tydemania expeditiones* (Bryopsidales, Chlorophyta): compact genomes and genes of bacterial origin. *BMC Genomics* 16, 204 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1418-3>.
- Letunic, I., Bork, P., (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research* 52, W78–W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>.
- Madricardo, Fantina, Federica Foglini, Elisabetta Campiani, et al. «Assessing the Human Footprint on the Sea-Floor of Coastal Systems: The Case of the Venice Lagoon, Italy». *Scientific Reports* 9, fasc. 1 (2019): 6615. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43027-7>.
- Michonneau, F. 2016. Using GMYC for species delimitation. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.838260>.
- Minh B.Q., Nguyen M.A.T., and von Haeseler A. (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* 30,1188-1195.
- Nguyen L.-T., Schmidt H.A., von Haeseler A., and Minh B.Q. (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268-274.
- POWO (2026). *Plants of the World Online* (Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew). Available at: <http://www.plantsoftheworldonline.org/>.
- Ravera, O. (2000). The Lagoon of Venice: the result of both natural factors and human influence. *J. Limnol.* 59, 19. doi: 10.4081/jlimnol.2000.19
- Robuchon, Marine, Myriam Valero, Delphine Gey, e Line Le Gall. «How Does Molecular-Assisted Identification Affect Our Estimation of α , β and γ Biodiversity? An Example from Understory Red Seaweeds (Rhodophyta) of Laminaria Kelp Forests in Brittany, France». *Genetica* 143, fasc. 2 (2015): 207–23. <https://doi.org/10.1007/s10709-014-9796-z>.
- Saunders, Gary W., e Daniel C. McDevit. «Methods for DNA Barcoding Photosynthetic Protists Emphasizing the Macroalgae and Diatoms». In *DNA Barcodes*, vol. 858, a cura di W. John Kress e David L. Erickson. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_10.
- Sfriso, A., Curiel, D., and Rismondo, A. (2009). “The Lagoon of Venice,” in *Flora and Vegetation of the Italian Transitional Water Systems*, 1st ed. Eds. E. Cecere, A. Petrocchi, G. Izzo and A. Sfriso (Stampa “Multigraf”, Spinea (VE), 17–80.

Sfriso, Adriano, Marion Adelheid Wolf, Alessandro Buosi, Katia Sciuto, e Andrea Augusto Sfriso. «Alien Macroalgal Rearrangement in the Soft Substrata of the Venice Lagoon (Italy): Impacts, Threats, Time and Future Trends». *Sustainability* 15, fasc. 10 (2023): 8256. <https://doi.org/10.3390/su15108256>.

Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., Minh, B.Q., (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res* 44, W232–W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>.

Wolf, M. A., Moro, I. (2013). *Guida alle alghe dell'alto Adriatico*. Dryades project. From https://dryades.units.it/home/index.php?procedure=ext_key_home&key_type=var&key_id=14624.

Wolf, Marion A., Katia Sciuto, Christine A. Maggs, Maria Beatriz B. de Barros-Barreto, Carlo Andreoli, and Isabella Moro (2011). *Ceramium Roth* (Ceramiales, Rhodophyta) from Venice lagoon (Adriatic Sea, Italy): Comparative studies of Mediterranean and Atlantic taxa. *Taxon* 60 (6), 1584-1595.

APPENDICE

Tabella A1. Sequenze dei taxa scaricate da GenBank e Bold. Per ogni sequenza sono indicati: la specie correlata e il taxa di appartenenza della specie, se si tratta o meno di una sequenza tipo e il codice di riferimento utilizzato nel database. Le sequenze delle specie con la lettera **B** provengono da *Bold*, le altre da *GenBank*.

<i>Taxa</i>	<i>Specie</i>	<i>Type</i>	<i>Accession number</i>
<i>Chlorophyta</i>	<i>Blidingia minima B</i>	-	0722 OSTO18
<i>Chlorophyta</i>	<i>Blidingia minima</i>	-	KT290281
<i>Chlorophyta</i>	<i>Blidingia chadefaudii B</i>	-	GWS043159
<i>Chlorophyta</i>	<i>Blidingia chadefaudii</i>	-	HQ610239
<i>Chlorophyta</i>	<i>Blidingia marginata B</i>	-	GWS004837
<i>Chlorophyta</i>	<i>Blidingia marginata</i>	-	MH475464
<i>Chlorophyta</i>	<i>Blidingia marginata</i>	-	MN258036
<i>Chlorophyta</i>	<i>Blidingia sp.B</i>	-	GWS021396
<i>Chlorophyta</i>	<i>Blidingia sp.</i>	-	MH475463
<i>Chlorophyta</i>	<i>Gayralia oxysperma</i>	-	HQ610252
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis muscosa</i>	-	LK022443
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis corymbosa</i>	-	LK022441
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis foliosa</i>	-	LK022442
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis myosuroides</i>	-	LK022444
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis plumosa</i>	-	FJ432653
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis maxima</i>	-	AB008009
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium fragile B</i>	-	MAL_485
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium fragile</i>	-	U09427
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium lucasii B</i>	-	PDO0021
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium lucasii</i>	-	FJ432662
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium bursa</i>	-	KP685764
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium bursa</i>	-	KP685766
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis</i>	-	MT160674
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva intestinalis B</i>	-	GWS017830
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva intestinalis</i>	-	MT076211
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva compressa</i>	-	HQ610295
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva lacinulata</i>	lectotype	MW543061
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva rigida</i>	holotype	MW543060
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva capillata</i>	holotype	OL421407
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva californica</i>	-	OR723828
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva intestinalis</i>	-	OL421110
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium platylobium B</i>	-	KZN2K4_24
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium platylobium</i>	-	FJ535856
<i>Chlorophyta</i>	<i>Prasinococcus capsulatus</i>	-	AB561084
<i>Chlorophyta</i>	<i>Prasinophyceae sp.</i>	-	AB561083

<i>Chlorophyta</i>	<i>Kornmannia leptoderma</i>	-	OL421504
<i>Chlorophyta</i>	<i>Kornmannia leptoderma</i>	-	OL421090
<i>Chlorophyta</i>	<i>Kornmannia leptoderma</i>	-	OL421134
<i>Chlorophyta</i>	<i>Gayralia oxysperma B</i>	-	GWS004830
<i>Chlorophyta</i>	<i>Gayralia oxysperma</i>	-	LC877949
<i>Chlorophyta</i>	<i>Kornmannia leptoderma B</i>	-	NAT046
<i>Chlorophyta</i>	<i>Kornmannia leptoderma</i>	-	MH538555
<i>Chlorophyta</i>	<i>Kornmannia leptoderma</i>	-	MF441478
<i>Chlorophyta</i>	<i>Gayralia brasiliensis</i>	-	MW242795
<i>Chlorophyta</i>	<i>Gayralia brasiliensis</i>	-	OR597303
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium fragile</i>	-	KX845585
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium fragile</i>	-	LN877867
<i>Chlorophyta</i>	<i>Codium fragile</i>	-	MN853876
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis sp.</i>	-	LC768901
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis plumosa</i>	-	NC_026795
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis hypnoides B</i>	-	GWS039110
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis hypnoides</i>	-	NC_013359
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis hypnoides</i>	-	PQ652170
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis pennata B</i>	-	BDA0059
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis pennata</i>	-	OR860994
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis pennata</i>	-	OR860995
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis pennata</i>	-	MT324546
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis plumosa B</i>	-	GWS018364
<i>Chlorophyta</i>	<i>Bryopsis plumosa</i>	-	JQ755423
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis</i>	-	PQ733683
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis</i>	-	PQ733682
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis</i>	-	PQ733669
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis B</i>	-	GWS023392
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis</i>	-	PQ733666
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva californica B</i>	-	LAK49
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva californica</i>	-	PQ733687
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva capillata</i>	-	PQ733702
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva californica</i>	-	PQ733696
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva capillata B</i>	-	0722 GOS017
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva capillata</i>	-	PQ733701
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva compressa</i>	-	PQ733741
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva compressa B</i>	-	L.3960381
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva compressa</i>	-	PQ733730
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva intestinalis</i>	-	PQ733805
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva intestinalis</i>	-	PQ733813
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva lacinulata B</i>	-	GWS024562
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva lacinulata</i>	-	PQ733832
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva lacinulata</i>	-	PQ733829
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva flexuosa B</i>	-	L.3960382

<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva linza</i>	-	PQ733866
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva linza</i>	-	PQ733869
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva linza</i>	-	PQ733872
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva lacunculata</i>	-	MT160657
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva lacunculata</i>	-	MW543061
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva flexuosa subsp. flexuosa</i>	-	OR734311
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva rigida</i>	-	MT160670
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva rigida</i>	-	MT078951
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva rigida</i>	-	MT894983
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva rigida</i>	-	MW543060
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva fenestrata B</i>	-	GWS014779
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva fenestrata</i>	type	MK456404
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva compressa</i>	type	OR427287
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva lacunculata</i>	type	MT078955
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva expansa</i>	type	MH731007
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva expansa B</i>	-	02UA
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis</i>	-	OL604521
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis</i>	-	OL604520
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis</i>	-	OL604523
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva australis</i>	-	OL604522
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Gongolaria barbata</i>	-	MF768075
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Ericaria amentacea</i>	-	MF768051
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Ericaria amentacea</i>	-	MF768052
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Gongolaria barbata</i>	-	MF768074
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Dictyopteris polypodioides</i>	-	EU681404
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	-	EU681424
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Sargassum siliquosum</i>	-	KP101267
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Sargassum siliquosum</i>	-	OP270186
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Scytosiphon lomentaria B</i>	-	GWS017948
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	-	KF281312
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Scytosiphon promiscuus B</i>	-	GWS011886
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Scytosiphon promiscuus</i>	holotype	KF281380
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Phaeocystis globosa B</i>	-	MT760703
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Phaeocystis globosa</i>	-	MN927527
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Phaeocystis globosa</i>	-	MN927543
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Phaeocystis globosa</i>	-	MT760761
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Sargassum muticum</i>	-	KC782903
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Sargassum muticum B</i>	-	PTM1863
<i>Heterokontophyta</i>	<i>Sargassum muticum</i>	-	KY682972
<i>Rhodophyta</i>	<i>Agardhiella subulata B</i>	-	GWS017856
<i>Rhodophyta</i>	<i>Agardhiella subulata</i>	-	KF714838
<i>Rhodophyta</i>	<i>Agardhiella subulata</i>	-	KF714844
<i>Rhodophyta</i>	<i>Agardhiella subulata</i>	-	KF714846
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria flabelliformis B</i>	-	TFP08 0072

<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria flabelliformis</i>	-	KP210178
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada perforata</i>	-	KF492773
<i>Rhodophyta</i>	<i>Solieria filiformis</i>	-	KJ202080
<i>Rhodophyta</i>	<i>Solieria filiformis B</i>	-	GWS001078
<i>Rhodophyta</i>	<i>Solieria robusta B</i>	-	GWS001590
<i>Rhodophyta</i>	<i>Solieria robusta</i>	-	HM915934
<i>Rhodophyta</i>	<i>Aglaothamnion scopula</i>	-	PV553641
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium corallinum</i>	-	MH388695
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria baileyana</i>	-	MH388698
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria sp. B</i>	-	GWS025702
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria sp.</i>	-	MT683781
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria sp.</i>	-	MT783832
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria arcuata</i>	-	HQ423044
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria baileyana B</i>	-	GWS032169
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria baileyana</i>	-	OP800339
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria baileyana</i>	-	KU564345
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia echinata B</i>	-	KM609436
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia echinata</i>	-	HM573506
<i>Rhodophyta</i>	<i>Carradoriella elongata B</i>	-	BIO309A 02
<i>Rhodophyta</i>	<i>Carradoriella elongata</i>	-	MF093996
<i>Rhodophyta</i>	<i>Kapraunia schneideri</i>	-	MF093998
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia scopulorum B</i>	-	MT676065
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia scopulorum</i>	-	MF093999
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia sertularioides</i>	-	MF094000
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia stricta B</i>	-	MF094004
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia stricta</i>	-	MF094004
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium oliveiranum</i>	-	MN165073
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium oliveiranum</i>	-	MN165074
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium corallinum</i>	-	MF094017
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium corallinum</i>	-	MN165075
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium seaforthii B</i>	-	MN165079
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium seaforthii</i>	-	MF093968
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium seaforthii</i>	-	MN165076
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium triquetrum</i>	-	MN165082
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alsidium triquetrum</i>	-	MN165084
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria dangeardii B</i>	-	GU223879
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria dangeardii</i>	-	GU223879
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria tenuissima</i>	-	MF094021
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria decipiens B</i>	-	MG272232
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria decipiens</i>	-	MG272232
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria scintillans B</i>	-	RMAR2421
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria scintillans</i>	-	KF492717
<i>Rhodophyta</i>	<i>Osmundea ramosissima</i>	-	KX258833
<i>Rhodophyta</i>	<i>Osmundea oederi B</i>	-	BIO309A 34

<i>Rhodophyta</i>	<i>Osmundea oederi</i>	-	KU566532
<i>Rhodophyta</i>	<i>Osmundea spectabilis B</i>	-	GWS021223
<i>Rhodophyta</i>	<i>Osmundea spectabilis</i>	-	KM254320
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada crustiformans</i>	-	KX258840
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada flagellifera B</i>	-	MMS0095
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada flagellifera</i>	-	KF492772
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada parvipapillata</i>	-	GU223895
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada tenerrima</i>	-	MF544099
<i>Rhodophyta</i>	<i>Melanothamnus harveyi</i>	-	GWS017872
<i>Rhodophyta</i>	<i>Melanothamnus harveyi</i>	-	GWS017872
<i>Rhodophyta</i>	<i>Melanothamnus harveyi</i>	-	GWS012476
<i>Rhodophyta</i>	<i>Melanothamnus harveyi</i>	-	GWS012474
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria dasyphylla B</i>	-	GWS014625
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria dasyphylla</i>	-	MT906850
<i>Rhodophyta</i>	<i>Chondria dasyphylla</i>	-	OP800334
<i>Rhodophyta</i>	<i>Osmundea oederi</i>	-	MN184283
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada perforata B</i>	-	BDA0314A
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada perforata</i>	-	OK209883
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gelidium crinale</i>	-	JX096542
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gelidium galapagense</i>	-	KX423473
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gelidium crinale B</i>	-	GWS018045
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gelidium crinale</i>	-	OQ656734
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gelidium crinale</i>	-	OQ656730
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gelidium crinale</i>	-	KU958465
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gelidium crinale</i>	-	OQ656729
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gelidium calidum</i>	-	KT208040
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gelidium americanum</i>	-	MW760396
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria gracilis B</i>	-	GWS014616
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria gracilis</i>	-	EF434919
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria gracilis</i>	-	JQ843331
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria gracilis</i>	-	MW465693
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria gracilis</i>	-	KF714847
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria pacifica B</i>	-	GWS022199
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria pacifica</i>	-	FJ499513
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria pacifica</i>	-	KM254246
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria arcuata B</i>	-	GWS017314
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria arcuata</i>	-	MG199570
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria multipartita B</i>	-	MZ336090
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria multipartita</i>	-	NC_058681
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria ornata B</i>	-	NC_058682
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria ornata</i>	-	NC_058682
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria yamamotoi</i>	-	OP669509
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria yamamotoi</i>	-	OP669511
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria parva B</i>	-	PHYKOS-4519

<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria parva</i>	-	OL690498
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria parva</i>	-	OL690495
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria vermiculophylla B</i>	-	GWS018610
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	-	HQ322059
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	-	HQ322046
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria textorii B</i>	-	GWS018608
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria textorii</i>	-	HQ322061
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria parvispora B</i>	-	ON527807
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria parvispora</i>	-	HQ322032
<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria gracilis</i>	-	FJ499509
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea spinella B</i>	-	ALCB100232
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea spinella</i>	-	KM214578
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea spinella</i>	-	KU905111
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea cervicornis B</i>	-	SP365646
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea cervicornis</i>	-	KU905089
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea cervicornis</i>	-	HQ422674
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea flexicaulis B</i>	-	KP708623
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea flexicaulis</i>	-	EF136606
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea musciformis B</i>	-	GWS045120
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea musciformis</i>	-	KP725277
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea musciformis</i>	-	KP725276
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea musciformis</i>	-	GQ141881
<i>Rhodophyta</i>	<i>Hypnea musciformis</i>	-	HQ422612
<i>Rhodophyta</i>	<i>Osmundea truncata</i>	-	KU566543
<i>Rhodophyta</i>	<i>Osmundea truncata</i>	-	KU566542
<i>Rhodophyta</i>	<i>Osmundea truncata</i>	-	KU566544
<i>Rhodophyta</i>	<i>Carradoriella elongata</i>	-	MF120730
<i>Rhodophyta</i>	<i>Carradoriella elongata</i>	-	MF409425
<i>Rhodophyta</i>	<i>Carradoriella elongata</i>	-	MF409433
<i>Rhodophyta</i>	<i>Carradoriella virgata</i>	-	MF120623
<i>Rhodophyta</i>	<i>Carradoriella virgata</i>	-	MF120783
<i>Rhodophyta</i>	<i>Kapraunia schneideri B</i>	-	MF093998
<i>Rhodophyta</i>	<i>Kapraunia schneideri</i>	-	MF543366
<i>Rhodophyta</i>	<i>Kapraunia schneideri</i>	-	MF120708
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia morrowii B</i>	-	GWS019916
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia morrowii</i>	-	MF120766
<i>Rhodophyta</i>	<i>Polysiphonia morrowii</i>	-	MF120685
<i>Rhodophyta</i>	<i>Kapraunia schneideri</i>	-	HM573514
<i>Rhodophyta</i>	<i>Kapraunia schneideri</i>	-	HM573516
<i>Rhodophyta</i>	<i>Kapraunia schneideri</i>	-	HM573513
<i>Rhodophyta</i>	<i>Kapraunia schneideri</i>	-	HM573515
<i>Rhodophyta</i>	<i>Spermothamnion cymosum B</i>	-	GWS015092
<i>Rhodophyta</i>	<i>Spermothamnion cymosum</i>	-	MG030803
<i>Rhodophyta</i>	<i>Spermothamnion cymosum</i>	-	MG030804

<i>Rhodophyta</i>	<i>Spermothamnion cymosum</i>	-	MF597664
<i>Rhodophyta</i>	<i>Spermothamnion cymosum</i>	-	PV553646
<i>Rhodophyta</i>	<i>Cyanophora paradoxa B</i>	-	KF631389
<i>Rhodophyta</i>	<i>Cyanophora paradoxa</i>	-	AB491672
<i>Rhodophyta</i>	<i>Cyanophora paradoxa</i>	-	KF631389
<i>Rhodophyta</i>	<i>Cyanophora tetracyanea B</i>	-	KF631391
<i>Rhodophyta</i>	<i>Cyanophora biloba B</i>	-	KF631390
<i>Rhodophyta</i>	<i>Cyanophora biloba</i>	-	KF631390
<i>Rhodophyta</i>	<i>Glaucozystis nostochinearum</i>	-	AB491671
<i>Rhodophyta</i>	<i>Caulacanthus okamurae</i>	-	PQ826726
<i>Rhodophyta</i>	<i>Caulacanthus ustulatus B</i>	-	GWS022436
<i>Rhodophyta</i>	<i>Caulacanthus ustulatus</i>	-	HQ423094
<i>Rhodophyta</i>	<i>Caulacanthus ustulatus</i>	-	KJ960508
<i>Rhodophyta</i>	<i>Caulacanthus ustulatus</i>	-	OQ174559
<i>Rhodophyta</i>	<i>Caulacanthus ustulatus</i>	-	OQ174562
<i>Rhodophyta</i>	<i>Caulacanthus okamurae B</i>	-	F208NC
<i>Rhodophyta</i>	<i>Caulacanthus okamurae</i>	-	NC_047435
<i>Rhodophyta</i>	<i>Caulacanthus okamurae</i>	-	MT193839
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada sp.</i>	-	MT996228
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada sp.</i>	-	KX258838
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada perforata</i>	-	OP297574
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada perforata</i>	-	MH388710
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada intermedia</i>	-	LC820980
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada sp.</i>	-	KX258835
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada tenerrima</i>	-	MG030782
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada corallopsis B</i>	-	PP974343
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada corallopsis</i>	-	PP974343
<i>Rhodophyta</i>	<i>Palisada corallopsis</i>	-	PP974342
<i>Rhodophyta</i>	<i>Aglaothamnion halliae B</i>	-	GWS005753
<i>Rhodophyta</i>	<i>Aglaothamnion halliae</i>	-	EU194956
<i>Rhodophyta</i>	<i>Aglaothamnion sepositum</i>	-	EU194959
<i>Rhodophyta</i>	<i>Aglaothamnion roseum</i>	-	EU194958
<i>Rhodophyta</i>	<i>Callithamnion tetragonum</i>	-	EU194960
<i>Rhodophyta</i>	<i>Callithamnion acutum</i>	-	PP735967
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion nipponicum</i>	-	LC820911
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion antillanum</i>	-	HQ4227951
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion antillanum</i>	-	HQ423091
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion decipiens</i>	-	HQ423063
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion sp.</i>	-	HQ423013
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion sp.</i>	-	HQ423104
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion hubbsii B</i>	-	NCweed-1308
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion hubbsii</i>	-	HQ412555
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion hubbsii</i>	-	KJ202083
<i>Rhodophyta</i>	<i>Antithamnion sp.</i>	-	KM254403

<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia cirrhosa</i>	-	KR263134
<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia cirrhosa</i>	-	MG227122
<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia cirrhosa</i>	-	DQ859175
<i>Tracheophyta</i>	<i>Cymodocea serrulata</i>	-	JN225335
<i>Tracheophyta</i>	<i>Cymodocea rotundata</i>	-	JN225334
<i>Tracheophyta</i>	<i>Cymodocea nodosa B</i>	-	KF488486
<i>Tracheophyta</i>	<i>Cymodocea nodosa</i>	-	KF488487
<i>Tracheophyta</i>	<i>Cymodocea nodosa</i>	-	KF488486
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex australasica B</i>	-	HM587582
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex australasica</i>	-	HM587582
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex centralasiatica B</i>	-	CCDB-26262-E02
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex centralasiatica</i>	-	HM587583
<i>Tracheophyta</i>	<i>Zostera noltii B</i>	-	BGE 00278 A03
<i>Tracheophyta</i>	<i>Zostera noltii</i>	-	JN225350
<i>Tracheophyta</i>	<i>Zostera noltii</i>	-	U80733
<i>Tracheophyta</i>	<i>Zostera marina B</i>	-	BGE 00278 A10
<i>Tracheophyta</i>	<i>Zostera marina</i>	-	U80734
<i>Tracheophyta</i>	<i>Zostera marina</i>	-	JN225353
<i>Tracheophyta</i>	<i>Cymodocea rotundata B</i>	-	JN225334
<i>Tracheophyta</i>	<i>Cymodocea rotundata</i>	-	KF488490
<i>Tracheophyta</i>	<i>Cymodocea serrulata B</i>	-	KF488492
<i>Tracheophyta</i>	<i>Cymodocea serrulata</i>	-	KF488491
<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia cirrhosa B</i>	-	BABY-09355
<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia cirrhosa</i>	-	JN113277
<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia cirrhosa</i>	-	MZ466378
<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia maritima</i>	-	JN113278
<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia maritima B</i>	-	EDNA21-0061572
<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia maritima</i>	-	U03729
<i>Tracheophyta</i>	<i>Ruppia maritima</i>	-	HQ901576
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia scoparia</i>	-	GU724242
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia scoparia</i>	-	KX582024
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia scoparia</i>	-	KX282552
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia scoparia</i>	-	KX282551
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia pubescens</i>	-	KX582020
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia japonica</i>	-	MN185069
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia glomerata B</i>	-	BAB-6414
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia glomerata</i>	-	MG223735
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia absinthium B</i>	-	SRM000443A
<i>Tracheophyta</i>	<i>Artemisia absinthium</i>	-	MK348958
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex aucherii B</i>	-	HM587581
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex aucherii</i>	-	HM587581
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex glauca B</i>	-	CCDB-26262-H05
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex glauca</i>	-	HM587584
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex portulacoides</i>	-	KM360659

<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex portulacoides</i>	-	MN810509
<i>Tracheophyta</i>	<i>Halimione portulacoides B</i>	-	EDNA21-0061571
<i>Tracheophyta</i>	<i>Halimione portulacoides</i>	-	JN891002
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex gardneri</i>	-	OQ832174
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex clivicola</i>	-	MN810488
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex peruviana B</i>	-	Peru170367
<i>Tracheophyta</i>	<i>Atriplex peruviana</i>	-	MN810501
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus maritimus B</i>	-	NMW3418
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus maritimus</i>	-	AY216629
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus gerardii</i>	-	AY216613
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus maritimus</i>	-	JN891642
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus acutus B</i>	-	NMW3388
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus acutus</i>	-	AM999842
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus acutus</i>	-	JN891719
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus gerardii B</i>	-	EDNA22-0062645
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus gerardii</i>	-	MG227439
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus gerardii</i>	-	MG226178
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus gerardii</i>	-	MG226269
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus gerardii</i>	-	KX678617
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus acutus</i>	-	HM850083
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus acutus</i>	-	JN891720
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus acutus</i>	-	JN893492
<i>Tracheophyta</i>	<i>Juncus acutus</i>	-	OQ851353
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium sp. B</i>	-	HM850125
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium narbonense B</i>	-	AJ286364
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium narbonense</i>	-	AJ286364
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium virgatum B</i>	-	KJ608053
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium virgatum</i>	-	KJ608053
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium vulgare B</i>	-	EDNA23-0065147
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium vulgare</i>	-	MH582735
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium vulgare</i>	-	MT984450
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium vulgare</i>	-	Y16904
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium virgatum</i>	-	AB917056
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limonium narbonense</i>	-	MW289886
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salicornia fruticosa B</i>	-	BPTPS106
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salicornia fruticosa</i>	-	NC_066030
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salicornia fruticosa</i>	-	ON684503
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salicornia europaea B</i>	-	Ge01517
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salicornia europaea</i>	-	KM360963
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salicornia europaea</i>	-	KX282990
<i>Tracheophyta</i>	<i>Sarcocornia perennis</i>	-	JN891224
<i>Tracheophyta</i>	<i>Sarcocornia perennis</i>	-	JQ412418
<i>Tracheophyta</i>	<i>Soda foliosa</i>	-	PP754489
<i>Tracheophyta</i>	<i>Soda foliosa</i>	-	PQ272990

<i>Tracheophyta</i>	<i>Salsola kali B</i>	-	EDNA21-0061526
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salsola kali</i>	-	AY270129
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salsola kali</i>	-	HM850332
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salsola kali</i>	-	JN893159
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salsola kali</i>	-	JN893640
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salsola kali</i>	-	KX789408
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salsola kali</i>	-	MG247392
<i>Tracheophyta</i>	<i>Salsola kali</i>	-	MH598919
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia media B</i>	-	EDNA22-0062639
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia media</i>	-	MG248444
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia marina B</i>	-	EDNA21-0061115
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia marina</i>	-	KX283054
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia marina</i>	-	OY804563
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia marina</i>	-	OP353921
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia bocconei B</i>	-	EDNA22-0062577
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia bocconei</i>	-	OY734961
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia bocconei</i>	-	OQ172709
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia media</i>	-	KX298990
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia media</i>	-	JN891830
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia media</i>	-	JN891963
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia bocconei</i>	-	HM850380
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia bocconei</i>	-	OQ172710
<i>Tracheophyta</i>	<i>Spergularia bocconei</i>	-	PP129849
<i>Tracheophyta</i>	<i>Puccinellia distans B</i>	-	iD19
<i>Tracheophyta</i>	<i>Puccinellia distans</i>	-	KC483744
<i>Tracheophyta</i>	<i>Puccinellia distans</i>	-	MG226113
<i>Tracheophyta</i>	<i>Puccinellia distans</i>	-	MG228057
<i>Tracheophyta</i>	<i>Phragmites australis B</i>	-	iD09
<i>Tracheophyta</i>	<i>Phragmites australis</i>	-	MG227498
<i>Tracheophyta</i>	<i>Phragmites australis</i>	-	MT886091
<i>Tracheophyta</i>	<i>Phragmites australis</i>	-	KM360930
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda fruticosa B</i>	-	JX985731
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda fruticosa</i>	-	JX985731
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda fruticosa</i>	-	KF679785
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda fruticosa</i>	-	KF679786
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda maritima</i>	-	JN891221
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda maritima</i>	-	JX997825
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda maritima</i>	-	JN893488
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda maritima</i>	-	JN891222
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda vera B</i>	-	EDNA20-0060189
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda vera</i>	-	JN893487
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda vera</i>	-	JN891228
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda maritima B</i>	-	BABY-09666
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda maritima</i>	-	KR057197

<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda rolandii</i>	-	MG246439
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda maritima</i>	-	MG247562
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda heterophylla B</i>	-	KF500483
<i>Tracheophyta</i>	<i>Suaeda heterophylla</i>	-	KR057194
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum elongatum</i>	-	AY836174
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum elongatum</i>	-	HQ652724
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum elongatum</i>	-	KF728581
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum elongatum</i>	-	KF728582
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum junceum</i>	-	JN890615
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum junceum</i>	-	JN890847
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum junceum</i>	-	JN891931
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum elongatum</i>	-	PV605568
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum elongatum</i>	-	MW888707
<i>Tracheophyta</i>	<i>Thinopyrum elongatum</i>	-	NC_043841
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin barrelieri B</i>	-	GQ452331
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin barrelieri</i>	-	GQ452331
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin elongata B</i>	-	GQ452332
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin elongata</i>	-	GQ452332
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin maritima B</i>	-	EDNA21-0061462
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin maritima</i>	-	GQ452333
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin palustris B</i>	-	EDNA21-0061102
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin palustris</i>	-	GQ452334
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin rheophila B</i>	-	GQ452335
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin rheophila</i>	-	GQ452335
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin striata B</i>	-	GQ452336
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin striata</i>	-	GQ452336
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin maritima</i>	-	JX848473
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin maritima</i>	-	HQ901578
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin maritima</i>	-	AB088811
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin palustris</i>	-	DQ859176
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin palustris</i>	-	OZ078213
<i>Tracheophyta</i>	<i>Triglochin palustris</i>	-	PP234593
<i>Tracheophyta</i>	<i>Tripolium pannonicum B</i>	-	EDNA21-0061451
<i>Tracheophyta</i>	<i>Tripolium pannonicum</i>	-	NC_088567
<i>Tracheophyta</i>	<i>Tripolium pannonicum</i>	-	LC778122
<i>Tracheophyta</i>	<i>Euthamia occidentalis B</i>	-	CCDB-22990-C10
<i>Tracheophyta</i>	<i>Euthamia occidentalis</i>	-	MF963323
<i>Tracheophyta</i>	<i>Gymnosperma glutinosum</i>	-	MT189220
<i>Tracheophyta</i>	<i>Bigelowia nudata B</i>	-	MCF-240
<i>Tracheophyta</i>	<i>Bigelowia nudata</i>	-	ON341350
<i>Tracheophyta</i>	<i>Euthamia graminifolia B</i>	-	CCDB-18322-E10
<i>Tracheophyta</i>	<i>Euthamia graminifolia</i>	-	KM212122
<i>Tracheophyta</i>	<i>Anthoceros agrestis B</i>	-	EDNA23-0065028
<i>Tracheophyta</i>	<i>Anthoceros agrestis</i>	-	DQ845682

<i>Tracheophyta</i>	<i>Anthoceros laminiferus B</i>	-	AY463053
<i>Tracheophyta</i>	<i>Anthoceros laminiferus</i>	-	AY463053
<i>Tracheophyta</i>	<i>Anthoceros punctatus B</i>	-	EDNA22-0062399
<i>Tracheophyta</i>	<i>Anthoceros punctatus</i>	-	DQ845681
<i>Tracheophyta</i>	<i>Anthoceros punctatus</i>	-	U87063
<i>Tracheophyta</i>	<i>Anthoceros lamellatus B</i>	-	DQ845679
<i>Tracheophyta</i>	<i>Anthoceros lamellatus</i>	-	DQ845679
<i>Tracheophyta</i>	<i>Callithamnion tetragonum B</i>	-	EC016
<i>Tracheophyta</i>	<i>Callithamnion tetragonum B</i>	-	GWS020296
<i>Tracheophyta</i>	<i>Inula crithmoides</i>	-	JN893641
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limbarda crithmoides B</i>	-	BPTPS107
<i>Tracheophyta</i>	<i>Limbarda crithmoides</i>	-	NC_066031