

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Evoluzionistica



Tesi di laurea

**Analisi della variazione genetica a livello temporale nelle
popolazioni di
Zosterisessor ophiocephalus della Laguna di Venezia**

Relatore: **Prof. Lorenzo Zane**

Correlatore: **Dott. Ilaria Anna Maria Marino**

Laureando: **Cesare Ginato**

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1 <i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	8
1.2 La Laguna e i sistemi lagunari nel Mare Adriatico	13
1.3 Variazione genetica in popolazioni di organismi marini e lagunari	16
2. SCOPO DELLA TESI	19
3. MATERIALI E METODI	20
3.1 Campionamento	20
3.2 Estrazione del DNA	23
3.3 Microsatelliti	25
3.4 La PCR	27
3.5 <i>Genotyping</i>	31
3.6 <i>Scoring</i>	31
3.7 <i>Binning</i>	34
3.8 Analisi dei dati	34
<u>3.8.1 Equilibrio di Hardy-Weinberg</u>	34
<u>3.8.2 <i>Linkage disequilibrium</i></u>	35
<u>3.8.3 Eterozigosità osservata e attesa</u>	36
<u>3.8.4 <i>Allelic richness</i></u>	37
<u>3.8.5 Indici F_{ST} e AMOVA</u>	38
<u>3.8.6 Confronto N° di alleli, F_{IS}, H_e, H_o e <i>allelic richness</i> tra gruppi</u>	41
<u>3.8.7 Test di <i>isolation by time</i></u>	41
<u>3.8.8 Stima della dimensione effettiva di popolazione</u>	42

3.8.9 Stima dei sottogruppi familiari.....	43
4. RISULTATI.....	44
4.1 Estrazione DNA.....	44
4.2 Amplificazione loci microsatellite.....	45
4.3 Analisi dei dati.....	46
4.3.1 Equilibrio di Hardy-Weinberg e <i>linkage disequilibrium</i>	47
4.3.2 <u>Analisi della variabilità genetica</u>	47
4.3.3 Indici F_{ST} e AMOVA	49
4.3.4 <u>Confronti <i>allelic richness</i>, eterozigosità attesa e osservata</u>	57
4.3.5 <u>Test di <i>isolation by time</i></u>	59
4.3.6 <u>Stima della dimensione effettiva di popolazione</u>	60
4.3.7 <u>Stima dei sottogruppi familiari</u>	60
5. DISCUSSIONE.....	61
6. CONCLUSIONE.....	68
7. BIBLIOGRAFIA.....	68
8. SITOGRAFIA	83

1. INTRODUZIONE

Questo lavoro di tesi si inserisce nel contesto del progetto “Venezia 2021”, un programma di ricerca scientifica coordinato da CORILA (Consorzio per il coordinamento delle ricerche inerenti al sistema lagunare di Venezia) che ha come obiettivo il monitoraggio del corretto equilibrio dell’ecosistema lagunare per proteggere il suo naturale funzionamento ecologico e salvaguardarne i benefici sociali, economici e culturali (<http://www.corila.it/it/Venezia2021>). *Zosterisessor ophiocephalus* è una delle quattro specie scelte per studiare la struttura di popolazione di organismi in futuro potenzialmente soggetti agli effetti della diminuzione degli scambi mare-laguna, in particolare in relazione alla messa in funzione del MOSE, un sistema di dighe mobili situate nelle tre bocche di porto progettato al fine di proteggere la città di Venezia e la sua Laguna dal fenomeno dell’acqua alta. È ipotizzabile che, a causa dell’interruzione temporanea del collegamento tra mare e laguna promossa da quest’opera e della conseguente riduzione del flusso genico tra le diverse popolazioni e del reclutamento a livello locale, si possa osservare un incremento della divergenza genetica ed un impatto a livello della variabilità genetica.

Gli scambi mare-laguna hanno infatti un ruolo fondamentale nel mantenimento dell’equilibrio degli ecosistemi degli ambienti di transizione. La connettività tra bacini diversi, fenomeno che determina la messa in comunicazione dei diversi habitat e delle diverse popolazioni, è ciò che influenza maggiormente le dinamiche di popolazione e la loro struttura genetica. Pertanto, lavori come questo, che si interessano della variabilità genetica e della struttura di popolazione di specie lagunari, rappresentano un importante termine di confronto per lavori futuri nei quali si potrà cominciare ad osservare gli effetti di questo sistema e delle interruzioni temporanee degli scambi mare-laguna sulle popolazioni lagunari.

1.1 *Zosterisessor ophiocephalus*



Figura 1: Fotografia di *Z. ophiocephalus* (<http://www.fishbase.org/>).

Zosterisessor ophiocephalus (Pallas, Figura 1), comunemente chiamato gò o ghiozzo, è un pesce osseo attinopterigio dell'ordine *Gobiiformes* e appartenente alla famiglia dei *Gobiidae*, nativo del Mar Mediterraneo, del Mar Nero e del Mare di Azov (Đodo et al., 2013). Essendo un organismo demersale di piccola taglia caratterizzato da uno stadio larvale pelagico, *Z. ophiocephalus* si è dimostrato un efficace bioindicatore utilizzato ampiamente in programmi di biomonitoraggio in Laguna di Venezia (Losso, 2010). La specie rappresenta l'unico membro del genere *Zosterisessor*. I suoi habitat principali sono caratterizzati da acque costiere poco profonde di estuari o lagune, da praterie di *Zostere* e *Posidonie* e substrati fangosi nei quali, data la sua natura demersale, è solito scavare delle buche nelle quali

nascondersi in attesa delle sue prede che consistono principalmente di crostacei, anellidi policheti e altri piccoli pesci (Đođo et al., 2013).

Zosterisessor ophiocephalus può raggiungere i 25 cm di lunghezza e i 5 anni di età (Gandolfi, 1991). Ha capo massiccio, quasi cilindrico nella metà anteriore e compresso nella metà posteriore. La bocca è grande ed è munita di spesse labbra e piccoli denti conici disposti su più file; gli occhi sono piccoli e di forma circolare, appena sporgenti sul profilo dorsale. Possiede due pinne dorsali, la prima è situata quasi all'altezza delle pettorali, la seconda, più grande, raggiunge il peduncolo caudale. La pinna anale è lunga e posta in maniera quasi simmetrica rispetto alla seconda pinna dorsale. Le pinne pettorali sono mediamente sviluppate mentre le pinne ventrali sono allungate e fuse quasi a formare una sorta di disco grazie al quale l'animale aderisce al substrato. La pinna caudale è omocerca e il corpo è rivestito di un abbondante muco secreto dalle cellule del derma. La colorazione è giallo-verdastra con numerose macchie brune sui fianchi e sul dorso. L'intensità della colorazione è in funzione della tipologia di ambiente in cui vive: chiara in ambienti fangosi e più marcata in substrati ricchi di flora. Il ventre risulta invece più chiaro. È possibile riconoscere il sesso dalla forma della papilla genitale: conica ed allungata nei maschi, tronca e arrotondata nelle femmine (Figura 2; Gandolfi, 1991).

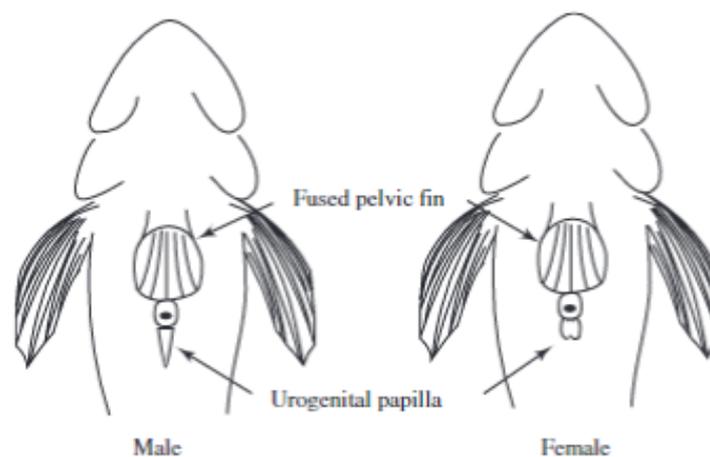


Figura 2: Rappresentazione grafica ventrale di un gobide (*Neogobius melanostomus*). Sono evidenziate le differenze della papilla urogenitale nei due sessi: nel maschio è conica ed allungata, nella femmina più corta ed ampia (Charlebois et al., 1997).

Il maschio ha in genere indole solitaria e territoriale, ogni esemplare occupa un'area dalla quale allontana i possibili competitori. Costruisce un rifugio nel substrato molle nel quale il crollo delle pareti è prevenuto dal muco secreto dalle cellule del derma. La struttura del rifugio è strettamente dipendente dalla funzione: in inverno il pesce scava un rifugio profondo e verticale per svernare (Figura 3A); durante il periodo di riproduzione, che va da febbraio a maggio, le tane sono invece grandi e con più entrate (Figura 3B, 3C). Nel periodo estivo le tane sono costituite da brevi tunnel e camere circolari (Figura 3D, 3E).

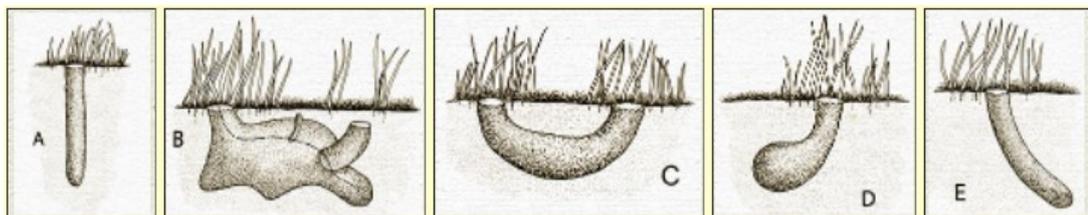


Figura 3: Tipologie di tane scavate da *Z. ophiocephalus*: (3A) rifugio per lo svernamento; (B, C) tane scavate per la riproduzione; (D, E) tane scavate nel periodo estivo.

(fonte: <http://www.ittiofauna.org/webmuseum/pesciossei/perciformes/gobidae/zosterisessor/zosterisessorophiocephalus/zosterisessorophio.htm>)

Il rilascio dei gameti è asincrono, è il maschio che rilascia gli spermatozoi sulla superficie del nido formando una sorta di pista costituita da una banda di mucina secreta dalle vescicole seminali dello stesso, delle strutture accessorie dell'apparato riproduttore maschile. La mucina si dissolve progressivamente nel tempo, rilasciando gli spermatozoi per un periodo prolungato e aumentando la probabilità di fecondazione delle uova (Mazzoldi et al., 2000). Le femmine depongono quindi le uova nella zona circostante.

La grande variabilità osservabile nelle dimensioni e nelle caratteristiche fisiologiche dell'apparato riproduttore di *Z. ophiocephalus* suggerisce la presenza di tattiche alternative di riproduzione tra i maschi (Scaggiante et al., 1999). Maschi di maggiori dimensioni presentano infatti testicoli di minore dimensione, associati ad una minore produzione di spermatozoi e una maggiore dimensione delle vescicole seminali, associata alla maggior produzione di mucina. Al contrario gli esemplari più piccoli, che sfruttano una tattica riproduttiva alternativa detta *sneaky*, producono una maggior quantità di sperma e quantità minori di mucina. Mentre negli organismi più grandi la mucina ha un ruolo essenziale nel prolungare l'efficacia dei

gameti, nei maschi di più piccole dimensioni grande rilevanza la possiede la quantità di spermatozoi. Questi vengono rilasciati in prossimità dei rifugi costruiti dai maschi più grandi (Scaggiante et al., 1999). Uno studio effettuato da Pujolar et al. (2012) ha verificato, tramite l'analisi di parentela delle uova prelevate dai nidi, come i grandi maschi territoriali presentino in media un maggior successo riproduttivo (74%) rispetto agli individui *sneaker* che comunque contribuiscono alla fecondazione delle uova. Nello stesso studio è stata inoltre rivelata la presenza di una correlazione positiva tra la dimensione corporea e il successo riproduttivo, oltre che l'assenza di correlazione tra la dimensione corporea e la grandezza delle gonadi (Pujolar et al., 2012). Questi risultati suggeriscono come, una volta raggiunta una dimensione importante, per i maschi adulti di *Z. ophiocephalus* risulti più efficace investire in comportamenti quali la difesa del nido, piuttosto che nella maggiore produzione di spermatozoi in relazione alla presenza di competizione spermatica (Pujolar et al., 2012).

Le larve sono pelagiche appena schiuse e si cibano di zooplankton. In questo stadio sono soggette al fenomeno della dispersione che permette all'organismo di diffondersi (Malakoff, 1997). Attraverso la dispersione le larve vengono principalmente trasportate passivamente dalle correnti e dalle maree (Weersing & Toonen, 2009). Dopo circa 26 giorni dalla schiusa, le larve assumono un comportamento demersale in relazione ad un aumento della dimensione corporea e alla manifestazione dei primi accenni di colorazione (Privileggi et al., 1997).

Zosterisessor ophiocephalus raggiunge generalmente la maturità sessuale e la massima grandezza corporea tra il secondo ed il terzo anno di vita (Gandolfi, 1991). Uno studio (Franco et al., 2012) ha però verificato come, nella Laguna di Venezia, la maturità sessuale venga raggiunta in età significativamente precedenti (talvolta addirittura prima della fine del primo anno di vita), probabilmente a causa di fattori esogeni come la pesca intensiva che determina una pressione selettiva che tende a sfavorire gli individui più grandi, a favore di quelli con dimensioni minori. In altre aree nelle quali la specie è presente e nelle quali la maturità sessuale è effettivamente raggiunta tra i 2 e i 3 anni, l'intensità delle attività di pesca risulta inferiore (Dolgi, 1962). Dato il raggiungimento della maturazione sessuale a circa un anno di vita e l'età massima raggiunta pari a circa cinque anni, il tempo di generazione

di *Z. ophiocephalus* nella Laguna di Venezia può essere approssimato a circa tre anni.

Essendo un organismo tipicamente sedentario e demersale, è largamente esposto alle contaminazioni presenti nel suo habitat attraverso il sistema respiratorio, l'apparato digerente e attraverso la cute. Il suo comportamento di sotterrarsi nel substrato lo pone inoltre a stretto contatto con l'area a maggior concentrazione di metalli pesanti e altri contaminanti (Pauletto et al., 2019). Per questo motivo *Z. ophiocephalus* è utilizzato come bioindicatore per il monitoraggio della Laguna di Venezia. In particolare, il pathway molecolare AHR-CYP1A, comprendente il gene del **recettore degli idrocarburi arilici** che svolge un ruolo cruciale nell'espressione del **Citocromo p450 1A**, il più importante enzima di regolazione del metabolismo degli xenobiotici, è stato individuato come un adeguato bioindicatore di qualità di *Z. ophiocephalus*. La trascrizione di CYP1A è inducibile da un altissimo numero di ligandi, tra i quali compaiono i POP (Persistent Organic Pollutants) e la sua misurazione può essere effettuata attraverso la quantificazione dell'RNA messaggero, della proteina o del livello di attività catalitica (Pauletto et al., 2019). La misurazione dell'espressione dell'enzima può quindi fornire informazioni importanti riguardo le concentrazioni di POP nell'ambiente in cui l'animale vive.

Dal punto di vista socioeconomico, *Z. ophiocephalus* rappresenta una risorsa ittica importante all'interno della Laguna di Venezia. Il suo sfruttamento commerciale esiste sin dal XII secolo (Ninni, 1941) e, alla fine degli anni '90, il gò costituiva circa l'11% della totalità del pescato all'interno della Laguna (Silvestri et al., 2006). Nonostante sia generalmente considerato di poco valore, principalmente a causa dei lunghi tempi necessari alla sua preparazione a causa della lisca ricca di spine, le sue carni sono apprezzate e parte integrante della cultura gastronomica dei pescatori della Laguna. La pesca avviene con il cosiddetto metodo "a braccio" nel periodo invernale, durante il quale il pesce è rifugiato nella sua profonda tana: questa tecnica consiste, durante la bassa marea, nello spingere il braccio nell'apertura del rifugio fino a raggiungere la camera nella quale il pesce risiede. Nel resto dell'anno vengono usate trappole (cogoleti da velma, Figura 4) o piccole nasse (Figura 5).

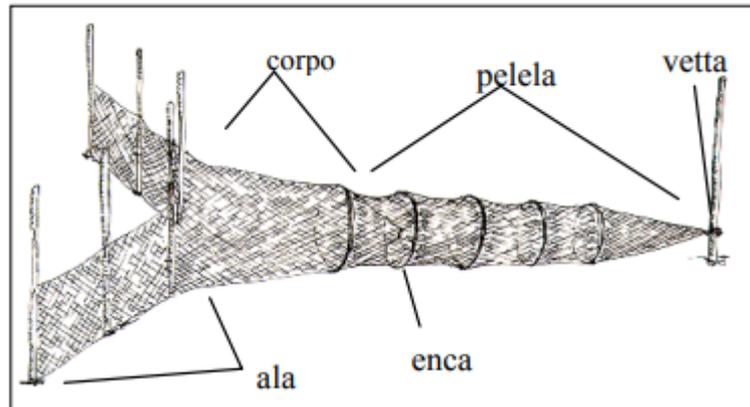


Figura 4: Rappresentazione di un cogoletto, chiamato anche bertovello o bertuello, strumento fisso utilizzato per la pesca del gò (Amministrazione della Provincia di Venezia, 1981). È costituito da una rete esterna a forma di cono mantenuta distesa da più anelli di legno o di ferro via via più piccoli. Nell'interno della rete principale sono posizionate altre reti di forma conica incastrate l'una sull'altra di modo che il vertice di ciascuna si insinui nella bocca della successiva per rendere impossibile al pesce di liberarsi.

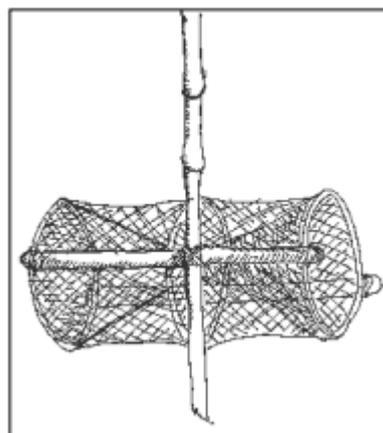


Figura 5: Rappresentazione di una nassa, strumento utilizzato per la pesca del gò (Amministrazione della Provincia di Venezia, 1981). È costituita da una rete con un imbuto all'estremità al termine del quale viene posizionata un'esca. Il pesce, nell'entrare nell'imbuto, forza le maglie posizionate sulla bocca della strozzatura che gli impediscono di lasciare la trappola.

1.2 La Laguna e i sistemi lagunari nel Mare Adriatico

Si definisce laguna un bacino d'acqua continentale separato dal mare da una barriera di terra e collegato ad esso da uno o più canali (Kjerfve, 1994). Le lagune

fanno parte dei cosiddetti ambienti di transizione, sistemi a metà tra l'ambiente marino e quello dulciacquicolo continentale (Basset et al., 2013), occupano circa il 13% delle regioni costiere del mondo e si sono originate dagli innalzamenti del livello delle acque marine avvenuti nel Pleistocene o nell'Olocene, che hanno determinato l'invasione di regioni pianeggianti in prossimità della costa da parte dell'acqua, e dalla costituzione di barriere costiere da parte dei processi marini (Kjerfve, 1994). In virtù di queste caratteristiche di transizione, le lagune sono caratterizzate da forti variazioni spaziali e temporali delle caratteristiche fisicochimiche e dei pattern di produttività (Pusceddu et al., 2007). Gli ambienti lagunari rappresentano alcuni tra i più preziosi ecosistemi del pianeta con rilevanza cruciale a livello ecologico, storico, economico e sociale (Pérez-Ruzafa et al., 2011; Wolanski & Elliott, 2015); la loro fragile ecologia e il loro ambiente estremamente variabile comportano grandi difficoltà nella loro gestione e nella loro conservazione (Basset et al., 2013), in particolare a causa dell'intensa attività antropica che viene esercitata su questi ambienti che può modificarne lo stato trofico e influire sulla salute dell'intero ecosistema (Cucco & Umgiesser, 2006).

Fattore importante per determinare la suscettibilità di un sistema lagunare all'effetto antropico è la capacità di una laguna di ricambiare le proprie acque con conseguente rimozione delle contaminazioni alle quali è soggetta; il tempo che una particella presente nella laguna impiega a raggiungere il mare, detto tempo di residenza, può dare un'idea del livello di efficienza del processo fisico di pulizia dell'ecosistema ed è di grande importanza per la gestione dello stesso (Baleo et al., 2001).

La complessa morfologia dei sistemi lagunari è dovuta all'equilibrio e alla relazione tra l'apporto di sedimenti dal mare o dai fiumi e l'erosione da parte delle maree o delle correnti. La perdita di questo equilibrio può compromettere la permanenza delle lagune come ambienti di transizione in quanto verrebbero trasformate in paludi se l'apporto di sedimenti continentali diventasse eccessivo, o verrebbero strappate alla terra se l'erosione fosse tanto intensa da interrompere definitivamente l'isolamento dal mare. Un altro fattore rilevante che col passare del tempo potrebbe minacciare in modo importante la conservazione di questi fragili ecosistemi è l'innalzamento del livello del mare, come documentato in diversi siti in tutto il mondo e con la Laguna di Venezia, in particolare, a costituire un valido esempio (Kearney

et al., 1988; Reed & Brown, 1995; Day et al., 1999; Hartig et al., 2002; van der Wal & Pye, 2004; Baily & Pearson, 2007; Ravens et al., 2009).

A causa dei cambiamenti spaziali e temporali a cui sono costantemente soggette, le lagune sono caratterizzate da una grande eterogeneità ambientale (Elliott & Hemmingway, 2002) in cui è possibile trovare una grande varietà di habitat diversi come praterie di posidonia, aree sabbiose, piane di marea, reef di ostriche e fondali fangosi (Franco et al., 2006). Le praterie di posidonia sono aree colonizzate da *Posidonia oceanica*, una delle *key species* del bacino mediterraneo avente ruolo cruciale a livello ecologico, geologico ed economico (Bell & Harmelin-Vivien, 1983; Jeudy de Grissac & Boudouresque, 1985; Gambi et al., 1989; Romero et al., 1992; Duarte, 1999; Duarte, 2002); le piane di marea sono ambienti sedimentari regolarmente soggetti agli effetti delle maree (Reise, 2012). In generale, l'ecosistema lagunare è pertanto in grado di supportare un livello importante di biodiversità grazie ai suoi diversi ecotoni, ambienti di transizione tra due ecosistemi, che mettono in contatto ambienti salini e ambienti di acqua dolce o ambienti terrestri e ambienti acquatici, oltre che per gli habitat specifici costituiti da particolari specie come, appunto, le fanerogame (De Wit, 2011).

Nel Mare Adriatico sono presenti diversi sistemi lagunari che ne interessano principalmente la porzione settentrionale, questi sono: la Laguna di Marano-Grado; il sistema lagunare del delta del Po comprendente la sacca di Goro e degli Scardovari e la Laguna di Venezia.

La Laguna di Marano-Grado ha un'area di circa 160 km² (Ferrarin et al., 2017), è compresa tra le foci dei fiumi Isonzo e Tagliamento ed è separata dall'Adriatico da una serie di isole che fanno da barriera costituendo sei collegamenti totali con il mare (Fontolan et al., 2012). Le sacche di Goro e degli Scardovari fanno parte del sistema del delta del Po che ha un'area complessiva di circa 106 km² (Ferrarin et al., 2017).

La Laguna di Venezia è il sistema lagunare più grande di tutto il Mar Mediterraneo (Malavasi et al., 2005) con un'ampiezza complessiva di circa 480 km² (Ferrarin et al., 2017) ed una profondità media di 1.5 m, che può arrivare ad un massimo di 20 m nelle zone più profonde (Umgiesser, 1997). È in comunicazione con il Mare Adriatico attraverso tre diverse bocche di porto, da nord a sud: Lido, Malamocco e Chioggia. Queste sono larghe tra i 500 e i 1000 metri e profonde fino a 20 metri

(Umgiesser, 1997). La maggior parte dell'area della Laguna è occupata da un ampio corpo acquatico centrale (circa 400 km²; Day et al., 1998) nel quale le tre principali specie di fanerogame presenti, *Cymodocea nodosa*, *Zostera marina* e *Zostera noltei* formano diverse categorie di praterie in termini di densità di individui, altezza e dimensioni delle foglie (Sfriso & Ghetti, 1998).

La Laguna scambia circa il 60% delle sue acque ad ogni ciclo di marea (c. 12h) e riceve scarichi fognari da tre principali centri: Venezia, Mestre e il porto di Marghera (Pusceddu et al., 2007). Dato soprattutto l'importante interesse turistico legato alla città di Venezia e alle numerose località di balneazione, rappresenta un esempio emblematico di un'area che ha subito un severo deterioramento morfologico a causa dell'attività umana nell'ultimo secolo (Favero, 1992; Day et al., 1998; Ravera, 2000; Pillon et al., 2003; Sfriso et al., 2005; Molinaroli et al., 2009; Sarretta et al., 2010). La diminuzione dell'apporto di sedimento oltre che lo sfruttamento delle zone costiere è risultato in una semplificazione della sua morfologia, nell'appiattimento e nell'aumento della profondità del fondale e in un'importante diminuzione (50% tra il 1927 e il 2002) delle zone paludose salmastre (Sarretta et al., 2010).

1.3 Variazione genetica in popolazioni di organismi marini e lagunari

Lo studio della struttura di popolazione, e in particolare l'analisi della divergenza genetica a livello temporale, ha grande importanza nell'ambito della genetica di conservazione e della filogeografia, in quanto può indicare l'occorrenza di crisi demografiche, eventi di colli di bottiglia e fornire stime di cambiamenti nella grandezza effettiva di popolazione (Richards & Leberg, 1996). Questo approccio risulta particolarmente interessante nell'ambito della Laguna di Venezia in relazione alle popolazioni di organismi che presentano uno stadio larvale pelagico, come *Z. ophiocephalus*, le cui larve si disperdono in tutto il Mare Adriatico settentrionale prima di venire 'reclutate' in una nuova popolazione.

Gli organismi marini sono generalmente caratterizzati da una grande abbondanza e un'elevata fecondità (Hedgecock & Pudovkin, 2011). Gli adulti sono in grado di produrre grandi quantità di piccole uova che si schiudono rapidamente e danno vita

a stadi larvali con scarsa capacità di nuoto attivo, soggetti al fenomeno della dispersione e ad alti tassi di mortalità (Cushing, 1990). Il fenomeno della dispersione, al quale le larve sono soggette, consente alla specie di diffondersi e agli individui di popolazioni diverse di migrare e di mescolarsi, riducendo il rischio di perdita di variabilità genetica (Malakoff, 1997). In generale, per specie marine, diversi studi hanno confermato la presenza di popolazioni poco strutturate e interessate da flussi genici importanti (Ward et al., 1994; Waples, 1998; DeWoody & Avise, 2000), suggerendo l'esistenza, in particolare per ambienti circoscritti o poco estesi come il Mar Adriatico e le sue lagune, di grandi popolazioni panmittiche (Palumbi, 1992, 2003), cioè geneticamente omogenee. Al contempo, tuttavia, divergenze genetiche piccole, ma significative, tra popolazioni sono state dimostrate a livello spazio-temporale per diverse specie marine (Ruzzante et al. 1999; Nielsen et al. 2003; Bekkevold et al. 2005; Jørgensen et al. 2005; Ruzzante et al. 2006; Marino et al., 2010). La presenza di eterogeneità genetica tra popolazioni di organismi marini caratterizzati da stadi larvali soggetti a dispersione, definita per la prima volta nel 1982 da Johnson & Black con il nome di *Chaotic genetic patchiness*, può essere spiegata in vari modi:

in primo luogo, è stato suggerito come l'eterogeneità ambientale possa favorire genotipi diversi in diversi microhabitat e, pertanto, determinare un differenziale di sopravvivenza della prole (Levins, 1968; Gillespie & Langley, 1974; Hedrick et al., 1976). Uno degli esempi più rilevanti è quello relativo alle divergenze delle frequenze alleliche a livello geografico delle popolazioni del mitilo *Mytilus edulis* le quali, nonostante la specie presenti uno stadio larvale soggetto a dispersione, risultano geneticamente distinte a causa della mortalità differenziale delle larve influenzata dal gradiente di salinità del loro habitat (Koehn et al., 1982). Data la dipendenza del reclutamento larvale dalle correnti e dalle maree, un'altra possibile spiegazione per la presenza di divergenze genetiche è legata alla diversa provenienza di successive generazioni di larve, processo che risulta nell'eterogeneità su piccola scala delle popolazioni di adulti (Johnson & Black, 1984). Questa ipotesi, detta *variable sources hypothesis* (Selkoe et al., 2006) è supportata da diversi studi su diversi organismi in numerosi contesti ecologici, tra i quali ambienti lagunari ed estuarini (Planes & Lenfant, 2002; Bowen et al., 2006; Maes et al., 2006; Hauser & Carvalho, 2008). Una terza spiegazione è attribuibile a fenomeni quali il *natal*

homing, cioè il ritorno degli organismi al luogo di nascita (Thorrold et al., 2001) e l'auto-reclutamento delle larve (Jones et al., 1999; Swearer et al., 1999; Cowen et al., 2006; Ruzzante et al., 2006). Questi fenomeni, influenzati principalmente dal comportamento e dalla motilità delle larve (Sponaugle et al., 2002), possono determinare un accumulo di divergenze a livello di frequenze alleliche in particolari popolazioni rispetto ad altre che invece non li prevedono. In uno studio effettuato da Eldon et al. (2016), è stata proposta un'ulteriore ipotesi denominata *collective dispersal*. Con questa ipotesi si definisce la condizione per cui, in qualsiasi processo di dispersione, due migranti appartenenti alla stessa popolazione siano imparentati con maggiore probabilità di quanto lo sarebbero per risultato del caso (Yearsley et al. 2013). Il *collective dispersal* può essere dovuto a strategie di dispersione peculiari di particolari specie o essere conseguenza di vincoli imposti dall'ambiente circostante che determinano la dispersione in gruppi degli individui (Siegel et al., 2008). Questo fenomeno può determinare una *chaotic genetic patchiness* in quanto il flusso genico risulta meno efficace nel rimescolare la diversità genetica di differenti popolazioni (Eldon et al., 2016).

Infine, secondo l'ipotesi dello *Sweepstakes reproductive success*, fenomeno inizialmente descritto da Hedgecock (1994), la presenza di numerose variabili ecologiche ed oceanografiche che condizionano il successo della fecondazione, la crescita e la sopravvivenza dello stadio larvale e il reclutamento degli individui nelle popolazioni adulte, rende la sopravvivenza di questi organismi una vera e propria 'lotteria', un processo cioè con molti perdenti e pochi vincitori (Hedgecock & Pudovkin, 2011). Questo fenomeno può pertanto risultare in eventi locali di deriva genetica, in quanto solo una minima proporzione degli organismi raggiunge la fase adulta (Planes & Lenfant, 2002) con conseguente riduzione della variabilità genetica (Vendrami et al., 2021). Il fenomeno della *chaotic genetic patchiness* è quindi generalmente causato da fenomeni che prevedono due condizioni principali, ovvero che l'effetto della deriva genetica risulti sufficientemente forte da determinare differenze nelle diverse coorti di larve e che il processo di dispersione non provveda in maniera efficiente all'omogeneizzazione della variabilità genetica (Eldon et al., 2016).

In sintesi, lo studio delle differenze genetiche geografiche e temporali è di grande importanza per comprendere la struttura di popolazione degli organismi marini e

lagunari e la loro eventuale suscettibilità ai cambiamenti ambientali o ecologici; questo aspetto è importante in particolare per quegli organismi che, disperdendo attraverso uno stadio larvale pelagico, vedono la struttura genetica delle popolazioni adulte influenzata dalle caratteristiche del reclutamento larvale (Johnson & Wernham, 1999).

2. SCOPO DELLA TESI

In questo lavoro di tesi è stata studiata la struttura genetica di diverse popolazioni del gobide *Z. ophiocephalus* nelle lagune del Mar Adriatico settentrionale attraverso l'uso di marcatori microsatellite. Il campionamento ha interessato le lagune di Marano, Goro e Venezia, ma il focus è stato principalmente mirato a quest'ultima dalla quale proveniva il maggior numero di campioni. È stata studiata per ogni popolazione la variabilità genetica e sono state effettuate analisi della variazione genetica a livello temporale tramite il confronto di dati relativi a campionamenti recenti, effettuati negli anni 2019, 2020 e 2021, con dati relativi a campionamenti risalenti agli anni 2001 e 2002. Durante il periodo di internato di tirocinio, è stato estratto il DNA da 251 individui di *Z. ophiocephalus* e per ciascuno sono stati amplificati e genotipizzati 10 loci microsatellite. Una volta ottenuti, i dati sono stati integrati ai risultati ottenuti da lavori di tesi precedenti. Complessivamente l'analisi ha compreso 1564 campioni, ciascuno genotipizzato per 10 loci microsatellite. Per ciascuna popolazione è stata verificata la presenza di eterogeneità genetica, quantificata la variazione dovuta a cambiamenti temporali, comparato il diverso grado di parentela tra gli individui di popolazioni provenienti da anni differenti ed è stata stimata la dimensione effettiva di popolazione.

L'obiettivo finale è quello di caratterizzare le popolazioni di questa specie dal punto di vista genetico e di identificare i cambiamenti a cui queste sono soggette anche in relazione ai futuri cambiamenti degli scambi tra mare e lagune in particolare nella Laguna di Venezia.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Nel presente studio sono stati analizzati esemplari di *Zosterisessor ophiocephalus* ottenuti da diversi siti di campionamento, in diversi periodi dell'anno e in anni diversi per un totale di 1568 campioni (Tabella 1). Di questi, 1472 individui sono stati raccolti negli anni 2019, 2020 e 2021, all'interno del progetto Venezia 2021 (<http://www.corila.it/it/Venezia2021>), nelle lagune di Venezia, Marano, Goro e Ferrara (Figura 6), mentre i rimanenti 96 campioni sono stati campionati negli anni 2001 e 2002 nella sola Laguna di Venezia e risalgono ad uno studio precedente (Gallini, 2003). Questi ultimi sono stati ri-estratti, analizzati ed integrati nella ricerca al fine di effettuare un confronto temporale su campioni di popolazioni raccolti in un intervallo di tempo di circa vent'anni.

I campionamenti in Laguna di Venezia del periodo 2019-2021 sono stati effettuati in aree diverse sia dal punto di vista geografico (per poter individuare le differenze genetiche legate alla diversa distribuzione delle popolazioni) che dal punto di vista ecologico (con aree più interne alla laguna e altre più esterne, prossime all'ambiente marino). Nello specifico, il campionamento ha interessato i 3 bacini in cui è suddivisa la Laguna di Venezia e, per ciascuna di questi, sono stati effettuati due campionamenti, il primo più internamente, il secondo più prossimo allo sbocco sul mare (Figura 6). Più precisamente, LN5 e LN6 indicano i siti di campionamento localizzati nella regione della Laguna settentrionale, localizzati internamente rispetto alla città di Venezia (LN5) e nei pressi della bocca di porto di san Nicolò (LN6); LC3 e LC4 rispettivamente, indicano invece i siti di campionamento della Laguna centrale, comprendente l'area a sud della città, e la bocca di porto di Malamocco; infine, LS1 e LS2 definiscono i siti di campionamento localizzati nella regione meridionale della Laguna (LS1) e nell'area della bocca di porto di Chioggia (LS2).

Per studiare le possibilità di differenziamento genetico tra la Laguna di Venezia e le regioni circostanti sono inoltre stati effettuati dei campionamenti esterni ad essa, in particolare a nord nella Laguna di Marano (MA), rappresentata nel

campionamento in ognuno dei 3 anni, e a sud nella Sacca di Goro (GO) campionata nel 2020 e nel 2021 o nella vicina Sacca degli Scardovari (FE), campionata nel 2019.

I campioni degli anni 2001 e 2002 provengono da diverse aree della Laguna di Venezia e sono stati nominati in relazione ai siti di campionamento: Lido (LI); Marghera (MG); Lago dei Teneri (LT); Cà Zane (CZ) e Chioggia (CH).

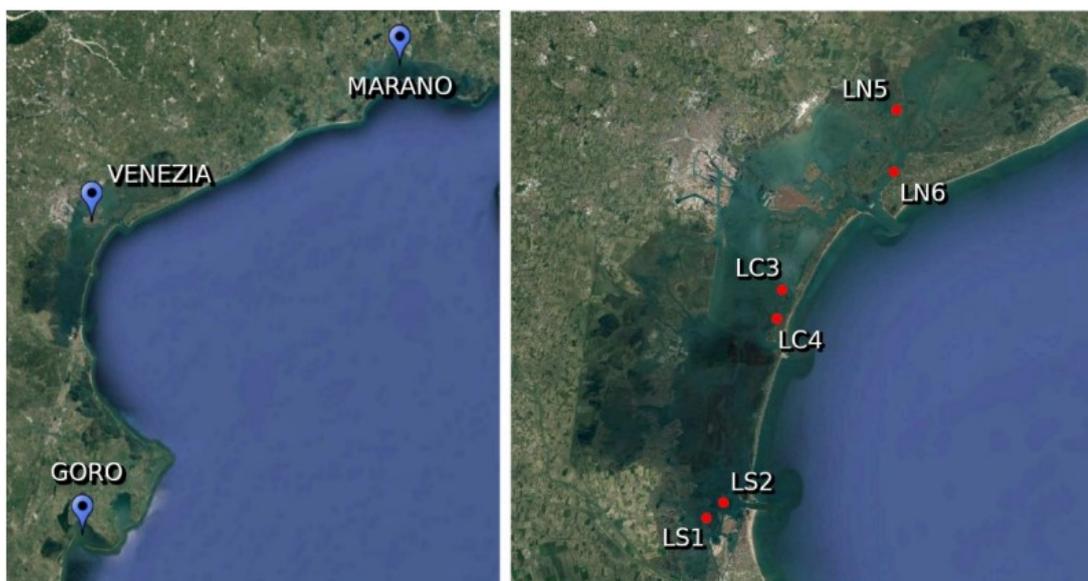


Figura 6. Il pannello di sinistra mostra la posizione geografica delle tre lagune oggetto di studio, da nord a sud: Marano, Venezia e Goro. Il pannello di destra mostra la posizione approssimativa delle aree di campionamento all'interno della Laguna di Venezia.

Fonte: <https://www.google.it/maps/@45.3668554,12.466449,126578m/data=!3m1!1e3>

Tabella 1: Sono riportati, per ogni campionamento, i dati relativi all'anno in cui è stato effettuato, la stagione e il numero totale di individui. Gli ultimi 7 siti, separati dagli altri da una riga bianca, riportano le informazioni relative ai campioni provenienti dagli anni 2001 e 2002 ricavati da uno studio precedente (Gallini, 2003).

Sito di campionamento	Sigla	Anno	Stagione	N° Individui
Laguna di Marano	ZO.19p.MA	2019	<i>primavera</i>	50
	ZO.19a.MA		<i>autunno</i>	50
	ZO.20p.MA	2020	<i>primavera</i>	50
	ZO.20a.MA		<i>autunno</i>	51
	ZO.21p.MA	2021	<i>primavera</i>	49

	ZO.21a.MA		<i>autunno</i>	50
Laguna di Venezia nord: Cà Zane	ZO.19p.LN5	2019	<i>primavera</i>	14
	ZO.20a.LN5	2020	<i>autunno</i>	9
	ZO.21p.LN5	2021	<i>primavera</i>	48
	ZO.21a.LN5		<i>autunno</i>	20
Laguna di Venezia nord: Bocca di Porto	ZO.19p.LN6	2019	<i>primavera</i>	50
	ZO.19a.LN6		<i>autunno</i>	11
	ZO.20p.LN6	2020	<i>primavera</i>	30
	ZO.20a.LN6		<i>autunno</i>	22
	ZO.21p.LN6	2021	<i>primavera</i>	18
	ZO.21a.LN6		<i>autunno</i>	24
Laguna di Venezia centrale: Poveglia	ZO.19p.LC3	2019	<i>primavera</i>	43
	ZO.19a.LC3		<i>autunno</i>	45
	ZO.20p.LC3	2020	<i>primavera</i>	25
	ZO.20a.LC3		<i>autunno</i>	37
	ZO.21p.LC3	2021	<i>primavera</i>	50
	ZO.21a.LC3		<i>autunno</i>	10
Laguna di Venezia centrale: Malamocco	ZO.19p.LC4	2019	<i>primavera</i>	10
	ZO.20p.LC4	2020	<i>primavera</i>	43
	ZO.20a.LC4		<i>autunno</i>	48
	ZO.21p.LC4	2021	<i>primavera</i>	39
	ZO.21a.LC4		<i>autunno</i>	40
Laguna di Venezia sud: Motta bombae	ZO.19p.LS1	2019	<i>primavera</i>	28
	ZO.19a.LS1		<i>autunno</i>	21
	ZO.20a.LS1	2020	<i>autunno</i>	51
	ZO.21a.LS1	2021	<i>autunno</i>	46
Laguna di Venezia sud: Baia dei Porci	ZO.19p.LS2	2019	<i>primavera</i>	28
	ZO.19a.LS2		<i>autunno</i>	49
	ZO.20p.LS2	2020	<i>primavera</i>	69
	ZO.21p.LS2	2021	<i>primavera</i>	46
	ZO.21a.LS2		<i>autunno</i>	12
Sacca degli Scardovari	ZO.19p.FE	2019	<i>primavera</i>	43
Sacca di Goro	ZO.20p.GO	2020	<i>primavera</i>	49
	ZO.20a.GO		<i>autunno</i>	45
	ZO.21aGO	2021	<i>autunno</i>	49

Laguna di Venezia: Lido	ZO.2001.LD	2001		21
	ZO.2002.LD	2002		10
Laguna di Venezia: Lago dei Teneri	ZO.2001.LT	2001		16
	ZO.2002.LT	2002		10
Laguna di Venezia: Chioggia	ZO.2002.CH	2002		13
Laguna di Venezia: Ca' Zane	ZO.2002.CZ	2002		13
Laguna di Venezia: Marghera	ZO.2002.MG	2002		13
Totale campioni:				1568

3.2 Estrazione del DNA

Nel periodo di internato, è stata effettuata l'estrazione e l'amplificazione del DNA di 251 individui di *Z. ophiocephalus*. L'estrazione è stata eseguita utilizzando il metodo *Salting out* (Patwary et al., 1994). Il protocollo ha previsto la lisi delle cellule di una piccola quantità di tessuto muscolare (circa 25 mg) mediante un tampone di lisi cellulare ed il trattamento con proteinasi K, quindi la separazione degli acidi nucleici dalle proteine e altre molecole contaminanti, tramite l'aggiunta di sali ad alte concentrazioni (da qui il nome del metodo *Salting out*).

Le proteine in acqua pura sono poco solubili, ma la loro solubilità aumenta all'aumentare della concentrazione ionica nella soluzione fino a raggiungere un picco massimo di solubilità. Superato il picco, e continuando ad aumentare la concentrazione salina, la solubilità delle proteine ricomincia a calare, fino a raggiungere una soglia che ne determina la precipitazione. Il metodo sfrutta questo processo per rimuoverle dalla soluzione. Infine, attraverso il trattamento con isopropanolo ed etanolo, si ottiene l'isolamento e la precipitazione del DNA (Nasiri et al., 2005).

Una porzione di tessuto è stata prelevata da ciascun campione da analizzare mediante l'uso di bisturi e pinzette sterili, quindi, con l'aiuto di carta assorbente, è stato rimosso l'etanolo in eccesso.

Ad ogni provetta è stata aggiunta una mix di reagenti composta da 300 µl di tampone di lisi (EDTA 0.1 M, TRIS 0.05 M, pH 8); 37.5 µl di SDS 10% e 12 µl di proteinasi K (20mg/ml).

L'SDS è un detergente che disgrega le componenti lipidiche del tessuto e denatura le proteine mentre la proteinasi è un enzima che provoca la lisi delle molecole proteiche.

Le provette contenenti il tessuto e il tampone di lisi sono state miscelate tramite un *vortex* e incubate a 56°C in un termoblocco (ThermoMixer F2.0, Eppendorf®) dotato di agitazione impostata a 550 rpm fino alla lisi completa dei tessuti. Ogni 30 minuti di incubazione il processo è stato interrotto e i campioni risospesi tramite *vortex* per facilitare la lisi. In generale il processo impiegava un'ora di tempo, fino ad un massimo di tre ore.

Una volta terminata la lisi, in ciascuna provetta sono stati aggiunti 90 µl di soluzione salina satura (NaCl > 6 M) e messo in agitazione per circa 15 minuti al fine di promuovere la precipitazione delle proteine. La provetta è quindi posta in centrifuga (modello 5424 R, Eppendorf®) a 4 °C per 30 minuti alla massima velocità di 14000 rpm. Questo procedimento determina l'accumulo delle proteine e delle altre molecole precipitate in un pellet sul fondo della provetta. Il surnatante contenente il DNA è stato prelevato e trasferito in una nuova provetta da 1.5 ml nella quale erano stati precedentemente aggiunti 450 µl di isopropanolo freddo. La provetta è stata quindi nuovamente centrifugata a 4°C per 20 minuti. L'isopropanolo permette l'isolamento e la compattazione del DNA che precipita durante la centrifugazione.

Una volta terminata la centrifugazione, il surnatante è stato eliminato e nella provetta sono stati aggiunti 500 µl di etanolo al 70%. Il campione è stato posto in centrifuga a temperatura ambiente per 5 minuti per eliminare i residui contaminanti rimasti nella provetta dalle fasi precedenti. Successivamente è stato eliminato l'etanolo e la provetta posta con il tappo aperto nel termoblocco a 37°C per favorire l'evaporazione degli eventuali residui di etanolo.

Infine, il DNA è stato risospeso in 100 µl di acqua sterile e conservato a -20°C. È stata effettuata una verifica qualitativa dell'estrazione mediante un'elettroforesi su

gel di agarosio all'1% in buffer TBE 1X, utilizzando come intercalante GelRed (Biotium®).

I campioni sono stati inoltre quantificati con uno spettrofotometro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™), che permette di quantificare il DNA estratto mediante la misurazione della luce ultravioletta assorbita dal campione. Le informazioni ottenute in questo passaggio sono risultate importanti in quanto hanno permesso di comprendere, per ciascun singolo campione, il rapporto di diluizione più efficace per assicurare la migliore resa nel successivo processo di amplificazione.

Le lunghezze d'onda indagate sono l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm, rispettivamente informative del picco di assorbimento delle basi azotate dei nucleotidi e della quantità di proteine e fenoli presenti nel campione e l'assorbanza a 230 nm che fornisce informazioni sul grado di contaminazione del campione da parte di carboidrati, fenoli e composti aromatici.

Il rapporto A260/280 restituisce il grado di purezza del DNA: se il rapporto risulta compreso tra 1.6 e 1.8 allora il DNA ha una purezza ottimale, se risulta minore il campione risulta contaminato da un eccesso di proteine o altre molecole non nucleiche mentre se risulta maggiore nel campione sono presenti alte concentrazioni di RNA.

Anche il rapporto A260/A230 dà un'informazione qualitativa del campione ed è ottimale se pari a 2.2.

3.3 Microsatelliti

In questo elaborato di tesi sono stati utilizzati i microsatelliti come marcatori molecolari. I microsatelliti sono composti da brevi sequenze da 1 a 6 paia di basi ripetute in tandem (Schlötterer, 2004). Sono marcatori codominanti, altamente polimorfici, molto abbondanti e distribuiti in maniera omogenea nell'eucromatina, la porzione della cromatina composta da DNA attivamente soggetto alla trascrizione (Pérez-Jiménez et al., 2013; Phumichai et al., 2015). Queste caratteristiche, accoppiate alla facilità del loro utilizzo grazie a tecniche di amplificazione come la PCR, hanno reso i microsatelliti i marcatori genetici più comuni in diversi ambiti della genetica, quali lo studio della struttura di popolazioni, il mapping genetico e lo studio dei

processi evolutivi oltre che per la genetica forense e analisi di parentela (Vieira, 2016).

Il numero variabile di ripetizioni del motivo principale, detto modulo, che costituisce i microsatelliti, è causato da errori dovuti principalmente allo slittamento della DNA polimerasi in relazione al DNA stampo e al suo scorretto riallineamento (Levinson & Gutman 1987; Ellegren, 2004). Studi quantitativi hanno dimostrato come il tasso di slittamento della polimerasi aumenti con il numero di *repeat* e come al contrario sia inversamente proporzionale alla lunghezza del modulo (Shinde et al., 2003; Ellegren, 2004)

I principali studi riguardo al tasso di mutazione dei microsatelliti sono stati effettuati sull'uomo (Rubinsztein et al., 1995), su *Mus musculus* (Makova et al., 2000), e su *Drosophila melanogaster* (Schlotterer et al., 1998), nei quali il tasso di mutazione variava tra 10^{-2} e 10^{-6} . Nel caso dei pesci, il tasso medio di mutazione dei microsatelliti in *Danio rerio* è stato stimato a 1.5×10^{-4} (Shimoda et al., 1999). Come conseguenza di questo elevato tasso di mutazione, i microsatelliti sono presenti in minore quantità nelle regioni codificanti in quanto potrebbero facilmente compromettere l'espressione e la funzionalità dei geni (Vieira et al., 2016). Studi sull'argomento hanno verificato come nelle regioni codificanti geni vi sia una predominanza di microsatelliti con moduli composti da tre o sei nucleotidi, risultato della pressione selettiva contro le mutazioni che alterano la corretta lettura del genoma (Zhang et al., 2004; Xu et al., 2013). Alcuni studi hanno tuttavia provato come questi marcatori, compresi all'interno di una sequenza proteica, possano talvolta contribuire all'evoluzione della stessa (Huntley & Golding, 2000; Katti et al., 2000; Vieira et al., 2016).

Per poter isolare ed amplificare i microsatelliti è necessario conoscere le sequenze entro le quali sono localizzati in modo da poter progettare una coppia di *primer* (*forward* e *reverse*) da sfruttare come punto di partenza per la polimerasi per l'amplificazione della regione di interesse.

Le sequenze relative ai *primer* utilizzati in questa tesi per l'amplificazione dei loci microsatellite sono state ottenute dai risultati di uno studio precedente (Gallini et al., 2005) nel quale 18 loci erano stati isolati da due librerie genomiche di *Z. ophiocephalus* ricavate tramite il protocollo FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats, Zane et al., 2002). Dieci di questi 18 loci amplificati nello

studio (Gallini et al., 2005) (Tabella 2) sono stati utilizzati nel presente studio. Ciascun *primer forward* è stato marcato all'estremità 5' con un particolare fluoroforo, molecola in grado di emettere fluorescenza dopo aver assorbito fotoni, per il riconoscimento degli alleli nel successivo passaggio del *genotyping*.

Tabella 2: Loci microsatellite ricavati dai risultati di Gallini et al., 2005. Sono riportate le caratteristiche del *repeat*, la sequenza dei rispettivi *primer forward* e *reverse*, il range degli alleli in paia di basi e il marcatore fluorescente associato al *primer forward* di ciascuno dei loci microsatellite utilizzati.

Locus	Repeat	Sequenze dei primer	Range allelico	Fluoroforo
ZO++3	(GT)12	F: CTGAAATGACCGCGAGGAG R: TGGGATTGGGGCACAAAG	109– 125	6-FAM
ZO++46	(TG)11	F: CAGACCTAACACCCCGATCCC R: CAACGCACCCCAACATTCA	116– 124	VIC
ZO++37M13	(TGC)13	F: GCTTTGAAGAGCGTCCTCCA R: ACCTCTGGACGGGGTCAATG	183– 228	VIC
ZO++26M13	(AC)16	F:TACAGACATACCCTCGGTGT- CAT R: GGCTTACTGGTCCTCCACTCC	113– 143	NED
ZO++6M13	(AC)10	F:TTCACAGTTGAG- GAAAGTGGTTTA R: AAGTCACCAGCGAATGTCGTG	195– 201	NED
ZO++2M13	TCCTCT(TCC)4(TCT)6	F: CCCAGTGCATTTCCGAAC R: CTGGAGGAGCGCAGCAGT	108– 129	PET
ZO++44M13	(AC)13	F: GCCGATCGATAGCTCTGACT R: CCTAGATTTCCCTCCCCTGGT	192– 216	PET
ZOAC3	(TG)6 CG(TG)2 CG(TG)6	F: TGTTAGAGCGA- GAAATCTCCAG R: AATGTGTTTCAGTTGGCATCG	102– 122	6-FAM
ZO++16M13	(GT)11	F: ACTCCCCTTGGTTTCAAGCTAC R: AACGACTAGAGCCAACATGC	123– 158	VIC
ZO++32M13	(AC)18	F: GTACAATGGGGCAGTTCCTT R: TTCTAGCCCAGTCAGTAATGC	115- 133	NED

3.4 La PCR

I 10 loci microsatellite sono stati amplificati per ciascuno dei 251 campioni attraverso una PCR (*Polymerase Chain Reaction*), una tecnica in grado di amplificare in maniera esponenziale un singolo frammento di DNA dopo averlo isolato dal resto del materiale genetico. Il DNA è aggiunto in una mix contenente i seguenti reagenti oltre al buffer di reazione:

- Polimerasi termoresistente (per catalizzare la reazione di amplificazione)

- *d*NTPs (che verranno utilizzati nella reazione per costituire i frammenti neosintetizzati)
- Mg-Cl₂ (essenziale per l'attività enzimatica e per la stabilità dell'ibridazione del DNA)
- Primer *forward* e *reverse* (siti specifici nella sequenza nucleica entro i quali avviene la reazione)

La tecnica della PCR è contraddistinta da tre fasi ripetute per un numero variabile di cicli:

- **1: Denaturazione:** In questa prima fase la doppia elica del DNA si separa nei due filamenti singoli in seguito all'esposizione ad una temperatura elevata (generalmente 95°C).
- **2: Appaiamento dei *primer*:** Nella seconda fase, caratterizzata da una temperatura più bassa, avviene l'appaiamento dei *primer* con il filamento stampo a singola elica. La temperatura di *annealing* è di cruciale importanza nel determinare la qualità dell'appaiamento e dipende dalla concentrazione, dalla lunghezza e dalla composizione in basi dei *primer* (Dieffenbach et al., 1993).
- **3: Estensione:** In questa fase la temperatura sale fino a raggiungere i 72°C, temperatura ottimale per il funzionamento della Polimerasi che catalizza l'aggiunta del nucleotide corrispondente nel DNA stampo a partire dai *primer* appaiati.

Durante i primi cicli di PCR l'amplificazione della sequenza di interesse è esponenziale; man mano che si procede l'efficienza cala sempre più a causa della saturazione degli enzimi e della diminuzione della concentrazione dei *d*NTPs e degli altri reagenti (Kainz, 2000).

Per ottimizzare i tempi di lavoro in questo lavoro di tesi, i 10 loci microsatellite sono stati amplificati in multiplex, una tecnica che consente di amplificare contemporaneamente nella stessa PCR due o più sequenze con *primer* diversi (Chamberlain et al., 1988).

Per allestire la PCR in multiplex sono necessarie:

- Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) = contiene la HotStartTaq DNA polimerasi, *d*NTPs, buffer e MgCl₂, tutti i componenti della PCR ad eccezione dei *primer* e del DNA.
- Mix di *primer* = contiene i *primer forward* e *reverse* di tutti i loci microsatellite selezionati, ognuno dei quali ad una concentrazione di 2 µM.
- DNA da amplificare

- H₂O

Per ogni campione le quantità di reagenti utilizzate sono:

- 2 µl DNA (50 ng/µl)
- 5 µl *Multiplex PCR Master mix 1X (Qiagen)*
- 1 µl *Primer mix 0.2 µM*
- 2 µl H₂O

Per un volume finale di reazione di 10 µl.

I 10 loci sono stati suddivisi in 2 multiplex e amplificati tramite PCR utilizzando il termociclatore SimpliAmp™ (Applied Biosystems) con il profilo termico riportato in tabella 3.

Tabella 3: Profilo di amplificazione delle 2 multiplex. La reazione di amplificazione è stata effettuata tramite termociclatore SimpliAmp™ (Applied Biosystems).

	TEMPERATURA	TEMPO	
<i>Stage 1</i>	95°C	15 min	
<i>Stage 2</i>	94°C	0.30 min	30 cicli
	60°C	1.30 min	
	72°C	1 min	
<i>Stage 3</i>	60°C	0.30 min	

Una volta terminata la PCR, la qualità dell'amplificato è stata indagata tramite una corsa elettroforetica su gel agarosio all'1.8% in buffer TBE 1X utilizzando GelRed (Biotium®) come intercalante.

Per tutti i campioni per i quali la reazione di amplificazione non fosse avvenuta correttamente, o per quelli i cui loci risultassero indistinguibili o poco leggibili nel successivo processo di *scoring*, è stata effettuata un'ulteriore reazione di amplificazione mediante una PCR a singolo locus. Il protocollo di PCR utilizzato in questo contesto è denominato *touch down* e prevede una prima fase in cui vi è un abbassamento progressivo della temperatura di *annealing* per evitare la comparsa di prodotti aspecifici, seguita da una seconda fase in cui la temperatura di *annealing* viene mantenuta costante (Tabella 4). Questo metodo permette di aumentare la specificità della reazione in quanto l'elevata temperatura iniziale della fase di *annealing* favorisce l'appaiamento tra il primer e il filamento stampo (Korbie & Mattick, 2008).

Tabella 4: Profilo di amplificazione dei loci in singolo tramite PCR *touch down*. Ad ogni ciclo nella fase di *annealing*, la temperatura è diminuita di 0.5°C.

	TEMPERATURA	TEMPO	
<i>Stage 1</i>	94°C	3 min	
<i>Stage 2</i>	94°C	1 min	-0.5°C ad ogni ciclo, 10 cicli
	58°C	0.50 min	
	72°C	1 min	
<i>Stage 3</i>	94°C	0.40 min	30 cicli
	55°C	0.50 min	
	72°C	1 min	
	72°C	6 min	

La mix di reazione, in un volume finale di 10 µl, utilizzata per le amplificazioni a singolo locus è costituita da:

- 5.53 µl H₂O
- 1 µl Buffer 1X (Solis BioDyne)
- 0.6 µl MgCl₂ 1.5 mM (Solis BioDyne)
- 0.35 µl dNTPs 0.07 mM (Solis BioDyne)
- 0.2 µl *Taq* polimerasi 1U (Solis BioDyne)
- 0.16 µl Primer *Forward* 0.16 µM
- 0.16 µl Primer *Reverse* 0.16 µM
- 2 µl DNA (50 ng/µl)

L'avvenuta amplificazione dei campioni è stata verificata tramite elettroforesi su gel d'agarosio all'1.8%.

3.5 Genotyping

Il *genotyping* è il processo con cui i frammenti di DNA vengono sequenziati e permette di identificare tutti gli alleli presenti in un dato locus e la separazione per dimensione degli alleli stessi. Ciò permette quindi di determinare il genotipo di ciascun individuo analizzato.

I campioni sono stati diluiti in relazione alla concentrazione di DNA rilevata dall'intensità delle bande ottenute dalla corsa elettroforetica. Sono stati quindi sottoposti ad elettroforesi su capillare presso BMR Genomics di Padova (<https://www.bmr-genomics.it/>). Il dimensionamento dei singoli alleli avviene tramite il confronto con lo standard interno *LIZ 500*.

3.6 Scoring

I dati sono stati analizzati con il software *Peak Scanner v1.0* (Applied Biosystems), che permette di visualizzare graficamente gli alleli individuati attraverso un grafico avente in ascissa la dimensione espressa in paia di basi e in ordinata l'intensità della fluorescenza delle molecole fluorescenti, i fluorofori, legate ai *primer forward*. Grazie all'utilizzo di fluorofori di colori diversi applicati a *primer* diversi, più loci possono essere analizzati insieme e distinti. La dimensione dei picchi è stata determinata manualmente. Se in un determinato locus è presente un solo picco, allora l'individuo è omozigote per quel locus e la fluorescenza dei due alleli è identica (Figura 7); se ci sono due picchi distinti, allora l'individuo è eterozigote per quel locus (Figura 8). Se non è presente nessun picco nel range atteso, allora si è verificato un problema in una delle fasi precedenti e il campione va nuovamente amplificato.

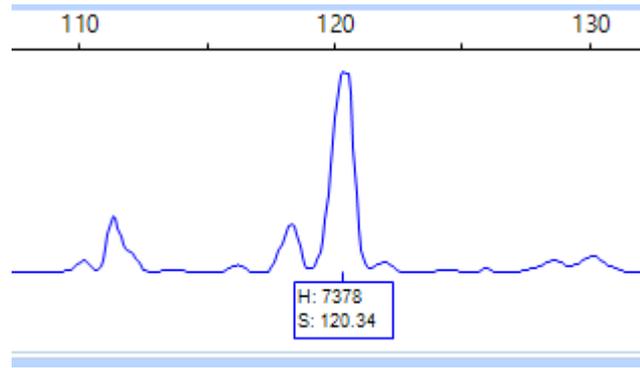


Figura 7: Esempio di visualizzazione grafica di individuo omozigote su PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems). Il primer forward del locus ZO++3 è marcato con il fluoroforo 6-FAM.

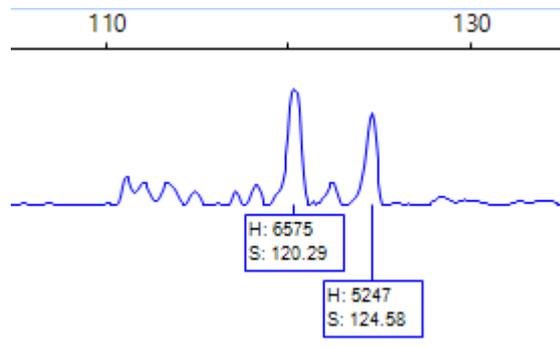


Figura 8: Esempio di visualizzazione grafica di individuo eterozigote su PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems). Il primer forward del locus ZO++3 è marcato con il fluoroforo 6-FAM.

Il processo di *scoring*, ovvero la selezione manuale del picco corrispondente alla fluorescenza dell'allele nei diversi loci in analisi, è stato effettuato da tre diversi operatori individualmente e i risultati sono stati confrontati; laddove risultassero delle discrepanze si è proceduto ad effettuare un ulteriore controllo su *Peak Scanner*.

Il processo di *scoring* può serbare delle difficoltà legate alle modalità con cui sono state organizzate le multiplex, al modo in cui i diversi fluorofori interagiscono tra loro o a causa di altri problemi relativi alle caratteristiche dei loci in esame. Tra le principali fonti di errore uno dei fenomeni più importanti è detto *stuttering*. Lo *stuttering* consiste nello slittamento della DNA polimerasi durante il processo di amplificazione che determina la formazione di picchi, i cosiddetti *stutter* (Figura 9), nell'intorno del vero picco dell'allele. L'interpretazione dell'allele corretto può quindi risultare difficile per loci prони a questo fenomeno che può portare a sotto-stimare gli alleli più piccoli; questi possono infatti venire facilmente scambiati per

stutter andando a compromettere i risultati delle analisi (Jones et al., 1997; van Oosterhout et al., 2004).

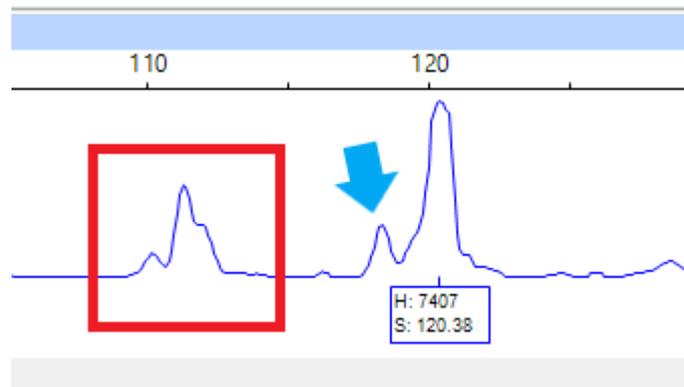


Figura 9: Esempio di *stutter* che può compromettere il processo di *scoring*. Il picco indicato dalla freccia blu, non rappresenta un vero allele rilevato dal sequenziatore, ma è il risultato del suddetto fenomeno. La discriminazione tra i picchi effettivamente legati agli alleli e gli artefatti dovuti a questi fenomeni è di cruciale importanza per l'efficacia del processo di *scoring*. Il picco racchiuso nel quadrato rosso è un aspecifico.

Un secondo fenomeno che complica il processo di *scoring* se non compreso appieno è quello del *large allele dropout* che si manifesta negli eterozigoti come una minore intensità o altezza dell'allele più grande rispetto all'allele più piccolo a causa dell'amplificazione preferenziale di quest'ultimo rispetto al primo (Figura 10) (Björklund, 2005). Questo fenomeno può portare a sovrastimare gli alleli più corti e sottostimare quelli più grandi (DeWoody et al., 2006).

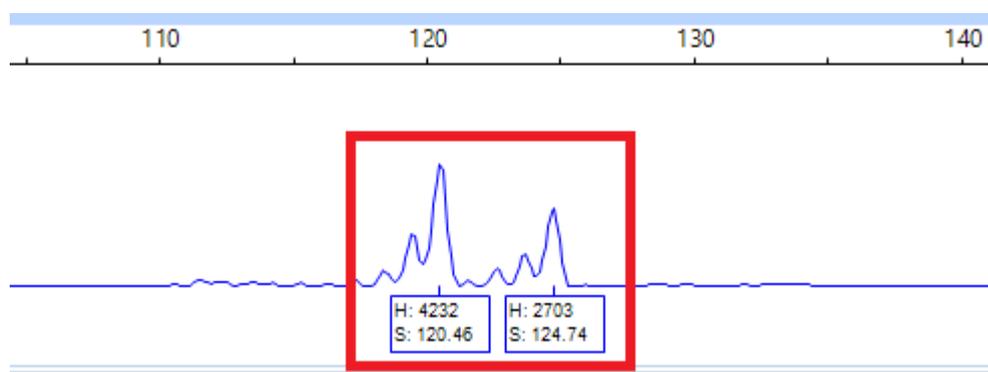


Figura 10: Esempio di *large allele dropout*. Nel riquadro rosso il picco relativo all'allele più grande (quello più a destra) risulta nel fluorogramma meno intenso di quello che lo precede.

3.7 Binning

Ottenuti i valori dello *scoring* per ogni campione è stato effettuato il processo di *binning* che permette di raggruppare in diverse classi i diversi alleli ottenuti utilizzando il software *FlexiBin V.2* (Amos et al, 2007). Gli alleli vengono partizionati in gruppi (*bins*) di uguale dimensione e convertiti da un valore di dimensione di frammenti di DNA ad un'unità discreta identificata da un numero intero come etichetta (Idury & Cardon, 1997).

3.8 Analisi dei dati

3.8.1 Equilibrio di Hardy-Weinberg

L'equilibrio di Hardy-Weinberg è un principio cardine della genetica di popolazione che descrive come, in popolazioni che presentino particolari caratteristiche, le frequenze alleliche e le conseguenti frequenze genotipiche rimangano invariate nel corso delle generazioni (Garnier-Géré & Chikhi, 2013).

Affinché una popolazione venga considerata ideale, questa deve soddisfare determinate caratteristiche: deve essere infinitamente grande in modo da poter considerare assente il fenomeno dell'*inbreeding* e della deriva genetica; deve essere chiusa, con assenza di fenomeni di migrazione (immigrazione ed emigrazione) per evitare un cambiamento nelle frequenze alleliche; inoltre la mutazione non deve essere presente così come l'azione della selezione naturale, in modo da evitare la fissazione di varianti alleliche e la selezione di alleli che conferiscono un vantaggio/svantaggio agli individui. Infine, non deve esserci sovrapposizione tra le generazioni, gli incroci devono essere casuali e le frequenze alleliche uguali tra i due sessi.

Considerando un locus con due alleli A e a con frequenze alleliche pari a p e q , si possono calcolare le frequenze genotipiche attese nella generazione successiva tramite le formule p^2 (AA); q^2 (aa) e $2pq$ (Aa). Considerando non solo uno, ma tutti i loci analizzati nelle popolazioni e considerando non solo 2, ma tutti gli alleli presenti ad ogni locus, è possibile calcolare le frequenze alleliche e genotipiche attese per ogni popolazione e confrontarle con quelle osservate attraverso un test del χ^2 . Un p-value che risulti significativo ($P < 0.05$) suggerisce che la popolazione in

esame risulti in disequilibrio e che quindi una delle condizioni di equilibrio non viene rispettata (Cavalli-Sforza & Bodmer, 1973).

Tramite il software *Genepop* 4.7.2 (Rousset, 2008) è stato effettuato un *Hardy-Weinberg probability test* per ogni popolazione impostando come parametri 500 *batches* e 10000 *iterations per batch*. I p-value così ottenuti sono stati sottoposti a correzione per test multipli. La correzione adottata è quella di Benjamin-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995): è un metodo utilizzato per correggere i valori di p-value ottenuti da test multipli applicati ad uno stesso dataset. Applicando un gran numero di test sullo stesso dataset, aumenta la probabilità di commettere errori di primo tipo e quindi di accettare un'ipotesi alternativa falsa. La correzione è stata applicata ai risultati per testare la veridicità dei test risultati significativi tramite la comparazione del loro p-value con un valore critico calcolato individualmente per ciascun test. Tale valore critico è tanto più stringente quanto più basso è il valore gerarchico del p-value ottenuto dal test (Thissen et al., 2002).

3.8.2 *Linkage disequilibrium*

L'analisi del *linkage disequilibrium* indaga la possibilità di associazione tra due loci. Due loci si dicono in *linkage disequilibrium* se si verifica un'associazione non casuale tra due loro specifici alleli, ovvero se questi si trovano significativamente più spesso insieme di quanto non ci si aspetterebbe sulla base delle rispettive frequenze alleliche (Flint-Garcia et al., 2003). A partire dalle frequenze alleliche calcolate dal dataset viene stimato il parametro D chiamato il coefficiente di *linkage disequilibrium* (Slatkin, 2008) che è proprio di ogni coppia di alleli e se questo coefficiente D risulta pari a 0, i due alleli in esame possono essere considerati in *linkage equilibrium* e risultano di conseguenza non associati (Slatkin, 2008).

Il coefficiente può essere descritto tramite la formula:

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

Che rappresenta la differenza tra la frequenza dei gameti caratterizzati dal genotipo AB e il prodotto delle frequenze degli alleli A e B.

Le cause del *linkage disequilibrium* sono imputabili a diverse ragioni: la principale (molto importante per ridurre il focus negli studi di associazione nello studio dei caratteri complessi, Cordell & Clayton, 2005) è la vicinanza fisica dei due loci nello

stesso cromosoma, condizione che determina la diminuzione della probabilità di eventi di ricombinazione in grado di separarli nel corso delle generazioni (Mackay & Powell, 2007); un altro caso per cui questo fenomeno può caratterizzare il rapporto tra due loci è quello in cui la presenza in combinazione dei suddetti venga favorita dalla selezione naturale anche se questi risultino nel cromosoma lontani fisicamente. Lo studio del *linkage disequilibrium* può quindi permettere l'identificazione dell'azione della selezione naturale in relazione a due o più alleli (Smith & Haigh, 1973). Anche il fenomeno della deriva genetica può causare un'associazione non randomica tra due loci qualora determini un campionamento non casuale tra gli individui (Mackay & Powell, 2007). Infine, suddivisioni nelle popolazioni, variazioni della dimensione di popolazione e fenomeni di migrazione tra popolazioni rappresentano tutte possibili cause dell'associazione tra due loci (Mackay & Powell, 2007); per questo motivo le analisi di *linkage disequilibrium* risultano estremamente utili per risalire alla storia dei cambiamenti nella dimensione di popolazione, a possibili effetti dell'azione della selezione naturale e ai pattern di migrazione tra popolazioni (Slatkin, 2008).

Tramite il software *Genepop* 4.7.2 (Rousset, 2008) è stato quindi calcolato il coefficiente D per ogni coppia di loci e i p-value ottenuti tramite l'algoritmo delle catene di Markov sono stati corretti con la correzione di Benjamin-Hochberg per test multipli. L'eventuale significatività del p-value relativo al coefficiente D calcolato per una specifica coppia di loci descrive come la loro tendenza a co-segregare non sia imputabile ad una deviazione casuale dall'ipotesi nulla di non associazione e permette di conseguenza di considerarli come un unico locus nel caso questa significatività sia riscontrabile in tutte le popolazioni.

3.8.3 Eterozigosità osservata e attesa

Il calcolo dell'eterozigosità osservata (H_o) ed attesa (H_e), permette di quantificare la variabilità esistente entro una popolazione, inoltre, il confronto tra le due misure, può fornire informazioni riguardo alla presenza o meno di incroci casuali tra individui. Nel contesto del presente studio è stata calcolata per ogni *locus* in ogni popolazione tramite il software *Arlequin* versione 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010); il software fornisce anche la media dei valori dell'eterozigosità tra tutti i loci in una

popolazione. L'eterozigosità osservata è definita come la frequenza di genotipi eterozigoti presente in una popolazione (Greenbaum et al., 2014); l'eterozigosità attesa, anche chiamata *gene diversity*, è invece definita come la proporzione di eterozigoti attesa in una popolazione in equilibrio di *Hardy-Weinberg* (Nei, 1973). L'eterozigosità attesa è formalmente descritta come la probabilità che una coppia di alleli campionati casualmente da una stessa popolazione siano diversi ed è espressa dalla formula (Excoffier & Lischer, 2015):

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

Dove n è il numero di copie del locus nel campione, k il numero di aplotipi in quel locus e p_i la frequenza dell'aplotipo i -esimo nel campione.

3.8.4 Allelic richness

L'*allelic richness* è calcolata come il numero medio di alleli per locus pesato per la dimensione della popolazione (Hughes et al., 2008), è una misura di diversità genetica che può descrivere il potenziale di adattamento e la capacità di perseveranza a lungo termine di una popolazione (Greenbaum et al., 2014). Questa misura risulta pertanto un importante indicatore del potenziale evolutivo di una popolazione, la diversità che descrive rappresenta di fatto materiale grezzo per l'evoluzione (Fisher, 1930), ed ha una notevole importanza nell'ambito della conservazione e dell'ecologia molecolare (Foulley & Ollivier, 2006). È normalmente presentata come indicatore della variabilità negli studi genetici, ma le conclusioni relative alle sue misure sono spesso mere comparazioni tra gruppi come ad esempio: “la popolazione A ha un'*allelic richness* maggiore rispetto alla popolazione B” o “la popolazione era caratterizzata da un'*allelic richness* maggiore al tempo T, rispetto al tempo S” più che informazioni quantitative (Greenbaum et al., 2014). Nel presente studio è stata calcolata con il software FSTAT versione 2.9.4. (Goudet, 2003) che implementa una formula, adattata da El Mousadik & Petit (1996) in grado di

standardizzare la stima *dell'allelic richness* la quale altrimenti risulterebbe fortemente influenzata dalla sample size:

$$R_s = \sum \left[1 - \frac{2N - N_j}{2N} \right]$$

In cui N_i è il numero di alleli presenti tra tutti i loci; $2N$ il numero dei loci; n il numero più piccolo di individui tipizzati per un locus in quella popolazione mentre R_s il numero di alleli nella popolazione per un determinato locus pesato per la numerosità della popolazione.

3.8.5 Indici F_{ST} e AMOVA

L'indice F_{ST} è uno dei tre indici di Wright (1951) che descrivono la struttura genetica di una popolazione. Può essere utilizzato come misura della differenziazione tra le popolazioni dovuta alla loro struttura genetica (Chen et al., 2015). Wright ha definito l'indice F_{ST} , detto anche indice di fissazione, come il rapporto tra la varianza osservata delle frequenze alleliche tra sottopopolazioni e la varianza attesa delle frequenze alleliche secondo l'ipotesi di panmissia (Wright, 1951). In sintesi, possiamo definire l'indice F_{ST} come una misura della percentuale di variabilità presente nella popolazione totale attribuibile alle differenze tra sottopopolazioni (Relethford, 2012):

$$F_{ST} = \frac{\text{variabilità tra gruppi}}{\text{variabilità totale}}$$

Il risultato dell'equazione ci permette pertanto di comprendere la percentuale della variabilità genetica totale osservata che è attribuibile alle differenze genetiche fra popolazioni. Per un sistema a due alleli la stessa formula può essere espressa anche

in termini di variabilità totale e variabilità media entro sottopopolazioni nel modo seguente:

$$F_{ST} = \frac{Ht - Hs}{Ht}$$

In cui Ht è la variabilità totale e Hs la variabilità media entro sottopopolazioni.

In sintesi, minore è il valore di F_{ST} , minore sarà la variabilità genetica tra le sottopopolazioni.

Un ulteriore modo di definire questo indice è descriverlo in termini di eterozigosità e in particolare come la differenza tra l'eterozigosità nelle sottopopolazioni e quella nella popolazione totale; se il valore ottenuto risulta prossimo allo 0, allora la probabilità di pescare casualmente un dato allele è uguale in tutte le sottopopolazioni, in quanto la loro eterozigosità è molto simile. Conseguenza di ciò è la possibilità di considerare, per valori di F_{ST} sufficientemente bassi, la popolazione totale come geneticamente omogenea. Al contrario, valori di F_{ST} prossimi ad 1 descrivono una differenza importante nella probabilità di campionare uno specifico allele nelle diverse sottopopolazioni e ciò implica una netta divergenza dal punto di vista genetico tra le suddette. Per determinare la significatività dell'eventuale differenza tra le sottopopolazioni, il valore di F_{ST} viene associato ad un p-value relativo all'ipotesi nulla di omogeneità tra popolazioni, generalmente calcolato attraverso un approccio permutazionale. Se il p-value risulta significativo, l'ipotesi nulla di omogeneità tra sottopopolazioni viene rigettata.

Pertanto, l'indice di fissazione definisce la riduzione proporzionale dell'eterozigosi che si verifica quando una popolazione è strutturata in sottopopolazioni piuttosto che in un'unica grande popolazione (Relethford, 2012).

Nel contesto di questo studio l'indice F_{ST} è stato calcolato *locus by locus* con il software *Arlequin* versione 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) per ogni coppia di popolazioni in esame e i corrispettivi p-value sono stati corretti con la correzione di Benjamini-Hochberg per test multipli. I risultati di questo test permettono di verificare se siano presenti differenze genetiche significative tra le diverse popolazioni. Uno dei metodi più popolari utilizzati per calcolare l'indice F_{ST} è l'AMOVA (Excoffier et al., 1992; Peakall et al., 1995; Michalakis & Excoffier, 1996), acronimo

di Analysis of Molecular Variance (Excoffier, 1995) che permette di stimare la varianza totale del dataset e di scomporla in varianza entro e fra popolazioni. La percentuale di variabilità risultante fra popolazioni è associata ad un p-value che ne verifica la significatività.

Sulla base dell'ipotesi nulla di panmissia, il software effettua delle permutazioni tra le matrici delle distanze euclidee costruite in relazione alle differenze nel contenuto allelico degli aplotipi per testare la significatività delle componenti di covarianza associate a diversi possibili livelli di struttura genetica all'interno della popolazione (Excoffier et al., 1992).

Tramite il software *Arlequin* (Excoffier & Lischer, 2010), le diverse popolazioni campionate sono state organizzate in singoli gruppi a seconda del tipo di informazioni che si volevano ricavare, quindi, tramite un'AMOVA *locus by locus* che prevede la computazione di una singola AMOVA per ciascuno dei loci in esame, è stata analizzata la struttura genetica di questi gruppi per verificare se entro di essi vi fosse una variabilità significativa o se al contrario potessero essere considerati geneticamente omogenei. L'utilizzo dell'AMOVA *locus by locus* è stato preferito a quello di un'AMOVA non gerarchica in quanto la presenza di possibili dati mancanti all'interno del dataset avrebbe potuto comportare l'ottenimento di risultati meno veritieri.

Confrontando tra loro più gruppi distinti, il software calcola tre indici di variabilità, ciascuno con un rispettivo p-value, che descrivono rispettivamente la percentuale di variabilità imputabile a differenze entro popolazione (F_{ST}); tra popolazioni entro gruppi (F_{SC}) e tra gruppi (F_{CT}). Tra questi, il p-value ottenuto per quest'ultimo test, relativo alla percentuale di variabilità tra gruppi, è di particolare importanza in quanto la sua significatività definisce una differenza genetica sostanziale tra i gruppi presi in esame.

Sempre con il software *Arlequin* sono stati effettuati dei confronti F_{ST} a coppie tra diverse popolazioni per indagarne nel dettaglio le differenze genetiche e verificare eventuali pattern di variazione nel corso del tempo; anche questi valori sono calcolati con un p-value associato che ne definisce la significatività: se il p-value risulta più basso della soglia di significatività (impostata a 0.05) l'ipotesi nulla di omogeneità tra le due popolazioni è rigettata.

3.8.6 Confronto N° di alleli, F_{IS} , H_e , H_o e *allelic richness*

Sulla base dei risultati delle analisi AMOVA, i dati delle popolazioni dei singoli campionamenti sono stati raggruppati in modo da costituire nuove popolazioni, sempre omogenee dal punto di vista genetico, che offrissero un maggiore potere statistico. Per questi nuovi gruppi sono stati calcolati i valori del n° di alleli, dell'eterozigosità osservata e attesa, dell'*allelic richness* e dell'indice F_{IS} . L'indice F_{IS} è uno dei tre indici descritti da Wright (1951) in grado di descrivere la struttura genetica di una popolazione. Nel dettaglio, l' F_{IS} descrive la presenza di differenze nelle frequenze alleliche all'interno delle singole popolazioni e può essere usato per stimare la presenza di incroci non casuali all'interno delle stesse (Wright, 1965). Una volta ottenuti, i dati delle diverse misurazioni relative a specifici gruppi sono state confrontate attraverso un test t di Student attraverso il programma FSTAT versione 2.9.4. (Goudet, 2003). Questo test permette di confrontare la media di un valore in due gruppi e di verificare l'ipotesi nulla secondo la quale queste medie siano uguali (Kim, 2015).

3.8.7 Test di *isolation by time*

È stato condotto un test di *isolation by time* utilizzando il software ISOLDE presente in *Genepop on the web* (<https://genepop.curtin.edu.au/>).

Il test è originariamente pensato per verificare la presenza di correlazione significativa tra le differenze a livello genetico e la distanza geografica tra due o più popolazioni, nel nostro caso è utilizzato per testare la significatività di un'eventuale correlazione tra le differenze a livello genetico e il tempo trascorso tra più generazioni della stessa popolazione. I dati vengono organizzati in due matrici: la prima riporta i valori di F_{ST} dei diversi confronti a coppie tra i gruppi, opportunamente standardizzati; la seconda riporta le distanze temporali tra quelle stesse coppie di popolazioni espresse in mesi. Il software esegue quindi un test di Mantel (Mantel, 1976) che effettua delle permutazioni delle righe e delle colonne delle matrici. Questo test è in grado di verificare quanto i dati rispettino l'ipotesi nulla di indipendenza tra le due matrici.

Nel contesto di questo studio, gli F_{ST} a coppie sono stati corretti, sempre attraverso il software *Genepop on the web* (Rousset, 2008) con la formula $F_{ST}/(1-F_{ST})$, mentre le distanze a coppie sono state standardizzate attraverso il logaritmo naturale. Il p-value ottenuto dall'analisi descrive la significatività o meno dell'ipotesi di correlazione tra le due matrici.

3.8.8 Stima della dimensione effettiva di popolazione

Con il software *NeEstimator* versione 2.1. (Do et al., 2013), è stata calcolata la dimensione effettiva di popolazione. Questo valore, introdotto per la prima volta da Wright, è definito come la grandezza minima di una popolazione ideale che sarebbe caratterizzata dalla stessa varianza nelle frequenze alleliche e dallo stesso tasso di inbreeding, di una popolazione reale. Queste differenze tra reale e ideale sono dovute a caratteristiche quali sex ratio ineguale, variabilità della grandezza delle famiglie e fluttuazioni temporali della grandezza delle popolazioni (Frankham, 1995). Lo studio della dimensione effettiva di popolazione permette di ottenere importanti informazioni sullo stato di conservazione della specie in esame: valori bassi di N_e sono infatti associati ad una bassa variabilità genetica e viceversa (Charlesworth, 2009). Inoltre, dalla N_e dipendono il tasso e il tempo di fissazione o di selezione di alleli vantaggiosi o deleteri così come la suscettibilità della popolazione in esame alla selezione artificiale (Caballero, 1994).

Il metodo utilizzato per la stima della popolazione effettiva è il *temporal method* (Nei & Tajima, 1981) che utilizza la seguente formula:

$$N_e = \frac{|t_2 - t_1|}{2F'}$$

In cui t_1 e t_2 rappresentano la popolazione campionata nei due rispettivi momenti mentre F' è la differenza standardizzata tra le frequenze alleliche di due campioni separati da n generazioni, ed è una misura dell'errore nella stima della dimensione della popolazione a partire dalle frequenze alleliche. Il tempo di generazione di *Z. ophiocephalus* usato per calcolare la dimensione effettiva di popolazione è stato

approssimato a tre anni facendo una media dell'età riproduttiva che va da 1 anno a 5 anni.

Nel file *output* con i risultati, il programma riporta la stima della dimensione effettiva della popolazione in relazione a quattro diversi valori minimi di frequenza che gli alleli devono avere per poter essere integrati nell'analisi. Inoltre, il programma calcola anche un intervallo di confidenza al 95% con il metodo *Jackknife* (Do et al., 2013) per definire l'intervallo entro il quale con maggiore probabilità risiede il valore reale della dimensione effettiva della popolazione.

3.8.9 Stima dei sottogruppi familiari

Tramite il software *Colony* versione 2.0.6.7 (Jones & Wang, 2010) sono stati identificati per ogni gruppo le coppie di *fullsib*, ovvero le coppie di individui che potevano essere considerati fratelli e aventi la stessa madre e lo stesso padre. La stima del numero di individui imparentati in diverse popolazioni rende possibile effettuare un ulteriore confronto tra le suddette per supportare eventuali differenze nei livelli di *inbreeding*.

Il software suddivide il dataset in tre gruppi distinti considerando il gruppo in esame come un campionamento casuale ottenuto da una popolazione in assenza di *inbreeding*: uno contenente tutti i potenziali individui padre (*Candidate father sample*; CFS); il secondo contenente tutti i potenziali individui madre (*Candidate mother sample*; CMS) e un ultimo contenente tutti gli individui considerati come prole (*Offspring sample*; OFS; Jones & Wang, 2010). Utilizzando i dati relativi ai genotipi nei diversi loci, *Colony* stima i rapporti di parentela tra gli individui utilizzando gli algoritmi descritti in Wang 2004; per ogni pedigree è calcolato un valore di *likelihood* tenendo in considerazione l'intera struttura e non solo i confronti a coppie tra gli individui (Jones & Wang, 2010). A partire da una configurazione iniziale, è utilizzato un algoritmo di *annealing* simulato (Kirkpatrick et al., 1983) per cercare una configurazione con un valore di *likelihood* più alto minimizzando il numero di pedigree indagati.

Nel contesto di questo studio, è stata posta l'attenzione sul numero di individui *fullsib* in diversi gruppi. In particolare, tramite un test del χ^2 , è stata confrontata la percentuale di individui non imparentati nelle due popolazioni che sono risultate

significativamente diverse dal punto di vista genetico per verificare se in una popolazione fosse presente un numero significativamente inferiore di individui imparentati rispetto che nella seconda.

4. RISULTATI

4.1 Estrazione DNA

Tutti e 1568 i campioni sono stati estratti con successo tramite il metodo *Salting out* (Patwary et al., 1994). I campioni relativi agli anni 2001 e 2002 e quelli provenienti dalle 3 lagune negli anni 2019, 2020 e dalla primavera 2021 erano già stati estratti e amplificati in studi o in lavori di tesi precedenti. Il lavoro pratico svolto nel contesto di questa tesi ha interessato unicamente il campionamento dell'autunno 2021, rappresentato da 251 individui, mentre l'analisi dei dati è stata svolta sull'intero dataset.

L'avvenuta estrazione è stata verificata tramite una corsa su gel di agarosio all'1% in TBE 1X (Figura 11).

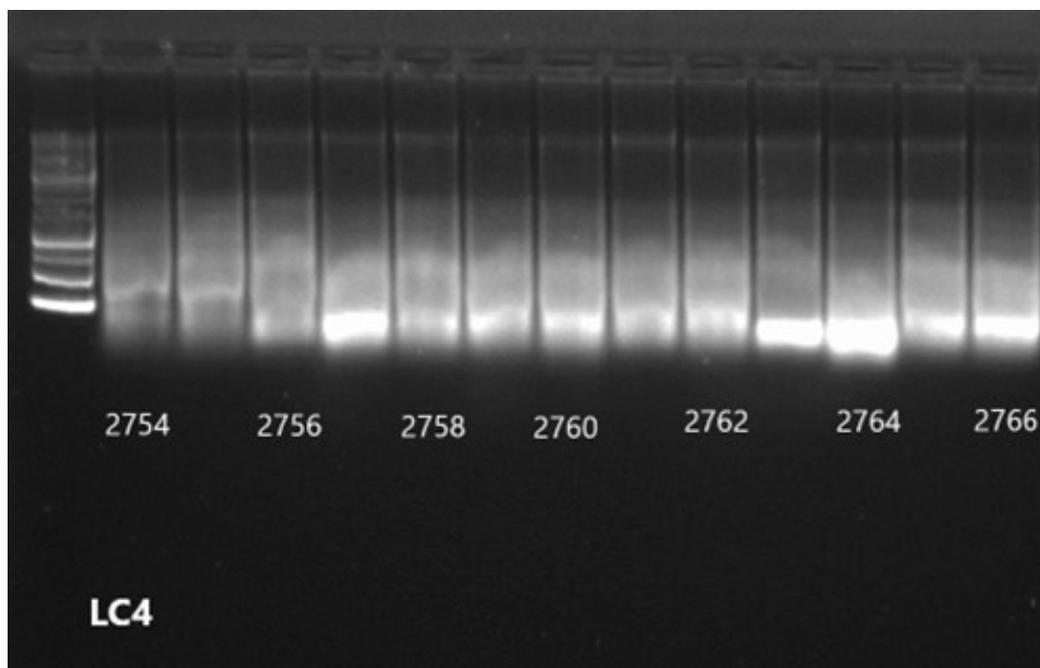


Figura 11: Fotografia del risultato di una corsa elettroforetica su gel agarosio all'1%, intercalante GelRed (BIOTIUM) (ottenuta tramite BioRad, GelDoc™ XR+) di campioni di DNA di *Z. ophiocephalus*. Il primo pozzetto a sinistra è occupato dal marcatore di peso molecolare 25kb (SMO-BIO), mentre nei rimanenti pozzetti sono visibili più bande relative ai diversi acidi nucleici

presenti in soluzione. In particolare, la banda più in alto verifica la presenza di DNA genomico ad alto peso molecolare. Le bande sottostanti sono invece determinate dalle molecole di RNA presenti in soluzione e da DNA degradato.

Per ogni campione è stata inoltre effettuata un'analisi quantitativa allo spettrofotometro Nanodrop 2000c (ThermoScientific) (Tabella 5).

Tabella 5: esempio di tabella compilata con dati relativi all'estrazione dei campioni di *Z. ophiocephalus*. Per ogni campione sono riportati il sito del campionamento, la data di campionamento, il codice identificativo del campione, la concentrazione in nanogrammi su microlitro (ng/μl), i dati relativi al rapporto di assorbanza 260/280, che permette di ottenere una stima della purezza del campione e quelli relativi al rapporto 260/230.

Campionamento	data	Codice identificativo	Data estrazione DNA	ng/μl	260/280	260/230
LS1	05.11.21	2684	15.02.22	437.1	2.08	1.99
LS1	05.11.21	2685	15.02.22	480.5	2.05	2.13
LS1	05.11.21	2686	15.02.22	439.5	2.06	2.13
LS1	05.11.21	2687	15.02.22	318	2.04	2.11
LS1	05.11.21	2688	15.02.22	586.9	2.05	2.08

4.2 Amplificazione loci microsatellite

Ciascun campione è stato sottoposto a 2 reazioni di amplificazione, una per ciascuna multiplex, in modo da amplificare tutti e 10 i loci. L'avvenuta amplificazione è stata verificata tramite una corsa elettroforetica su gel agarosio all'1.8% (Figura 12).

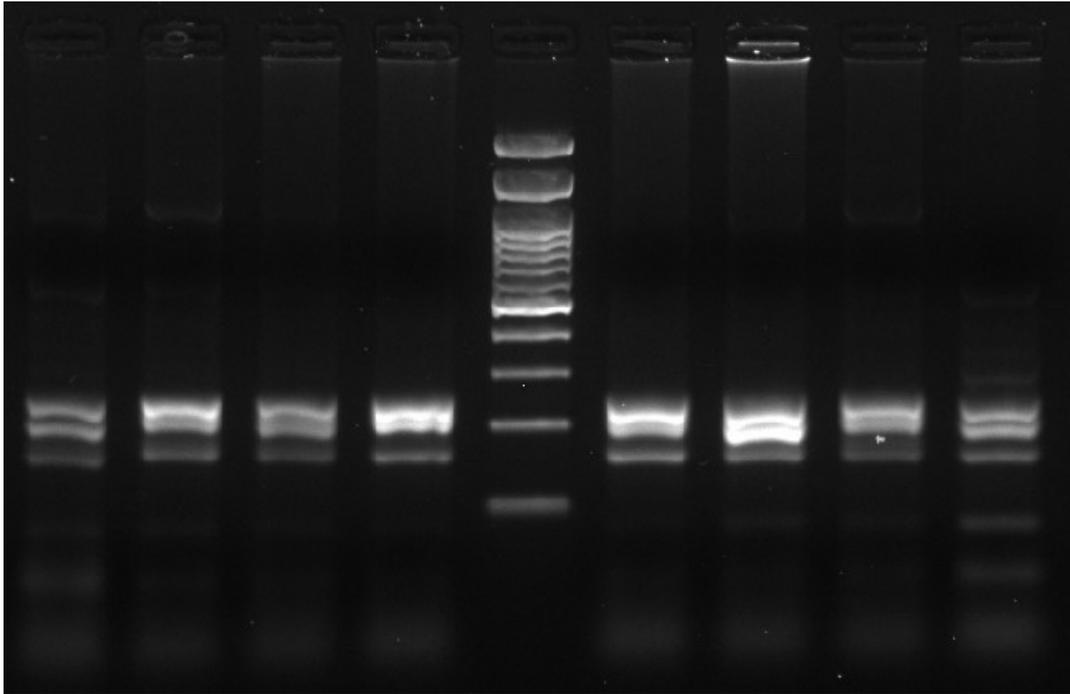


Figura 12: Fotografia del risultato di una corsa elettroforetica su gel agarosio all'1.8%, intercalante GelRed (BIOTIUM) (ottenuta tramite BioRad, GelDoc™ XR+) utilizzata per verificare l'avvenuta amplificazione dei campioni di DNA. Il marcatore utilizzato, visibile nella colonna centrale, è un marcatore 100 bp (SMOBIO). Le due bande visibili nei quattro pozzetti ai due lati della colonna del marcatore corrispondono rispettivamente agli amplificati e ai primer non utilizzati nella reazione.

4.3 Analisi dei dati

Per 1564 dei 1568 campioni totali, provenienti da 47 campioni di popolazione distinti sulla base del luogo, dell'anno e della stagione di campionamento, è stato possibile amplificare con successo almeno 7 loci su 10 mediante PCR in multiplex o singola e sono stati dunque utilizzati per le analisi successive. Per 4 campioni non è stato possibile amplificare con successo 3 o più loci, né con PCR in multiplex né singola utilizzando il profilo di amplificazione specifico dei vari loci. Questi 4 campioni sono stati dunque esclusi dalle analisi successive. Per i campioni di DNA estratti ed amplificati nel corso dell'internato è stato effettuato il processo di *scoring*; quindi, i dati ottenuti relativi ai genotipi di ciascun individuo, sono stati integrati al dataset comprendente anche i dati relativi ai lavori di tesi precedenti, oltre che quelli relativi agli anni 2001 e 2002 provenienti dallo studio di Gallini (2003).

Il dataset completo è stato sottoposto al processo di *binning* che ha permesso di costituire le classi alleliche sulle quali è stato possibile effettuare le diverse analisi.

4.3.1 Equilibrio di Hardy-Weinberg e *linkage disequilibrium*

L'ipotesi di equilibrio di Hardy-Weinberg è stata testata tramite il software *GenePop* versione 4.7.2. (Rousset, 2008) per tutti i loci e tutti i campioni di popolazione. I p-value ottenuti, corretti tramite la correzione di Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995), sono risultati significativi per 3 dei 470 confronti effettuati. In particolare, i siti Marano autunno 2021 (ZO.21a.MA) per il locus ZO++26, LC3 autunno 2020 (ZO.20a.LC3) per il locus ZO++32 e Goro primavera 2020 (ZO.20p.GO) per il locus ZO++6 risultavano discostarsi significativamente dall'ipotesi di equilibrio.

Sempre con lo stesso software, è stato effettuato un test di *linkage disequilibrium* con risultati non significativi per tutte le combinazioni di loci, confermando la condizione di indipendenza tra loci.

4.3.2 Analisi della variabilità genetica

Per ogni popolazione analizzata sono stati calcolati diversi indici di variabilità: con il software *Arlequin* versione 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) sono stati ottenuti i dati relativi al numero di alleli e l'eterozigosità osservata ed attesa, mentre con il software *FSTAT* versione 2.9.4. (Goudet, 2003) è stata calcolata *l'allelic richness*. I dati sono stati calcolati per ogni popolazione campionata (Tabella 6).

Il numero medio di alleli per popolazione va dai 2.8, come nel caso delle due popolazioni ZO.2002.LD e ZO.2002.LT; a 6.2 nelle due popolazioni ZO.21a.GO e ZO.21p.MA. I campioni degli anni 2001 e 2002 hanno, mediamente, un numero di alleli inferiore (3.23) rispetto ai campioni degli anni 2019-20-21 (4.75). *L'allelic richness* varia da un minimo di 2.63 (ZO.2002.CH) ad un massimo di 3.517 (ZO.21a.LS2). L'eterozigosità osservata varia da un minimo di 0.285 (ZO.2002.CH) ad un massimo di 0.440 (ZO.19p.LC4), mentre l'eterozigosità attesa varia da un minimo di 0.318 (ZO.2002.CZ) ad un massimo di 0.407 (ZO.20p.GO).

Gli stessi indici di variabilità sono stati calcolati anche per ciascun locus (Tabella 7).

Tabella 6: Sono riportati, per ciascuna popolazione analizzata, i valori relativi al numero di alleli, l'*allelic richness*, eterozigotà osservata ed attesa e il p-value relativo al test dell'equilibrio di Hardy-Weinberg calcolato per tutti i loci.

Sito	N°alleli	<i>Allelic richness</i>	Ho	He	Equilibrio di Hardy-Weinberg (p-value)
ZO.19p.MA	4.6	3.008	0.386	0.364	0.9723
ZO.19a.MA	5	3.049	0.378	0.362	0.0406
ZO.20p.MA	5.5	3.189	0.344	0.395	0.4325
ZO.20a.MA	5.2	3.130	0.369	0.373	0.9094
ZO.21p.MA	6.2	3.281	0.379	0.379	0.9982
ZO.21a.MA	5.5	3.281	0.345	0.379	0.3684
ZO.19p.LN5	3.8	3.318	0.416	0.377	0.7107
ZO.20a.LN5	3	3.000	0.367	0.351	0.4915
ZO.21p.LN5	5.2	3.288	0.420	0.396	0.3062
ZO.21a.LN5	3.6	2.871	0.335	0.345	0.0249
ZO.19p.LN6	5.7	3.202	0.374	0.362	0.3705
ZO.19a.LN6	3	2.936	0.310	0.371	0.3022
ZO.20a.LN6	4.1	3.129	0.350	0.366	0.0202
ZO.20p.LN6	4.8	3.091	0.370	0.377	0.4204
ZO.21a.LN6	4	2.957	0.363	0.360	0.8489
ZO.21p.LN6	3.8	2.993	0.365	0.343	0.9777
ZO.19p.LC3	4.9	3.047	0.361	0.362	0.9896
ZO.19a.LC3	5.7	3.214	0.356	0.367	0.0086
ZO.20a.LC3	5.2	3.258	0.323	0.394	0.0001
ZO.20p.LC3	3.7	2.918	0.376	0.390	0.5106
ZO.21a.LC3	3.6	3.447	0.330	0.377	0.1171
ZO.21p.LC3	6	3.429	0.392	0.371	0.8508
ZO.19p.LC4	3.2	3.125	0.440	0.398	0.9562
ZO.20p.LC4	5.2	3.128	0.357	0.368	0.6681
ZO.20a.LC4	5	3.103	0.350	0.371	0.2603
ZO.21p.LC4	5.1	3.125	0.418	0.376	0.6233
ZO.21a.LC4	4.6	3.125	0.363	0.364	0.3852
ZO.19p.LS1	4.4	3.196	0.389	0.374	0.9109
ZO.19a.LS1	4.4	3.322	0.395	0.385	0.9686
ZO.20a.LS1	5.5	3.142	0.348	0.368	0.0845
ZO.21a.LS1	4.9	3.223	0.356	0.373	0.2424
ZO.19p.LS2	4.4	3.135	0.371	0.377	0.9354

ZO.19a.LS2	5.3	3.182	0.367	0.382	0.1661
ZO.20p.LS2	5.5	3.125	0.357	0.373	0.9296
ZO.21p.LS2	5.3	3.035	0.374	0.368	0.2166
ZO.21a.LS2	3.9	3.517	0.392	0.361	0.9958
ZO.19p.FE	4.2	3.116	0.379	0.361	0.7348
ZO.20p.GO	5.3	3.219	0.389	0.407	0.8722
ZO.20a.GO	5.5	3.204	0.369	0.376	0.6898
ZO.21a.GO	6.2	3.439	0.390	0.390	0.0097
ZO.2001.LD	4.2	3.208	0.381	0.368	0.5941
ZO.2001.LT	3.5	3.010	0.300	0.348	0.1568
ZO.2002.CH	2.9	2.639	0.285	0.342	0.3668
ZO.2002.CZ	3.2	2.822	0.292	0.318	0.2891
ZO.2002.LD	2.8	2.718	0.330	0.368	0.1242
ZO.2002.LT	2.8	2.758	0.350	0.388	0.6049
ZO.2002.MG	3.2	2.904	0.377	0.346	0.9769

Tabella 7: Sono riportati i valori medi per numero di alleli, *allelic richness*, eterozigosità osservata ed attesa e il p-value combinato dell'equilibrio di Hardy-Weinberg per ciascun locus.

Locus	N° alleli	<i>Allelic richness</i>	H _o	H _e	Equilibrio di Hardy-Weinberg
ZO++3	2.7	1.837	0.138	0.128	0.9998
ZO++46	2.4	2.110	0.529	0.495	0.5098
ZO++37M13	5.8	3.659	0.429	0.438	0.5176
ZO++26M13	8.4	6.188	0.748	0.792	0.4328
ZO++6M13	1.3	1.093	0.011	0.011	1.0000
ZO++2M13	1.6	1.159	0.023	0.019	0.9046
ZO++44M13	6.2	4.188	0.631	0.643	0.6335
ZOAC3	1.8	1.237	0.021	0.027	0.2001
ZO++16M13	8.0	4.895	0.570	0.568	0.6413
ZO++32M13	7.2	4.847	0.559	0.575	0.0001

4.3.3 Indici F_{ST} e AMOVA

Il dataset rappresentato da tutte le popolazioni è stato sottoposto, tramite il software *Arlequin* versione 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), a diverse analisi AMOVA *locus by locus* per verificare la presenza di omogeneità a livello sia geografico che temporale. Per prima cosa è stata testata l'omogeneità genetica tra tutte le popolazioni. L'indice F_{ST} è risultato essere pari a 0.00367 con un p-value associato pari a

0.00010. Questi risultati ci hanno permesso di rigettare l'ipotesi di omogeneità complessiva tra tutti i campioni di popolazione in esame. Proseguendo nell'analisi è stata indagata la presenza di omogeneità entro le singole lagune: sono pertanto state effettuate tre nuove analisi AMOVA *locus by locus* in cui sono state raggruppate rispettivamente le popolazioni provenienti dalla Laguna di Venezia, quelle provenienti dalla Laguna di Marano e quelle provenienti dal sistema lagunare di Goro/Ferrara. In generale, per tutte le analisi effettuate per questo lavoro di tesi, è stata selezionata la soglia di significatività pari a 0.05 per discriminare valori di probabilità che supportino o meno le ipotesi nulle. I risultati dimostrano come per le lagune di Marano e di Goro/Ferrara siano presenti differenze significative tra popolazioni provenienti dal medesimo sistema lagunare campionate in anni o in stagioni diversi, mentre per la Laguna di Venezia queste differenze non siano significative (Tabella 8).

Tabella 8: Sono riportati i valori F_{ST} e i p-value associati risultati dall'AMOVA *locus by locus* utilizzata per testare l'omogeneità dei campioni provenienti dalla stessa laguna. I p-value sono considerati significativi se inferiori al valore soglia 0.05; in tal caso in tabella sono riportati in corsivo. In questo caso, tutti i p-value sono risultati significativi.

Confronto	F_{ST}	p-value F_{ST}
Tra popolazioni entro la Laguna di Venezia	0.0038	<i>0.0002</i>
Tra popolazioni entro la Laguna di Marano	0.0041	<i>0.0132</i>
Tra popolazioni entro il sistema lagunare di Goro/Ferrara	0.0047	<i>0.0188</i>

Una volta effettuata questa analisi, le lagune esterne sono state confrontate con i campioni provenienti dalla Laguna di Venezia tramite due analisi AMOVA *locus by locus*. Tramite il software *Arlequin* i campioni provenienti dalle diverse lagune a confronto sono stati raggruppati in due diversi gruppi. L'analisi permette quindi di discriminare la percentuale di variabilità totale attribuibile alle differenze entro gruppi, descritta dal p-value associato al valore di F_{ST} e quella attribuibile invece alle differenze tra gruppi, descritta dal p-value associato al valore di F_{CT} . Il p-value

relativo all'ipotesi nulla di assenza di differenze tra gruppi è risultato non significativo in entrambi i confronti (Tabella 9), ciò ha permesso di considerare le popolazioni provenienti dalle tre lagune tra loro geneticamente omogenee.

Tabella 9: Risultati dell'analisi AMOVA *locus by locus* utilizzata per verificare l'ipotesi nulla di uniformità genetica tra i gruppi relativi ai campionamenti nelle tre lagune considerate. Le differenze genetiche presenti tra le popolazioni della Laguna di Venezia e quelle della Laguna di Marano e tra quelle di Venezia e quelle di Goro-Ferrara non sono risultate significative. I p-value sono considerati significativi se inferiori a 0.05; in tal caso in tabella sono riportati in corsivo.

Confronto	F_{ST}	p-value F_{ST}	F_{CT}	p-value F_{CT}
Marano vs Venezia	0.0009	<i>0.0244</i>	-0.0004	0.8036
Goro/Ferrara vs Venezia	0.0011	<i>0.0201</i>	-0.00004	0.3594

Per rafforzare le ipotesi, è stata effettuata un'ulteriore AMOVA *locus by locus* globale escludendo i campioni provenienti dalle lagune esterne. il valore F_{ST} globale calcolato tra tutti i campioni provenienti esclusivamente dalla Laguna di Venezia (N=37), risultante uguale a 0.0038, è più alto del valore F_{ST} calcolato per tutte le popolazioni (N=47) pari a 0.0036 (Tabella 10). Grazie a queste informazioni è stato possibile concentrare le analisi successive esclusivamente sui campioni provenienti dalla Laguna di Venezia, oggetto principale del presente studio.

Tabella 10: Indici F_{ST} e relativi p-value delle analisi AMOVA *locus by locus* effettuate raggruppando in primo luogo tutte le popolazioni campionate, in secondo luogo raggruppando solo le popolazioni campionate all'interno della Laguna di Venezia. Eventuali p-value significativi sono riportati in corsivo.

Confronto	F_{ST}	p-value F_{ST}
Tutte le popolazioni	0.0036	<i>0.0000</i>
Solo popolazioni della Laguna di Venezia	0.0038	<i>0.0002</i>

Con l'attenzione rivolta esclusivamente alla Laguna di Venezia, sono state effettuate diverse analisi AMOVA *locus by locus* per testare ipotesi di omogeneità genetica sia su base geografica che su base temporale.

Inizialmente considerando solamente i campioni relativi agli anni 2019, 2020 e 2021: in una prima AMOVA i campioni sono stati suddivisi in 6 gruppi sulla base della loro provenienza geografica. Ogni gruppo, cioè, era costituito da tutti i campioni di popolazione campionati in uno stesso sito della Laguna di Venezia nelle diverse stagioni del triennio 2019-2021. I risultati dell'AMOVA *locus by locus* hanno riportato la presenza di una significativa variabilità genetica entro popolazioni, ma l'assenza di significatività in relazione alle differenze presenti tra i diversi gruppi (Tabella 11). Tali conclusioni hanno permesso di accettare l'ipotesi di omogeneità geografica all'interno della Laguna di Venezia.

Tabella 11: Risultati dell'analisi AMOVA *locus by locus* per testare l'ipotesi di omogeneità geografica tra le popolazioni della Laguna di Venezia. Il p-value associato al valore di F_{ST} ottenuto descrive la significatività o meno dell'ipotesi di omogeneità entro popolazioni. Un valore significativo permette pertanto di rigettare l'ipotesi nulla di omogeneità entro popolazioni. Il p-value associato al valore di F_{CT} ottenuto descrive invece la significatività o meno dell'ipotesi di omogeneità genetica tra gruppi di popolazioni. Non essendo il valore significativo, viene accettata l'ipotesi nulla per la quale non siano presenti differenze tra i diversi gruppi. I p-value significativi sono riportati in corsivo.

Confronto	F_{ST}	p-value F_{ST}	F_{CT}	p-value F_{CT}
Popolazioni raggruppate sulla base del sito di campionamento	0.0030	<i>0.0017</i>	-0.0012	0.9833

In secondo luogo, sono state effettuate delle analisi su base temporale. In particolare, inizialmente considerando unicamente le popolazioni campionate all'interno della Laguna di Venezia, sono state verificate le ipotesi di omogeneità tra popolazioni nel contesto delle singole stagioni. Sempre con il software *Arlequin* versione 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), considerando le popolazioni campionate nel corso della stessa stagione come appartenenti ad un medesimo gruppo, tramite

un'AMOVA *locus by locus* è stata testata l'ipotesi nulla di omogeneità all'interno di questo (Tabella 12).

In generale, i campioni provenienti dalla stessa stagione sono risultati tra loro geneticamente omogenei con la sola eccezione del gruppo formato dai campionamenti relativi all'autunno del 2020. Il gruppo è risultato statisticamente omogeneo solo con l'omissione del campionamento relativo al sito LC3; i dati relativi al campionamento ZO.20a.LC3 sono pertanto stati omessi dal resto delle analisi.

Questi test hanno permesso di creare un nuovo dataset nel quale i campioni provenienti dai diversi siti prelevati in uno stesso anno e stagione sono stati riuniti (Tabella 12). Ciò permette di aumentare la sample size e migliorare di conseguenza il potere statistico delle successive analisi.

Tabella 12: Risultati dell'AMOVA *locus by locus* utilizzata per testare l'omogeneità genetica tra campioni provenienti da campionamenti effettuati nella stessa stagione e nello stesso anno. In tutti i casi tranne uno, il p-value non risulta significativo e permette perciò di accettare l'ipotesi di omogeneità genetica tra le suddette popolazioni. Solo nel caso dell'autunno 2020 il p-value è risultato significativo; successive analisi hanno rivelato che lo stesso test, effettuato senza considerare il campione proveniente dal sito LC3, risultava non significativo. I p-value significativi sono riportati in corsivo.

Confronto	F_{ST}	p-value F_{ST}
Popolazioni campionate nella primavera 2019	0.0048	0.0536
Popolazioni campionate nell'autunno 2019	0.0263	0.2680
Popolazioni campionate nella primavera 2020	0.0027	0.1530
Popolazioni campionate nell'autunno 2020	0.0078	<i>0.0197</i>
Popolazioni campionate nella primavera 2021	0.0027	0.0668
Popolazioni campionate nell'autunno 2021	-0.0024	0.7935
Popolazioni campionate nell'autunno 2020 senza ZO.20°.LC3	0.0069	0.0567

Proseguendo nel percorso per verificare l'omogeneità genetica entro la Laguna di Venezia, è stata verificata l'omogeneità tra tutti i campioni provenienti dallo stesso anno. I suddetti campioni sono stati considerati come un solo grande gruppo ed è stata testata l'ipotesi nulla di omogeneità con un'ulteriore analisi AMOVA *locus by locus*. Anche in questo caso i risultati non hanno rivelato differenze significative (Tabella 13) permettendo di considerare anche le popolazioni provenienti dallo stesso anno come geneticamente omogenee.

Tabella 13: Risultati dell'AMOVA *locus by locus* per testare l'omogeneità genetica tra le diverse popolazioni campionate nello stesso anno entro la Laguna di Venezia. Tutti i p-value risultano non significativi (*i dati relativi al sito ZO.20a.LC3 sono stati esclusi dalle analisi) e ciò ha permesso di considerare le popolazioni provenienti dal medesimo anno come geneticamente omogenee.

Confronto	F_{ST}	p-value F_{ST}
Popolazioni anno 2019	0.0033	0.0558
Popolazioni anno 2020*	0.0029	0.0898
Popolazioni anno 2021	0.0008	0.2479
Popolazioni anno 2019-2020-2021	0.0004	0.1869

Infine, unendo tramite il software *Arlequin* i campioni dei tre anni entro tre gruppi distinti ed effettuando un'ulteriore AMOVA *locus by locus*, i risultati dell'analisi hanno confermato l'ipotesi di omogeneità genetica anche tra le popolazioni dei diversi anni (Tabella 14).

Tabella 14: Risultati dell'AMOVA *locus by locus* tra gruppi rappresentanti i tre anni di campionamento 2019, 2020 e 2021. Il p-value relativo all'ipotesi di presenza di differenze entro popolazioni e quello relativo all'ipotesi di presenza di differenze tra gruppi risultano entrambi non significativi.

Confronto	F_{ST}	p-value F_{ST}	F_{CT}	p-value F_{CT}
Gruppi di Popolazioni suddivise per anno di campionamento	0.0005	0.1896	0.0005	0.1190

Dopo aver appurato l'omogeneità genetica tra le popolazioni provenienti dal campionamento del triennio 2019-2020-2021, sono stati presi in analisi i dati relativi alle popolazioni campionate all'interno della Laguna di Venezia negli anni 2001 e 2002. Anche per queste popolazioni è stata testata l'ipotesi di omogeneità genetica tramite un'AMOVA *locus by locus* che ha dato risultati non significativi (Tabella 15).

Tabella 15: Risultati dell'AMOVA *locus by locus* utilizzata per testare l'ipotesi nulla di omogeneità genetica tra i diversi campioni provenienti dagli anni 2001 e 2002. Il p-value relativo all'ipotesi non risulta significativo e le popolazioni possono pertanto essere considerate omogenee dal punto di vista genetico.

Confronto	F_{ST}	p-value F_{ST}
Campioni 2001-campioni 2002	0.0029	0.4534

Appurato che anche i campioni del 2001 e 2002 costituissero un gruppo omogeneo dal punto di vista genetico, le singole popolazioni sono state unite in base all'anno in un nuovo dataset e confrontate tramite un'ulteriore AMOVA *locus by locus* con il gruppo costituito dai campioni provenienti dalla Laguna di Venezia del triennio 2019, 2020 e 2021 in modo da effettuare un confronto temporale con individui provenienti dallo stesso luogo, ma da un periodo precedente. In questo caso il confronto è risultato significativo: i campioni del vecchio campionamento risultano essere significativamente diversi rispetto ai campioni di quello nuovo (Tabella 16).

Tabella 16: Risultati dell'analisi AMOVA *locus by locus* utilizzata per testare l'ipotesi nulla di omogeneità tra le popolazioni campionate entro la Laguna di Venezia provenienti dal biennio 2001-2002 e quelle provenienti dal triennio 2019-2020-2021. Il p.value relativo al valore di F_{CT} è risultato significativo. I p-value significativi sono riportati in corsivo.

Confronto	F_{ST}	p-value F_{ST}	F_{CT}	p-value F_{CT}
Campioni 2001-2002 vs campioni 2019-2020-2021	0.0053	<i>0.0100</i>	0.0049	<i>0.0004</i>

Alla luce della significatività del confronto temporale sono stati calcolati gli indici F_{ST} *locus by locus* a coppie tra le popolazioni del nuovo dataset caratterizzato dai campioni riuniti per anni e stagioni. I p-value risultanti, dopo la correzione di Benjamini-Hochberg per test multipli, non hanno evidenziato confronti significativi (Tabella 17). Tuttavia, osservando i dati è possibile notare un generale aumento della divergenza genetica in relazione alla distanza temporale e alcuni confronti, prima della correzione per test multipli, sono risultati significativi.

Tabella 17: Confronti F_{ST} *locus by locus* a coppie tra le popolazioni suddivise per stagioni ed anni (*senza il campione ZO.20a.LC3). Sotto la diagonale sono riportati i valori di F_{ST} per ciascuna coppia, sopra la diagonale sono riportati i valori dei rispettivi p-value. I p-value risultati significativi sono indicati in corsivo. Nessun confronto è risultato significativo dopo la correzione di Benjamini-Hochberg per test multipli.

	2001	2002	Prima- vera 2019	Au- tunno 2019	Prima- vera 2020	Au- tunno 2020*	Prima- vera 2021	Au- tunno 2021
2001		0.4667	0.2103	0.1611	0.0704	0.1182	0.0671	<i>0.0059</i>
2002	0.0004		<i>0.0282</i>	<i>0.0366</i>	<i>0.0290</i>	<i>0.0035</i>	<i>0.0515</i>	<i>0.0012</i>
Prima- vera 2019	0.0018	0.0046		0.4282	0.7103	0.4326	0.3187	0.0677
Au- tunno 2019	0.0032	0.0053	0.0010		0.4904	0.3917	0.4315	0.4677
Prima- vera 2020	0.0048	0.0049	-0.0006	-0.0001		0.9347	0.6486	0.0569
Au- tunno 2020*	0.0041	0.0088	0.0001	0.0003	-0.0014		0.1908	<i>0.0233</i>
Prima- vera 2021	0.0040	0.0033	0.0002	-0.0001	-0.0005	0.0008		0.1215
Au- tunno 2021	0.0104	0.0089	0.0017	0.0000	0.0019	0.0031	0.0010	

4.3.4 Confronti *allelic richness*, eterozigosità attesa e osservata e indice F_{IS}

Oltre ai valori degli F_{ST} stimati nei confronti a coppie, per le popolazioni del nuovo dataset sono stati calcolati anche i valori relativi al numero di alleli, all'*allelic richness*, all'eterozigosità attesa ed osservata e al valore del coefficiente di *inbreeding* F_{IS} per poter analizzare la loro variazione nel corso del tempo (Tabella 18).

Tabella 18: Sono riportati, per ciascuna popolazione analizzata, i valori relativi al numero di alleli, l'*allelic richness*, media dell'eterozigosità osservata ed attesa e coefficiente di *inbreeding* F_{IS} . Si osserva un generale aumento dei valori di *allelic richness*, H_o e H_e nelle popolazioni degli anni 2019, 2020 e 2021 e una diminuzione del valore F_{IS} rispetto alle popolazioni degli anni 2001 e 2002.

	N° Alleli	<i>Allelic richness</i>	H_o media	H_e media	F_{IS}
2001	4.5	4.500	0.343	0.3581	0.0420
2002	4.7	4.129	0.322	0.3518	0.0850
Primavera 2019	7.7	5.015	0.379	0.3707	-0.0230
Autunno 2019	7.2	5.048	0.363	0.3767	0.0370
Primavera 2020	7.0	4.781	0.362	0.3652	0.0090
Autunno 2020	7.1	4.888	0.350	0.3693	0.0510
Primavera 2021	8.1	5.094	0.397	0.3818	-0.0410
Autunno 2021	7.1	4.963	0.357	0.3632	0.0170

Tramite FSTAT versione 2.9.4. (Goudet, 2003) sono state confrontate, attraverso un test t ad una coda, le medie delle diverse misure nei gruppi di popolazioni

che sono risultati geneticamente diversi. Sono stati calcolati i valori medi delle misure nel gruppo relativo ai campioni provenienti dal 2001 e dal 2002 e nel gruppo relativo ai campioni del triennio compreso tra il 2019 e il 2021 (Tabella 19). Osservando i valori è possibile osservare come nelle popolazioni prelevate negli anni 2019, 2020 e 2021 i valori dell'*allelic richness*, dell'eterozigosità osservata e di quella attesa siano più alti rispetto a quelle provenienti dagli anni 2001 e 2002; al contrario, il valore del coefficiente di *inbreeding* risulta maggiore in queste ultime rispetto che nelle popolazioni relative al triennio più recente. Per verificare la veridicità di queste osservazioni, è stato effettuato un test-t ad una coda al fine di testare l'ipotesi alternativa per la quale il valore di ciascuna misura fosse significativamente più grande in un primo gruppo rispetto al secondo; p-value associati al test che risultino inferiori alla soglia di significatività di 0.05 descrivono come il valore confrontato sia significativamente maggiore nel primo gruppo rispetto che nel secondo. I valori risultati significativi, identificati con un asterisco nella tabella 19, dimostrano come nel gruppo del vecchio campionamento l'indice F_{IS} risulti significativamente maggiore e come, al contrario, l'*allelic richness*, l'eterozigosità osservata e l'eterozigosità attesa risultino significativamente maggiori nel gruppo relativo al nuovo campionamento.

Tabella 19: Sono riportati i valori medi dell'*allelic richness*, l'eterozigosità osservata e attesa e il coefficiente di *inbreeding* F_{IS} per ciascuno dei due gruppi in esame. I valori in corsivo e contrassegnati dall'asterisco sono risultati significativamente maggiori nel loro gruppo rispetto all'altro. L'*allelic richness*, l'eterozigosità osservata e l'eterozigosità attesa sono risultate essere significativamente maggiore nel gruppo relativo ai campioni più recenti: rispettivamente p-value=0.027, p-value=0.033 e p-value=0.033; mentre l'indice F_{IS} è risultato essere significativamente maggiore nel gruppo relativo ai campioni più vecchi: p-value=0.025.

	<i>Allelic richness</i>	H_o media	H_e attesa	F_{IS}
2001-2002	4.314	0.330	0.354	<i>0.068*</i>
2019-2020-2021	<i>4.965*</i>	<i>0.369*</i>	<i>0.370*</i>	0.003

4.3.5 Test di *isolation by time*

Osservando i valori di F_{ST} si nota un pattern più o meno definito che prevede l'aumentare del valore dell'indice di fissazione qualora si confronti la stessa popolazione con gruppi temporalmente sempre più distanti. Ciò è riscontrabile in particolare osservando la prima colonna della tabella 14 relativa ai confronti con la popolazione del 2001. Ad un indice F_{ST} più basso (0.00039), ottenuto nel confronto con la popolazione del 2002, quella temporalmente più vicina, si sostituiscono, man mano che il tempo di divergenza aumenta, valori di F_{ST} sempre più elevati fino ad arrivare all'autunno 2020 e la primavera 2021, ove si nota un'interruzione del pattern con valori di F_{ST} che tendono a rimanere stabili. Con l'aggiunta dei nuovi campioni provenienti dall'autunno del 2021 l'indice F_{ST} ritorna a salire. Per testare l'effettiva presenza di correlazione tra la diversità genetica tra le popolazioni e la distanza temporale delle stesse è stato effettuato, tramite il software ISOLDE, disponibile sul sito *Genepop on the web* il test di *isolation by time*. Il risultato del test ha verificato la presenza di correlazione tra le due variabili con un p-value relativo all'ipotesi di indipendenza dei dati pari a 0.007 (Figura 13).

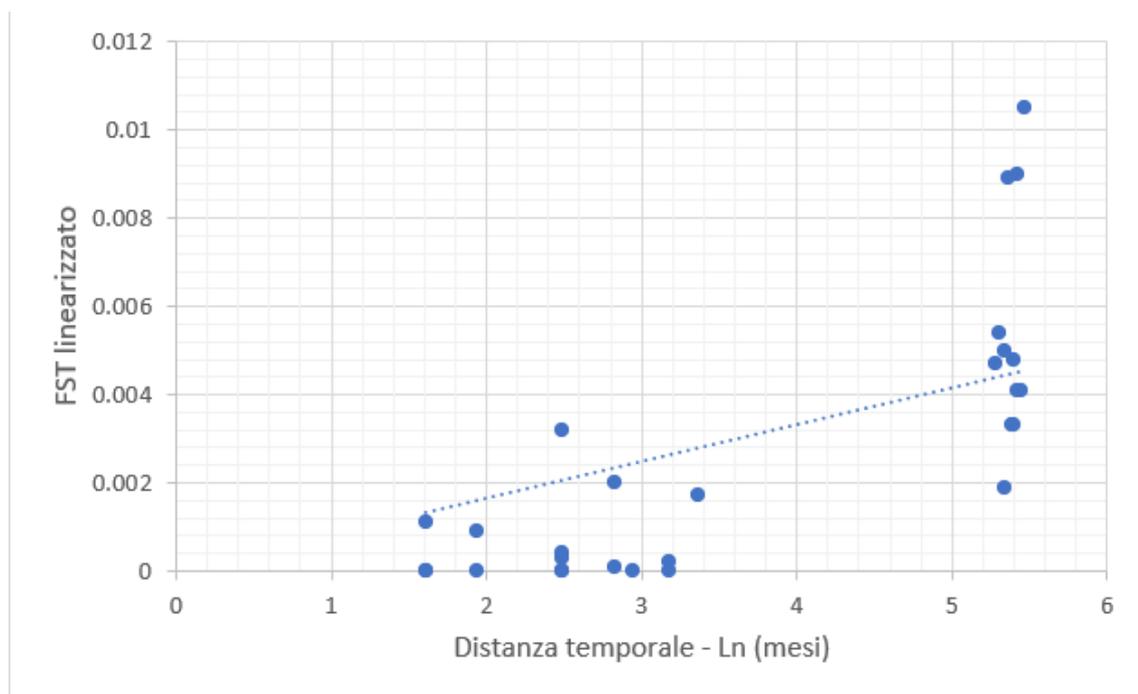


Figura 13: Visualizzazione della retta di regressione calcolata tra i valori delle due variabili riportate sui due assi cartesiani: sull'asse delle ascisse sono riportati i valori dei logaritmi naturali delle

distanze temporali calcolate in numero di mesi intercorsi tra i campionamenti; sull'asse delle ordinate sono riportati i valori degli F_{ST} locus by locus per ogni confronto linearizzati attraverso la formula: $F_{ST}/(1-F_{ST})$.

La formula della retta ottenuta dall'analisi è descritta dall'equazione: $y=0.0008x$, con coefficiente di regressione positivo pari a: $r^2=0.7005$.

4.3.6 Stima della dimensione effettiva di popolazione

È stata calcolata la dimensione effettiva di popolazione con il software *NeEstimator* versione 2.1. (Do et al., 2013), con il *temporal method* (Nei & Tajima, 1981). Il tempo di generazione è stato stimato in 3 anni ed è stato calcolato il tempo intercorso tra i due gruppi, quello delle popolazioni campionate nel 2001 e nel 2002 e quello delle popolazioni campionate tra il 2019 e il 2021, sulla base del tempo di generazione stesso. Per calcolare il tempo intercorso tra i due gruppi in termini di tempo di generazione, l'anno 2001 è stato considerato come tempo 0, mentre come tempo 1 è stato considerato l'anno centrale (il 2020) tra quelli dei nuovi campionamenti, in quanto valore medio.

La grandezza di popolazione effettiva calcolata per questi due gruppi (considerando solo gli alleli con frequenza pari o superiore all'1%) è stata stimata, secondo il metodo di Nei & Tajima (1981), in 440.2 individui, con un intervallo di confidenza al 95%, calcolato con il metodo Jackknife (Do et al., 2013), compreso tra 198.3 e 1140.2 individui.

4.3.7 Stima dei sottogruppi familiari

Tramite il software *Colony* versione 2 (Jones & Wang, 2010), per ciascuno dei due gruppi relativi ai nuovi e ai vecchi campionamenti, è stato stimato il numero di fratelli (*fullsib*). Il software ha rilevato la presenza di 13 coppie di individui strettamente imparentati nel gruppo relativo alle popolazioni degli anni 2001 e 2002, comprendenti talvolta individui in comune per un totale di 23 individui diversi e di 65

coppie di individui strettamente imparentati nel gruppo relativo alle popolazioni degli anni 2019, 2020 e 2021 per un totale di 112 individui diversi (Tabella 20).

È possibile notare come la percentuale di individui imparentati sia in apparenza maggiore nel gruppo 2001-2002.

Tabella 20: Sono riportati per ciascuno dei due gruppi analizzati il numero totale dei campioni, il numero di confronti a coppie effettuati, il numero di fratelli identificati e il numero di individui non imparentati.

Gruppi	Campioni totali	Confronti a coppie	N° di fratelli	N° di individui non imparentati
2001-2002	96	4560	23	73
2019-2020-2021	947	447931	112	835

Per verificare la significatività di queste differenze e confrontare il numero di fratelli nelle due rispettive popolazioni, è stato effettuato un test del χ^2 per testare l'ipotesi nulla che il numero di individui non imparentati nelle due popolazioni non fosse diverso. Il test è stato effettuato online presso il sito <https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/> che permette di costruire una tabella di contingenza a due variabili e di effettuare il test. Il p-value associato al test è risultato significativo (p-value=0.0007) pertanto, i due gruppi differiscono nella percentuale di individui imparentati: il gruppo relativo ai campioni del 2001 e 2002 mostra in effetti una maggior frequenza di individui strettamente imparentati (23/96) rispetto al gruppo relativo ai campioni degli anni 2019, 2020 e 2021 (112/947)

5. DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi sono stati studiati i processi di differenziamento spaziale e temporale a livello genetico nelle popolazioni di *Z. ophiocephalus* nel Mar Adriatico settentrionale attraverso la genotipizzazione di 10 loci microsatellite di campioni provenienti dalle lagune di Venezia, Marano e Goro/Ferrara rappresentativi degli anni 2001-2002 e 2019-2021.

I risultati hanno rivelato la presenza di differenze genetiche significative tra campioni di popolazione. Non sono emerse differenze tra le popolazioni delle diverse lagune, mentre il differenziamento osservato è legato a differenze all'interno della Laguna di Venezia come confermato dal fatto che l'indice F_{ST} globale è risultato maggiore considerando solo i campioni provenienti dalla Laguna di Venezia. All'interno della Laguna di Venezia, le analisi su base geografica tra diversi siti di campionamento non hanno rilevato differenze significative, mentre sono state rilevate differenze tra campioni prelevati nel periodo 2001-2002 e nel periodo 2019-2021; pertanto, la variazione rilevata è dovuta esclusivamente alla presenza di differenze su base temporale. Le differenze temporali osservate in laguna di Venezia sono accompagnate da un pattern di IBT (*isolation by time*) in cui il differenziamento aumenta all'aumentare della distanza temporale tra campioni e, sorprendentemente, da un aumento della variabilità genetica e una riduzione dell'inbreeding e della proporzione di individui strettamente imparentati nei campioni più recenti. Infine, le differenze temporali osservate determinano una ridotta dimensione effettiva di popolazione, molto più piccola di quanto atteso sulla base dell'abbondanza della specie in Laguna di Venezia.

La specie analizzata, *Z. ophiocephalus*, è un gobide demersale di piccola taglia. Presenta uno stadio larvale pelagico di circa 26 giorni (Privileggi et al., 1997). Il maschio territoriale, generalmente di grandi dimensioni, costruisce un nido nel substrato fangoso all'interno della Laguna; quindi, rilascia lo sperma che si ancora ai rizomi delle fanerogame tramite un muco secreto dall'animale stesso. Le femmine depongono le uova nei dintorni dei nidi e queste vengono fecondate sia dallo sperma del maschio territoriale, che difende attivamente il nido, sia da maschi di dimensioni minori che adottano strategie di fecondazione alternative, detti *sneaker*. La neonata larva, fino a circa 26 giorni dalla schiusa, viene trasportata passivamente dalle correnti e dalle maree determinando, come in altre specie marine con stadio larvale planctonico, un'elevata dispersione (Malakoff, 1997)

È importante notare come, nel caso del gò, lo stadio larvale viene prodotto nei nidi che si trovano all'interno delle lagune e correnti e maree sono quindi responsabili del trasporto delle larve dalla laguna al mare e viceversa. Il fenomeno della dispersione a livello larvale gioca quindi un ruolo fondamentale in quanto determina il reclutamento, cioè l'ingresso di nuovi individui della nuova coorte a livello locale

e permette potenzialmente alle diverse popolazioni del bacino settentrionale del Mar Adriatico di rimanere in contatto; la presenza dei collegamenti tra mare e laguna risulta pertanto cruciale per il mantenimento del flusso genico ed eventuali interruzioni degli scambi, come accadrà in futuro con l'attivazione del sistema MOSE, possono causare importanti cambiamenti nel livello di variabilità genetica e nella connettività tra le diverse popolazioni.

I risultati dei confronti geografici non hanno rilevato differenze significative tra i campioni della Laguna di Venezia e i campioni provenienti dalle lagune di Marano e Goro/Ferrara. Le lagune di Marano, Venezia e Goro/Ferrara sono pertanto considerabili geneticamente omogenee in quanto i valori degli indici F_{ST} e F_{CT} , che permettono di stimare la variabilità genetica tra popolazioni e tra gruppi di popolazioni, calcolati confrontando i campioni provenienti da ciascuna laguna, non sono risultati significativi. Dal punto di vista geografico si esclude pertanto la presenza di un differenziamento genetico stabile tra questi sistemi lagunari.

Generalmente, dal punto di vista geografico, la popolazione di *Z. ophiocephalus* delle lagune di Marano, Venezia e di Goro/Ferrara, su una scala di circa 150 km, può quindi essere considerata panmittica, ovvero un'unica grande popolazione omogenea dal punto di vista genetico, come d'altronde saremmo normalmente portati a pensare per organismi marini aventi uno stadio larvale soggetto a dispersione (Palumbi 1992, 2003). Similmente, anche le analisi effettuate unicamente sui campioni provenienti dalla Laguna di Venezia, effettuate confrontando i campioni provenienti dai diversi siti, ne hanno verificato l'omogeneità genetica su base geografica.

La condizione di panmissia verificata per le popolazioni di *Z. ophiocephalus* provenienti dalle diverse lagune del Mar Adriatico settentrionale concorda con i risultati ottenuti da Papetti et al. (2013) e da Cavraro et al. (2017), in studi effettuati rispettivamente sullo sgombro (*Scomber scombrus*) e su *Aphanius fasciatus* nei quali è stata verificata la condizione di panmissia nella stessa area. Questa omogeneità genetica è principalmente dovuta al fatto che le larve sono trasportate passivamente dalle correnti e al carattere stocastico del fenomeno del reclutamento. Le larve appena nate vengono dalle correnti attraverso le bocche di porto fino al mare; qui, possono subire differenti destini dettati principalmente dal caso. Per esempio, possono essere reclutate all'interno della stessa Laguna in cui sono nate, magari

tramite un differente accesso, contribuendo a mantenere l'omogeneità all'interno del sistema lagunare stesso o possono venire trasportate anche per centinaia di chilometri fino a raggiungere altri sistemi lagunari contribuendo al flusso genico tra popolazioni e alla condizione generale di panmissia. Un'ulteriore ipotesi che spiega l'omogeneità genetica tra le popolazioni del bacino settentrionale dell'Adriatico fa riferimento alla sua storia idrogeologica: durante l'ultimo massimo glaciale, circa 18.000 anni fa, il suo bacino settentrionale non era invaso dall'acqua (Emiliani, 1955) e la costa si trovava circa 300 chilometri più a sud. Il livello dell'acqua si sarebbe innalzato solo alla fine del periodo glaciale, circa 10.000 anni fa e in questo ristretto arco di tempo, in popolazioni di grandi dimensioni, la deriva genetica potrebbe non essere stata una forza evolutiva sufficiente a determinare differenze genetiche significative tra sottopopolazioni. Questa ipotesi appare improbabile vista la piccola dimensione effettiva di popolazione rilevata in questa tesi.

Infine, l'omogeneità genetica rilevata potrebbe essere dovuta ad un potere risolutivo limitato dei marcatori utilizzati e a come questi non siano abbastanza informativi da permettere di discriminare differenze significative tra popolazioni; tuttavia, il fatto che in questa tesi siano state rilevate differenze tra campioni prelevati in diversi anni in laguna di Venezia, ed in un caso tra campioni interni alla laguna di Venezia, sembra indicare un potere risolutivo adeguato.

Infatti, nel confronto tra popolazioni entro la Laguna di Venezia, è stata rilevata una singola eccezione all'omogeneità su base spaziale: una singola popolazione, campionata nel sito LC3 nell'autunno dell'anno 2020, risultava significativamente diversa dal punto di vista genetico se confrontata con popolazioni campionate in siti diversi della Laguna, ma nello stesso anno e stagione. Questa singola eccezione può essere frutto di quel fenomeno definito *Chaotic genetic patchiness* (Johnson & Black, 1984) per il quale, anche in popolazioni apparentemente grandi, si possono manifestare divergenze genetiche locali dovuta a fenomeni legati alle caratteristiche ecologiche dei singoli microhabitat (gradienti di salinità o di altri fattori chimico-fisici che determinano un differenziale nella sopravvivenza della prole; Gillespie & Langley, 1974; Hedrick et al., 1976), o oceanografiche (come particolari caratteristiche dei flussi di marea e delle correnti che influenzano la provenienza di successive generazioni di larve; Johnson et al., 1984) così come per fenomeni quali il *natal homing* (Thorrold et al., 2001) e l'auto-reclutamento delle larve (Jones et al., 1999;

Swearer et al., 1999; Cowen et al., 2006; Ruzzante et al., 2006) che prevedono il ritorno di queste all'interno della popolazione nella quale sono nate. Un altro fenomeno importante è lo *sweepstakes reproductive success* che prevede, a causa della riproduzione differenziale degli individui, eventi di deriva genetica locale che possono contribuire all'eterogeneità genetica in una determinata area (Hedgecock, 1994).

Per quanto riguarda i confronti temporali, popolazioni campionate nella Laguna di Venezia in stagioni e anni diversi del periodo 2019-2021 non hanno rivelato differenze genetiche significative. Questa condizione di omogeneità può essere spiegata dalle caratteristiche biologiche di *Z. ophiocephalus* e in particolare dal suo lungo periodo riproduttivo che può arrivare a durare quattro anni (Gandolfi, 1991; Franco et al., 2012) e che determina la presenza di generazioni sovrapposte e non distinte tra loro. In conseguenza di ciò, è infatti possibile che un individuo possieda genitori provenienti da coorti diverse e che quindi le frequenze alleliche rilevate in diversi anni siano altamente correlate.

Il confronto temporale tra gli individui campionati nel triennio 2019, 2020 e 2021 e quelli campionati nel biennio 2001 e 2002 è invece risultato significativo. Il calcolo degli F_{ST} a coppie tra popolazioni ha suggerito l'esistenza di un pattern di *isolation by time* che è risultato significativo; in particolare, si osserva una correlazione significativa tra l'aumento della divergenza genetica e la distanza temporale tra le popolazioni. Tra i due gruppi è presente, inoltre, una differenza significativa nei valori medi dell'*allelic richness*, dell'eterozigosità osservata e dell'eterozigosità attesa che sono risultati significativamente maggiori nella popolazione più recente. Al contrario, il valore medio relativo al coefficiente di *inbreeding* F_{IS} è risultato significativamente maggiore nella popolazione dei campioni più vecchi.

La significatività della differenza del coefficiente di *inbreeding* F_{IS} nei due gruppi è coerente con i risultati delle analisi di parentela che hanno identificato la presenza di individui strettamente imparentati (*Full-sibs*) nei campioni analizzati ed hanno rivelato come il numero di individui non imparentati nel gruppo relativo ai campioni degli anni 2019, 2020 e 2021 sia significativamente maggiore rispetto al gruppo relativo ai campioni degli anni 2001 e 2002. I risultati delle analisi di parentela suggeriscono quindi la presenza di una struttura familiare nella popolazione della laguna di Venezia, inattesa viste le modalità di dispersione larvale passiva che,

come detto in precedenza, fanno presumere un elevato rimescolamento ed un elevato export del pool larvale, attraverso l'azione di correnti e maree.

Uno studio di Bernardi et al. su *Dascillus trimaculatus*, un pesce di barriera corallina che presenta uno stadio larvale pelagico attraverso il quale disperde, ha dimostrato come larve tra loro imparentate migrassero insieme durante tutto il loro ciclo pelagico e come venissero, in diversi casi, reclutate nella stessa popolazione. Gli autori suggeriscono come i risultati ottenuti supportino l'ipotesi che gli organismi posseggano meccanismi comportamentali che gli permettano di rimanere vicini durante la dispersione. In questo contesto, il rilevamento di *full-sibs* in *Z. ophiocephalus* potrebbe rappresentare una prima indicazione dell'importanza di meccanismi comportamentali a livello larvale in questa specie, anche se sarebbe importante nel futuro stimare, attraverso appropriate simulazioni di dispersione larvale (si veda ad es. Schiavina et al. 2014), la probabilità che fenomeni puramente passivi mantengano una qualche coesione a livello di parentela, ad esempio per il semplice fatto che larve rilasciate in uno specifico momento e da uno specifico nido potrebbero essere soggette a condizioni tidali ed oceanografiche simili che ne potrebbero determinare in qualche misura una dispersione collettiva come già ipotizzato per il fenomeno della *chaotic genetic patchiness*.

Questi risultati sono in contrasto con quanto atteso per una popolazione ideale panmittica di grandi dimensioni, nella quale la probabilità di rilevare individui strettamente imparentati dovrebbe essere molto bassa e che dovrebbe mantenersi stabile nel tempo in assenza di effetti di deriva genetica importanti. Al contrario, le osservazioni di variazione temporale significativa e di un pattern di *isolation by time* sono attese in caso di popolazioni di piccola dimensione e sono supportate dalla stima della dimensione effettiva di popolazione ottenuta in questo lavoro di tesi. La dimensione effettiva di popolazione è definita come la grandezza minima di una popolazione ideale caratterizzata dalla stessa varianza nelle frequenze alleliche e dallo stesso tasso di inbreeding di una popolazione reale. La popolazione in esame è risultata avere una dimensione effettiva di popolazione piuttosto piccola di circa 440 individui genetici con un intervallo di confidenza compreso tra i circa 200 e i 1400 individui, soprattutto se confrontata con la dimensione di popolazione censita che si aggira intorno ai 2 milioni di individui. La stima di questa grandezza assume un ruolo estremamente importante nella comprensione dello stato di conservazione

delle specie (Charlesworth, 2009); generalmente, valori di N_e superiori o al massimo pari a 50 sono considerati necessari per minimizzare gli effetti negativi a breve termine dell'*inbreeding*, mentre valori di N_e pari o superiori a 500 per mantenere un potenziale evolutivo sufficiente in ottica a lungo termine (Franklin, 1980; Soulé, 1980). Questi valori sono stati rivalutati nel tempo e nuove stime propongono valori di grandezza di popolazione effettiva compresi tra i 500 e i 1000 individui perché la popolazione sia in grado di mantenere un livello adeguato di variabilità genetica (Lande, 1995; Lynch, 1996; Lynch & Lande, 1998). La stima della dimensione effettiva ottenuta per il gò è in discordanza con il fatto che è stato rilevato un aumento di eterozigotità nel tempo tra i campioni del 2001 e del 2002 e quelli del triennio 2019, 2020, 2021; d'altra parte il limite inferiore dell'intervallo di confidenza risulta inferiore al limite minimo di grandezza effettiva di popolazione necessario per minimizzare la perdita di variabilità genetica pari a $N_e = 500$ e poco distante dal limite minimo del valore necessario per minimizzare gli effetti dell'*inbreeding*. Inoltre, la dimensione di popolazione effettiva risulta estremamente minore rispetto alla popolazione censita, cioè al numero totale di individui presenti. Anche se al momento non sono disponibili stime affidabili di *census size* per la specie, è possibile utilizzare i dati relativi allo sbarcato medio al mercato ittico di Chioggia (<https://chioggia.biologia.unipd.it/banche-dati/banca-dati-del-pescato/1945-oggi/>), che proviene dalla Laguna di Venezia e che pertanto rappresenta una frazione della popolazione reale, per avere almeno un'idea dell'ordine di grandezza della stessa. Lo sbarcato risulta pari a circa 45 tonnellate tra il 2020 e il 2021, biomassa che risulta pari a circa 2 milioni di individui considerando il peso medio di un individuo pari a 2.39 g indicando che la popolazione censita è sicuramente più grande di questo numero. Il rapporto tra popolazione effettiva e censita è quindi ragionevolmente molto più basso di 5×10^{-3} calcolato considerando un massimo di 1140 individui genetici diviso per un minimo di 2 milioni di individui censiti

Questa grande discrepanza risulta piuttosto comune per gli organismi marini che presentano normalmente tassi di $\frac{N_e}{N}$, inteso come il rapporto tra la popolazione effettiva e la popolazione censita, molto inferiori rispetto a quelli di altre popolazioni naturali (Frankham, 1995) principalmente in relazione al successo riproduttivo differenziale degli individui (Hedgecock, 1994). La popolazione *Z. ophiocephalus*, si comporta pertanto come una popolazione piccola da un punto di vista genetico,

supportando l'idea di una elevata complessità delle popolazioni reali di organismi marini e lagunari e contraddicendo le aspettative a priori legate all'abbondanza e alle stime della dimensione totale (Hauser & Carvalho, 1984).

6. CONCLUSIONE

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno rivelato la presenza di differenze genetiche significative tra popolazioni provenienti dalla Laguna di Venezia campionate a distanza di circa 19-20 anni di distanza l'una dall'altra. Questi dati, insieme alla stima di dimensione effettiva di popolazione ottenuta, risultata particolarmente bassa se confrontata con la popolazione censita, suggeriscono come la popolazione di gò della Laguna di Venezia risulti potenzialmente vulnerabile rispetto a cambiamenti che ne determinino la diminuzione della dimensione di popolazione. In particolare, eventuali riduzioni degli scambi mare-laguna, specialmente se localizzati temporalmente nel periodo successivo alla riproduzione, potrebbero precludere alle larve la possibilità di essere trasportate lontano in nuove popolazioni, o tramite il *self-recruitment*, di tornare nel loro stesso sito di nascita. Studi futuri sulla questione, su *Z. ophiocephalus* come su altri organismi, potranno verificare l'entità e le conseguenze di questo fenomeno anche e soprattutto in relazione alla messa in funzione del sistema MOSE.

7. BIBLIOGRAFIA

Amministrazione della provincia di Venezia (1981). La pesca nella Laguna di Venezia. Antologia storica di testi sulla pesca nella laguna, sulla sua legislazione, sul popolo, la lingua e il lavoro dei pescatori, sui pesci e sulla cucina. Abrizzi editore, Venezia, Italia.

Amos, W., Hoffman, J. I., Frodsham, A., Zhang, L., Best, S., Hill, A. V. S. (2007). Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes*, 7, 10-14.

- Baily, B. & Pearson, A. W. (2007). Change, detection, mapping and analysis of salt marsh areas of central southern England from Hurst Castel Spit to Pegham Harbour. *Journal of Coastal Research*, 23, 1549-1564.
- Baleo, J. N., Humeau, P., Cloirec, P. L. (2001). Numerical and experimental hydrodynamic studies of a lagoon pilot. *Water Research*, 35, 2268-2276.
- Basset, A., Elliott, M., West, R. J. & Wilson, J. G. (2013). Estuarine and lagoon biodiversity and their natural goods and services. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 132, 1-4.
- Bell, J. D. & Harmelin-Vivien, M. L. (1983). Fish fauna of French Mediterranean *Posidonia oceanica* seagrass meadows feeding habits. *Tethys*, 11, 1-14.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 57, 289-300.
- Bekkevold, D., Andre, C., Dahlgren, T. G., Clausen, L. A. W., Torstensen, E., Mosegaard, H., Carvalho, G. R., Christensen, T. B., Norlinder, E., Ruzzante, D. E. (2005). Environmental correlates of population differentiation in Atlantic herring. *Evolution*, 59, 2656-2668.
- Bernardi, G., Beldade, R., Holbrook, S. J., & Schmitt, R. J., (2012). Full-sibs in cohorts of newly settled coral reef fishes. *PLoS One* 7: e44953.
- Björklund, M. (2005). A method for adjusting allele frequencies in the case of microsatellite allele drop-out. *Molecular Ecology Notes*, 5, 676-679.
- Bowen, B. W., Bass, A. L., Muss, A., Carlin, J., Robertson, D. R. (2006). Phylogeography of two Atlantic squirrelfishes (Family Holocentridae): exploring links between pelagic larval duration and population connectivity. *Marine Biology*, 149, 899-913.
- Caballero, A. (1994). Developments in the prediction of effective population size. *Heredity*, 73, 657-679.
- Cavalli-Sforza, L. L. & Bodmer, W. F. (1973). *The genetics of human populations*; Wiley-Blackwell.
- Cavraro, F., Malavasi, S., Torricelli, P., Gkenas, C., Liouisia, V., Leonardos, I., Kappas, I., Abatzopoulos, T. J., & Triantafyllidis, A. (2017). Genetic structure of the South European

toothcarp *Aphanius fasciatus* (Actinopterygii: Cyprinodontidae) populations in the Mediterranean basin with a focus on the Venice lagoon. *The European Zoological Journal*, 84, 153-166.

Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N., Caskey, C. T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16, 11141-11156.

Charlebois, P. M., Marsden, J. E., Goettel, R. G., Wolfe, R. K., Jude, D. J. & Rudnika, S. (1997). The Round Goby, *Neogobius melanostomus* (Pallas), a review of European and North American literature. Zion, IL: Illinois-Indiana Sea Grant Program and Illinois Natural History Survey.

Charlesworth, B., (2009). Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics*, 10, 195-205.

Chen, G., Yuan, A., Shriner, D., Tekola-Ayele, F., Zhou, J., Bentley, A. R., Zhou, Y., Wang, C., Newport, M. J., Adeyemo, A. & Rotimi, C. N. (2015). An improved FST estimator. *PLoS One*, 10, e0135368.

Cordell, H. J. & Clayton, D. G. (2005). Genetic association studies. *Lancet* (London, England), 366(9491), 1121-1131.

Cowen, R. K., Paris, C. B. & Srinivasan, A. (2006). Scaling of connectivity in marine populations. *Science*, 311, 522-527.

Cucco, A., Umgiesser, G., (2006). Modeling the Venice Lagoon residence time. *Ecological modelling*, 193, 34-51.

Cushing, D. H. (1990). Plankton production and year-class strength in fish populations: an update of the Match/Mismatch Hypothesis. *Advances in Marine Biology*, 26, 249-293.

Day, J. W., Scarton, F., Rismondo, A., & Are D. (1998). Rapid Deterioration of a Salt Marsh in Venice Lagoon, Italy. *Journal of Coastal Research*, 14, 583-590.

Day, J. W., Rybczyk, J., Scarton, F., Rismondo, A., Are, D., Cecconi, G. (1999). Soil Accretionary Dynamics, Sea-Level Rise and the Survival of Wetland in Venice Lagoon: A Field and Modelling Approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 49, 607-628.

- De Wit, R. (2011). Biodiversity of coastal lagoon ecosystems and their vulnerability to global change. *Ecosystems Biodiversity*, eds O. Grillo and G. Venora (Rijeka: InTech), 29-40.
- DeWoody, J. A., Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56, 461-473.
- DeWoody, J., Nason, J. D. & Hipkins, V. D. (2006). Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Molecular Ecology Notes*, 6, 951-957.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*, 3, S30-S37.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillet, B. J., Ovenden, J. R. (2013). NeEstimator v2: re-implementation of software for estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14, 209-214.
- Dođo, Ž., Dulčić, J., Antolović, N., Marić, S. & Lončarić, Z. (2013). Age and growth determination of the grass goby (*Zosterisessor ophiocephalus*, Pallas, 1814) in the Novigrad Sea (Adriatic). 48. Hrvatski i 8. Međunarodni Simpozij Agronoma, Dubrovnik, Hrvatska, 17.-22. veljač 2013. Zbornik Radova, 629-632.
- Dolgii, V. N. (1962). Data on the biology of the Travyanik goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas) in the conditions of the Tuzlov group of estuaries. *Uchenye zapiski Kishinevskogo Universiteta*, 62, 129-135.
- Duarte, C. M. (1999). Seagrass ecology at the turn of the millennium: challenges for the new century. *Aquatic Botany*, 65, 7-20.
- Duarte, C. M. (2002). The future of seagrass meadows. *Environmental Conservation*, 29, 192-206.
- El Mousadik, A., Petit, R. J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92, 832-839.
- Eldon, B., Riquet, F., Yearsley, J., Jollivet, D., & Broquet, T. (2016). Current hypotheses to explain genetic chaos under the sea. *Current Zoology*, 62, 551-566.

- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5, 435-445.
- Elliott, M. & Hemingway, K. L. (2002). *Fishes in Estuaries*. Blackwell Science, UK.
- Emiliani, C. (1955). Pleistocene temperatures. *The Journal of geology*, 63, 538-578.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.
- Excoffier, L. (1995). *Analysis of Molecular Variance*, 1.55. University of Geneva, Geneva.
- Excoffier, L., Lischer, H. E., (2010). Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Excoffier, L., Lisher, H. (2015). *An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis*. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute of Ecology and Evolution. University of Berne.
- Favero, V., (1992). Evoluzione morfologica e trasformazioni ambientali dalla conterminazione lagunare al nostro secolo. In: *Conterminazione lagunare: storia, ingegneria, politica e diritto nella Laguna di Venezia*. Proceeding of the Conference “Convegno di studio nel bicentenario della conterminazione lagunare”, Venice, Italy, 14e16 March 1991. Istituto Veneto di Scienze Lettere ed Arti, Tipografia La Garangola, Padova, pp. 165 e 184.
- Ferrarin, C., Maicu, F., Umgiesser, G. (2017). The effect of lagoons on Adriatic Sea tidal dynamics. *Ocean Modelling*, 119, 57-71.
- Fisher, R. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Oxford University Press.
- Flint-Garcia, S. A., Thornsberry, J. M., Buckler, E. S. (2003). IV Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 357-374.
- Fontolan, G., Pillon, S., Bezzi, A., Villalta, R., Lipizer, M., Triches, A., & D'Aiotti, A. (2012). Human impact and the historical transformation of saltmarshes in the Marano and Grado Lagoon, northern Adriatic Sea. *Estuarine, coastal and shelf science*, 113, 41-56.

- Foulley, J., Ollivier, L. (2006). Estimating allelic richness and its diversity. *Livestock Science*, 101, 150-158.
- Franco, A., Franzoi, P., Malavasi, S., Riccato, F., Torricelli, P. (2006). Fish assemblages in different shallow water habitats of the Venice Lagoon. In: *Marine Biodiversity*. Springer, Dordrecht, pp. 159-174.
- Franco, A., Malavasi, S., Pranovi, F., Franzoi, P., Torricelli, P. (2012). Age and reproductive investment in grass goby females in the Venice lagoon. *Environmental Biology of Fishes*, 93, 419-425.
- Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. *Genetical Research*, 66, 95-107.
- Franklin, I. (1980). Evolutionary change in small populations. Pages 135–150 in M. E. Soulé and B. A. Wilcox, editors. *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Gallini, A. (2003). Biodiversità a livello molecolare in *Zosterisessor ophiocephalus* nella Laguna di Venezia. Tesi di laurea in Scienze Biologiche, Università degli studi di Padova, A.A. 2002/2003.
- Gallini, A., Zane, L., Bisol, P. M. (2005). Isolation and characterization of microsatellites in *Zosterisessor ophiocephalus* (Perciformes, Gobiidae). *Molecular Ecology Notes*, 5, 24-26.
- Gambi, M. C., Buia, M. C., Casola, E. & Scardi, M. (1989). Estimates of water movement in *Posidonia oceanica* beds: a first approach. International workshop on Posidonia beds (Vol. 2, pp. 101-112). Marseille: GIS Posidonie.
- Gandolfi, G. (1991). *I pesci delle acque interne italiane*. Istituto poligrafico e Zecca dello Stato, Libreria dello Stato.
- Garnier-Géré, P. & Chikhi, L. (2013). Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect. In *eLS* (John Wiley & Sons, Chichester, UK).
- Gillespie, J. H. & Langley, C. H. (1974). A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics*, 76, 837-848.

Goudet, J. (2003). FSTAT version 2.9.4: a program to estimate and test population genetics parameters. Updated from Goudet [1995].

Greenbaum, G., Templeton, A. R., Zarmi, Y., Bar-David, S. (2014). Allelic richness following population founding events—a stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift. PLoS One, 9, e115203.

Hartig, E. K., Kolker, A., Gornitz, V. (2002). Investigation into Recent Salt Marsh Losses in Jamaica Bay, New York. In: Integrated Reconnaissance of the Physical and Biogeochemical Characteristics of Jamaica Bay: Initial Activity Phase. New York: Gateway National Recreation Area and the Columbia Earth Institute, pp. 21-40.

Hauser, L., Cavalho, G. R. (2008). Paradigm shifts in marine fisheries genetics: ugly hypotheses slain by beautiful facts. Fish and Fisheries, 9, 333-362.

Hedgecock, D. (1994). Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: genetic and Evolution of Aquatic Organisms (ed. Beaumont AR), pp. 122-134.

Hedgecock, D., Pudovkin, A. I. (2011). Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. Bulletin of Marine Science, 87, 971-1002.

Hedrick, P. W., Ginevan, M. E. & Ewing, P. E. (1976). Genetic polymorphism in heterogeneous environments. Annual Review in Ecology and Systematics, 7, 1-32.

Hughes, R. A., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. Ecology Letters, 11, 609-623.

Huntley, M. & Golding, G. B. (2000). Evolution of simple sequence in proteins. Journal of Molecular Evolution, 51,131-140.

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

Jeudy de Grissac, A. & Boudouresque, C. F. (1985). Rôles des herbiers de phanérogames marines dans les mouvements des sédiments côtiers: les herbiers à *Posidonia oceanica*. Les aménagements côtiers et la gestion du littoral, Colloque pluridisciplinaire franco-japonais océanographie, 143-151.

- Johnson, M. S. & Black, R. (1984). Pattern beneath the chaos: the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. *Evolution*, 38, 1371-1383.
- Johnson, M., Wernham, J. (1999). Temporal variation of recruits as a basis of ephemeral genetic heterogeneity in the western rock lobster *Panulirus cygnus*. *Marine Biology*, 135, 133-139.
- Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevschi, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A. & Karp, A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3, 381-390.
- Jones, G. P., Milicich, M. J., Emslie, M. J. & Lunow, C. (1999). Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature*, 402, 802-804.
- Jones, O. R. & Wang, J. (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, 10, 551-555.
- Jørgensen, H. B. H., Hansen, M. M., Bekkevold, D., Ruzzante, D. E., Loeschcke, V. (2005). Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 14, 3219-3234.
- Kainz, P. (2000). The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494, 23-27.
- Katti, M. V., Sami-Subbu, R., Ranjekar, P. K. & Gupta, V. S. (2000). Amino acid repeat patterns in protein sequences: Their diversity and structural-functional implications. *Protein Science*, 9, 1203-1209.
- Kearney, M. S., Grace, R. E., Stevenson, J. C. (1988). Marsh loss in the Nanticoke Estuary, Chesapeake Bay. *Geographical Review*, 78, 205-220.
- Kim, T. K. (2015). T test as a parametric statistic. *Korean Journal of Anesthesiology*, 68, 540-546.
- Kirkpatrick, S., Gellatt, C.D., Vecchi, M.P. (1983). Optimization by simulated annealing. *Science*, 220, 671-680.

- Kjerfve, B. (1994). Coastal Lagoon Processes. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, xx + 577pp.
- Koehn, R. K., Newell, R. I. E., Immermann, F. (1982). Maintenance of an aminopeptidase cline by natural selection. Proceeding of the National Academy of Science USA, 77, 5385-5389.
- Korbie, D. J. & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nature Protocols, 3, 1452-1456.
- Lande, R. (1995). Mutation and conservation. Conservation Biology, 9, 782-791.
- Levins, R. (2020). Evolution in changing environments. In Evolution in Changing Environments. Princeton University Press.
- Levinson, G. & Gutman, G. A. (1987). High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Research, 15, 5323-5338.
- Losso, C. & Ghirardini, A. V. (2010). Overview of ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy). Environment International, 36, 92-121.
- Lynch, M. (1996) A quantitative-genetic perspective on conservation issues. In Conservation Genetics: Case Studies from Nature (Avise, J.C. and Hamrick, J.L. eds), pp. 471–501, Chapman and Hal.
- Lynch, M., & Lande, R. (1998). The critical effective size for a genetically secure population. In Animal Conservation forum (Vol. 1, No. 1, pp. 70-72). Cambridge University Press.
- Mackay, I., Powell, W. (2007). Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. Trends in Plant Science, 12, 7-63.
- Maes, G. E., Pujolar, J. M., Hellemans, B., Volckaert, F. A. M. (2006). Evidence for isolation by time in the European eel (*Anguilla Anguilla L.*). Molecular Ecology, 15, 2095-2107.
- Makova, K. D., Nekrutenko, A., Baker, R. J. (2000). Evolution of microsatellite alleles in four species of mice (genus *Apodemus*). Journal of Molecular Evolution, 51, 166-172.
- Malakoff, D. (1997) Extinction on the high seas. Science 277,486-488.

- Malavasi, S., Franco, A., Fiorin, R., Franzoi, P., Torricelli, P. & Mainardi, D. (2005). The shallow water gobiid assemblage of the Venice Lagoon: abundance, seasonal variation and habitat partitioning. *Journal of Fish Biology*, 67, 146-165.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, 209-220.
- Marino, I. A. M., Barbisan, F., Gennari, M., Giomi, F., Beltramini, M., Bisol, P. M. & Zane, L. (2010). Genetic heterogeneity in populations of the Mediterranean shore crab, *Carcinus aestuarii* (Decapoda, Portunidae), from the Venice Lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 87, 135-144.
- Mazzoldi, C., Scaggiante, M., Ambrosin, E. & Rasotto, M. B. (2000). Mating system and alternative male mating tactics in the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae). *Marine Biology*, 137, 1041-1048.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. (1996). A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142, 1061-1064.
- Molinaroli, E., Guerzoni, S., Sarretta, A., Masiol, M. & Pistolato, M. (2009). Thirty-year changes (1970 to 2000) in bathymetry and sediment texture recorded in the Lagoon of Venice sub-basins, Italy. *Marine Geology*, 258, 115-125.
- Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaee, M. J. & Rahbarizadeh, F. (2005). Modified Salting-Out Method: High-Yield, High-Quality Genomic DNA Extraction from Whole Blood Using Laundry Detergent. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 19, 229-232.
- Nei, M. (1973). Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 70, 3321-3323.
- Nei, M., Tajima, F. (1981). Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics* 98: 625-640.
- Nielsen, E. E., Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., Meldrup, D., Gronkjaer, P. (2003). Evidence of a hybrid-zone in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic and the Danish Belt Sea revealed by individual admixture analysis. *Molecular Ecology*, 12, 1497-1508.
- Ninni, E. (1941). L'importanza e la disciplina della pesca del ghiozzo-gò (*Gobius ophiocephalus*) nelle lagune venete. *Bollettino di Pesca, Piscicoltura e Idrobiologia*, 17, 355-369.

- Palumbi, S. R. (1992). Marine speciation on a small planet. *Trends in Ecology & Evolution*, 7, 114-118.
- Palumbi, S. R. (2003). Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13, 146-158.
- Papetti, C., Di Franco, A., Zane, L., Guidetti, P., De Simone, V., Spizzotin, M., Zorica, B., Čikeš Keč, V. & Mazzoldi, C. (2013). Single population and common natal origin for Adriatic Scomber scombrus stocks: evidence from an integrated approach. *ICES Journal of Marine Science*, 70, 387-398.
- Patwary, M. U., Kenchington, E. L., Bird, C. J., Zouros, E. (1994). The use of random amplified polymorphic DNA (RAPd) markers in genetic studies of the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *Journal of Shellfish Research*, 13, 547-553.
- Pauletto, M., Lopparelli, R. M., Pegolo, S., Armani, M., Zorzan, E., Giantin, M., Bertotto, D., Gallochio, F., Zancanella, V., Capolongo, F., Binato, G., Mutinelli, F. & Dacasto, M. (2019). Significance of the goby *Zosterisessor ophiocephalus* as a sentinel species for Venice Lagoon contamination: Combining biomarker responses and bioaccumulation. *The Science of the Total Environment*, 660, 959-973.
- Peakall, R., Smouse, P. E. & Huff, D. R. (1995). Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology*, 4, 135-148.
- Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C., Pérez-Ruzafa, I. (2011). Mediterranean coastal lagoons in an ecosystem and aquatic resources management context. *Physics and Chemistry of the Earth*, 36, 160-166.
- Pérez-Jiménez, M., Besnard, G., Dorado, G. & Hernandez, P. (2013). Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PLoS One*, 8, e70507.
- Phumichai, C., Phumichai, T. & Wongkaew, A. (2015). Novel chloroplast microsatellite (cpSSR) markers for genetic diversity assessment of cultivated and wild *Hevea rubber*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, 1486-1498.
- Pillon, S., Fontolan, G., Bezzi, A., Burla, I., Tessari, U., Simeoni, U., Zamariolo, A., Trombellini, E., Gabellini, M., 2003. A GIS-based morphological evolution of the Venice

Lagoon. In: VI International Conference on Mediterranean Coastal Environment Medcoast 03, 2, pp. 1269–1280.

Planes, S. & Lenfant, P. (2002). Temporal change in the genetic structure between and within cohorts of a marine fish, *Diplodus sargus*, induced by a large variance in individual reproductive success. *Molecular Ecology*, 11, 1515-1524.

Privileggi, N., Ota D. & Ferrero, E. A. (1997). Embryonic and larval development of the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae). *Italian Journal of Zoology*, 64, 201-207.

Pujolar, J. M., Locatello, L., Zane, L., Mazzoldi, C. (2012). Body size correlates with fertilization success but not gonad size in grass goby territorial males. *PLoS One*, 7, e46711.

Pusceddu, A., Gambi, C., Manini, E. & Danovaro, R. (2007). Trophic state, ecosystem efficiency and biodiversity of transitional aquatic ecosystems: analysis of environmental quality based on different benthic indicators, *Chemistry and Ecology*, 23, 505-515.

Ravens, T. M., Thomas, R. C., Roberts, K. A., Santschi, P. H. (2009). Causes of Salt Marsh Erosion in Galveston Bay, Texas. *Journal of Coastal Research*, 25, 265-272.

Ravera, O. (2000). The Lagoon of Venice: the result of both natural factors and human influence. *Journal of Limnology*, 59, 19-30.

Reed, S. C. & Brown, D. (1995). Subsurface Flow Wetlands: A Performance Evaluation. *Water Environment Research*, 67, 244-248.

Reise, K. (2012). Tidal flat ecology: an experimental approach to species interactions (Vol. 54). Springer Science & Business Media, pp.1-4.

Relethford, J. H. (2012). Human population genetics (Vol. 7). John Wiley & Sons, pp.247-249.

Richards, C. & Leberg, P. L. (1996). Temporal changes in allele frequencies and population's history of severe bottlenecks. *Conservation Biology*, 10, 832-839.

Romero, J., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Mateo, M. A. & Regnier, C. (1992). The detritic compartment in a *Posidonia oceanica* meadow: litter features, decomposition rates, and mineral stocks. *Marine Ecology*, 13, 69-83.

- Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106.
- Rubinsztein, D. C., Amos, W., Leggo, J., Goodburn, S., Jain, S., Li, S. H., Margolis, R. L., Ross, C. A., Ferguson-smith, M. A. (1995). Microsatellite evolution evidence for directionality and variation in rate between species. *Nature Genetics*, 10, 337-343.
- Ruzzante, D. E., Taggart, C. T. & Cook, D. (1999). A review of the evidence for genetic structure of cod (*Gadus morhua*) populations in the NW Atlantic and population affinities of larval cod off Newfoundland and the Gulf of St. Lawrence. *Fisheries Research*, 43, 79-97.
- Ruzzante, D. E., Mariani, S., Bekkevold, D., Andre, C., Mosegaard, H., Clausen, L. A. W., Dahlgren, T. G., Hutchinson, W. F., Hatfield, E. M. C., Torstensen, E., Brigham, J., Simmonds, E. J., Laikre, L., Larsson, L. C., Stet, R. J. M., Ryman, N. & Carvalho, G. R. (2006). Biocomplexity in a highly migratory pelagic marine fish, Atlantic herring. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 273, 1459-1464.
- Sarretta, A., Pillon, S., Molinaroli, E., Guerzoni, S., & Fontolan, G. (2010). Sediment budget in the Lagoon of Venice, Italy. *Continental Shelf Research*, 30, 934-949.
- Scaggiante, M., Mazzoldi, C., Petersen, C. & Rasotto, M. (1999). Sperm competition and mode of fertilization in the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae). *Journal of Experimental Zoology*, 283, 81-90.
- Schiavina, M., Marino, I. A. M., Zane, L., Melià, P. (2014). Matching oceanography and genetics at the basin scale. Seascape connectivity of the Mediterranean shore crab in the Adriatic Sea. *Molecular Ecology*, 23, 5496-5507.
- Schlötterer, C., Ritter, R., Harr, B., Brem, G. (1998). High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology of Evolution*, 15, 1269-1274.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5, 63-69.
- Selkoe, K. A., Gaines, S. D., Caselle, J. E., Warner, R. R., (2006). Current shifts and kin aggregation explain genetic patchiness in fish recruits. *Ecology*, 87, 3082-3094.

Sfriso, A., Ghetti, P. F. (1998). Seasonal variation in biomass, morphometric parameters and production of seagrasses in the lagoon of Venice, *Aquatic Botany*, 61, 207-223.

Sfriso, A., Facca, C., Marcomini, A. (2005). Sedimentation rates and erosion processes in the lagoon of Venice. *Environment International*, 31, 983-992.

Shimoda, N., Knapik, E. W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E., Kaplan, S., Jackson, D., De Sauvage, F., Jacob H. & Fishman, M. C. (1999). Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics*, 58, 219-232.

Shinde, D., Lai, Y., Sun, F. & Arnheim, N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:(CA/GT) n and (A/T) n microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 31, 974-980.

Siegel, D. A., Mitarai, S., Costello, C. J., Gaines, S. D., Kendall, B. E., Warner, R. R., & Winters, K. B. (2008). The stochastic nature of larval connectivity among nearshore marine populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 8974-8979.

Silvestri, S., Pellizzato, M., Boatto, V., 2006. Fishing across the centuries: what prospects for the Venice Lagoon? *Fondazioni Eni Enrico Mattei – Note di Lavoro 126.06*, Fondazione Eni Enrico Mattei, Milan, Italy, pp.43.

Slatkin, M. (2008). Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*, 9, 477-485.

Smith, J. & Haigh, J. (1974). The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetical Research*, 23, 23-35.

Soulé, M.E. (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. *Conservation Biology, an Evolutionary-Ecological Perspective* (eds M.E. Soule, & B.A. Wilcox), pp. 151-169. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Sponaugle, S., Cowen, R. K., Shanks, A., Morgan, S. G., Leis, J. M., Pineda, J., Boehlert, G. W., Kingsford, M. J., Lindeman, K. C., Grimes, C., & Munro, J. L. (2002). Predicting self-recruitment in marine populations: biophysical correlates and mechanisms. *Bulletin of Marine Science*, 70, 341-375.

Swearer, S. E., Caselle, J. E., Lea, D. W. & Warner, R. R. (1999). Larval retention and recruitment in an island population of a coral-reef fish. *Nature*, 402, 799-802.

- Thissen, D., Steinberg, L. & Kuang, D. (2002). Quick and Easy Implementation of the Benjamini-Hochberg Procedure for Controlling the False Positive Rate in Multiple Comparisons. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, 27, 77-83.
- Thorrold, S. R., Latkooczy, C., Swart, P. K. & Jones, C. M. (2001). Natal homing in a marine fish metapopulation. *Science*, 291, 297-299.
- Umgiesser, G. (1997). Modelling the Venice Lagoon. *International Journal of Salt Lake Research*, 6, 175-199.
- Van der Wal D. & Pye K. (2004). Patterns, rates and possible causes of saltmarsh erosion in the Greater Thames area. *Geomorphology*, 61, 373-391.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- Vendrami, D. L., Peck, L. S., Clark, M. S., Eldon, B., Meredith, M., Hoffman, J. I. (2021). Sweepstake reproductive success and collective dispersal produce chaotic genetic patchiness in a broadcast spawner. *Science Advances*, 7, eabj4713.
- Vieira, M. L., Santini, L., Diniz, A. L. & Munhoz C. D. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 312-328.
- Wang, J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*, 166, 1963-1979.
- Waples, R. S. (1998). Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*, 89, 438-450.
- Ward, R. D., Woodwark, M., Skibinski, D. O. F. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, fresh-water, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44, 213-232.
- Weersing, K. & Toonen, R. J. (2009). Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, 393, 1-12.
- Wolanski, E., Elliott, M. (2015). *Estuarine Ecohydrology. An Introduction*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.

Wright, S. (1965). The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution*, 19, 395-420.

Xu, J., Liu, L., Xu, Y., Chen, C., Rong, T., Ali, F., Zhou, S., Wu, F., Liu, Y., Wang, J., Cao, M., Lu, Y. (2013). Development and characterization of simple sequence repeat markers providing genome-wide coverage and high resolution in maize. *DNA Research*, 20, 497-509.

Yearsley, J. M., Viard, F., Broquet, T. (2013). The effect of collective dispersal on the genetic structure of a subdivided population. *Evolution*, 67, 1649-1659.

Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1-16.

Zhang, L., Yuan, D., Yu, S., Li, Z., Cao, Y., Miao, Z., Qian, H. & Tang, K. (2004). Preference of simple sequence repeats in coding and non-coding regions of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, 20, 1081-1086.

8. SITOGRAFIA

http://www.ittiofauna.org/webmuseum/pesciossei/percifomes/gobidae/zosterisessor/zosterisessorophiocephalus/z_ophiocephalus_01.htm

<http://www.fishbase.org/>

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

<https://www.bmr-genomics.it/>

<https://genepop.curtin.edu.au/>

<https://chioggia.biologia.unipd.it/banche-dati/banca-dati-del-pescato/1945-oggi/>

<https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/>