



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato di Ricerca in Scienze Ecologiche

XXIII ciclo

**Caratterizzazione ultrastrutturale e molecolare di
esemplari mediterranei dei generi
Hydrolithon e *Pneophyllum* (Corallinales, Rhodophyta)**

Dottoranda

Dott.ssa Sara Mancini

Matricola n°687556

Docente Guida

Prof.ssa Nadia Abdelahad

Dip. Biologia Ambientale

INDICE

1.	Introduzione	p. 1
2.	DNA Barcoding	3
	2.1 Il DNA Barcoding per le alghe	5
3.	Caratteristiche morfologiche delle Corallinali non articolate	7
	3.1 Anatomia del tallo	7
	3.2 Tricociti	9
	3.3 Riproduzione	10
	3.4 Germinazione delle spore	12
4	Sistematica e filogenesi delle Corallinali	14
	4.1 La sottofamiglia Mastophoroideae	16
5.	Obiettivi della ricerca	17
6.	Materiali e metodi	18
	6.1 Stazioni di raccolta	18
	6.2 Analisi morfologica	19
	6.3 Analisi molecolare	21
7.	Risultati e discussione	24
	Genere <i>Hydrolithon</i>	25
	<i>Hydrolithon</i> sp.	26
	Complesso <i>Hydrolithon cymodoceae/Hydrolithon cruciatum</i>	31
	<i>Hydrolithon boreale</i>	35
	<i>Pneophyllum coronatum</i>	37
	Conclusioni	39
	Bibliografia	40
	Appendice	I

1.Introduzione

Le alghe rosse (Rhodophyta) comprendono un gruppo molto antico di organismi che vanno da forme unicellulari a forme pluricellulari complesse, diffuse essenzialmente nell'ambiente marino (pochissime sono le forme di acqua dolce). Sono state descritte circa 6000 specie in tutto il mondo, alcune delle quali importanti economicamente.

Le alghe rosse sono difficili da determinare, anche per tassonomi esperti, a causa della loro morfologia e anatomia semplice e convergente, della loro plasticità fenotipica e della loro alternanza di generazioni eteromorfe (spesso una sola delle fasi vitali è nota) (Clarkston & Saunders 2010).

L'ordine delle Corallinales è considerato, "dal punto di vista tassonomico, il più difficile e problematico delle Rhodophyta" (Steneck, 1986; Woelkerling, 1988). Le difficoltà tassonomiche risiedono, in parte, nella variabilità di alcuni caratteri diagnostici, da imputare, secondo alcuni Autori, a fattori ambientali (Chamberlain, 1977, 1985; Jones & Woelkerling, 1984; Irvine & Chamberlain, 1994).

Le difficoltà nella identificazione, sia in campo vegetale che animale, hanno condotto alla ricerca di un nuovo tipo di approccio: l'uso di marcatori molecolari. Molti *marker* sono stati usati in tassonomia (Provan *et al.* 2004). Sebbene si siano dimostrati utili per l'identificazione a livello specifico, alcuni sono risultati troppo lunghi e richiedono diverse coppie di *primers* per ottenere la sequenza completa (Robba *et al.* 2006). Inoltre l'uso di *marker* differenti nei diversi laboratori rendeva difficile confrontare i dati ottenuti nei diversi studi (Saunders 2005). Si è reso pertanto necessario l'uso di un marcatore universale. Studi recenti hanno mostrato che il gene COI codificante la prima subunità della citocromo *c* ossidasi è un ottimo *marker*

per l'identificazione molecolare. Questo argomento sarà trattato in modo dettagliato nel paragrafo successivo.

2. DNA *Barcoding*

Lo studio della diversità biologica attraverso l'approccio morfologico, la *alfa* tassonomia, presenta alcuni limiti. Spesso la variabilità genetica e la plasticità fenotipica dei caratteri usati per la determinazione possono condurre a un'identificazione non corretta. L'approccio morfologico, inoltre, non è in grado di discriminare le specie criptiche (comuni in molti gruppi di organismi). Le chiavi dicotomiche richiedono spesso un alto livello di specializzazione da parte dell'utilizzatore e sono utili, talora, solo per un particolare stadio vitale o per un solo sesso (Hebert *et al.* 2003a). Molti organismi non sono quindi identificabili. La determinazione delle specie in base solo a caratteri morfologici presenta pertanto dei limiti che hanno condotto a ricercare nuovi approcci, basati sull'uso di marcatori molecolari.

Lo sviluppo di tecniche di amplificazione del DNA mediante la PCR (*polymerase chain reaction*) ha accresciuto le applicazioni delle tecniche molecolari in tutti i campi della sistematica. L'uso di piccoli frammenti del genoma rappresenta un approccio molto promettente per la diagnosi della diversità biologica. Alcuni piccoli frammenti di DNA variano poco all'interno di una stessa specie e di più tra specie diverse. Molti marcatori sono stati usati per l'identificazione molecolare, ma la mancanza di un marcatore standard rendeva difficile il confronto tra i risultati diversi ottenuti. Pertanto era necessario trovare un *marker* applicabile universalmente a tutti gli organismi viventi.

Studi effettuati da Hebert *et al.* (2003a, b) hanno stabilito che il DNA mitocondriale è uno tra i migliori candidati per la identificazione delle specie nel mondo animale. Il DNA mitocondriale è, generalmente privo di introni, è poco esposto a ricombinazione ed è ereditato in modo aploide per via materna. Inoltre è molto conservativo sia nel contenuto sia nell'ordine dei

geni. Il gene scelto è quello codificante la prima subunità della citocromo *c* ossidasi (COI o *cox1*), un enzima coinvolto nella catena di trasporto degli elettroni durante la respirazione cellulare. Il COI sembra avere un ampio *range* di segnale filogenetico. Sia le delezioni sia le inserzioni sono rare e ciò facilita il confronto delle sequenze (Hebert *et al.*, 2003a, b). Il frammento del gene mitocondriale COI selezionato come barcode, cioè l'estremità 5', è un frammento molto piccolo di DNA (circa 700 paia di basi) che può essere facilmente amplificato con un unico set di *primers*. Richiede tuttavia *primers* specifici per ogni gruppo.

Le sequenze del gene COI-5' possono essere viste come dei codici a barre impressi in ogni cellula, da cui *barcoding*.

La capacità del COI-5' di discriminare gli organismi viventi è stata testata con successo sulla classe Esapoda (*Phylum Arthropoda*) e in seguito su tutti i *phyla* animali, confermando la capacità del gene di discriminare le specie, esclusi i Celenterati (Hebert *et al.* 2003a, b). In seguito si è sperimentata la validità del COI-5' su altri tipi di organismi: piante, macroalghe (Saunders 2005), funghi, protisti e batteri. Non per tutti è risultato utile: il COI-5' non sembra appropriato per le piante a causa del loro tasso di evoluzione più basso rispetto a quello degli animali (Hajibabaei *et al.* 2007). Pertanto, per le piante a fiore, è stato proposto come marcatore l'ITS e i geni plastidiali *trnH-psbA*.

I vantaggi del DNA *barcoding* sono molteplici: l'identificazione tassonomica è possibile anche per frammenti di organismi e per qualsiasi stadio vitale di uno stesso organismo. In questo modo è possibile riconoscere gli stadi vitali di una stessa specie.

Il DNA *barcoding* non sostituisce il sistema linneano di classificazione; il suo scopo non è creare un sistema di classificazione basato esclusivamente sul DNA. Lo scopo è di aiutare l'identificazione di nuove specie nell'ambito di *taxa* ancora non ben definiti. Le nuove specie scoperte dovranno sempre possedere un nome in base al sistema linneano di classificazione, essere studiate accuratamente con immagini ad alta risoluzione di alcuni esemplari,

ed essere accompagnate da informazioni precise sui siti di raccolta. Il DNA barcoding non segna pertanto la fine dell'*alfa* tassonomia ma la assiste e la coadiuva: il DNA barcoding ha pertanto valore solo se accompagnato da una corretta tassonomia tradizionale (Hebert *et al.* 2005, Schander & Willassen 2005). Lo studio molecolare è efficiente, infatti, solo quando è possibile il confronto tra l'esemplare sconosciuto oggetto dello studio e un esemplare di riferimento ben descritto dal punto di vista tassonomico, morfologico ed ecologico (Dupont *et al.* 2007).

Inoltre includendo una sequenza standard di riferimento per ogni specie descritta, è possibile condurre uno studio ecologico più esauriente (Clarkston & Saunders 2010). Lo studio dei sistemi ecologici non può prescindere infatti da una corretta identificazione degli organismi viventi che li compongono.

Le applicazioni ecologiche per l'ambiente marino sono molteplici. Il DNA *barcoding* consentirà di risolvere i problemi tassonomici delle specie più problematiche (Dupont *et al.* 2007). Sarà utile soprattutto ai non specialisti, che saranno in grado di discriminare i *taxa* difficili da determinare (Schander & Willassen 2005). E' strumento promettente, inoltre, per monitorare le specie invasive (Savolainen *et al.* 2005) e si è dimostrato efficace anche negli studi di genetica di popolazione (Hajibabaei *et al.* 2007).

2.1 Il DNA *Barcoding* per le alghe

L'uso del gene COI-5' si è dimostrato valido sia per le alghe rosse (Saunders 2005, 2008; Robba *et al.* 2006; Le Gall & Saunders 2010a, b) sia per le alghe brune (Lane *et al.* 2007; Kucera & Saunders 2008; McDevitt & Saunders 2009, 2010).

Il primo studio sulle alghe rosse è stato condotto, con successo, da

Saunders (2005) su 15 famiglie appartenenti a 6 ordini di Floridophyceae. Lo studio ha evidenziato che il COI-5' é un marcatore genetico potente per la identificazione delle specie di macroalghe rosse.

Uno studio successivo condotto da Robba *et al.* (2006) su sei ordini di alghe rosse ha confermato che l'uso del COI-5' consente di discriminare bene le specie. Inoltre, lo studio ha evidenziato che il COI-5' è più sensibile della RUBISCO nel rilevare una speciazione in corso e la presenza di specie criptiche.

Per le alghe rosse, quindi, il COI-5' si è dimostrato ottimo strumento di discriminazione ed è accettato dal CBOL (*Consortium of Barcoding of Life*).

3. Caratteristiche morfologiche delle Corallinali non articolate

3.1 Anatomia del tallo

Nelle Corallinali non articolate la struttura anatomica è di tipo dorsoventrale. L'accrescimento del tallo si compie per intervento di due meristemi: il meristema apicale o terminale, e il meristema intercalare (vedi Fig. 1A). Quest'ultimo si origina per mezzo di divisioni periclinali delle cellule del meristema apicale. Il meristema apicale permette l'espansione orizzontale del tallo, il meristema intercalare assicura la crescita in spessore.

In una sezione longitudinale del tallo è possibile distinguere le diverse parti: l'ipotallo, l'epitallo e il peritallo.

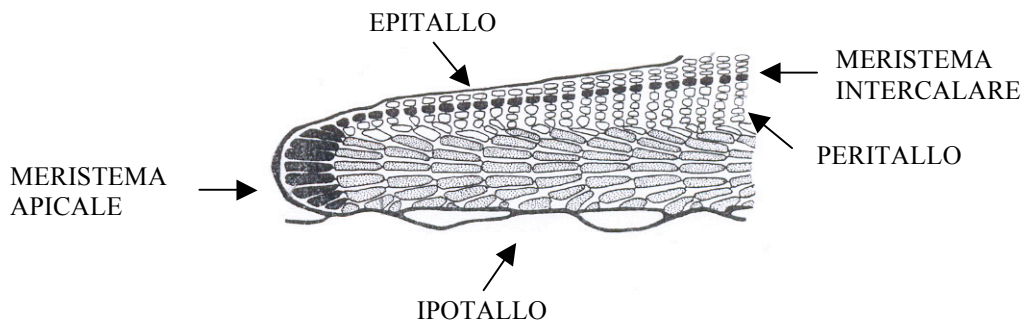


Fig. 1A. Anatomia del tallo delle Corallinali non articolate (da Bold & Wynne, 1978)

L'ipotallo si origina per divisioni anticlinali delle cellule del meristema apicale. E' costituito di filamenti orientati più o meno orizzontalmente rispetto al substrato e può essere mono o pluristromatico.

Le cellule dell'epitallo e del peritallo si formano per divisioni del meristema intercalare. Il peritallo è costituito di filamenti orientati verticalmente rispetto al substrato. Le cellule dell'epitallo differiscono morfologicamente da quelle dell'ipotallo e da quelle del peritallo e, in alcuni casi, non sono calcificate.

La terminologia tradizionalmente usata assegna alle parti del tallo descritte nomi in relazione al loro orientamento rispetto al substrato. Woelkerling (1988) ha proposto una terminologia diversa, basata sull'origine dei filamenti piuttosto che sul loro orientamento, ma le strutture identificate sono le stesse. Su questa base, l'organizzazione del tallo delle Corallinali non articolate viene distinta in due morfologie diverse: dimera e monomera (vedi Bressan & Babbini, 2003: 25 e Fig. 2A).

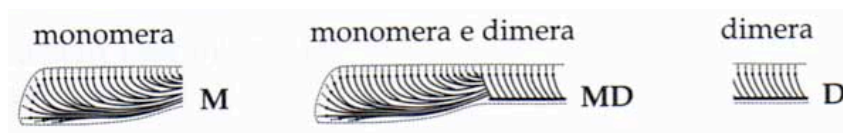


Fig. 2A. Talli monomeri e talli dimeri (da Bressan & Babbini, 2003)

Nei talli dimeri si possono distinguere due gruppi di filamenti orientati più o meno perpendicolarmente l'uno rispetto all'altro, chiamati in Woelkerling (1988), *primigenous* e *postigenous*

Nei talli monomeri si può distinguere un singolo sistema di filamenti ripetutamente ramificati. I filamenti più interni formano la *medulla* (indicata con il termine "*core filaments*" in Woelkerling, 1988), orientata più o meno

parallelamente alla superficie del tallo. Altri filamenti s'incurvano verso l'esterno formando il *cortex* (o "*peripheral derivatives of core filaments*" in Woelkerling, 1988). Alcuni talli sono esclusivamente dimeri mentre altri esclusivamente monomeri, ma è possibile individuare un *continuum* tra talli monomeri e dimeri per la presenza di strutture di passaggio. Nelle specie appartenenti ai generi *Hydrolithon* (Foslie) Foslie e *Pneophyllum* Kützing si possono riscontrare i due tipi di tallo, ma la struttura dimera è la più frequente.

3.2 Tricociti

I tricociti sono formazioni pilifere superficiali ottenute per divisione di una cellula peritallica in due - talora più - cellule, di cui la superiore rappresenta l'iniziale del pelo. Questa cellula si trasforma in un pelo più o meno lungo, privo di nucleo, con parete non calcificata e citoplasma occupato da un grande vacuolo, che rimane collegato alla cellula da cui ha avuto origine (Cabiocch 1971, vedi Fig. 3A).

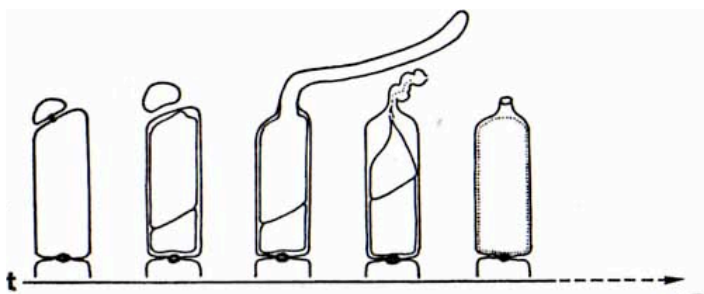


Fig. 3A. Formazione dei tricociti (da Cabiocch, 1971)

I tricociti possono essere disposti in modo diverso sul tallo delle Corallinali. Possono essere intercalari o terminali, singoli o in gruppi

orizzontali (“*horizontal fields*”, “*horizontal rows*”) o verticali (“*vertical series*”) (Woelkerling 1988, Womersley 1996). Gli “*horizontal fields*” differiscono dagli “*horizontal rows*” per avere filamenti vegetativi tra i tricociti (Woelkerling 1988, Penrose & Woelkerling 1988). I tricociti terminali si formano all’estremità di filamenti di cellule ipotalliche che, pertanto, non possono più dividersi. I tricociti intercalari si formano in mezzo ad una fila di cellule che prosegue normalmente la sua divisione (Cabioch, 1971). I tricociti intercalari possono sprofondare nel tallo in seguito all’accrescimento vegetativo di questo, o possono anche tornare ad essere cellule vegetative ordinarie (Woelkerling 1988). Il pelo è caduco, pertanto, in molti casi, non è più presente ma è riconoscibile la sua cicatrice.

La disposizione dei tricociti ha valore tassonomico. In particolare, nel genere *Pneophyllum*, i tricociti sono intercalari e singoli, mentre nel genere *Hydrolithon* sono terminali, singoli e/o riuniti in file verticali (“*vertical series*”) od orizzontali (“*horizontal rows*”) (Penrose & Woelkerling 1988). La loro presenza/assenza è stata messa in relazione con fattori ambientali, in particolare, luce e temperatura (Chamberlain, 1977, 1985; Jones & Woelkerling, 1984).

3.3 Riproduzione

Il ciclo biologico delle Corallinali è, come quello di molte alghe rosse, trigenetico aplo-diplo-diploide con alternanza di una generazione gametofitica aploide e di due generazioni sporofitiche diploidi, il carposporofito e il tetrasporofito. Le cellule riproduttive si formano all’interno di concettacoli, costituiti di una camera, un pavimento e un tetto.

In *Hydrolithon* e *Pneophyllum* tutti i concettacoli, compresi quelli tetrasporangiali, sono unipori, carattere questo tipico della sottofamiglia

Mastophoroideae.

I talli sessuati sono monoici o dioici. La condizione monoica o dioica, nelle alghe, è generalmente ritenuta carattere diagnostico di specie distinte. Alcuni AA., tuttavia, riportano, entrambe le condizioni per una stessa specie [ad esempio, nelle Corallinali, per *Melobesia membranacea* (Esper) Lamouroux (vedi Irvine & Chamberlain, 1994)]. Per alcune specie monoiche, si segnala la presenza anche di talli solo spermatangiali, come ad esempio per *H. boreale* (Irvine & Chamberlain 1994), o di talli solo carposporangiali, come ad esempio per *Pneophyllum fragile* (Irvine & Chamberlain 1994).

Nei concettacoli spermatangiali, piccoli e adiacenti a quelli carposporangiali, spesso è visibile lo *spout*, struttura che facilita l'espulsione degli spermazi. I rami spermatangiali, non ramificati, si dipartono dal pavimento del concettacolo.

Anche i rami carpogoniali si dipartono dal pavimento del concettacolo femminile. Sono costituiti di due cellule che si dipartono da una cellula basale che funziona da cellula ausiliaria. La cellula terminale è il carpogonio. Dopo la fertilizzazione, le cellule ausiliarie di uno stesso concettacolo si fondono tutte in una unica grande cellula di fusione dalla quale si sviluppa il carposporofito.

I concettacoli tetrasporangiali contengono generalmente da uno a più tetrasporangi. Il canale del poro dei concettacoli tetrasporangiali e carposporangiali è delimitato da cellule ingrossate e disposte verticalmente nel genere *Hydrolithon*, mentre, nel genere *Pneophyllum*, queste cellule sono disposte, almeno all'inizio dello sviluppo del concettacolo, più o meno parallelamente al concettacolo (Irvine & Chamberlain 1994; Womersley 1996). Spesso è presente una columella centrale.

In alcune specie si sviluppano concettacoli bisporangiali, simili a quelli tetrasporangiali, contenenti due bispore uninucleate diploidi, che possono riprodurre vegetativamente talli diploidi bisporangiali (Irvine & Chamberlain 1994).

La riproduzione vegetativa può avvenire anche mediante *propaguli*, oppure mediante frammentazione del tallo. I *propaguli* sono cellule

vegetative che formano una struttura morfologicamente ben distinta (Woelkerling 1988). Sono stati segnalati per *Hydrolithon farinosum* (J.V. Lamouroux) Penrose & Y.M. Chamberlain e *Pneophyllum fragile* Kützing. La frammentazione del tallo, molto frequente nelle specie a tallo libero (rodoliti), è stata rinvenuta da Woelkerling (1988) anche in *Hydrolithon* e *Pneophyllum*.

3.4 Germinazione delle spore

Nelle Corallinali, la germinazione delle spore avviene in modo simile a quello della maggior parte delle Florideophyceae, per lo meno nelle prime fasi dello sviluppo (Cabioch 1972). Le carospore e le tetraspore germinano allo stesso modo (Cabioch 1972) con un processo che inizia subito dopo la loro liberazione anche se non ancora fissate al substrato. In generale, per fissarsi al substrato, le spore secernono una sostanza adesiva mucopolisaccaridica che forma rapidamente un alone attorno alla spora stessa (Chamberlain 1984, Steneck 1986).

La germinazione della spora porta alla formazione di quello che viene comunemente chiamato “disco germinativo” in cui si riconoscono cellule “centrali” e cellule “pericentrali”. La disposizione e il numero di queste cellule è considerato carattere tassonomico a livello specifico (Irvine & Chamberlain, 1994).

Diversi tipi di germinazione dei dischi sono stati descritti nelle Corallinali. Chemin (in Chamberlain, 1984) descrive un primo tipo, *Dumontia*, nel quale le spore si dividono per formare un disco di 32 cellule. Successivamente, Cabioch (1972) osserva l'esistenza di due tipi di germinazione nelle Corallinali, il tipo *Dumontia* e il tipo *Naccaria*. Il tipo *Naccaria*, già osservato da Chemin per altri gruppi di alghe rosse, consiste di

divisioni irregolari di spore che in generale non si fissano ad un substrato. Questo tipo è caratteristico di generi parassiti endofiti o semi endofiti ed è stato anche osservato in esemplari di *Hydrolithon farinosum* cresciuti in coltura a partire da spore non attaccate ad un substrato. All'interno del tipo *Dumontia* sono riconoscibili tre modalità di sviluppo: la modalità *Lithothamnium*, la modalità *Neogoniolithon*, al può ricondursi lo sviluppo delle spore nel genere *Hydrolithon*, e la modalità *Lithophyllum*, al quale può ricondursi lo sviluppo delle spore nel genere *Pneophyllum*.

Chihara (1974) rinviene, nelle Corallinali, modalità di germinazione della spora riconducibili a quelle già descritte da Cabioch (1972).

Bressan (1980) descrive una decina di variazioni del tipo *Dumontia*, raggruppabili in tre gruppi principali. Inoltre rileva che il tipo di segmentazione della spora è genotipicamente determinato ed ha quindi importanza dal punto di vista filogenetico.

Chamberlain (1984 e 1994) porta un contributo importante alla definizione dei dischi germinativi delle Corallinali. Descrive un primo tipo con un disco centrale di quattro cellule, un secondo tipo con un disco centrale di otto cellule e un terzo tipo con un disco centrale composto anche da 56 cellule. Il primo tipo è caratteristico del genere *Hydrolithon*, il secondo del genere *Pneophyllum*. Jones & Woelkerling (1984) osservano, in colture di spore di *Pneophyllum zonale* (P.L. et H.M. Crouan) Y.M. Chamberlain sottoposte a condizioni diverse di luce e temperatura, che la loro germinazione può portare, oltre che alla formazione di dischi di germinazione regolari, anche di dischi aberranti, con cellule disposte irregolarmente e, addirittura, anche allo sviluppo di talli senza la formazione di dischi germinativi. Importante è tuttavia l'osservazione che, anche nei casi in cui si formano dischi aberranti, *Hydrolithon* non presenta mai un disco con otto cellule centrali né *Pneophyllum* un disco con quattro cellule centrali (Jones & Woelkerling 1984). Anche Chamberlain (1984) aveva osservato che, in nessun caso, un individuo appartenente a uno di questi generi presentava una segmentazione tipica di un altro genere.

4. Sistematica e filogenesi delle corallinali

Uno studio recente sulla filogenesi delle alghe appartenenti alla classe Florideophyceae (Le Gall & Saunders, 2007) ha rilevato un forte legame tra gli ordini Corallinales e Rhodogorgonales, tanto da includerli nella nuova sottoclasse Corallinophycidae Le Gall *et* Saunders. Questi due ordini sono unici tra le alghe marine per la presenza di calcite e per presentare *pit plugs* con calotte esterne a cupola (Pueschel, 1989).

L'ordine Corallinales era suddiviso in tre famiglie: Corallinaceae, Hapalidiaceae e Sporolithaceae (Harvey *et al.* 2003). Uno studio condotto sul gene 18S del rDNA ha confermato la famiglia Hapalidiaceae per le alghe appartenenti alle sottofamiglie Choreonematoideae, Melobesioideae, e Austrolithoideae ma messo in discussione la posizione tassonomica della famiglia Sporolithaceae (Harvey *et al.* 2003). Il genere *Sporolithon* Heydrich (1897), il quale comprende attualmente 20 specie (Guiry M.D. & Guiry G.M., 2010), è stato dapprima incluso nelle Melobesioideae (Johansen, 1969), poi nella sottofamiglia delle Sporolithoideae (Cabioch, 1972), ed infine, da Verheij (1993) elevato al rango di famiglia per la presenza di tetrasporangi a divisione crociata. Alla famiglia Sporolithaceae, è stato in seguito riferito un secondo genere, *Heydrichia* R.A. Townsend *et al.* (Townsend *et al.*, 1994). Harvey *et al.* (2002) hanno evidenziato lo stretto legame tra le Sporolithaceae e *Rhodogorgon carriebowensis* J.N. Norris and Buchner (Rhodogorgonales) confermato da una recente analisi filogenetica condotta su *Sporolithon* (Le Gall *et al.*, 2007). Sulla base di questi studi, la famiglia Sporolithaceae non può più appartenere all'ordine delle Corallinales essendo un *taxon* monofiletico appartenente all'ordine Sporolithales, proposto da Le Gall *et al.* (2007), che si posiziona all'interno della sottoclasse Corallinophycidae. Pertanto, alla sottoclasse Corallinophycidae appartengono attualmente tre ordini ben

distinti, sia dal punto di vista genetico che morfo-anatomico: Corallinales, Rhodogorgonales e Sporolithales (vedi Tab. 1A) .

ordine	famiglia	sottofamiglia
Corallinales	Corallinaceae	Amphiroideae
		Corallinoideae
		Lithophylloideae
		Mastophoroideae
		Metagoniolithoideae
Sporolithales	Hapalidiaceae	Melobesioideae
	Sporolithaceae	
Rhodogorgonales	Rhodogorgonaceae	

Tab.1A. Schema riassuntivo della sottoclasse Corallinophycidae

L'ordine Rhodogorgonales comprende una sola famiglia e due specie segnalate per i Mar dei Caraibi e la Polinesia. Nel Mediterraneo sono presenti gli ordini Corallinales e Sporolithales (Bressan & Babbini, 2003; Furnari *et al.* 2003).

La famiglia Corallinaceae comprende 5 sottofamiglie (vedi Tab 1A): Amphiroideae, Corallinoideae, Lithophylloideae, Mastophoroideae, Metagoniolithoideae, tutte rappresentate nel Mar Mediterraneo.

I generi *Hydrolithon* e *Pneophyllum*, oggetto del mio studio, appartenengono alla sottofamiglia Mastophoroideae.

4.1 La sottofamiglia Mastophoroideae

Alla sottofamiglia Mastophoroideae Setchell (Corallinaceae, Rhodophyta) appartengono, sulla base dei caratteri vegetativi e riproduttivi (Penrose & Chamberlain 1993; Harvey & Woelkerling 1995), otto generi: *Hydrolithon* Foslie, *Lesueuria* Woelkerling & Ducker, *Lithophorella* (Foslie) Foslie, *Mastophora* J. Decaisne, *Metamastophora* Setchell, *Neogoniolithon* Setchell & L.R. Mason, *Pneophyllum* Kützing e *Spongites* Kützing.

Questa sottofamiglia, riconosciuta da Woelkerling (1988) come una delle otto sottofamiglie delle Corallinaceae, non è invece riconosciuta da Cabioch (1971, 1972, 1988) che include *Lithoporella*, *Mastophora*, *Metamastophora*, *Hydrolithon* (come *Fosliella*), *Neogoniolithon*, *Porolithon* e *Metagoniolithon* nella sottofamiglia Corallinoideae.

Per verificare la posizione filogenetica delle Mastophoroideae su un numero maggiore di specie, Bailey *et al.* (2004) intraprendono un secondo studio su 9 specie di alghe a tallo calcificato, 6 delle quali appartenenti a tre generi diversi di Mastophoroideae (*Hydrolithon*, *Metamastophora* e *Neogoniolithon*), due appartenenti al genere *Amphiroa* J. V. F. Lamouroux (Lithophylloideae) ed una di *Incertae sedis*, in quanto non identificata con certezza e indicata come (*Sporolithon* sp.??). I dati ottenuti rivelano che la sottofamiglia Mastophoroideae rappresenta un *taxon* polifiletico composto da 4 linee distinte. Da questo studio risulta, in particolare, che le specie di *Hydrolithon* sono considerate “sorelle” delle specie di *Metagoniolithon* (genere esclusivamente australiano, con tallo articolato). I caratteri morfologici condivisi da questi due generi strettamente imparentati sono: la cellula di fusione da cui si sviluppano i filamenti del gonimoblasto; le iniziali spermatangiali ristrette al pavimento del concettacolo maschile; la distruzione delle cellule della cavità durante lo sviluppo del tetrasporangio.

5. Obiettivi della ricerca

Argomento della mia tesi di dottorato è lo studio delle specie, ancora mal conosciute, di Corallinali non articolate epifite della *Posidonia oceanica* (L.) Delile appartenenti ai generi *Hydrolithon* (Foslie) Foslie (1909) e *Pneophyllum* Kützing (1843).

Ho affrontato questo studio usando tre approcci diversi:

1. Un primo approccio basato sull'uso del microscopio elettronico a scansione (SEM), strumento ancora oggi poco utilizzato per lo studio morfologico delle Corallinali.

2. Un secondo approccio, classico, basato su osservazioni al microscopio ottico di talli sezionati al vibratomo. Questo approccio è stato necessario per poter confrontare le mie osservazioni con quelle esistenti in letteratura, quasi esclusivamente conseguite con l'ausilio del microscopio ottico.

3. Un terzo approccio, iniziato a metà del secondo anno del dottorato, basato sulla tecnica del DNA barcoding. Questa tecnica, applicabile solo per *taxa* ben conosciuti, si basa sul sequenziamento di piccoli segmenti del DNA mitocondriale (*barcodes*) codificanti le estremità 5' della subunità I della citocromo c ossidasi (COI-5') (Hebert et al. 2003a, b) (vedi Capitolo 1).

6. Materiali e metodi

6.1 Stazioni di raccolta

Nel periodo compreso tra maggio 2007 e giugno 2010, ho effettuato, campionamenti in 14 stazioni diverse del Mar Tirreno centrale e meridionale, in località Giannutri, Civitavecchia, Ischia, Ponza, Acqualadroni (Me), tra 4 m e 27 m di profondità. Le località di raccolta sono elencate nella Tab. 2A.

In queste stazioni, ho prelevato fascetti fogliari di *Posidonia oceanica* (L.) Delile, a caso, mediante immersione con A.R.A. (autorespiratore ad aria) che ho posto rapidamente in barattoli con acqua di mare. In laboratorio ho selezionato il materiale secondo la metodologia d'indagine cui doveva essere sottoposto. Ho allestito campioni d'erbario che ho depositato presso il Laboratorio di Algologia del Dipartimento di Biologia Ambientale.

CAMPIONAMENTO	DATA	SITO	PROFONDITA (m)
A	20/5/07	Ischia, Mezza Torre (Na)	5
B	20/5/07	Ischia, Bell'Ommo (Na)	22
C	4/5/08	Ischia, Pietra Nera (Na)	10
D	4/06/08	Ponza, Punta Madonna (Lt)	5
E	28/09/08	Giannutri, Punta S. Francesco	15
F	9/11/08	Ischia, La Nave	27
G	9/11/08	Ischia, La Nave	8
H	25/03/09	Civitavecchia, Punta del Pecoraro	5
I	15/04/09	Civitavecchia, Parete Pierucci	10
L	Maggio '09	Acqualadroni (Me)	4
M	30/09/09	Civitavecchia, Parete Pierucci	8
N	30/09/09	Civitavecchia, Parete Pierucci	14
O	21/05/10	Ischia Punta Caruso	12
P	9/06/10	Zannone	6

Tab. 2A. Siti di campionamento

6.2 Analisi morfologica

Il materiale raccolto è stato dapprima esaminato allo stereomicroscopio per effettuare una prima distinzione dei talli. Diversi talli con diametro maggiore di 5 mm, sono stati divisi a metà per consentire lo studio dello stesso esemplare sia al SEM che al microscopio ottico. Questo confronto incrociato è stato fondamentale per confermare le osservazioni rilevate con i due strumenti d'indagine.

L'analisi morfologica è stata compiuta su più di 300 esemplari.

Per l'osservazione al microscopio ottico, talli freschi sono stati decalcificati con acido nitrico 0,6 M per un'ora e quindi inclusi in una soluzione di AGAR al 5%. Sezioni di 25-35 μm di spessore sono state ottenute con l'ausilio di un vibratomo (VIBRATOME SERIES 1000), osservate e fotografate, usando un microscopio Zeiss Axiolab munito di apparecchio fotografico digitale Leica (DCF420).

Per l'osservazione al SEM, ho selezionato allo stereo-microscopio i diversi talli da esaminare, tagliato le porzioni di foglie di *Posidonia* fresche o essiccate sulle quali erano presenti i talli, incollato questi su *stubs* con dischetti biadesivi al carbonio (TAAB Laboratories Equipment Ltd, England) che ho metallizzato con oro palladio a 1,4kV per 90" (strumento utilizzato: Polaron E5000). Le osservazioni sono state compiute esaminando più di 70 *stubs* ad un microscopio a scansione Zeiss Leo Evo 40 (voltage di 15-20 kV).

Durante lo studio morfologico sono state acquisite complessivamente più di 1700 immagini digitali. Le tavole fotografiche sono state montate utilizzando i programmi *Adobe Photoshop™* e *QuarkXPress*.

Per le misurazioni dei concettacoli ho seguito Adey & Adey (1973).

Per la determinazione degli esemplari ho consultato le monografie di Woelkerling (1988), Irvine & Chamberlain (1994), Penrose (1996a e 1996b), Bressan & Babbini (2003), ed i seguenti articoli: Bressan, Miniati-Radin & Smundin (1977), Chamberlain (1985), Penrose & Woelkerling (1991), Wilks & Woelkerling (1991), Penrose (1992), Penrose & Chamberlain (1993), Reyes & Afonso-Carrillo (1995).

Per l'aggiornamento nomenclaturale dei binomi ho consultato le *check-list* di Furnari et al. (2003).

6.3 Analisi molecolare

Il materiale da sottoporre all'indagine molecolare è stato determinato, fotografato e posto in sacchetti di plastica contenenti gel di silice con indicatore di colore.

L'analisi molecolare è stata effettuata sugli esemplari provenienti dai campionamenti G-P (vedi Tab.2A).

Estrazione

L'estrazione del DNA è stata condotta senza staccare i talli delle Corallinacee dalle foglie di *P. oceanica*. La specificità dei *primer* permette l'amplificazione solo del gene COI-5' delle alghe rosse. Il protocollo di estrazione è quello indicato da Saunders (1993) (*DNA extraction protocol* RED 2006 e il kit Wizard® DNA Clean up System Promega) (vedi Appendice A, pag. I).

Amplificazione

L'amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 50 µl. La composizione della miscela è riportata in Appendice (A), nella tabella di riferimento. Per ciascuna reazione è stato allestito un controllo negativo, contenente tutti i componenti della miscela eccetto il DNA, al fine di verificare l'assenza di eventuali contaminazioni. In alcuni casi è stato anche allestito un controllo positivo con DNA già amplificato, purificato e sequenziato con successo, al fine di escludere il cattivo funzionamento di uno dei reagenti della miscela di reazione come causa della non riuscita dell'amplificazione.

La quantità di DNA estratto e sottoposto ad amplificazione è stata 1 µl. Per alcuni campioni questa quantità non è risultata sufficiente e si è proceduto raddoppiando la quantità di DNA. Nella tabella 3A sono riportate le quantità utilizzate per ogni campione.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in Px2 Thermal Cycler della Thermo Electron Corporation, Italia.

Il programma di amplificazione (programma BC) prevede le seguenti fasi: denaturazione (94°C per 30"), appaiamento (50°C per 45"), polimerizzazione (72°C per 1'), ripetute per 35 cicli, precedute da una denaturazione iniziale a 94°C per 3' e seguite da una polimerizzazione finale a 72°C per 7' (vedi Appendice A).

Il prodotto di PCR è stato visualizzato e confrontato con un DNA di riferimento (DNA *step ladder* 500bp) mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio 0,8% in TAE (Sambrock *et al.* 1989) con bromuro di etidio 0,4µg/ml, ad un voltaggio di 5 V/cm. Sono stati caricati 2µl di ogni campione. Il gel al termine della corsa è stato osservato attraverso un transilluminatore a raggi UV e fotografato con una fotocamera digitale Canon Powershot A570IS.

L'amplificazione ha presentato spesso dei problemi. La cellula algale non è la cellula ideale da cui estrarre DNA chimicamente puro, a causa della presenza di una parete cellulare e di polisaccaridi di riserva (Coleman & Goff 1991). La bassa quantità di DNA estratto dai campioni e la presenza di inibitori della PCR hanno portato ad effettuare molte PCR per ogni campione (in alcuni casi l'estratto è stato completamente usato).

Sono state sperimentate due diverse TAQ (Bioline e Promega), con volumi finali differenti: per la Bioline 25µl mentre per la Promega 50 µl. la concentrazione di MgCl₂ è la stessa per le 2 mix (2mM). Per la TAQ Bioline è stata sperimentata una diversa temperatura di appaiamento (52°C).

I risultati migliori sono stati ottenuti con la TAQ Promega. In appendice è descritto solo questo protocollo.

Purificazione del DNA

I campioni amplificati presentavano, per la maggior parte, bande piuttosto deboli. Per la purificazione sono stati sperimentati due metodi

diversi.

Il primo è il metodo di purificazione su gel di agarosio 0,8% con colonne di lana di vetro (vedi Appendice A), seguendo il protocollo di Saunders 1993 e Sambrook *et al.* 1989. E' quello che ha dato risultati positivi. L'uso di vere fibre di lana di vetro è essenziale per la riuscita della purificazione: la sostituzione di tali fibre con prodotti sintetici (materiale usato per i filtri degli acquari) non è altrettanto efficiente.

Il secondo metodo è stato l'uso del kit GenElute™ Gel extraction Kit Sigma-Aldrich che non ha dato risultati soddisfacenti. Il prodotto sequenziato era spesso sporco o presentava una sequenza di poche centinaia di paia di basi.

La concentrazione e la quantità totale di DNA è stata calcolata attraverso il confronto con un marker di riferimento (Lambda DNA Hind III digested, Sigma Aldrich) con elettroforesi su gel di agarosio 0,8% in TAE con bromuro di etidio. Sono stati caricati sul gel i campioni utilizzando un *loading buffer* nelle seguenti quantità: 2µl di DNA e 1µl di *loading buffer*.

Sequenziamento

I sequenziamenti sono stati effettuati dalla MWG Biotech AG (Ebersberg, Germany) e dalla Macrogen Inc.

Sono stati usati gli stessi *primer* della PCR (GazF1 e GazR1).

7. Risultati e discussione

Lo studio morfologico, condotto al microscopio ottico e al SEM, su talli epifiti di *Posidonia oceanica* appartenenti ai generi *Hydrolithon* e *Pneophyllum*, ha consentito di caratterizzare nettamente quattro tipi diversi di talli, tre dei quali appartenenti al genere *Hydrolithon*, riferiti a *Hydrolithon* sp., *H. boreale* (Foslie) Y.M. Chamberlain, e al complesso *H. cymodoceae* (Foslie) Penrose/*H. cruciatum* (Bressan) Y.M. Chamberlain, ed uno appartenente al genere *Pneophyllum*, attribuito alla specie *P. coronatum* (Rosanoff) Penrose.

Il gene COI-5' è stato sequenziato con successo per tre tipi di talli sottoposti all'indagine morfologica (Tab. 2): *Hydrolithon* sp., *H. boreale* e *Pneophyllum coronatum*. Il confronto delle sequenze ottenute con quelle presenti nelle banche dati BOLD System (<http://www.boldsystems.org/views/login.php>) e NCBI ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi? CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHom](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHom)) ha evidenziato che gli individui sequenziali sono sconosciuti ad ambedue le banche dati (Graf. 1-3). La similarità maggiore (circa 84%-87%) si è avuta con individui appartenenti a specie del genere *Metagoniolithon* (Corallinacee) e con altri indicati genericamente come "coralline crusts". Nessuna delle sequenze presenti nelle banche dati e riferite a specie di *Hydrolithon* e *Pneophyllum* risulta corrispondere a quelle dei miei esemplari.

CAMPIONAMENTO					
template	specie	data	Sito	prof	μ l
SMHfA2	<i>Hydrolithon sp.</i> (F o T)	9/11/08	Ischia "La Nave"	26 m	2
SM080	<i>Hydrolithon sp.</i> (F o T)	9/06/10	Zannone	6 m	1
SM082	<i>Hydrolithon sp.</i> (M)	9/06/10	Zannone	6 m	1
SM085	<i>Hydrolithon sp.</i> (M)	9/06/10	Zannone	6 m	1
SM005	<i>P.coronatum</i>	25/03/09	Civitavecchia Punta del Pecoraro	5 m	2
SM006	<i>P.coronatum</i>	25/03/09	Civitavecchia Punta del Pecoraro	5 m	1
SM007	<i>P.coronatum</i>	25/03/09	Civitavecchia Punta del Pecoraro	5 m	1
SM053	<i>H.boreale</i>	27/05/09	Acqualadroni (Messina)	4 m	2

Tab. 3A. Provenienza degli esemplari sottoposti ad analisi molecolare e quantità di DNA estratto usato per l'amplificazione.

I risultati dell'indagine morfologica e molecolare sono presentati e discussi di seguito.

Genere **Hydrolithon** Foslie 1909

Talli incrostanti, sottili, ad organizzazione dorso-ventrale; strato ventrale costituito, nelle parti vegetative, da 1-3 strati di filamenti basali. Tricociti sempre presenti, terminali sui filamenti basali, singoli e in gruppi ("*fields*" degli Autori di lingua inglese) a filo (Figg. 23 e 32-35) o nettamente sporgenti (Figg. 1-5) sulla superficie del tallo. Disco germinativo con quattro cellule centrali. Simmetria del disco germinativo radiale (Figg. 13, 28-29) o bilaterale (Figg. 47-50). Nei dischi germinativi a simmetria radiale, concavità

epiteliali (visibili al SEM) poste alla sommità (Figg. 13, 16) oppure sul lato mediano (Figg. 18-20) delle cellule centrali, a seconda delle specie. Talli sessuati monoici o dioici.

Hydrolithon sp.

Figg. 1-16

Caratteri distintivi:

- tricociti singoli molto grandi, verticali
- gruppi di tricociti nettamente sporgenti sulla superficie del tallo
- talli gametangiali dioici
- disco germinativo con simmetria radiale. Concavità epiteliali sempre presenti alla sommità delle cellule centrali. Quattro grandi tricociti ai lati del disco

Caratteristiche morfologiche

Talli caratterizzati da gruppi di tricociti nettamente sporgenti sulla superficie del tallo (Figg. 3-4, 10-11) e da tricociti singoli, molto grandi, 12-19 μm di diametro, disposti verticalmente (Figg. 5, 11-12). Le caratteristiche dei tricociti risultano evidenti già allo stereo-microscopio e consentono di riconoscere facilmente questi talli (Figg. 1-2, 7-8). Talli gametangiali dioici (Figg. 1-2). Concettacoli maschili (Figg. 5-6) con rami spermatangiali che si dipartono dal pavimento della camera (Fig. 6). Concettacoli carposporangiali con poro infossato (Figg. 3-4). Concettacoli bi-tetrasporangiali con camere divise da una columella centrale; poro profondamente infossato (Figg. 10-11); canale del poro largo, di forma trapezoidale, delimitato da cellule allungate disposte obliquamente, non protese lateralmente nel canale (Fig.

9). Un anello basale di tricociti è spesso visibile alla base dei concettacoli tetra- e carposporangiali. Dischi germinativi con simmetria radiale, mostranti, quando ben conformati, 12 cellule pericentrali e 4 grandi tricociti disposti simmetricamente nell'anello successivo di cellule (Figg. 13-16). Concavità epiteliali sempre presenti alla sommità delle cellule centrali del disco (Figg. 13, 16).

Caratterizzazione molecolare

Sono state ottenute sequenze da esemplari raccolti in due siti diversi, Ischia e Zannone, a due diverse profondità, 6 m e 26 m, in due diversi periodi dell'anno (giugno e novembre) (vedi Tab. 2). Gli esemplari sequenziati sono quattro: due esemplari maschili (siglati con M nella Tab. 1) e due esemplari femminili o bi-tetrasporofitici (siglati con F/T nella Tab. 1).

La variazione tra 0% e 2% risultante dal confronto delle sequenze è verosimilmente indicativa dell'appartenenza dei quattro individui ad una stessa specie (Grafico 1).

Discussione

I talli da me osservati presentano un disco germinativo identico a quello raffigurato in Penrose & Chamberlain (1993: 297, Fig. 1) e Irvine & Chamberlain (1994, Fig. 3A) e da questi Autori attribuito a *Hydrolithon farinosum* (J.V. Lamouroux) Penrose & Y.M. Chamberlain.

Si distinguono tuttavia dai talli riferiti a questa specie per essere dioici.

Talli molto simili ai miei per la dioicità dei talli e per le caratteristiche dei tricociti (singoli grandi e in gruppi sporgenti sulla superficie del tallo) sono quelli rinvenuti da Reyes & Afonso-Carrillo (1995) nelle Isole Canarie, su piante di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, riferiti a *Hydrolithon* sp. "probably a widely distributed undescribed species" (Reyes & Afonso-

Carrillo, 1995: 180). Tuttavia questi talli presentano un disco germinativo di sole 8 cellule pericentrali (12 nei miei esemplari).

E' il numero delle cellule pericentrali, un carattere valido per discriminare tra le specie?

Per rispondere a questa domanda è innanzitutto importante rilevare quanto riportano Irvine & Chamberlain (1994: 115) a proposito del disco germinativo di *H. farinosum*. Un primo esame del materiale tipo di questa specie - un lectotipo che contiene "several other non-geniculate corallines" (Penrose & Chamberlain, 1993: 296) -, effettuato da Chamberlain (1983), portò al rinvenimento di un primo disco germinativo attribuito a *H. farinosum* (Chamberlain, 1983, fig. 7B). A un secondo esame dello stesso materiale, effettuato da Penrose & Chamberlain (1993), il primo disco non fu più riosservato ma furono invece trovati altri due dischi, uno con 8 cellule pericentrali e l'altro con 12 cellule pericentrali. Poiché il disco con 8 cellule pericentrali era quello descritto da Bressan et al. (1977, Fig. 1) per *Fosliella cruciata* Bressan (= *Hydrolithon cruciatum* (Bressan) Y.M. Chamberlain) ed era inoltre meno abbondante di quello con 12 cellule pericentrali, *H. farinosum* fu lectotipificato con quest'ultimo disco.

Va rilevato tuttavia che, nello stesso lavoro, Penrose & Chamberlain (1993: 297) riferiscono di aver osservato una certa variabilità nel numero delle cellule pericentrali del disco di *H. farinosum*: "occasionally, one or more of these cells may be displaced or absent". Irvine & Chamberlain (1994: 115), osservano inoltre che: "considerable variation is seen in plants derived from these sporelings (YMC obs.)", ma malgrado ciò ritengono il numero di cellule pericentrali carattere tassonomico valido e lo utilizzano per distinguere tra loro *H. farinosum* e *H. cruciatum*.

Due anni dopo la pubblicazione del lavoro di Irvine & Chamberlain (1994), Penrose (1996a) propone una chiave e descrizioni di alcune specie di *Hydrolithon* dei mari australiani, nelle quali non vi è invece nessun riferimento al disco germinativo delle specie trattate. In questo lavoro, inoltre, Penrose (1996a), sulla base di osservazioni non pubblicate e

successivamente non più confermate, considera *H. cruciatum* sinonimo di *H. farinosum* mostrando di non dare alcun peso all'unico carattere in base al quale le due specie sono distinte in Irvine & Chamberlain (1994).

Nel mio materiale, ho riscontrato variabilità nel numero delle cellule pericentrali del disco germinativo, non solo negli esemplari riferiti a *Hydrolithon* sp. ma anche in quelli riferiti a *H. boreale* e al complesso *H. cymodoceae/H. cruciatum* (vedi Figg. 19-20 e 45-48). Costanti sono apparse, invece, la simmetria del disco germinativo e la posizione delle cellule epiteliali che sormontano le cellule centrali del disco, caratteri questi probabilmente migliori per discriminare le specie.

Il numero delle cellule pericentrali del disco germinativo appare pertanto un carattere diagnostico poco attendibile. E' molto probabile, quindi, che i miei esemplari siano identici a quelli osservati nelle Isole Canarie da Reyes & Afonso-Carrillo (1995).

La dioicità di questi talli escluderebbe la loro attribuzione a *H. farinosum*.

Inoltre, a *H. farinosum*, sono stati attribuiti sia talli con tricociti "visible as dots throughout thallus" (Irvine & Chamberlain, 1994: 123) (e quindi probabilmente simili ai miei), sia talli privi di tricociti (Penrose, 1996a: 261). La presenza/assenza dei tricociti è discussa in Chamberlain, (1977, 1985) e Jones & Woelkerling (1984) e messa in relazione con le condizioni ambientali (luce e temperatura). Le osservazioni da me effettuate su circa 200 esemplari riferibili sia a questa specie sia al complesso *H. cymodoceae/H. cruciatum*, rivelano costanza nella presenza e nelle caratteristiche dei tricociti, indipendentemente dalla profondità (6 m o 26 m) e dalla stagione (giugno o novembre) di raccolta. Anzi, questo carattere è stato l'unico utile per distinguere tra loro i talli allo stereo-microscopio.

Inoltre, dovrà essere testata da osservazioni future anche la possibilità che la disposizione obliqua (verticale in *H. farinosum*, vedi Penrose & Chamberlain, 1993: 300, Fig. 13) delle cellule che delimitano il canale del poro (Fig. 9) possa rappresentare un carattere differenziale.

Due esemplari riferiti a *H. farinosum* sono stati depositati nella banca dati BOLD e sono in attesa di essere sequenziati. Molto utile sarà il confronto tra queste sequenze e quelle ottenute dai miei esemplari per chiarire la loro posizione tassonomica. Nel frattempo, attribuisco i miei esemplari ad *Hydrolithon* sp.

Complesso *Hydrolithon cymodoceae* (Foslie) Penrose / *Hydrolithon cruciatum* (Bressan) Y.M. Chamberlain

Figg. 17-44

Caratteri distintivi:

- tricociti in file terminali orizzontali di 9-20
- gruppi di tricociti a filo sulla superficie del tallo
- talli gametofitici monoici
- disco germinativo con simmetria radiale. Concavità epiteliali presenti sul lato mediano delle cellule centrali

Caratteristiche morfologiche

Talli confluenti ma non sovrapposti tra loro (Fig. 26), caratterizzati da file terminali orizzontali di 9-20 tricociti (Fig. 22) che formano, con la successiva crescita del tallo, gruppi caratteristici per essere a filo sulla superficie del tallo (Fig. 23-25). Questi gruppi di tricociti consentono di distinguere facilmente, allo stereo-microscopio (Figg. 42-44), questi talli da quelli di *Hydrolithon* sp. e *H. boreale*. Sono stati osservati dischi germinativi con 16 (15-14) oppure 8 cellule pericentrali (Figg. 19-20), tutti con concavità epiteliali poste sul lato mediano delle cellule centrali (Figg. 18-20).

Concettacoli tetrasporangiali con tetto talora pressoché appiattito (Figg. 33, 37-39), talora prominente ed emisferico (Fig. 34-35, 40-41) come evidenziato anche dalle sezioni trasversali ottenute con il vibratomo. Cellule del tetto munite ciascuna di una concavità epiteliale (Figg. 33-35). Camere dei concettacoli appiattiti, alte 36-63 μm e larghe 103-152 μm , contenenti uno o due tetrasporangi adagiati orizzontalmente (Figg. 36-38). Nelle camere contenenti 2 tetrasporangi, questi sono disposti parallelamente tra loro (Fig. 38). Camere dei concettacoli prominenti, alte 58-103 μm e larghe 134-181

µm, provviste di una columella centrale, contenenti 2-4 tetrasporangi disposti verticalmente (Figg. 40-41). Sono stati anche osservati, nello stesso concettacolo, tetrasporangi disposti sia obliquamente che verticalmente (Fig. 39). Canale del poro, stretto, triangolare, delimitato da cellule ingrossate, orientate più o meno perpendicolarmente alla superficie de tallo (Fig. 41).

Talli gametofitici monoici (Fig. 32). Concettacoli spermatangiali piccoli, muniti di *spout*, posti spesso tra due concettacoli carposporangiali (Figg. 31-32). Concettacoli carpogoniali poco rilevati sulla superficie del tallo (Fig. 27-28) con, talora, un anello di tricociti alla base (Fig. 27). Il concettacolo della Fig. 29 è probabilmente un concettacolo carpogoniale dopo presunta fertilizzazione. Mostra un tappo neoformato che chiude il poro (aperto nelle Figg. 27-28), la cui posizione nettamente decentrata suggerisce un percorso obliquo del canale del poro. Sezioni trasversali a livello dei concettacoli carposporangiali mostrano effettivamente una disposizione obliqua del canale del poro; le camere contengono un singolo carposporangio (Fig. 43).

Discussione

La presenza di un singolo tetrasporangio adagiato orizzontalmente nel concettacolo tetrasporangiale come quella di un singolo carposporangio nel concettacolo carposporangiale che, inoltre, presenta il canale del poro disposto obliquamente rispetto alla superficie del tallo, sono considerati caratteri distintivi della specie australiana *H. cymodoceae* (Foslie) Penrose (Penrose, 1992, 1996a). Questi caratteri sono presenti anche nei miei esemplari che, tuttavia, hanno mostrato, spesso, la presenza anche di due tetrasporangi adagiati orizzontalmente nella stessa camera (Fig. 38) o di due o più tetrasporangi disposti verticalmente o obliquamente (Figg. 38-41).

La variabilità osservata nei miei esemplari, relativamente alla disposizione e al numero dei tetrasporangi nei concettacoli, potrebbe non essere in contrasto con una loro assegnazione a *H. cymodoceae*. La stessa

Penrose (1996a: 256) riporta infatti (anche nella chiave) la presenza occasionale di tetrasporangi verticali in questa specie. A questo proposito, Penrose (1992: 98) osserva: “at some time when the sporangium has become detached from the stalk cell, the single sporangium becomes oriented horizontally within the chamber. When two mature tetrasporangia occur, however, they remain vertically oriented within the chamber”. La posizione orizzontale o verticale dei tetrasporangi nelle camere dipenderebbe pertanto dal numero di tetrasporangi che si formano in essa. Le mie osservazioni mostrano che anche le dimensioni della camera (larghezza, altezza e profondità) possono condizionare la posizione dei tetrasporangi, come rivelano le Figg. 38 e 39. La Fig. 38 mostra infatti una camera le cui dimensioni (larghezza e altezza) sono appena più grandi delle dimensioni dei tetrasporangi e ciò determina la posizione orizzontale non solo del tetrasporangio in primo piano ma anche del secondo tetrasporangio che si scorge dietro al primo (essendo la sezione piuttosto spessa). Allo stesso modo, nella Fig. 39, a causa dell'altezza ridotta della camera, il tetrasporangio più grande si dispone obliquamente mentre gli altri due, più piccoli, sono disposti verticalmente. E' interessante rilevare che altezze diverse dei concettacoli tetrasporangiali si possono apprezzare anche all'osservazione dei talli al SEM (vedi Figg. 33-35).

Morfologicamente molto simile a *H. cymodoceae* è *H. cruciatum* (Bressan) Y.M. Chamberlain, per la presenza di gruppi di tricociti a filo sulla superficie del tallo (vedi Bressan & Babbini, 2003: 140, Figg. A e C; Reyes & Afonso-Carrillo (1995, Fig. 15). Pur non essendoci riferimenti precisi circa la posizione dei tetrasporangi in questa specie, i disegni disponibili mostrano: un tetrasporangio pressoché verticale in Bressan *et al.* (1977, Fig. 2) e - dettaglio questo particolarmente interessante - adagiato in parte sul pavimento della camera in Irvine & Chamberlain (1996: 122, Fig. 53A).

Per *H. cruciatum* viene riportato un disco germinativo con 8 cellule pericentrali (Bressan *et al.*, 1977; Irvine & Chamberlain, 1994), mentre l'unico disco germinativo osservato da Penrose (1992), in esemplari di *H.*

cymodoceae, presenta 16 cellule pericentrali. Nel miei esemplari, ho rinvenuto sia dischi con 8 (Fig. 20) che dischi con 16 cellule pericentrali (Fig. 19), appartenenti a talli morfologicamente indistinguibili tra loro. E' stato già discusso, nel paragrafo relativo a *Hydrolithon* sp., lo scarso significato tassonomico attribuibile a questo carattere. Inoltre, Penrose, nel lavoro del 1996, non accenna al disco germinativo, né nelle chiavi, né nella descrizione di *H. cymodoceae*.

Poiché questo carattere non è considerato diagnostico per *H. cymodoceae* (Penrose, 1996a), *H. cruciatum* deve probabilmente confluire in *H. cymodoceae* e non in *H. farinosum* come proposto da Penrose (1996a: 260).

Tuttavia, poiché, malgrado i numerosi tentativi effettuati, non ho ancora potuto ottenere (e confrontare tra loro), sequenze pulite del gene COI-5' di miei esemplari, non propongo ancora questa sinonimia e indico i miei esemplari come appartenenti al complesso *H. cymodoceae/H. cruciatum*.

Hydrolithon boreale (Foslie) Y.M. Chamberlain

Figg. 45-58

Caratteri distintivi:

- tricociti singoli o appaiati
- disco germinativo con simmetria bilaterale
- concettacoli tetrasporangiali con un anello di cellule attorno al poro (visibile al SEM)

Caratteristiche morfologiche

Le osservazioni sono state condotte solo al SEM, su esemplari tetrasporofitici caratterizzati da concettacoli tetrasporangiali mostrandoti un anello di 6-8 cellule attorno al poro (Figg. 51-54, 56), già osservato in precedenza da Garbary (1978, Fig. 17 sub *Fosliella farinosa*) (vedi Irvine & Chamberlain, 1994: 117). Concavità epiteliali sulle cellule del tetto, grandi e profonde (Fig. 51-54). Sono stati talora osservati talli giovani con filamenti ancora non del tutto consolidati (Fig. 57). Tricociti singoli o appaiati (più raramente terminanti 3-4 cellule contigue) (Figg. 50, 55-57). Gruppi di tricociti non osservati. Disco germinativo caratteristico, unico nell'ambito delle specie mediterranee del genere, per la simmetria bilaterale dovuta al mancato sviluppo di cellule in due parti opposte del disco centrale (Figg. 45-50). Cellule pericentrali 4(-5) (Figg. 45-50). Quattro (3-2) grossi tricociti spesso osservati nell'anello di cellule successivo a quello delle cellule pericentrali (Figg. 48-50).

Caratterizzazione molecolare

E' stata ottenuta una sequenza da un esemplare raccolto ad Acqualadroni (Me), nel maggio 2009, a 4 m di profondità, che risulta ignota

alla banca dati (vedi Grafico 2).

Discussione

Attendibile è l'attribuzione di questi esemplari a *H. boreale* per la simmetria bilaterale del disco germinativo e per l'anello di cellule attorno al poro dei concettacoli tetrasporangiali. Anche qui, tuttavia, il numero di cellule pericentrali osservato nei dischi germinativo è diverso da quello riferito in letteratura (4 per lato contro 2, vedi Irvine & Chamberlain, 1994, Fig. 3B). Questa osservazione, come le precedenti, conferma la non validità del carattere per delimitare le specie.

I talli attribuiti a questa specie sono tutti tetrasporangiali. Talli sessuati, forse appartenenti a questa specie, sono stati anche osservati, ma necessitano di ulteriore esame per confermarne l'attribuzione.

Pneophyllum coronatum (Rosanoff) Penrose

Figg. 59-64

Caratteri distintivi:

- tricociti intercalari, singoli
- disco germinativo con 8 cellule centrali disposte in due file parallele
- Poro dei concettacoli tetrasporangiali e carposporangiali circondato da filamenti unicellulari liberi

Caratteristiche morfologiche

Talli incrostanti (Fig. 59), bistratificati. Concavità epitelliali per lo più rettangolari (Fig. 64). Tricociti singoli, intercalari, disposti accanto alle cellule epitalliche (Fig. 64). Dischi germinativi di forma ellittica, con 8 cellule centrali disposte in due file parallele (Fig. 63). Concettacoli unipori, poco rilevati sulla superficie del tallo (Fig. 62). Poro dei concettacoli tetrasporangiali e carposporangiali circondato da filamenti unicellulari liberi (Figg. 61, 64).

Talli gametofitici monoici. Carpogoni e spermatangi prodotti in concettacoli separati. Concettacoli spermatangiali adiacenti a quelli carposporangiali, piccoli, alti, in media, 16 μm e larghi, in media, 33 μm , sprofondati nel tallo dal quale emerge solo lo *spout* (Fig. 62).

Concettacoli femminili più o meno rilevati sulla superficie del tallo, con poro circondato da un anello di filamenti unicellulari liberi e camera divisa da una columella centrale (Fig. 61).

Concettacoli tetrasporangiali molto simili a quelli carposporangiali, poco rilevati sulla superficie del tallo, contenenti tetrasporangi adagiati orizzontalmente nella camera del concettacolo nelle prime fasi della maturazione, poi disposti verticalmente alla periferia della camera. La Fig. 60 mostra due tetrasporangi in posizione intermedia. Camere dei concettacoli

tetrasporangiali alte, in media, 43 μm e larghe, in media, 144 μm . Poro circondato da un anello di filamenti unicellulari liberi.

Caratterizzazione molecolare

Sono state ottenute sequenze da tre esemplari raccolti a Civitavecchia (vedi Tab. 3A) che risultano ignoti alla banca dati (Grafico 3). La variazione massima riscontrata tra le sequenze è del 2% ed è indicativa dell'appartenenza dei tre esemplari ad una stessa specie.

Discussione

Gli esemplari osservati corrispondono bene a *P. coronatum* (= *P. caulerpae* (Foslie) P. Jones & Woelkerling). Sono presenti nel materiale raccolto a tutte le profondità (4-26 m) ma sono risultati dominanti nel campionamento H (Civitavecchia, Punta Pecoraro, 5 m (vedi Tab. 1).

Conclusioni

La presente ricerca ha consentito:

- La caratterizzazione ultrastrutturale (SEM) di esemplari appartenenti a 4 specie diverse di Corallinali:
 - a. *Hydrolithon* sp.
 - b. Complesso *H. cymodoceae/H. cruciatum*
 - c. *Hydrolithon boreale*
 - d. *Pneophyllum coronatum*

- L'ottenimento delle prime sequenze del gene COI-5' di esemplari appartenenti a 3 di queste specie (*Hydrolithon* sp., *H. boreale*, *Pneophyllum coronatum*), che saranno presto depositate nella banca dati BOLD system

- La proposizione di nuovi caratteri diagnostici per il genere *Hydrolithon*
 - a. simmetria radiale o bilaterale del disco germinativo
 - b. posizione delle concavità epiteliali sulle cellule centrali, nei dischi a simmetria radiale (osservabile al SEM)
 - c. posizione dei gruppi di tricociti, a filo (*H. cymodoceae/H. cruciatum*) o sporgenti (*Hydrolithon* sp.) sulla superficie del tallo (osservabile sia al SEM che allo stereo-microscopio)

- Il rinvenimento, nel Mediterraneo, di *Hydrolithon cymodoceae*, specie finora segnalata solo per l'Australia, alla quale. inoltre. possono probabilmente ricondursi tutte le precedenti citazioni di *Hydrolithon cruciatum*.

Bibliografia

- Adey W.H. & Adey P.J., 1973. Studies on the biosystematics and ecology of the epilithic crustose Corallinaceae of the British Isles. *Br. Phycol J.* **8**: 343-407.
- Bailey J.E. 1999. Phylogenetic positions of *Lithophyllum incrustans* and *Titanoderma pustulatum* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on 18S rRNA gene sequence analyses, with a revised classification of the Lithophylloideae. *Phycologia* **38**: 208-216.
- Bailey, J.C., Gabel J.E. & Freshwater D.W., 2004. Nuclear 18S rRNA gene sequence analyses indicate that the Mastophoroideae (Corallinaceae, Rhodophyta) is a polyphyletic taxon. *Phycologia* **43**: 3-12.
- Bold H.C. & Wynne M.J., 1978. Introduction to the algae. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 584-587.
- Bressan G., Miniati-Radin D. & Smundin L., 1977. Ricerche sul genere *Fosliella* (Corallinaceae-Rhodophyta): *Fosliella cruciata* sp. nov. *Giorn. Bot. Ital.* **111**: 27-44.
- Bressan G., 1980. La polarité cellulaire dans la progénèse des *Fosliella* (Corallinacées). *Giorn. Bot. Ital.* **114**: 15-24.
- Bressan G. & Babbini L., 2003. Biodiversità marina delle coste italiane: Corallinales del Mar Mediterraneo: Guida alla determinazione. *Biologia Marina Mediterranea* **10** (Suppl. 2), 237 pp.

- Cabioch J., 1971. Étude sur les Corallinacées. I. Caractères généraux de la cytologie. *Cahiers de Biologie Marine* **12** : 121-186.
- Cabioch J., 1972. Étude sur les Corallinacées, 2. La morphogenèse : conséquences systématiques et phylogénétiques. *Cah. Biol. mar.* **13**: 137-288.
- Cabioch J., 1988. Morphogenesis and generic concepts in coralline algae - a reappraisal. *Helgolinder Meeresuntersuchungen* **42**: 493-509.
- Chamberlain Y.M., 1977. Observation on *Fosliella farinosa* (Lamour.) Howe (Rhodophyta, Corallinaceae) in the British Isles. *British Phycological Journal* **12**: 343-358.
- Chamberlain Y.M. 1983. Studies in the Corallinaceae with special reference to *Fosliella* and *Pneophyllum* in the British Isles. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany Series*, **11**: 291-463.
- Chamberlain Y.M., 1984. Spore size and germination in *Fosliella*, *Pneophyllum* and *Melobesia* (Rhodophyta, Corallinaceae). *Phycologia* **23**: 433-442.
- Chamberlain Y.M., 1985. Trichocyte occurrence and phenology in four species of *Pneophyllum* (Rhodophyta, Corallinaceae) from the British Isles. *Phycologia* **20**: 375-379.
- Chamberlain Y.M. & Norris R.E., 1994. *Hydrolithon pellire* sp. nov., a mastophoroid crustose coralline red algal epiphyte from South Africa. *Phycologia* **33**(4): 291-297.
- Chihara M., 1974. The significance of reproductive and spore germination characteristics to the systematics of the Corallinaceae: nonarticulated coralline algae. *J. Phycol.* **10**: 266-274.
- Clarkston B.E. & Saunders G.W., 2010. A comparison of two DNA barcode

- markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov.. *Botany* **88**: 119-131.
- Coleman, A.W. & Goff, L.J., 1991. DNA analysis of eukaryotic algal species. *Journal of Phycology* **27**: 463-473. doi: 10.1111/j.0022-3646.1991.00463.
- Dupont, S., Wilson, K., Obst, M., Sköld, H., Nakano, H. & Thorndyke, M. C., 2007. Marine ecological genomics: when genomics meets marine ecology. *Marine ecology progress series* **332**: 257-273.
- Foslie, M. (1909). Algologiske notiser VI. *Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter* **1909**(2): 1-63
- Furnari G., Giaccone G., Cormaci M., Alongi G., Serio D., 2003. Biodiversità marina delle coste italiane: Catalogo del macrofitobenthos. *Biologia Marina Mediterranea* **10**(1): 1-481.
- Guiry, M.D. & Guiry G.M., 2010. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available at: <http://www.algaebase.org> (accessed on October 15, 2008).
- Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert P.D.N. & Hickey D.A., 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in genetic*. Doi : 10.1016/j.tig.2007.02.001.
- Harvey A.S. & Woelkerling W.J. 1995. An account of *Austrolithon intumescens* gen. et sp. nov. and *Boreolithon van-heurckii* (Heydrich) gen. et comb. nov. (Austrolithoideae subfam. nov., Corallinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* **34**: 362-382.
- Harvey, A.S., Woelkerling, Wm.J., Millar, A.J.K., 2002. The Sporolithaceae

(Corallinales, Rhodophyta) in south-eastern Australia: taxonomy and 18S rRNA phylogeny. *Phycologia* **41**: 207–227.

Harvey, A.S., Broadwater, S.T., Woelkerling, Wm.J., Mitrovski, P.J., 2003. *Choreonema* (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the Hapalidiaceae for the subfamilies *Choreonematoideae*, *Austrolithoideae* and *Melobesioideae*. *J. Phycol.* **39**: 988–998.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. & deWaard J.R., 2003a. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **270**(1512): 313–321. Doi: 10.1098/rspb.2002.2218.

Hebert P.D.N., Ratnasingham S. & deWaard J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society Biology* **270**: S96–S99.

Hebert, P.D. & Gregory, T.R., 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* **54**(5): 852–859.

Irvine L.M. & Chamberlain Y.M., 1994. Seaweeds of the British Isles. Volume I. Rhodophyta Part 2B Corallinales, Hildenbrandiales. The Natural History Museum Publications, London, 275 pp.

Johansen, H.W., 1969. Patterns of genicular development in *Amphiroa* (Corallinaceae). *J. Phycol.* **5**: 118–123.

Jones P.L. & Woelkerling W.J., 1984. An analysis of trichocyte and spore germination attributes as taxonomic characters in the *Pneophyllum-Fosliella* complex (Corallinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* **23**: 183–194.

Kucera H. & Saunders G.W., 2008. Assigning morphological variants of

- Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding. *Canadian journal of Botany* **86**: 1065-79.
- Kützing, F.T. (1843). *Phycologia generalis oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange...* Mit 80 farbig gedruckten Tafeln, gezeichnet und gravirt vom Verfasser. pp. [part 1]: [i]-xxxii, [1]-142 , [part 2:] 143-458, 1, err.], pls 1-80. Leipzig: F.A. Brockhaus.
- Lane, C.E., Lindstrom, S. & Saunders G.W., 2007. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariaceae, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Mol. Phylogenet. Evol.* **44**: 634-648.
- Le Gall L. & Saunders G.W., 2007. A nuclear phylogeny of the Floridophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: establishing the new red algal subclass Corallinophycidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* **43**: 1118-1130.
- Le Gall L. & Saunders G.W., 2010a. Dna barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *Journal of Phycology* **46**: 374-389.
- Le Gall L. & Saunders G.W., 2010b. Establishment of a DNA-barcode library for the Nemaliales (Rhodophyta) from Canada and France uncovers overlooked diversity in the species *Nemalion helminthoides* (Velley) Batters. *Cryptogamie, Algologie* **31**(4): 403-421
- Lee R.E., 1999. *Phycology*. 3rd Edition. Cambridge University Press, 614 pp.
- Mc Devitt D.C. & Saunders G.W., 2009. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae)

- including a novel extraction protocol. *Phycological research* **57**: 131-141.
- McDevitt, D.C. & Saunders, G.W., 2010. A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights. *Phycologia* **49**: 235-248.
- Penrose D.L. & Woelkerling W.J., 1988. A taxonomic reassessment of *Hydrolithon* Foslie, *Porolithon* Foslie and *Pseudolithophyllum* Lemoine emend. Adey (Corallinaceae, Rhodophyta) and their relationship to *Spongites* Kützing. *Phycologia* **27**: 159-176.
- Penrose D.L. & Woelkerling W.J., 1991. *Pneophyllum fragile* in southern Australia: implications for generic concepts in the Mastophoroideae (Corallinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* **30**(6): 495-506.
- Penrose D.L., 1992. *Hydrolithon cymodoceae* (Foslie) comb. nov. (Corallinaceae, Rhodophyta) in southern Australia and its relationship to *Fosliella*. *Phycologia* **31**: 89-100.
- Penrose D.L. & Chamberlain Y.M., 1993. *Hydrolithon farinosum* (Lamouroux) comb. nov.: implications for generic concepts in the Mastophoroideae (Corallinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* **32**(4): 295-303.
- Penrose D.L. 1996a. Genus *Hydrolithon* (Foslie) Foslie. In: Womersley H. B. S., The marine benthic flora of southern Australia. Rhodophyta. Part III B, Gracilariales, Rhodymeniales, Corallinales and Bonnemaisoniales: 255-266.
- Penrose D.L. 1996b. Genus *Pneophyllum* Kützing. In: Womersley H. B. S., The marine benthic flora of southern Australia. Rhodophyta. Part III B, Gracilariales, Rhodymeniales, Corallinales and Bonnemaisoniales: 266-272.

- Penrose D.L., 1992. *Hydrolithon cymodoceae* (Foslie) comb. nov. (Corallinaceae, Rhodophyta) in southern Australia and its relationship to *Fosliella*. *Phycologia* **31**: 89-100.
- Provan J., Murphy S., and Maggs C. A., 2004. Universal plastid primers for Chlorophyta and Rhodophyta. *European Journal of Phycology* **39**: 43-50.
- Pueschel C.M., 1989. An expanded survey of the ultrastructure of red algal pit plugs. *Journal of Phycology* **25**: 625-636.
- Reyes J. & Afonso-Carrillo J., 1995. Morphology and distribution of nongeniculate coralline algae (Corallinaceae, Rhodophyta) on the leaves of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Cymodoceaceae). *Phycologia* **34**: 179-190.
- Robba L., Russell S., Barker G. and Brodie J., 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany*: **93**(8): 1101-1108.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.
- Saunders G.W., 1993. Gel purification of red algal genomic DNA: an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction-friendly DNA. *Journal of Phycology* **29**: 251-254.
- Saunders G.W., 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **360**(1462): 1879-1888. Doi: 10.1098/rstb.2005.1719.
- Saunders G.W., 2008. A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species

- diversità. 1. The foliose *Dilsea-Neodilsea* complex and *Weeksia*. *Botany* **86**: 773-789.
- Savolainen V., Cowan R.S., Vogler A.P., Roderick G.K. & Lane R., 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **360**: 1805-1811. Doi: 10.1098/rstb.2005.1730.
- Schander, C. & Willassen, E., 2005. What can biological barcoding do for marine biology? *Marine Biology Research* **1**: 79-83.
- Steneck R.S., 1986. The ecology of coralline algal crusts: convergent patterns and adaptive strategies. *Annual review of Ecology and Systematics* **17**: 273-303.
- Townsend, R.A., Chamberlain, Y.M. & Keats, D.W., 1994. *Heydrichia woelkerlingii* gen. & sp. nov., a newly discovered non-geniculate red alga (Coralinales, Rhodophyta) from Cape Province, South Africa. *Phycologia* **33**: 177-186, 24 figs.
- Verheij, E., 1993. The genus *Sporolithon* (Sporolithaceae fam. nov., Corallinales, Rhodophyta) from the Spermonde Archipelago, Indonesia. *Phycologia* **32**, 184-196.
- Wilks K.M. & Woelkerling W.J., 1991. Southern Australian species of *Melobesia* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* **30**(6): 507-533.
- Woelkerling W.J., 1988. The Coralline red algae: an analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae. British Museum (Natural History). *Oxford University Press*, 268 pp.
- Womersley, H.B.S., 1996. The Marine Benthic Flora of the Southern Australia. Part IIIB, Gracilariales, Rhodymeniales, Corallinales and Bonnemaisoniales. *Australian Biological Resources Study, Canberra* 392

pp.

Appendice

Estrazione del DNA

DNA extraction protocol RED 2006 + Wizard®DNA Clean up System (Promega)

1. Triturare il tallo, pulito da eventuali epifiti, in azoto liquido in un tubo da microcentrifuga di 1,5 ml con l'uso di micropestelli senza staccarlo dalla foglia di *Posidonia oceanica* (se essiccato in *silica gel*, reidratare per 15 minuti).
2. Aggiungere 600µl di DNA *extraction buffer* (Saunders 1993) a temperatura ambiente, 60µl di *Tween 20* al 10%, e 6µl di Proteinasi K 20 mg/ml (conservata in freezer).
3. Mescolare costantemente per 90-120 minuti in un agitatore rotante a temperatura ambiente.
4. Incubare in ghiaccio per 20 minuti
5. Centrifugare per 10 minuti alla massima velocità (17000 rpm).
6. Mescolare la resina del kit Wizard®DNA Clean up System (Promega) facendo attenzione a sciogliere eventuali residui solidi. Aggiungere 1ml di resina in ogni microtubo contenente un campione. Mescolare gentilmente per inversione alcune volte (invertire i tubi 20 secondi; attendere 20 secondi; invertire per 5 secondi attendere per 20 secondi).
7. Preparare le colonne rimuovendo gli stantuffi dalle siringhe e attaccando le minicolonne del kit Wizard®DNA Clean up System

(Promega) alla siringa. Aggiungere il campione nella siringa, facendo attenzione a non prelevare la parte solida.

8. Riposizionare lo stantuffo e far uscire il campione al ritmo di una goccia al secondo.
9. Levare la siringa dalla minicolonna e rimuovere lo stantuffo. Riattaccare la siringa alla minicolonna. Per lavare la colonna aggiungere 2 ml di isopropanolo all'80% nella siringa. Inserire lo stantuffo e far uscire gentilmente la soluzione dalla minicolonna al ritmo di una goccia al secondo.
10. Rimuovere la minicolonna dalla siringa e metterla in un tubo da micro centrifuga da 1,5 ml a centrifugare a 10000 rpm per 2 minuti per asciugare completamente la colonna.
11. Mettere la colonna in un nuovo microtubo da 1,5ml. Attendere 3 minuti per permettere all'isopropanolo in eccesso di evaporare.
12. Aggiungere 50 μ l di acqua calda (70°C) alla minicolonna. Aspettare 90 secondi. Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto.

Verificare la quantità e la qualità di estratto mediante elettroforesi in gel di agarosio 0,8%.

Conservare i campioni a -20°C.

Tabella PCR

Final concentration		# Reactions	<i>no extra</i>	<i>no extra</i>	+0,5	+0,5	+0,5	+0,5	+0,5	+0,5	+0,5	+0,5	+0,5
			2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		μl											
	5X Buffer	10,0	20,0	30,0	45,0	55,0	65,0	75,0	85,0	95,0	105,0	115,0	125,0
2 mM	25mM MgCl ₂	4,0	8,0	12,0	18,0	22,0	26,0	30,0	34,0	38,0	42,0	46,0	50,0
	Sterile H ₂ O	28,4	56,8	85,2	127,8	156,2	184,6	213,0	241,4	269,8	298,2	326,6	355,0
0,2 mM	2,0mM each dNTPs	5,0	10,0	15,0	22,5	27,5	32,5	37,5	42,5	47,5	52,5	57,5	62,5
1,0 U/reaction	5U μl ⁻¹ Taq polymerase	0,2	0,4	0,6	0,9	1,1	1,3	1,5	1,7	1,9	2,1	2,3	2,5
	<i>1 frammento</i>												
0,7 μM	50 μM Primer f	0,7	1,4	2,1	3,2	3,9	4,6	5,3	6,0	6,7	7,4	8,1	8,8
0,7 μM	50 μM Primer r	0,7	1,4	2,1	3,2	3,9	4,6	5,3	6,0	6,7	7,4	8,1	8,8

Sequenze dei primer usati per l'amplificazione del gene CO1

Primer forward	Sequenza 5'-3'	Autore
GazF1	TCAACAAATCATAAAGATATTGG	Saunders 2005
Primer reverse	Sequenza 5'-3'	Autore
GazR1	ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA	Saunders 2005

Il prodotto di PCR è stato visualizzato e confrontato con un DNA di riferimento (DNA *step ladder* 500bp) mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio 0,8% in TAE (Sambrook *et al.* 1989) con bromuro di etidio 0,4 μg/ml, ad un voltaggio di 5 V/cm. Sono stati caricati 2 μl di ogni campione.

Il gel al termine della corsa è stato osservato attraverso un transilluminatore a raggi UV e fotografato con una fotocamera digitale Canon Powershot A570IS.

Purificazione

1. Preparare un gel di agarosio 0,8% e porlo in TAE (usare sempre TAE fresco).
2. Per ogni campione di PCR aggiungere 4 μ l di *loading buffer*.
3. Caricare un campione in ogni pozzetto, lasciandone sempre uno vuoto tra ciascuno di essi. Non aggiungere nessun *marker*.
4. Connettere gli elettrodi e lasciare correre il gel il più a lungo e il più lentamente possibile per permettere alle bande di separarsi nettamente.
5. Al completamento della corsa porre il gel sul visualizzatore a raggi UV e con un bisturi tagliare le bande ponendo ciascuna di essa nella propria colonna con lana di vetro preparata in precedenza (vedi fig.1).
6. Centrifugare a 10000 rpm per 10 minuti.
7. Misurare il volume esatto con la pipetta e spostare la soluzione in un nuovo microtubo da 1,5 ml.
8. Aggiungere 1/10 del volume di sodio acetato 3M e 2 volte del volume di etanolo 95% freddo. Mescolare gentilmente.
9. Incubare a -20°C per 1 ora (se necessario i campioni possono essere conservati *overnight*).
10. Centrifugare alla massima velocità per 30 minuti a 4°C.

11. Eliminare il supernatante e aggiungere 250 μ l di etanolo al 70% freddo.
12. Centrifugare alla massima velocità per 5 minuti.
13. Versare il supernatante ed asciugare il *pellet* all'aria (è possibile rimuovere l'etanolo in eccesso con dei coni di carta assorbente pulita facendo attenzione a non disturbare il *pellet*).
14. Reidratare con 22 μ l di acqua bidistillata.

Controllare qualità e quantità dei prodotti purificati su gel di agarosio 0,8% (caricare 2 μ l di ogni campione sul gel).

I prodotti purificati della PCR sono stati conservati a -20°C.