



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

**DOTTORATO DI RICERCA
BIOLOGIA APPLICATA E MEDICINA SPERIMENTALE
(XXXIII CICLO)**

**ANALISI DEL CARIOTIPO E LIVELLI DI PLOIDIA IN
FANEROGAME MARINE DEL MAR MEDITERRANEO**

Tesi di Dottorato
Dott.ssa **Alice Crosca**

Il Coordinatore
Prof. **Nunziacarla Spanò**

Il Tutor
Prof. **Gaetano M. Gargiulo**

(SSD: BIO/01)

1. INTRODUZIONE	1
2. MATERIALI E METODI	30
3. RISULTATI	115
4. DISCUSSIONE	202
BIBLIOGRAFIA	218

1. INTRODUZIONE

1.1. LE FANEROGAME MARINE

1.1.1. Generalità

Le fanerogame marine, conosciute come “seagrasses” nella letteratura anglosassone, sono angiosperme monocotiledoni che vivono sommerse in acque marine e salmastre delle regioni temperate e tropicali del pianeta (den Hartog 1970). L'importanza che le fanerogame rivestono negli ambienti marini costieri è universalmente riconosciuta ormai da oltre 30 anni (Duarte 2002). In questo breve arco temporale, le ricerche scientifiche sulle piante marine hanno avuto un forte sviluppo che, favorito dalla base sistematica rappresentata dalla monografia di Den Hartog (1970), ha permesso di passare da una fase iniziale, di tipo descrittivo e sistematico, a quella attuale, di taglio ecofisiologico, molecolare e sperimentale (Buia *et al.* 2003).

Recente è la pubblicazione di un manuale di metodologie dedicato alle fanerogame (Short e Coles 2001) che aggiorna il panorama su questi sistemi rispetto alla bibliografia precedente (Bortone 2000; Duarte e Fortes 1999; Hemminga e Duarte 2000; Larkum *et al.* 1989; McRoy e Helfferich 1977; Phillips e McRoy 1980, 1990; Phillips e McRoy 1990; Pollard *et al.* 1993).

La presenza in mare delle fanerogame è datata a oltre 100 milioni di anni fa, con testimonianze fossili risalenti nel Cretaceo (*Posidonia cretacea* Hos. *et v.d.* Mark) e nell'Eocene [*Posidonia parisiensis* (Brongniart) Fritel]. Infatti, 120-110 milioni di anni fa, le piante vascolari continentali ricolonizzano l'ambiente marino lasciato dai loro antenati 475 milioni di anni fa, nell'Ordoviciano, per conquistare il continente (Arber 1920; Boudouresque e Meinesz 1982; den Hartog 1970; Les *et al.* 1997; Sculthorpe 1967). L'origine delle fanerogame marine ancora non è stata compresa del tutto.

Le teorie che spiegherebbero il riadattamento delle fanerogame alla vita sommersa sono diverse. Fra queste, la teoria di Arber sostiene l'origine delle fanerogame da piante di acqua dolce che, in seguito ad un improvviso aumento di salinità, si sono diffuse progressivamente dalle acque dolci a quelle salmastre fino ad arrivare a mare (Sculthorpe 1967).

La più attendibile è quella basata sullo studio morfologico delle specie attuali e fossili sviluppata da Den Hartog (1970), secondo il quale da angiosperme terrestri che vivevano in zone intertidali, si sarebbero evolute specie capaci di sopportare brevi immersioni in acque salate. Tali specie, inizialmente, trovarono il loro habitat al confine tra terra e mare fino a quando l'impollinazione idrofila prese il sopravvento su quella anemofila, conquista evolutiva che ha permesso a tali specie di vivere completamente sommerse in mare (Mazzella *et al.* 1986).

A sostegno di tale tesi sono sicuramente di grande aiuto i reperti fossili del tardo cretaceo riconducibili ad antenati delle attuali fanerogame marine poiché sono costituiti da piante poco adattate all'acqua dolce. Diventa improbabile quindi la tesi di Arber (1920), secondo cui queste specie avrebbero avuto successo nel compiere la difficile strada dall'acqua dolce al mare passando per l'ambiente salmastro. Tuttavia, le analisi di filogenesi molecolare hanno evidenziato l'origine polifiletica delle fanerogame, ma su questo punto occorre attendere ulteriori studi (Green e Short 2003). Inoltre, la diversità morfologica e l'anatomica degli organi vegetativi e riproduttivi, non soltanto tra specie marine e terrestri ma anche tra i diversi taxa delle fanerogame marine, suggerisce che queste probabilmente non si sono evolute né da un antenato comune né attraverso gli stessi percorsi evolutivi, né nello stesso periodo geologico (den Hartog, 1970; Larkum e den Hartog, 1989; Philbrick e Les, 1996; Les *et al.* 1997). Per sopravvivere in ambiente marino hanno sviluppato differenti adattamenti: prelevano, ad esempio, in maniera efficiente carbonio inorganico dall'acqua e le sostanze nutritive necessarie per la crescita possono essere assorbite sia direttamente dalle radici, come per le piante terrestri, sia dalla colonna d'acqua attraverso le foglie. La diffusione di polline nei fiori femminili, che nelle piante terrestri tipicamente è mediata dal vento o dagli insetti, nelle fanerogame marine si verifica attraverso le correnti d'acqua. Dal momento che il sedimento del fondo marino è spesso privo di ossigeno, le parti sotterranee vengono rifornite di ossigeno dalle foglie attraverso un sistema di canali pieni d'aria all'interno del tessuto (Borum *et al.* 2004).

Le fanerogame marine non costituiscono un vero e proprio gruppo tassonomico ma un raggruppamento ecologico (den Hartog e Kuo 2006). Esse formano un gruppo di piante acquatiche «eurisalino», caratteristico per le acque con salinità instabile, quali acque salmastre mixo e iperaline, acque continentali salate dove l'anione dominante può essere cloruro o solfato (den Hartog, 1981). Alcuni di questi taxa possono trovarsi in acqua dolce, e, inoltre, alcune di esse sono state osservate in acque dolci estremamente oligotrofiche. È noto anche che i rappresentanti di questo gruppo possono resistere a fluttuazioni molto grandi ed improvvise di parametri ambientali, quali salinità e temperatura, anche se, come accade in alcuni generi come *Ruppia* Linnaeus e *Zannichellia* Linnaeus, spesso un'ampia tolleranza è accoppiata ad una ridotta capacità di competere con più taxa stenobionti in circostanze più o meno stabili (den Hartog 1970). Tuttavia non tutte sono stenoaline allo stesso grado. In particolare alcuni membri del genere *Zostera* Linnaeus, *Cymodocea* K. D. König e *Halophila* Du Petit-Thouars in una certa misura, possono penetrare in estuari e questi sono gli stessi che si estendono fino al centro della zona intertidale (den Hartog e Kuo 2006).

Dal punto di vista tassonomico, nonostante alcune tematiche siano ancora controverse, vari autori concordano nel collocarle tutte all'interno dell'ordine Alismatales (=Helobiae) (Adl *et al.* 2005;

Dahlgren *et al.* 1985; Harada 1956). I generi inclusi tra le fanerogame marine sono 15, distribuiti in 5 famiglie, Cymodoceaceae N. Taylor, Hydrocharitaceae Jussieu, Posidoniaceae Lotsy, Potamogetonaceae Reichenbach, Zosteraceae Dumortier, con circa 74 specie (*Algaebase*, Guiry M.D. e Guiry G. 2017). I generi, sebbene separati filogeneticamente (Les *et al.* 1997; Waycott *et al.* 2006), mostrano una morfologia spesso simile, risultato dell'adattamento a un ambiente meno instabile rispetto a quello terrestre (Kuo e den Hartog 2006).

Rimandando ai testi classici di sistematica per il riconoscimento delle monocotiledoni marine (Den Hartog 1970; Kuo e Mc Comb 1998; Kuo e Den Hartog 2001; Tomlinson 1982), possiamo dire che esse sono piante erbacee costituite da germogli o fusti eretti rigidi e resistenti portanti diverse foglie, rizomi striscianti e una o più radici ramificate ad ogni nodo o in alcuni nodi (Kuo e den Hartog 2006). Le porzioni sottostanti la sabbia sono normalmente costituite da radici per l'ancoraggio e da rizomi o fusti per il supporto meccanico, mentre le parti sovrastanti di solito sono costituite da germogli contenenti diverse foglie che proteggono il meristema apicale (guaina fogliare), producono sostanze per la fotosintesi e liberano vapore acqueo attraverso la traspirazione (lamina distale). Durante il periodo riproduttivo producono fiori per l'impollinazione e la fecondazione ed infine producono i semi per completare il loro ciclo vitale (Kuo e den Hartog 2006).

La distribuzione delle fanerogame marine in tutto il mondo, è stata sviluppata dall'UNEP-WCMC, basandosi su un'ampia letteratura e ricerche ad opera di esperti (Green e Short 2003). Sono state raccolte approfondite informazioni e, in seguito, è stato sviluppato un sistema di informazione geografica (GIS) (Short *et al.* 2007). Sono state formulate le bioregioni per descrivere la distribuzione, la biodiversità e il numero di specie di fanerogame nelle varie parti del globo (Short *et al.* 2001; Short *et al.* 2007).

Nel Mar Mediterraneo sono presenti diverse fanerogame marine: *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, presenti anche sulla costa atlantica del Nord Africa e portoghese; *Zostera marina* L. e *Zostera noltei* Hornemann, con una vasta distribuzione in zone temperate e *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson, risultato di un'introduzione dal Mar Rosso (Short e Coles 2001). Anche le specie *Ruppia cirrhosa* (Petagna) Grande e *Ruppia maritima* L. sono riportate per il Mediterraneo anche se sono tipiche ed esclusive di ambienti salmastri lagunari.

1.1.2. Ruolo ecologico delle praterie

Le fanerogame marine modificano profondamente gli ambienti che colonizzano, dando luogo a sistemi specifici, detti prati o praterie, tra i più diversificati, complessi e produttivi presenti lungo la fascia costiera di quasi tutti gli oceani ed i mari (Short e Coles 2001).

Composizione, estensione e struttura di questi sistemi sono condizionate non solo dalle caratteristiche biologiche delle singole specie di fanerogame, ma anche dalle caratteristiche ambientali, quali tipo e natura del substrato, geomorfologia del fondo, idrodinamismo, profondità e luminosità, tasso di sedimentazione e torbidità (Buia *et al.* 2003).

In generale, colonizzano zone dominate da substrati sabbiosi o fangosi, ma alcune specie sono in grado di colonizzare substrati rocciosi o si impiantano su strutture biogeniche “autocostruite”, dette “matte” per *Posidonia* e “turf” per *Cymodocea* e *Zostera*, formate dall'intrico di rizomi, radici e sedimento (Boudouresque e Bianconi 1986; Buia *et al.* 1985; Molinier e Picard 1952).

Data la loro complessa struttura sotterranea costituita da numerosi tessuti non fotosintetici che richiedono l'input da parte delle foglie, le piante marine richiedono grandi quantità di luce per il loro sviluppo. Quindi, le fanerogame marine vivono generalmente in acque poco profonde, ma alcune specie possono colonizzare i fondali fino a 40-50 metri di profondità (Green e Short 2003).

Nelle zone in cui le praterie marine si estendono in grandi superfici costiere, queste sono state utilizzate per molti scopi diversi, come materia prima dei materiali in vimini come imbottitura per materassi, cuscini, tappezzeria e per ottenere carta; in usi chimici, per ottenere sali e soda dalle sue ceneri e per ottenere nitrocellulosa; come combustibile per ottenere calore, come fertilizzante, isolante termico e acustico, per la costruzione di dighe artificiali artigianali, come filtro biologico nel trattamento delle acque reflue, come stabilizzatori di sedimenti in tratti di costa, come pascolo per il bestiame, come risorsa alimentare e medicinale per l'uomo, e così via (McRoy e Helfferich 1980).

L'importanza di questi organismi, com'è emerso nell'ultimo periodo del XX secolo, è nel loro ruolo chiave sui fondali superficiali dei nostri continenti. Esse sono ora considerate uno dei più importanti ‘ecosystem engineers’ data la loro capacità di cambiare significativamente numerosi aspetti di quest'ambiente (Larkum *et al.* 2006). Esse sono importanti produttori primari, forniscono cibo organico per una varietà di organismi, stabilizzano il fondo marino e lo strutturano in un ambiente complesso che funzionano da “nursery” per diverse specie animali e consente a molte di queste di viverci (Larkum *et al.* 2006). Nonostante il numero limitato di specie, queste piante costituiscono uno degli ecosistemi costieri più produttivi e importanti dei mari temperati. Si stima che le praterie coprano circa 600.000 km² dei fondali marini in tutto il pianeta e sono responsabili di una produzione di circa 600 milioni di tonnellate di carbonio all'anno e il 15% dell'assorbimento totale di CO₂ degli organismi marini, quindi sono indispensabili per la riduzione dei livelli di questo gas e l'aumento dell'effetto serra atmosferico (Luque e Templado 2004). Costituiscono l'habitat per molte specie, essendo le sue foglie, rizomi e radici vivai di molte fasi giovanili che trovano in loro un posto in cui passare inosservati dai predatori e, inoltre, sono un luogo di riproduzione per numerose specie (Reyes 2011). Le fanerogame marine, infatti, hanno una struttura fisica relativamente complessa che fornisce

nutrienti e riparo che permettono un'elevata biomassa e produttività di specie ittiche commercialmente importanti (Beck *et al.* 2001; Hemminga e Duarte 2000). Esse, oltre a fornire cibo organico per un'ampia varietà di organismi, stabilizzano il fondo marino grazie alle radici ed ai rizomi nei sedimenti leganti (Koch *et al.* 2006). Il ruolo dei germogli delle fanerogame marine in questo processo è altrettanto importante, dal momento che questo fornisce uno strato superficiale stabile per il benthos, riducendo l'energia dell'onda deviando le correnti e quindi favorendo il loro insediamento nei sedimenti e inibendo la risospensione (Short F.T. e Short C.A. 1984; Short *et al.* 2007; Ward *et al.* 1984). L'alta densità delle foglie aumenta la ritenzione di particelle in sospensione favorendo la maggiore trasparenza nelle acque e diminuisce l'idrodinamismo, riducendo al minimo l'erosione costiera. Queste formazioni vegetali intervengono nel controllo dei cicli biogeochimici del litorale, agendo nel riciclo di nutrienti ed essendo responsabili di un'alta produzione di ossigeno e materia organica che esportano in altri ecosistemi costieri (Reyes 2011). Migliorando i processi di sedimentazione e di assorbimento relativamente rapido di sostanze nutritive sia per le fanerogame marine che per i loro epifiti, gli ecosistemi di queste praterie rimuovono sostanze nutritive e altri contaminanti dalla colonna d'acqua. Una volta rimosso, questi nutrienti possono essere rilasciati solo lentamente attraverso un processo di decomposizione e consumo, riducendo così i problemi di eutrofizzazione e di legame ad inquinanti organici (Hemminga e Duarte 2000). L'habitat delle fanerogame marine è inoltre fondamentale per una serie di specie minacciate, tra cui dugonghi, tartarughe marine e cavallucci marini ed altre funzioni che includono il mantenimento della variabilità genetica, una potenziale utilità biochimica (Short *et al.* 2007). Per tutti questi motivi, sono considerate come importanti rifugi per la biodiversità.

Presente lungo quasi tutte le coste del Mar Mediterraneo di cui è endemica, *Posidonia oceanica* di solito cresce su dense matte spesse fino a 4 m, costituite da rizomi vivi o morti e resti di guaine fogliari insieme a sedimenti che riempiono gli interstizi. Questi resti di guaine fogliari possono rimanere all'interno delle matte e persistere per più di 4600 anni o possono accumularsi sulle spiagge fino a due metri di altezza durante l'inverno per poi essere riportati nell'oceano in tarda primavera, mostrando così una variazione ciclica dipendente dalle condizioni ambientali quali luce, temperatura e idrodinamismo (Pergent 1990; Di Dat *et al.* 2000). Questi accumuli che con l'azione delle onde formano degli agglomerati di differenti forme, le cosiddette 'marine balls' o 'palle di *Posidonia*' o egagropili, giocano un ruolo importantissimo nella catena alimentare marina (Kuo e den Hartog 2006). La *P. oceanica* rappresenta una specie molto importante sia per la complessità e la persistenza del sistema rizoidale, sia per l'estensione delle sue praterie. Infatti è l'unica fanerogama in grado di colonizzare in maniera continua la fascia costiera compresa tra la superficie e la batimetrica dei 40 metri circa. La prateria di *P. oceanica* è considerata habitat prioritario per la Direttiva 92/43/CEE ed

ha un importante ruolo di bioindicatore: il suo stato è indice generale della qualità dell'ambiente migliore e più completo di qualsiasi altro parametro, sia esso microbiologico, chimico e fisico.

Cymodocea nodosa e *Zostera noltii*, ugualmente diffuse, formano praterie più limitate per estensione e distribuzione. In aree riparate sotto costa, dove sia in atto una regressione delle praterie di *Posidonia oceanica*, queste tre specie sono commiste o contigue. Fino ad ora, per l'area del Mediterraneo, sono stati effettuati molti studi ecologici, oltre che progetti di mappatura, di monitoraggio e di protezione delle praterie di *C. nodosa*, sebbene le caratteristiche anatomiche di questa fanerogame e le loro variazioni siano meno note (Cecchereli e Cinelli 1990; Garrido *et al.* 2013; Mazzela *et al.* 1998; Peduzzi e Vuković 1990; Reyes e Sanson 1994; Rismondo *et al.* 1997).

Zostera marina può essere considerata una specie relitta: la sua distribuzione è estremamente puntiforme e limitata a zone costiere con afflussi di acque dolci.

Halophila stipulacea è una specie di origine lessepsiana diffusa soprattutto nella porzione orientale del Mediterraneo e con copertura limitata (Buia *et al.* 2003).

1.1.3. Regressione e salvaguardia delle praterie

Oltre ad essere estremamente importanti da un punto di vista ecologico, le praterie sono dei sistemi estremamente vulnerabili.

Purtroppo oggi si assiste, lungo gran parte delle coste italiane, ad una sostanziale riduzione delle superfici dei posidonieti. Le praterie di *C. nodosa* stanno rapidamente diminuendo in tutto il mondo, con tassi che stanno aumentando da una media del 0,9% l'anno prima del 1940 al 7% l'anno dopo il 1990; a causa di questi alti tassi di diminuzione, le praterie sono tra gli ecosistemi più minacciati sulla terra (Waycott *et al.* 2009). Molte delle fanerogame marine sono considerate a rischio di estinzione perché direttamente minacciate o perché presenti in habitat gravemente minacciati da attività antropiche (IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <<http://www.iucnredlist.org>). La protezione delle praterie di fanerogame marine dovrebbero essere valutate attraverso legislazioni nazionali e internazionali, in quanto queste specie sono elencate come protette o in pericolo (lista Službeni 76/06, Convenzione di Barcellona 1976, Convenzione di Berna del 1979, Direttiva 92/43 / CEE del Consiglio).

Gli impatti umani sulla distribuzione, la diversità e lo stato di salute delle praterie, sono profondi e si verificano in diverse scale mostrando, in particolare, l'assenza di praterie nei porti industrializzati e in altre zone di intenso sviluppo umano costiero (Orth *et al.* 2006; Short e Wyllie-Echeverria 1996). Le praterie infatti sono in rapida regressione nelle zone altamente sviluppate nonostante gli sforzi occasionali per mitigarle e ripristinarle (Short *et al.* 2006b). Gli impatti antropici possono essere diretti o indiretti. I primi includono il dragaggio, i materiali di riempimento, la bonifica del terreno,

la costruzione di pontili e di moli e alcune pratiche di pesca e acquacoltura. I secondi invece includono lo scarico di sostanze nutritive e sedimentarie dagli spartiacque, la rimozione della vegetazione costiera che determinano una ridotta trasparenza dell'acqua favorendo il processo di regressione delle praterie essendo particolarmente sensibili alla limitazione della luce. Gli effetti del cambiamento climatico globale sulle fanerogame marine sono difficili da documentare, ma si manifestano come innalzamento del livello del mare, aumento della temperatura, esposizione alle radiazioni solari o aumento delle tempeste, riducendo in gran parte l'habitat, la distribuzione e la diversità dei fondali marini (Duarte *et al.* 2008; Short e Neckles 1999).

In molte parti del mondo, i recenti cambiamenti nella distribuzione delle specie sono avvenuti come risultato dell'alterazione dell'ambiente fisico o del trasporto di specie dalle loro località endemiche (Short *et al.* 2007). L'invasione di *Halophila stipulacea* dal Mar Rosso nel Mediterraneo dopo l'apertura del Canale di Suez ha portato ad una distribuzione diffusa di *H. stipulacea* nel Mediterraneo occidentale, che si estende fino a ovest come in Sicilia ed ora, probabilmente a causa del traffico navale, verso il Caraibi (Ruiz e Ballantine 2004). L'espansione dei letti di *Cymodocea nodosa* nel Mediterraneo occidentale è spesso legata alla concorrenza con *Posidonia oceanica*. Quando quest'ultima specie è assente (come risultato di fattori abiotici), lo sviluppo di *C. nodosa* è più esteso, in particolare nelle lagune e negli estuari o in condizioni di elevato idrodinamismo. Il verificarsi di specie invasive nelle aree a fondo molle può portare alla regressione o alla scomparsa delle praterie di fanerogame marine come quando è stata accidentalmente introdotta nel Mediterraneo negli anni '80 l'alga *Caulerpa taxifolia* (M.Vahl) C. Agardh, la cui espansione ha portato a regressioni localizzate sia delle praterie di *C. nodosa* che di *P. oceanica* (Ceccherelli e Cinelli, 1997; Meinesz *et al.* 1993).

1.1.4. Protocolli di micropropagazione

Negli ultimi anni c'è stato un notevole interesse per lo sviluppo di protocolli per la micropropagazione di piante acquatiche (Provan *et al.* 2007; Wilson e Bennett 2008). Lo sviluppo di tali protocolli è importante se si considerano sia le difficoltà che le fanerogame marine hanno nel crescere in condizioni controllate sia la necessità di produrne un gran numero per programmi di recupero ambientale, senza compromettere popolazioni preesistenti. Inoltre, lo sviluppo di queste tecniche fornisce una serie di strumenti investigativi che possono essere utilizzati per indagare le esigenze di crescita di queste piante in ambiente axenico, un aspetto che non è stato ancora esaminato in nessuna di questi taxa. Il successo di tali metodiche può dipendere in modo rilevante dal livello di conoscenza dei dati citogenetici relativi agli organismi su cui queste tecniche si vogliono applicare (Šesek *et al.* 2005). La mancanza di questi dati ha conseguenze sull'esito delle diverse manipolazioni

biotecnologiche, come ad esempio la rigenerazione di piante cresciute in vitro (da tessuti intatti), calli, sospensione cellulari e protoplasti (Anrini e Jha 2009). Infatti, è noto che nuclei con livello alto di ploidia perdono la loro capacità a dividersi.

1.1.5. Scopo della tesi

Sebbene le fanerogame marine siano state oggetto di studio in diverse discipline (sistematica, fisiologia, biologia cellulare e molecolare, genetica, conservazione ed ecologia) e numerosi dati siano stati ottenuti anche grazie all'utilizzo di tecniche avanzate di biologia molecolare (Larkum *et al.* 2006; Larkum *et al.* 2018; Les e Tippery, 2013), pochissimo si conosce della loro citogenetica di base, della quantità di DNA nucleare e della dimensione del genoma (*C-value*) (da Silva *et al.* 2017; Gargiulo *et al.* 2018; Greilhuber 2008). I dati cariologici riguardano poche popolazioni e spesso sono limitati al solo numero cromosomico, senza informazioni sul cariotipo e sui possibili meccanismi coinvolti nella sua evoluzione (den Hartog *et al.* 1987; den Hartog 1979; Goldblatt e Johnson 1979; Harada, 1956; Huang *et al.*, 2010; Kuo 2001, 2013; Kuo *et al.* 1990; Ito *et al.* 2010; Miège 1960; Stewart e Rùdenberg 1980; Uchiyama 1993; Vanitha *et al.* 2016).

I dati cariomorfologici sono noti in 12 taxa (Gargiulo *et al.* 2018; Gargiulo *et al.* 2020; Huang *et al.* 2010; Semroud *et al.* 1992; Vanitha *et al.* 2016; Wang *et al.* 2011), mentre i dati sul quantitativo di DNA e sulla dimensione del genoma sono insufficienti; solo in cinque specie se ne conosce il loro valore (Bennett e Leitch I. 2010; Cavallini *et al.* 1995; Koce *et al.* 2008; Koce *et al.* 2003; York 2005; Gargiulo *et al.* 2018). L'analisi citogenetica che indica i possibili meccanismi coinvolti nella variazione del numero di cromosomi è stata recentemente riportata solo per i generi *Halodule* Endlicher, *Halophila* Du Petit Thouars e (da Silva *et al.* 2017; Gargiulo *et al.* 2018). Inoltre, Peska *et al.* (2020), riportano la presenza di ripetizioni dei telomeri di tipo umano sui cromosomi di *Zostera marina*.

Lo scopo di questo progetto è di ampliare le conoscenze di citogenetica collegate alle fasi di differenziamento e sviluppo degli organi (in particolare della radice) di alcune fanerogame marine, per aiutare a comprenderne i meccanismi coinvolti. Tali conoscenze sono fondamentali per migliorare la gestione delle diverse fasi che si susseguono durante l'impianto di colture in vitro di questi organismi. In particolare, lo studio si concentrerà su popolazioni di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Halophila stipulacea* (Forsskål), *Posidonia oceanica* (L.) Delile, Ascherson e *Zostera noltei* Hornemann presenti lungo le coste della Sicilia (Calvo *et al.* 2010) per capire, se presente, la dinamica di endoploidizzazione nei tessuti di questi taxa e descriverne il modello. Pochi sono gli studi che riguardano tali aspetti nei vegetali (Barow e Jovtchev 2007; Kocová *et al.* 2016). A oggi, non esistono dati su nessuna specie inclusa tra le angiosperme marine, nonostante il forte impatto che tali

studi potrebbero avere non solo per la conservazione ma anche per la comprensione della tassonomia, filogenesi, ecologia e genetica di popolazioni di questo gruppo di organismi.

1.2. POLIPLOIDIA

1.2.1. Generalità

La poliploidia somatica è un fenomeno già da qualche tempo noto in piante e animali come risultato di diversi meccanismi cellulari quali mitosi acitocinetica, fusione dei nuclei, mitosi di restituzione, endomitosi ed endoreduplicazione dei cromosomi (Barow e Jovtchev 2007; Bourdon *et al.* 2010; D'Amato 1964, 1984, 1989; D'Amato e Durante 2002; Husband *et al.* 2013; Kocová *et al.* 2016). Quest'ultima rappresenta il principale meccanismo che porta all'aumento della quantità di DNA in cellule della linea somatica di organi e tessuti nelle angiosperme (Bourdon *et al.* 2010; D'Amato 1989; Nagl 1976; Soltis *et al.* 2015). Endopoliploidia è un termine utilizzato per indicare una moltiplicazione esponenziale del DNA nucleare ($2n$) in assenza di mitosi. L'endopoliploidizzazione si manifesta a vari livelli di ploidia (etichettati come 2C, 4C, 8C, 16C ...) in differenti cellule nello stesso individuo come risultato di diversi cicli di sintesi del DNA senza mitosi. La variazione dei livelli di ploidia della cellula sono indicati anche come poliploidia somatica. L'endopoliploidizzazione è principalmente il risultato sia dell'endoreduplicazione che dell'endomitosi (D'Amato 1964).

L'endomitosi è stata descritta per la prima volta da Geitler (1939) nell'insetto *Gerris lateralis* Schummel (*Heteroptera*) come processo di divisione cromosomica senza divisione cellulare. Durante il ciclo endomitotico i cromosomi raddoppiano e si condensano (endoprofase, endometafase) all'interno di un involucro nucleare intatto. I cromatidi fratelli poi si separano e decondensano nel nucleo portando all'endopoliploidia, che si caratterizza per la moltiplicazione del numero di cromosomi visibili. Cicli endomitotici di questo tipo sono stati riportati in diversi gruppi animali ma raramente in angiosperme (D'Amato 1989; Weiss e Maluszynska 2001).

Il processo di endoreduplicazione fu descritto per la prima volta da Levan (1939) nella zona di allungamento delle radici di *Allium cepa* L. Esso porta alla replicazione dei cromosomi senza la successiva divisione del nucleo e della cellula e senza alcun evidente segno di condensazione e decondensazione della cromatina. I cromatidi nell'interfase possono separarsi o rimanere uniti in determinate regioni, principalmente nei centromeri, o, molto raramente, lungo la maggior parte della loro lunghezza. In quest'ultimo caso si formano i fasci dei cromatidi, i cosiddetti cromosomi giganti. Molti cicli successivi di replicazione del DNA senza la segregazione dei cromatidi fratelli può provocare la formazione di cromosomi politenici (Maluszynska *et al.* 2013). Entrambi i processi,

endomitosi e endoreduplicazione, differiscono dalla mitosi per mancanza di formazione dei fusi mitotici e per la presenza dell'involucro nucleare durante tutto l'endociclo.

Non tutte le cellule di un organismo vanno incontro a poliploidia, piuttosto in uno stesso organo o tessuto possono essere presenti cellule a diverso grado di ploidia, polisomatia (Barow e Jovtches 2007; Leitch I. e Leitch A. 2013). La poliploidia somatica è collegata a vari aspetti della vita dell'intero organismo e delle cellule che lo compongono. Correlazioni a vario livello sono state dimostrate tra poliploidia e volume cellulare, dimensioni dei nuclei, crescita e differenziamento cellulare, metabolismo, adattamento ecologico e "life strategy" (Barow 2006; Barow e Meister 2003; Bourdon *et al.* 2010; Kocová *et al.* 2016). Un controllo sistemico dell'endopoliploidia è stato riscontrato in alcune specie di piante (Maluszynska *et al.* 2013). In queste, la polisomatia può essere espressa nelle radici, foglie, piccioli, fusti, internodi e fiori. I dati hanno evidenziato che ogni tessuto presenta un modello caratteristico di endopoliploidizzazione correlato con lo stadio di sviluppo, evidenziando che la polisomatia è spazialmente e temporalmente regolata. Gli altri processi, come la fusione di nuclei o la presenza di cellule multinucleate, possono portare anche alla poliploidizzazione, ma sono rari e non essenziali per lo sviluppo della pianta (D'Amato 1984).

Sebbene l'endoreduplicazione sia diffusa negli eucarioti, il ruolo e il controllo dell'endociclo sono scarsamente caratterizzati nelle piante. Aumentare la conoscenza riguardo i meccanismi di regolazione del ciclo cellulare dovrebbero contribuire a migliorare la comprensione della regolazione dell'endociclo e del significato biologico dell'endopoliploidizzazione nello sviluppo delle piante. Studi recenti di genetica, principalmente utilizzando mutanti *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., hanno rivelato i geni chiave coinvolti nella regolazione dell'endopoliploidia vegetale, ed il progresso nelle tecniche di citometria di flusso e di immagine ha accelerato le indagini e la determinazione del modello di endopoliploidizzazione in nuove specie vegetali (Maluszynska *et al.* 2013).

1.2.2. Endopoliploidia nelle piante

L'endopoliploidizzazione è strettamente associata alla differenziazione cellulare ed è essenziale per il normale sviluppo e la fisiologia in molti organi diverse di piante e animali. In alcune specie l'endopoliploidia è stata riportata ad alto livello in quasi tutti gli organi, mentre in altre specie si verifica in misura bassa o non in tutti gli organi ed è correlata con lo sviluppo delle piante (Maluszynska *et al.* 2013). Alcuni studi hanno suggerito che l'endopoliploidizzazione può avvenire nelle fasi iniziali della differenziazione tissutale durante lo sviluppo degli embrioni (Gendreau *et al.* 2008). Durante la germinazione del seme e lo sviluppo successivo della pianta appare una crescente percentuale di nuclei endopoliploidi. Di solito il livello più alto di endopoliploidia è osservato negli ipocotili e nelle radici primarie. Questo può essere spiegato dalla considerevole percentuale di tessuto

vascolare presente in questi organi. L'aumento dell'endopoliploidia sembra essere correlato con il loro allungamento rapido durante la germinazione, e quindi connesso con lo sviluppo del tessuto vascolare (Barow 2006; Barow e Meister 2003). Quasi tutti gli organi vegetali possono diventare polisomatici durante sviluppo vegetativo e riproduttivo (Maluszynska *et al.* 2013). Tuttavia, è stato osservato che l'endopoliploidia è assente nei meristemi del germoglio e dell'apice radicale (Kudo e Kimura 2001a; Lim e Loh 2003). Ciò suggerisce che la repressione dell'endopoliploidizzazione all'apice del germoglio potrebbe essere uno dei meccanismi per garantire la stabilità genetica della linea germinale (Kudo e Kimura 2001a).

Il livello di endopoliploidia è generalmente specie ed organo specifico, ma di solito gli organi più anziani mostrano un maggiore livello di endopoliploidia rispetto a quelli più giovani a parte qualche eccezione in cui il modello di polisomatia rimane invariato sia nelle foglie giovani sia nelle mature (Gilissen *et al.* 1993). Nonostante i numerosi studi, tuttavia, il contributo ed il ruolo dell'endopoliploidia nella crescita vegetale e nello sviluppo non è ancora pienamente compreso. Lo sviluppo delle piante e la differenziazione cellulare di solito sono accompagnate da un aumento della dimensione cellulare e da una correlazione tra la quantità di DNA nucleare e la dimensione cellulare come è stato riportato in alcune specie vegetali (Bertin 2005; Jovtchev *et al.* 2006; Melaragno *et al.* 1993). Questo ha portato all'ipotesi di un 'rapporto nucleo-citoplasma'. Questa ipotesi afferma che un certo meccanismo di controllo assicura che la quantità di citoplasma in una cellula è proporzionale alla quantità di DNA nel suo nucleo. Le specie con genomi più grandi hanno generalmente nuclei e volumi cellulari più grandi ed è ben noto che le cellule poliploidi sono più grandi delle cellule diploidi (Cavalier-Smith 2005; Jovtchev *et al.* 2006; Webster *et al.* 2009).

L'ipotesi che l'endoreduplicazione effettivamente determina il tasso di crescita cellulare è stato proposto in base a numerose osservazioni supportate dal fatto che l'endoreduplicazione di solito precede l'espansione cellulare (Traas *et al.* 1998). Tuttavia, la teoria del "rapporto nucleo-citoplasma" non spiega perché le cellule di diversi tessuti in un dato organismo con la stessa quantità di DNA differiscono nella dimensione nucleare e cellulare (Maluszynska *et al.* 2013). I dati correnti sostengono un ruolo fisiologico di endopoliploidia come facilitatore della crescita cellulare e come acceleratore per la crescita dell'organo (Kondorosi *et al.* 2000; Chevalier *et al.* 2011).

Il verificarsi dell'endopoliploidia e un alto grado di endopoliploidizzazione sembra essere caratteristico in molte famiglie vegetali e soprattutto sembra essere comune in specie con genoma di piccole dimensioni (ad esempio, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* L., *Brassica oleracea* L.). Questo sembrerebbe dovuto al fatto che alcune cellule specializzate hanno bisogno di un determinato quantitativo minima di DNA nucleare per mantenere il proprio stato funzionale, e questo potrebbe essere raggiunto attraverso l'endopoliploidizzazione in cellule vegetative (Nagl 1976;

Galbraith *et al.* 1991). Il livello di endopoliploidizzazione sembra essere correlato non solo con dimensioni del genoma ma anche con il tipo di ciclo vitale. Gli endopoliploidi sono più frequenti nelle piante erbacee annuali anziché perenni (Barow e Meister 2003). L'analisi di endoreduplicazione nelle cellule della radice durante la differenziazione all'interno di diverse famiglie monocotiledoni ha rivelato un più alto livello di endopoliploidia nelle specie con un minore contenuto del DNA e un tipo di ciclo vitale annuale (Olszewska e Osiecka 1982). Un buon esempio di tale correlazione è *Arabidopsis thaliana*, che presenta un genoma di piccola dimensione (157 Mb in Bennett *et al.* 2003), un ciclo vitale breve e un'endopoliploidizzazione in tutti gli organi vegetativi (Galbraith *et al.* 1991).

1.2.3. Metodi per analizzare l'endopoliploidia

L'endopoliploidia può essere studiata quantitativamente e qualitativamente. I metodi quantitativi permettono di stabilire il modello di ploidia di un tessuto, un organo o un intero organismo. Per questo la citometria di flusso è più diffusa anche se la citometria d'immagine (ICM) sta generando maggiore interesse (Vilhar *et al.* 2001). Entrambe le tecniche consentono un'analisi veloce e un alto rendimento del DNA nucleare. La preparazione del campione per entrambe le tecniche richiede l'isolamento di una sospensione nucleare, di solito raggiunto con l'omogeneizzazione meccanica di un tessuto in un opportuno buffer di isolamento (Dolezel *et al.* 2007). Successivamente, i nuclei sono colorati con un fluorocromo, spesso DAPI o ioduro di propidio, ed il loro contenuto di DNA viene valutato sulla base della intensità di fluorescenza (Dolezel e Bartos 2005; Dolezel *et al.* 2007). I dati vengono visualizzati sotto forma di istogramma nel quale i picchi consecutivi rappresentano cicli di endoreduplicazione. Il valore medio di endopoliploidizzazione può essere calcolato in base all'istogramma, che consente un'analisi comparativa dell'endopoliploidia tra i diversi campioni. Esistono due parametri che determinano il valore medio di endopoliploidia: (1) il Mean C-level e (2) il Cycle-value (Barow e Meister 2003; Barow e Jovtchev 2007). Il Mean C-level indica il contenuto medio del DNA per nucleo ed è calcolato dal numero di nuclei per ciascun livello di ploidia moltiplicato per il corrispondente livello ploidia. La somma è divisa per il numero totale di nuclei che sono stati studiati. Il Cycle-value rappresenta il numero medio di endocicli per nucleo e viene calcolato dal numero di nuclei a ciascun livello di ploidia moltiplicato per il numero di cicli di endoreduplicazione necessari per raggiungere il corrispondente livello di ploidia. La somma viene poi suddivisa per il numero totale di nuclei. Un valore di ciclo inferiore a 0,1 indica una pianta non polisomatica. Sebbene la citometria di flusso consente di misurare rapidamente il livello di ploidia in un gran numero di cellule, non fornisce informazioni specifiche sul tessuto. Il vantaggio della citometria d'immagine rispetto alla citometria di flusso è che combina dati citometrici con microscopia fluorescente (Vilhar *et al.* 2001). I nuclei sono studiati su vetrini e dopo o contemporaneamente con la determinazione del contenuto

del DNA, possono essere utilizzati per studi con altre tecniche come la ibridazione fluorescente in situ (FISH). Questa tecnica impiega sonde specifiche fluorescenti che si legano ad una porzione del cromosoma o sull'intero cromosoma. Analizzando la dimensione e la localizzazione dei segnali interni si può ottenere la struttura dei cromosomi endoreduplicati. Infatti, usando questo approccio per i nuclei delle foglie di *A. thaliana*, è stato dimostrato che i cromatidi fratelli rimanevano associati lungo tutto la lunghezza dei cromosomi nei nuclei con bassi livelli di endopoliploidia, mentre con livelli di ploidia oltre i 16C si osservava una dissociazione delle regioni centromeriche (Schubert *et al.* 2006, 2008). I risultati ottenuti per nuclei endoreduplicati nell'endosperma di *Zea mays* L. sostengono la tesi secondo la quale la dissociazione dei cromatidi fratelli è probabilmente il risultato di una diminuzione del numero di siti di coesione lungo i bracci del cromosoma (Schubert *et al.* 2009).

Informazioni sull'organizzazione della cromatina in nuclei endoreplicati possono essere ottenuti dalla FISH che è utile non solo per determinare il livello di ploidia in un nucleo singolo di un tessuto in fase di analisi ma può anche fornire informazioni circa i meccanismi con cui è guidata l'endoreduplicazione (Maluszynska *et al.* 2013; Weiss e Maluszynska 2001). L'utilizzo accoppiato di entrambe le tecniche FISH con i dati citometrici consente di ottenere informazioni sull'organizzazione e la struttura dei cromosomi endoreplicati a varie livelli di ploidia (Schubert *et al.* 2006, 2008).

1.3. ANATOMIA E MORFOLOGIA VEGETATIVA DELLE FANEROGAME MARINE

1.3.1. Generalità

Tutte le fanerogame marine mostrano diverse modificazioni sia morfologiche che anatomiche, sia vegetative che riproduttive, che le differenziano da quelle terrestri. Queste piante infatti, hanno sviluppato un complesso sistema di rizomi o fusti sotterranei efficace per l'ancoraggio in fondi sedimentari instabili e hanno acquisito modificazioni floreali per consentire in modo efficiente la dispersione del polline in acqua in assenza di venti e insetti impollinatori (Larkum *et al.* 2006). I rizomi possono disporsi orizzontalmente o verticalmente ed entrambi i tipi non hanno una differenziazione definitiva e, se necessario, possono adottare un altro tipo di crescita. I rizomi orizzontali sono responsabili della colonizzazione di nuovi spazi, principalmente ai margini delle praterie sottomarine, mentre quelli verticali, più frequenti nelle aree centrali delle praterie, impediscono la sepoltura delle piante per i processi di sedimentazione. Nei rizomi si riconoscono nodi (le cicatrici originate dalla caduta delle foglie) e internodi (intervallo tra due nodi) più o meno lunghi a seconda della stagione. Dalla parte distale dei rizomi verticali emergono le foglie, che di solito sono

più lunghe che larghe e con i bordi laterali più o meno paralleli (tranne le foglie ovali del genere *Halophila*, o le foglie cilindriche di *Syringodium*), e sono disposte in piccole fasce terminali. Le radici si sviluppano dai rizomi e permettono alla pianta di fissarsi al substrato e assorbire i nutrienti (Reyes 2011).

Le fanerogame marine possono sviluppare infiorescenze o fiori in alcuni periodi dell'anno che poiché presentano dimensioni molto ridotte e sono poco appariscenti, di solito passano inosservati. Il processo di fioritura è raro in alcune specie, mentre nella maggior parte dei generi è predominante la riproduzione vegetativa attraverso la crescita dei rizomi. Questo porta come conseguenza una bassa diversità genetica nelle praterie rendendole più fragili durante le condizioni avverse (Reyes 2011). Inoltre dal punto di vista anatomico, le angiosperme marine rispetto a quelle terrestri, presentano foglie aventi una sottile cuticola, piccole cellule epidermiche con pareti ispessite contenenti alte concentrazioni di cloroplasti, mancanza di stomi, presenza di un aerenchima sviluppato ed uno xilema ridotto a volte accompagnato da una riduzione dei tessuti meccanici, strati ridotti della parete del polline e diverse caratteristiche uniche associate alla formazione del seme e ai meccanismi di dispersione. In altri casi, invece, le fanerogame marine conservano alcune caratteristiche funzionali, morfologiche e anatomiche delle piante terrestri, come ad esempio la presenza di suberina o lignina o strutture simili che limitano i percorsi apoplastici nei fasci delle cellule della guaina fogliare ed un ipoderma e un endoderma nei rizomi e nelle radici (Kuo e den Hartog 2006).

Le descrizioni e le illustrazioni di Sauvageau (1890, 1891) forniscono le prime basi per la comprensione dell'anatomia vegetativa delle angiosperme marine. Weber (1956) ha descritto l'anatomia di rizomi lignificati e di radici avventizie delle specie mediterranee di *P. oceanica* che ancor oggi è valida, anche se è piuttosto incompleta. Più tardi, alcuni autori, come Arber (1920), si sono interessati all'anatomia delle piante acquatiche e altri, come Sculthorpe (1967), hanno avanzato ulteriormente la conoscenza sull'ecologia e sulla biologia delle piante acquatiche.

La monografia di den Hartog (1970) stabilisce il confine con la moderna tassonomia di questi organismi utilizzando caratteri morfologici ben precisi.

Tomlinson (1974) richiama l'attenzione sulla conoscenza incompleta dell'organizzazione del germoglio nelle fanerogame marine, sottolineando l'importanza della crescita vegetativa per estensione e per ramificazione dei rizomi, condizione che viene chiamata "meristema dipendente", ovvero le popolazioni si sviluppano, persistono e si diffondono grazie all'attività continua dei meristemi apicali del germoglio. In un secondo momento Tomlinson (1982) riesamina la vecchia letteratura e documenta ulteriormente la morfologia generale, l'anatomia dettagliata degli organi vegetali e le strutture riproduttive di alcuni generi.

Kuo e McComb (1989) forniscono una revisione della struttura e della funzione degli organi vegetativi, combinando dati morfologici, anatomici e ultrastrutturali. McConchie e Knox (1989a) aggiungono informazioni simili riguardo la biologia riproduttiva e l'impollinazione.

Tradizionalmente, i caratteri utilizzati per la classificazione delle fanerogame sono le strutture riproduttive (petali, sepali, stami, frutti e semi) anche se, spesso, questi dati non vengono raccolti facilmente e per questo motivo si utilizzano i caratteri vegetativi (Kuo e den Hartog, 2001). Secondo Kuo e den Hartog (2006) tutti gli organi sono costituiti da tre tessuti di base con strutture e funzioni diverse: (a) L'epidermide forma uno strato continuo sulla superficie del corpo vegetale e presenta una cuticola sulla parete esterna che fornisce protezione meccanica e limita la traspirazione e l'aerazione; (b) Il fascio vascolare contiene il floema per il trasporto dei soluti e lo xilema per il trasporto dell'acqua; (c) Il tessuto parenchimatico che presenta pareti sottili ed il collenchima non lignificato sono responsabili della fotosintesi e dello stoccaggio mentre la spessa parete lignificata dello sclerenchima agisce come supporto meccanico. Un parenchima aerifero consente il movimento di gas.

1.3.2. Morfologia della radice

Le radici delle fanerogame marine sono avventizie e nascono dalla superficie inferiore dei rizomi, generalmente nei nodi e attraversano i tessuti corticali ed epidermici per poi penetrare nel substrato. La parte più vecchia di una radice è marrone chiaro, la più giovane crema o bianca (Kuo e Cambridge 1978).

Secondo Kuo e den Hartog (2006) la morfologia esterna delle radici presenta differenti caratteri a seconda del genere e del tipo di substrato in cui si insedia. Ad esempio, l'*Halophila* produce radici singole non ramificate con robusti peli radicali per penetrare nei diversi tipi di substrato, a differenza delle radici di *Zostera* che sono sempre disposti in coppia su ciascun nodo, ognuno portante 2-12 radici sottili non ramificate e con numerosi lunghi peli radicali per crescere in substrati fangosi e sabbiosi (Kuo e den Hartog 2006; Tomlinson, 1974). Le radici di *Posidonia*, che invece sono sottili, delicate ma ampiamente ramificate, non sono associate ai nodi ma vengono prodotte di solito in coppia lateralmente e irregolarmente al nodo dalla stele del rizoma, con peli rari e, se presenti, di solito associati a substrati sabbiosi (Grenier 1869; Kuo e Cambridge 1978; Ostfeld 1916; Tomlinson 1974; Weber 1956). Infatti la produzione di radici è intimamente associata allo sviluppo del germoglio, poiché le radici nascono con disposizione acropetala vicino all'apice del rizoma (Kuo e Cambridge 1978). D'altro canto la *Cymodocea*, che solitamente cresce sulle sabbie bianche coralline, presenta ad ogni nodo del rizoma una o più radici moderatamente ramificate e pochi peli radicali che si sviluppano robusti sugli assi con lunghi internodi e sottili negli internodi corti (Bornet 1864; Sauvageau 1891; Kuo e den Hartog 2006; Tomlinson 1974).

1.3.3. Anatomia della radice

L'apice della radice di tutti le fanerogame marine presenta una cuffia radicale distinta per proteggere le cellule meristematiche fornendo un set continuo di cellule in divisione (Kuo e den Hartog 2006). Di solito, le cellule giovani della cuffia sono piccole, ricche di citoplasma e presentano pareti sottili a differenza delle cellule mature che hanno pareti più spesse e sono vacuolate (Kuo e Cambridge 1978). Inoltre, i granuli di amido sono più abbondanti nella parte basale della cellula rispetto alla distale. Sul margine della cuffia, le cellule sono altamente vacuolate, con poco citoplasma e senza granuli di amido.

La regione matura può presentare peli radicali a seconda della specie e tessuti parenchimatici corticali che racchiudono lacune aerifere e una stele centrale.

Kuo e Cambridge (1978), effettuando studi su sezioni trasversali di una radice matura di *Posidonia* con il micrografo a scansione, hanno mostrato la presenza di diverse regioni distinte: epidermide, esoderma, corteccia, endoderma e stele.

Le cellule contenenti polifenoli sono disperse in tutti i tessuti della radice, compresa la stele.

Anche se i dettagli dell'anatomia radicale possono essere diversi tra i generi in base alla morfologia radicale ed al substrato in cui si insediano, tutte le radici delle fanerogame hanno uno strato di cellule epidermiche, con o senza peli radicali, e un esoderma (Kuo 1993).

Sullo strato più esterno, le cellule epidermiche di solito presentano pareti sottili, non lignificate e un citoplasma periferico. In *Posidonia* l'epidermide radicale è costituita da cellule che presentano una parete ricca di polifenoli (Kuo e Cambridge 1978). All'interno l'epidermide è presente un esoderma distinto costituito da uno o più strati di cellule, ciascuno con pareti spesse ma non lignificate che contengono lamelle di suberina e polisaccaridi come cellulose ed emicellulose (Kuo 1993b; Kuo e Cambridge 1978; Kuo e McComb 1989). Inoltre, nelle cellule dell'esoderma della radice di *Zostera* e *Halophila* sono presenti bande di Caspary e, quelle confinanti con i peli radicali, presentano delle cellule di trasporto caratteristiche (Barnabas 1994b, 1996; Barnabas e Arnott 1987; Gunning e Pate 1969; Gunning 1972; Kuo e den Hartog 2006; Pate e Gunning 1972). In *Halophila*, le pareti tra le cellule esodermiche ed i peli radicali prodotti dalle cellule epidermiche non si accrescono verso l'interno ma possiedono numerosi plasmodesmi che potrebbero avere un ruolo nell'assorbimento dei nutrienti dai peli radicali e nel trasporto di questi nelle cellule corticali (Roberts 1993). Inoltre Webster e Stone (1994a) hanno ritrovato cutina, lipidi, callosio, carboidrati ma non lignina nelle pareti dei peli radicali del genere *Zostera*.

La struttura cellulare e la disposizione della corteccia varia a seconda del tipo di radice, ma quest'ultima spesso presenta tre zone distinte. Nelle radici sottili, come nel caso della *Posidonia* e

dell'*Halophila*, la corteccia esterna consiste di diversi strati di cellule compatte, le cui cellule interne sono molto più piccole di quelle esterne e presentano pareti sottili e non lignificate. La corteccia centrale è ampia ed è rappresentata da una serie di lacune aerifere longitudinali separate da gruppi di cellule collassate ed allungate che in sezione trasversale, a volte, possono presentarsi biforcute o fuse e contenenti piccoli pori intercellulari. La corteccia interna presenta un parenchima lignificato costituito da 5-6 strati di piccole cellule compatte, disposte in modo regolare e concentrico, che presentano un citoplasma ricco di mitocondri, reticolo endoplasmatico ed una parete sottile con numerosi plasmodesmi (Albergoni *et al.* 1978; Kuo e Cambridge 1978; Kuo e McComb 1989; Kuo 1993b; Kuo e den Hartog 2006; Roberts *et al.* 1985). Nel caso delle radici di *Cymodocea* e *Zostera*, mentre la corteccia centrale contiene due o più strati di cellule irregolari con pareti sottili che a volte formano lacune aerifere irregolari, la corteccia interna presenta due o più strati di cellule piccole, compatte e con pareti sottili (Kuo e den Hartog 2006). Queste lacune aerifere potrebbero facilitare il movimento di gas sia dalla base all'apice della radice sia dalla superficie della radice al fusto o viceversa (Borum *et al.* 2006; Tomlinson 1982).

In tutte le specie di fanerogame marine, l'endoderma è molto distinto e consiste di uno strato cellulare compatto che racchiude la stele limitando così i movimenti dei soluti e dell'acqua tra la corteccia e la stele (Kuo e Cambridge 1978). Le pareti cellulari dell'endoderma possono essere sottili o moderatamente spesse, lignificate o non, e spesso contengono una banda di Caspary distinta sulle pareti radiali, come è possibile osservare in *Posidonia*. In particolare, l'endoderma della *Posidonia* è costituito da uno strato di cellule vive prive di spazi intercellulari che presentano spesse fasce irregolari e lignificate in tutta la parete cellulare (Albergoni *et al.* 1978). Inoltre, nelle pareti cellulari di alcune specie di *Zostera* e nell'ipoderma e nell'endoderma radicale di *Posidonia*, è stato riportato uno strato ricco di suberina la cui funzione sembra limitare lo scambio di acqua e soluti e impedire l'invasione di microrganismi (Kuo e Cambridge 1978; Kuo e den Hartog 2006).

Albergoni *et al.* (1978) suggerisce che la struttura del midollo della *Posidonia* è tipicamente un actinostele, cioè formata da un unico fascio cribro-vascolare centrale di tipo radiale, in cui lo xilema centrale si distribuisce secondo dei raggi di numero variabile, detti arche, ed il floema riempie gli spazi tra quest'ultimi costituendo a sua volta delle arche floematiche che si alternano alle prime. Lo xilema presenta tracheidi con pareti poco lignificate e le pareti delle cellule parenchimatiche vascolari sono sottili e con un citoplasma ricco di mitocondri, reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi (Kuo e Cambridge 1978).

In *Zostera* la stele è costituita da xilema e floema senza un distinto periciclo e gli elementi xilematici o sono rappresentati da pochi tracheidi con pareti sottili e scarsamente lignificate o da un singolo ampio lume cellulare (Kuo e den Hartog 2006). Diversi tubi floematici con pareti cellulari normali

sono circondati da cellule del parenchima vascolare, le quali presentano pareti ispessite e sono ricche di citoplasma (Barnabas e Arnott 1987).

Numerose sono state le controversie riguardo l'importanza funzionale delle radici di fanerogame marine per l'assorbimento di soluti in ambienti acquatici sommersi. Il sistema vascolare ridotto ed il povero sviluppo di peli radicali in alcune specie hanno portato alla proposta che le radici sono irrilevanti per l'assunzione di acqua e sostanze nutritive (Sculthorpe 1967). Tuttavia Kuo e Cambridge (1978), esaminando l'anatomia di base dei rizomi e del sistema radicale di *Posidonia australis* J.D. Hooker, hanno fornito evidenze anatomiche relative all'assorbimento ed al trasporto di soluti. Infatti le radici contengono strutture, come tracheidi e vasi xilematici che, nonostante siano poco visibili e scarsamente lignificati, sembrano siano necessari per l'assorbimento e la traslocazione dei soluti. D'altra parte, Roberts *et al.* (1985) suggerisce che tutte le strutture della radice di *Halophila ovalis* (R. Brown) J.D. Hooker sono coinvolte nell'assorbimento e nel trasporto delle sostanze poiché, durante lo sviluppo delle radici, i tubi floematici si differenziano prima degli elementi xilematici e della formazione dei peli radicali mentre la formazione delle bande di Caspary ed il differenziamento dello xilema avviene in modo sincrono. Inoltre le cellule epidermiche che producono i peli radicali contengono più citoplasma e possiedono un numero maggiore di plasmodesmi con le sottostanti cellule corticali esterne rispetto alle cellule adiacenti che producono i peli radicali (Robert 1993).

1.3.4. Morfologia del rizoma

I rizomi delle fanerogame marine di solito sono erbacei, da cilindrici a compressi lateralmente, con ramificazioni monopodiali o simpodiali, continue o diffuse (Kuo e den Hartog 2006). I fusti in *Posidonia*, *Cymodocea* e *Zostera* sono rigidi, mentre in *Halophila* sono soffici ed erbacei (Kuo e den Hartog 2006). La lunghezza dell'internodo è relativamente lunga nella maggior parte dei generi (Barnabas 1994b).

In *Posidonia* gli assi vegetativi si ramificano con una crescita monopodiale e sono rappresentati da un rizoma orizzontale appiattito che porta foglie erette. Il meristema cresce precocemente producendo ramificazioni ad intervalli irregolari che ripetono la costruzione dell'asse principale o ramificazioni comunemente abortite (o inibite) che persistono come un meristema potenzialmente dormiente (Kuo e Cambridge 1978; Tomlinson 1974).

In *Zostera*, *Cymodocea* e *Halophila* gli assi vegetativi si differenziano in rizomi orizzontali (perenni), monopodiali ed a crescita indeterminata, ed assi eretti (di solito annuali), a crescita determinata e simpodiali solo quando fioriscono. Il meristema inizialmente si separa dal nodo nel quale è iniziata una crescita intercalare, occupando così una posizione opposta alla foglia immediatamente al di sotto del nodo precedente, e l'ulteriore sviluppo porta a meristemi che

abortiscono, o sono inibiti e probabilmente fungono da meristemi di riserva, altrimenti si sviluppano sia come germogli fogliari eretti annuali sui quali nascono i fiori, sia come rizomi orizzontali perenni che ripetono la costruzione dell'asse principale (Setchell 1929, 1933). Questa differenziazione morfologica del germoglio è dovuta alla periodicità della crescita stagionale che condiziona in gran parte la morfologia degli assi (Bornet 1864; Tomlinson 1974). Quindi i meristemi dei rizomi si sviluppano ramificazioni secondo tre possibilità: o diventano nuove unità del rizoma (germogli lunghi) o germogli corti a crescita indeterminata oppure ancora germogli corti a crescita determinata che terminano con un fiore con l'ulteriore possibilità di sviluppare una ramificazione di tipo simpodiale sotto il fiore terminale attraverso i meristemi laterali. Inoltre, la ramificazione può essere continua, quando si ha una ramificazione in ogni nodo come avviene in *Halophila*, o diffusa, quando i rami vengono prodotti a intervalli irregolari come in *Posidonia*, *Zostera* e *Cymodocea* (Tomlinson 1974).

In *Posidonia* e *Zostera* i rizomi sono sepolti nei sedimenti e presentano cicatrici persistenti alle giunzioni delle guaine fogliari fibrose che persistono per molti anni coprendo i rizomi (Kuo e den Hartog 2006).

1.3.5. Anatomia del rizoma

In sezione trasversale gli internodi dei rizomi e gli assi eretti sono simili e possiedono una disposizione dei tessuti simili a quelle delle radici: il più esterno è l'epidermide, segue l'esoderma, l'ipoderma, la corteccia (cilindro corticale) multi-stratificata di cellule parenchimatiche, un endoderma e una stele centrale (midollo o cilindro centrale) (Kuo e Cambridge 1978). Le cellule contenenti polifenoli sono disperse in tutti i tessuti del rizoma, compreso la stele. L'epidermide che normalmente è distinta e rivestita da una cuticola, presenta cellule con pareti spesse e lignificate contenenti sostanze polifenoliche come tannini (Kuo e Cambridge 1978; Kuo e den Hartog 2006). In *Posidonia* e *Halophila* l'esoderma e l'ipoderma sono distinti e presentano più di uno strato di cellule con pareti ispessite e lamelle mediane contenenti suberina (Kuo e den Hartog 2006).

Le cellule parenchimatiche corticali della porzione esterna sono più larghe e con pareti spesse e lignificate rispetto a quelle interne piccole, con pareti sottili, prive di lignina e contenenti pectina. In *Posidonia* e in *Zostera* sono presenti anche granuli di amido immersi nelle cellule parenchimatiche corticali (Kuo e Cambridge 1978; Kuo e den Hartog 2006; Weber 1956), il cui accumulo suggerisce che i rizomi possono avere un ruolo importante anche nel deposito di carboidrati, come avviene nei rizomi di molte altre piante acquatiche (Sculthorpe 1967).

In tutti i generi, all'interno dei tessuti corticali si sviluppano numerose lacune aerifere, il cui numero sembra essere costante per ogni genere (Kuo e Cambridge 1978; Kuo e den Hartog 2006). A differenza dei tessuti radicali, accanto alla stele centrale, in *Cymodocea*, *Zostera* e *Posidonia* spesso sono presenti due o più fasci vascolari e numerosi fasci fibrosi sparsi lungo i tessuti corticali esterni del rizoma e del fusto (Kuo e den Hartog 2006). Ciascuna fibra è provvista di un piccolo lume, presenta pareti spesse, debolmente lignificate e contenti polisaccaridi, cellulose ed emicellulose (Kuo e Cambridge 1978).

In tutti i generi è presente una stele centrale composta da uno o più elementi protoxilematici centrali e tubi floematici, racchiusa da un'evidente endoderma ricco di suberina e mancante di periciclo (Kuo e den Hartog 2006).

Kuo e Cambridge (1978), analizzando la sezione trasversale del rizoma di *Posidonia australis* Hook.f., riportano un unico strato di endoderma con struttura uguale a quella descritta per la radice che racchiude una stele centrale a forma di stella costituita da un elemento xilematico centrale e fibre xilemiche debolmente lignificate circondate da numerosi tubi floematici.

Albergoni *et al.* (1978) descrivendo il rizoma, in uno studio dedicato all'anatomia di *P. oceanica*, propongono una struttura polistelica formata da più fasci concentrici che possono essere di due diversi tipi: un atactostele centrale (tipico delle monocotiledoni) avente un numero limitato di fasci concentrici perixilematici che appaiono distribuiti apparentemente senz'ordine in tutta la sezione trasversale; sei (o più raramente 8) steli laterali più piccoli, disposti sullo stesso piano, tre (o quattro) ad ogni lato della stele centrale e costituiti da un singolo fascio perixilematico centrale, circondato da un anello floematico. Le strutture interpretate da Albergoni *et al.* (1978) come steli laterali possono essere confuse con i fasci corticali, ma la presenza di un endoderma in ciascuna di queste strutture (endoderma che manca nelle foglie) così come le modalità della loro istogenesi da aree di differenziazione chiaramente definite, conferma la loro interpretazione. Infatti, l'apice vegetativo, con una forma a cupola leggermente appiattita, porta steli laterali più vicini alle corrispondenti zone di differenziazione, che comunque restano chiaramente separati. Mentre lungo il tratto longitudinale, gli steli laterali si biforcano con una frequenza irregolare ed immediatamente ogni ramo si fonde con un ramo della stele contigua, realizzando così un reticolo indipendente della stele centrale. Il ramo esterno della stele più laterale determina la nervatura più esterna della foglia. Va notato che durante il suo breve percorso lungo il rizoma, questo ramo non ha endoderma, ed è per questo che deve essere considerato come un elemento fogliare.

1.3.6. Morfologia e anatomia della foglia

La foglia è prodotta o a partire dai nodi del rizoma, come avviene in *Halophila*, *Posidonia* e *Zostera*, o dall'apice degli assi eretti come nel caso di *Cymodocea*.

La disposizione delle foglie è tipicamente distica in tutte le specie ma possono essere pronunciate simmetrie a destra o a sinistra (Tomlinson 1974). Le foglie di solito sono raggruppate in formano un'unità costituita da diverse foglie, indicata come germoglio che contiene foglie a differenti stadi di sviluppo (Kuo e den Hartog 2006).

Tomlinson (1974) utilizza come carattere identificativo i germogli per distinguere le specie di fanerogame marine: quando il germoglio genera un solo tipo di foglia, come avviene nei generi *Posidonia*, *Zostera* e *Cymodocea*, la specie viene chiamata monomorfica, mentre quando il germoglio genera due tipi di foglia, come nel caso di *Halophila*, la specie è detta dimorfica.

Ciascuna foglia consiste di una guaina basale ed una lamina distale che produce sostanze per la fotosintesi e libera il vapore acqueo attraverso la traspirazione (Grenier 1860; Kuo e den Hartog 2006; Sauvageau 1890, 1891).

A differenza delle monocotiledoni terrestri, la superficie della lamina fogliare delle angiosperme marine è semplice e nuda come in alcune specie di *Posidonia* o presenta peli unicellulari sulla superficie delle cellule epidermiche più pronunciati sul lato abassiale come in alcune specie di *Halophila*, o corti peli /spine o 'denti marginali' sui margini della lamina fogliare verso gli apici della foglia, come in altre specie di *Halophila* e *Cymodocea* (Kuo e den Hartog 2006). La forma delle cellule epidermiche in visione superficiale differisce tra le specie e può essere utilizzata come carattere identificativo in alcuni generi come *Posidonia* e *Halophila* (Cambridge e Lambers, 1998; Kuo 1978; Kuo 2005; Kuo e den Hartog 2006; Kuo e McComb 1989; Kuo e Stewart 1995; Kuo *et al.* 1988). Anche l'aspetto degli apici fogliari spesso sono utilizzati come un importante carattere diagnostico per una sicura identificazione dei generi che includono *Zostera* (den Hartog 1979).

Le differenze anatomiche più evidenti nella struttura delle fanerogame marine rispetto alle piante terrestri sono la mancanza di stomi, la presenza di uno strato ben definito di cuticola, l'epidermide che agisce come maggiore sito fotosintetico e la riduzione degli elementi conduttori di acqua (Kuo 1978; Kuo e den Hartog 2006). D'altro canto, gli altri tipi cellulari e tessuti sono simili o presentano lievi differenze tra i gruppi di fanerogame marine.

A livello ultrastrutturale la cuticola si presenta come uno strato elettrondenso trasparente, sottile ed uniforme in *Halophila*, moderatamente sottile e con 'cavità subcuticulari' dentro o vicino le giunzioni (soprattutto fuori dalle pareti tangenziali) in *Zostera* e *Cymodocea*, e moderatamente spesso con un aspetto fibrillare o poroso in *Posidonia* (Kuo 1978; Kuo e den Hartog 2006).

Le cellule epidermiche normalmente sono piccole con pareti diverse a livello istochimico e ultrastrutturale. Le pareti tangenziali esterne si presentano come una struttura microfibrillare impacchettata, spessa e costituita da polisaccaridi, proteine con poca cellulosa e mai lignificata, com'è possibile osservare nei generi *Zostera*, *Posidonia* ed *Halophila* (Doohan e Newcomb 1976; Kuo e den Hartog 2006). La parete radiale si assottiglia dall'esterno verso l'interno e per la maggior parte è costituita da cellulosa e pectine. Le pareti tangenziali interne invece mostrano una struttura lamellare e uniforme che, in alcune specie di *Halophila* e *Posidonia*, si accresce verso l'interno e presenta cellule di trasporto associate al plasmalemma (Gunning 1972; Gunning e Pate 1969; Pate e Gunning 1972). Kuo (1978) suggerisce che la presenza nell'epidermide di cellule di trasporto con pareti spesse presumibilmente indica il loro coinvolgimento nel trasporto a breve distanza e nell'assorbimento dei soluti dall'ambiente acquatico circostante. Inoltre i plasmodesmi sono stati riportati solo nei primi stadi di sviluppo dell'epidermide della foglia di *Zostera* e non nella zona di maturazione, suggerendo che in quelle specie che presentano pareti che si accrescono verso l'interno non esiste continuità citoplasmatica tra le cellule epidermiche e quelle del mesofillo sottostante e quindi il movimento dei nutrienti è apoplastico (Jagel 1983; Kuo e McComb 1989). D'altro canto, un sistema ben sviluppato di connessioni plasmodesmiche con le cellule adiacenti in tutte le pareti cellulari di *Posidonia* suggerisce la possibilità di una via simplastica (Kuo 1978; Kuo e McComb 1989; Kuo e Stewart 1995; Kuo e den Hartog 2006).

In alcune Angiosperme marine, vi è una concentrazione maggiore di cloroplasti nelle cellule epidermiche rispetto a quelle del mesofillo, probabilmente come forma di adattamento per ridurre la diffusione di CO₂ in acqua piuttosto che per il fattore luce (Albergoni *et al.* 1978; Sculthorpe 1967). Infatti, l'epidermide della lamina fogliare è il maggior sito di fotosintesi per le fanerogame marine e le piante d'acqua dolce, diversamente dalle piante terrestri (Larkum *et al.* 2006). Nelle foglie mature, ogni cellula epidermica, oltre a presentare un'alta concentrazione di cloroplasti, contiene mitocondri, gocce lipidiche, apparato del Golgi, reticolo endoplasmatico e, a volte, come in *Posidonia*, *Cymodocea* e *Zostera*, piccoli granuli di amido e vacuoli contenenti polifenoli (Kuo 1978; Kuo e den Hartog 2006).

Appena sotto l'epidermide sono presenti tessuti meccanici che includono gruppi di fibre cellulari che insieme alle spesse pareti epidermiche, forniscono resistenza alla trazione riducendo però il grado di flessibilità (Kuo 1978; Kuo e den Hartog 2006). La presenza di fibre cellulari nella lamina fogliare è un carattere utilizzato per distinguere le specie in alcuni generi come *Posidonia*, *Zostera* e *Cymodocea*, ma è assente o ridotta in altri generi come *Halophila* (Kuo e den Hartog 2006). In *Posidonia* si presentano come bande di varia dimensione con pareti spesse, uniformi e moderatamente elettrondense, prive di lignina e ricche di cellulosa ed emicellulosa, abbondanti

vicino ai margini ed associate ai fasci vascolari e all'ipoderma adiacente alla lacuna aerifera (Kuo 1978; Kuo e den Hartog 2006). Un solo strato di cellule epidermiche si trovano sopra un parenchima di 3-5 cellule in cui sono incorporati i fasci vascolari longitudinali.

Il mesofillo delle fanerogame marine è un tessuto omogeneo con cellule parenchimatiche grandi, fibrillari in struttura e con pareti piuttosto sottili che, come quelle delle fibre cellulari, contengono pectina come è possibile osservare in *Posidonia* e *Zostera* (Kuo 1978; Kuo e den Hartog 2006). Il citoplasma sottile periferico contiene un solo grande vacuolo che occupa la maggior parte del lume, pochi cloroplasti grandi con una grana ben sviluppata e talvolta piccoli granuli di amido (Kuo 1978). Le cellule del mesofillo circondano lacune aerifere di varia taglia che si sviluppano per l'incremento dello spazio gassoso interno funzionale nelle piante acquatiche per poter crescere in substrati poveri di ossigeno (Borum *et al.* 2006). In alcuni generi, come *Zostera* e *Posidonia*, esse sono evidenti, disposte regolarmente e separate longitudinalmente dai fasci vascolari, mentre in altri generi come *Halophila*, sono meno evidenti o di dimensione ridotta (Kuo 1978; Kuo e den Hartog 2006). Le lacune aerifere sono interconnesse con tutti gli organi vegetativi e riproduttivi (foglie, rizomi, fusti, radici, fiori e frutti) e sono interrotte da setti trasversali che, in particolari organi, si trovano ad intervalli irregolari. In *Zostera* e *Halophila*, ciascun setto consiste di piccole cellule parenchimatiche con spazi intercellulari o pori e numerose protuberanze della parete che insieme potrebbero funzionare da 'stomi interni' per regolare il flusso gassoso all'interno dell'aerenchima (Larkum *et al.* 1989; Roberts *et al.* 1984). I setti possono prevenire il collasso delle lacune aerifere, fornire una barriera per l'entrata d'acqua e permettere l'entrata di gas continua all'interno del sistema lacunare assicurando il trasporto laterale nelle radici, nei rizomi e nei fusti o nel mesofillo parenchimatico della lamina e della guaina fogliare attraverso la corteccia (Kuo e den Hartog 2006). Inoltre, le lacune aerifere contengono azoto, ossigeno e anidride carbonica e sono molto importanti per la fotosintesi delle fanerogame marine (Borum *et al.* 2006; Roberts e Moriarty 1987).

Le lamine fogliari delle fanerogame marine spesso possiedono tre o più nervature longitudinali interconnesse ad intervalli irregolari con nervature trasversali parallele di solito visibili ad occhio nudo e recanti almeno un elemento xilematico (Kuo 1978; Kuo e den Hartog 2006). Alcune specie possiedono anche diverse nervature laterali che formano un sistema vascolare adassiale e abassiale separato. Infatti, in *Halophila* è presente una nervatura centrale e due nervature laterali intramarginali legate alla base e all'apice ed interconnesse con diverse nervature trasversali. Le lamine fogliari di *Posidonia* presentano una nervatura parallela caratterizzata da una nervatura centrale e un numero variabile da 6-10 di nervature laterali o fasci collaterali appaiati e perfettamente simili ai fasci perixilematici su ciascuna metà della lamina (Sauvageau 1890-1891).

Secondo Albergoni *et al.* (1978), la nervatura centrale di ogni foglia è determinata dalla separazione e l'estensione del fascio cribro-vascolare della stele radicale che, col passaggio al fusto, si spezza in numerosi fasci indipendenti in relazione alla presenza delle foglie entro le quali i fasci debbono penetrare.

Il sistema vascolare delle fanerogame marine è simile a quello delle altre piante terrestri e tutte possiedono elementi xilematici e floematici e cellule parenchimatiche vascolari anche se non si distinguono le cosiddette cellule compagne associate ai tubi floematici (Kuo e den Hartog 2006). La maggior parte di questi fasci vascolari longitudinali nelle foglie sono racchiusi in un distinto strato di cellule della guaina del fascio che, in alcuni casi contengono sostanze polifenoliche, un sottile citoplasma periferico ricco di cloroplasti, ribosomi, mitocondri e vacuoli e possono sviluppare a maturità, asimmetricamente, pareti cellulari ispessite contenenti una lamella suberizzata (Esau 1977).

La struttura delle cellule della guaina del fascio differisce nei vari generi di fanerogame marine: (a) in *Posidonia* presentano pareti sottili e lignificate; (b) in *Zostera*, le pareti si accrescono verso l'interno di quelle tangenziali; (d) mentre in *Cymodocea* e *Halophila*, non sembrano avere una struttura specializzata evidente (Kuo e den Hartog 2006; Kuo 1993a). Indipendentemente dalle differenti strutture, è stato ipotizzato che le cellule della guaina del fascio nelle angiosperme marine, così come nelle terrestri, potrebbero essere coinvolte nel limitare il trasferimento di soluti tra il mesofillo ed il tessuto vascolare attraverso la via simplastica (Kuo e McComb 1989; Kuo 1993a). Inoltre, O'Brien e Carr (1970) suggeriscono che questo strato può ridurre lo scambio apoplastico di acqua e soluti tra il mesofillo ed il tessuto vascolare.

Nelle fanerogame marine i tubi floematici presentano o pareti sottili con un lume relativamente grande, come in *Posidonia*, o un ispessimento irregolare della parete senza lignificazione ed un lume di varie dimensioni, come in *Zostera* (in Kuo e den Hartog 2006; Kuo 1983b). Nonostante la differenza nella struttura anatomica, entrambi i tipi di elementi floematici hanno proprietà citoplasmatiche simili, presentano un plasmalemma distinto e contengono mitocondri, reticolato endoplasmatico liscio impilato, plastidi con proteine cristalloidi e, a maturità, mancano di nucleo e ribosomi (Kuo e den Hartog 2006).

Le fanerogame marine, di solito, sono caratterizzate da un tessuto xilematico ridotto come risultato della perdita della funzione meccanica e conduttiva necessaria alle piante terrestri per un apporto costante di acqua (Sculthorpe 1967). In tutte le specie acquatiche i vasi sono essenzialmente assenti e le tracheidi ridotte sono rappresentate da elementi debolmente lignificati che presentano pareti ispessite anulari o spirali (Tomlinson 1982). In *Zostera*, lo xilema ed il floema sono totalmente separati e lo xilema è rappresentato da una singola larga lacuna circondata da uno strato

elettrondenso di cellule parenchimatiche xilematiche con pareti ispessite ma non lignificate. D'altro canto, negli altri generi, lo xilema ed il floema sono uniti e gli elementi xilematici presentano pareti altamente idrolizzate, lignificate nel caso di *Posidonia*, o non lignificate, come in *Halophila* e *Cymodocea* (Kuo e den Hartog 2006). In tutte le fanerogame marine, ad eccezione delle *Zosteraceae*, che presentano una parete cellule parenchimatiche floematiche, le strutture delle cellule parenchimatiche vascolari sono simili. Esse contengono normalmente più cloroplasti (con una grana poco sviluppata), mitocondri, goccioline lipidiche, ribosomi liberi e reticolo endoplasmatico rugoso, nonché plastidi con corpi elettronici opachi simili a cristalli proteici e plasmodesmi con pareti ingrossate che formano connessioni con le cellule parenchimatiche vascolari (Kuo e den Hartog 2006).

Le guaine fogliari, di solito ricoperte fino alla base dai sedimenti, nascono dicotomicamente sul rizoma e racchiudono le foglie giovani in via di sviluppo. Esse rimangono relativamente intatte per 6-12 mesi dopo la morte e, a seconda della natura del substrato e del livello di attività microbica, si staccano alla giunzione tra la lamina e la guaina a livello dell'epidermide e dell'ipoderma meccanico (composto da fibre lunghe con pareti cellulose) dando origine ad agglomerati sferici o ovali di colore marrone chiaro e di consistenza feltrosa, gli egagropili, che si accumulano sui litorali costieri sospinti dalle onde nelle zone costiere dove si trova *Posidonia* e *Zostera* (Albergoni *et al.* 1978; Kuo 1978; Tomlinson 1972). Entrambe le guaine fogliari e i rizomi producono fibre contenenti lignina e cellulosa ma quest'ultime sono la più probabile fonte di accumulo di fibre marine poiché presentano un maggior contenuto di lignina (Read e Smith 1919; Winterbottom 1917). Le fibre mantengono la loro forma e preservano le essenziali caratteristiche dei depositi che si accumulano sia sotto le praterie viventi di fanerogame che sotto le dune di sabbia confinanti con la costa (Kuo e Cambridge 1978). Bell (1952) ritiene che questo accumulo di depositi è il risultato di una rapida crescita verso l'alto dei rizomi e la resistenza delle fibre alla decomposizione potrebbe essere associata al modo in cui queste sono impregnate di lignina. Infatti le cellule parenchimatiche non lignificate dei rizomi e delle guaine fogliari possono essere perse presto dopo la morte del tessuto, mentre i filamenti di fibre lignificate restano intatti. La lignina non solo agisce come un impermeabilizzante, ma in determinate condizioni, come la suberina e la cutina, è resistente alla degradazione ritardando l'idrolisi polisaccaridica (Clowes and Juniper, 1968). Una struttura simile ad una lingua, detta ligula, è prodotta come una protuberanza adassiale alla giunzione della guaina e della lamina fogliare in tutte le fanerogame marine eccetto nelle *Hydrocaritaceae* (Kuo e den Hartog 2006).

L'anatomia della guaina fogliare è, in generale, simile a quella della lamina, ma i dettagli della ultrastruttura e le porzioni esterne ed interne dell'epidermide e dei tessuti meccanici mostrano

differenze significative. Infatti, a differenza della lamina, gli spazi intercellulari sono più grandi nella guaina rispetto a quella della lamina, la cuticola dell'epidermide della guaina appare come uno strato sottile, uniforme, elettrondenso, ma non poroso e ricco di polifenoli o lipidi, come è possibile osservare in *Posidonia* o carente di cavità subcuticolari, come in *Zostera* (Kuo 1978; Kuo e Stewart, 1995; Kuo e den Hartog 2006). La struttura microfibrillare nelle pareti delle cellule epidermiche è impacchettata secondo una disposizione regolare. Le cellule epidermiche e parenchimatiche sono altamente vacuolate, con un citoplasma periferico sottile e, se presenti, cloroplasti sparsi nelle porzioni esterne (Kuo 1978; Kuo e den Hartog 2006). In contrasto alla lamina, i gruppi di fibre sono ampiamente distribuiti tra i tessuti parenchimatici della guaina e sono simili in struttura alle fibre associate con l'epidermide adassiale anche se non sono lignificate (Kuo 1978). Infatti, come descritto da Sauvageau (1890, 1891), le fibre della guaina, che si trovano immediatamente sotto le cellule epidermiche, sul lato abassiale sono presenti in tutte le porzioni di guaina (inclusi i lembi) e presentano pareti non lignificate, mentre sul lato adassiale sono presenti solo nella parte principale della guaina e mostrano un grande lume, una parete spessa, lignificata e contenente cellulosa.

Le differenze più evidenti tra le cellule epidermiche di *Posidonia* e quelle di altre angiosperme marine, sono la presenza di materiali polifenolici e l'assenza di pareti cellulari ispessite (Kuo 1978). I fasci vascolari della guaina fogliare sono simili a quelle delle lamine, anche se le pareti della fibra e delle cellule epidermiche nella lamina fogliare sono insolitamente spesse e ricche di polisaccaridi cellulosici e emicellulose, ma non sono lignificate a differenza della guaina fornendo così non solo un supporto meccanico per lo sviluppo delle foglie ma anche sufficiente flessibilità per resistere all'azione continua dell'oceano (Kuo 1978). Inoltre, a differenza della lamina fogliare, la guaina probabilmente ha una piccola funzione per il rendimento della fotosintesi o degli scambi ionici con il substrato circostante, ma è fondamentale per la protezione dei meristemi apicali e per lo sviluppo delle foglie (Kuo e den Hartog 2006). Tyerman (1989), durante gli studi condotti sulle fanerogame marine, mostra che all'interno della soluzione racchiusa dalla guaina vi è un gradiente osmotico che determina l'assorbimento di ioni dalla guaina.

1.4. ANATOMIA E MORFOLOGIA RIPRODUTTIVA

1.4.1. Generalità

Per tutte le specie di fanerogame marine, la loro distribuzione è dovuta alla riproduzione sessuale combinata alla crescita asessuale ed è influenzata dalla dispersione e dalle limitazioni ambientali (Spalding *et al.* 2003).

Molte popolazioni sono altamente clonali, in gran parte contano sulla riproduzione asessuale per conservare la popolazione attraverso una crescita orizzontale dei rizomi, producendo unità modulari o 'ramets' (sensu Harper 1977) che possono essere fisiologicamente indipendenti ma geneticamente identici alla pianta madre o 'genet' (Short *et al.* 2007; Waycott *et al.* 2006). Altre producono un gran numero di propaguli sessuali (Kuo *et al.* 1991) o modificano le loro strategie riproduttive a seconda delle condizioni ambientali (Rasheed 1999; Robertson e Mann 1984; Phillips *et al.* 1983a).

Le fanerogame possono riprodursi sessualmente producendo frutti e semi o asessualmente attraverso la crescita del rizoma (Kuo e Kirkman 1987). I semi prodotti da alcune specie di fanerogame marine possono rimanere dormienti nei sedimenti per qualche tempo e formare una "banca del seme" (den Hartog 1971; Inglis e Waycott 2001; McMillan 1983). I semi per la maggior parte delle specie sono poco adattati per la dispersione e molti sono rilasciati al di sotto della superficie del sedimento (den Hartog 1970; Orth *et al.* 1994).

1.4.2. I fiori

La maggior parte delle piante acquatiche conserva i sistemi fiorali dei loro antenati terrestri ma alcune specie col tempo hanno acquisito modificazioni a tali sistemi per facilitare in modo efficiente l'impollinazione in habitat acquatici. Molte delle parti fiorali nelle fanerogame marine, infatti, sono più semplificate e con un ridotto perianzio in confronto a quelle delle piante terrestri, e tali modifiche possono variare nei diversi taxa (Soros-Pottruff e Posluszny 1994; Tomlinson 1982). Mentre le Hydrocharitaceae e le Zosteraceae possono contenere sia generi monoici che dioici, le Posidoniaceae sono esclusivamente monoiche e le Cymodoceaceae sono interamente dioiche.

In *Cymodocea*, *Zostera* e *Halophila* l'infiorescenza è a spadice, ovvero costituita da una grande brattea modificata, chiamata spata, che avvolge l'asse principale appiattito noto come spadice su cui si formano i fiori. Inoltre, mentre in *Cymodocea* e nelle specie di *Halophila* che non presentano assi eretti i fiori sono unisessuali, quasi sempre solitari e si sviluppano e maturano progressivamente su ciascun nodo del rizoma, in *Zostera* nascono come rami terminali (portanti da una a tre infiorescenze) o laterali su alcuni nodi (Kuo 2005). In *Posidonia* invece le infiorescenze sono racemose costituita da un asse centrale sul quale si inseriscono lateralmente i fiori con brattee fogliari supportate da lunghi peduncoli della stessa lunghezza in punti diversi lungo l'asse florale (i più vecchi nella parte più bassa dell'asse florale, mentre i più giovani nella parte verso la sommità). Inoltre in *Posidonia* i fiori sono bisessuali (ermafroditi), ciascuno con tre stami e un fiore femminile costituito da un ovario oblungo contenente un ovulo e uno stigma a disco con lobi irregolari (Kuo e den Hartog 2006).

L'*Halophila* presenta fiori perigini con un ipanzio, ricettacolo fatto a coppa, sul cui margine superiore sono inseriti tre tepali (antofilli non distinguibili in sepali e petali costituenti il perianzio, il cui insieme prende il nome di perigonio) sovrapposti che racchiudono tre antere mentre in fondo alla coppa stessa, senza però aderire alle pareti interne, si trova il fiore femminile consiste di un ovario con tre placente parietali contenenti numerosi ovuli e 2-6 stili filiformi. In *Zostera* il fiore maschile ha uno stame con due antere biloculari (teca), mentre il fiore femminile (gineceo) ha un singolo ovario con un ovulo, uno stilo corto e due stigmi che sporgono verso la superficie della guaina dello spadice. In *Cymodocea* il fiore maschile ha due antere fuse alla stessa altezza, mentre il fiore femminile, che è sessile o con un pedicello corto, possiede due ovari liberi, ciascuno con uno stilo lungo o corto che si estende in due o tre stigmi sottili (Kuo e McComb 1989; McConchie e Knox 1989a).

L'impollinazione in tutte le fanerogame marine è idrofila ed avviene quando gli stami maturi formano delle aperture longitudinali nelle antere sommerse che rilasciano il polline in acqua per poi staccarsi dallo spadice (nei fiori monoici) o staccarsi interamente dalla pianta (nelle piante dioiche).

Cox (1988) e Ackerman (1995) argomentano che l'impollinazione può avvenire anche sulla superficie dell'acqua in alcune specie di *Halophila* e *Zostera*, perché i loro organi riproduttivi maturi spesso galleggiano sulla superficie dell'acqua ed il polline sembra essere rilasciato durante la massima escursione di marea.

In base alla loro struttura e alla modalità di impollinazione esistono tre tipi principali di polline. In *Halophila* il fiore maschile rilascia granuli di polline che presentano una forma ellissoide o sferica, possiedono sia l'esina (parete esterna) che l'intina (parete interna) come strato protettivo e formano catene all'interno di tubi mucillaginosi (Pettitt e Jermy 1975). I restanti generi di fanerogame producono polline filiforme unico senza esina (McConchie e Knox 1989a) anche se la sua disposizione all'interno dell'antera è diversa tra i generi. Lo sviluppo ultrastrutturale del polline in *Zostera*, descritto da Pettitt e Jermy (1975), mostra che i filamenti di polline di lunghezza varia si trovano paralleli all'asse longitudinale dell'antera e presentano pareti costituite da due strati microfibrillari a differenza di quelle della *Posidonia* che non sono chiaramente stratificate ma presentano inclusioni globulari e tubulari nelle porzioni esterne (Pettitt 1984).

Il polline di tutte le fanerogame è trinucleato, cioè composto da tre cellule aploidi (una forma il tubetto pollinico e le altre due sono direttamente coinvolte nel processo riproduttivo), indipendentemente se è granulare o filamentoso, e i suoi nuclei si trovano centralmente. L'entrata del tubo pollinico nella sacca embrionale è stata osservata raramente nelle fanerogame (Ackerman 1993; McConchie e Knox 1989a). Pertanto, i processi dettagliati di impollinazione e di fecondazione in queste specie rimangono sconosciute (Kuo e den Hartog 2006).

1.4.3. Frutti e semi

Dopo la fecondazione, in tutte le fanerogame, l'ovario si sviluppa in un frutto, ma il suo sviluppo e la sua struttura sono diversificati tanto quanto i modelli e le strutture dei fiori (Orth *et al.* 2006). In generale i semi sono dotati di una riserva nutrizionale e tendono ad affondare piuttosto che galleggiare. La caratteristica strutturale più rilevante degli embrioni delle fanerogame marine è che l'endosperma è di breve durata e viene sostituito da un ipocotile ingrandito (Tomlinson 1982). In alcune fanerogame marine, esso sembra servire non solo come riserva di nutrienti per la germinazione ma anche da sistema stabilizzante che mantiene un orientamento di seminazione costante (Kuo e den Hartog 2006).

La *Posidonia*, la *Cymodocea* e la *Zostera* producono frutti contenenti un unico seme ellissoidale in via di sviluppo a differenza dell'*Halophila* che produce numerosi semi sub-sferici.

Kuo e Kirkman (1996) classificano tre principali tipi di semi funzionali in relazione all'immagazzinamento di nutrienti, alla struttura del tegumento del seme e alla germinazione (Orth *et al.* 2006). Al primo tipo appartengono i generi *Zostera*, *Halophila* e *Cymodocea*, i quali presentano semi quiescenti con un pericarpo duro o un rivestimento del seme distinto in un esocarpo delicato, un mesocarpo e un endocarpo duro e fibroso che produce un gran numero di lunghe cellule con pareti spesse e lignificate come tegumento. Il genere *Posidonia*, appartiene al secondo tipo e presenta semi non quiescenti con un pericarpo carnoso, un pistillo modificato. Ogni seme possiede un embrione con una foglia primordiale distinta protetta da un cotiledone arrotolato e da un ipocotile ingrandito in *Zostera* e *Halophila*, o una radichetta ridotta adiacente ad un ipocotile ingrandito come in *Posidonia* e *Cymodocea*. Istochimicamente, entrambi i tipi presentano semi che immagazzinano una grande quantità di amido e poche proteine nel tessuto dell'ipocotile da utilizzare durante la germinazione e lo sviluppo del seme.

Come in tutte le angiosperme, i semi delle fanerogame marine normalmente germinano dopo un periodo di dormienza, la cui durata dipende dalla struttura del tegumento del seme. Il genere *Posidonia*, che presenta semi con un tegumento membranoso, non ha un periodo di dormienza distinto e i semi germinano quando vengono rilasciati dalle piante parentali a differenza dei semi degli altri generi che hanno rivestimenti più o meno duri e presentano periodi di quiescenza che vanno da pochi mesi a pochi anni (Kuo e den Hartog 2006).

2. MATERIALI E METODI

Campioni di *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson, *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Zostera noltei* Hornemann, collezionati in differenti località lungo le coste siciliane, sono stati oggetto di studio per l'analisi morfo-anatomica, l'analisi citogenetica classica e molecolare e la quantificazione del DNA nucleare. Per poter acquisire i dati di citogenetica di base e quelli relativi all'ontogenesi della radice sono stati messi a punto, per ogni specie studiata, le metodiche da utilizzare.

Lo studio ontogenetico dei diversi tessuti della radice e l'analisi citogenetica classica sono stati effettuati mediante la messa a punto dei protocolli di inclusione in resina e di schiacciamento/colorazione AzurA riportati, rispettivamente, nel Capitolo 2.2 e 2.3.

La Citometria di Flusso e la Citogenetica Molecolare sono state sperimentate durante il soggiorno presso il Laboratorio del Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, Germania). Per assicurare la possibilità di utilizzare materiale vivo, indispensabile, per procedere a una corretta sperimentazione durante i mesi di soggiorno in tale struttura, sono stati ricercati i parametri chimico-fisici per il mantenimento delle diverse fanerogame marine mediterranee in condizioni controllate (vedi Capitolo 2.4).

I dati relativi alla citogenetica molecolare sono stati ottenuti dall'esecuzione dei protocolli di isolamento di DNA genomico, di ibridazione fluorescente in situ (FISH) e di immunolabeling (Capitolo 2.5).

La quantificazione del DNA nucleare mediante Image-Cytometry (IC) e Flow Cytometry (FC) e in particolare le operazioni di controllo del sistema e di misura sono riportate nel Capitolo 2.6. Per ogni tecnica utilizzata sono riportati, in modo specifico, sia gli aspetti teorici che quelli applicativi.

2.1. SITI DI CAMPIONAMENTO

Questo studio è stato condotto principalmente con il materiale raccolto durante gli anni 2017-2020 eseguendo diverse immersioni con A.R.A (autorespiratore ad aria) al fine di individuare le stazioni di campionamento più idonee per la raccolta delle popolazioni di fanerogame marine mediterranee. La campagna di raccolta è stata inizialmente effettuata nell'area dello Stretto di Messina. Sono state così individuate e campionate tre popolazioni di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson (Lago di Ganzirri, Canale di Faro, Tono) e una popolazione di *Posidonia oceanica* (L.) Delile (località Tono) (Tab.1). Le popolazioni di *Zostera noltei* Hornemann, citate in letteratura per i Laghi di Ganzirri e Faro (Cavaliere, 1963; Calvo et al. 2010), non sono state

ritrovate e presumibilmente non sono più presenti. Si è proceduto così ad indagare le popolazioni di fanerogame marine presenti nell'area tirrenica siciliana, per individuare popolazioni di *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson nelle stazioni storiche della Riserva di Marinello (Biliotti e Abdelahad, 1990) e di Pellaro (Reggio di Calabria). Popolazioni di *C. nodosa* sono state raccolte insieme nel Laghetto Mergolo della Riserva di Marinello (Oliveri-Tindari, Messina), ma nessuna traccia della popolazione di *H. stipulacea* in entrambe le stazioni (Tab.1). Proseguendo le indagini in campo nell'area ionica, sono state individuate e campionate le popolazioni di *Z. noltei*, *C. nodosa* e *P. oceanica* che vegetano insieme presso la Baia di Brucoli (Siracusa). L'assenza di popolazioni di *H. stipulacea* storicamente riportate presso la baia di Riposto (Catania) (Villari, 1988) hanno messo in evidenza che presumibilmente esse siano scomparse. Si è così proceduto con lo studio del materiale precedentemente raccolto nel Golfo di Aqaba (Mar Rosso) presso Eilat (Israele), nello Stretto di Messina e nell'Isola di Vulcano durante gli anni 2011-2014 (Tab.1). Per quanto riguarda l'esistenza di popolazioni di *Zostera marina* in Sicilia, nel Golfo di Gela (Giaccone e Di Martino, 1996; Calvo et al. 2010), è stata verificata l'inesattezza dei dati riportati in letteratura. Buia e Marzocchi (1995) infatti, affermavano che la presunta presenza di *Z. marina* lungo le coste siciliane (Licata, Golfo di Gela) era da imputare ad una erronea interpretazione della segnalazione di *Z. noltei*.

Tab. 1. Stazioni di campionamento per la raccolta delle popolazioni di fanerogame marine mediterranee.

Taxa	Siti di raccolta	
<i>Cymodocea nodosa</i> (Ucria) Ascherson	Riserva naturale orientata di Capo Peloro, Lago di Ganzirri, Messina	38°15'40.5"N 15°37'09.6"E
	Riserva naturale orientata Laghetti di Marinello, Patti, Messina	38°08'08.4"N 15°03'17.1"E
	Baia di Brucoli, Siracusa	37°16'59.0"N 15°11'19.1"E
<i>Halophila stipulacea</i> (Forsskål) Ascherson	Eilat, Golfo di Aqaba, Mar Rosso, Israele	29°33'N 34°57'E
	Pace, Messina, Messina	38°13'46.2"N 15°34'15.0"E
	Isola di Vulcano, Isole Eolie, ME	38°24'N 14°58'E
<i>Posidonia oceanica</i> (Linnaeus) Delile	Baia di Brucoli, Siracusa	37°16'59.0"N 15°11'19.1"E
	Torrente Tono, Messina	38°17'21.1"N 15°34'08.5"E
<i>Zostera noltei</i> Hornemann	Baia di Brucoli, Siracusa	37°16'59.0"N 15°11'19.1"E

È molto probabile dunque che *Z. marina* sia assente in Sicilia, essendo tipica di climi temperati (in Italia si ritrova nell'Alto Adriatico nel Golfo di Trieste e nella Laguna Veneta) o comunque confusa con *Z. noltei*. Sono stati quindi effettuati diversi campionamenti nei vari anni e, una volta raccolto il materiale, è stato trasferito nel laboratorio del Dipartimento di Botanica e depositato nell'Erbario del Prof. G.M. Gargiulo dell'Università di Messina.

In seguito alla messa a punto di tutte le metodiche utilizzate, si è iniziato a studiare i vari aspetti di citogenetica, anatomia, quantificazione, sulle diverse popolazioni di fanerogame marine collezionate (*H. stipulacea*, *C. nodosa*, *P. oceanica* e *Z. noltei*).

In Tabella 1 sono riportati i siti di campionamento delle diverse fanerogame marine raccolte nelle lungo le coste siciliane.

2.2. STUDIO MORFO-ANATOMICO

Per ogni sito di campionamento (vedi Tab. 1), il materiale fresco delle diverse fanerogame marine raccolte è stato immediatamente posto su una vaschetta con acqua di mare e osservato con un microscopio da dissezione (Leica Wild M5A) (Fig. 1a) per una prima analisi di tipo morfologico.

Lo studio anatomico della radice delle fanerogame marine è stato condotto mediante osservazioni al microscopio ottico (Leica Aristoplan) (Fig. 1b) di sezioni longitudinali e trasversali ottenute da materiale incluso in resina (Technovit 7100) (Fig. 1c,d) e sezionato con un microtomo a rotazione (Leica, Jung Biocut, 2035) (Fig. 1e). La resina Technovit 7100 è una resina polimerizzante a freddo a base di idrossietilmetacrilato (HEMA). Seguendo le dosi consigliate, la resina polimerizza a basse temperature. Lavorando ad una temperatura ambiente di 23° C, la temperatura di polimerizzazione raggiunge i valori di 37° C. Per la stesura delle sezioni sull'acqua, i migliori risultati si ottengono con acqua distillata alla temperatura di circa 25° C. Le sezioni (ottenute al microtomo) sono state raccolte su un vetrino porta-oggetto pulito (senza utilizzo di adesivi o vetrini pretrattati). I vetrini sono stati asciugati in stufa a 37° C per tutta la notte e le colorazioni, effettuate senza rimuovere la resina, sono state eseguite col Blu cresile brillante (Fig. 1f,g).



Fig. 1 a-g. (a) Microscopio da dissezione (Leica Wild M5A); (b) microscopio Ottico Aristoplan (Leica) attrezzato con una macchina fotografica Leica DF500; (c) componenti della resina Technovit 7100; (d) apici radicali di fanerogame marine incluse in resina; (e) microtomo rotativo; (f) essiccamento delle sezioni in stufa; (g) colorazione delle sezioni con Blu di Cresile brillante.

2.2.1. Protocollo di inclusione in resina

L'allestimento dei vetrini prevede le classiche fasi di *fissazione*, *disidratazione*, *inclusione*, *colorazione* e *montaggio*.

❖ *Fissazione*

1. Isolare radici di circa 1 cm di lunghezza con una lametta sterile in una piastra Petri
2. Sciacquare più volte in acqua distillata per eliminare le impurità
3. Fissare per 1h in formalina tamponata in acqua di mare al 4%

❖ *Disidratazione*

4. Sciacquare abbondantemente in acqua corrente prima di sottoporli a disidratazione con serie crescenti di alcol
5. Disidratare le radici con serie crescenti di etanolo sciacquando per ogni passaggio:
 - I. Etanolo 70% (30 minuti circa)
 - II. Etanolo 70% (30 minuti circa)
 - I. Etanolo 95% (30 minuti circa)
 - II. Etanolo 95% (30 minuti)
 - I. Alcol assoluto (1 ora)

Con una pipetta Pasteur eliminare i 2/3 di alcol dalla boccettina e aggiungere l'alcol pulito, evitando così che i campioni siano esposti all'aria.

❖ *Preinfiltrazione*

6. Preparare una miscela 1:1 di alcol assoluto e resina Technovit 7100.
7. Immergere i campioni nella soluzione per 2 ore a temperatura ambiente.

❖ *Infiltrazione*

8. Sciogliere con un'agitazione (magnetica o meccanica) di almeno 5 minuti, 1g di induritore I (una bustina) in 100 ml di liquido base.
9. Impregnare i campioni nella soluzione preparata, rispettando il rapporto volume del campione /quantità di soluzione di lavoro pari almeno ad 1:3, per 1-12 ore, a seconda delle dimensioni e del tipo di tessuto del campione da processare. Per una migliore impregnazione dei campioni, collocare la boccettina in un agitatore meccanico e lasciarlo tutta la notte. La soluzione ottenuta (soluzione d'infiltrazione o soluzione di lavoro) resta stabile per circa 4 settimane, se conservata in frigo a 4° C. Per le volte successive, togliere la soluzione dal frigo e tenere a temperatura ambiente fino al momento dell'utilizzo.

❖ *Inclusione*

10. Con una pipetta prelevare 1 ml di induritore II e aggiungere a 15 ml di soluzione d'infiltrazione mescolando nel beker con un agitatore magnetico.
11. Versare la soluzione ottenuta nelle cavità delle Histoform (la capacità è di 1-3 ml).
12. Versare i campioni impregnati in una vaschetta e prelevandoli con un bastoncino di legno, asciugarli accuratamente su carta prima di trasferirli nelle cavità delle Histoform. Eventualmente impregnare ulteriormente i campioni nella soluzione di infiltrazione pulita.
13. Introdurre i campioni negli stampi avendo cura di orientarli correttamente per il taglio. A temperatura ambiente pari a 23° C si hanno 5-7 minuti per eseguire queste operazioni, dopodiché la resina inizia la sua polimerizzazione addensandosi. Sempre ad una temperatura di 23° C la resina polimerizza completamente in due ore circa.
14. Osservare che i campioni non galleggino nella soluzione, ma si dispongano sul fondo, indice di una buona disidratazione. I campioni possono essere introdotti in stufa ad una temperatura costante di 23° C. Ricordare di coprire sempre le soluzioni durante la preparazione per evitare che assorbano umidità.
15. Sezionare al microtomo e raccogliere le sezioni su un vetrino porta-oggetto pulito e asciugare in stufa a 37° C per tutta la notte.

❖ *Colorazione*

16. Sparaffinare i vetrini mediante immersione in xilolo per 15 min
17. Idratare i vetrini passandoli nella serie discendente degli alcoli (alcol assoluto, più passaggi per 30 min, 95°, 75°, 50°, per 15 min ciascuno)
18. Lavare in acqua distillata
19. Colorare con Toluidina Blu o Blu cresile brillante

❖ *Montaggio*

20. Disidratare rapidamente mediante passaggio nella serie crescente degli alcoli;
21. Montare i vetrini con gelatina glicerinata.

2.3. METODICHE DI CITOGENETICA CLASSICA

Per la preparazione di piastre cromosomiche per l'analisi del cariotipo di ciascuna fanerogama studiata, è stato sperimentato un metodo basato sulla capacità dei coloranti cationici (Azur-A/ Toluidine blu) di colorare selettivamente il nucleo ed i cromosomi in cellule sottoposte ad idrolisi acide od alcaline. Questa metodica è utile per studiare la morfologia dei cromosomi, determinare il cariotipo e per visualizzare i modelli di condensazione dell'eterocromatina dei

nuclei nelle diverse fasi metaboliche, producendo immagini di alta qualità. Inoltre, i materiali non necessitano di alcun pretrattamento, la tecnica richiede un tempo minore e un processo meno complicato rispetto alle procedure di colorazione di Feulgen o Aceto-Orcein.

Il protocollo di schiacciamento/colorazione Azur-A è stato applicato a cellule della radice di popolazioni di *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson, *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Zostera noltei* Hornemann ottimizzando i tempi di colorazione e perfezionando il metodo di schiacciamento per ciascuna specie.

Per ogni popolazione studiata sono stati raccolti in modo casuale circa 30 ramet, ciascuno composto da sette a dieci germogli dallo stesso rizoma orizzontale. Per l'analisi del cariotipo sono stati isolati da ciascun ramet circa otto apici radicali, immediatamente fissati dopo la raccolta in acido acetico etanolo-glaciale (3: 1) e conservati per almeno 24 ore a 4°C (Kapraun e Gargiulo, 1987). Le sezioni degli apici della radice sono state colorate con una soluzione di Azur A allo 0,05% in tampone McIlvaine a pH 4 dopo idrolisi in HCl 5M a 20°C per 20 minuti (Gargiulo et al. 2019a). Le osservazioni e le microfotografie sono state effettuate con un microscopio Leitz Diaplan dotato di una fotocamera Leica DFC 500. Le immagini di nuclei e dei cromosomi sono state ottenute con obiettivo di immersione (100x) e digitalizzate da un sistema di analisi delle immagini collegato al microscopio.

2.3.1. Protocollo di schiacciamento e colorazione Azur-A / Toluidine Blue

Il metodo di colorazione AzurA/ Toluidine Blue su materiale vivo prevede i seguenti passaggi:

1. Isolare direttamente dalle piante, al microscopio da dissezione, apici caulinari e / o radicali in crescita attiva.
2. Idrolizzare per 20 minuti in HCl 5M a temperatura ambiente (Fig. 2a).
3. Lavare i campioni con acqua distillata per 5 minuti. Se necessario, il materiale può essere conservato per diversi giorni a 4°C senza deterioramento (Fig. 2a).
4. Utilizzando una pipetta Pasteur, selezionare e posizionare direttamente su un vetrino, con una piccola quantità di acqua (Fig. 2b), un apice e quindi con:
 5. – apice caulinare: elimina le foglie esterne con una pinzetta sterile e un ago da dissezione a punta fine lasciando sole le bozze fogliari. Rimuovi completamente le cellule rimanenti (Fig. 2c).
 6. – apice radicale: isolare solo le cellule apicali più giovani con un ago da dissezione a punta fine (Fig. 2c).
7. Rimuovere accuratamente l'acqua con una carta assorbente fino a quando il materiale è quasi asciutto, facendo attenzione a non toccare le cellule apicali (Fig. 2d).

8. Aggiungere una goccia di soluzione colorante (Azure A o blu di toluidina) e controllare il momento giusto della colorazione al microscopio da dissezione (Fig. 2e). Di solito i nuclei si colorano in meno di un minuto. L'eccesso di colorante può essere ridotto lavando il materiale con soluzione tampone a pH 4.
9. Coprire il materiale con un vetrino coprioggetto pulito posizionando prima su uno dei bordi verso il basso, a contatto con la soluzione di colorazione sul vetrino, quindi abbassare lentamente il coprioggetto con una pinza (Fig. 2f).
10. Stabilizzare il coprioggetto premendo saldamente, con il pollice e l'indice, un pezzo di carta assorbente su uno dei bordi. Premere delicatamente il coprioggetto con la punta di un batuffolo di cotone, in corrispondenza del materiale, e spostare rapidamente avanti e indietro fino a quando le cellule si diffondono in uno strato quasi invisibile (Fig. 2g). Tale operazione va effettuata sotto un microscopio da dissezione per osservare la diffusione appropriata del materiale.
11. Posizionare il vetrino su un foglio di carta da filtro e delicatamente, ma con fermezza, spingere verso il basso con il pollice al centro, evitando qualsiasi movimento orizzontale, per eliminare l'eccesso di liquido (Fig. 2h).
12. Esaminare al microscopio ottico (Fig. 2i).

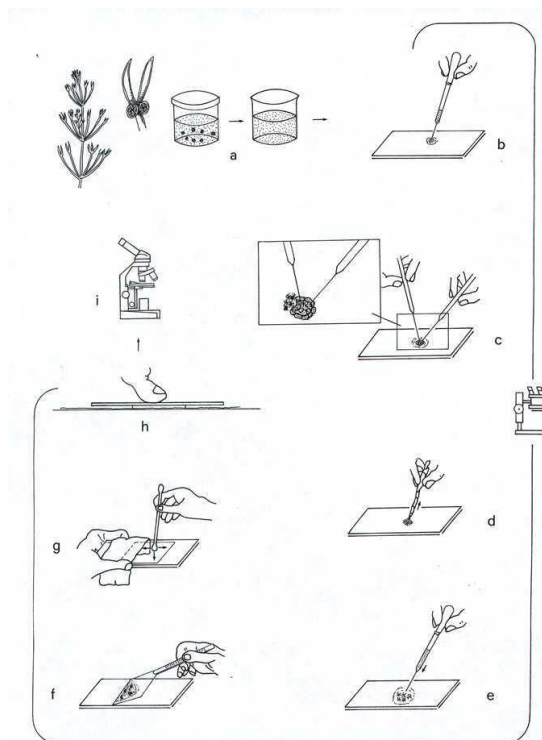


Fig. 2a-i. Disegno delle fasi principali del metodo di colorazione /schiacciamento con AzurA / Toluidine Blue.

2.3.2. Studio del cariotipo

Il cariotipo è stato determinato dall'esame di almeno cinque piastre in metafase chiare utilizzate per le misurazioni. L'analisi del cariotipo è stata eseguita in ciascuna popolazione studiata utilizzando i seguenti indici: lunghezza del braccio lungo (L), lunghezza del braccio corto (S), lunghezza del cromosoma (C), rapporto tra braccio lungo e corto (r), indice centromerico (CI), lunghezza totale del complemento aploide (THL), lunghezza relativa totale [TRL = (lunghezza dell'intero cromosoma / lunghezza totale di tutti i cromosomi nel set aploide incluso quello misurato) · 100]. Nelle tabelle 2 e 3 sono descritti gli indici utilizzati per l'analisi del cariotipo. La nomenclatura del cromosoma segue quella raccomandata da Levan et al. (1964).

Le coppie cromosomiche sono state identificate in base a un metodo grafico di comparazione morfologico dei cromosomi sia nell'ambito della stessa specie che tra specie diverse (Plummer et al. 2003). Il metodo si basa sui valori di New Relative Length di ciascun cromosoma [NRL = (lunghezza del singolo cromosoma / lunghezza totale di tutti i cromosomi) · 100] contrapposti ai valori relativi al rapporto tra braccio lungo e braccio corto ($r = L/S$).

Per stimare il grado di asimmetria dei singoli cariotipi sono stati calcolati, secondo Peruzzi ed Eroğlu (2013), il Coefficiente di Variazione della Lunghezza del Cromosoma (CV_{CL}) e dell'asimmetria centromerica media (MCA). Sono stati valutati anche i metodi proposti da Paszko (2006) e Huziwara (1962) che utilizzano il CV_{CI} (Coefficiente di Variazione dell'Indice Centromerico) e CV_{CL} ($= A2 \times 100$) ed il TF%, rispettivamente. I dati utili per calcolare tali parametri sono stati ottenuti grazie ad un Sistema di Analisi di Immagini (Image Pro-Plus ver. 6.2) e al software KaryoType (Altinordu et al. 2016). Tutti questi dati sono stati impiegati per la costruzione degli idiogrammi relativi alle singole metafasi studiate.

Per l'appaiamento dei cromosomi sono stati utilizzati sia il metodo grafico da noi descritto su *Halophila* (Gargiulo et al. 2019b) sia quello proposto da Altinordu et al. (2016). Il metodo è stato utilizzato per un confronto dettagliato sul cariotipo e la dimensione del genoma con popolazioni mediterranee di *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson studiate da altri autori (Famà, 1995-96; Vilardo e Gargiulo, 2014) e popolazioni extramediterranee di altre specie di questo genere (Tab. 1; 2; 3), i cui dati sono riportati in letteratura. I dati utilizzati per i confronti tra le diverse popolazioni e le diverse specie di *Halophila* sono stati ottenuti misurando i cromosomi dalle immagini originali. L'elaborazione e la sperimentazione del nuovo metodo grafico consente l'identificazione delle coppie di cromosomi in un complemento e permette di confrontare cariotipi sia a livello intraspecifico che interspecifico. Tale metodo è basato sulla Lunghezza Standard del Cromosoma [$SCL = (lunghezza\ cromosomica / lunghezza\ del\ cromosoma\ più\ lungo\ nel\ complemento) \cdot 100$] e sul valore di Asimmetria del Centromero [CA

= (LS) / (L + S)]. La simultanea rappresentazione grafica di entrambi i valori di ciascun cromosoma consente un'analisi accurata dei caratteri morfologici dei singoli cromosomi. Se lo scopo è di identificare le coppie di cromosomi in un complemento, allora tutti i valori di ciascun cromosoma del set diploide devono essere rappresentati nel grafico. Al contrario se l'obiettivo è di evidenziare differenze tra cariotipi di taxa a qualsiasi livello, è preferibile rappresentare solamente i valori medi standardizzati di ciascuna coppia di omologhi del complemento (mSCL/mCA), facilitando così la lettura del grafico.

Idiogrammi aploidi per ciascuna popolazione studiata sono stati costruiti raggruppando la lunghezza media assoluta dei bracci lunghi (L) e corti (S) delle coppie cromosomiche di almeno cinque piastre metafase. Quando possibile, sono stati costruiti gli idiogrammi di altre popolazioni / specie di *Halophila* dai dati riportati in letteratura o da quelli acquisiti misurando i cromosomi dalle immagini originali (Altinordu et al. 2016; Peruzzi et al. 2017). In quest'ultimo caso, sono state prese in considerazione solo buone piastre metafase con ingrandimento o barra della scala (Peruzzi et al. 2009). L'idiogramma di *H. stipulacea* (*H_sti_Rip*) di Riposto (Fig. 2i) è stato costruito sui dati originali riportati da Famà (1995-6). Questo materiale viene qui indicato come *H_sti_Rip *** per distinguerlo da quelli originali (*H_sti_Rip*) studiati da Famà (1995-96) e da quello di Famà riesaminato da noi (*H_sti_Rip **). È stato costruito un cariotipo medio (*H_sti_m*) per le popolazioni studiate di *H. stipulacea* per confrontarlo con quelli degli altri taxa riportati in letteratura.

2.4. ALLESTIMENTO ACQUARI

Diversi sistemi di coltura in laboratorio mediante allestimento di acquari e mesocosmi sono stati sperimentati su varie specie di fanerogame marine per creare un sistema marino su piccola scala che simuli le condizioni ambientali degli habitat naturali in base alle specie e alla località (Bigley 1981; Bujang et al. 2008; Garrote-Marino et al. 2014; Harrison 1982; Malea et al. 2013; Marín-Guirao et al. 2013a, b; Marín-Guirao et al. 2016; Oscar et al. 2018; Pansch & Hiebenthal 2019; Pages et al. 2010; Ruiz et al. 2017; Sandoval-Gil et al. 2014; Short et al. 1995; Tsioli et al. 2018). Tra gli esperimenti di successo vi è l'esempio ad Austin, in Texas, dove 9 generi di fanerogame marine su 12 (*Talassia*, *Halodule*, *Halophila*, *Posidonia*, *Zostera*, *Cymodocea*, *Syringodium*, *Enhalus* e *Thalassodendron*) sono stati coltivati con successo in acqua di mare sintetica e in condizioni ambientali controllate da McMillan (1976,1978, 1980a, 1980b). L'utilizzo di sistemi di coltura per il mantenimento delle piante marine hanno facilitato gli studi riguardanti gli aspetti biologici, ecologici e fenologici (McMillan, 1980a; McMillan 1980b; McMillan et al. 1981). Sebbene tali culture siano state sviluppate e le loro condizioni di crescita

siano state studiate, l'origine, la biologia, la distribuzione e l'habitat delle piante utilizzate negli studi non erano simili. Infatti, esse erano adatte solo per un particolare specie di fanerogama marina (Hillman et al. 1995; Ralph 1998; Longstaff et al. 1999; Short 1985). Inoltre, finora, nessuna coltivazione a lungo termine è stata sviluppata con successo.

Per assicurare la possibilità di utilizzare materiale vivo, necessario per procedere a una corretta sperimentazione delle tecniche di citogenetica molecolare e citometria di flusso durante i mesi di soggiorno presso il Laboratorio del Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, Germania), sono stati ricercati i parametri chimico-fisici per il mantenimento in condizioni controllate delle diverse specie di fanerogame marine mediterranee (Tab. 2). A tal fine sono state attrezzate, presso il laboratorio del Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS) del Dipartimento di Scienze Veterinarie responsabile Prof. Fabio Marino, alcuni acquari in cui sono state verificate le condizioni di temperatura, salinità, pH, ossigeno, livelli di irradianza e fotoperiodo. In particolare, nel periodo compreso tra Giugno/Luglio 2019, piante di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Zostera noltei* Hornemann con germogli e radici intatti collegati al rizoma sono state raccolte in immersione da praterie ben conservate da 2-7 m di profondità situati in differenti località lungo le coste sud-orientali e nord-occidentali della Sicilia (Tab. 3).



Fig. 3a-b. Tipologie di acquari allestiti presso il laboratorio del Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS) del Dipartimento di Scienze Veterinarie. (a) esempio di acquario da 120 l; (b) acquario di 400 l.

Le piante sono state trasportate in grandi refrigeratori al laboratorio del CISS entro 2 ore dalla loro raccolta. Quindi, le piante di ogni specie sono state immediatamente trapiantate in 4 vasche indipendenti da 120 L (100 cm x 30 cm x 39 cm, Fig. 3a) ed uno da 400 L (145 cm x 68 cm x 50 cm, Fig. 3b) precedentemente allestite e riempite con acqua di mare naturale raccolta nei siti di campionamento e lasciata maturare negli acquari per un periodo di circa trenta giorni. In ciascuna vasca, da dieci a quindici frammenti di rizoma intatti contenenti da cinque a dieci germogli verticali collegati sono stati piantati in vasi di plastica in cui era stato collocato il sedimento proveniente dal sito di raccolta delle piante e posti sul fondo.

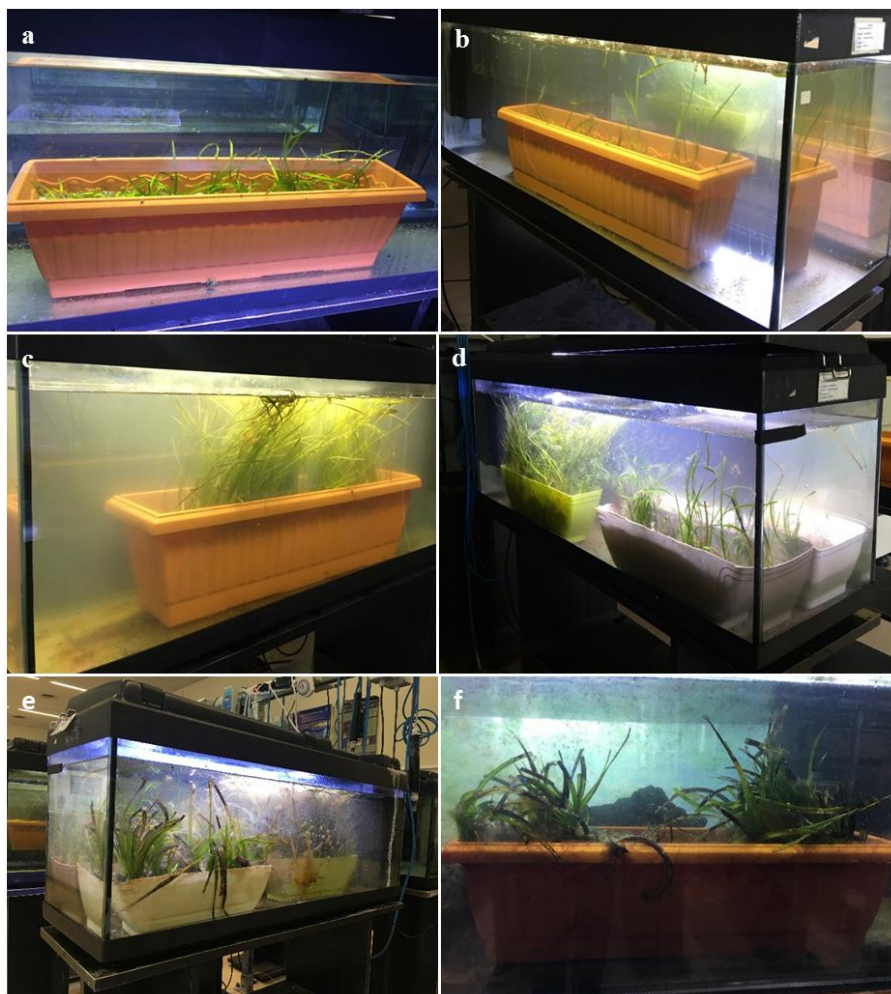


Fig. 4a-f. Differenti specie di fanerogame marine allestite in acquari presso il CISS del Dipartimento di Scienze Veterinarie. **(a,b)** *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson; **(c)** *Zostera noltei* Hornemann; **(d)** ed **(e)** le 3 specie in una singola vasca da 120 L; **(f)** *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile in acquario da 400 L.

Tre degli acquari da 120 L sono stati utilizzati per collocare ogni singola specie (Fig. 4a-c), mentre il quarto acquario, delle stesse dimensioni, è stato utilizzato per coltivare contemporaneamente le quattro specie (*C. nodosa*, *P. oceanica* e *Z. noltei*; Fig. 4d,e). La vasca da 400 l è stata predisposta per coltivare solamente la *P. oceanica* (Fig. 4f).

Ogni acquario era dotato di una lampada alogena indipendente come sorgente luminosa e di una pompa ad aria sommergibile per ottenere un'adeguata aerazione e circolazione del flusso d'acqua. Il regime di luce è stato progressivamente aumentato di 2h ogni 4 giorni, partendo da una condizione di 2L: 22D (light: dark) fino a raggiungere un fotoperiodo di 12L: 12D. I livelli d'irradianza sono stati regolati in considerazione delle necessità della specie presa in esame. La temperatura, la salinità, il pH e l'ossigeno disciolto sono stati controllati in ciascuna vasca settimanalmente per provvedere alle eventuali necessarie correzioni. Ai fini dell'acclimatazione, le condizioni ambientali nell'esperimento corrispondevano ai valori di campo: si trattava di una salinità di 38 ± 1 ‰, una temperatura di 22 ± 2 °C e un'irradiazione giornaliera incidente di ~ 370 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$. Le condizioni finali utilizzate dopo l'acclimatazione sono riportate in Tabella 4.

Le condizioni chimico-fisiche sperimentate presso il laboratorio del CISS, sono state riprodotte presso il laboratorio dell'IPK per consentire di sperimentare le tecniche di Citometria di Flusso e di Citogenetica Molecolare su materiale vivo. È stato così allestito un acquario da 120 l (78 cm x 34 cm x 45 cm, Fig. 5a) riempito con acqua di mare sintetica preparata con una salinità al 38‰. Piante di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Zostera noltei* Hornemann e *Posidonia oceanica* (L.) Delile raccolte presso la Baia di Brucoli (Siracusa, Italia) sono state conservate in fogli di giornale umidi all'interno di una borsa frigo con ghiaccio e spedite in Germania presso il laboratorio dell'IPK. Le piante quindi sono state sistemate in vasi di plastica in cui è stato aggiunto il sedimento sintetico (Fig. 5b). L'acquario è stato posizionato in una stanza con un regime di luce e temperatura costante (16L: 8D, 24°C). Esso, infatti, era provvisto di un sistema di luce indipendente e di una pompa di movimento adatta per una adeguata aerazione e circolazione del flusso d'acqua. Il pH e l'ossigeno disciolto sono stati controllati mensilmente e la quantità di sale disciolto è stata corretta settimanalmente aggiungendo, quando necessario, acqua distillata portando a volume.

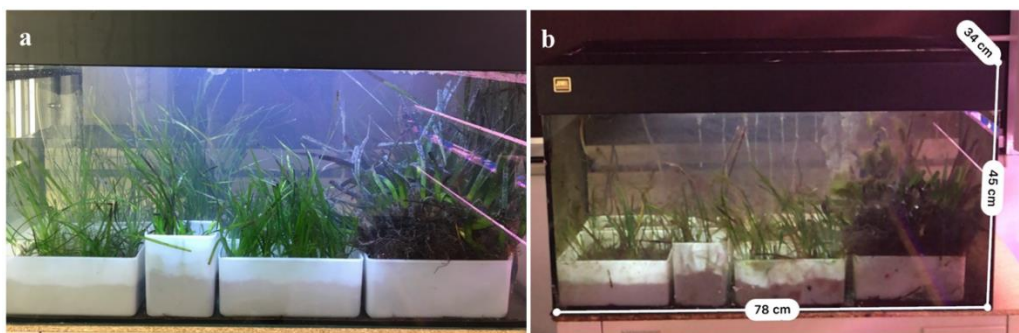


Fig. 5a-b. Individui di *C. nodosa*, *Z. noltei* e *P. oceanica* provenienti da Brucoli (Sr) sistemate in un acquario da 120l presso l'IPK in Germania. (a) Piante appena sistemate in acquario; (b) piante al terzo mese.

Tabella 2. Differenti parametri fisico-chimici per il mantenimento in condizioni delle fanerogame marine mediterranee raccolti dai diversi studi riportati in letteratura.

Mesocosm system	<i>Posidonia oceanica</i> (L.) Delile	<i>Cymodocea nodosa</i> (Ucria) Ascherson	<i>Zostera marina</i> L.	<i>Halophila stipulacea</i> (Forsskål) Ascherson
Aquaria (L)	500 ⁽¹⁾ ; 500 ⁽²⁾ ; 120 ⁽³⁾ ; 500 ⁽⁴⁾ ; 500 ⁽⁵⁾ ; 100 ⁽⁶⁾	80 ⁽²⁾ ; 500 ⁽²⁾ ; 120 ⁽⁴⁾ ; 4 ⁽⁵⁾ ; 500 ⁽⁶⁾ ; 100 ⁽⁷⁾	80 ⁽¹⁾ ; 225 ⁽²⁾ ; 600 ⁽³⁾	45 ⁽¹⁾ ; 45 ⁽²⁾
Kind, thick substrate (base cm × cm x height cm)	plastic pots filled with coarse washed-sediments ⁽¹⁾ ; plastic pots (22×40×10) filled with sediment ⁽²⁾ ; plastic trays with washed and dried natural sediments ⁽³⁾ , ⁽⁵⁾ , ⁽⁶⁾	10 cm of natural sediment ⁽²⁾ , ⁽⁷⁾ ; plastic pots (22×40×10) filled with sediment ⁽³⁾ ; plastic trays with washed and dried sediments ⁽⁴⁾ , ⁽⁶⁾ ; plastic aquaria without sediment ⁽⁵⁾	plastic pots with 3-4 cm of clean fine sand ⁽¹⁾ ; 15 cm natural sediment ⁽²⁾ ; 10 cm of clean sand and natural sand ⁽³⁾	3-4 cm ⁽¹⁾ ; natural sediment 10 cm high ⁽²⁾
Light regime (irradiance $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ under a xh:xh light:dark photoperiod)	300 - 12h:12h ⁽¹⁾ ; 140 - 12h:12h ⁽²⁾ ; 250 \pm 20 - 8:16 ⁽³⁾ ; 10.19 \pm 0.5 - 20.47 \pm 1.64 mol/m ² /d, 12:12 (19.9-20.9 in shallow meadow, 8.55-11.8 in deep meadows) ⁽⁴⁾ ; 370 \pm 20 - 12h:12 ⁽⁵⁾ ; 5.9 \pm 0.7 mol/m ² /d ⁽⁶⁾	~200 - 16:8 ⁽¹⁾ ; ~350 \pm 50 - 12:12 ⁽²⁾ ; ~200 - 12:12 ⁽³⁾ ; 250 \pm 20 - 8:16 ⁽⁴⁾ ; 60-90 mol/m ² /d - 14:10 ⁽⁵⁾ ; 10.19 \pm 0.5 - 20.47 \pm 1.64, 12:12 (19.9-20.9 in shallow meadow, 8.55-11.8 in deep meadows) ⁽⁶⁾ ; 5.9 \pm 0.7 mol/m ² /d ⁽⁷⁾	higher irradiance - 14:10 ⁽¹⁾ ; natural ⁽²⁾ ; 700 ⁽³⁾	~200 - 12:12 ⁽¹⁾ ; ~100-120 - 10:12 ⁽²⁾
Temperature (C°)	23 ⁽¹⁾ ; 21 (14-25) ⁽²⁾ ; 24 ⁽³⁾ ; 19 \pm 0.1 (19-24.8 in shallow meadow, 16.8-21.6 in deep meadows) ⁽⁴⁾ ; 21 \pm 1 ⁽⁵⁾ ; 15 \pm 0.1 ⁽⁶⁾	21 \pm 1 ⁽¹⁾ ; 18-20 ⁽²⁾ ; 21 (14-25) ⁽³⁾ ; 24 ⁽⁴⁾ ; 21-22 ⁽⁵⁾ ; 19 \pm 0.1 (19-24.8 in shallow meadow, 16.8-21.6 in deep meadows) ⁽⁶⁾ ; 15 \pm 0.1 ⁽⁷⁾	18 ⁽¹⁾ ; ambient ⁽²⁾ ; 16 ⁽³⁾	25 ⁽²⁾
Practical Salinity Units (‰)	37.5 ⁽¹⁾ ; 37 ⁽²⁾ ; 37.3-37.7 ⁽³⁾ ; 37 \pm 0.1 ⁽⁴⁾ ; 37 \pm 1 ⁽⁵⁾ ; 37 \pm 0.2 ⁽⁶⁾	36.7 ⁽¹⁾ ; 37.2 ⁽²⁾ ; 37 ⁽³⁾ ; 37.3-37.7 ⁽⁴⁾ ; 33.5 ⁽⁵⁾ ; 37 \pm 0.1 ⁽⁶⁾ ; 37 \pm 0.2 ⁽⁷⁾	30 ⁽¹⁾ ; 12-15 ⁽²⁾ ; ⁽³⁾	30 ⁽¹⁾ ; 40 ⁽²⁾
pH	⁽³⁾	7.9 ⁽¹⁾		
Dissolved O ₂ (mg/L)	7.5 ⁽²⁾	5.88 ⁽¹⁾		
References	Ruiz et al. 2017 ¹ ; Marín-Guirao et al. 2013a ² ; Marín-Guirao et al. 2016 ³ ; Sandoval-Gil et al. 2014 ⁴ ; Marín-Guirao et al. 2013b ⁵ ; Garrote-Marino et al. 2014 ⁶	Malea et al. 2013 ¹ ; Pages et al. 2010 ² ; Marín-Guirao et al. 2013a ³ ; Marín-Guirao et al. 2016 ⁴ ; Tsioli et al. 2018 ⁵ ; Sandoval-Gil et al. 2014 ⁶ ; Garrote-Marino et al. 2014 ⁷	Harrison 1982 ¹ ; Short et al. 1995 ² ; Pansch & Hiebenthal 2019 ³	Bujang et al. 2008 ¹ ; Oscar et al. 2018 ²

Tabella 3. Siti di raccolta dei campioni di fanerogame marine.

Taxa	Sito di raccolta				
<i>Cymodocea nodosa</i> (Ucria) Ascherson	Laguna di Capo Peloro, Lago di Ganzirri, Messina, ME 38°15'40.5"N 15°37'09.6"E				
<i>Posidonia oceanica</i> (Linnaeus) Delile	Torrente	Tono,	Messina,	ME 38°17'21.1"N 15°34'08.5"E	
<i>Zostera noltei</i> Hornemann	Baia	di	Brucoli,	Siracusa,	SR 37°16'59.0"N 15°11'19.1"E

Tabella 4. Parametri fisico-chimici utilizzati per il mantenimento in acquario delle specie prese in esame.

Taxa	<i>Cymodocea nodosa</i> (Ucria) Ascherson	<i>Posidonia oceanica</i> (Linnaeus) Delile	<i>Zostera noltei</i> Hornemann
Volume (l) e dimensione acquario (cm) (L x P x H)	120; 100 × 30 × 39	400; 145 × 68 × 50	120; 100 × 30 × 39
Dimensione vaso (cm) (L x P x H) e tipo di sedimento	58 × 19 × 16; 36 × 15 × 12; sedimento fine (sabbia-limo)	58 × 19 × 16; sedimento grossolano (ghiaia)	58 × 19 × 16; 36 × 15 × 12; sedimento fine (sabbia)
Irradianza (μmol/m²/sec) e fotoperiodo (L: D)	~370; 200; 12: 12	~370; 12: 12	~370; 200; 12: 12
Temperature (C°)	22 ± 2	22 ± 2	22 ± 2
Salinità (‰)	38 ± 1	38 ± 1	38 ± 1
pH	8.2 ± 0.2	8.2 ± 0.2	8.2 ± 0.2
O₂ disciolto (mg/L)	7.6 ± 0.3	7.6 ± 0.3	7.6 ± 0.3

2.5. TECNICHE DI CITOGENETICA MOLECOLARE

Le tecniche di citogenetica molecolare, svolte durante il soggiorno presso i laboratori dell'IPK (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Germania), hanno previsto la messa a punto dei protocolli per l'estrazione, purificazione e amplificazione degli acidi nucleici da tessuto vegetale. L'applicazione post-estrazione è stata prevista per amplificare le regioni ribosomiali 5S rDNA e 45S rDNA (18S e 26S rDNA) degli individui delle popolazioni di fanerogame marine prese in esame necessarie per generare le sonde utilizzate per la Fluorescence in situ Hybridization (FISH) e Immunolabeling.

I protocolli per le analisi di citogenetica molecolare sono stati messi a punto su apici radicali di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Zostera noltei*

Hornemann precedentemente raccolte presso la Baia di Brucoli (Siracusa, Italia) e spedite in Germania.

Inizialmente sono stati utilizzati i vetrini pretrattati con il metodo di ‘compressione’ o ‘schiacciamento’ (‘Squashing Method’) secondo Cao et al. 2016 e conservati a 4°C. In un secondo momento sono state effettuate delle modifiche nel protocollo di schiacciamento su campioni fissati in Carnoy. In breve, apici radicali di tutte e tre le specie sono stati incubati a diversi tempi e temperature in 2mM 8-idrossichinolina con lo scopo di assicurare la presenza del maggior numero di metafasi. Il materiale così trattato è stato fissato in Carnoy (3 etanolo assoluto: 1 acido acetico glaciale). Dopo almeno 24h di fissazione il materiale è stato lavato in 10mM di tampone di citrato di sodio pH 4.6 per 10 minuti ciascuno e trattato a diversi tempi (partendo da 1.30h fino arrivare a 3.45h) con una miscela di enzimi (pectinasi/cellulasi) per l'ammorbidimento prima della macerazione e lo schiacciamento su vetrino in 45% di acido acetico. Rimosso il vetrino copri oggetto tramite azoto liquido, gli apici sono stati trattati a diversi tempi con pepsina (a partire da 5min fino a 1h), post-fissati in formaldeide tamponata e sciaquati due volte in 2xSSC. In seguito, sono stati disidratati in una serie crescente di etanolo, messi ad asciugare all’aria e colorati con 4',6-diamidin-2-fenilindolo o DAPI in Vectashield (2µg/ml). Prima di continuare con l’ibridazione, i vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza per assicurarsi la presenza di cellule in metafase prive di citoplasma e parete cellulare. Solo in alcuni vetrini pretrattati con un maggior numero di metafasi presenti, sono state sperimentate le sonde per la *Fluorescent In Situ Ibridation* (FISH) o Ibridazione fluorescente in situ e l’*Immunolabeling* o Immunomarcatura. Sono stati testati anche ulteriori metodi di pretrattamento dei vetrini per l’ibridazione in situ, come il "metodo di rilascio a vapore" (Steam Drop method) secondo Kirov *et al.* 2014 per ottenere cromosomi isolati e garantire la corretta ibridazione delle sonde fluorescenti utilizzate. Questa tecnica, chiamata comunemente ‘a goccia’, prevede l’impiego di meristemi radicali (precedentemente trattati con 2mM 8-idrossichinolina e fissati in Carnoy) digeriti enzimaticamente (con un mix di pectoliasi 1%, cellulasi 0,7% citoelicasi 1% in 1x PBS) e la preparazione di una sospensione cellulare in una provetta che viene lavata consecutivamente in acqua distillata, etanolo al 100% e acido acetico / etanolo (9: 1) ed infine, fatto cadere ‘‘a goccia’’ su vetrini posizionati in una scatola foderata con carta bagnata e asciugato lentamente.

La messa a punto del protocollo "Squashing method" per la FISH su apici radicali di individui di *C. nodosa* è stata applicata per localizzare le sequenze conservate organizzate come unità ripetitive in tandem dei geni ribosomiali (rDNA) e le sequenze altamente ripetute di DNA telomerico.

Le sonde per l'ibridazione in situ e l'immunomarcatura sono state generate dopo la messa a punto del protocollo di estrazione e amplificazione di DNA genomico di foglie di *C. nodosa*, *P. oceanica* e *Z. noltei*. Il DNA genomico isolato di *C. nodosa* è stato usato come modello per amplificare le regioni ribosomiali (rDNA) con le coppie di primer progettate per:

- ❖ 18S-rDNA: 18S – SSU1 F (TGGTTGATCCTGCCAGTAG) e 18S – 1243 R (AGAGCTCTCAATCTGTCA) (Shoup and Lewis 2003);
- ❖ 26S-rDNA: 26S – 0091 F (TAGTAACGGCGAGCGAACC) (Tippery et al. 2015) e 26S – 1229 R (ACTTCCATGACCACCGTCCT) (Kuzoff et al. 1998);
- ❖ 5S rDNA: UP46 F (GTGCGATCATAACCAGCACTAATGCACCGG) e UP47 R (GAGGTGCAACACGAGGACTTCCCAGGAGG) (Gottlob-McHugh. et al. 1990).

Le sonde telomeriche specifiche sono state generate dalla PCR usando tetrameri di ripetizioni di telomeri di tipo *Arabidopsis* (TTAGGG)_n senza DNA modello e telomeri di tipo umano (TTTAGGG)_n secondo Ijdo et al. (1991). I prodotti PCR sono stati usati come modelli per l'etichettatura PCR (sequenza 45S rDNA, regioni telomeriche umane e telomeri di *Arabidopsis*) o nick-translation (sequenze 5S, 18S e 26S rDNA e) per generare le corrispondenti sonde FISH. Le sonde sono state etichettate direttamente e indirettamente mediante il metodo della 'Nick Traslation' rispettivamente con i coloranti fluorescenti Cy3-dUTP (GE Healthcare Life Science), Alexa Fluor 488-5-dUTP, Texas Red-12-dUTP, e con gli apteni Biotin-dUTP o Digoxigenin-dUTP (Life Technologies) e precipitate come descritto in Hoang e Schubert (2017). Le sonde sono state denaturate a 95°C per 5 minuti e refrigerate su ghiaccio per 10 minuti prima di aggiungere 10µl di ciascuna sonda per vetrino (sono state sperimentate fino a tre diverse sonde etichettate contemporaneamente). Quindi, i cromosomi sono stati denaturati insieme alle sonde su una piastra riscaldante a 80°C per 3 minuti e incubati in una camera umida a 37°C per almeno 16 ore. Il lavaggio post-ibridazione e il rilevamento del segnale sono stati effettuati secondo Lysak et al. (2006). Le sonde marcate con gli apteni (che agiscono da antigeni) sono rilevate da anticorpi digossigenina (Mouse-anti-Digoxin) e biotina (Goat-anti-avidin-Biotin) coniugati con i fluorocromi Goat-anti-mouse-Alexa 488 e Avidin-Texas Red™, rispettivamente, per amplificare e visualizzare il segnale.

Le immagini dei nuclei in metafase sono state catturate con una telecamera SPOT Vision System (Spot 2e, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) montata su un Microscopio a Fluorescenza Axioplan 2 imaging (Zeiss, Oberkochen, Germania) con ingrandimento obiettivo 100 × (Fig. 6). Le immagini grigie dei cromosomi metafase sono state acquisite mediante il software di analisi Metavue utilizzando il canale della telecamera blu per il DAPI, mentre le immagini del segnale delle sonde sono state catturate separatamente per ogni

fluorocromo utilizzando il filtro verde per la fluorescenza gialla in Cy3, blu per la fluorescenza verde in a488 e giallo per fluorescenza rosso in TXR. Successivamente, le immagini sono state elaborate e sovrapposte usando il software Adobe Photoshop CS6.

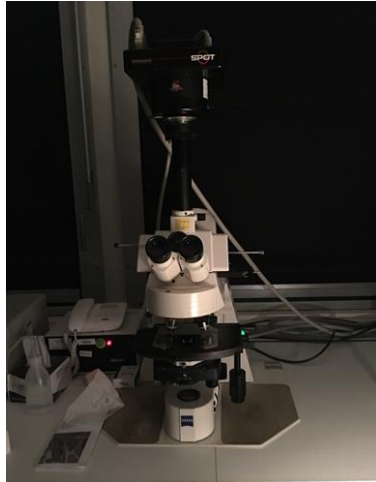


Fig. 6. Microscopio a Fluorescenza Axioplan 2 imaging (Zeiss, Oberkochen, Germania) con una telecamera SPOT Vision System (Spot 2e, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA).

2.5.1. Estrazione, Purificazione e amplificazione del DNA

L'estrazione degli acidi nucleici da tessuto vegetale rappresenta la premessa indispensabile per qualsiasi tipo di manipolazione genetica. L'ottimizzazione dell'estrazione dipende dal tipo di acido nucleico che si vuole isolare, dalla fonte utilizzata per l'estrazione e dall'applicazione prevista post-estrazione. Indipendentemente dalla tecnica di estrazione usata, essa deve rispondere a due requisiti principali: la *resa* e la *purezza*, intesa sia come presenza in soluzione dell'acido nucleico in esame, sia come assenza di sostanze contaminanti che, legandosi ai reagenti in soluzione, potrebbero modificare i risultati del sequenziamento. In generale, tutti i metodi di estrazione del DNA si basano su fasi essenzialmente simili che possono essere così schematizzate:

1. Raccolta e conservazione del materiale vegetale
2. Omogenizzazione del tessuto vegetale
3. Estrazione con solvente organico
4. Purificazione (rimozione dell'RNA)
5. Precipitazione degli acidi nucleici
6. Caratterizzazione del DNA

➤ *Raccolta e conservazione del materiale vegetale.* Le giovani foglie sono gli organi maggiormente utilizzati per l'estrazione del DNA genomico. Queste, immediatamente dopo il prelievo, sono ripulite di ogni residuo, lavate in acqua,

asciugate e poste in contenitori contenenti azoto liquido. Alla raccolta può non seguire necessariamente l'estrazione del materiale genetico. Esso può essere conservato in condizioni che riducono al minimo la sua degradazione. La liofilizzazione è un ottimo metodo di conservazione. Infatti, la non idratazione del DNA rende quest'ultimo meno suscettibile alle sollecitazioni meccaniche. Un altro valido sistema è quello della crioconservazione a -80°C .

- *Omogenizzazione del tessuto vegetale.* Le cellule vegetali presentano una parete cellulare per la cui rimozione spesso si ricorre al congelamento (-80°C) dei tessuti e alla loro macinazione manuale, mediante mortai e pestelli pre-raffreddati in azoto liquido, o tramite appositi omogenizzatori.
- *Estrazione con solvente organico.* La dissoluzione della cellula (distruzione della membrana) è una fase delicata in quanto risultato di due eventi contrastanti: l'esigenza di frammentare il materiale di partenza e quella di non alterare gli acidi nucleici da analizzare. I metodi tradizionali di lisi si basano su trattamenti complessi che includono la digestione enzimatica, la solubilizzazione tramite detergente o tecniche meccaniche di spaccatura. Il tessuto polverizzato od omogenizzato risultante dalla precedente operazione è trasferito in un nuovo tubo in cui è aggiunto un tampone di estrazione (CTAB 2x) che ha il compito di promuovere la lisi cellulare mediante la denaturazione delle proteine, l'immobilizzazione di queste ultime e dei carboidrati ed il rilascio degli acidi nucleici in soluzione. I quantitativi di tampone sono basati sul rapporto peso-volume, per cui si aggiungerà 1ml di tampone per ogni grammo di tessuto vegetale. A questo punto il campione viene incubato a 60°C per favorire la distruzione delle membrane cellulari e la rottura delle pareti delle cellule da parte del CTAB che è un detergente. Esso, infatti, forma dei complessi con i fosfolipidi e le proteine di membrana, provocandone la precipitazione. Inoltre, gli ioni sodio del sale schermano le cariche negative dei gruppi fosfato presenti nel DNA, facendoli associare. A 60°C , le DNAasi sono parzialmente denaturate.
- *Purificazione (rimozione dell'RNA).* Durante la purificazione del DNA viene utilizzata la ribonucleasi A (RNasi) per allontanare ed eliminare l'RNA, mentre durante l'estrazione dell'RNA viene utilizzata la deossiribonucleasi (DNasi) per eliminare la contaminazione data dal DNA genomico. Questi enzimi insieme alle proteine associate agli acidi nucleici, al termine del processo, verranno eliminati. Un metodo per promuovere la separazione ed il recupero dell'acido nucleico dalla

soluzione contenente il lisato cellulare prevede l'uso di solventi organici (come fenolo o cloroformio), che consentono la separazione degli acidi nucleici dai contaminanti (proteine); successivamente, dopo centrifugazione, gli acidi nucleici vengono recuperati in soluzione acquosa. Una seconda metodologia di separazione prevede l'adsorbimento del DNA sulla superficie di una matrice di gel di silice in presenza di sali caotropici (in commercio si trovano diversi kit di separazione basati su questo principio).

- *Precipitazione.* La precipitazione degli acidi nucleici è indispensabile per concentrare le soluzioni di DNA ed eliminare i residui di fenolo e cloroformio che interferirebbero nelle successive analisi molecolari. La precipitazione avviene perché l'alcool (di solito in alcool etilico o isopropanolo), rispetto al DNA, è assai più affine all'acqua, per cui l'acqua che circonda il DNA mantenendolo in soluzione viene sequestrata dall'alcool ed il DNA, non più idratato e non essendo solubile in alcool, precipita. Dunque, passando in fase solida, è osservabile come un gel che si posiziona nella parte superiore della provetta in modo da permettere il recupero. Dopo lavaggio con etanolo, si ha una valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici estratti e quindi la loro conservazione.
- *Caratterizzazione del DNA.* Al termine dell'estrazione vengono valutate quantità e qualità degli acidi nucleici utilizzando la spettrofotometria UV e/o l'elettroforesi su gel di agarosio.

2.5.1.1. Protocollo di isolamento del DNA

Le estrazioni di DNA sono state eseguite a partire da foglie di piante di *Zostera noltei* Hornemann, *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson e *Posidonia oceanica* (L.) Delile mantenute in condizioni controllate in un acquario di 120 l.

Prima di iniziare:

1. *Preparare 2 provette eppendorf sterili da 2ml ed altre 2 da 1.5ml per ciascun campione da cui estrarre il DNA genomico (è preferibile seguire almeno due repliche per ciascuna specie) ed etichettare la parte superiore e i lati con un pennarello usando lettere maiuscole per l'individuo. Aggiungere anche la data al lato della provetta e avvolgere con un nastro adesivo. Il nastro impedisce al marcatore di sfregarsi dopo il congelamento*
2. *Disporre 2 biglie in acciaio sterilizzate per ciascun campione in una vaschetta*

3. *Accendere il bagno termostatico a 65°C e incubare la soluzione CTAB 2X prima dell'uso*
4. *Impostare la centrifuga a 4°C e la camera umida a 37°C*
5. *Travasare con cautela una piccola quantità di azoto liquido dal serbatoio criogenico in un contenitore con manico e chiusura utilizzando sempre guanti di protezione da ustioni da freddo*
6. *Preparare i prodotti per l'estrazione del DNA:*
 - *Isopropanolo conservato a -20°C*
 - *β-mercaptoetanolo conservato a 18-20°C*
 - *Buffer di estrazione CTAB 2x conservato a 4°C: Sciogliere 4g di CTAB 2% in una miscela di 20ml di Tris-HCl 1M a pH 8.0, 56 ml o 16.4g di NaCl 5M e 16ml di EDTA 0.5M portando il volume finale a 200ml con ddH₂O e agitando per facilitare la dissoluzione → lavorare a concentrazione Tris-HCl 0.1M pH8.0/NaCl 1.4M/EDTA 20mM/CTAB 2%; Aggiungere β-mercaptoetanolo al tampone CTAB subito prima dell'uso → 10ml CTAB 2x + 20μl β-mercaptoetanolo per campione; Tris-HCl 1M = Sciogliere 121,1 g di Tris in circa 700 ml di H₂O, ridurre il pH a 8.0 aggiungendo ~50ml di HCl concentrato e portare il volume totale a 1L con ddH₂O*
 - *RNAasi A 5ml conservato a -20°C: Sciogliere 50mg RNAasi A in 5ml di SSC 2x, posizionare la soluzione per 10 minuti in un bagnomaria per rimuovere l'attività della DNAasi, raffreddare un'aliquota in porzioni da 100μl e conservare a -20°C*
 - *Tampone di lavaggio I (Washing buffer I) conservato a 18-20°C: Miscelare 152ml di etanolo assoluto (EtOH) con 13.34ml di acetato di sodio (NaAc) 3M*
 - *Tampone di lavaggio I (Washing buffer II) conservato a 18-20°C: Miscelare 152ml di etanolo al 10% con 154.2mg di acetato di sodio (NH₄Ac) 3M*
 - *ddH₂O o tampone TE ph 7.8 conservato a 4°C: Miscelare 10ml di Tris-HCl 1M a pH 8.0 con 2ml di EDTA 0.5M portando il volume totale a 1L con ddH₂O; EDTA 0.5M = Miscelare 186.12 g EDTA in 700 ml di H₂O, regola il pH a 8.0 aggiungendo 16-18 g di NaOH e portare il volume finale a 1L con ddH₂O*

Il protocollo di estrazione di DNA genomico da tessuto vegetale prevede diversi passaggi:

1. Usando una pinza, pesare 0.2-0.5g di campione fresco, preferibilmente foglie giovani precedentemente lavate in acqua distillata e asciugate su carta assorbente (Fig. 7a), tagliare in piccoli pezzi con delle forbici e trasferire in ciascuna eppendorf (epp) da 2ml insieme a 2 biglie di metallo (una sotto ed una sopra) (Fig. 7b,c). Immergere le pinze in acqua di

candeggina, quindi asciugare e tra ogni campione. Scegliere le foglie più piccole, se possibile, poiché hanno un rapporto massa di DNA/massa di tessuto più favorevole.

2. Congelare i campioni in azoto liquido immergendoli con cautela nel contenitore criogenico (Fig. 7d) ed estrarre dopo un minuto utilizzando sempre una pinza (Figs. 7e).
3. Triturare i campioni impostando la macchina per macinare (grinder) a 30v prima per un minuto e poi per 30 sec (Fig. 7f-i).
4. Lavorando sotto cappa aggiungere 20 μ l di β -mercaptoetanololo in 100ml di buffer di estrazione CTAB 2x (2:1000) per promuovere la lisi cellulare.
5. Pipettare 900 μ l CTAB 2x in ogni epp (Fig. 7l) e rimescolare con l'agitatore per qualche secondo fino ad ottenere un liquido omogeneizzato liquido abbastanza denso.
6. Incubare a bagnomaria a 65°C per almeno 30 min capovolgendo i campioni ogni 10 min (Fig. 7m) per favorire la distruzione delle membrane cellulari e la rottura delle pareti e denaturare parzialmente le DNAasi.

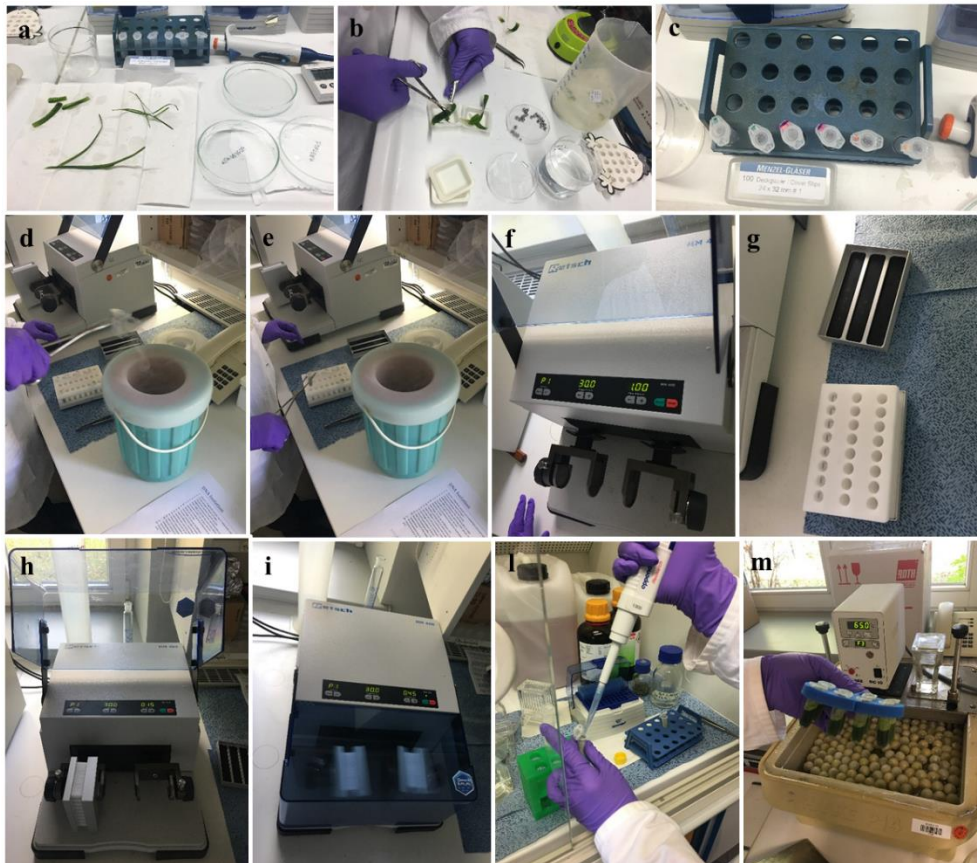


Fig. 7a-m. Isolamento del DNA genomico di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Zostera noltei* Hornemann. (a) Foglie isolate di *C. nodosa*, *P. oceanica* e *Z. noltei*; (b) sminuzzamento campioni; (c) trasferimento in eppendorf etichettate; (d, e) congelamento in azoto liquido; (f-i) triturazione dei campioni nel grinder; (l) aggiunta del buffer di estrazione (CTAB 2x) in ciascuna epp; (m) incubazione dei campioni a bagnomaria a 65°C.

7. Rimuovere le provette dal bagnomaria, raffreddare la miscela per 5min per evitare che il DNA si idrolizzi e, sotto cappa, aggiungere 600µl di miscela fenolo: cloroformio: isoamilalcol freddo (25:24:1) per eliminare gran parte delle proteine e dei pigmenti (tra cui la clorofilla). Fare attenzione a non gocciolare la miscela sulle provette poiché essa ha una bassa viscosità e gocciolando farà sì che l'etichetta si separi dal tubo. Sostituire immediatamente i guanti se si versa la miscela su di essi.
8. Agitare i campioni lentamente e in continuazione per 15 minuti a 4°C (Fig. 8a).
9. Centrifugare le provette a 14.000 giri/min (rpm) per 15 minuti a 4°C (Fig. 8b) per separare la componente organica (contenente le proteine) da quella acquosa (contenente gli acidi nucleici). Le proteine denaturate formano infatti uno strato bianco all'interfaccia tra la fase fenolica inferiore e la fase acquosa superiore, nella quale il DNA è più solubile e viene facilmente recuperato (Fig. 8c).
10. Trasferire con cura 600µl di surnatante in una nuova epp da 1.5ml precedentemente etichettata. Estrai le biglie dalle vecchie provette ed immergile in acqua di candeggina per almeno 20 minuti prima di risciacquare e sterilizzare in autoclave (Fig. 8d).
11. Aggiungere 5µl RNasi A (1mg/ml) per purificare il DNA estratto (Fig. 8e), incubare in camera umida a 37°C per 15 minuti capovolgendo più volte la provetta durante l'incubazione in modo che l'enzima agisca eliminando l'RNA (Fig. 8f). I passaggi seguenti vengono eseguiti meglio in gruppi di 10-20, a seconda della velocità con cui è possibile lavorare.
12. Rimuovere i campioni dal bagnomaria, e sotto cappa aggiungere 560µl di isopropanolo freddo (Fig. 8g) miscelare capovolgendo delicatamente le provette per almeno 20 volte. Si lascia precipitare per 90 minuti a -20°C o -80°C per ottenere un miglior precipitato. Possiamo prolungare il tempo di incubazione con isopropanolo per aumentare ulteriormente le rese precipitate. A questo punto è possibile visualizzare, in controluce, la matassa di DNA genomico ed il pulviscolo di RNA.
13. Centrifugare a 14.000 giri / min per 10 min a 4°C.
14. Scartare il surnatante nel contenitore per rifiuti chimici stando attenti a non rimuovere il pellet.
15. Aggiungere 1ml di tampone di lavaggio I (Washing buffer I) e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente per allontanare i sali.
16. Eliminare il surnatante e sostituire con 1ml di soluzione tampone di lavaggio II (Washing buffer II) ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.

17. Eliminare il surnatante e asciugare il pellet di DNA a temperatura ambiente per eliminare le tracce di etanolo.
18. Solubilizzare il pellet di DNA in 40 μ ddH₂O o in tampone TE, centrifugare per 15minuti a 4°C (Fig. 8h), incubare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione del DNA e conservare a -20°C. A questo punto il DNA isolato deve essere quantizzato e visualizzato su gel, ed è pronto per le analisi molecolari.

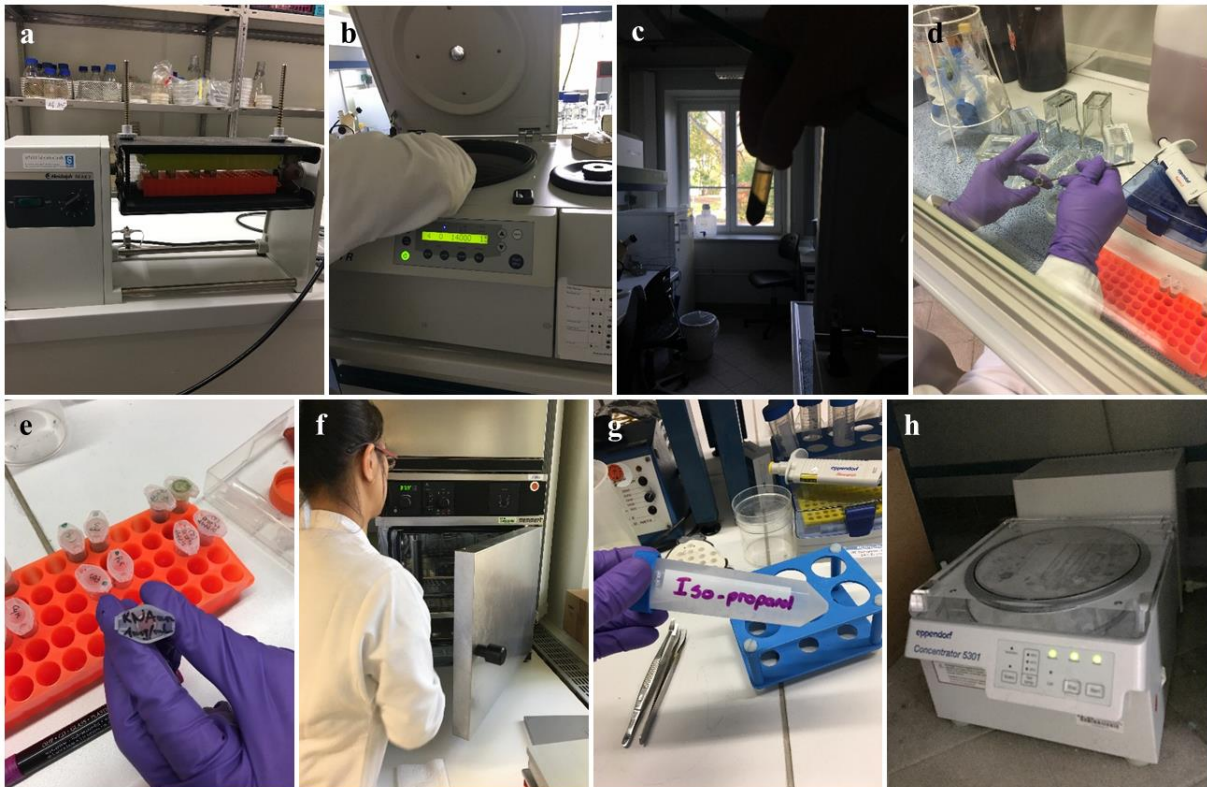


Fig. 8a-h. Estrazione del DNA genomico di *Cymodocea nodosa*, *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Zostera noltei* Hornemann. **(a)** agitazione dei campioni; **(b)** centrifugazione a 14000 rpm a 4°C; **(c)** separazione della la componente organica contenente le proteine (pellet) da quella acquosa contenente gli acidi nucleici (supernatante); **(d)** estrazione biglie; **(e)** inserimento di RNasi A e **(f)** incubazione dei campioni in stufa a 37°C; **(g)** introduzione di isopropanolo freddo; **(h)** centrifugazione a 4°C del DNA isolato.

2.5.1.2. Analisi purezza DNA

Al termine della metodica di estrazione, occorre valutare la purezza del DNA isolato per determinare se il campione è contaminato da sostanze superflue che potrebbero costituire un ostacolo nelle fasi successive di processamento. Tra i possibili contaminanti si possono annoverare le proteine che impaccano e proteggono il DNA nella cellula, l'RNA, enzimi quali le DNAasi, che potrebbero portare alla frammentazione del materiale genetico rendendolo così inutilizzabile, i sali, i residui organici, i detergenti, ecc. Un metodo per quantificare in modo preciso è quello spettrofotometrico. Si utilizza uno spettrofotometro che è uno strumento in

grado di misurare la quantità di radiazione assorbita dalla materia che è proporzionale alla quantità di materia stessa. Più in particolare, quando un fascio di luce (monocromatica) di intensità I_0 attraversa uno strato di spessore l di un mezzo, una parte di esso viene assorbita dal mezzo stesso e una parte ne viene trasmessa con intensità residua I_1 . L'evento è spiegato nell'immagine sotto (Fig. 9):

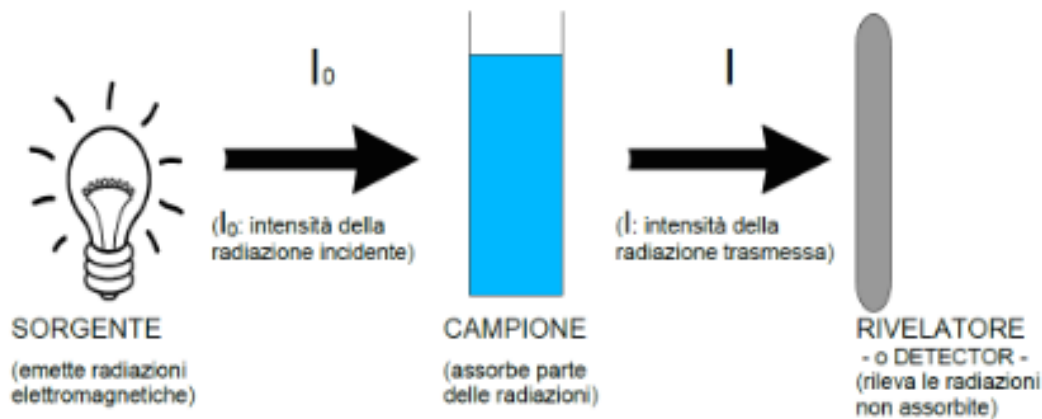


Fig. 9. Rappresentazione grafica del funzionamento di uno spettrofotometro.

Lo spettrofotometro utilizza proprio questa capacità della luce di essere assorbita, a diverse frequenze, dalle sostanze chimiche o biologiche. Lo strumento quindi è in grado di determinare un parametro, l'*Assorbanza*, definita come:

$$A = \log (I_0/I_1)$$

essendo I_1 e I_0 le intensità di luce trasmessa e iniziale. L'assorbanza è un numero senza unità di misura, che dunque avrà valore 0 quando $I_1=I_0$, avrà valore 2 quando la luce trasmessa è un centesimo della luce incidente ($\log[100/1]$) e così via. Generalmente gli spettrofotometri più comuni riescono a leggere nel campo di assorbanze tra 0 e 2, mentre per riuscire a determinare valori maggiori di assorbanza servono strumenti molto più sensibili.

L'assorbanza segue la legge principe della spettrofotometria, la *Legge di Lambert e Beer* secondo la quale Assorbanza e concentrazione del campione sono linearmente dipendenti:

$$A = \epsilon c l$$

dove ϵ è il *coefficiente di estinzione molare* (espresso quindi in $M^{-1}cm^{-1}$), una costante caratteristica per ogni sostanza (varia a seconda della lunghezza d'onda incidente e indica la capacità di quella sostanza di assorbire quella radiazione), c la concentrazione molare (M) della sostanza, ed l il *cammino ottico*, cioè la lunghezza in cm.

Quando un raggio di luce a tale lunghezza d'onda colpisce la soluzione di DNA, una parte di energia di tale raggio viene assorbita dalle basi azotate del DNA, così uscirà un raggio di minore intensità rispetto a quello incidente. A questa lunghezza d'onda viene misurato il valore di

Assorbimento per calcolare la concentrazione del DNA. Per il DNA, utilizzando cuvette di 1cm di cammino ottico ad un valore di assorbanza a 260nm pari a 1 unità di assorbimento, corrisponde una concentrazione di DNA di 50 µg/ml. Vale la seguente formula semplificata:

$$1 \text{ u.a.}_{260} = 50 \text{ µg/ml}$$

Con una semplice proporzione si ricava la concentrazione di DNA ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times 50 / 1 \text{ u.a.}$. In base alle diverse lunghezze d'onda dei diversi composti, osservando lo spettro, è possibile avere delle indicazioni sulla qualità dei campioni estratti e purificati. Il tipico spettro di un acido nucleico presenta un picco a 260nm che è possibile visualizzare in un grafico di assorbanza della soluzione contenente il DNA (Fig. 10).

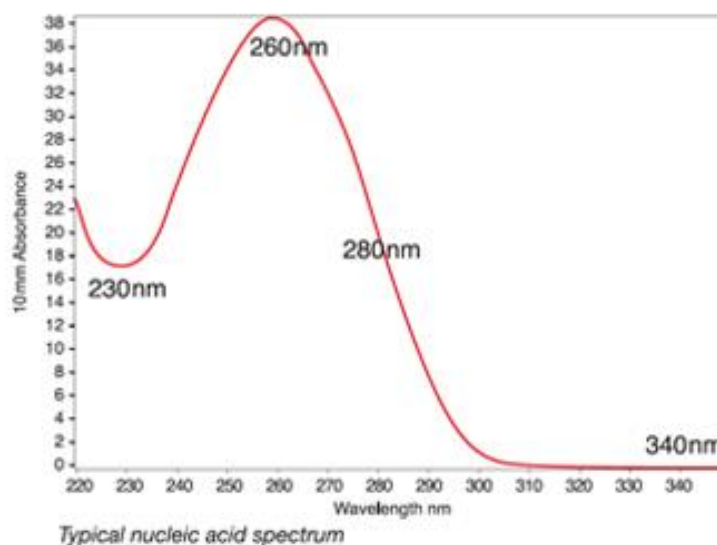


Fig. 10. Spettro di assorbimento tipico degli acidi nucleici.

Tracce di proteine o fenoli mostrano uno spettro deformato con un picco aggiuntivo (o una "gobba") a 280nm, mentre tracce di polisaccaridi sono osservabili con un picco a 230nm.

Per un DNA di buona qualità il rapporto dei valori di assorbimento a 260 e 280nm deve essere di ~1,8 e ~2,0 per l'RNA. Se tale rapporto risulta inferiore significa che ci sono possibili contaminazioni di proteine o composti fenolici. In questi casi il DNA dovrà essere ulteriormente purificato perché tali contaminazioni possono interferire con le reazioni successive. Il rapporto di purezza tra le assorbanze a 260/230 è una seconda misura di controllo del DNA, che deve essere compreso tra 1,8 e 2,2. Quindi, i rapporti di purezza che sono significativamente inferiori ai valori attesi possono indicare che la tecnica di estrazione e purificazione dell'acido nucleico utilizzato può richiedere un'ulteriore ottimizzazione.

Molti spettrofotometri sono impostabili su una lunghezza d'onda per volta ed effettuano letture singole di assorbanza a una specifica lunghezza d'onda. Esistono anche spettrofotometri a

doppio raggio' che presentano due alloggiamenti, uno per la cuvetta del campione e uno per la cuvetta del bianco che viene sottratto in automatico al campione. Ci sono poi spettrofotometri a serie di diodi in grado di effettuare in pochi secondi una lettura di tutte le assorbanze del campione comprese in un range di lunghezze d'onda (in genere UV/visibile).

Quantificazione degli acidi nucleici al nanodrop

Le analisi per la purezza del DNA isolato sono state effettuate attraverso l'utilizzo di uno spettrofotometro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific™). Il NanoDrop è uno spettrofotometro UV-Vis a spettro completo utilizzato per quantificare e valutare la purezza di DNA, RNA, proteine e altro utilizzando dei micro volumi di campione (~0.5-2µl) grazie alla tecnologia delle fibre ottiche e le proprietà naturali della tensione superficiale di catturare e trattenere piccole quantità di campione svincolandosi dall'utilizzo delle classiche cuvette. E' composto da una parte strumentale facile da usare e da un software intuitivo (Software ND-1000 V3.8.1) da installare in un computer Microsoft Windows 7 Professional (32-bit e 64-bit), Windows 8 (32- and 64-bit) e Windows 10 Pro (64-bit) che include metodi personalizzati, preconfigurati per A260, A280, DNA o proteine etichettati, e capacità di esportazione dei dati. Il principio di funzionamento è semplice: viene calcolata la curva di assorbimento del campione in relazione ad un "bianco", cioè un paragone, impostato per primo (si utilizza il composto in cui è tenuto in soluzione il campione da analizzare). Viene infatti messo 1µl di campione nel recettore apposito, che verrà poi chiuso permettendo allo strumento di analizzarlo (Fig. 11).



Fig. 11. Spettrofotometro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific™). Inserimento di 1µl di campione nell'apposito recettore per analizzare il campione.

In base alla natura che noi avevamo dato in precedenza, avremo quindi una serie di informazioni utili all'analizzatore quali ad esempio la concentrazione del campione compresa tra 2-15.000ng/μl, il picco di assorbimento (diverso a seconda della natura del composto, ad esempio per il DNA è 260nm, per polisaccaridi 230nm, infine per le proteine 280nm) tra 190 e 840nm. I dati estrapolati possono essere esportati in tabelle di Microsoft Excel, aumentando la maneggevolezza e la facilità di lavoro.

L'analisi allo spettrofotometro a microvolume prevede i seguenti passaggi:

1. Inizialmente pulire le superfici ottiche superiori ed inferiori del sistema di ritenzione spettrofotometrico, pipettando 1.5μl di acqua deionizzata pulita sulla superficie ottica inferiore.
2. Chiudere il braccio di leva, assicurandosi che il piedistallo superiore entra in contatto con l'acqua deionizzata. Sollevare il braccio di leva, appoggiare un pezzo di carta assorbente pulito e asciutto e chiudere il braccio di leva. Quindi ripetere l'operazione.
3. Aprire il software NanoDrop e selezionare l'applicazione di acido nucleico.
4. Utilizzare 1μl di tampone o ddH₂O sulla superficie inferiore ottica per tarare la macchina dando in questo modo un controllo "a vuoto" ('bianco') per due volte. Abbassare il braccio di leva e selezionare "vuoto" nella domanda di acido nucleico.
5. Una volta tarato, pulire entrambe le superfici ottiche con un panno pulito e asciutto.
6. Scegliere la costante appropriata per il campione che deve essere misurato. Quindi selezionare DNA-50 (vedi Tab. 5).

Tabella 5. Esempi di impostazioni delle applicazioni per l'analisi allo spettrofotometro a microvolume.

Tipo di campione	Selezionare l'opzione	Costante utilizzata per calcolare la concentrazione
dsDNA	DNA-50	50
ssDNA	DNA-33	33
RNA	RNA-40	40
Oligo	Costume	15-150

7. Dispensare 1μl di campione di acido nucleico sulla superficie ottica e chiudere il braccio di leva. Nomina il campione da analizzare e procedi dando il comando 'misura' al computer fino a tre volte per ciascun campione da analizzare
8. A seguito della misura controlla l'immagine dello spettro di assorbimento per valutare la qualità e quantità del campione. Il software misura l'assorbanza alle diverse lunghezza d'onda e calcola automaticamente il rapporto di concentrazione e purezza del campione.

Nel caso dell'estrazione di DANN con fenolo, la contaminazione residua del reagente può essere indicata da spettri anomali tra 220 e 240 nm, nonché da spostamenti nella regione da 260 a 280 nm.

9. Prima di procedere con l'analisi del campione successivo, pulire la superficie inferiore ottica con ddH₂O per evitare contaminazioni. Sollevare il braccio di leva, appoggiare un pezzo di carta assorbente pulito e asciutto e chiudere il braccio di leva e ripetere l'operazione.
10. Terminati i campioni da analizzare, pulire con acqua deionizzata la superficie ottica inferiore, salvare il report, esportare i dati e chiudere il software.

2.5.1.3. Elettroforesi su gel di agarosio

Una metodica di routine per analizzare il DNA, che consente di valutarne in modo approssimativo la concentrazione, l'integrità ed il peso molecolare (la lunghezza), è l'elettroforesi su gel di agarosio. Consiste nel caricare campioni di DNA in soluzione salina acquosa all'interno di un gel e sottoporlo ad un campo elettrico. In questo modo, le molecole tenderanno a migrare verso l'elettrodo con carica opposta rispetto a quella propria, separandosi in base al loro peso molecolare in quanto le molecole più grandi migreranno più lentamente rispetto a quelle più piccole. Il DNA, che è carico negativamente a causa dei gruppi fosfato che fanno parte dello scheletro, tenderà quindi a migrare verso l'anodo che presenta carica positiva (Fig. 12).

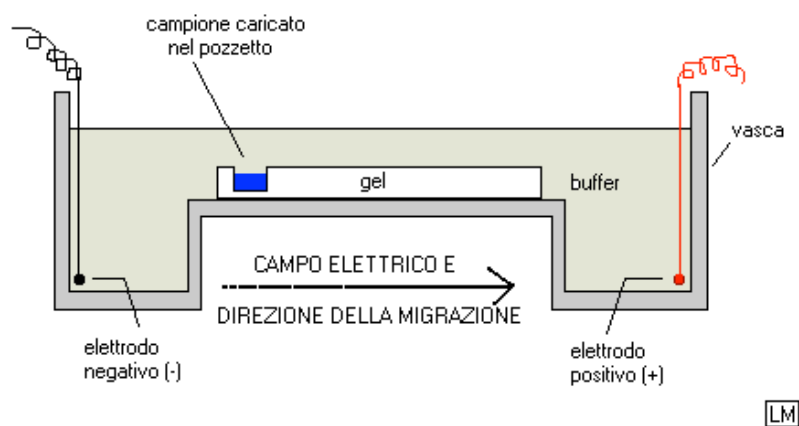


Fig. 12. Rappresentazione grafica di un apparato elettroforetico su gel di agarosio.

Il DNA migra attraverso le maglie del gel di agarosio con una velocità che dipende dal proprio peso molecolare: frammenti brevi migrano più velocemente di frammenti lunghi. La relazione tra velocità di migrazione e peso molecolare non è lineare: la velocità è inversamente

proporzionale al logaritmo del peso molecolare, cioè della lunghezza). In questo modo è possibile separare frammenti di DNA a diverso peso molecolare presenti in una miscela.

Utilizzando marcatori di peso molecolari a concentrazione nota è inoltre possibile stimare le dimensioni e le concentrazioni dei nostri campioni. Infatti per valutare la *quantità* di un campione di DNA tramite l'elettroforesi è sufficiente un semplice saggio colorimetrico poiché il DNA nel gel di una elettroforesi si colora in modo proporzionale alla sua quantità. Con l'utilizzo di uno standard a concentrazione nota, caricato in quantità scalari su differenti pozzetti (es. 50, 100, 200 ng), semplicemente comparando l'intensità della colorazione del campione da valutare con quella degli standard, si può risalire in modo approssimativo alla sua concentrazione. Inoltre, con l'elettroforesi è anche possibile valutare l'*integrità* di un campione di DNA genomico isolato da un tessuto. Se il DNA è di buona qualità ovvero è integro, al termine della corsa elettroforetica, apparirà una banda vicino al pozzetto in cui era stato caricato, cioè il campione risulterà costituito da frammenti di lunghezza omogenea che avranno migrato poco perché costituiti da molecole di DNA ad altissimo peso molecolare. Viceversa se il DNA ottenuto dall'estrazione non è di buona qualità ovvero contiene DNA assai frammentato, al termine della corsa si presenterà come una lunga strisciata perché i frammenti di DNA di diversa lunghezza saranno migrati diversamente: in basso frammenti a basso peso molecolare che saranno migrati più velocemente, in alto, vicino al pozzetto, frammenti ad alto peso molecolare che saranno migrati più lentamente.

L'elettroforesi viene normalmente condotta su gel di agarosio all' 1% in tampone TBE 1x (1g di agarosio in 100ml di TBE 1x). Il gel solido viene immerso nel tampone TBE 1x della vaschetta dove avviene la corsa. Essa viene programmata con un voltaggio che dipende dalle dimensioni del gel (100-200 volt). Per la colorazione degli acidi nucleici si usa il colorante SyberSafe, colorante fluorescente che, durante l'elettroforesi, si lega in modo stechiometrico (proporzionale alla quantità) al DNA, intercalandosi nella doppia elica. Più DNA viene caricato su gel, più colorante si legherà. Prima di inserire i vari campioni di DNA nel gel, questi devono essere diluiti e marcati con un colorante blu-violetto, il Loading Dye, che nel gel formerà due bande separate. Il Loading Dye, oltre al Blu di bromofenolo e Xilenciamolo che migrano alla stessa velocità di un frammento di DNA a doppia elica di circa 300pb e 400pb rispettivamente, contiene glicerolo. Quest'ultimo ha la funzione di appesantire il DNA facendolo andare nel fondo del pozzetto e così facilitare il successivo caricamento. Dopo il caricamento dei campioni nei pozzetti, agli estremi della vasca viene applicata una differenza di potenziale. Al termine della corsa elettroforetica il DNA sarà visualizzabile illuminando il gel ai raggi UV, posizionandolo su un transilluminatore. Quest'ultimo è un sistema di documentazione su gel

costruito attorno a una fotocamera in bianco e nero dotata di messa a fuoco e apertura manuale e zoom 8-48 mm solo ottico, con una camera oscura controllata da microprocessore. Esso può essere utilizzato con una stampante video termica che grazie filtro appropriato per gel di DNA colorato con SYBR® Safe permette di stampare immagini in gel a 768 X 582 pixel a 8 bit. La radiazione ultravioletta eccita il colorante che emette, per fluorescenza, radiazione luminosa fornendo una luce verde di intensità proporzionale alla quantità di DNA cui si è legato.

Procedura per l'elettroforesi

Corsa elettroforetica prevede i seguenti passaggi:

1. Preparare il gel di agarosio da 40ml all' 0.1%, quindi pesare 0,4g di agarosio, mettere in una beuta e aggiungere 40ml di TBE 1x
2. Far sciogliere l'agarosio in forno microonde (Fig. 13a) e lasciarlo raffreddare
3. Aggiungere 4µl di colorante SaberSafe DNA green
4. Versare il liquido in un supporto (vaschetta) chiuso con carta adesiva per evitare la fuoriuscita del liquido e provvisto di un pettine allo scopo di creare dei pozzetti, all'interno dei quali verrà caricato il DNA (Fig. 13b)
5. Una volta solidificato rimuovere il pettine ed il nastro adesivo ed immergere il gel in una vasca elettroforetica riempita con la medesima soluzione tampone di cui è costituito il gel (Fig. 13c)
6. Preparare in un pezzo di parafilm 1µl di Loading Dye per ciascun campione da analizzare e unire 2µl di H₂O e 3µl di DNA estratto, quindi miscelare (Fig. 13d)
7. Caricare i campioni nei pozzetti lasciando il primo pozzetto (o l'ultimo) vuoto per il GeneRuler
8. Caricare il pozzetto vuoto con 3µl di Gene Ruler DNA Ladders (100bp) che funge da controllo per il dimensionamento e la quantificazione del DNA (Fig. 13e)
9. Accendere lo strumento per l'elettroforesi tarare a 80V, 0.16A, 13W (Fig. 13f) e avviare la corsa per almeno un ora e mezza finchè tutto il DNA migra ai poli opposti
10. Al termine della corsa elettroforetica, delicatamente prelevare il gel con una paletta e posizionarlo sul trasilluminatore (GeneFlash di Syngene) per visualizzare e documentare il DNA su gel (Fig. 13g)
11. Accendere il display LCD della camera oscura, visualizzare il DNA illuminando il gel ai raggi UV, inquadrare e mettere a fuoco e scattare una foto
12. Al termine stampare l'immagine del gel e salvare una copia digitale utilizzando una chiave di memoria USB

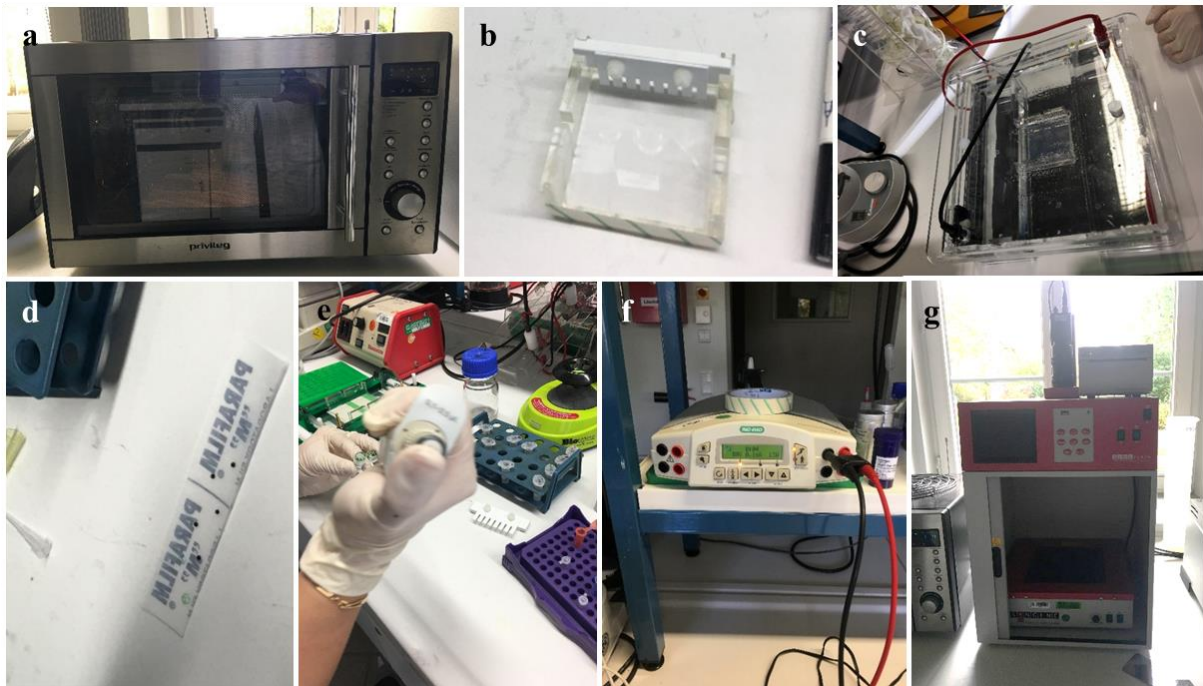


Fig. 13a-g. Procedura per l'elettroforesi su gel di agarosio. (a) Preparazione del gel di agarosio al microonde; (b) vaschetta con il pettine per caricare il DNA nei pozzetti; (c) vasca elettroforetica riempita con soluzione tampone; (d) parafilm con 1 μ l di Loading Dye per ciascun campione; (e) caricamento Gene Ruler DNA Ladders; (f) impostazione strumento per la corsa elettroforetica; (g) trasilluminatore (GeneFlash di Syngene).

2.5.1.4. PCR (Polimerase Chain Reaction, “reazione a catena della polimerasi”)

La Reazione a Catena della Polimerasi o PCR è una tecnica di biologia molecolare che permette l'amplificazione esponenziale di frammenti di DNA sfruttando la capacità di sintesi del DNA dell'enzima DNA polimerasi, che permette una duplicazione semiconservativa. Questo enzima infatti è in grado di sintetizzare copie multiple di una sequenza specifica di DNA racchiusa tra due brevi tratti di sequenza nota, su cui sono stati disegnati degli inneschi (primers) specifici. La PCR prevede l'alternarsi ciclica di tre fasi:

- Denaturazione: la doppia elica del DNA si apre a 92-95°C per 30-60”.
- Annealing: i primer si attaccano alle 2 estremità del frammento da amplificare. Avviene a 55-60°C, a seconda del contenuto in GC dei primer, per 30-60”.
- Estensione: la DNA polimerasi (Taq) sintetizza i nuovi filamenti di DNA a 72°C aggiungendo nuovi nucleotidi liberi all'estremità 3'-OH dell'innesco.

Per agevolare il lavoro, si fa una master mix unica, contenente:

- H₂O sterile
- PCR Buffer: specifico per ogni enzima. È un mix di sali con funzione di mantenere il pH ideale per il funzionamento della Taq polimerasi.

- $MgCl_2$ (o $MgSO_4$): è il cofattore della DNA polimerasi, influenza la specificità dei legami dei primer e favorisce l'inserimento dei dNTPs. Viene usato con una concentrazione variabile da 1,5 a 3 mM, ma un eccesso di questo cofattore può rendere aspecifica l'attività della polimerasi.
- dNTPs: sono i desossinucleotidi (A-T-C-G) che verranno incorporati dall'enzima nel filamento di nuova sintesi. Devono essere messi in uguale concentrazione, variabile da 200 a 400 μM .
- Primer Fw e Rev: ovvero degli inneschi oligonucleotidici fiancheggiati le regioni target (che dovranno cioè essere amplificate) fungendo da attacco per la DNA polimerasi. Essi devono essere efficienti, specifici ed avere l'OH libero per far continuare la polimerizzazione (può essere persa a temperatura ambiente). Quando si disegna un primer si deve tener conto della sua lunghezza, che deve essere compresa tra 24 e 30 nt, della sua composizione in C e G (>60%) e la temperatura di Melting, calcolata con la formula $2x (A+T) + 4x (G+C)$. Inoltre la breve sequenza di nucleotidi non deve formare strutture secondarie o omo/eterodimeri.
- DNA templat-stampo: può essere di diversa natura, DNA singolo o doppio filamento, ibridi di DNA/RNA o colonie batteriche (PCR-colony). È importante che sia il più pulito possibile perché può inibire la PCR.
- Taq DNA Polimerasi: è un'enzima con un optimum di temperatura 72 °C e un tasso di errore di 1 base ogni 104 basi. L'enzima che viene usato nelle reazioni di PCR è la Taq DNA Polymerase, con l'aggiunta di alcuni composti per rendere migliore e più specifica l'amplificazione. Esso proviene dall'organismo termofilo *Thermus aquaticus* (tramite ingegnerizzazione) ed è costituito da una singola catena polipeptidica (massa molecolare di 94 kDa). Presenta un'attività principale DNA polimerasi DNA - dipendente in direzione 5' 3', per la quale è richiesta una temperatura ottimale di 75-80 °C e la presenza di ioni Mg^{2+} (ad es. $MgCl_2$); in tali condizioni la reazione avviene con elevata processività e alto numero di turn over.
- Additivo per PCR: sostanze eterogenee per natura (DMSO, Betaine, etc) con la comune capacità di destabilizzare i filamenti del DNA rendendo più facile la denaturazione di regioni ricche in GC che tendono a formare strutture secondarie molto stabili, di aumentare la specificità dei legami con i primers ed incrementare l'attività enzimatica.

L'esecuzione delle reazioni cicliche a diverse temperature richiede un termociclatore in cui impostare tempi e temperature che devono essere applicati alla miscela la cui composizione può

variare a seconda delle diverse applicazioni specifiche. In generale un profilo termico più o meno standard si può schematizzare in questo modo:

1. 96°C per 5 min
 2. 95°C per 1 min
 3. 55°C per 30 sec
 4. 72°C per 50 sec
 5. 72°C per 12 min
 6. 4°C per ∞
- } x 35-40 cicli

Alla fine si ottengono più di un miliardo di copie del tratto di DNA di interesse compreso tra il primer Fw e il primer Rev. All'inizio della reazione l'amplificazione sarà direttamente proporzionale, ma verso gli ultimi cicli raggiungerà un plateau dovuto all'inibizione dei prodotti di reazione, come ad esempio i prodotti di scarto, la disattivazione dell'enzima e minor disponibilità di dNTPs. Una volta ottenuto l'amplificato, è possibile controllarlo mediante una corsa elettroforetica; se la PCR è venuta, avremo una corrispondenza di grandezza, legata all'amplificato ed al marker. Se invece i risultati non sono soddisfacenti, bisogna andare a modificare dei parametri nel protocollo al fine di migliorarne il prodotto di amplificazione:

- concentrazione di MgCl₂ che può rendere più o meno specifica l'amplificazione;
- quantità e qualità del template di partenza;
- modifica settaggi del termociclatore (temperatura annealing, tempi in base alla lunghezza del frammento, ecc...).

Procedura per la preparazione delle sonde ribosomiali e telomeriche

Il DNA genomico isolato di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson e di *Zostera noltei* Hornemann, è stato usato come modello per amplificare le regioni di rDNA con coppie di primers progettate per:

- ❖ 18S-rDNA: 18S-SSU1 F (5' – TGG-TTG-ATC-CTG-CCA-GTA-G – 3') e 18S-1243 R (AGA-GCT-CTC-AAT-CTG-TCA– 3') (Shoup and Lewis, 2003);
- ❖ 26S-rDNA: 26S-0091 F (5' – TAG-TAA-CGG-CGA-GCG-AAC-C – 3') (Tippery et al. 2015) e 26S-1229 R (5' – ACT-TCC-ATG-ACC-ACC-GTC-CT – 3') (Kuzoff et al. 1998);
- ❖ 5S-rDNA: UP46 F (5' – GTG-CGA-TCA-TAC-CAG-CAC-TAA-TGC-ACC-GG– 3') e UP47 R (5' – GAG-GTG-CAA-CAC-GAG-GAC-TTC-CCA-GGA-GG– 3') (Gottlob-McHugh et al. 1990).

Per ciascuna regione ribosomiale amplificata sono state effettuate 3 reazioni per un totale di 9: 3 reazioni per ciascun campione di DNA template (3 per *C. nodosa* e 3 per *Z. noltei*) ed 3 di controllo (NC) senza DNA template. Per le reazioni di PCR è stata utilizzata la DreamTaq DNA Polymerase™ (5 U/μl) che garantisce maggiore sensibilità, prodotti PCR più lunghi e rese più elevate rispetto alla convenzionale Taq DNA (Fig. 14a). Essa non richiede un'ottimizzazione estesa delle condizioni di reazione poiché utilizza le stesse condizioni di reazione e ciclo della convenzionale Taq DNA polimerasi e viene fornita con il buffer DreamTaq™ 10x ottimizzato, che include 20 mM MgCl₂. In alcuni casi, la DreamTaq è stata usata insieme l'additivo dimetilsofossido (DMSO, Invitrogen™) per aumentare la prestazione dell'enzima. Tutti i prodotti sono stati riposti su ghiaccio (Fig. 14b).

La composizione relativa al mix PCR sono riassunti nelle Tabelle 6 e 7:

Tabella 6. Componenti del master mix per amplificare la regione rDNA-5S.

<i>Componenti</i>	<i>Unità</i>	<i>Volume x 1 reazione</i>	<i>Volume x 3.5 reazioni</i>
ddH ₂ O	μl	15.75	55.12
Buffer DreamTaq (10x)	μl	2.5	8.75
dNTPs (2.5mM)	μl	2.0	7.0
UP46 F	μl	1.25	4.37
UP47 R	μl	1.25	4.37
DreamTaq (5 U/μl)	μl	0.25	0.87
DNA stampo (20ng/μl)	μl	2.0	7.0
Volume totale	μl	25	87.5

Tabella 7. Componenti del mix di PCR per amplificare le regioni rDNA-18S e 26S. Nota: F primer *= 18S–SSU1 per rDNA-18S e 26S–0091 F per rDNA-26S, R primer **= 18S–1243 R per rDNA-18S e 26S–1229 R per rDNA-26S.

<i>Componenti</i>	<i>Unità</i>	<i>Volume x 1 reazione</i>	<i>Volume x 3.5 reazioni</i>
ddH ₂ O sterile	μl	13.0	45.5
Buffer DreamTaq (10x)	μl	2.5	8.75
dNTPs (2.5mM)	μl	2.0	7.0
DMSO	μl	2.5	8.75
F primer*	μl	1.25	4.37
R primer**	μl	1.25	4.37
DreamTaq (5 U/μl)	μl	0.5	1.75
DNA stampo (20ng/μl)	μl	2.0	7.0
Volume totale	μl	25	87.5

Utilizzando tetrameri di ripetizioni di telomeri di tipo *Arabidopsis* (TTTAGGG)_n sono state generate, tramite PCR, sonde telomeriche (telo) specifiche secondo Ijdo et al. (1991). Inoltre, sequenze di ripetizione dei telomeri umani (TTAGGG)_n con frammenti di dimensioni fino a 25 kb sono state utilizzate per generare sonde telomeriche di tipo umano a diversa concentrazione. La PCR è stata eseguita in assenza di modello utilizzando primer telomerici (Hu_telomere F e R, Eurofins MWG Operon) a concentrazione 0.1µl e 1µl (hutelo_0.1 e hutelo_1) (Fig. 14c):

- F primer: 5' – TTAGGG TTAGGG TTAGGG TTAGGG – 3'
- R primer: 5' – CCCTAA CCCTAA CCCTAA CCCTAA – 3'

Le variazioni nella concentrazione di primer influiscono sulla dimensione media del prodotto: riducendo la concentrazione iniziale di primer aumenta la lunghezza media dei prodotti. Di seguito è riportata la Tabella 8 che mostra i master mix utilizzati per generare sonde telomeriche umane per il rilevamento dei telomeri.

Tabella 8. Componenti per il rilevamento delle sonde telomeriche di tipo umano con concentrazioni dei primer Rev e Fw 0.1 µl e 1µl.

<i>Componenti</i>	<i>Unità</i>	<i>Volume x primer 0.1µl</i>	<i>Volume x primer 1µl</i>
ddH ₂ O	µl	40.4	38.6
Buffer DreamTaq (10x)	µl	5.0	5.0
dNTPs (2.5mM)	µl	4.0	4.0
Hu_telomere_F primer	µl	0.1	1.0
Hu_telomere_R primer	µl	0.1	1.0
DreamTaq	µl	0.4	0.4
Volume totale	µl	50	50

Per amplificare le regioni di rDNA 5S, 45S (18S + 26S), le regioni telomeriche specifiche per le piante e per gli umani, è stato utilizzato il Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) (Fig. 14d). Il termociclatore è stato programmato con tre diversi metodi impostando tempi e temperature a seconda delle diverse applicazioni specifiche semplicemente toccando il passaggio e utilizzando la tastiera per selezionare i diversi stadi e step (Fig. 14e). Dopo aver completato l'installazione da eseguire, i metodi programmati sono stati salvati sullo strumento ed i campioni sono stati posti nel termociclatore. Le condizioni di reazione PCR sono riportate nella Tabella 9.

Le dimensioni dei frammenti amplificati sono stati controllati tramite elettroforesi su gel di agarosio per verificare l'efficienza della sonda prodotta e quantificati al NanoDrop mediante

spettroscopia UV a microvolume per determinare la concentrazione e la purezza dei geni isolati, come descritto in precedenza (Fig. 11).

Tabella 9. Programmi PCR impostati a diversi tempi e temperature per ciascun prodotto amplificato: telomeri umani (hutelo 0.1 e 1), rDNA-5S e rDNA18S e 26S.

Programmi PCR												
Telomeri umani			rDNA-5S				rDNA-18S/26S					
Stage 1	94°C	60'	Stage 1	94°C	5"	x1	Stage 1	94°C	5"	x1		
	55°C	30'		55°C	5"			Stage 2	94°C		1"	x30
	72°C	60'		72°C	30'				52°C		40'	
Stage 2	94°C	60'	Stage 2	94°C	1"	x30	Stage 2	72°C	1"	x1		
	60°C	30'		55°C	1"			Stage 3	72°C		10"	
	72°C	90'		Stage 3	72°C				5"		4°C	∞
Stage 3	72°C	5"	Stage 3		4°C	∞	x1					
	4°C	∞										



Fig. 14a-e. Preparazione delle sonde ribosomiali e telomeriche. (a) DreamTaq DNA Polymerase™; (b) preparazione dei prodotti utilizzati su ghiaccio; (c) primer telomeric (Hu_telomere F e R, Eurofins MWG Operon); (d) Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™); (e) impostazione programmi per i diversi step.

2.5.2. Ibridazione fluorescente in situ (Flourescent In Situ Hybridization, FISH) e Immunomarcatura (Immunolabeling)

L'ibridazione fluorescente in situ o *Flourescent in situ hybridization* (FISH) è una tecnica citogenetica molecolare che consente di rilevare e localizzare la presenza o l'assenza di specifiche sequenze DNA complementari a una sonda marcata che si legano in modo estremamente selettivo ad alcune specifiche regioni del cromosoma o all'interno dei nuclei interfase (Schwatuacher e Heslop-Harrison 1993). Per individuare il sito di legame tra sonda e cromosoma si utilizzano tecniche di microscopia a fluorescenza. Per preparare la sonda, che deve essere abbastanza lunga per ibridare esattamente il suo obiettivo (e non un'altra sequenza simile del genoma) ma non deve essere tanto grande da impedire il processo, essa viene marcata con metodi diretti o indiretti. Con la marcatura diretta, gli acidi nucleici vengono etichettati grazie a molecole 'reporter' (ad esempio etichette radioattive o fluorescenti) incorporate direttamente alla molecola o uniformemente lungo la sua lunghezza, massimizzando così la densità dell'etichetta, o solo a un'estremità (Harvey et al. 1994). Nei metodi indiretti, invece, il segnale è determinato indirettamente dall'interazione di biotina o digossigenina legate ad un nucleotide sempre della sonda con substrati (avidina/streptavidina o anticorpi anti-digossigenina) legati direttamente ad un fluorocromo (Leitch I.J. e Heslop-Harrison 1994; Karp 1994). Questo approccio indiretto viene utilizzato per il processo di Immunomarcatura o *Immunolabeling* che consente il rilevamento e la localizzazione di un antigene in un determinato sito all'interno di una cellula, tessuto o organo. Esso, in particolare impiega un anticorpo primario che cerca e si lega all'antigene bersaglio (antigene-specifico) e di un anticorpo secondario fuso ad un tag (etichettato) che si lega specificamente l'anticorpo primario.

I vantaggi del metodo di etichettatura diretta con fluorocromi comprendono la semplicità, infatti non sono necessarie lunghe procedure di rilevazione dopo i lavaggi post-ibridazione, meno colorazioni di fondo ed evitano un'eccessiva amplificazione dei segnali, risultando quindi in una rappresentazione più accurata della localizzazione nucleare e della morfologia del locus (Bolland et al. 2013). Infatti, la quantificazione del segnale è più affidabile poiché la stechiometria della singola fase di ibridazione è più chiara di quella di una procedura immunocitochimica a più fasi (Schwatuacher e Heslop-Harrison 1993). Il sistema viene utilizzato principalmente per rilevare un numero di copie medio-alto o sonde multiple, ciascuna etichettata con una diversa combinazione di fluorocromo, consentendo il rilevamento simultaneo di più target (Ried et al. 1992). Tuttavia, poiché non vi è amplificazione del segnale,

la sensibilità è inferiore rispetto a metodi indiretti che permettono la visualizzazione di un segnale migliore e più intenso (Leitch I.J. e Heslop-Harrison 1994).

Per l'esecuzione di esperimenti FISH di successo è importante la scelta dei trattamenti cellulari, comprese le fasi di fissazione, pre e post-ibridazione, per preservare il più possibile la morfologia nucleare rendendo il DNA sufficientemente accessibile per l'ibridazione delle sonde. Esistono diverse tecniche FISH che utilizzano differenti fissativi, pre-trattamenti e lavaggi post-ibridazione e, generalmente, rientrano nelle seguenti categorie: fissazione della glutaraldeide con denaturazione di NaOH, fissazione della formaldeide con denaturazione di HCl e fissazione della formaldeide con denaturazione termica (Brown 2002, Hewitt et al. 2009, Solovei et al. 2002, Solovei 2002). Ognuno di questi ha vantaggi e svantaggi. La fissazione della glutaraldeide si traduce in una buona conservazione strutturale nucleare, ma richiede un trattamento con agenti riducenti per ridurre al minimo la conseguente autofluorescenza e il trattamento con NaOH deve essere attentamente controllato per bilanciare la denaturazione del DNA e il potenziale danno alla struttura nucleare (Brown 2002). La fissazione della formaldeide è meno forte, dando una maggiore probabilità di perturbazioni dell'architettura nucleare, ma in genere dà anche segnali più forti e più affidabili e una minore autofluorescenza (Solovei 2002). Il trattamento con HCl denatura il DNA e rimuove le proteine, fornendo un buon accesso al DNA per le sonde, ma può anche introdurre rotture del DNA. Il riscaldamento separa fisicamente i due filamenti di DNA con conseguente buona ibridazione del bersaglio e segnali forti ma può causare qualche perturbazione della struttura nucleare (Solovei et al. 2002, Krueger et al. 2012). Il grado in cui ciascuna di queste tecniche influisce sulle proteine e sul DNA varia ampiamente, risultando necessario determinare sperimentalmente il protocollo ottimale da utilizzare negli esperimenti FISH. Sebbene non esista una tecnica "perfetta" per eseguire la FISH, possono essere tutti utili se ben controllati (Bolland et al. 2013).

La procedura di ibridazione in situ a fluorescenza diretta segue i protocolli generali di ibridazione in situ (Heslop-Harrison 1991) e prevede l'etichettatura della sonda (Bronwen et al. 1994, Mandakova and Lysak 2008), la preparazione dei cromosomi (Cao et al. 2016, Karp 1994, Schwarzacher and Leitch 1994) e le fasi di fissazione, ibridazione e post-ibridazione (Lysak et al. 2006).

2.5.2.1. Etichettatura delle sonde

Un'etichettatura efficiente delle sonde è di fondamentale importanza per FISH. Una delle tecniche di laboratorio di biologia molecolare più utilizzata per operare la marcatura del DNA è il metodo della 'Nick translation'. La caratteristica che lo contraddistingue è quella di essere

una tecnica capace di marcare fino alla totalità del filamento interessato, a differenza di altre tecniche di marcatura che interessano in primis le estremità 5' P o 3' OH del filamento. Tradizionalmente, la nick-translation è stata usata per introdurre apteni o nucleotidi coniugati con fluorocromi (Sambrook et al. 2000). Il metodo si avvale di una sequenza di DNA a doppio filamento, che una volta purificata viene tagliata con una endonucleasi a-specifica come la DNasi I capace di causare delle rotture a singolo filamento, in gergo chiamate proprio nick, generate dalla rottura dei legami fosfodiesterici. La presenza di un nick è il substrato di reazione per la DNA pol I, che partendo dal punto di rottura inizia ad integrare via via (dall'estremità 3') i dNTP marcati sostituendo i nucleotidi presenti, non marcati: la capacità di rimozione, detta in gergo attività 5'-esonucleasica è un caratteristica intrinseca e distintiva di questa DNA polimerasi DNA-dipendente. È fondamentale raggiungere il giusto equilibrio tra la nichelatura della DNasi I e la traduzione della DNA polimerasi I. Infatti troppa DNasi I comporterà un'eccessiva digestione del DNA dando bassa resa e dimensioni di frammenti brevi, al contrario, troppo poco non produrrà abbastanza nick per la polimerasi per iniziare la traduzione, producendo frammenti di grandi dimensioni con una scarsa incorporazione di dUTP-marcati (Bolland et al. 2013).

In commercio sono disponibili kit di nick-translation per incorporazione diretta di apteni o fluorocromi, ma anche per l'etichettatura in due fasi utilizzando nucleotidi aminoallilici e coloranti reattivi con ammine. Quest'ultime rendono l'incorporazione del colorante più efficiente dando alla DNA polimerasi una molecola meno voluminosa con cui lavorare (Bolland et al. 2013). Le sonde FISH possono anche essere acquistate già etichettate. Sebbene i kit e le sonde fabbricati commercialmente offrano senza dubbio facilità d'uso, sono considerevolmente più costosi rispetto all'acquisto dei singoli componenti e alla produzione di sonde interne. L'utilizzo di amino-allil-dUTP consente un'etichettatura flessibile di sonde con coloranti che reagiscono con l'ammina (ad es. Texas Red, Alexa Fluor 488 o Cy-dyes) o con apteni (ad es. Biotina, Digossigenina). Le sonde marcate con gli apteni (che agiscono da antigeni) sono rilevate da anticorpi coniugati con fluorocromi o streptavidina per amplificare e visualizzare il segnale (Boyle et al. 2011).

Protocollo di Nick translation: dUTP fluorescence

I prodotti PCR sono stati utilizzati come modelli per l'etichettatura diretta e indiretta tramite il metodo della 'nick-translation' per generare le corrispondenti sonde FISH e precipitate come descritto in Hoang e Schubert (2017).

In particolare, i primers generati in seguito all'amplificazione delle regioni ribosomiali 45S rDNA (18S e 26S) dal DNA isolato di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson e delle regioni telomeriche di tipo *Arabidopsis* (plant_telo) e di tipo umano a diverse concentrazioni (hutelo_0.1 e hutelo_1) sono state etichettate direttamente con coloranti fluorescenti con differenti proprietà spettroscopiche: Cy3-dUTP (GE Healthcare Life Science), Alexa Fluor 488-5-dUTP e Texas Red-12-dUTP (Life Technologies) in soluzione sterile rosa, giallo e rosso-viola in 10 mM Tris-HCl, rispettivamente. Questi fluorocromi, infatti presentano una coppia diversa di massimi di eccitazione e emissione con differenti colori fluorescenti: Cy3-dUTP presenta una fluorescenza color giallo con λ_{exc} 550 nm/ λ_{em} 570 nm, Alexa Fluor 488-5-dUTP fluorescenza verde con λ_{exc} 494 nm/ λ_{em} 515 nm, Texas Red-12-dUTP fluorescenza rosso con λ_{exc} 588 nm/ λ_{em} 609 nm.

Tabella 10. Componenti del mix di reazione di traduzione nick per l'etichettatura indiretta (Digossigenina e Biotina) e diretta (Texas Red, Alexa Fluor 488 e Cy3).

<i>Componenti nick translation</i>	<i>Unità</i>	<i>Digossigenina, Biotina</i>	<i>Texas Red, Alexa Fluor 488</i>	<i>Cy3</i>
DNA template (~1µg)	µl	10	10	10
Buffer NT 10x	µl	5	5	5
Soluzione ME 0.1M	µl	5	5	5
dNTP mix (senza dTTP)	µl	5	5	5
dUTP marcato	µl	4	1.5	3
ddH ₂ O	µl	17.4	20.3	18.8
DNAasi I (1:250)	µl	2.6	2.2	2.2
DNA Pol I	µl	1	1	1
Volume totale	µl	50	50	50

Inoltre, le sequenze dei telomeri di tipo umano, sono state anche etichettate indirettamente con Biotin-11-dUTP o Digoxigenin-11-dUTP (Life Technologies) che si presentano come soluzioni acquose trasparenti sterili in Tris-HCl 10 mM con proprietà spettroscopiche rispettivamente λ_{max} 240/289 nm e λ_{max} 290 nm.

La generazione di sonde di DNA con etichettatura diretta e indiretta attraverso la Nick Translation è stata calcolata per 50 vetrini (1µl di ciascuno) per un volume totale di 50 µl (Tab. 10). La reazione di traduzione Nick deve essere eseguita al buio per proteggere il dUTP etichettato.

Prima di iniziare:

1. Preparare i prodotti da etichettare e riporre su ghiaccio:
 - Digoxigenin-11-dUTP (**Dig**) → regioni telomeriche di tipo umano (Dig Hutelo 14S)
 - Biotin-11-dUTP (**Bio**) → regioni telomeriche di tipo umano (Bio Hutelo 14S)
 - Cy3-dUTP (**Cy3**) → regioni 18S e 26S rDNA *C. nodosa* (18S.Cy3 e 26S.Cy3), regione 45S rDNA *Arabidopsis* (Cy3.45S), regioni telomeriche umane (Hutelo.0.1.Cy3 e Hutelo.1.Cy3) e di tipo *Arabidopsis* (Telo.Cy3)
 - Texas Red-12-dUTP (**TxR**) → regione 18S e 26S rDNA *C. nodosa* (18S.TXR e 26S.TXR), regioni telomeriche di tipo umano (Hutelo.0.1.TXR e Hutelo.1.TXR) e di tipo *Arabidopsis* (Telo.TXR)
 - Alexa Fluor 488-5-dUTP (**a.488**) → regione 18S + regione 26S e regioni telomeriche umane (Hutelo.0.1.a488 e Hutelo.1.a488) e di tipo *Arabidopsis* (Telo.a488)
2. Preparare le provette eppendorf sterili da 1.5ml per ciascuna sonda da marcare con il metodo diretto e indiretto ed etichettare la parte superiore e i lati con un pennarello usando abbreviazioni e data al lato della provetta, quindi avvolgere con un nastro adesivo:
 - 6 epp. in Cy3 per 18S rDNA, 26S rDNA, 45S rDNA, telo, hutelo. 0.1 e hutelo.1.0
 - 5 epp. in a488 per 18S rDNA, 26S rDNA, telo, hutelo. 0.1 e hutelo.1.0
 - 5 epp. in TXR per 18S rDNA, 26S rDNA, telo, hutelo. 0.1 e hutelo.1.0
 - 1 epp. in Dig per human telo.
 - 1 epp. in Bio per human telo.
3. Accendere il bagno termostatico a 15°C
4. Preparare i prodotti per la Nick translation e riporli su ghiaccio:
 - Buffer Nick translation (NT) 10x (10ml): Miscela 0.5 M di Tris.HCl a ph 7.8 con 50mM MgCl₂ e 0.5mg/ml di BSA (albumina di siero bovino senza nucleasi) e conservare a -20°C in una scatola per Nick translation
 - Soluzione β-mercaptoetanol 0.1M (ME) conservato a -20°C
 - Nucleotide mix 1ml (dNTP mix) senza dTTP: Miscelare 0.5mM di ciascun dNTP (dATP, dCTP, dGTP) e conservare -20°C in una scatola per Nick translation
 - Desossiribonucleasi I o DNAasi I (1:250): Sciogliere 1mg/ml di DNAasi I in 0.15M di NaCl e 50% di glicerolo (v/v), diluire con ddH₂O (1:250) e conservare -20°C in una scatola per Nick translation
 - DNA Pol I nella scatola degli enzimi e dUTP marcato in quella dei marcatori mantenuti a -20°C
 - ddH₂O

Il protocollo per l'etichettatura delle sonde mediante il metodo della nick translation prevede i seguenti passaggi:

1. Preparare la miscela per i corrispondenti metodi di etichettatura diretta (Tab. 11-13) e indiretta (Tab. 14) e riporre su ghiaccio (Fig. 15a-d).



Fig. 15a-d. Componenti del mix per l'etichettatura diretta e indiretta delle sonde mediante il metodo della nick translation. (a) Buffer Nick translation 10x (NT), soluzione β -mercaptoetanolo 0.1M (ME), nucleotide mix 1ml senza dTTP (dNTP mix); (b) Desossiribonucleasi I o DNAasi I (1:250); (c) acqua distillata (ddH_2O); (d) DNA Pol I nella scatola degli enzimi e dUTP marcato.

Tabella 11. Componenti della miscela per l'etichettatura diretta delle sonde FISH in Cy3-dUTP.

<i>Componenti etichettatura diretta</i>	Unità	18S Cy3	26S Cy3	45S Cy3	plant telo Cy3	telo 0.1 Cy3	telo 1 Cy3
<i>ddH₂O</i>	μ l	23.8	23.8	20.3	20.3	25.3	25.8
<i>Buffer NT 10x</i>	μ l	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>Soluzione ME 0.1M</i>	μ l	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>dNTP mix</i>	μ l	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>dUTP-Cy3</i>	μ l	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
<i>DNAasi I (1:250)</i>	μ l	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
<i>DNA Pol I</i>	μ l	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>DNA template (~1μg)</i>	μ l	5.0	5.0	10.0	10.0	3.5	3.0
<i>Volume totale</i>	μ l	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

Tabella 12. Componenti della miscela per l'etichettatura diretta delle sonde FISH in TXR-dUTP.

<i>Componenti etichettatura diretta</i>	Unità	18S TXR	26S TXR	plant telo TXR	telo 0.1 TXR	telo 1 TXR
<i>ddH₂O</i>	μl	23.8	23.8	20.3	25.3	25.8
<i>Buffer NT 10x</i>	μl	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>Soluzione ME 0.1M</i>	μl	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>dNTP mix (senza dTTP)</i>	μl	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>dUTP-TXR</i>	μl	1.5	1.5	1.5	3.0	3.0
<i>DNAasi I(1:250)</i>	μl	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
<i>DNA Pol I</i>	μl	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>DNA template (~1μg)</i>	μl	5.0	5.0	10.0	3.5	3.0
<i>Volume totale</i>	μl	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

Tabella 13. Componenti della miscela per l'etichettatura diretta delle sonde FISH in a488-dUTP.

<i>Componenti</i>	Unità	18S a488	26S a488	plant telo a488	telo 0.1 a488	telo 1 a488
<i>ddH₂O</i>	μl	23.8	23.8	20.3	25.3	25.8
<i>Buffer NT 10x</i>	μl	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>Soluzione ME 0.1M</i>	μl	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>dNTP mix (senza dTTP)</i>	μl	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>dUTP-a488</i>	μl	1.5	1.5	1.5	3.0	3.0
<i>DNAasi I(1:250)</i>	μl	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
<i>DNA Pol I</i>	μl	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>DNA template (~1μg)</i>	μl	5.0	5.0	10.0	3.5	3.0
<i>Volume totale</i>	μl	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

Tabella 14. Componenti della miscela per l'etichettatura indiretta delle sonde FISH in bio-dUTP e dig-dUTP.

<i>Componenti etichettatura indiretta</i>	Unità	Dig Hutelo 14S	Bio Hutelo 14S
<i>ddH₂O</i>	μl	17.4	17.4
<i>Buffer NT 10x</i>	μl	5.0	5.0
<i>Soluzione ME 0.1M</i>	μl	5.0	5.0
<i>dNTP mix (senza dTTP)</i>	μl	5.0	5.0
<i>dUTP-Cy3</i>	μl	4.0	4.0
<i>DNAasi I(1:250)</i>	μl	2.6	2.6
<i>DNA Pol I</i>	μl	1.0	1.0
<i>DNA template (~1μg)</i>	μl	10.0	10.0
<i>Volume totale</i>	μl	50.0	50.0

2. Rimescolare brevemente con l'agitatore, centrifugare rapidamente e incubare a 15°C per 150 minuti (Fig. 16a)
3. Preparare il gel di agarosio al 1% per controllare la dimensione dei frammenti etichettati. Mentre prepari il gel, mantieni la reazione sul ghiaccio.
 - Sciogliere 0,4g di agarosio in 40ml 1X TBE nel microonde (Fig. 16b,c).
 - Dopo il raffreddamento, aggiungere 5µl di colorante verde SYBR-Safe green (Fig. 16d), versare nel vassoio per il gel precedentemente ricoperto con un nastro adesivo per evitare la fuoriuscita del gel ancora liquido e posizionare il pettine per creare i pozzetti.
 - Lasciare che il gel si raffreddi e quindi si solidifichi, quindi estrarre il pettine.
4. Procedere con l'elettroforesi su gel di agarosio per verificare il risultato della nick traslation.
 - Caricare i pozzetti con:
 - ❖ 5µl di campione con 1µl di STOP Loading Dye LD (colorante di 'caricamento' blu-viola) precedentemente mescolati insieme in un pezzetto di parafilm (Fig. 16e)
 - ❖ 4µl di DNA ladder da 100bp 1:10 (GeneRuler) (Fig. 16e). Di solito si lascia un pozzetto vuoto (il primo o l'ultimo) per il 'Gene Ruler' come controllo per indicare la grandezza delle basi. Le sonde e la DNAasi devono essere conservate su ghiaccio al buio
 - Aziona la corsa elettroforetica per 45 ~ 60 minuti a 80 V (Fig. 16f).

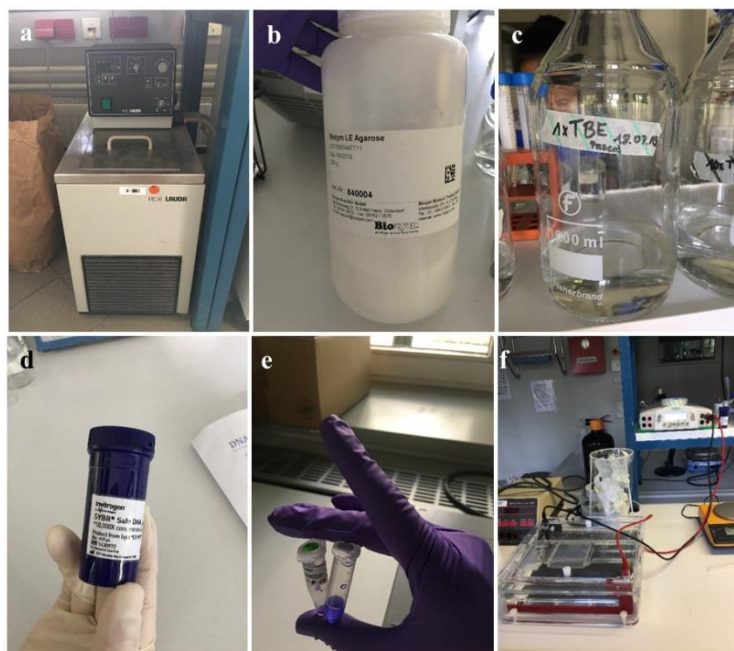


Fig. 16a-f. Elettroforesi su gel di agarosio. (a) Incubazione dei prodotti nick; (b) agarosio (Biozym Le Agarose); (c) tampone TBE 1x; (d) Invitrogen SYBR Safe DNA Gel Stain; (e) STOP Loading Dye LD e DNA ladder (Gene Ruler 100bp); (f) azionamento corsa elettriforetica.

5. I frammenti nick adatti devono essere compresi nell'intervallo 400-700 bp (500 - 1000 bp). Nel caso in cui i frammenti siano ancora più grandi delle dimensioni previste, aggiungere più DNAasi I quindi effettuare un'ulteriore incubazione a 15°C per un tempo più lungo.
6. Quando si ottiene un buon range di frammenti nick (visibile dalla presenza di strisce o 'sbavature'), arrestare la reazione aggiungendo 1µl di STOP (bianco) e incubare a 65°C a bagnomaria per 10 minuti per disattivare la DNAasi I
7. Le sonde della nick translation possono essere utilizzate immediatamente o conservate a -20°C

Precipitazione dei prodotti nick

Prima di iniziare la procedura per la precipitazione dei prodotti nick (NP):

1. *Preparare le provette eppendorf sterili da 1.5ml per ciascun prodotto nick da precipitare etichettando la parte superiore e i lati con un pennarello usando abbreviazioni e data al lato della provetta, quindi avvolgere con un nastro adesivo*
2. *Impostare la centrifuga a 4°C*
3. *Accendere un termomiscelatore a 37°C e un altro a 95°C*
4. *Preparare i prodotti utilizzati per la procedura:*
 - *Sonde per la nick traslation conservate a -20°C*
 - *Salmon Sperm DNA Solution*
 - *Buffer acetato di sodio (NaOAc) 3M: Sciogliere 24,6 g di acetato di sodio (anidro) in 70 ml di ddH₂O, aggiungere una pulce magnetica nel flacone e posizionarla su un agitatore magnetico per alcuni minuti. Regolare il pH su 5,2 aggiungendo acido acetico glaciale. Rabboccare la soluzione a 100 ml con ddH₂O e conservare in eppendorf da 1.5µl a -20°C.*
 - *Etanolo al 96% (EthOH) conservato a -20°C*
 - *Soluzione destrano solfato 20% (DS20) = Lavorando a concentrazione destrano solfato 20% in formammide deionizzata al 50%/ buffer SSC 2x/ buffer fosfato di sodio ph 7.0, miscelare 5ml di formammide deionizzata, 1ml di SSC 20x e 1ml di buffer fosfato di sodio a ph 7.0 in 3ml di ddH₂O. Sciogliere 2g di destrano solfato nella miscela di 10ml incubando la soluzione per 3h a 70°C. Aliquota in provette da 1ml e conservare a -20°C.*
 - *Buffer fosfato di sodio 0.5M a ph 7.0 (10ml) = Miscela 0.35g di fosfato di sodio dibasico o diidrato (Na₂HPO₄) e 0.29g di fosfato di sodio monobasico o monoidrato (NaH₂PO₄) in 10ml di ddH₂O, aggiungere una pulce magnetica*

nel becker e posizionarlo su un agitatore magnetico per alcuni minuti. Regolare il pH su 7.0, aliquotare la soluzione in eppendorf da 1ml e conservare a -20°C.

- Calcolare la quantità appropriata di sonde da preparare in base al numero di vetrini e alla concentrazione della sonda (1µl di prodotto nick per vetrino). La miscela deve essere preparata su ghiaccio ed al buio (Fig. 17a; Tab. 15).

Tabella 15. Miscela per la precipitazione dei prodotti nick per 10 vetrini.

<i>Sonde della Nick translation (10 vetrini)</i>	<i>Carried DNA (Salmon sperm)</i>	<i>3M NaOAc (0.1 V di campione)</i>	<i>96% EthOH freddo (2.5 V di campione)</i>
10µl (standard)	1µl	1.1µl	30.25µl

- Rimescolare brevemente con l'agitatore, girare verso il basso e mantenere la sonda a -20°C per una notte (o almeno per 2h a -80°C). Questo passaggio rimuove le tracce di ammine che potrebbero interferire con la reazione di etichettatura.
- Centrifugare a 14.000 rpm per 30min a 4°C per raccogliere la sonda (Fig. 17b).
- Rimuovere il surnatante pipettando 50µl, rimescolare brevemente con l'agitatore e asciugare per 5 minuti
- Aggiungere 100ml di soluzione DS20 nella provetta della sonda e mescolare con l'agitatore per eliminare eventuali bolle
- Incubare a 37°C per 1h o più in agitazione e buio (Fig. 17c)
- Denaturare la sonda a 95°C per 5 minuti al buio ed in agitazione (Fig. 17d), quindi trasferire immediatamente sul ghiaccio per 10 minuti
- Le sonde possono essere utilizzate immediatamente o conservare le sonde a -20°C.

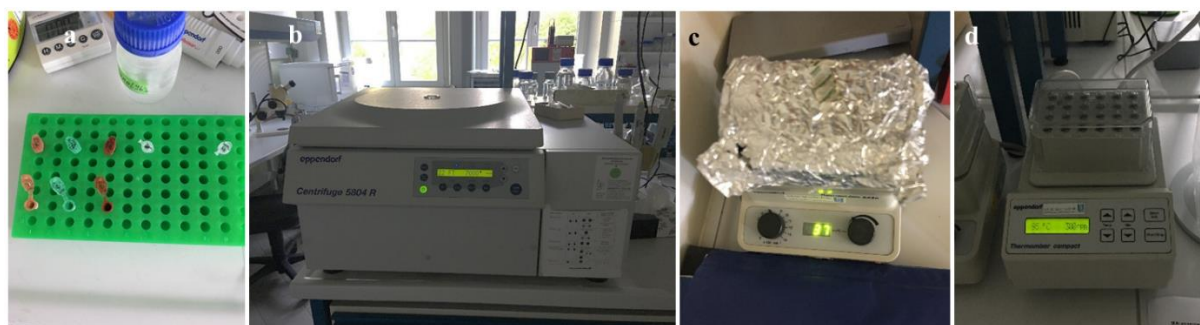


Fig. 17a-d. Procedura per la precipitazione dei prodotti nick (NP). (a) prodotti utilizzati per la nick traslation: sonde NP, salmon sperm DNA solution, buffer acetato di sodio (NaOAc) 3M ed etanolo al 96% (EthOH); (b) impostazione della centrifuga a 14000 rpm a 4°C; (c) incubazione a 37°C per 1h nel termomiscelatore; (d) denaturazione della sonde nel termomiscelatore.

2.5.2.2. Preparazione dei cromosomi per la FISH: Pretrattamento dei vetrini

La preparazione nelle piante di piastre cromosomiche in metafase è un passaggio cruciale per ottenere risultati soddisfacenti nelle ricerche citogenetiche molecolari, ed ancor oggi rimane una sfida per alcune specie. La maggior parte delle moderne tecniche citogenetiche molecolari come FISH, GISH e Tyramide-FISH richiedono cromosomi ben sparsi e morfologicamente intatti. Numerose lavori sono stati dedicati a chiarire la dinamica di diffusione dei cromosomi per migliorare i preparati cromosomici umani (Claussen 1980, Rønne 1990, Spurberck et al. 1996, Deng et al. 2003, Moralli et al. 2011), mentre studi equivalenti mancano in gran parte per le piante (Kirov et al. 2014). Le difficoltà nell'ottenere una preparazione cromosomica ben distesa sono dovute alla presenza della parete cellulare. I cromosomi e i nuclei dovrebbero essere ben separati e liberi di citoplasma e detriti. Il segnale non specifico si deposita sul citoplasma e sui detriti cellulari e il citoplasma può mascherare i cromosomi e ostacolare l'accesso della sonda e dei reagenti di rilevazione (Schwarzacher and Leitch 1994). Inoltre, poiché vi è un'alta diversità di specie che presentano cromosomi piccoli o grandi, un numero basso o alto di cromosomi e diversi composti nel loro citoplasma, vengono condotte numerose sperimentazioni prima di mettere a punto un buon metodo di preparazione dei cromosomi.

Esistono tre metodi principali per rendere idonei i preparati cromosomici per l'ibridazione in situ: "squashing" o compressione (Belling 1921, Schwarzacher et al. 1980, Schwarzacher and Leitch 1994), "air dry/spreading" o diffusione (Fukui and Iijima 1991, Pijnacker and Ferwerda 1984) e "dropping" o caduta (Ambros et al. 1986, Ananthawat-Jonsson 2003, Andras et al. 1999, Geber and Schweizer 1988, Kato et al. 2004, Kato et al. 2006, Mouras et al. 1978, Mouras and Saul 1987, Murata 1983). Per decenni la procedura più comunemente utilizzata per il conteggio dei cromosomi nella citogenetica delle piante è stata quella della compressione, metodo ancor oggi valido. Nel metodo di schiacciamento, i cromosomi si diffondono schiacciando il materiale tra il vetrino e il coprioggetti in acido acetico al 45%, congelando il materiale sul vetrino e quindi rimuovendo il coprioggetti (Schwarzacher and Leitch 1994). La tecnica dell'essiccazione/diffusione all'aria prevede la preparazione di una sospensione cellulare che viene realizzata direttamente sul vetrino per macerazione con la punta di un ago e sparsa lungo il vetrino (Pijnacker e Ferwerda 1984). Questo metodo è stato sviluppato anche per lo studio dei cromosomi somatici del mais (Carvalho and Saraiva 1993, Jewell and Islam-Faridi 1994). Tuttavia, è più adatto per piante con piccoli cromosomi. La tecnica per caduta o a goccia è stata sviluppata per le cellule umane più di mezzo secolo fa (Rothfels e Siminovitch 1958) ed in seguito applicata anche sui cromosomi delle piante per isolarne i protoplasti (Murata 1983). Tuttavia, poiché presentava degli svantaggi legati soprattutto alla perdita cellulare

durante l'isolamento del protoplasto, al danno del protoplasto stesso durante il trattamento ipotonico ed all'origine di poliploidia causata dalla fusione spontanea di protoplasti isolati, Kato *et al.* (2004) hanno sviluppato un nuovo metodo di caduta. Questo era basato sull'impiego di meristemi radicali digeriti enzimaticamente e sulla preparazione della sospensione cellulare in una provetta che veniva lavata consecutivamente in acqua, etanolo al 100% e acido acetico / etanolo (9:1), e fatto cadere "a goccia" su vetrini posizionati in una scatola foderata con carta bagnata ed infine asciugato lentamente. Il metodo è stato usato con successo per la FISH su metafasi mitotiche e cromosomi di mais in pachitene (Kato *et al.* 2004, Kato *et al.* 2006, Danilova and Birchler 2008) e su cromosomi di soia in metafase mitotica (Gill *et al.* 2009, Findley *et al.* 2010). Il metodo per caduta presenta vantaggi rispetto al metodo di schiacciamento in quanto i preparati sono di spessore e densità uniformi con metafasi non sovrapposte ed, inoltre, è possibile realizzare più vetrini dallo stesso lotto di sospensione con una qualità molto simile (Kirov *et al.* 2014). I cromosomi hanno maggiori probabilità di diffondersi liberi dal citoplasma e sono spesso meno distorti rispetto ai preparati schiacciati (Schwarzacher and Leitch 1994). Tuttavia, lo svantaggio del metodo di caduta è che è richiesta una notevole quantità di materiale, comprese molte cellule in divisione (Komuro *et al.* 2013). Nella maggior parte delle specie non è possibile effettuare una sospensione per caduta da, ad esempio, una singola punta della radice e le specie con grandi cromosomi o molti cromosomi sono difficili da diffondere solo per caduta (Schwarzacher and Leitch 1994).

Nonostante i numerosi protocolli disponibili per la preparazione dei cromosomi delle piante, non è stato sviluppato alcun metodo "standard" applicabile per tutte le piante. Pertanto, studiando in dettaglio tutte le fasi della preparazione dei vetrini per ottenere piastre metafasiche ben distese e prive di parete cellulare e citoplasma, è stato messo a punto il protocollo "Squashing method" per la FISH su apici radicali e caulinari di popolazioni di fanerogame marine mediterranee. La tecnica è stata applicata per localizzare le sequenze conservate organizzate come unità ripetitive in tandem dei geni ribosomiali (rDNA) e le sequenze altamente ripetute di DNA telomerico.

❖ **Pretrattamento con idrossichinolina**

Applicare una fase di pretrattamento adeguata è importante per arrestare la mitosi in metafase. Solitamente è possibile utilizzare uno dei tre pretrattamenti seguenti: 8-idrossichinolina, colchicina, o *a*-bromonftalene. La risposta ai reagenti per l'accumulo di metafasi è diversa da specie a specie e deve essere stabilita mediante prove ed errori a diversi tempi e temperature. Per ottenere risultati ottimali, si consiglia di fissare il materiale dopo diversi periodi di

trattamento, sperimentare diversi reagenti e controllare l'indice mitotico effettuando preparazioni cromosomiche. In Tabella 16a-c sono riportate le diverse prove di pretrattamento con idrossichinolina effettuate a diversi tempi e temperature per ciascuna specie studiata. Per aumentare ulteriormente l'indice della metafase, si può tentare la sincronizzazione delle cellule in divisione sottoponendo piantine o piante a un periodo di basse temperature (generalmente 24-48 ore a 4°C). Un trattamento troppo a lungo provoca una sovracondensazione dei cromosomi in metafase, che non sarebbe auspicabile per il conteggio dei cromosomi, ma non per l'ibridazione in situ dove si desidera una risoluzione spaziale lungo i cromosomi. Il materiale può essere conservato per diverse settimane prima della digestione degli enzimi.

Prima di iniziare il pretrattamento per arrestare le mitosi in metafase:

1. *Impostare la camera umida a 37°C*
2. *Preparare i prodotti:*
 - *2mM di 8-idrossichinolina (8-HDQ): Sciogliere a 60°C per 6h 0.29g di 8-HDQ (252565 Sigma-Aldrich, ACS reagent 99%) in 100ml ddH₂O e conservare a 18-20°C*
 - *Soluzione Carnoy 3:1 (etanolo assoluto: acido acetico) conservato a 18-20°C*
1. Isolare ~10 apici caulinari e/o apici radicali di ~1-2cm inserendoli in pozzetti chiusi ed inserirli tra due piastre Petri. Se si utilizzano apici radicali, determinare quale lunghezza della radice offre la massima attività mitotica in relazione al materiale.
2. Incubare gli apici in 2ml di 8-HDQ (2mM) a 37°C o su ghiaccio per circa 60-90 minuti. In base al materiale utilizzato, testare tempi e temperatura per determinare quale pretrattamento è adatto.
3. Fissare in etanolo assoluto fresco: acido acetico (3:1) per almeno 24/48 h. Se possibile, limitare la fissazione a qualche giorno. Se le radici sono troppo fresche è difficile sezionarle facilmente perché diventano fragili mentre se sono troppo vecchie diventano fragili. Circa 1 settimana è l'ideale, a seconda della specie.

Tabella 16a-c. Diverse prove di pretrattamento con idrossichinolina effettuate a diversi tempi e temperature per ciascuna specie studiata: (a) *Cymodocea nodosa*; (b) *Posidonia oceanica*; (c) *Zostera noltei*.

Taxon	Luogo e data di raccolta	Tipologia di trattamento	Data e inizio trattamento (°C)	Tempo trattamento	Numero fasi mitotiche																																						
					Radice 1					Radice 2					Radice 3					Radice 4					Radice 5					Radice 6					Radice 7								
					profase	metafase	anafase	telofase	citofase	profase	metafase	anafase	telofase	citofase	profase	metafase	anafase	telofase	citofase	profase	metafase	anafase	telofase	citofase	profase	metafase	anafase	telofase	citofase	profase	metafase	anafase	telofase	citofase	profase	metafase	anafase	telofase	citofase				
a	Lago di Ganzari, ME 02/07/19	8-idrossichinolina	4°C	1h	20	72	1	7	50	133	0	4	0	144	46	166	3	34	52	20	1	0	0	6	0	4	28	9	0	0	0	74	1	2	1	32	0	0	1				
				2h	42	22	0	0	14	9	4	0	0	0	14	8	2	0	22	14	0	0	10	0	0	6	0	0	28	9	0	0	0	0	0	16	8	0	0				
				3h	23	46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
				4h	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
				5h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
				6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
				7h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
				8h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
				9h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
				10h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
				11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
				b	Torrente Tono, ME 02/07/19	8-idrossichinolina	4°C	1h	20	72	1	7	50	133	0	4	0	144	46	166	3	34	52	20	1	0	0	6	0	4	28	9	0	0	0	74	1	2	1	32	0	0	1
2h	42	22	0					0	14	9	4	0	0	0	14	8	2	0	22	14	0	0	10	0	0	6	0	0	28	9	0	0	0	0	0	16	8	0	0				
3h	23	46	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4h	8	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
5h	0	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
6h	0	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7h	0	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
8h	0	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9h	0	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10h	0	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11h	0	0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
c	Brucoli, SR 02/08/19	8-idrossichinolina	4°C					1h	20	72	1	7	50	133	0	4	0	144	46	166	3	34	52	20	1	0	0	6	0	4	28	9	0	0	0	74	1	2	1	32	0	0	1
				2h	42	22	0	0	14	9	4	0	0	0	14	8	2	0	22	14	0	0	10	0	0	6	0	0	28	9	0	0	0	0	0	16	8	0	0				
				3h	23	46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
				4h	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
				5h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				7h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				8h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				9h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				10h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				11h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

❖ **Pretrattamento dei vetrini con pepsina e fissazione**

La fase di digestione dell'enzima deve essere attentamente adattata al materiale utilizzato, modificando il tempo di digestione, la concentrazione dell'enzima e talvolta il rapporto tra cellulasi e pectinasi. Idealmente, le pareti cellulari dovrebbero essere indebolite, in modo che le cellule possano essere separate facilmente e che i preparati cromosomici siano puliti dal citoplasma. Nella maggior parte dei casi le cellule meristematiche saranno digerite più velocemente dei tessuti non in divisione. Utilizzando il metodo di schiacciamento, il materiale deve rimanere intatto da maneggiare, altrimenti le cellule di divisione vengono perse nel mezzo. Se il materiale è stato fissato per diverse settimane, esso diventa più duro e necessita di una digestione più lunga.

Prima di iniziare il pretrattamento:

1. *Impostare la camera umida a 37°C*
2. *Impostare il bagnomaria a 38°C (20 minuti prima del trattamento con la pepsina)*
3. *Accendere la piastra riscaldante a 37 °C per i vetrini colorati con DAPI (dopo aver catturato le immagini dei cromosomi al microscopio a fluorescenza)*
4. *Travasare con cautela una piccola quantità di azoto liquido dal serbatoio criogenico in un contenitore con manico e chiusura utilizzando sempre guanti di protezione da ustioni da freddo*
5. *Preparare i seguenti prodotti:*
 - *Buffer di Na-citrato (10mM) a pH 4.6: Sciogliere 0.7055g di Na-citrato (W302600 Sigma-Aldrich, ≥99%) e 0.4995g di acido citrico in 500ml bbH₂O, aggiustare il pH a 4.6 aggiungendo HCl o NaOH e conservare a 4°C*
 - *Miscela di enzimi Pectinasi/Cellulasi (PC) 2% in 0.01M di buffer di Na-Citrato a pH 4.6: Miscelare 1ml di Pectinasi/Cellulasi al 2%(Pectinase from *Aspergillus aculeatus*, P2611 Sigma-Aldrich aqueous solution, ≥3,800 units/mL; Cellulase from *Aspergillus niger*, powder, ≥0.3 units/mg solid) in 1ml di buffer di Na-citrato 0.01M e conservare a -20°C*
 - *Acido acetico al 45% conservato a 18-20°C*
 - *Azoto liquido o ghiaccio secco*
 - *Buffer SSC 2x a pH 7.0: Diluire 100ml di buffer SSC 20x in 900ml di bbH₂O e conservare a 4°C; Buffer SSC 20x a pH 7.0: Sciogliere 175.3g di NaCl 3M e 88.24g di Na-citrato 0.3M in 1l bbH₂O, aggiustare il pH a 7.0 aggiungendo HCl 5M*

- Soluzione di pepsina: Lavorando a concentrazione 50µg di pepsina/HCl 0.01N ml, miscelare 400µl di pepsina 10mg/ml in 80ml di HCl 0.01N (deve essere attivata mediante incubazione a bagnomaria a 38°C per 15 minuti)
 - Formaldeide 4%: Miscelare 8.6ml di formaldeide 37% in 80ml di buffer SSC 2x
 - Etanolo (EtOH) 70, 90 e 100%: Diluire 700ml e 900ml di ETHO 100% in 300ml e 100ml di ddH₂O rispettivamente per 1l di ETHO al 70% e 90%
 - 2µg/ml DAPI: Per 1ml di DAPI/Vectashield, miscelare 2µl di DAPI (DAPI™ dye solution 1mg/ml) in 1ml di Vectashield 2µg/ml (VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium, H-1000) e conservare a 2-8°C al buio
1. Lavare gli apici caulinari e/o apici radicali in 2ml di buffer di Na-citrato 10mM pH 4.6 (2x10 min)
 2. Ammorbidire in 2ml di PC incubando gli apici in camera umida a 37°C per ~3-3.30h prima della macerazione (Fig. 18a)
 3. Sciacquare in 2ml di tampone di Na-citrato 10 mM pH 4.6 (2x10 min)
 4. Sotto un microscopio da dissezione, posizionare gli apici su un vetrino pulito e rimuovere la cuffia della radice e/o le foglie esterne usando un bisturi pulito e trasferire il materiale su un altro vetrino pulito
 5. Aggiungere una goccia di acido acetico al 45%, tenere gli apici alla base con un paio di pinze affilate e tagliarli verticalmente lungo la lunghezza usando il bisturi per estrarre il contenuto meristematico attraverso lo spazio creato dalla fessura, aggiungere il coprioggetto e premere delicatamente con movimenti circolari
 6. Esaminare la preparazione al microscopio a contrasto di fase, conservare i vetrini solo se sono visibili almeno cinque buone metafasi, segnare le posizioni dei buoni schiacciamenti ed etichettare i vetrini con una matita
 7. Segnare gli angoli del coprioggetto con la matita prima di rimuoverlo congelando i vetrini in ghiaccio secco o azoto liquido e sfogliandoli con una lama di rasoio. Quando si utilizza azoto liquido, immergere il vetrino lentamente nel contenitore criogenico tenendolo con una pinza lunga e indossando guanti protettivi e protezioni per gli occhi finché l'azoto bolle, quindi rimuovere rapidamente il vetrino coprioggetto prima che si riscaldi.
 8. Trattare i vetrini con la soluzione di pepsina per ~40min (massimo 1h) a bagnomaria a 37°C immergendoli in un vasetto di coplin (Fig. 18b,c)
 9. Sciacquare i vetrini in SSC 2x (2x5 minuti) in un nuovo vasetto di coplin
 10. Fissare in formaldeide al 4% per 10 minuti sempre in un vasetto
 11. Sciacquare i vetrini in SSC 2x (2x5 minuti) usando sempre un vasetto di coplin

12. Disidratare i vetrini in serie crescenti di etanolo (EtOH 70, 90, 100%), 3 minuti per ogni passaggio (cambia con nuove soluzioni dopo averle utilizzate per 5 volte)
13. Lasciare asciugare i vetrini per 30 minuti in una scatola porta vetrini aperta, quindi chiudere e conservare a -20° in attesa di continuare con l'ibridazione delle sonde, altrimenti colorare i vetrini con $10\mu\text{l}$ di DAPI ($2\mu\text{g/ml}$), osservarli al microscopio a fluorescenza e catturare le immagini dei cromosomi per effettuare il conteggio.



Fig. 18a-c. Pretrattamento dei vetrini. (a) Incubazione apici radicali e caulinari in camera umida a 37°C ; (b, c) Trattamento dei vetrini con la soluzione di pepsina a bagnomaria a 37°C .

2.5.2.3. Ibridazione delle sonde

Prima di iniziare:

1. Assicurarsi di avere i vetrini pronti per l'ibridazione (pretrattamento dei vetrini con pepsina e fissazione). Nel caso che i vetrini siano stati colorati con DAPI/Vectashield ($2\mu\text{g/ml}$), mettere i vetrini sulla piastra riscaldante a 37°C per 10 minuti (Fig. 19a), rimuovere con cura il vetrino coprioggetto con una pinza sterile quindi sciacquare in SSC 2x (2x5 minuti) prima dell'ibridazione usando i vasetti di coplin.
2. Scegliere se lavorare con sonde con etichette dirette o indirette e calcolare la quantità appropriata di sonde in base al numero di vetrini ($10\mu\text{l}$ di ciascuna sonda su ogni vetrino)
5. Accendere un termomiscelatore a 37°C e un altro a 95°C
3. Impostare la camera umida a 37°C
4. Impostare la piastra riscaldante a 80°C
5. Riporre su ghiaccio ed al buio i prodotti della Nick translation:

- Sonde marcate con apteni (**Biotina** e **Digossigenina**) se si lavora per l'etichettatura indiretta
- Sonde marcate con coloranti ammino-reattivi (**Cy3**, **TXR** e **Alexa 488**) se si lavora per l'etichettatura diretta

1. Incubare le sonde al buio a 37°C per 10 minuti nel primo agitatore termico (Fig. 17c)
2. Denaturare la sonda al buio a 95°C per 5 minuti nel secondo agitatore termico, quindi trasferire immediatamente su ghiaccio per 10 minuti (Fig. 17d)
3. Centrifugare le sonde con un agitatore manuale per 30 secondi e prelevare 10µl di ciascuna sonda da applicare su ciascun vetrino. Per ogni vetrino combinato a 3 coloranti, prendere 10µl di ciascuna sonda etichettata, mescolare e posizionare sul vetrino. Quindi, per 10 vetrini combinati con 3 coloranti (es. Cy3, TXR e a488), prelevare 100µl di ciascuna sonda etichettata, pipettare su un pezzetto di parafilm o in una eppendorf miscelando le sonde (Fig. 19b). Pipettare 28µl su ciascun vetrino, eliminare eventuali bolle con un ago sterile, applicare il coprioggetto 22x22 e sigillare con colla a gel.
4. Incubare i vetrini in una piastra riscaldante a 80°C per 3min al buio e trasferirli in una scatola porta vetrini ricoperta con carta assorbente bagnata con ddH₂O (Fig. 19c)
5. Richiudere la scatola con i vetrini e incubare nella camera umida a 37°C per tutta la notte (Fig. 19b).

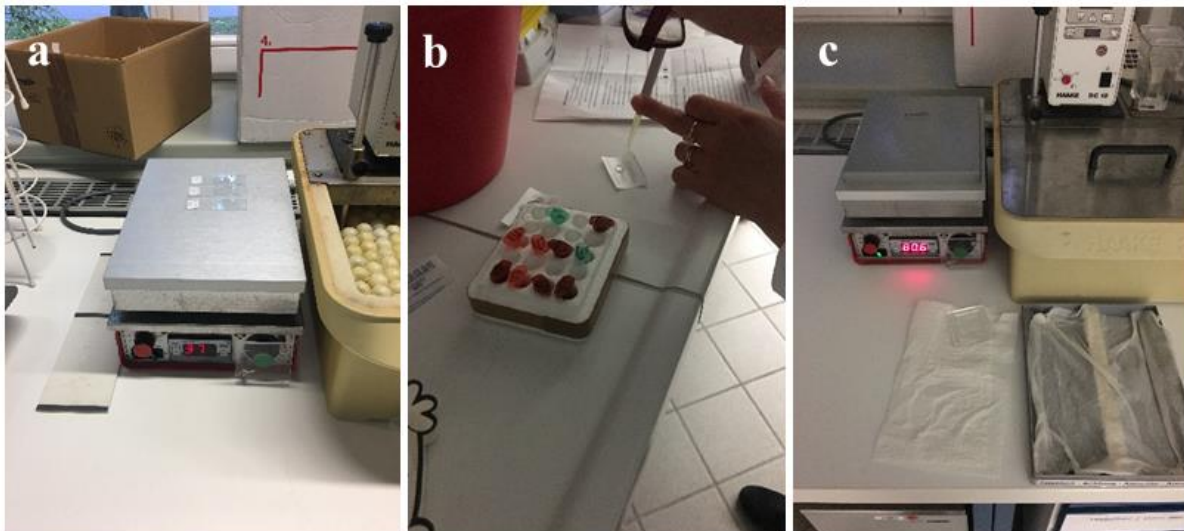


Fig. 19a-c. Ibridazione delle sonde. (a) Piastra impostata a 37°C per i vetrini colorati con DAPI; (b) miscelamento in un pezzetto di parafilm delle diverse sonde da applicare su ciascun vetrino; (c) incubazione dei vetrini con le sonde in piastra a 80°C e trasferimento nel box porta vetrini ricoperto con carta assorbente bagnata con acqua distillata.

2.5.2.4. Trattamento di Post-Ibridazione e rilevamento del segnale

Il lavaggio post-ibridazione e il rilevamento del segnale sono stati effettuati secondo Lysak et al. (2006). Le sonde di DNA telomerico di tipo umano regioni telomeriche di tipo umano marcate indirettamente con Digossigenina (Dig Hutelo 14S) e Biotina (Dig Hutelo 14S), sono state rilevate mediante la tecnica di immulabeling (immunomarcatura o immunofluorescenza) usando anticorpi digossigenina (Mouse-anti-Digoxin) e biotina (Goat-anti-avidin-Biotin) coniugati con il colorante fluorescente verde Goat-anti-mouse-Alexa 488 e rosso Avidin-Texas Red™, rispettivamente.

Prima di iniziare il trattamento post-ibridazione ed il rilevamento del segnale:

1. *Impostare il bagnomaria a 42°C*
2. *Impostare la camera umida a 37°C se si lavora solo con etichette indirette*
3. *Preparare le soluzioni utilizzate per il trattamento.*
 - ❖ *Se si lavora con le sonde dirette (Cy3, TXR e Alexa 488):*
 - *Soluzioni SF50 I, II, III : Lavorando a concentrazione SSC formammide 50% /2x pH 7.5, miscelare 200ml di formammide 100% con 40ml di SSC 20x in 160ml di ddH₂O e aggiustare il pH a 7.5 con HCl 5M*
 - *Buffer SSC 2x pH 7.0 = Diluire 100ml di buffer SSC 20x in 900ml di ddH₂O e conservare a 4°C*
 - *Buffer SSC 20x a pH 7.0: Sciogliere 175.3g di NaCl 3M e 88.24g di Na-citrato 0.3M in 1l ddH₂O, aggiustare il pH a 7.0 aggiungendo HCl 5M*
 - *Soluzione 4T = Lavorando a concentrazione SSC 4x/Tween-20 0.05%, miscelare 0.5ml Tween-20 in 200ml SSC 20x e portare il volume finale a 1l con ddH₂O*
 - ❖ *Se si lavora con le sonde indirette (sonde Bio e Dig) preparare anche:*
 - *Soluzione TNT = Lavorando a concentrazione TN 10x/Tween-20 0.05%, miscelare 5ml di Tween-20 al 10% in 100ml TN 10x portando il volume finale a 1l con ddH₂O*
 - *TN 10x = Lavorando a concentrazione 1M Tris.HCl/1.5M NaCl pH 7.5, sciogliere 121.4g di Tris.HCl e 87.4g NaCl in 800ml ddH₂O , aggiustare il pH a 7.5 con HCl 6M e portare il volume finale a 1l aggiungendo ddH₂O;*
 - *10% Tween-20= Diluire 10ml Tween-20 100% in 90ml ddH₂O*
 - *Buffer Bloccante (BB) = Lavorando a concentrazione BSA 5% / Tween-20 0.1% /SSC 4x, ... e riporre in una sacca di nylon a -20°C*

- Buffer TNB = Lavorando a concentrazione TN 10x/reagente bloccante Boehringer 0.5%, sciogliere 0.5g di reagente bloccante Boehringer in 100ml di soluzione TN 10x ed aggiungere 100µm di thimerosal per prevenire la crescita batterica. Incubare la miscela per 1h a 60°C per sciogliere il reagente bloccante. Dividere la soluzione in porzioni da 10ml e conservare a -20°C in una sacca di nylon
4. Preriscaldare le soluzioni SF50 (3 vasetti di Coplin), 4T ed il buffer SSC 2x e soluzioni TNT (per le sonda con etichette indirette) nel bagnomaria a 42°C
 5. Riporre su ghiaccio i prodotti per il rilevamento del segnale nella scatola delle etichette indirette a -4°C (Fig. 20a)
 - Anticorpo primario diretto contro l'antigene (Avidin-Texas **Red** e/o Mouse-anti-**Digoxin**)
 - Anticorpo secondario coniugato con la biotina e/o digossigenina (Goat-anti-avidin-**Bio** e/o Goat-anti-mouse-**Alexa 488**)
 1. Prendere i vetrini dalla camera umida a 37°C e, utilizzando una pinza, rimuovere delicatamente la colla dal coprioggetto
 2. Sciacquare i vetrini in SSC 2x per 5 minuti per rimuovere i coprioggetto
 3. Sciacquare i vetrini in SF50 per 3x5 min nel bagnomaria a 42°C (Fig. 20b)
 4. Sciacquare i vetrini in SSC 2x per 2x5 min a 42°C (Fig. 20b)
 5. Sciacquare i vetrini in 4T per 5 min a 42°C (Fig. IMG_20b)
 - ❖ Per le sonde etichettate direttamente (**Cy3**, **Alexa 488**, **TxR**) sciacquare i vetrini in 2x SSC per 5 minuti e proseguire dal passaggio 15
 - ❖ Per le sonde con etichetta indiretta (**Bio**, **Dig**), continuare dal passaggio 6 per il rilevamento del segnale mediante immunolabeling
 6. Aggiungere 50µl di BB per vetrino (Fig. 20c), coprire con parafilm (Fig. 20d) e incubare per 30 minuti a 37°C in camera umida (Fig. 18a). Calcola la quantità appropriata di sonde marcate e anticorpi coniugati in base al numero di vetrini considerando sempre 50µl di ogni sonda su ciascun vetrino.
Per 10 vetrini → 500µl BB
 7. Rimuovere il vetrino coprioggetto, sciacquare il vetrino in 4T per 5 min a 42°C (Fig. 20b)
 - Per le sonde con etichetta **Bio**, continuare dal passaggio 8
 - Per le sonde con etichetta **Dig**, proseguire dal passaggio 11
 8. Aggiungere 50µl di Avidin-Texas **Red** (1: 1000; 0.05µl in 50µl di BB) (Fig. 20e). Coprire con parafilm e incubare a 37°C in camera umida per 30 min (Fig. 20d, 18a).

Per 10 vetrini → 500µl BB

0.05µl: 50µl BB = x: 500µl → 0.5µl Avidin-Texas **Red** in 500µl BB → 50µl/vetrino

9. Sciacquare i vetrini in 4T per 5 min a 42°C (Fig. 20b)
10. Sciacquare i vetrini in TNT per 5 min a 42°C (Fig. 20b)

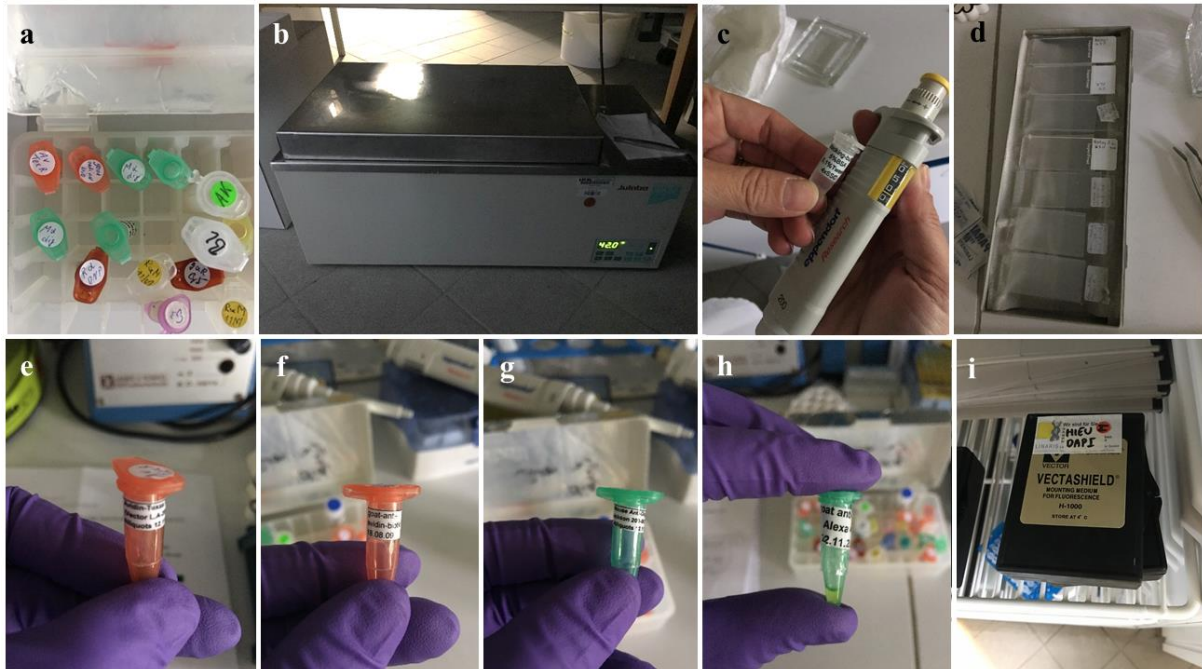


Fig. 20a-i. Trattamento post-ibridazione e rilevamento del segnale. (a) prodotti per il trattamento post-ibridazione; (b) risciacquo dei vetrini nel bagnomaria a 42°C; (c) aggiunta del buffer bloccante (BB) e (d) copertura dei vetrini con parafilm; (e) Avidin-Texas Red; (f) Goat-anti-avidin-Biotin; (g) Mouse-anti-Digoxin; (h) Goat-anti-mouse-Alexa 488; (i) DAPI/Vectashld (1-2µg/ml).

11. Aggiungere 50µl di Goat-anti-avidin-**Bio**tin (1: 200; 0.25µl in 50µl di TNB) (Fig. 20f) e/o Mouse-anti-**Dig**oxin (1: 250; 0.2µl in 50µl di TNB) (Fig. 20g). Coprire con parafilm e incubare a 37°C in camera umida per 30 min (Fig. 20d, 18a).

Per i vetrini contenenti più di 1 colorante, diluire tutti i tipi di coloranti in totale 50µl di TNB.

0.25µl: 50µl TNB = x: 500µl → 2.5µl Goat-anti-avidin-**Bio**tin in 500µl TNB → 50µl/vetrino

0.2µl: 50µl TNB = x: 500µl → 2µl Mouse-anti-**Dig**oxin in 500µl TNB → 50µl/vetrino

12. Sciacquare i vetrini in TNT per 3x5 minuti a 42°C (Fig. 20b)
13. Aggiungere 50µl di Avidin-Texas **Red** (1: 1000; 0.05µl in 50µl TNB) (Fig. 20e) e/o Goat-anti-mouse-**Alexa 488** (1: 200; 0.25µl in 50µl TNB) (Fig. 20h). Coprire con parafilm e incubare a 37°C in camera umida per 30 min (Fig. 20d, 18a). Per i vetrini contenenti più di 1 colorante, diluire tutti i tipi di coloranti in totale 50µl di TNB.

$0.05\mu\text{l}: 50\mu\text{l TNB} = x: 500\mu\text{l} \rightarrow 0.5\mu\text{l Avidin-Texas Red in } 500\mu\text{l TNB} \rightarrow 50\mu\text{l/vestrino}$

$0.5\mu\text{l}: 100\mu\text{l TNB} = x: 500\mu\text{l} \rightarrow 2.5\mu\text{l Goat-anti-mouse-Alexa 488 in } 500\mu\text{l TNB} \rightarrow 50\mu\text{l/vestrino}$

14. Sciacquare i vetrini in TNT per 3x5 min a 42°C (Fig. 20b)
15. Disidratazione in serie di 70-90-96% di EthOH (2 minuti ogni passaggio al buio)
16. Asciugare all'aria al buio per 1~2 h
17. Colorare con 15µl (cromosoma da schiacciamento) o 10µl (nuclei ordinati) di 1-2µg/ml DAPI/Vecta (Fig. 20i) per la conta dei cromosomi al microscopio a fluorescenza.

2.5.3. Microscopia ad alta risoluzione

In passato, la microscopia ottica per il DNA e le proteine specificamente marcate con fluorocromi rispettivamente mediante FISH e immunostaining, così come l'imaging di cellule vive basato su proteine ricombinanti fluorescenti, ha aumentato significativamente le nostre conoscenze sull'organizzazione e la funzione delle cellule ed essa rappresenta un vantaggio importante rispetto alla microscopia elettronica (Schubert 2017). Tuttavia, mentre la microscopia elettronica consente di identificare le sottostrutture cellulari fino a una risoluzione di ~1 nm, la risoluzione della microscopia a fluorescenza è limitata a ~200 nm a causa del limite di diffrazione della luce (Pawley, 1995). Pertanto, questa risoluzione limitata non ha permesso di identificare singole molecole e strutture con la risoluzione ottenuta mediante microscopia elettronica. Per superare questa restrizione e colmare il gap di risoluzione tra microscopia ottica ed elettronica, sono state sviluppate le cosiddette tecniche di super risoluzione (anche denominate nanoscopia ottica) come Structured Illumination Microscopy (SIM), Photoactivated Localization Microscopy (PALM), Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) e Stimulated Emission Depletion (STED) che consentono di analizzare strutture e molecole oltre il limite di diffrazione della luce (Schubert 2017). Questi metodi di "subdiffrazione" possono essere suddivisi in due diversi principi: (i) localizzazione nel campione dei singoli fluorocromi con precisione di subdiffrazione (PALM, STORM) e (ii) strutturazione della luce di illuminazione per raccogliere alte frequenze spaziali nell'immagine che contengono informazioni ad alta risoluzione (SIM, STED) (Rego et al., 2012).

Di recente si è assistito ad una crescente applicazione di queste tecniche nella biologia cellulare (Rouquette et al., 2010; Han et al., 2013; Fornasiero e Opazo, 2015) su campioni fissati e in vivo sia di procarioti che di eucarioti che ha permesso di scoprire nuove strutture e di studiare le interazioni tra diverse cellule, organelli cellulari e nuclei. Tali esperimenti sono stati la base per quantificare e colocalizzare polisaccaridi, proteine e DNA e si sono già applicati con

successo per seguire lo sviluppo di componenti citoscheletrici, proteine di membrana e strutture di infezione fungina (Bell e Oparka, 2011, 2015; Bozkurt et al. 2014; Dong et al., 2015; Durst et al., 2014; Kleine-Vehn et al.2011; Komis et al., 2014; Komis et al., 2015a; Liesche et al., 2013; Hosy et al., 2015).

L'utilizzo del microscopio Elyra PS.1 (combinazione di SIM e PALM) consente la duplicazione della tradizionale risoluzione al microscopio a fluorescenza fino a circa 100 nm applicando la cosiddetta Structured Illumination Microscopy (SIM). Inoltre, con PALM (Photoactivated Localization Microscopy) è possibile realizzare una risoluzione aggiuntiva fino a 20 nm lateralmente e fino a 100 nm assialmente (Schubert 2017). La combinazione di SIM e PALM, fattibile con sistemi come Elyra PS.1 di Zeiss, consente di acquisire successivamente pile di immagini ('stack') con entrambe le tecniche. Quindi, la combinazione di queste consente di contare e localizzare singole molecole all'interno delle strutture identificate dalla SIM tramite misurazioni dell'intensità dei pixel (Antosz et al., 2017; Dürr et al., 2014; Schubert, 2014; Schubert e Weisshart, 2015; Weisshart et al., 2016). Pertanto, applicando queste tecniche è possibile analizzare più strutture etichettate a una risoluzione molto elevata, rilevando le strutture della cromatina in modo differenziato nei tessuti fissati e in vivo.

2.5.3.1. Super-resolution imaging

Per analizzare l'ultrastruttura e la disposizione spaziale dei segnali fluorescenti e della cromatina a una risoluzione laterale di ~ 120 nm (super risoluzione, ottenuta con un laser a 488 nm), è stata applicata una tecnica di microscopia a illuminazione strutturata 3D (3D-SIM) utilizzando il Super-Resolution Microscope System Elyra PS.1 e il software d'immagini ZENblack 2.1 SP3 (Carl Zeiss GmbH) con l'obiettivo 63x / 1.4 Oil Plan-Apochromat ed un'illuminazione X-Cite (LED). Pertanto, applicando queste tecniche è stato possibile analizzare più strutture etichettate a una risoluzione molto elevata, rilevando le strutture della cromatina in modo differenziato nei cromosomi fissati.

La 'super-resolution imaging' è stata eseguita su vetrini di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson con nuclei in metafase mitotica trattati per FISH. La tecnica è stata applicata per localizzare le sequenze conservate organizzate come unità ripetitive in tandem dei geni ribosomiali (rDNA) e le sequenze altamente ripetute di DNA telomerico. Le variazioni riguardanti il numero e le distribuzioni cromosomiche dei loci 45S (18S e 26S) rDNA e la locazione delle regioni telomeriche sono importanti marcatori informativi per discriminare rispettivamente i cariotipi delle specie e per il conteggio dei cromosomi in metafase.

Dopo aver selezionato le piastre in metafase con cromosomi ben distesi, pile di immagini ('stack') di dati grezzi SIM sono state catturate separatamente per ciascun fluorocromo usando le linee laser 561, 488 e 405 nm per l'eccitazione (Weisshart et al. 2016). L'acquisizione dello stack di immagini fino a 30 sezioni per ciascuna metafase a una distanza di ~100 nm alla massima risoluzione (~1024 × 1024 pixel, 80 µm × 80 µm FOV), ha richiesto circa 4-5 minuti per ogni esperimento sequenziale a 3 colori. Una volta salvate le immagini di dati grezzi della SIM, sono state combinate tutte le sezioni di ciascuna immagine di nuclei in metafase in un'unica immagine SIM in 3D (MIP, 'maximum intensity projection') tramite Zeiss Imaging Software ZEN 2.6 (blue edition) / ZEN 2.3 SP1 (black edition) (Carl Zeiss Microscopy GmbH). La procedura prevede i seguenti passaggi:

- ❖ *Montaggio del campione e selezione dei nuclei.* Selezionare i nuclei favorevoli utilizzando l'obiettivo 63x / 1.4 Oil Plan-Apochromat, l'illuminazione X-Cite (LED), gli oculari e applicare lo strumento ZEN "Trova" (Fig. 21a)
- ❖ *Acquisizione di dati grezzi per SIM in 3D.* Utilizzando lo stesso obiettivo, acquisire l'immagine SIM eccitando con i laser 642 nm e 488 nm (griglia 51 µm per 642 nm e griglia 34 µm per eccitazioni 488 nm; 5 rotazioni). A partire dalla lunghezza d'onda più lunga minimizza lo sbiancamento.
 1. Passare dallo strumento "Individua" allo strumento "Acquisizione" e selezionare lo strumento "Imaging Setup" di "SIM" per acquisire pile di immagini di dati grezzi SIM (Fig. 21b).

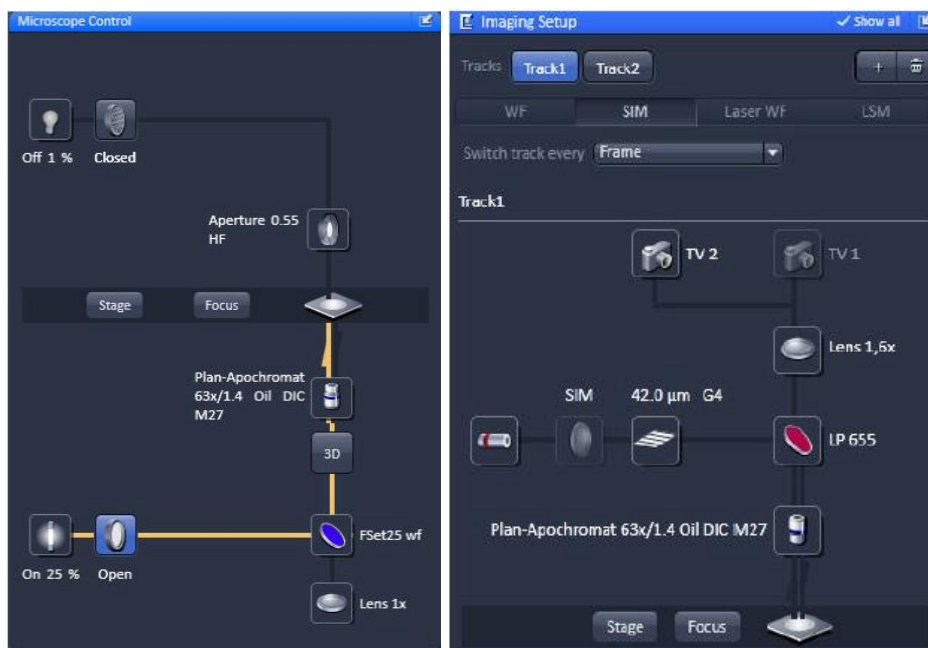


Fig. 21a-b. (a) Impostazioni per il rilevamento oculare della luce a fluorescenza riflessa (linea gialla); (b) configurazione di un esperimento a due tracce con la traccia 1 utilizzando il laser 642 nm.

- Nello strumento "Canali" definire un esperimento multitraccia usando il laser a 642 nm per il primo canale e il laser a 488 nm per il secondo canale. Regolare la potenza del laser a circa il 10%, il guadagno della videocamera (ISO) a 30 V e il tempo di esposizione della videocamera Andor iXon885 a 100 ms per visualizzare il campione. Nella "Modalità di acquisizione" selezionare la dimensione della cornice appropriata e impostare il numero di rotazioni su 5. Regolare ulteriormente la dimensione della cornice ritagliandola se necessario (Fig. 22a).
- Concentrarsi sul campione e definire il focus come porzione centrale.
- Utilizzando una delle linee laser, definire la pila nello strumento "Z-stack" usando il metodo "Centro". Si consiglia di impostare il numero di sezione su un numero non uniforme per avere successivamente il piano focale come sezione centrale (Fig. 22b).
- Acquisire le pile di immagini usando prima la linea 642 nm seguita dalla linea 488 nm, per ridurre il minimo il bleaching (Fig. 22c).
- Salvare lo stack di immagini di dati grezzi della SIM.

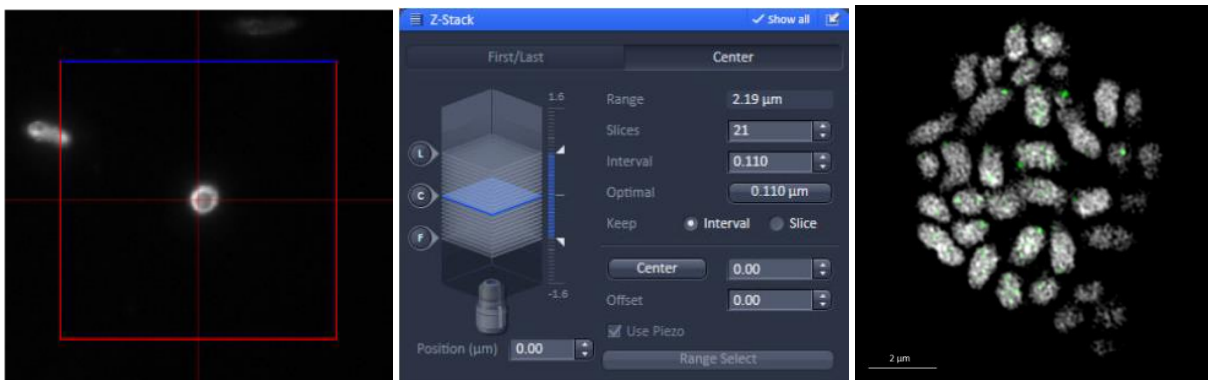


Fig. 22a-b. (a) Esempio di ritaglio centrale della cornice; (b) strumento di Zen per l'impostazione del numero di stack; (c) immagine dei dati grezzi SIM. Viene mostrato uno dei 21 segmenti SIM (5 fasi a 5 rotazioni) dallo stack z del campione di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson proveniente da Ganzirri (Cnodosa-Ganzirri_Slide2_telomere-Alexa488-4_SIM_bis).

❖ *Elaborazione dei dati SIM.* Utilizzando software Zeiss Imaging ZEN 2.6 (blue edition) / ZEN 2.3 SP1 (black edition) applicare lo strumento 'maximum intensity projection' (MIP) per combinare tutte le sezioni di ciascuna immagine di nuclei in metafase in un'unica immagine SIM in 3D.

- Caricare le pile di immagini SIM nello strumento di elaborazione "SIM".
- Selezionare l'elaborazione "Manuale" ed attivare il menù "Filtro rumore automatico", "Taglio di base" e "PSF teorico", lasciando i parametri sui valori predefiniti: 'Ponderazione di frequenza SE' a 1.0 e 'Sezionamento' a 100/83/83. Come immagini in

uscita selezionare 'SR-SIM + Wide-field' per confrontare il miglioramento della risoluzione. Altrimenti basta selezionare l'immagine SIM.

3. Elaborare lo stack per SIM attivando il pulsante "Applica". Regola luminosità e contrasto per ciascun canale e salva. La luminosità e il contrasto possono essere regolati meglio impostando i limiti dal bordo inferiore e superiore dell'istogramma.
4. Applica il comando "Proiezione della massima intensità" per ciascun stack di immagini SIM per canale e salva.

2.6. QUANTIFICAZIONE DEL DNA NUCLEARE

A partire dagli anni '50, sono state utilizzate numerose tecniche per la quantificazione del DNA nucleare. Il lavoro di Swift (1950) sulla costanza del DNA in nuclei di *Tradescantia* e *Zea mais*, ha dato inizio alle moderne ricerche densitometriche sul quantitativo di DNA nucleare nelle piante. Negli anni '80 invece, con Galbraith, si assiste alla nascita dell'utilizzo della fluorimetria per stime di *genome size* (Bennett e Leitch 2011). Attualmente, i metodi che permettono di eseguire accurate misure di *genome size* e contemporaneamente di stabilire il livello di ploidia dei nuclei, sono due (Vilhar et al. 2001): la densitometria e la fluorimetria. Tali metodi prevedono l'uso di tecniche quali la microdensitometria (Feulgen microdensitometry, Fe), la citometria d'immagine (Image cytometry, IC) e la citometria di flusso (Flow cytometry, FC). Greilhuber (2008) afferma che le tecniche offrono risultati comparabili e che la scelta dell'una o dell'altra dipende dalla necessità di soddisfare esigenze di varia natura: eseguire indagini routinarie o occasionali, disponibilità di materiale fresco, disponibilità economica, etc. Per il nostro studio, sono state utilizzate entrambe le tecniche. La citometria d'immagine è stata utilizzata per associare ai dati di *genome size* anche informazioni di citogenetica classica, e la tecnica della citometria di flusso, per confrontare e confermare i dati ottenuti con i precedenti metodi. Riportiamo di seguito i principi base di entrambe le tecniche.

La citometria di flusso (FC), mediante l'utilizzo di un citofluorimetro, permette di stimare il quantitativo di DNA nucleare dalla quantità di luce emessa dalle molecole di DNA precedentemente trattate con specifici fluorocromi, quali il DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo), il propidio ioduro (PI) o il bromuro d'etidio (EB) (Vilhar et al. 2001; Doležel et al. 2007; Bennett e Leitch 2011). La semplicità di preparazione dei campioni e il trattamento di un elevato numero di campioni in poco tempo (la FC permette di misurare fino a 100-1000 particelle al secondo) spiegano il perché tale tecnica si stia ampiamente diffondendo in ambito scientifico. In passato era una tecnica poco utilizzata nella ricerca in campo botanico, oggi invece l'uso della FC si sta incrementando e sono in aumento anche i campi d'applicazione

(Doležel et al. 2007). Sono, infatti, numerosi i lavori che fanno uso di FC per stime di DNA nucleare nelle piante (Loureiro et al. 2007). È noto, inoltre, che la maggior parte dei dati di *genome size* nelle piante sia stata stimata con la citometria di flusso e si prevede che ulteriori implementazioni del database di *genome size* saranno proprio dovute all'uso massiccio di tale tecnica (Bennett e Leitch, 2011).

I campioni sono preparati da poche decine di milligrammi di tessuto della pianta, per cui il metodo è tipicamente non distruttivo e utilizzabile per analisi di piccoli individui. Infatti, secondo il protocollo messo a punto da Galbraith (1983), che con alcune varianti, è quello ancora oggi maggiormente utilizzato, i nuclei vengono “estratti” da una piccola quantità di materiale vegetale fresco, tagliuzzandolo (chopping) con un bisturi in un buffer appropriato. Dopo la filtrazione dell'omogenato attraverso un filtro di nylon e l'aggiunta di un fluorocromo per il DNA, il campione è pronto per l'analisi al citofluorimetro. Sebbene originariamente sviluppato per essere applicato solo su materiale fresco, sembra che il protocollo di Galbraith possa essere utilizzato anche per stime del quantitativo di DNA relativo su materiale asciutto derivante da campioni d'erbario o conservato in silica gel. Un altro importante vantaggio per la stima della ploidia è che non sono necessariamente richiesti tessuti che contengono cellule in divisione. Il fatto che i nuclei sono misurati individualmente facilita l'analisi dei campioni con divisioni cellulari asincrone e l'individuazione di subpopolazioni con differenti quantitativi di DNA. Il quantitativo di DNA può essere analizzato con elevata precisione, con un coefficiente di variazione (CV) dei picchi di DNA che in genere varia dall'1 al 5% (Doležel et al. 2007). La FC dà come risultato segnali d'intensità di fluorescenza. L'interpretazione dei risultati in termini di ploidia e *genome size* richiede l'utilizzo di una specie standard, con livello di ploidia e/o quantitativo di DNA noto. In campo botanico standard animali, come gli eritrociti di pollo, non sono raccomandati (Greilhuber et al. 2007). Sebbene la citometria di flusso rappresenti un metodo efficace per stimare la ploidia e il *genome size* (Doležel et al. 2007; Bennett e Leitch 2011), i costi elevati delle apparecchiature ne limitano l'utilizzo per indagini non routinarie.

Una valida alternativa alla citometria di flusso è rappresentata dalla citometria d'immagine (Vilhar et al. 2001; Greilhuber 2008). Il metodo della densitometria permette di dedurre la quantità di DNA presente nel nucleo da misure di densità ottica su campioni opportunamente colorati mediante reazione di Feulgen. Tale relazione è possibile perché il colorante (reattivo di Schiff) si lega in maniera specifica e stechiometrica al DNA. La quantità di colorante legato è determinata dalla quantità di luce assorbita dal DNA, cioè è determinata dalla sua densità. Tuttavia, per quantificare le molecole di colorante legato al DNA non è possibile eseguire misure dirette di assorbanza (o densità ottica, dall'inglese Optical Density, OD) poiché essa

rappresenta la quantità di luce assorbita dall'oggetto, e dunque deve essere calcolata indirettamente mediante misure di trasmittanza (T). La trasmittanza, indicando la quantità di luce incidente che passa attraverso un oggetto, a sua volta, è misurata come differenza tra l'intensità della luce incidente che entra nell'oggetto e l'intensità della luce trasmessa che lascia l'oggetto.

In densitometria, le misure di trasmittanza vanno eseguite sia dentro che fuori dal nucleo, in un'area chiara del vetrino. La differenza d'intensità luminosa tra le due aree rappresenta la trasmittanza.

Densità ottica e trasmittanza sono legate dalla seguente relazione:

$$OD = \text{Log} (I_0/I) = \text{Log}(1/T) = - \text{Log} T \quad (1)$$

dove la densità ottica è il logaritmo decimale del rapporto tra luce incidente e luce trasmessa, cioè è l'inverso della trasmittanza (dove I_0 è la luce incidente e I la luce trasmessa).

Secondo la legge di Lambert-Beer l'assorbanza di luce monocromatica attraverso una soluzione è proporzionale sia alla sua concentrazione che alla sua densità. Tale legge trova applicazione anche in misure di densità ottica su nuclei colorati con Feulgen, ma, mentre l'assorbanza di una soluzione può essere ottenuta con una singola misura (ad esempio con uno spettrofotometro), la natura eterogenea del DNA nel nucleo, fa sì che la misura di un singolo punto non sia rappresentativa dell'intero nucleo. Pertanto è necessario misurare le densità dei singoli punti che coprono l'intera area nucleare, tenendo conto anche della misura di densità ottica dell'area fuori dal nucleo (misura di background). Nel caso di un'immagine digitale, la somma delle densità ottiche dei singoli punti nell'area misurata è l'IOD (*Integrated Optical Density*) del nucleo:

$$IOD_n = \sum_i OD_{ni} = \sum_i [\text{Log} (GV_{bi}/GV_{ni})]$$

dove IOD_n è l'IOD del nucleo, i rappresenta il numero di pixel nel nucleo, $\sum_i OD_{ni}$ è la somma delle OD calcolate per ciascun pixel del nucleo (da notare che l'OD è calcolata come logaritmo, quindi per il calcolo dell'IOD bisogna tener conto delle proprietà dei logaritmi), GV_{bi} è il valore di grigio del pixel i su un'immagine di sfondo (background), GV_{ni} è il valore di grigio del pixel i e \sum_i rappresenta la somma dei valori calcolati per i pixel individuali. Con questa procedura l'IOD del nucleo rappresenta la somma delle OD calcolate per ciascun pixel nel nucleo. È bene notare che il calcolo dell'IOD deve basarsi sui valori di grigio del singolo pixel e non sulla media dei valori di grigio del nucleo, perché la somma dei logaritmi dei valori di trasmissione non è uguale al logaritmo della media del valore di trasmissione moltiplicato per il numero di pixel (Vilhar e Dermastia, 2002). Tale tecnica, utilizzando sistemi d'analisi d'immagine computerizzati, permette di eseguire accurate misure di *genome size*, fornendo risultati

comparabili a quelli ottenuti con la citofluorimetria e la Feulgen microdensitometria (tradizionale tecnica densitometrica che faceva uso di un fotometro) (Vilhar e Dermastia, 2002; Vilhar et al. 2001; Greilhuber, 2008).

L'analisi d'immagine si basa sull'elaborazione delle immagini mediante le fasi di acquisizione, segmentazione, parametrizzazione e analisi dei dati (Puech e Giraud, 1999; Shinya, 1986). In un sistema d'analisi d'immagine per densitometria, il campo visivo del microscopio è catturato da una telecamera, preferibilmente con dispositivo CCD integrato, collegata per mezzo di una scheda d'acquisizione ad un computer (acquisizione). Le immagini, trasformate da una frame-grabber da analogiche a digitali, sono costituite da una matrice di pixel, ciascuno con un valore da 0 a 255 (nel caso di immagini a 8 bit in bianco e nero). Dai nuclei selezionati dall'immagine (segmentazione) si estraggono le informazioni numeriche che descrivono gli oggetti evidenziati (parametrizzazione) e durante l'analisi quantitativa vengono calcolati i parametri densitometrici, cioè il software d'analisi d'immagine converte i valori d'intensità dei pixel in valori di assorbanza (o densità ottica). Un'immagine reale di nuclei colorati può essere convertita in un'immagine in scala di grigi utilizzando luce incidente monocromatica (interponendo un filtro ad interferenza lungo il passaggio della luce) oppure analizzando solo il canale verde della telecamera. Misurando la densità ottica di un'area del vetrino priva di nuclei, si ottiene il valore d'intensità della luce incidente così da poter calcolare, insieme ai valori assunti da ciascun pixel esternamente al nucleo, la densità ottica integrata di ogni nucleo secondo la formula (1). Sebbene la natura eterogenea del DNA nel nucleo costituisca un problema in qualsiasi tecnica densitometrica e anche nell'analisi d'immagine basata su Feulgen-densitometria, con questo approccio, l'analisi d'immagine, utilizzando i valori assunti da ciascun pixel, permette di calcolare istantaneamente l'IOD dell'intero nucleo. La citometria d'immagine è una metodica ampiamente utilizzata in ambito scientifico per eseguire studi di tipo quantitativo su materiale biologico (Chieco et al. 2013). In ambito medico essa rappresenta una tecnica ormai validata nello studio del livello di ploidia in nuclei di cellule cancerose (Böcking et al. 1995; Puech e Giraud 1999). Grazie a Vilhar e Dermastia che nel 2002 hanno messo a punto la metodica, adattandola al materiale vegetale e standardizzando tutte le procedure di controllo della strumentazione, è possibile utilizzare la citometria d'immagine anche in campo botanico, ottenendo misure accurate di *genome size*.

Per valutare il livello di ploidia nelle piante possono essere usati sia metodi basati sulla densitometria che sulla citofluorimetria. Le tecniche densitometriche, come la citometria d'immagine basata su reazione di Feulgen, hanno il vantaggio di analizzare singole cellule o tessuti, tuttavia, la citofluorimetria, sebbene non permetta di discriminare cellule di differenti

tessuti, può risultare più utile nell'ottimizzare i tempi di lavoro e nella valutazione di numerose cellule in poco tempo. Le prime indagini sull'endopoliploidia furono realizzate mediante conta dei cromosomi, quando ancora le tecniche per quantificare il DNA nucleare non erano note. Poiché l'endopoliploidia in piante non porta a condensazione dei cromosomi, in passato sono stati utilizzati diversi metodi per indurre la mitosi come il taglio sui tessuti (Grafl 1939) o trattamenti con auxina (D'Amato e Avanzi 1948). Nel 2004 Fras e Maluszynska per valutare il livello di endopoliploidia su calli ed espianti di *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) hanno utilizzato il numero di cromocentri evidenziati dopo colorazione con DAPI; mentre Baroux et al. (2004) hanno valutato il livello di ploidia delle cellule utilizzando la FISH con sonde per la marcatura del centromero, anche se Schubert et al. (2006) mettono in dubbio la validità di tale operazione. Anche l'osservazione di nuclei colorati con Feulgen e la successiva analisi dei nuclei mediante citometria d'immagine rappresenta un metodo di valutazione dell'endopoliploidia. Un ulteriore metodo per valutare il quantitativo di DNA nelle piante in maniera veloce e accurata è la citofluorimetria (FC), come mostrato per primo da Galbraith et al. (1983). L'endopoliploidia viene valutata allo stesso modo con cui vengono condotte le analisi sul genome size, utilizzando tessuti in un buffer di colorazione contenente un fluorocromo per il DNA. I dati sull'endopoliploidia, ottenuti mediante FC, vengono valutati misurando l'altezza dei picchi in un istogramma in scala logaritmica. In un istogramma in scala logaritmica i picchi teorici hanno tutti la stessa ampiezza (data dallo stesso CV per tutti i picchi) per cui l'altezza del picco dovrebbe corrispondere al numero di nuclei che formano un dato picco (Barow e Meister 2003). In piante che non presentano endopoliploidia, si osserva il picco 2C e un piccolissimo picco nella posizione 4C, dovuto probabilmente a nuclei 2C attaccati o a nuclei 2C che si stanno replicando o ancora a nuclei in fase G2 del ciclo cellulare (fase post sintesi) oppure a nuclei che stanno per entrare in mitosi (Barow e Meister 2003). Poiché la percentuale di tali nuclei 4C è molto bassa, essi non possono essere considerati nuclei endopoliploidi. In piante con media endopoliploidia si osservano nuclei 2C, 4C, 8C e in quelli con alta endopoliploidia, nuclei 2C, 4C, 8C, 16C, 32C (Fig. 23a-c) (Barow e Jovtchev 2007). Oltre alla visualizzazione degli istogrammi indicanti l'endopoliploidia e al calcolo della percentuale di nuclei presenti in un dato livello di endopoliploidia, per indicare il grado medio di endopoliploidia di un organo o tessuto possono essere usati due parametri: il *C-level mean* e il *cycle value*. Il primo parametro si calcola sommando il numero di nuclei in ciascun livello di endopoliploidia moltiplicato per il corrispondente livello di ploidia, diviso il numero totale di nuclei misurati (Engelen-Eigles et al. 2000; Mishiba e Mii 2000). Il secondo parametro, indicante il numero medio di cicli di endoreduplicazione per nucleo di tutte le cellule analizzate,

si calcola moltiplicando il numero di nuclei di un particolare livello di ploidia per il numero di cicli di endoreduplicazione necessari a raggiungere quel corrispondente livello di ploidia. La somma è poi divisa per il numero totale di nuclei misurati (Barow e Meister 2003). La formula è riportata di seguito:

$$\text{Cycle-value} = (0 * n_{2C} + 1 * n_{4C} + 2 * n_{8C} + 3 * n_{16C} \dots) / (n_{2C} + n_{4C} + n_{8C} + n_{16C})$$

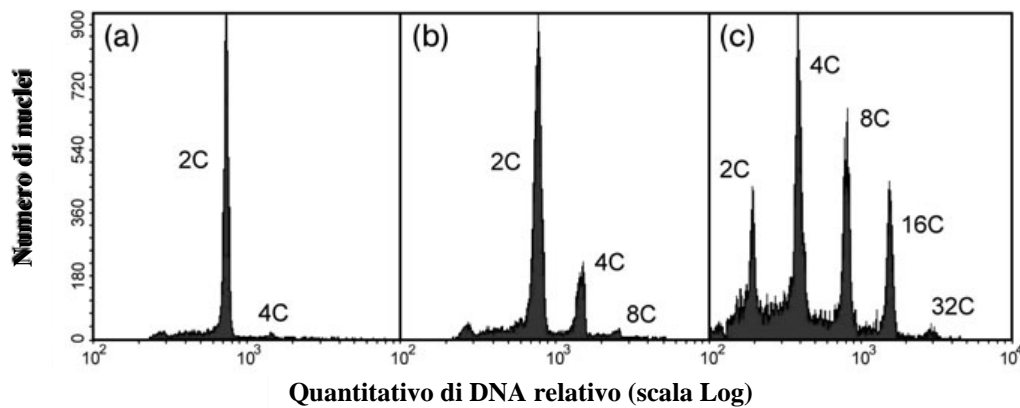


Fig. 23a-c. Tipico istogramma da FCM di nuclei isolati da organo (a) senza endopoliploidia, (b) media endopoliploidia, (c) alta endopoliploidia.

2.6.1. Tecniche di citometria d'immagine

Le stime della quantità di DNA dalla citometria d'immagine (IC) sono state condotte su materiale precedentemente trattato per misurazioni densitometriche-feulgen, usando il metodo del picco interfascico (Vilhar et al. 2001). Sono state misurate diverse centinaia di nuclei in ciascuna popolazione e i picchi di DNA nucleare 2C e 4C sono stati ottenuti dal confronto con lo standard interno. Le procedure di reazione di Feulgen sono state eseguite secondo Greilhuber e Tensch (2001). In breve, sono stati sezionati apici di diverse radici e fissati in formaldeide neutra tamponata con fosfato al 4% per 1,5 ore a temperatura ambiente. In seguito i campioni sono stati post-fissati in 3: 1 metanolo: acido acetico per 24 ore a 4°C e conservati in etanolo al 96% a -20°C. Apici radicali in crescita attiva delle specie standard di calibrazione interna *Pisum sativum* L. varietà "nano Samish", veniva fissato ed elaborato nelle stesse fiale contenenti gli apici radicali di ciascuna fanerogama marina. Esso presenta un *genome size* noto, espresso come 2C-value, pari a 9.09 pg di DNA (Greilhuber e Ebert 1994). Il 2C-value del nostro standard (9,05 pg) è stato ottenuto utilizzando semi di *Pisum sativum* L. "Ctirad" (valore 2C = 9,09 pg, Doležel et al. 1998). I semi sono stati gentilmente forniti dal prof. J. Doležel del Center of Plant Structural and Functional Genomics of Institute of Experimental Botany AS CR, Praga (Repubblica Ceca).

Prima della colorazione con il reagente Feulgen, i campioni sono stati idrolizzati in HCl 5M a $20 \pm 0,1$ °C. L'influenza del tempo di idrolisi sull'intensità della colorazione di Feulgen è stata studiata in tutti gli apici fissati con formaldeide. I tessuti fissati in MAA sono stati idrolizzati per 60 minuti (Greilhuber e Baranyi 1999). Dopo l'idrolisi, i campioni sono stati lavati in acqua distillata fredda per 5 minuti, colorati con il reagente Feulgen (cloruro di pararosanilina, BDH, Regno Unito) per 120 minuti a 20 ° C, lavati in più cambi di acqua solforosa per un totale di 45 minuti e lavato in acqua distillata (Greilhuber e Temsch 2001). Gli apici sono stati sezionati e schiacciati in una goccia di acido acetico al 45%. I vetrini coprioggetto sono stati rimossi con il metodo del ghiaccio secco, ed i vetrini sono stati essiccati all'aria per 1 ora per almeno 1 giorno.

Le immagini di nuclei interfase sono state catturate con una telecamera CCD con testa raffreddata (Optronics DEI – 470) montata su un microscopio ottico (Leitz Aristoplan) e collegata per mezzo di una frame-grabber (Matrix XLP247) ad un personal computer. Le immagini sono osservate con un obiettivo ad immersione 100x, interponendo un filtro verde a interferenza di 540 nm (EdmundOptics®) lungo la direzione della luce utilizzando l'illuminazione di Köhler. La loro acquisizione è stata effettuata utilizzando il solo canale verde della telecamera, in accordo con quanto richiesto per le misure di *genome size* (Vilhar et al. 2001).

Protocollo per Feulgen densitometry

Il protocollo per la Colorazione Feulgen su campioni fissati prevede i seguenti passaggi:

1. Eseguire sezioni di apici radicali¹ (radici primarie o secondarie) approssimativamente di 5 mm di lunghezza, sia dello standard di calibrazione (*Pisum sativum* L. var. nano-Samisch) sia delle fanerogame marine. Le due specie devono essere processate contemporaneamente nelle stesse fiale come raccomandato da Greilhuber e Temsch (2001);
2. *Fissazione* con formaldeide² 4% in tampone fosfato (Sörensen pH 7) per 1,5 ore³ a 20 °C;
3. Breve sciacquo in acqua corrente (Greilhuber 1986) per 1 min⁴;
4. Lavaggio per 1 ora in MAA⁵ (Metanolo: Acido acetico; 3:1) con diversi cambi;
5. Passaggio in Etanolo 96%;
6. Conservazione a -20 °C in etanolo 96% per 5 anni e oltre⁶.
7. *Idrolisi* in HCl 5M⁷ (T 20/21 °C) per la durata ottimale stabilita dalla curva d'idrolisi. (Per la curva d'idrolisi eseguire diverse prove di tempi: 10', 20' 30', 40' 50', 60' 70',

- 80', 90', 120', proseguendo dal tempo max al min in modo da interrompere l'idrolisi allo stesso momento per tutti i campioni ed effettuare così la colorazione simultaneamente);
8. Sciacquo in acqua fredda distillata per 5-10 min al massimo⁸ (diversi cambi, almeno cinque in Greilhuber e Tensch, 2001);
 9. *Colorazione* col reagente di Schiff (è un liquido incolore, ma macchia di rosa intenso!) per 1.5 h a 20°C, avendo cura, durante la colorazione, di tenere il materiale al buio. Il colorante, conservato in boccettina scura, va tolto in precedenza dal frigo e mantenuto a temperatura ambiente fino al momento dell'utilizzo;
 10. Lavaggi accurati in SO₂-water⁹ (acqua solforosa) per 45 minuti, a temperatura ambiente, effettuando almeno 6 cambi, di cui i primi tre a breve intervallo di tempo (Greilhuber e Tensch 2001);
 11. Breve sciacquo in acqua distillata;
 12. Conservazione al max per 9 giorni in acqua distillata a 4°C;
 13. Softening¹⁰ (ammorbidimento) in acido acetico 45% da 3 a 5 minuti, a 20°C (Greilhuber e Tensch 2001);
 14. Schiacciamento su vetrino;
 15. Rimozione del coprioggetto dal vetrino mediante ghiaccio secco;
 16. Passaggio in Etanolo 96% per 2 minuti¹¹;
 17. Disseccamento all'aria¹²;
 18. Misurazioni di IOD immediate¹³ o possibile conservazione¹⁴ al buio per 2-3 settimane.

SOLUZIONI

SO₂-water: diluire 0,5 g di metabisolfito di sodio anidro (Na₂S₂O₅) in 95 ml di acqua distillata e aggiungere 5ml di HCL 1M (Greilhuber and Temsh 2001).

NOTE

1. La reazione di Feulgen per misure di *genome size* è di solito condotta su tessuti meristematici adatti allo schiacciamento. Tessuti "duri" con forti pareti cellulari impediscono la penetrazione dei reagenti (Greilhuber 2008).
2. La formaldeide è da preferire o da usare necessariamente come fissativo quando nelle radici sono presenti tannini condensati o altri metaboliti secondari che potrebbero legare il colorante e costituire così fonte di errore nella determinazione del quantitativo di DNA nucleare in seguito a colorazione di Feulgen (Greilhuber 1986).

3. Le curve d'idrolisi hanno mostrato un optimum di tempo a 90 minuti (a 20°C) per il materiale fissato con formaldeide. Un aumento di tempo e di temperatura porta, infatti, a diminuzione della colorazione in quanto i gruppi aldeidici cui si lega il colorante diventano meno accessibili. Questo tipo di fissazione è temperatura e tempo-dipendente (Greilhuber and Temsch 2001).
4. La formaldeide deve essere accuratamente rimossa dal materiale, prima della colorazione.
5. Parecchi lavaggi in MAA (Greilhuber e Temsch 2001), per circa un'ora, eventualmente preceduti da un breve sciacquo in acqua, sono più efficaci dei lunghi sciacqui in acqua proposti da Greilhuber e Ebert (1994). Il lavaggio in MAA, che consiste in pratica in una post-fissazione, ha la funzione di rimuovere la formaldeide-non legata dai tessuti fissati. Quest'ultima, infatti, presenta lo svantaggio di far diminuire l'intensità della colorazione (Greilhuber 2008).
6. Il materiale conservato in etanolo a -20°C risulta intatto per 5 anni e oltre. Non è noto il comportamento della colorazione per materiale conservato nel fissativo anziché in etanolo. La sostituzione del fissativo (MAA) con l'etanolo è consigliata poiché è stato notato che ad alte temperature si verifica maggiore perdita di colore, come accade in presenza di acqua e protoni, che pertanto devono essere ridotti al minimo.
7. L'idrolisi è il momento più critico dell'intera procedura. È noto che l'idrolisi con HCl 5M a basse temperature (Fox 1969) è superiore a quella classica, con HCl 1M a 60 °C, perché in quest'ultima l'intervallo di tempo in cui si verifica la colorazione è troppo breve. Il materiale fissato in formaldeide mostra un'intensità di colorazione dei nuclei inferiore rispetto a quello fissato in MAA, tuttavia presenta una minore diminuzione dell'intensità di colorazione fino a tre ore con idrolisi in HCl 5 M. L'optimum di tempo d'idrolisi per materiale fissato in formaldeide è di 90 minuti (Greilhuber and Temsch 2001).
8. E' necessario interrompere l'idrolisi rimuovendo l'HCl mediante sciacqui in acqua. La durata del lavaggio rappresenta un punto critico della procedura e non deve essere prolungata oltre un certo tempo poiché può determinare una perdita della colorazione. Inoltre il prolungamento può determinare un deterioramento strutturale dell'integrità dei cromosomi con comparsa di colorazione rosa nel citoplasma, dovuta alla mobilitazione in esso di frammenti di DNA. In materiale fissato con formaldeide, la perdita di colorazione tuttavia è di minor entità rispetto a quello fissato in MAA (Greilhuber e Temsch 2001).
9. La soluzione deve essere preparata al momento (Kiernan A. 1990). Gli sciacqui in acqua solforosa sono necessari per rimuovere il colorante di Schiff non legato. La durata, dai 30

minuti è stata estesa ai 45, in quanto è stato visto che i 30 minuti e i 3 cambi solitamente consigliati non erano sufficienti a rimuovere tutto il reagente (Greilhuber e Temsch 2001).

- ^{10.} L'acido acetico ha la funzione di ammorbidire il tessuto all'atto dello schiacciamento. Lo standard interno e il materiale devono essere schiacciati a breve distanza l'uno dall'altro. Greilhuber e Temsch (2001) osservano una perdita del 2% di colorante ogni ora per prolungata permanenza del materiale in acido acetico.
- ^{11.} L'intensità della colorazione non è influenzata da un prolungato sciacquo in etanolo (Greilhuber e Temsch 2001). Il passaggio in etanolo rende più rapida l'asciugatura ma non è obbligatorio (Greilhuber 2008).
- ^{12.} Dopo la rimozione del coprioggetto mediante ghiaccio secco, il disseccamento all'aria favorisce l'appiattimento dei nuclei (Greilhuber 2008).
- ^{13.} I vetrini possono essere vantaggiosamente osservati con un obiettivo a immersione senza applicazione di coprioggetto (Greilhuber e Temsch 2001). Un 63x è adatto per genomi molto piccoli (Greilhuber 2008).
- ^{14.} I vetrini conservati al buio sono relativamente stabili. Fino a due settimane non è stata osservata diminuzione d'intensità di colorazione. Tale diminuzione sarebbe comunque verificata grazie alla presenza dello standard interno.

2.6.1.1. Analisi delle immagini e procedure di controllo del sistema di quantificazione

Il software d'analisi d'immagine utilizzato è stato Image Pro-Plus versione 6.2, affiancato dall'utilizzo del software *ImageSharp* creato nell'ambito di una collaborazione col Dipartimento di Matematica e Informatica dell'Università di Messina. Sebbene Image Pro-Plus sia utile in tutte le fasi del lavoro e sia in grado di misurare il livello di ploidia dei nuclei, presenta problemi nel caso in cui siano richieste misure quantitative di DNA. Infatti, l'algoritmo utilizzato dal software si è dimostrato, dopo una serie di prove, non idoneo per misure di IOD finalizzate ad una quantificazione esatta di DNA. Per tale motivo, la fase delle misure di IOD è stata eseguita col software *ImageSharp*. Per eliminare le oscillazioni della corrente elettrica, che potrebbero danneggiare la qualità delle immagini, la sorgente di luce del microscopio, la telecamera e il computer sono stati collegati ad uno stabilizzatore di corrente che mantiene un voltaggio costante. Al fine di ottenere una corretta analisi quantitativa è necessario ridurre al minimo gli errori della parte ottica ed elettronica della strumentazione (Puech e Giraud 1999); pertanto abbiamo sottoposto il nostro sistema ad una serie di accurate regolazioni iniziali. Il primo passo nella misura del quantitativo di DNA mediante analisi d'immagine è stato quello di regolare il microscopio. Innanzitutto, il sistema di lenti è stato accuratamente pulito, poiché

anche piccole quantità di polvere potrebbero comparire come macchie nell'immagine ed essere erroneamente computate nelle misure di densità. Prima delle misure è stata impostata una corretta illuminazione di Köhler ed è stata centrata la lampada e la direzione della luce per ottenere un campo visivo il più uniformemente illuminato. In densitometria si è soliti utilizzare luce monocromatica con una lunghezza d'onda vicina al massimo d'assorbimento del reattivo di Schiff (560 nm). Si può ottenere lo stesso effetto inserendo un filtro verde a interferenza, di 560 nm, lungo la direzione della luce. L'adeguata intensità luminosa della sorgente di luce del microscopio va regolata simultaneamente alle impostazioni della telecamera. Dopo aver settato il microscopio sono state stabilite le opportune condizioni di inquadratura delle immagini e le regolazioni della telecamera. Inizialmente è stato messo a fuoco un campo visivo contenente i nuclei, eseguendo le osservazioni sullo schermo del computer piuttosto che con gli oculari. Ottimizzata la messa a fuoco, è stato spostato il campo visivo su un'area del vetrino priva di nuclei. Tale area "vuota" è stata usata per correggere la luminosità (*brightness*) ed effettuare il bilanciamento del bianco della telecamera. Questa operazione è stata eseguita prima dell'inserimento del filtro. Il livello di esposizione della telecamera può essere usato per aumentare o diminuire la luminosità dell'immagine, ma è preferibile realizzare tale aggiustamento con la sorgente di luce del microscopio. Nel nostro studio abbiamo impostato un tempo di esposizione di 1/30 di secondo (vedi Tabella 17 per le impostazioni della telecamera).

Tabella 17. Settaggio della telecamera

Impostazioni telecamera	
Brightness	+4
Sharpness	+5
Contrasto	+2
Esposizione manuale	1/30
Gamma	+1

Il "gain" automatico della telecamera è stato disattivato al fine di evitare degli aggiustamenti automatici di luminosità. Il gamma della telecamera è stato impostato sul valore 1.0 affinché essa dia una risposta lineare. Infine, il campo visivo è stato nuovamente spostato su un'area del vetrino contenete i nuclei e sono stati eseguiti gli ultimi aggiustamenti di luminosità.

Completate le suddette operazioni, l'immagine è stata acquisita e salvata al fine di eseguire l'analisi. Il nostro sistema d'analisi d'immagine *ImageSharp* permette di eseguire misure

densitometriche anche su immagini dal vivo. Tuttavia, avendo eseguito delle prove di confronto e verificato che i valori di IOD rimangono invariati, per ottimizzare i tempi di lavoro, abbiamo preferito eseguire le misure di densità sulle immagini salvate. Dopo aver convertito l'immagine in bianco e nero è stato impostato il *threshold* dei valori di grigio dell'immagine (l'operazione è automatica e tiene conto dello sfondo dell'immagine). È stato selezionato il nucleo dall'immagine e poiché il valore soglia è stato in precedenza impostato, tutti i pixel dentro il nucleo sono stati inclusi nelle misure. Per ciascun nucleo selezionato è stata ottenuta una matrice di valori di grigio, l'immagine bitmap che il programma automaticamente, utilizzando l'algoritmo corretto di calcolo dell'IOD, trasforma in valori di IOD. Tutti i nuclei deformati, rotti, o sovrapposti sono stati esclusi dalle misure. Inoltre è importante che il campo visivo su cui effettuare le misure sia quanto più uniforme, poiché si è osservato che, all'aumentare della densità dei nuclei per campo, diminuisce il valore di IOD ottenuto (Hardie *et al.* 2002). È fondamentale quindi, per evitare sottostime di IOD, avere in partenza vetrini su cui sia stato eseguito un buon schiacciamento e che siano ben asciutti.

La procedura fin qui illustrata ha permesso non solo di individuare i nuclei a differente ploidia ma anche di eseguire misure di *genome size*. Le stime della quantità di DNA dei nuclei sono state effettuate su materiale precedentemente trattato per misurazioni densitometriche di Feulgen (eseguite secondo Greilhuber e Tensch 2001), utilizzando il metodo dei picchi interfasicci (interphase-peak method) riportato in Vilhar *et al.* (2001). Diverse centinaia di nuclei sono stati misurati in ciascuna popolazione e dal confronto con una specie standard sono stati ottenuti i picchi del DNA nucleare 2C e 4C.

Le tecniche basate sull'analisi d'immagine *ImageSharp*, siano esse densitometriche o fluorimetriche, prevedono la conversione delle unità arbitrarie di IOD in valori assoluti di *genome size*, indicato come *C-value* ed espresso in picogrammi di DNA. Tale conversione avviene mediante l'utilizzo di una specie standard il cui quantitativo di DNA è noto. Il valore di *genome size*, indicato come *C-value*, è stato calcolato come segue:

$$C_{vx} = (IOD_x / IOD_s) * C_{vs}$$

dove C_{vx} è il *C-value* della specie incognita, IOD_x è il valore medio di IOD della specie incognita, IOD_s è il valore medio di IOD dello standard e C_{vs} è il *C-value* dello standard.

Per verificare la validità dei valori di *genome size* ottenuti dalle misure, Vilhar *et al.* (2001) hanno proposto di utilizzare due parametri standard usati in campo medico: il coefficiente di variazione dei valori di IOD misurati e il rapporto di proporzionalità. Il coefficiente di variazione [$CV\% = (\text{deviazione standard}/\text{media delle misure}) * 100$] dei nuclei (nel gruppo dei 2C o 4C) per ciascun vetrino, non deve superare il 6% (Böcking *et al.* 1995). Il secondo criterio

(rapporto di proporzionalità) riguarda la deviazione dal rapporto tra il valore 4C e 2C, che idealmente dovrebbe essere pari a 2. Il rapporto 4C/2C può essere compreso tra 1.9 e 2.1 come riportato in Tabella 18 (Kindermann e Hilgers 1994). Comunque, è da tenere in conto che alcune deviazioni da tali limiti standard, presi in prestito da standard medici, sono accettabili poiché possono essere dovute alla diversità del materiale vegetale rispetto a quello animale (Vilhar *et al.* 2001; Koce *et al.* 2003).

Tabella 18. Valori limite per i parametri standard (Coefficiente di Variazione e Rapporto di proporzionalità) verificati in campo botanico.

Coefficiente di Variazione IOD	Rapporto di proporzionalità
CV %	4C/2C
< 6%	1.9 - 2.1

La validità delle regolazioni iniziali della strumentazione è stata testata mediante l'applicazione di specifiche procedure di controllo del sistema di quantificazione. Vilhar e Dermastia (2002), per prime, hanno affrontato i problemi connessi all'utilizzo di un sistema d'analisi d'immagini per misure di *genome size* su materiale vegetale, standardizzando il metodo. Le prove cui il sistema è stato sottoposto per essere definito idoneo a eseguire misure quantitative sono state: (a) prova di stabilità, (b) prova di linearità, (c) prova di shading, (d) prova di uniformità dell'intero campo visivo.

La stabilità del sistema è influenzata dalla stabilità della sorgente di luce, dal *random noise* e dal *drift over time*. La stabilità è raggiunta mediante l'utilizzo di uno stabilizzatore di corrente, mentre *random noise* e il *drift over time* sono stimati usando il CV dei valori di grigio misurati al centro dell'immagine e sull'intero campo visivo, rispettivamente. I limiti di accettabilità per la stabilità per il *random noise* e il *drift over time* sono rispettivamente: CV inferiore al 2% e CV inferiore all'1% (Tab. 19) (Puech e Giraud 1999). Per il nostro sistema, essi erano entrambi al di sotto dei limiti di accettabilità: per il *random noise* il CV% corrispondeva a 1.12 e per il *drift over time* il CV% era 0.6.

Tabella 19. Limiti di accettabilità per le prove di controllo qualità del sistema.

UNIFORMITÀ	STABILITÀ		LINEARITÀ			SHADING
CV %	Noise CV %	Drift CV %	Slope	SEE %	r ²	CV %
< 3	< 2	< 1	0.9 – 1.1	< 5	> 0.990	< 2

La linearità di un sistema d'analisi d'immagini rappresenta una misura costante della risposta della telecamera alla luce, pertanto è la relazione che esiste tra il valore in ingresso (la carica

elettrica raccolta in ogni singolo fotoelemento) ed il valore in uscita (il numero associato ad ogni pixel che compone l'immagine finale) ovvero tra la densità ottica reale dell'oggetto (il nucleo) e il segnale ricostruito dal sistema. Quanto più il sistema ha una risposta lineare, tanto più l'output digitale è "fedele" all'immagine reale ripresa dalla telecamera. Tale "fedeltà" è espressa in termini numerici dal valore di pendenza (*slope*) della curva di regressione lineare tra le OD misurate e quelle teoriche dei filtri. La linearità del sistema, è valutata utilizzando un set di filtri neutri ad assorbimento (Absorptive Neutral Density Filters Kit, della Edmund Optics), con valori di densità ottica noti (OD = 0.1, 0.15, 0.2, etc.). Quindi per analizzare i dati ottenuti (OD misurate) si calcola la regressione lineare tra le OD teoriche e quelle misurate, utilizzando i seguenti parametri: *slope* della regressione lineare, errore sistematico (*Standard Error of Estimate*, SSE, restituisce l'errore standard del valore previsto per y per ciascun valore di x nella regressione) espresso in percentuale e coefficiente di regressione (r^2). I limiti di accettabilità per la linearità stabiliti secondo Puech e Giraud (1999) sono: $slope = 0.9-1.1$; errore sistematico% = <5; coefficiente di regressione (r^2) = > 0.990 (Tab. 19). Nella prova di linearità, il valore medio degli *slope* delle 5 regressioni lineari corrispondeva a 0.986 (valore più basso 0.962, più alto 1.0); r^2 a 0.993 e l'SSE a 4.7% (Tab. 20). Pertanto il nostro sistema ha mostrato una linearità che soddisfa in maniera corretta i limiti di accettabilità proposti per i tre parametri (Tab. 21). I dati sulla prova di linearità sono stati riportati in Figura 24.

Il fenomeno dello *shading* (ombra) si può verificare quando il campo visivo non è illuminato in maniera uniforme e omogenea. Per la valutazione dello *shading* l'immagine è divisa in cinque riquadri, in accordo con Puech e Giraud (1999), come mostrato in Figura 25. Successivamente si determina l'OD dei cinque riquadri e i dati ottenuti (OD misurate) sono valutati, anche in questo caso, mediante la regressione lineare tra le densità misurate e i valori teorici di densità dei filtri. Per la prova di *shading*, il sistema presentava un CV% di 1.2 risultando, anche in questo caso, inferiore al limite proposto (Tab. 19). I dati ottenuti dalle nostre misurazioni sono stati riportati nella Fig. 25.

Infine, l'uniformità del campo visivo è calcolata misurando ripetutamente gli IOD di uno stesso nucleo di *Pisum sativum* var. *nano Samish*, catturato in differenti aree del campo visivo. Tali misure non devono presentare un CV superiore al 3% (Böcking et al. 1995; Vilhar e Dermastia, 2002). Per la prova di uniformità del campo visivo il sistema presentava un CV% di 2.5, soddisfacendo ampiamente il limite di accettabilità proposto (Tab. 19). Tutti i valori assunti dal nostro sistema, per ciascuna prova, sono stati riassunti nella tabella sottostante (Tab. 22).

Tab. 20. Prova di linearità per il sistema utilizzato: valori di IOD Misurata per ciascun campo, con i rispettivi valori dei parametri (slope, r2, SSE) e valore medio finale.

Prova di linearità		OD Misurata						
		campo1	campo2	campo3	campo4	campo5		
	0,1	0.14	0.16	0.18	0.16	0.19		
	0,15	0.18	0.2	0.22	0.2	0.22		
	0,2	0.23	0.23	0.25	0.24	0.25		
	0,3	0.31	0.32	0.34	0,33	0.34		
	0,4	0.38	0.39	0.41	0.4	0.42		
	0,5	0.47	0.48	0.49	0.48	0.5		
	0,6	0.55	0.56	0.59	0.57	0.59		
OD Teorica	0,7	0.61	0.62	0.64	0.62	0.64		
	0,9	0.81	0.8	0.83	0.82	0.83		
	1	0.97	0.99	1	0.99	1		
	1,3	1.26	1.29	1.34	1.31	1.34		
	1,5	1.48	1.52	1.51	1.52	1.54		
	2	1.96	2.06	2.07	2.07	2.02		
	2,5	2.14	2.14	2.35	2.22	2.2		
	3	2.08	2.23	2.3	2.31	2.28		
Slope		0.962	0.997	0.993	1	0.98	0.986	
r²		0.995	0.992	0.993	0.993	0.993	0.993	Media
SSE		0.038	0.052	0.049	0.050	0.047	4.73%	

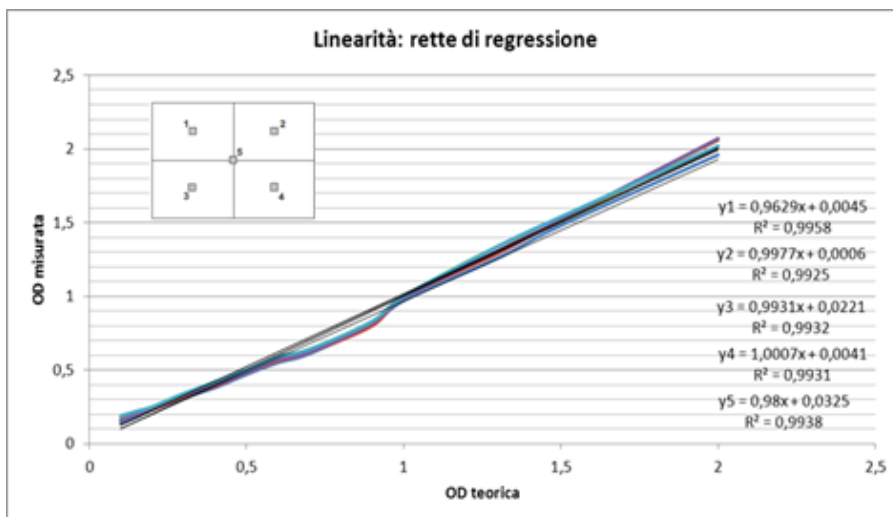
Tabella 21. Valori assunti dal sistema per la prova di linearità. I tre parametri risultano contemporaneamente verificati.

LINEARITÀ			
	Slope	Errore sistematico standard (SSE %)	Coefficiente di regressione (r ²)
Limiti	0.9 – 1.1	< 5	> 0.990
Valori del sistema	0.986	4.7	0.993

Tabella 22. Valori assunti dal sistema nelle prove di controllo qualità.

	Uniformità	Stabilità		Linearità			Shading
	CV %	Noise CV %	Drift CV %	Slope	SEE %	R ²	CV %
Limiti	< 3	< 2	< 1	0.9 – 1.1	< 5	> 0.990	< 2
Valori sistema	2.5	1.1	0.6	0.986	4.7	0.993	1.2

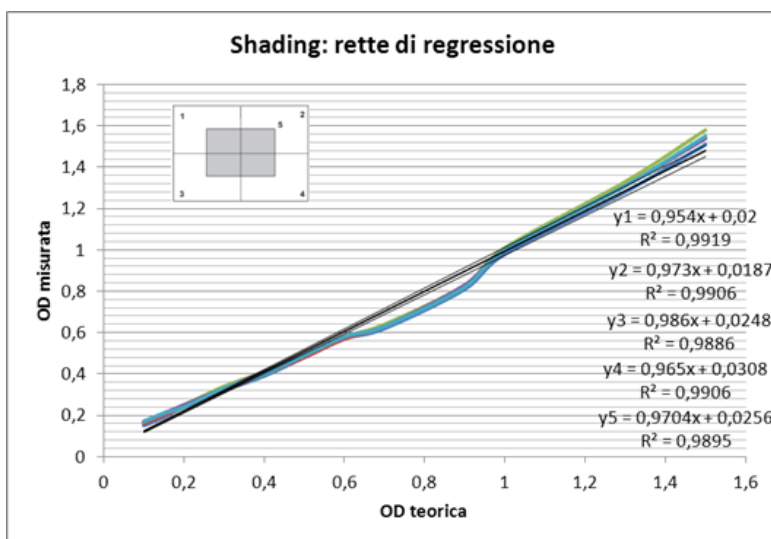
OD Misurata	OD Teorica																
	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,9	1	1,3	1,5	2	2,5	3		
Linearità 1	0,14	0,18	0,23	0,31	0,38	0,47	0,55	0,61	0,81	0,97	1,26	1,48	1,96	2,14	2,08		
Linearità 2	0,16	0,2	0,23	0,32	0,39	0,48	0,56	0,62	0,8	0,99	1,29	1,52	2,06	2,14	2,23		
Linearità 3	0,18	0,22	0,25	0,34	0,41	0,49	0,59	0,64	0,83	1	1,34	1,51	2,07	2,35	2,3		
Linearità 4	0,16	0,2	0,24	0,33	0,4	0,48	0,57	0,62	0,82	0,99	1,31	1,52	2,07	2,22	2,31		
Linearità 5	0,19	0,22	0,25	0,34	0,42	0,5	0,59	0,64	0,83	1	1,34	1,54	2,02	2,2	2,28		



Linearità	slope	r ²	SSE
campo 1	0,962	0,995	0,038
campo 2	0,997	0,992	0,052
campo 3	0,993	0,993	0,049
campo 4	1	0,993	0,050
campo 5	0,98	0,993	0,047
MEDIA	0,986	0,993	4,73%

Fig. 24. Analisi riassuntiva delle cinque rette di regressione per la prova di linearità.

OD Misurata	OD Teorica																
	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,9	1	1,3	1,5	2	2,5	3		
Sh 1	0,15	0,19	0,24	0,32	0,39	0,48	0,57	0,62	0,81	0,98	1,28	1,51	1,96	2,14	2,2		
Sh 2	0,16	0,2	0,24	0,32	0,4	0,48	0,57	0,63	0,82	1	1,31	1,54	2,02	2,2	2,3		
Sh 3	0,17	0,21	0,25	0,34	0,41	0,49	0,58	0,64	0,83	1,01	1,33	1,58	2,11	2,27	2,31		
Sh 4	0,17	0,21	0,25	0,33	0,41	0,49	0,58	0,63	0,83	1	1,31	1,54	2,04	2,22	2,27		
Sh 5	0,17	0,21	0,24	0,33	0,4	0,49	0,58	0,63	0,82	1	1,31	1,55	2,04	2,22	2,27		



Shading		
Campo 1	slope	0,954
Campo 2	slope	0,973
Campo 3	slope	0,986
Campo 4	slope	0,965
Campo 5	slope	0,97
CV % slope		1,2

Fig. 25. Analisi riassuntiva delle cinque rette di regressione per la prova di shading.

2.6.2. TECNICHE DI CITOMETRIA DI FLUSSO

Le stime della quantità di DNA nucleare ed i livelli di ploidia dalla citometria di flusso (Flow Cytometry Method, FCM) sono state condotte su campioni di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Zostera noltei* Hornemann coltivati in un unico acquario (vedi Fig. 3) presso il Laboratorio del Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, Germania) usando la procedura secondo Dolezel et al. (2007). Inizialmente sono stati testati differenti tamponi di isolamento dei nuclei per valutare quale di essi determinava maggiori risultati per le stime di DNA nucleare. Essi sono stati ulteriormente modificati manipolando la concentrazione di detergenti e aggiungendo composti che potrebbero contrastare gli effetti negativi del citosol (CyStain PI Absolute P, Galbraith buffer, Galbraith MA VI e Galbraith PVP [GB + 5% PVP]). In particolare, sono stati sperimentati differenti composizioni del buffer Galbraith (45 mM MgCl₂, 30 mM sodium citrate, 20 mM. MOPS, 0.10% v/v Triton X, pH 7.0) (Galbraith et al. 1983). In Fig. 26a-d sono riportate alcune prove di sperimentazione dei tamponi utilizzati su cellule di giovani foglie di individui di *C. nodosa*. Pertanto, dopo la sperimentazione, è stato scelto il kit CyStain® PI Absolute P (PI stock solution, Sigma-Aldrich).

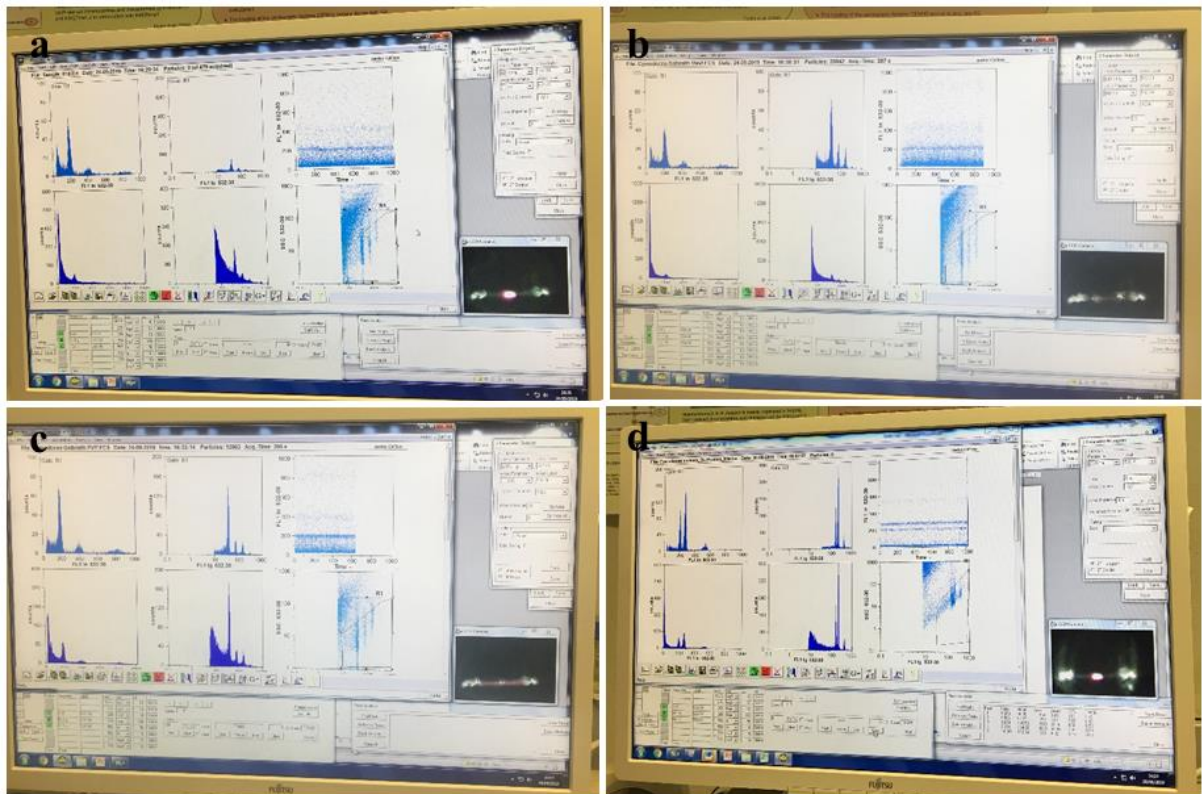


Fig. 26a-d. Differenti buffer di isolamento dei nuclei per le analisi al citofluorimetro testati su foglie di individui di *C. nodosa*. (a) Galbreith; (b) Galbraith MA IV; (c) Galbreith PVP; (d) CyStain PI Absolute P.

L'interpretazione dei risultati in termini di ploidia e dimensioni del genoma hanno richiesto la sperimentazione di diversi standard di riferimento per ciascuna specie analizzata. Solitamente, la standardizzazione può essere esterna o interna. La prima prevede una prima analisi del campione ed una successiva dello standard, mentre la seconda comporta l'isolamento simultaneo, la colorazione e l'analisi dei nuclei sia dal campione che dallo standard (Doležel et al. 2007). Poiché alcune specie contengono composti citosolici, come ad es. i polifenoli, che differiscono in termini di quantità e qualità interferendo con la colorazione del DNA e distorcendo le misurazioni FCM, sono stati prima valutati i potenziali effetti negativi misurando prima il campione e lo standard separatamente e poi insieme (Price et al 2000; Doležel et al. 2007). Quando viene rilevata l'interferenza dopo aver analizzato il campione misto si osserva uno spostamento nella posizione di picco dello standard di riferimento (Doležel et al. 2007). L'idoneità dello standard di riferimento è stata così confermata analizzando contemporaneamente il campione preparato da entrambi i tessuti. Pertanto, dopo aver testato i differenti standard, sono stati utilizzati per ciascuna specie i seguenti: *Raphanus sativus* "Vorán" (numero di accesso alla banca genetica IPK RA 34; $2C = 1,11$ pg), *Glycine max* (L.) Merr. convar. *max* var. *max*, Cina 5202 (numero di accesso alla banca genetica IPK SOJA 32; $2C = 2,21$ pg) e *Pisum sativum* cv. "Viktoria, Kifejtő Borsó" (numero di accesso alla banca genetica IPK PIS 630; $2C = 9,09$ pg) (Doležel et al. 1998), rispettivamente per *C. nodosa*, *Z. noltei* e *P. oceanica*. Gli standard di riferimento utilizzati possedevano una diversa dimensione nota del genoma che non variava più di due volte da quella del campione per ridurre il rischio di errori dovuti alla non linearità dello strumento durante la lettura dei dati. D'altra parte, gli standard con un contenuto di DNA nucleare troppo simile non dovrebbero essere usati per evitare la sovrapposizione dei picchi (ciò dipende dalla risoluzione degli istogrammi del contenuto di DNA, la differenza ragionevole è del 15-20%) (Doležel et al. 2007).

Per evitare effetti non specificati sulla cromatina e sulla colorazione del DNA dovuti all'essiccamento o alla fissazione, sono stati utilizzati solo tessuti freschi raccolti dall'acquario immediatamente prima dell'analisi per consentire una stima di maggiore qualità del contenuto di DNA in unità assolute.

Per la messa a punto del protocollo per FCM, sono state utilizzate cellule di tessuti di foglie per ogni specie presa in esame. In particolare, sono stati scelti sia i tessuti giovani e in rapida crescita che, di solito, danno i migliori risultati, sia i tessuti differenziati e senescenti, i quali possono avere un'alta percentuale di nuclei endopoliploidi (Doležel et al. 2007). In totale, per ogni specie sono state eseguite almeno sei misurazioni indipendenti in giorni diversi per compensare la variazione dei saggi FCM. Inoltre, per chiarire gli aspetti correlati al contenuto

di DNA presente negli individui di *Cymodocea nodosa* ed evidenziare la presenza di fenomeni di poliploidia somatica nelle diverse porzioni della pianta, sono state eseguite misure citofluorimetriche anche sui rizomi e le rispettive foglie di ciascun nodo di due individui raccolti nel Lago di Faro presso la Riserva naturale orientata di Capo Peloro (Messina) e spediti in Germania in fogli di giornale umidi.

Il quantitativo di DNA assoluto (pg / 2C) è stato calcolato in base ai valori delle medie dei picchi G1 e alle corrispondenti dimensioni del genoma (Mbp / 1C) in accordo con Dolezel et al. (2003). In breve, i tessuti freschi sono stati sciacquati in una capsula di Petri con acqua distillata e tamponati su carta assorbente per eliminare eventuali residui di altri organismi. Quindi i campioni sono stati preparati tagliando e colorando contemporaneamente i tessuti dello standard di riferimento del DNA e del campione da analizzare. Questo punto offre l'opportunità di rilevare gli effetti negativi del citosol sulla colorazione del DNA. A questo punto i campioni sono stati analizzati nel Citofluorimetro CyFlow® Space (Partec Sysmex) (Fig. 27a-b) per determinare l'intensità relativa di fluorescenza del DNA nucleare, la ploidia del campione e il contenuto di DNA nucleare in unità assolute (dimensione del genoma).

Negli strumenti Partec, a causa del grande diametro dell'eccitazione del raggio di luce, si è reso necessario impostare i livelli di soglia adeguati, le finestre di gate e selezionare i parametri di impulso di fluorescenza, quali altezza e area dell'impulso. Sebbene, in linea di principio, l'area dell'impulso debba essere selezionata, è consigliato consultare le istruzioni del produttore per l'impostazione appropriata.

I dati sono stati acquisiti tramite il software FloMax per Windows™ ed i report personalizzati dai dati acquisiti tramite l'interfaccia integrata e azionata mediante macro con Microsoft™ Word ed Excel.

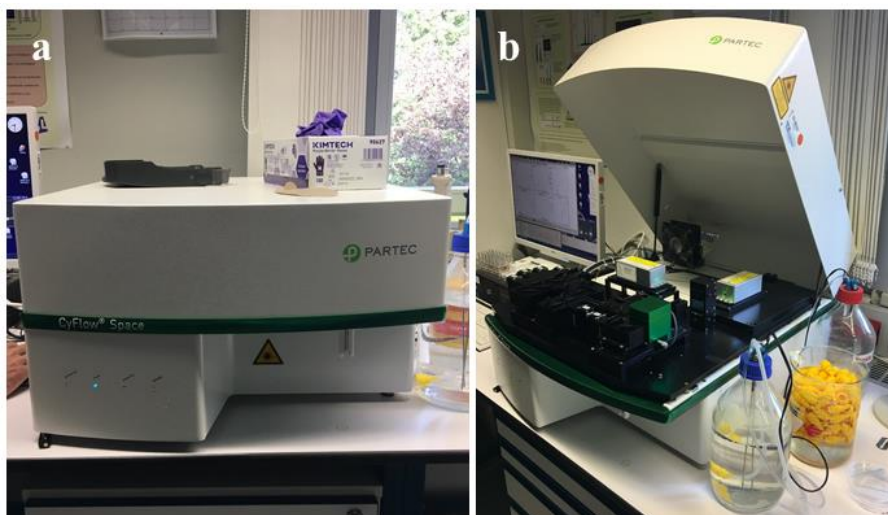


Fig. 27a-b. Citofluorimetro CyFlow® Space (Partec Sysmex). (a) Esterno ed (b) interno dello strumento.

Oltre al Citofluorimetro CyFlow Space, è stato anche utilizzato il sistema BD Influx™ Cell Sorter (BD Biosciences). Il sistema BD Influx può gestire una velocità di trasmissione fino a 200.000 eventi al secondo il sistema ottico offre una scelta fino ad un massimo di dieci laser, opzioni di rivelatori intercambiabili, elevata produttività e ordinamento a sei vie che lo rendono altamente configurabile per precise esigenze di ricerca avanzata. Infatti il sistema BD Influx è stato originariamente progettato come strumento per Human Genome Project. Inoltre, il software di smistamento BD FACST™ Software offre un controllo completo, dalla configurazione e l'impostazione della compensazione all'acquisizione, allo smistamento e all'analisi (Fig. 28a-c).

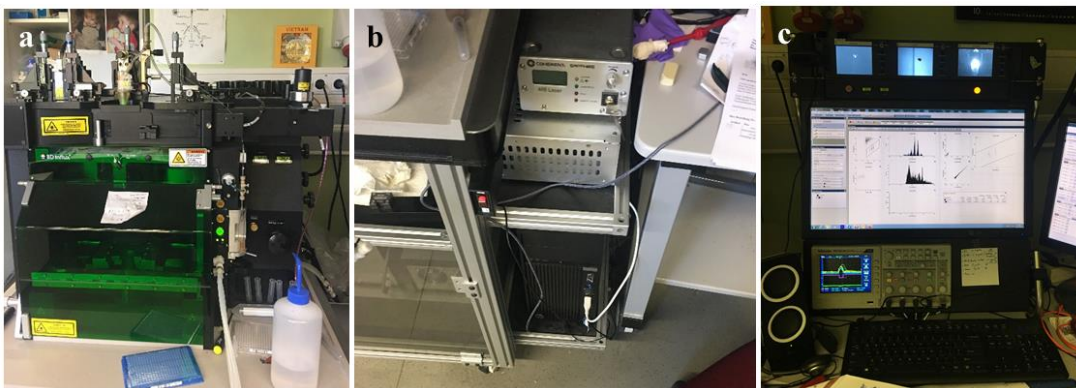


Fig. 28a-c. Diverse componenti del citofluorimetro BD Influx™ Cell Sorter - BD Biosciences.

✚ Protocollo per le misurazioni mediante il FCM

La procedura prevede i seguenti step.

- Preparare sospensioni di nuclei intatti:
1. Collocare una piccola quantità di tessuto vegetale (circa 20 mg) al centro di una capsula di Petri in plastica (Fig. 29a). La quantità di materiale utilizzato dovrebbe essere determinata empiricamente rispetto alla concentrazione di nuclei nel campione e alla quantità di detriti sullo sfondo dell'istogramma del contenuto di DNA. Per la standardizzazione interna, aggiungere contemporaneamente i tessuti fogliari di uno standard di riferimento appropriato con ploidia nota (Fig. 29a). In rapporto al campione, la quantità di tessuto standard anche in questo caso dovrebbe essere determinata empiricamente, in modo che i loro picchi G₁ siano di altezza simile agli istogrammi del contenuto di DNA dei nuclei delle piante da analizzare.
 2. Aggiungere 300µl di tampone di isolamento dei nuclei ghiacciati (CyStain® PI Absolute P) nella capsula di Petri ed attendi per 30 secondi prima di procedere allo step successivo (Fig. 29b). La scelta del buffer di isolamento nucleare è empirica. Si consiglia di testare diversi

buffer e selezionare quello con le migliori prestazioni per una determinata specie di pianta e tessuto.

3. Tagliare immediatamente il tessuto nel tampone con una nuova lama di rasoio o un bisturi affilato (usa e getta). È importante che la lama del rasoio o il bisturi siano affilati e sterili e che il materiale sia tagliato a fette molto sottili e non solo schiacciato (utilizzare ogni bordo della lama del rasoio una sola volta). L'entità del taglio dovrebbe essere determinata teoricamente rispetto alla concentrazione di nuclei nel campione e alla quantità di detriti sullo sfondo dell'istogramma del contenuto di DNA. Evitare di disperdere e asciugare il tampone durante il taglio. È utile inclinare la capsula di Petri in modo che il buffer occupi una piccola superficie.
4. Miscelare l'omogenato pipettando su e giù per più volte (evitare bolle d'aria).
5. Aggiungere 1200µl di soluzione madre di un fluorocromo per il DNA (Buffer di colorazione CyStain Ox Protect PI), agitare delicatamente ed attendere 1 minuto prima di procedere allo step successivo (Fig. 29b). Il DAPI è tipicamente usato a 4 mg ml⁻¹, mentre il PI viene tipicamente usato a 50 mg ml⁻¹ contemporaneamente a 50 mg ml⁻¹ di RNase a.
6. Filtrare l'omogenato attraverso una rete di nylon da 42 µm in una provetta etichettata (Fig. 29b). Si noti che a causa delle perdite della soluzione durante il taglio e la filtrazione, il volume del filtrato è in genere di circa 0,5 ml. Controllare visivamente che il filtrato sia privo di particelle che potrebbero causare l'intasamento dello strumento.
7. Incubare il campione su ghiaccio prima dell'analisi (da pochi minuti a 1 ora), agitando occasionalmente (Fig.29b). I tempi ottimali di colorazione per una determinata specie di pianta e tessuto dovrebbe essere determinato sperimentalmente.
8. Procedere al passaggio successivo per analizzare il contenuto di DNA nucleare.



Fig. 29a-b. Preparazione sospensioni di nuclei. (a) Tessuti fogliari di *Cymodocea nodosa*, *Posidonia oceanica* e *Zostera noltei* e di ciascuno standard di riferimento posti al centro di una capsula di Petri in plastica; (b) piano di lavoro con la strumentazione e le soluzioni utili alla preparazione della sospensione.

➤ Analizzare il contenuto di DNA del campione:

❖ Misurare l'intensità relativa di fluorescenza del DNA nucleare

1. Introdurre la sospensione di nuclei colorati nel citometro a flusso (CyFlow® Space, Partec Sysmex) ed avvia la corsa aspettando per alcuni secondi prima di procedere al passaggio successivo. Questo tempo è necessario per stabilizzare la frequenza di campionamento ed equilibrare la concentrazione di colorante legata ai nuclei del campione e al tubo di linea.
2. Regola la “frequenza di campionamento” ovvero la frequenza dei tempi di analisi dei nuclei del campione. A volte, a causa della concentrazione piuttosto bassa di nuclei nel campione, la frequenza di campionamento di solito non supera i 20-50 nuclei / s. La concentrazione di nuclei nel campione varia notevolmente a seconda della quantità di tessuto di origine e del tipo di tessuto da analizzare. Può essere inferiore a 2×10^{-3} nuclei ml^{-1} in campioni preparati da una piccola quantità di materiale essiccato con silice e raggiungere 200×10^{-3} nuclei ml^{-1} in campioni preparati con semi e protoplasti. L'eccessiva velocità di raccolta dei dati del campione può comportare l'ampliamento di picchi di DNA e picchi CV più elevati (Dolezel et al., 2007).
3. Posizionare i picchi di DNA nella posizione richiesta sull'ascissa regolando le impostazioni “di guadagno” ovvero l'ampiezza e la potenza del segnale dello strumento (tensione del fotomoltiplicatore, guadagno dell'amplificatore o entrambi). A volte è necessaria una soglia per il taglio di segnali indesiderati a basso canale provenienti da detriti cellulari e/o composti autofluorescenti. Il guadagno deve essere mantenuto entro l'intervallo raccomandato dal produttore per evitare anomalie del segnale a causa di effetti di saturazione e altre non linearità.
4. Misurare 5.000 particelle e salvare i dati.
5. Utilizzare un software appropriato per valutare la qualità dell'analisi stimando la percentuale di detriti di fondo, che dovrebbe essere il più bassa possibile, controllando la simmetria dei picchi e valutando la distribuzione delle intensità di fluorescenza (larghezza dei picchi di DNA), espressa come coefficiente variazione ($\text{CV}\% = \text{SD del picco} / \text{posizione del picco medio sul canale} \times 100$). Il posizionamento del picco standard su un canale appropriato sull'ascissa viene solitamente eseguito una sola volta e i seguenti campioni vengono misurati con le stesse impostazioni dello strumento. I CV inferiori al 3% sono considerati buoni, mentre le misurazioni con CV superiori al 5% non sono accettabili. Va notato che non è possibile ottenere CV inferiori al 5% con alcuni materiali (ad es. i campioni ricchi di polifenoli e con dimensioni del genoma molto ridotte). Considerare che i CV possono essere calcolati solo per le misurazioni eseguite su scala lineare (i valori CV non hanno senso per

i picchi su scala logaritmica). Questa analisi è fondamentale soprattutto quando viene misurato un nuovo materiale poiché i dati verranno utilizzati per scegliere la metodologia ottimale.

❖ Determinare la ploidia del campione

6. Determinare il numero di canale medio del picco del campione G₁.

7. Calcolare la ploidia del DNA del campione sconosciuto come segue:

Numero di ploidia campione = ploidia dello standard x (posizione media del picco del campione G₁ / posizione media del picco dello standard di riferimento G₁).

La perfetta sovrapposizione dei picchi della pianta di riferimento e il campione sconosciuto indicano la stessa ploidia. I picchi biforcati o non simmetrici (inclinati) implicano l'aneuploidia. Tuttavia, l'aneuploidia può essere identificata in modo affidabile utilizzando l'analisi simultanea di una pianta di riferimento e un aneuploide se i CV dei picchi di DNA sono inferiori alla metà della differenza tra il contenuto di DNA di entrambe le piante (Greilhuber et al. 2007, Dolezel e Göhde 1995). Se tale precisione non può essere raggiunta, una soluzione consiste nell'utilizzare come riferimento i nuclei di una diversa specie vegetale con una dimensione del genoma appropriata. In tal caso, l'identificazione dell'aneuploidia richiede misure replicate (Roux et al. 2003). Infine, è sempre consigliabile accompagnare risultati citometrici a flusso imprevisto con conteggi cromosomici convenzionali.

❖ Stimare il contenuto di DNA nucleare in unità assolute

8. La quantità di DNA nucleare del campione sconosciuto è calcolata come segue:

Valore del campione 2C (DNA pg o Mbp) = 2C-value dello standard x (posizione media del picco 2C del campione / posizione media del picco 2C dello standard)

9. Ripetere l'analisi su almeno altri due individui. In alternativa, è possibile eseguire tre replicati sulla stessa pianta se non sono disponibili ulteriori individui. Almeno tre diverse misurazioni devono essere eseguite in giorni diversi per compensare la variazione dei saggi FCM

10. Calcolare il contenuto medio di DNA nucleare 2C ed eseguire analisi statistiche secondo necessità.

11. Se necessario, converti la massa del DNA in picogrammi nel numero di paia di basi o viceversa come segue (Dolezel et al. 2003): 1 pg di DNA = 0,978 x 10⁻⁹bp.

3. RISULTATI

3.1. ANALISI MORFO-ANATOMICHE

3.1.1. *Halophila stipulacea*

La popolazione studiata di *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson vegeta su fondale sabbioso a una profondità di 3-10 m nel Golfo di Aqaba (Mar Rosso) presso Eliat (Israele).

Le piante presentano uno stolone (2-3 mm in diametro) diviso in nodi ed internodi (Fig. 30). Gli internodi sono 1.5-3 cm in lunghezza. Da ciascun nodo si originano due scaglie fogliari trasparenti di forma obovata, 1-1.6 cm in lunghezza, ripiegate a carena ed incise. Le foglie, che anch'esse si dipartono in coppia da ciascun nodo, sono picciolate (1-2 cm in lunghezza), di forma lineare a ellittica, con margine finemente dentellato, misurano 3-7 cm in lunghezza per 3.5-7 mm in larghezza. Presentano un'evidente nervatura centrale da cui si dipartono quelle trasversali ascendenti che, con un angolo di 45° - 60°, raggiungono le nervature intramarginali. Da ciascun nodo prende origine anche una singola radice che può raggiungere una lunghezza di circa di 3-6 cm.



Fig. 30. Campione di erbario di *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson da Eliat (Golfo di Aqaba, Israele).

In sezione longitudinale la radice mostra differenti regioni: la *cuffia*, le *cellule meristematiche*, la *zona di accrescimento per divisione*, la *zona di accrescimento per distensione* e la *zona di differenziamento* (Fig. 31a-d).

La *cuffia* è caratterizzata da due distinte porzioni (Fig. 31a, b), una interna che ricopre normalmente l'apice radicale e una esterna, costituita da uno o due strati di cellule, che come un astuccio ricopre le cellule sottostanti, da cui si distacca, lasciando tra le due porzioni uno spazio vuoto (Fig. 31a, b). Nella regione interna della cuffia (Fig. 31a, b) si osservano cellule di diverse dimensioni e morfologia. Le cellule iniziali della cuffia si presentano quadrangolari (8-10 x 8-10 μm) con un nucleo sferoidale (6-8 μm \emptyset) che occupa quasi interamente il volume cellulare. I nuclei in interfase si presentano granulari. Inferiormente a queste, le cellule della zona centrale della cuffia sono di dimensioni maggiori (20-25 x 20-28 μm) con il nucleo sempre in posizione centrale. In queste zone sono presenti divisioni mitotiche. Nella regione sottostante sono riconoscibili cellule con dimensioni maggiori rispetto alle precedenti (25-35 x 15-20 μm). In queste cellule, la parete è sottile, la vacuolizzazione è molto evidente e sono presenti numerosi granuli di amido. I nuclei hanno un aspetto granulare con un diametro di 10-12 μm . In questa zona le divisioni mitotiche sono in numero minore rispetto alle zone sovrastanti. Al di sotto di queste cellule si ritrovano cellule di dimensioni più piccole (10-12 x 10-12 μm) che danno origine alle file di cellule più esterne della cuffia. Le dimensioni di queste cellule sono variabili e vanno da 15-20 x 15-20 μm nella parte basale e di 30-40 x 7-10 μm nella parte distale. Esternamente si ritrova l'astuccio costituito da uno, talvolta due strati di cellule che in sezione longitudinale si presentano allungate, raggiungendo dimensioni di 35-40 x 8-10 μm . L'astuccio ricopre la radice fino alla zona di allungamento per distensione, dove le cellule raggiungono dimensioni di 80-100 x 10-15 μm (Fig. 31a). Immediatamente al di sopra della zona meristemica, in sezione trasversale, il livello di differenziamento delle cellule corticali è già evidente: Si distinguono un cilindro centrale e uno corticale. Nel primo non sono ancora riconoscibili gli elementi xilematici e floematici mentre è già evidente lo strato di cellule dell'endoderme (Fig. 31c). Il secondo è caratterizzato da cellule parenchimatiche che dividendosi portano alla formazione di spazi intercellulari che daranno origine alle lacune (Fig. 31c). A questo livello iniziano a differenziarsi le cellule basali dei tricoblasti, che sono disposte in modo ordinato tra le cellule dell'epiderme (Fig. 31a). In queste cellule, di 60- 100 μm di lunghezza, si osserva un nucleo di dimensioni notevoli, 25-30 μm in diametro, in cui è visibile un grosso nucleolo.

Nella *zona meristemica*, le cellule iniziali meristematiche sono presenti in numero esiguo, hanno forma più o meno quadrangolare con dimensioni di 5-8 x 8-10 μm e i nuclei misurano 4-8 μm in diametro (Fig. 31a, b). Le cellule al di sopra si dividono sia periclinalmente che anticlinalmente e presentano anch'esse forma quadrangolare con dimensioni di 10-12 x 8-10 μm .

Nella *zona di accrescimento per divisione*, le cellule disposte in file ordinate, mantengono una forma più o meno quadrangolare con dimensioni di 10-15 x 12-16 e un nucleo (8-10 μm \emptyset) che occupa quasi interamente il volume cellulare (Fig. 31a, c).

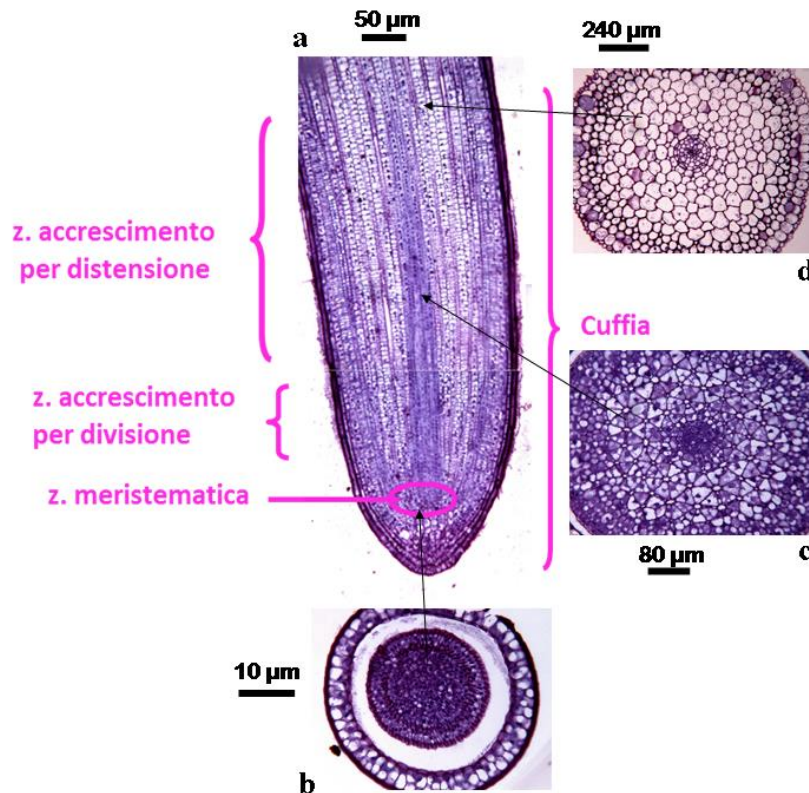


Fig. 31a-d. *Halophila stipulacea* da Eliat (Golfo di Aqaba, Israele). (a) sezione longitudinale di radice di *H. stipulacea*; (b) sezione trasversale nella zona meristemica; (c) sezione trasversale al livello della zona di accrescimento per distensione; (d) sezione trasversale nella zona di differenziamento.

Nella parte superiore le cellule appaiono leggermente più grandi (15-18 x 15-18), con un nucleo che mantiene le dimensioni delle cellule precedenti (8-10 µm Ø). Nelle zone laterali, in corrispondenza delle cellule basali della zona di accrescimento per divisione, è già osservabile il differenziamento delle cellule basali dei peli. Tali cellule si differenziano dalle iniziali dell'epidermide e dalle cellule corticali in quanto presentano un nucleo di dimensioni maggiori (10 µm Ø). Lateralmente, in alto, le cellule corticali si presentano più o meno quadrangolari con dimensioni di 8-10 x 10-12 µm.

Nel cilindro corticale, nella *zona di accrescimento per distensione* (Fig. 31a), le cellule aumentano di dimensioni raggiungendo una lunghezza di 15-20 x 18-25 µm; i nuclei, in posizione centrale, rimangono di dimensioni 8-10 µm in diametro e sono evidenti segni di vacuolizzazione. Nella porzione distale, le cellule si allungano e sono riconoscibili, esternamente, le cellule della cuffia e internamente le cellule epidermiche (20-50 x 10-15 µm). I nuclei presentano una notevole vacuolizzazione e mantengono le dimensioni di 8-10 µm di diametro. In sezione trasversale (Fig. 31d), il cilindro centrale è evidente e sono riconoscibili l'endodermide e il periciclo. Si iniziano ad osservare i primi segni di differenziamento delle cellule xilematiche e floematiche. Esternamente all'epidermide si osserva ancora uno strato di cellule della cuffia e tra le prime si riconoscono le cellule basali dei peli radicali. Nella parte più alta della zona di accrescimento per distensione è ancora

presente l'astuccio con cellule di dimensioni notevoli (80-100 x 15-20 μm) con un nucleo in posizione centrale che mantiene sempre le dimensioni di 8-10 μm . Nella *zona di differenziamento*, in sezione trasversale poco più in alto della precedente zona, si nota l'assenza sia delle cellule dell'astuccio sia di quelle della cuffia ed è invece riconoscibile un cilindro centrale ormai differenziato.

3.1.2. *Cymodocea nodosa*

Individui di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson sono stati raccolti nel periodo di maggio-giugno 2018 nel Lago Mergolo della Tonnara (Riserva Naturale Orientata Laghetti di Marinello, Oliveri, Messina), dove la popolazione vegeta da pochi centimetri di profondità fino a circa 2,5 m di profondità su fondo sabbioso-fangoso (Fig. 32). La popolazione copre la maggior parte della superficie del lago e cresce in associazione con *Ruppia* cf. *cirrhosa* (Petagna) Grande e alghe di diversi gruppi tassonomici.



Fig. 32. Popolazione di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson proveniente dal Lago Mergolo della Tonnara (Laghetti di Marinello, Oliveri, Messina).

I campioni (Fig. 33a) provenienti dalla popolazione, presa in esame, mostrano uno stolone con colorazione bianco-rossastra, diviso in nodi e internodi (lunghezza 5 cm) e con costruzione

monopodiale. Le radici avventizie, isolate (una per nodo) hanno una lunghezza di 5-9 cm (Fig. 33b). Le foglie (da 2 a 5), alterne e di forma lineare, sono lunghe 4-10 cm e larghe 4 mm, presentano un margine finemente denticolato verso l'apice (Fig. 33c) e numerose nervature tutte uguali fra loro. Non sono state osservate strutture riproduttive.

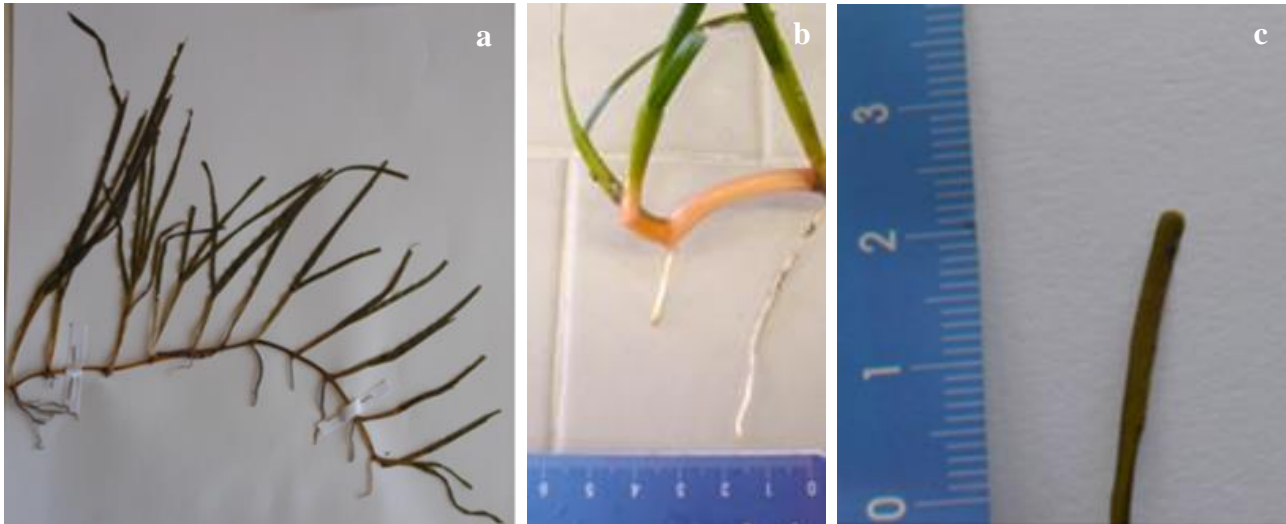


Fig. 33a-c. Campione di erbario di *C. nodosa* raccolta presso i Laghetti di Marinello. (a) Individuo di isolato dal campione di erbario; (b) dettaglio radici avventizie; (c) dettaglio foglia.

In una sezione longitudinale di radice, partendo dall'apice radicale, possiamo riconoscere: la *cuffia*, le *cellule meristematiche*, la *zona di accrescimento per divisione*, la *zona di accrescimento per distensione* e la *zona di differenziamento* (Fig. 34a-r).

Nella regione della *cuffia* (Fig. 34c-g) ritroviamo cellule di diverse dimensioni e morfologia. Le cellule vicine a quelle meristematiche iniziali hanno una forma per lo più quadrangolare (9-11 x 9-11 μm) (Fig. 34e) con un nucleo sferoidale (6-8 μm \emptyset) che occupa la maggior parte del volume cellulare. I nuclei in interfase mostrano una struttura a cromocentri. Tali cellule adiacenti alle meristematiche iniziali vanno incontro a divisioni mitotiche. Inferiormente a queste, le cellule della zona centrale della *cuffia* (Fig. 34c) appaiono più lunghe (14-22 x 12-18 μm) con il nucleo sempre in posizione centrale. Il nucleo in interfase presenta un modello a cromocentri. Nel citoplasma sono visibili i primi segni di vacuolizzazione. Anche in questa zona sono presenti divisioni mitotiche. Nella regione sottostante (Fig. 34d) sono riconoscibili cellule con dimensioni maggiori rispetto alle precedenti (16-24 x 12-20 μm). In queste cellule, la parete continua ad essere sottile, la vacuolizzazione è evidente e i nuclei iniziano a spostarsi lateralmente. Questi ultimi presentano dimensioni eterogenee (6-12 μm \emptyset) (Fig. 34d). Anche in questo caso i nuclei in interfase presentano un'organizzazione a cromocentri (Fig. 34d). In questa zona le divisioni mitotiche sono in numero minore rispetto alle zone sovrastanti. Lateralmente alla zona centrale (Fig. 34f, g) le cellule si presentano allungate e hanno dimensioni che

variano da 16-27 x 12-14 μm (Fig. 34f) e 42 x 16 μm (Fig. 34g). Il nucleo è molto più evidente e mostra una struttura a cromocentri (Fig. 34f, g). Le divisioni mitotiche sono molto rare. Le cellule della porzione di cuffia che si estende fino alla zona di accrescimento per divisione presentano dimensioni maggiori (43-105 x 12-17 μm). La parete delle cellule è piuttosto sottile (le cellule più esterne della cuffia producono mucillagini) e il citoplasma appare granulare, per la presenza di amido. La strutturazione dei nuclei in interfase si presenta sempre a cromocentri. Non si osservano divisioni mitotiche.

Le *cellule meristematiche* iniziali si trovano al centro dell'apice radicale, nella zona protetta dalla cuffia (Fig. 34b). Presentano dimensioni ridotte e una forma quadrangolare con dimensioni che rientrano in un range di 6-12 x 6-10 μm . La parete è una parete primaria poco ispessita, il citoplasma si presenta denso. Il nucleo ha dimensioni di 4-6 μm di diametro occupando quasi l'intero volume (Fig. 34b). I nuclei in interfase presentano cromocentri. Tali cellule si dividono raramente. Le cellule adiacenti a quelle meristematiche iniziali (Fig. 34h), di dimensioni 10-12 x 10-12 μm , si dividono frequentemente in tutte le direzioni. Esse presentano un nucleo interfase a cromocentri localizzato in posizione centrale, con dimensioni di 7-8 μm in diametro (Fig. 34h).

Nella zona sovrastante, o di *accrescimento per divisione*, le cellule appaiono disposte in file ordinate. Col procedere delle divisioni, nella parte centrale, le cellule appaiono di dimensioni leggermente maggiori (11-14 x 12-15 μm) e di forma quadrangolare (Fig. 34i). Il nucleo sferoidale presenta un diametro di 5-8 μm , a cromocentri e occupa quasi tutto il volume cellulare (Fig. 34i). Superiormente, le cellule si presentano allungate e hanno dimensioni maggiori (24-32 x 16-27 μm). La parete è sempre primaria e sottile. Il citoplasma è denso. Il nucleo sferoidale, con un singolo nucleolo, ha un diametro di circa 10-12 μm ed occupa una posizione centrale (Fig. 34n). Nelle zone laterali, in corrispondenza delle cellule basali della zona di accrescimento per divisione, le cellule si presentano di maggiori dimensioni (14-21 x 11-16 μm) e sono già evidenti segni del differenziamento (Fig. 34m). Infatti, le cellule sono vacuolizzate e la parete è leggermente ispessita. Tali cellule sono quelle che daranno origine alle cellule corticali. Le cellule iniziali dell'epidermide mostrano i primi segni di differenziamento. L'epidermide origina da cellule che si trovano nella zona di passaggio tra la cuffia e le cellule meristematiche (Fig. 34l). Le cellule iniziali dell'epidermide si dividono solo anticlinalmente, costituendo così uno strato distinto. La zona di accrescimento per divisione, nella parte centrale, si può estendere per alcuni millimetri e può variare da una radice all'altra.

Nella parte centrale della *zona di accrescimento per distensione* le cellule si presentano allungate e con segni evidenti di differenziamento. La maggior parte del volume cellulare è occupata da un grosso vacuolo e il citoplasma è confinato a ridosso delle pareti che si presentano ispessite. Il nucleo anche in questo caso si presenta a cromocentri.

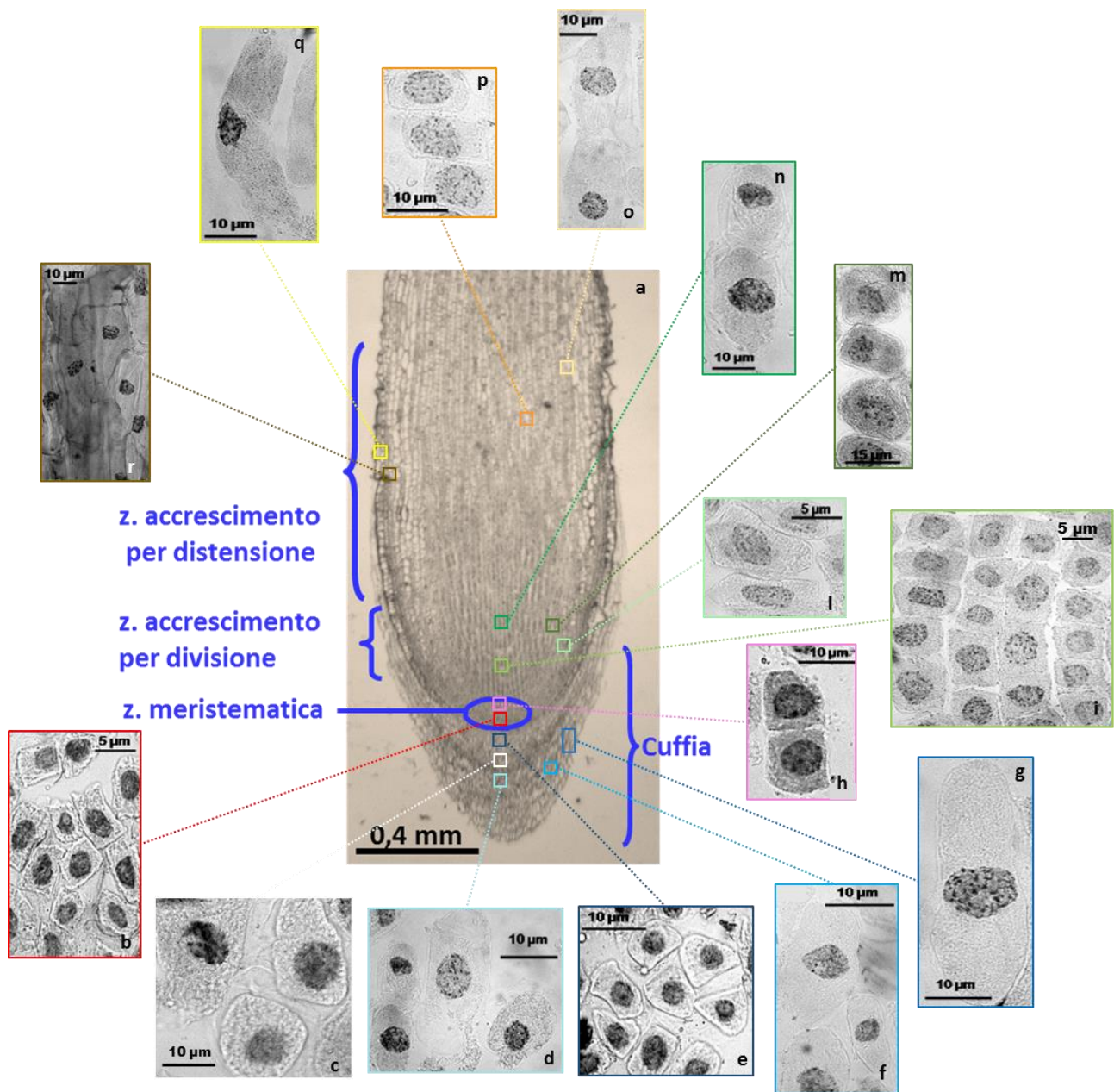


Fig. 34a-r. *Cymodocea nodosa* raccolta presso i Laghetti di Marinello (Messina). **(a)** sezione longitudinale di radice di *C. nodosa*; **(b)** cellule meristematiche iniziali di dimensioni ridotte e di forma quadrangolare; **(c)** cellule allungate della zona centrale della cuffia; **(d)** cellule di dimensioni eterogenee della zona sottostante quella centrale della cuffia; **(e)** cellule di forma quadrangolare della zona sovrastante quella centrale della cuffia; **(f)** cellule irregolari laterali della cuffia; **(g)** cellule allungate laterali della cuffia; **(h)** cellule adiacenti alle meristematiche iniziali; **(i)** cellule quadrangolari della porzione centrale della zona di accrescimento per divisione; **(l)** cellule iniziali dell'epidermide nella zona di passaggio tra la cuffia e le cellule meristematiche; **(m)** cellule iniziali corticali laterali della zona di accrescimento per divisione; **(n)** cellule allungate della porzione centrale superiore della zona di accrescimento per divisione; **(o)** cellule corticali esterne prossimali della zona di accrescimento per distensione; **(p)** cellule corticali interne della zona di accrescimento per distensione; **(q)** cellule corticali esterne distali della zona di accrescimento per distensione; **(r)** cellule epidermiche della zona di accrescimento per distensione.

Le dimensioni di queste cellule variano in relazione alla loro distanza dall'apice. Nella parte basale di questa regione le cellule misurano 7-11 x 24-30 μm , mentre nelle cellule che sono più prossime alla zona di differenziamento le dimensioni variano da 9-10 x 42-60 μm . Nella porzione laterale della zona di accrescimento per distensione le cellule interne del cilindro corticale hanno dimensioni 10-16 x 7-12 μm nella parte proximale all'apice (Fig. 34p); mentre nella parte distale raggiungono i 32-75 x 12-16 μm . Le cellule esterne del cilindro corticale mostrano un livello di differenziamento maggiore e presentano dimensioni che variano da 28-35 x 14-20 μm , nella parte proximale all'apice (Fig. 345o), mentre nella parte distale raggiungono i 32-75 x 12-17 μm (Fig. 34r). Le cellule dell'epidermide hanno dimensioni di 52-64 x 12-15 μm (Fig. 34q). Tra le cellule epidermiche sono presenti le cellule iniziali dei tricoblasti. In questa zona della radice le divisioni sono molto rare.

Nella *zona di differenziamento* tutte le cellule hanno raggiunto il loro livello massimo di specializzazione, evidenziando così l'anatomia tipica di una radice in struttura primaria. In sezione trasversale, in questa zona si riconoscono le cellule dell'epidermide di cui alcune differenziate in peli radicali, i tessuti parenchimatici corticali con lacune aerifere e il cilindro centrale. Le cellule epidermiche presentano pareti primarie, non lignificate, e una vacuolizzazione che spinge il citoplasma in una zona periferica. Sotto l'epidermide si differenzia un singolo strato, l'esoderma uniseriato e compatto, che presenta pareti cellulari che a volte sviluppano ispessimenti irregolari a forma di U.

La zona corticale si presenta ampia e divisa in tre zone distinte. La cortex esterna è compatta e costituita da 5-12 strati di cellule grandi con pareti che diventano lignificate nelle radici più vecchie. La zona centrale della cortex, invece, è costituita da due o più strati di cellule irregolari con pareti primarie che a volte formano lacune aerifere irregolari separate da partizioni radiali. La cortex interna è compatta e costituita da strati regolarmente concentrici di cellule strettamente addossate con pareti inspessite. Inoltre, sia nella cortex esterna che in quella interna sono presenti cellule contenenti tannini. L'endoderma, uniseriato, spesso è indistinto. Il cilindro centrale è molto ridotto e comprende un tessuto floematico costituito da 4-5(8) elementi, ciascuno associato a cellule compagne, e un tessuto xilematico rappresentato da cellule con pareti primarie scarsamente lignificate o tracheidi alternate a bande floematiche.

3.1.3. *Posidonia oceanica*

La popolazione studiata di *Posidonia oceanica* (L.) Delile vegeta su fondale sabbioso ad una profondità di 3-15 m nel Golfo di Brucoli (Siracusa, Italia) formando delle praterie sottomarine (il posidonieto) insieme a *Zostera noltei* Hornemann e *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson (Fig.35).

Le piante presentano uno stolone (fino ad 1 cm in diametro) diviso in nodi ed internodi che cresce sia in senso orizzontale (rizomi *plagiotropi*), sia in senso verticale (rizomi *ortotropi*). I primi, grazie alla presenza sul lato inferiore di radici lignificate e lunghe fino a 15 cm, ancorano la pianta al substrato mentre i secondi, incrementando l'altezza, hanno la funzione di contrastare l'insabbiamento dovuto alla continua sedimentazione. I due tipi di accrescimento danno luogo alla cosiddetta *matte*, una formazione a terrazzo costituita dall'intreccio degli strati di rizomi, radici e dal sedimento intrappolato. Le radici sono sottili, delicate ma ampiamente ramificate, con peli rari e non sono associate ai nodi ma vengono prodotte di solito in coppia lateralmente e irregolarmente al nodo dalla stele del rizoma, in corrispondenza a ciascuna foglia. Le foglie nascono dai rizomi ortotropi, sono nastriformi, di colore verde brillante che diventa bruno con il passare del tempo. Raggiungono la lunghezza di circa 1,5 m, sono larghe in media 1 cm e presentano da 13 a 17 nervature parallele. Gli apici sono arrotondati e spesso vengono persi per l'azione del moto ondoso e delle correnti. Sono organizzate in fasci che presentano 6 o 7 foglie, con le più vecchie che si trovano all'esterno e le più giovani all'interno di lunghezza inferiore ai 50 mm.



Fig. 35. Posidonieta del Golfo di Brucoli (Siracusa).

3.1.4. *Zostera noltei*

La popolazione di *Zostera noltei* Hornemann vegeta su fondale sabbioso ad una profondità di 3-4 m nel Golfo di Brucoli (Siracusa, Italia) insieme a *Posidonia oceanica* (L.) Delile e *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. Le piante presentano uno stolone (circa 1mm in diametro) diviso in nodi ed internodi. Gli internodi sono relativamente lunghi e in ciascun nodo si originano due o più radici alternate non ramificate. Le radici, sottili con numerosi peli lunghi per crescere in substrati fangosi e/o sabbiosi, sono sempre disposte in due gruppi ciascuno con 2-12 radici non ramificate. Una singola radice può raggiungere una lunghezza di circa di 4-8 cm. Le foglie, prodotte normalmente dalla parte superiore dai nodi del rizoma, formano un'unità di più foglie, il germoglio, contenente diversi stadi di sviluppo. Esse sono molto sottili, di forma nastriforme, misurano 20-30 cm in lunghezza per 3-4 mm in larghezza. Presentano 3 nervature parallele con un'evidente incisione centrale asimmetrica sull'apice. Ogni foglia è costituita da una guaina fogliare basale e da una lama fogliare distale. Le guaine fogliari che racchiudono le giovani foglie, sono tubolari e sono generalmente coperte dai sedimenti almeno fino alla base. La lamina fogliare è semplice e nuda, priva di peli. Le vecchie lamine si rompono con l'età sollevandosi di solito all'incrocio tra lamina e la guaina fogliare. Una struttura simile alla lingua conosciuta come la ligula viene prodotta come escrescenza adassiale alla giunzione di guaina e lamina fogliare.

3.2. ANALISI DEL CARIOTIPO

3.2.1. *Halophila stipulacea*

Analisi cariomorfologiche

La mitosi somatica degli apici radicali della popolazione di *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson proveniente dal Golfo di Aqaba (Eliat, Mar Rosso) è risultata regolare in quasi tutte le piastre osservate (Fig. 36a-i). Il nucleo interfaseico (6-8 µm Ø) è caratterizzato da cromatina in fase dispersa senza strutture eterocromatiche evidenti (Fig. 36a). In profase la cromatina inizia a condensarsi e i cromosomi diventano visibili, in tarda profase (Fig. 36b), infatti, sono già riconoscibili 18 cromosomi. In metafase, i cromosomi sono disposti sul piano equatoriale (Fig. 36c) e in anafase inizia la separazione dei cromatidi (Fig. 36d), seguita dalla telofase in cui i cromatidi si ritrovano ai poli opposti della cellula (Fig. 36e, f). In questa fase si osservano la despiralizzazione della cromatina e la formazione della nuova membrana nucleare. La citodieresi si presenta regolare e inizia con la formazione della lamella mediana (Fig. 36g). L'unica anomalia osservata durante la mitosi è rappresentata dalla presenza di ponti inter-cromosomali in anafase (Fig. 36h, i). Il numero cromosomico ritrovato in tutte le metafasi studiate di *H. stipulacea* del Mar Rosso è $2n=18$ (Fig. 36l).

La lunghezza dei cromosomi varia da 1.66 μm a 4.37 μm (Tab. 23) con un rapporto LC/SC di 2.63. Dall'analisi dei dati ottenuti è stato costruito il cariotipo (Fig. 36l) che mostra un complemento costituito da cinque coppie di cromosomi metacentrici, tre di submetacentrici e una di subtelocentrici (Fig. 36l, m).

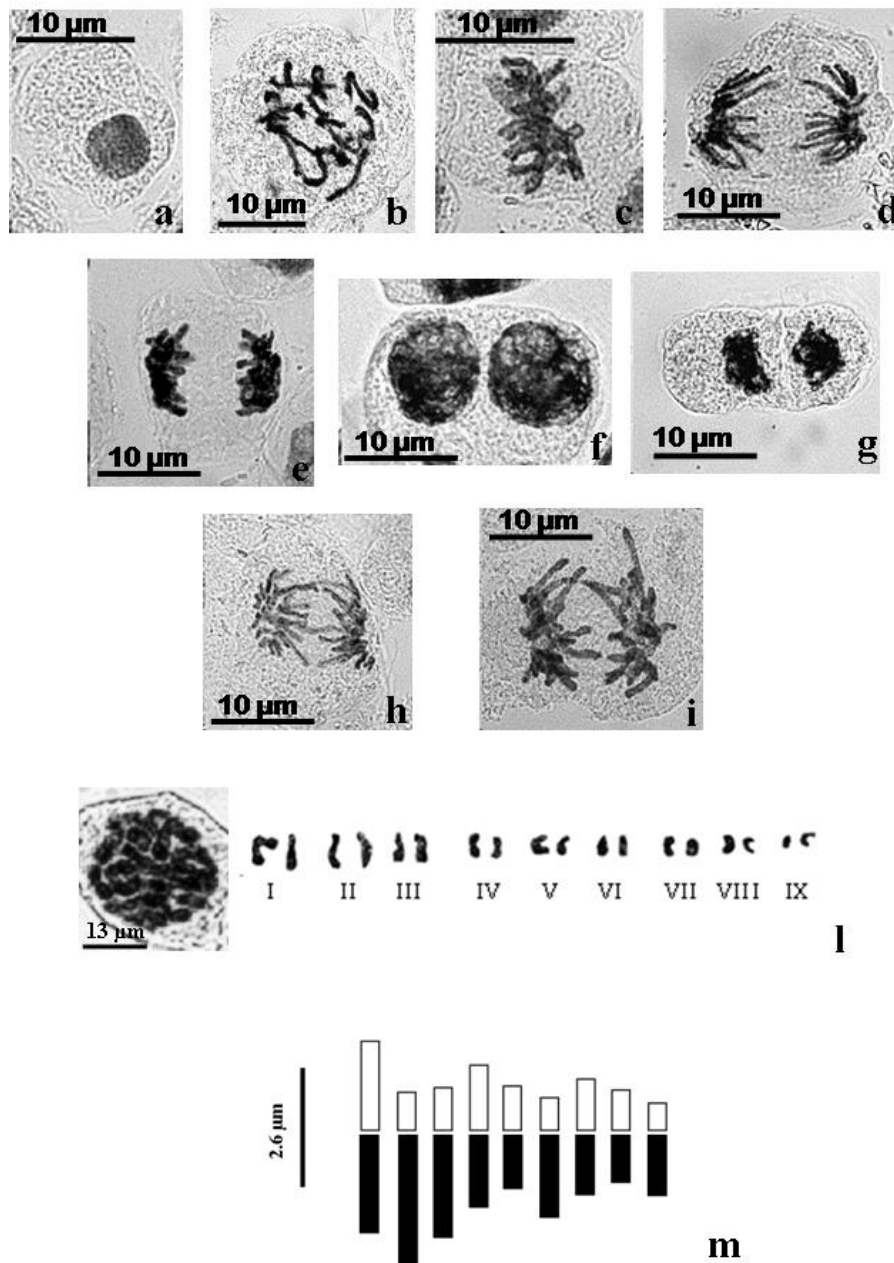


Fig. 36a-m. *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson proveniente dal Golfo di Aqaba (Eliat, Mar Rosso). (a) nucleo in interfase; (b) profase; (c) metafase; (d) anafase; (e) telofase precoce; (f) telofase avanzata; (g) citodieresi; (h, i) ponti metafasici; (l) piastra cromosomica e cariotipo, $2n= 18$; (m) ideogramma.

In particolare, è possibile identificare quattro paia di cromosomi di dimensioni maggiori (range 3.05-4.13 μm), con la prima coppia e la quarta metacentriche, la seconda subtelocentrica, la terza submetacentrica ma con valori assoluti prossimi a quelli di una subtelocentrica (Fig. 36l, m; Tab. 23).

Le altre, di dimensioni minori (range 1.98-2.18 μm) si presentano con la quinta, settima e ottava metacentriche e la sesta e la nona submetacentriche, sebbene i valori assoluti della sesta si approssimano ai valori stabiliti per considerarle subtelocentriche. Il rapporto tra la lunghezza relativa media dei singoli cromosomi e il numero cromosomico aploide evidenzia una leggera tendenza del cariotipo a presentare due gruppi di cromosomi con dimensioni diverse. L'analisi dell'ideogramma conferma queste osservazioni (Fig. 36m). Il rapporto tra la media delle lunghezze relative dei singoli cromosomi del complemento aploide e il valore del rapporto tra braccio lungo e braccio corto conferma la presenza nel complemento di cinque coppie di cromosomi metacentrici, tre coppie di submetacentriche e una coppia di subtelocentrici. La prima coppia tra le metacentriche è composta da cromosomi che presentano dimensioni leggermente maggiori rispetto a tutte le altre coppie. La formula cariotipica è $2n=2x=18=10m+6sm+2st$. La lunghezza totale del complemento aploide dei cromosomi (TL) è di 25.35 μm (Tab. 23). L'indice asimmetrico (IA) è 7.08. Tutti i dati morfometrici dei cromosomi sono riportati in Tab. 23.

Tabella 23. Dati morfometrici dei cromosomi di *H. stipulacea* dal Mar Rosso. LA= braccio lungo, SA= braccio corto; C=cromosoma intero; r= rapporto braccia (LA/SA); CI= indice centromerico; CT= tipologia del cromosoma (m= mediano; sm= submediano; st=subtelocentrico); TL= lunghezza totale del complemento.

chr	LA	SA	C	r	CI (%)	RL	CT
1a	2,23	2,14	4,37	1,04	49,97	17,23	m
1b	2,07	1,83	3,9	1,13	46,92	15,38	m
2a	3,01	0,87	3,88	3,45	22,42	13,6	st
2b	2,76	0,86	3,62	3,2	23,75	14,28	st
3a	2,22	1,1	3,32	2,01	33,13	13,09	sm
3b	2,28	0,85	3,13	2,68	27,15	12,34	sm
4a	1,6	1,49	3,09	1,07	48,22	12,19	m
4b	1,59	1,42	3,01	1,1	47,17	11,87	m
5a	1,19	1,02	2,21	1,16	46,15	8,71	m
5b	1,19	0,97	2,16	1,22	44,9	8,52	m
6a	1,91	0,81	2,72	2,35	29,77	10,72	sm
6b	1,73	0,69	2,42	2,5	28,51	9,54	sm
7a	1,5	1,2	2,7	1,25	44,44	10,65	m
7b	1,17	1,09	2,26	1,07	48,23	8,91	m
8a	1,14	1,03	2,17	1,1	47,46	8,56	m
8b	0,98	0,81	1,79	1,2	45,25	7,06	m
9a	1,71	0,59	2,3	2,89	25,65	9,07	sm
9b	1	0,66	1,66	1,51	39,75	6,54	sm
TL			50,71				

✚ Confronto dei cariotipi di *Halophila* spp.

Le piastre metafasiche di tutte le popolazioni di *H. stipulacea* delle diverse località (Tab. 24), compresa quella di Riposto (*H_sti_Rip* **), hanno mostrato una costante $2n = 2x = 18$ numero di cromosomi (Fig. 37a-d).

Tabella 24. Elenco di campioni di *Halophila* spp. studiati o riesaminati nel presente lavoro.

Taxon	Collection site	Note
<i>Halophila beccarii</i> Ascherson		
<i>H_bec_HK</i>	Pak Nui, Yuen Long, Hong Kong	Material re-examined from Huang et al. (2010)
<i>Halophila minor</i> (Zollinger) den Hartog		
<i>H_min_CN</i>	Li'an Lagoon, Hainan Province, China	Material re-examined from Wenjie et al. (2012)
<i>Halophila ovalis</i> (R. Brown) J.D. Hooker		
<i>H_ova_HK</i>	Tung Chung Pier, Lantau Island, Hong Kong	Material re-examined from Huang et al. (2010)
<i>Halophila stipulacea</i> (Forsskål) Ascherson		
<i>H_sti_Rip</i>	Riposto, Sicily, Italy	Original material from Famà (1995-96)
<i>H_sti_Rip*</i>	Riposto, Sicily, Italy	Material re-examined from Famà (1995-96)
<i>H_sti_Rip**</i>	Riposto, Sicily, Italy	Material conserved at MS and collected in 1994-98
<i>H_sti_RS</i>	Elat, Gulf of Aqaba, Red Sea	This study
<i>H_sti_StM</i>	Straits of Messina, Sicily, Italy	Material conserved at MS and collected in 2011-14
<i>H_sti_Vul</i>	Vulcano Island, Sicily, Italy	Material conserved at MS and collected in 2011-14

Tracciando i valori di lunghezza cromosomica standardizzata (SCL) rispetto a quelli di asimmetria centromerica (CA), sono state identificate in ciascuna popolazione nove coppie di cromosomi omologhi (Fig. 2a-d). Gli stessi risultati sono stati ottenuti utilizzando i valori New Relative Length (NRL) e arm ratio (r) (dati non mostrati).

Tutte le popolazioni presentavano una leggera organizzazione cariotipica bimodale costituita da quattro coppie cromosomiche più grandi (I-IV) e cinque più piccole (V-IX) (Figg 37a-d; 38a-d; 39a-d). Nessuno dei cromosomi mostrava il satellite. Tra i cromosomi più grandi, le coppie I e IV hanno il centromero localizzato nella posizione mediana.

La coppia I presentava i cromosomi più lunghi in tutte le popolazioni (Figg. 37a-d; 38a-d; 39a-d). Le sue dimensioni variavano da $5,69 \pm 0,19 \mu\text{m}$ in *H_sti_RS* (Figg. 37d; 38d; 39c) a $6,39 \pm 0,09 \mu\text{m}$ in *H_sti_Vul* (Figg. 37b; 38b; 39b). La coppia IV aveva una dimensione variabile tra $3,57 \pm 0,16 \mu\text{m}$ in *H_sti_Rip* ** (Figg. 37c; 38c; 38d) a $4,25 \pm 0,23 \mu\text{m}$ in *H_sti_RS* (Figg. 37d; 38d; 39c). La seconda (II) e la terza (III) coppia erano entrambe sub-telocentriche (Figg. 37a-d; 38a-d; 39a-d). Le loro dimensioni variavano tra $5,05 \pm 0,07 \mu\text{m}$ in *H_sti_StM* (Figg. 37a; 38a; 39a) a $5,54 \pm 0,22 \mu\text{m}$ in *H_sti_Rip* ** (Figg. 37c; 38c; 39d) e tra $3,92 \pm 0,18 \mu\text{m}$ in *H_sti_StM* (Figg. 37a; 38a; 39a) e $4,65 \pm 0,1 \mu\text{m}$ in *H_sti_Rip* ** (Figg. 37c, 38c; 39d), rispettivamente. Le coppie cromosomiche più piccole erano tutte metacentriche (Figg. 37a; 38a-d; 39a-d) tranne le coppie VI e IX. La dimensione della coppia V estesa da $2,52 \pm 0,09 \mu\text{m}$ in *H_sti_StM* (Figg. 37a; 38a; 39a) a $3,36 \pm 0,2 \mu\text{m}$ in *H_sti_RS* (Figg. 37d; 38d; 39c). La coppia VII misurata da $2,05 \pm 0,12 \mu\text{m}$ in *H_sti_StM* (Figg. 37a; 38a; 39a)

a $3,37 \pm 0,27 \mu\text{m}$ in *H_sti_RS* (Figg. 37d; 38d; 39c) e la coppia VIII da $1,69 \pm 0,13 \mu\text{m}$ in *H_sti_StM* (Figg. 37a; 38a; 39a) a $2,78 \pm 0,19 \mu\text{m}$ in *H_sti_RS* (Figg. 37d; 38d; 39c). La coppia VI era subtelocentrica e aveva dimensioni comprese tra $2,27 \pm 0,02 \mu\text{m}$ in *H_sti_StM* (Figg. 37a; 38a; 39a) e $3,83 \pm 0,11 \mu\text{m}$ in *H_sti_Rip* ** (Figg. 37c; 38c; 39d). L'ultima coppia (IX) era submetacentrica e le sue misure erano comprese tra $1,67 \pm 0,1 \mu\text{m}$ in *H_sti_StM* (Figg. 37a; 38a; 39a) a $2,66 \pm 0,35 \mu\text{m}$ in *H_sti_RS* (Figg. 37d; 38d; 39c).

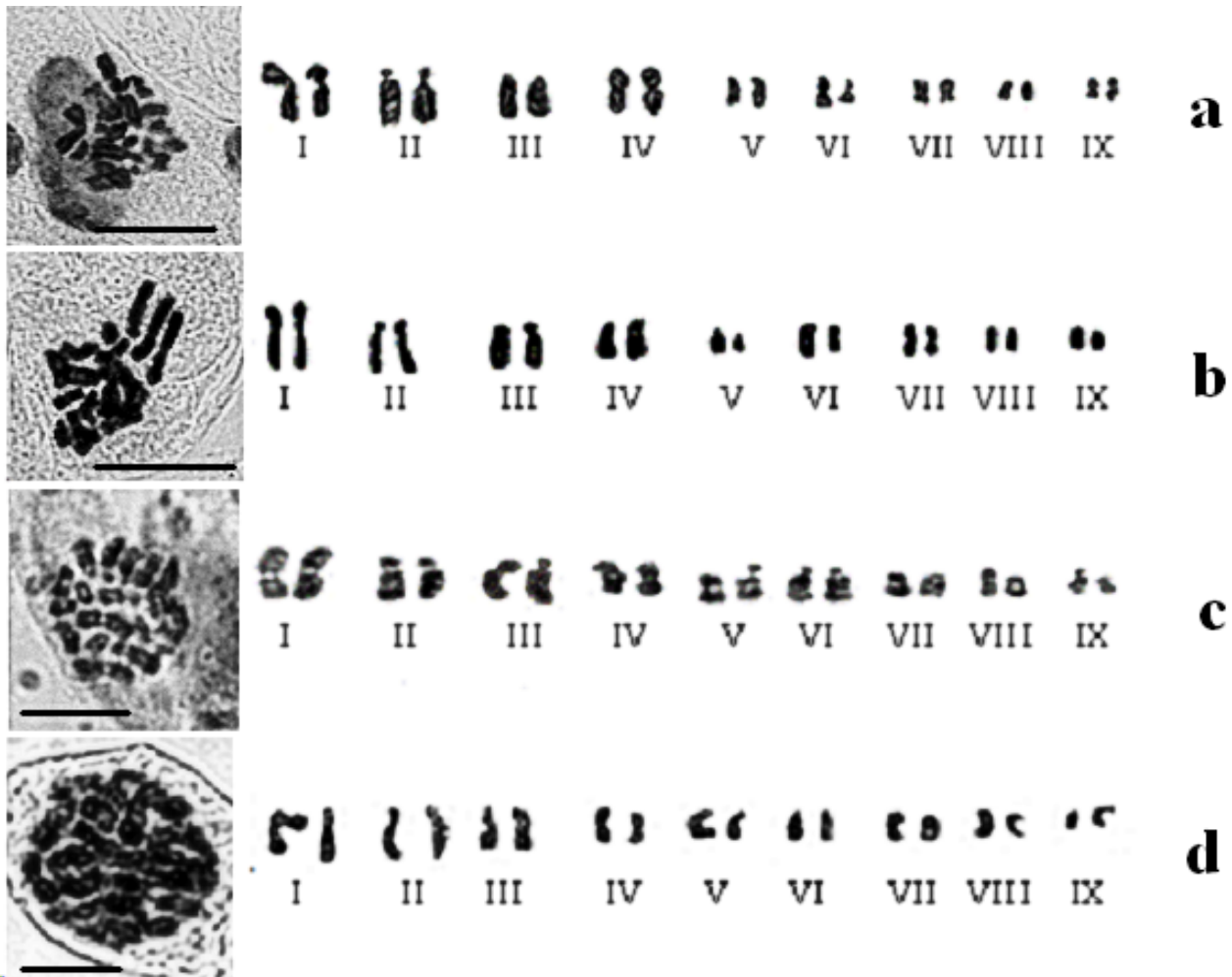


Fig.37a-d. *Halophila stipulacea*. (a) piastra metafascica e cariotipo $2n=18$ di un individuo proveniente dallo Stretto di Messina (*H_sti_StM*), scale bar= $10 \mu\text{m}$; (b) piastra metafascica e cariotipo $2n=18$ di un individuo proveniente da Vulcano (*H_sti_Vul*), scale bar= $12 \mu\text{m}$; (c) piastra metafascica e cariotipo $2n=18$ di un individuo proveniente da Riposto (*H_sti_Rip***), scale bar= $11 \mu\text{m}$; (d) piastra metafascica e cariotipo $2n=18$ di un individuo proveniente dal Golfo di Aquaba, Mar Rosso (*H_sti_RS*), scale bar= $13 \mu\text{m}$.

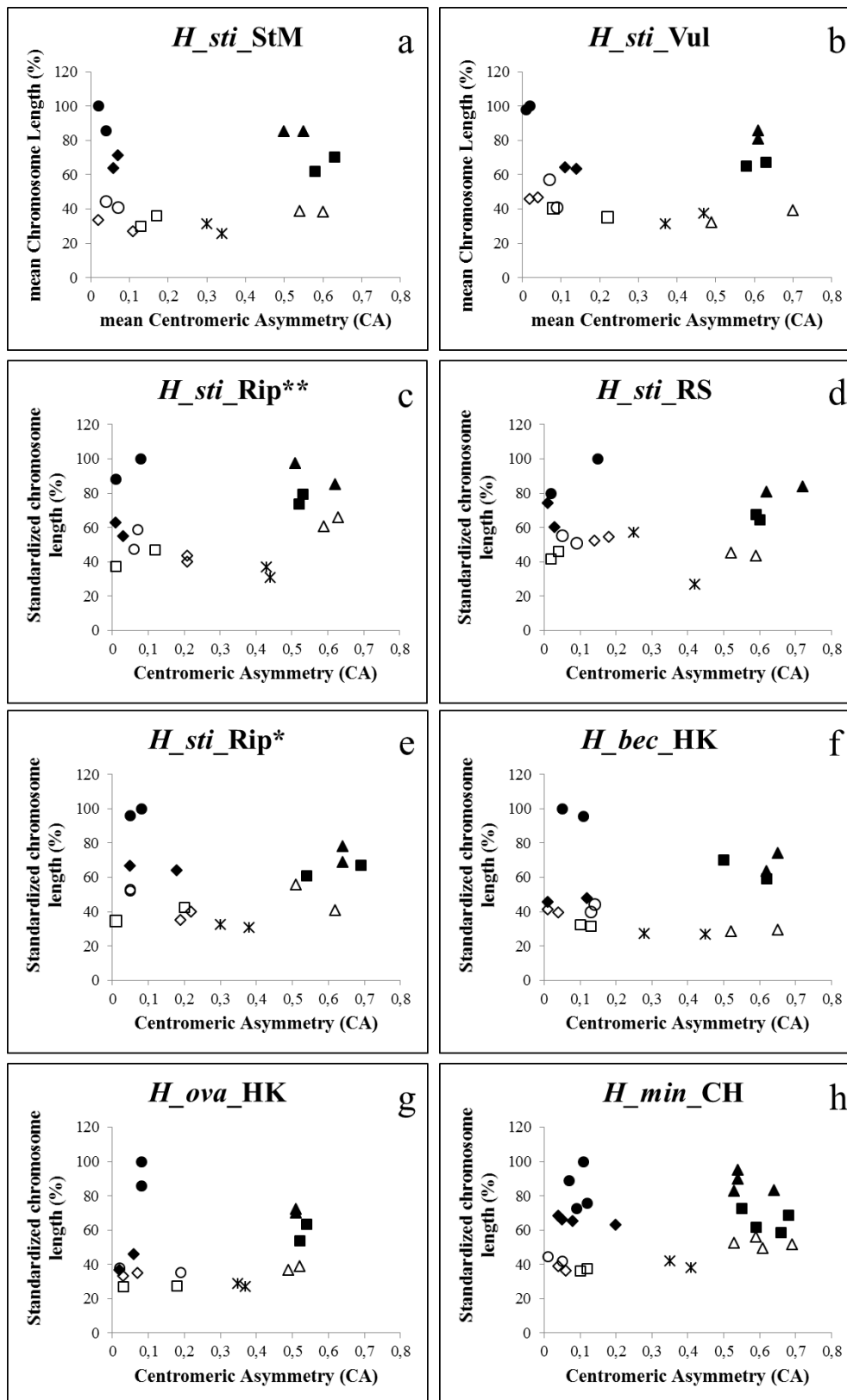


Fig. 38a-h. *Halophila* spp. Rappresentazione grafica delle coppie di cromosomi in un complemento: (a) *H. stipulacea* dallo Stretto di Messina (*H_sti_StM*); (b) *H. stipulacea* da Vulcano (*H_sti_Vul*); (c) *H. stipulacea* da Riposto (*H_sti_Rip***); (d) *H. stipulacea* dal Golfo di Aqaba, Mar Rosso (*H_sti_RS*); (e) *H. stipulacea* da Riposto (*H_sti_Rip**); (f) *H. beccari* da Hong Kong (*H_bec_HK*); (g) *H. ovata* da Hong Kong (*H_ova_HK*); (h) *H. minor* dalla Cina (*H_min_CN*).

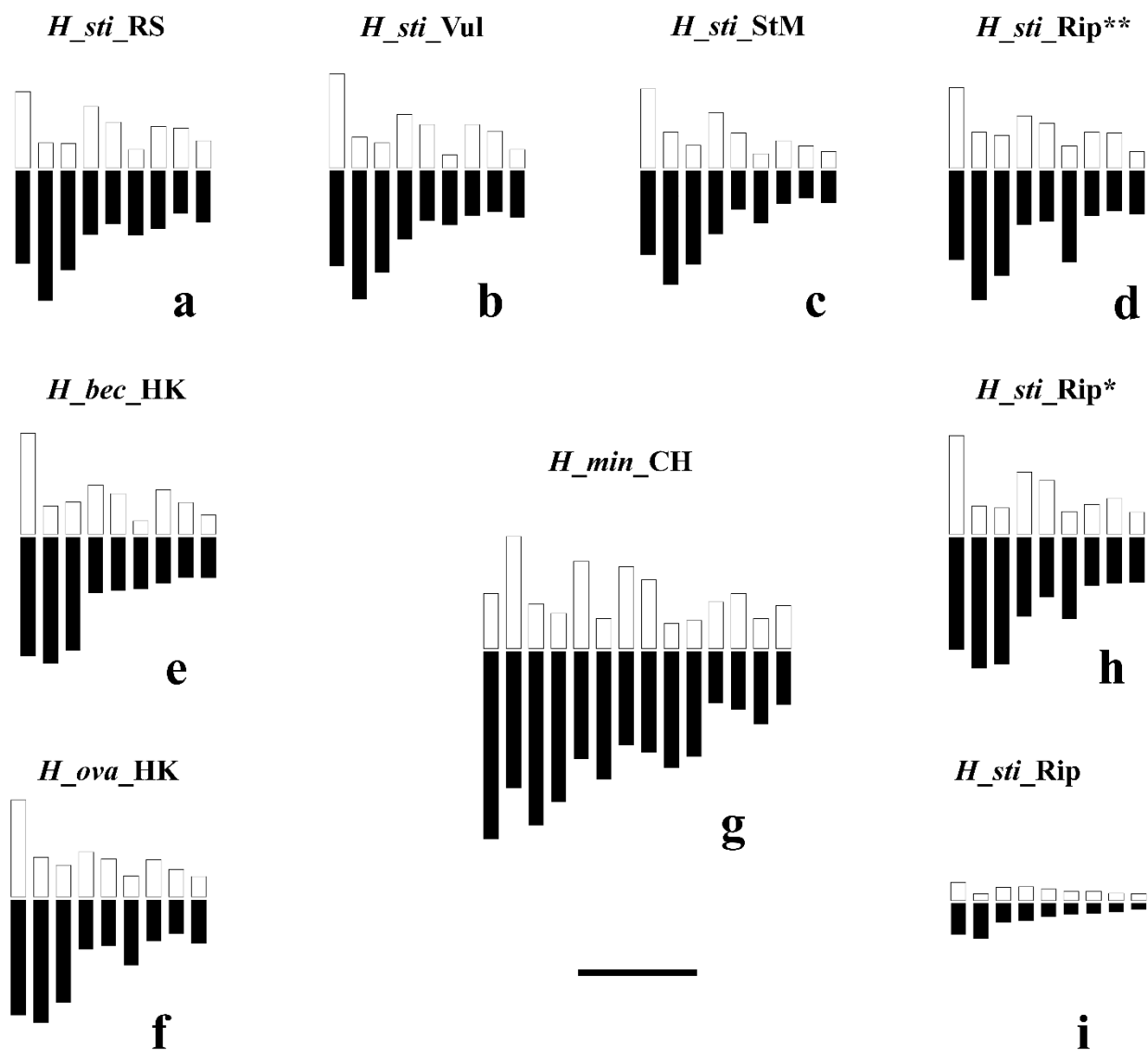


Fig. 39a-i. Idiogrammi *Halophila* spp. (a) *H. stipulacea* dallo Stretto di Messina (*H_sti_StM*); (b) *H. stipulacea* da Vulcano (*H_sti_Vul*); (c) *H. stipulacea* dal Golfo di Aqaba, Mar Rosso (*H_sti_RS*); (d) *H. stipulacea* da Riposto (*H_sti_Rip***); (e) *H. beccarii* da Hong Kong (*H_bec_HK*); (f) *H. ovata* da Hong Kong (*H_ova_HK*); (g) *H. minor* dalla Cina (*H_min_CN*); (h, i) *H. stipulacea* da Riposto (*H_sti_Rip** and *H_sti_Rip*); scale bar= 4 μ m.

I valori di lunghezza media dei cromosomi di tutte le popolazioni sono riportati in Tabella 25. La lunghezza totale del cromosoma aploide variava tra $28,72 \pm 2,32 \mu\text{m}$ nella popolazione *H_sti_StM* a $33,68 \pm 2,01 \mu\text{m}$ nella popolazione *H_sti_Rip*** (Tab. 26). Il confronto tra i valori mSCL / mCA relativi ai complementi aploidi delle popolazioni *H_sti_RS*, *H_sti_StM*, *H_sti_Vul* e *H_sti_Rip*** ha mostrato l'assenza di evidenti differenze cariomorfologiche tra di loro (Fig. 40a). Le formule cariotipiche erano identiche in tutte le popolazioni, $2n = 2x = 18 = 10m + 2sm + 6st$. I dati del cariotipo su *H. beccarii* (*H_bec_HK*) e *H. ovalis* (*H_ova_HK*) da Hong Kong, *H. minor* (*H_min_CN*) dalla Cina e *H. stipulacea* (*H_sti_Rip**) da Riposto (Sicilia, Italia) sono stati ottenuti misurando i cromosomi da immagini originali (Tab. 24-26). Le coppie cromosomiche sono state identificate come

per le popolazioni di *H. stipulacea* (Fig. 38e-h) e i dati sono stati utilizzati per costruire un ideogramma per ogni specie (Fig. 3e-h). Tutti i taxa presentavano $2n = 18$ cromosomi tranne *H. minor* con $2n = 28$ (Fig. 39g). L'ideogramma di *H. stipulacea* (*H_sti_Rip*) di Riposto (Fig. 39i) è stato costruito sui dati originali riportati da Famà (1995-6). Secondo lei, la dimensione del cromosoma variava da $1,72 \pm 0,14 \mu\text{m}$ per il cromosoma più lungo a $0,47 \pm 0,05 \mu\text{m}$ per il più piccolo (Fig. 39i). È stato costruito un cariotipo medio (*H_sti_m*) per le popolazioni di *H. stipulacea* studiate per confrontarlo con quelli degli altri taxa riportati in letteratura (Tab. 25; 26). Il confronto dei valori mSCL / mCA dei complementi aploidi tra *H_sti_m* e *H_bec_HK*, *H_ova_HK* e *H_sti_Rip* * ha sottolineato la somiglianza morfologica e dimensionale tra le corrispondenti coppie cromosomiche ad eccezione di *H_sti_Rip* (Fig. 40b). L'assenza di evidenti differenze cariomorfologiche tra le prime popolazioni risulta evidente analizzando anche i loro ideogrammi (Fig. 39a-h). Tutte queste specie presentavano le stesse formule cariotipiche di *H. stipulacea*. Al contrario, i valori mSCL / mCA hanno evidenziato le differenze di dimensioni e morfologia di *H_sti_Rip* con le altre popolazioni di *H. stipulacea* (Fig. 40b). In questa popolazione la formula cariotipica originale risultava essere $2n = 2x = 18 = 14m + 2sm + 2st$ (Figg. 39i; 40b).

In *H. minor*, il cui cariotipo aploide consisteva in quattordici coppie di cromosomi, la formula cariotipica era $2n = 2x = 28 = 14m + 2sm + 12st$ (Figg. 39g; 40d). Tuttavia, nove di questi cromosomi corrispondevano per dimensioni e morfologia a quelli presentati nei cariotipi di tutte le altre specie di *Halophila* studiate (Fig. 40d). Le altre cinque coppie apparivano come copie delle più grandi coppie I / IV metacentriche e II / III subtelocentriche e della piccola VI subtelocentrica (Figg. 39a-h; 40d). Le popolazioni di *H. stipulacea* (*H_sti_m*) e *H. ovata* (*H_ova_HK*) presentavano i valori più alti di CV_{CL} e la popolazione di *H. minor* (*H_min_CN*) era caratterizzata dal valore più alto di CV_{CI} (Fig. 40e-h). La popolazione di *H. beccari* (*H_bec_HK*) invece era caratterizzata da valori inferiori di CV_{CL} e CV_{CI} (Fig. 40e-h; Tab. 26). Secondo il diagramma a dispersione (Fig. 40e, g; Tab. 26) ottenuto dai parametri CV_{CL} rispetto a M_{CA}, *H. ovata* (*H_ova_HK*) e *H. minor* (*H_min_CN*) hanno mostrato rispettivamente il M_{CA} più basso e più alto. Il valore percentuale della forma totale (TF%) varia da 32,58 nella popolazione *H_min_CN* dalla Cina a 36,45 nella popolazione *H_ova_HK* da Hong Kong. I dati cariomorfometrici cromosomici di base di tutti i taxa sono presentati nelle Tabelle 24, 26.

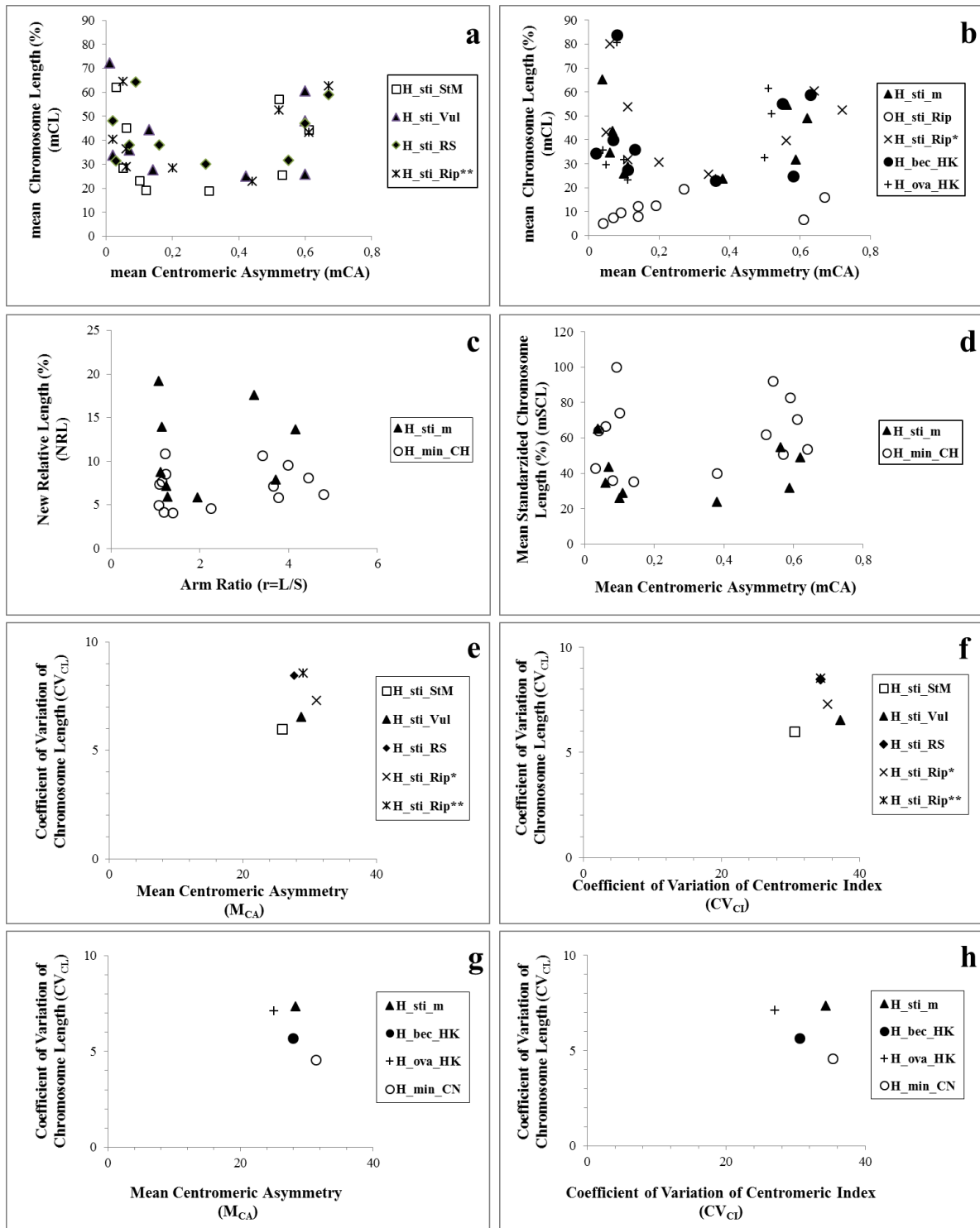


Fig. 40a-h. *Halophila* spp. (a) Confronto tra i valori medi standardizzati di ciascuna coppia di omologhi del complemento (mSCL/mCA) delle popolazioni mediterranee di *H. stipulacea* (*H_sti_StM*, *H_sti_Vul*, *H_sti_RS*, *H_sti_Rip***); (b) Confronto tra i valori medi standardizzati (mSCL/mCA) delle popolazioni di *H. stipulacea* (*H_sti_m*) con altre specie riportate in letteratura (*H_sti_Rip*, *H_sti_Rip**, *H_bec_HK*, *H_ova_HK*); (c) Confronto tra *H. stipulacea* and *H. minor* utilizzando i parametri NRL e r; (d) Confronto tra i valori medi standardizzati (mSCL/mCA) di *H. stipulacea* e *H. minor*; (e) Confronto tra i valori di asimmetria del cariotipo, espressi come MCA (asse x) e CVCL (asse y) delle popolazioni mediterranee di *H. stipulacea*; (f) Confronto tra i valori CVCI (asse x) e CVCL (asse y) delle popolazioni mediterranee di *H. stipulacea*; (g) Confronto tra i valori MCA (asse x) e CVCL (asse y) delle popolazioni non mediterranee di *Halophila*; (h) Confronto tra i valori CVCI (asse x) e CVCL (asse y) delle popolazioni mediterranee di *Halophila*.

Tabella 25. Caratteristiche dei cromosomi di specie / popolazioni di *Halophila* studiate o riesaminate. Nota: ° standardizzato sul cromosoma II di *H. minor*; °° valori della lunghezza media e della SD calcolati solo su entrambi i cromosomi di ciascuna coppia di omologhi.

Taxon		Mean chromosomes length (µm) (L, S, C)/Arm Ratio (r)/Centromeric Asymmetry (CA)													
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
<i>H_sti_Rip</i>	Long arm	1,07 ± 0,25	1,2 ± 0,12	0,66 ± 0,23	0,61 ± 0,19	0,47 ± 0,1	0,4 ± 0,16	0,36 ± 0,15	0,33 ± 0,21	0,24 ± 0,18	x	x	x	x	x
	Short arm	0,6 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,44 ± 0,05	0,46 ± 0,09	0,39 ± 0,07	0,3 ± 0,08	0,31 ± 0,1	0,25 ± 0,09	0,22 ± 0,06	x	x	x	x	x
	C	1,72 ± 0,14	1,43 ± 0,21	1,12 ± 0,12	1,09 ± 0,8	0,87 ± 0,2	0,72 ± 0,11	0,68 ± 0,03	0,61 ± 0,9	0,47 ± 0,05	x	x	x	x	x
	r	1,78	5,2	1,5	1,3	1,2	1,33	1,16	1,32	1,09	x	x	x	x	x
	CA°	0,27	0,67	0,19	0,14	0,09	0,14	0,07	0,61	0,04	x	x	x	x	x
<i>H_sti_Rip*</i>	Long arm	3,78 ± 0,22	4,4 ± 0,18	4,26 ± 0,25	2,66 ± 0,14	2,02 ± 0,08	2,74 ± 0,2	1,64 ± 0,17	1,56 ± 0,22	1,53 ± 0,01	x	x	x	x	x
	Short arm	3,31 ± 0,04	0,95 ± 0,08	0,88 ± 0,09	2,09 ± 0,1	1,8 ± 0,02	0,77 ± 0,2	1,07 ± 0,07	1,25 ± 0,01	0,74 ± 0,09	x	x	x	x	x
	C	7,09 ± 0,2	5,35 ± 0,4	4,64 ± 0,31	4,76 ± 0,14	3,82 ± 0,04	3,51 ± 0,4	2,72 ± 0,25	2,81 ± 0,4	2,28 ± 0,08	x	x	x	x	x
	r	1,14	4,63	4,84	1,27	1,12	3,55	1,53	1,24	2,06	x	x	x	x	x
	CA°	0,06	0,64	0,72	0,11	0,05	0,56	0,2	0,11	0,34	x	x	x	x	x
<i>H_sti_Rip**</i>	Long arm	3,01 ± 0,2	4,34 ± 0,19	3,55 ± 0,18	1,82 ± 0,14	1,71 ± 0,16	3,09 ± 0,2	1,53 ± 0,09	1,36 ± 0,13	1,47 ± 0,12	x	x	x	x	x
	Short arm	2,7 ± 0,09	1,2 ± 0,13	1,1 ± 0,04	1,74 ± 0,11	1,51 ± 0,09	0,74 ± 0,01	1 ± 0,06	1,19 ± 0,09	0,57 ± 0,07	x	x	x	x	x
	C	5,72 ± 0,25	5,54 ± 0,22	4,65 ± 0,1	3,57 ± 0,16	3,22 ± 0,2	3,83 ± 0,11	2,53 ± 0,14	2,56 ± 0,18	2,04 ± 0,13	x	x	x	x	x
	r	1,11	3,61	3,22	1,04	1,13	4,17	1,53	1,14	2,57	x	x	x	x	x
	CA°	0,05	0,67	0,52	0,02	0,06	0,61	0,2	0,06	0,44	x	x	x	x	x
<i>H_sti_RS</i>	Long arm	3,12 ± 0,24	4,36 ± 0,12	3,34 ± 0,09	2,17 ± 0,2	1,81 ± 0,05	2,18 ± 0,18	1,96 ± 0,15	1,44 ± 0,11	1,74 ± 0,25	x	x	x	x	x
	Short arm	2,57 ± 0,15	0,85 ± 0,08	0,83 ± 0,07	2,07 ± 0,2	1,55 ± 0,14	0,62 ± 0,08	1,41 ± 0,01	1,34 ± 0,07	0,92 ± 0,14	x	x	x	x	x
	C	5,69 ± 0,19	5,21 ± 0,1	4,17 ± 0,13	4,25 ± 0,23	3,36 ± 0,2	2,8 ± 0,08	3,37 ± 0,27	2,78 ± 0,19	2,66 ± 0,35	x	x	x	x	x
	r	1,21	5,12	4,02	1,04	1,16	3,51	1,39	1,07	1,89	x	x	x	x	x
	CA°	0,09	0,67	0,6	0,02	0,07	0,55	0,16	0,03	0,3	x	x	x	x	x
<i>H_sti_StM</i>	Long arm	2,85 ± 0,18	3,85 ± 0,09	3,16 ± 0,16	2,14 ± 0,17	1,33 ± 0,04	1,79 ± 0,03	1,13 ± 0,08	0,95 ± 0,05	1,1 ± 0,07	x	x	x	x	x
	Short arm	2,66 ± 0,14	1,2 ± 0,28	0,76 ± 0,02	1,86 ± 0,11	1,19 ± 0,09	0,48 ± 0,05	0,92 ± 0,06	0,74 ± 0,04	0,57 ± 0,09	x	x	x	x	x
	C	5,51 ± 0,32	5,05 ± 0,07	3,92 ± 0,18	4,01 ± 0,15	2,52 ± 0,09	2,27 ± 0,02	2,05 ± 0,12	1,69 ± 0,13	1,67 ± 0,1	x	x	x	x	x
	r	1,07	3,2	4,15	1,15	1,11	3,72	1,22	1,28	1,92	x	x	x	x	x
	CA°	0,03	0,52	0,61	0,06	0,05	0,53	0,1	0,12	0,31	x	x	x	x	x
<i>H_sti_Vul</i>	Long arm	3,23 ± 0,08	4,32 ± 0,18	3,43 ± 0,15	2,32 ± 0,02	1,71 ± 0,16	1,84 ± 0,21	1,52 ± 0,06	1,4 ± 0,01	1,58 ± 0,09	x	x	x	x	x
	Short arm	3,16 ± 0,01	1,05 ± 0,04	0,84 ± 0,05	1,8 ± 0,06	1,46 ± 0,13	0,45 ± 0,09	1,46 ± 0,03	1,04 ± 0,11	0,63 ± 0,01	x	x	x	x	x
	C	6,39 ± 0,09	5,37 ± 0,22	4,27 ± 0,1	4,12 ± 0,04	3,17 ± 0,3	2,29 ± 0,15	2,98 ± 0,03	2,44 ± 0,2	2,21 ± 0,12	x	x	x	x	x
	r	1,02	4,11	4,08	1,29	1,17	4,08	1,04	1,34	2,5	x	x	x	x	x
	CA°	0,01	0,6	0,6	0,13	0,07	0,6	0,02	0,14	0,42	x	x	x	x	x
<i>H_sti_m</i>	Long arm	3,19 ± 0,35	4,25 ± 0,22	3,54 ± 0,42	2,22 ± 0,3	1,71 ± 0,25	2,32 ± 0,57	1,55 ± 0,29	1,34 ± 0,23	1,48 ± 0,24	x	x	x	x	x
	Short arm	2,88 ± 0,33	1,05 ± 0,15	0,88 ± 0,12	1,91 ± 0,16	1,5 ± 0,21	0,61 ± 0,14	1,17 ± 0,24	1,11 ± 0,23	0,68 ± 0,14	x	x	x	x	x
	C	6,07 ± 0,12	5,3 ± 0,16	4,42 ± 0,18	4,13 ± 0,14	3,21 ± 0,23	2,93 ± 0,15	2,72 ± 0,21	2,45 ± 0,2	2,16 ± 0,17	x	x	x	x	x
	r	1,1	4,04	4,02	1,16	1,14	3,8	1,32	1,21	2,18	x	x	x	x	x
	CA°	0,05	0,6	0,6	0,07	0,06	0,58	0,14	0,09	0,37	x	x	x	x	x
<i>H_bec_HK</i> °°	Long arm	4,01 ± 0,05	4,25 ± 0,22	3,81 ± 0,14	1,89 ± 0,12	1,80 ± 0,13	1,74 ± 0,14	1,56 ± 0,08	1,36 ± 0,05	1,39 ± 0,07	x	x	x	x	x
	Short arm	3,39 ± 0,14	0,95 ± 0,04	1,08 ± 0,16	1,64 ± 0,08	1,37 ± 0,09	0,45 ± 0,08	1,49 ± 0,09	1,07 ± 0,04	0,64 ± 0,1	x	x	x	x	x
	C	7,41 ± 0,2	5,20 ± 0,25	4,89 ± 0,27	3,53 ± 0,11	3,18 ± 0,18	2,19 ± 0,15	3,05 ± 0,08	2,43 ± 0,04	2,03 ± 0,01	x	x	x	x	x
	r	1,22	4,47	3,52	1,15	1,31	3,86	1,04	1,27	2,17	x	x	x	x	x
	CA°	0,08	0,63	0,55	0,07	0,13	0,58	0,02	0,11	0,36	x	x	x	x	x
<i>H_ova_HK</i> °°	Long arm	3,87 ± 0,22	4,12 ± 0,12	3,45 ± 0,21	1,66 ± 0,16	1,55 ± 0,09	2,18 ± 0,12	1,38 ± 0,08	1,15 ± 0,12	1,46 ± 0,04	x	x	x	x	x
	Short arm	3,25 ± 0,12	1,33 ± 0,04	1,06 ± 0,08	1,51 ± 0,19	1,26 ± 0,11	0,71 ± 0,01	1,24 ± 0,01	0,92 ± 0,09	0,68 ± 0,04	x	x	x	x	x
	C	7,13 ± 0,35	5,45 ± 0,11	4,51 ± 0,25	3,17 ± 0,18	2,81 ± 0,13	2,89 ± 0,14	2,62 ± 0,09	2,07 ± 0,02	2,14 ± 0,08	x	x	x	x	x
	r	1,19	3,09	3,25	1,09	1,23	3,07	1,11	1,25	2,14	x	x	x	x	x
	CA°	0,08	0,51	0,52	0,04	0,1	0,5	0,05	0,11	0,36	x	x	x	x	x
<i>H_min_CN</i> °°	Long arm	6,31 ± 0,25	4,59 ± 0,3	5,84 ± 0,26	5,06 ± 0,1	3,63 ± 0,01	4,31 ± 0,07	3,15 ± 0,03	3,41 ± 0,24	3,91 ± 0,05	3,54 ± 0,04	1,74 ± 0,06	1,97 ± 0,05	2,44 ± 0,07	1,81 ± 0,06
	Short arm	1,85 ± 0,07	3,77 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,19 ± 0,16	2,93 ± 0,01	1 ± 0,17	2,75 ± 0,18	2,31 ± 0,3	0,84 ± 0,2	0,95 ± 0,16	1,56 ± 0,09	1,84 ± 0,13	1,09 ± 0,08	1,44 ± 0,02
	C	8,16 ± 0,32	8,36 ± 0,37	7,34 ± 0,03	6,25 ± 0,23	6,56 ± 0,17	5,31 ± 0,18	5,90 ± 0,2	5,73 ± 0,23	4,75 ± 0,26	4,49 ± 0,2	3,31 ± 0,15	3,81 ± 0,17	3,54 ± 0,21	3,26 ± 0,08
	r	3,33	1438	3,005	2,564	2,113	1,393	1,227	1,227	1,383	1,996	1,142	1,242	2,07	1,384
	CA°	0,54	0,09	0,59	0,61	0,1	0,62	0,06	0,04	0,64	0,57	0,05	0,03	0,38	0,11

Tabella 26. Caratteri cariomorfologici delle specie/popolazioni studiate o riesaminate in questo studio. Legenda: Ch n°= numero cromosomico; THL (µm)= lunghezza totale del complemento aploide; CV_{CL}= Coefficiente di Variazione della Lunghezza dei Cromosomi; CV_{CI}= Coefficiente di Variazione dell'Indice Centromerico; M_{CA}= Valore Medio della Asimmetria del Centromero; TF%= Forma Totale %.

Taxon	Ch n°	THL (µm)	CV _{CL}	CV _{CI}	M _{CA}	TF%
<i>H_sti_Rip*</i>	18	37,01 ± 2,51	7,29	35,29	31	34,74
<i>H_sti_Rip**</i>	18	33,68 ± 2,01	8,55	34,28	29	34,88
<i>H_sti_RS</i>	18	34,32 ± 1,85	8,46	34,28	27,7	35,43
<i>H_sti_StM</i>	18	28,72 ± 2,32	5,98	30,55	25,88	36,14
<i>H_sti_Vul</i>	18	33,26 ± 1,57	6,53	37,14	28,77	35,74
<i>H_sti_m</i>	18	33,39 ± 2,97	7,362	34,31	28,47	35,36
<i>H_bec_HK</i>	18	33,92 ± 2,43	5,67	30,55	28	35,61
<i>H_ova_HK</i>	18	32,81 ± 1,18	7,14	27,02	25	36,45
<i>H_min_CN</i>	28	76,78 ± 4,41	4,57	35,29	31,35	32,58

3.2.2. *Cymodocea nodosa*

✚ Cariotipo: metodi classici e molecolari

✚ Analisi di Citogenetica classica

Apici radicali e del germoglio d'individui di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson raccolta nel Lago Mergolo della Tonnara (Riserva Naturale Orientata Laghetti di Marinello, Oliveri), sono stati utilizzati per la costruzione del cariotipo di alcune delle piastre ritrovate.

Le osservazioni condotte sugli apici radicali della popolazione studiata hanno mostrato che le divisioni mitotiche sono state ritrovate principalmente nelle cellule della cuffia adiacenti alle cellule meristematiche iniziali, sebbene anche cellule distanti da questa zona possano andare incontro a tale fenomeno. L'andamento dei cromosomi nel ciclo mitotico si presenta regolare nell'84.32% delle divisioni fino ad ora osservate. Il nucleo si presenta provvisto di nucleolo (Fig. 41a). La divisione comincia con la condensazione della cromatina. Negli stadi iniziali della profase i cromosomi diventano visibili sotto forma di lunghi filamenti e contemporaneamente si osserva la scomparsa del nucleolo (Fig. 41b, c). In prometafase la membrana nucleare si dissolve e otto cromosomi, che sono vicini al loro punto di massima condensazione, sono chiaramente osservabili (Fig. 41d). In alcuni casi erano visibili sette o nove cromosomi. In metafase, in visione laterale, i cromosomi si presentano regolarmente allineati sul fuso mitotico (Fig 41e).

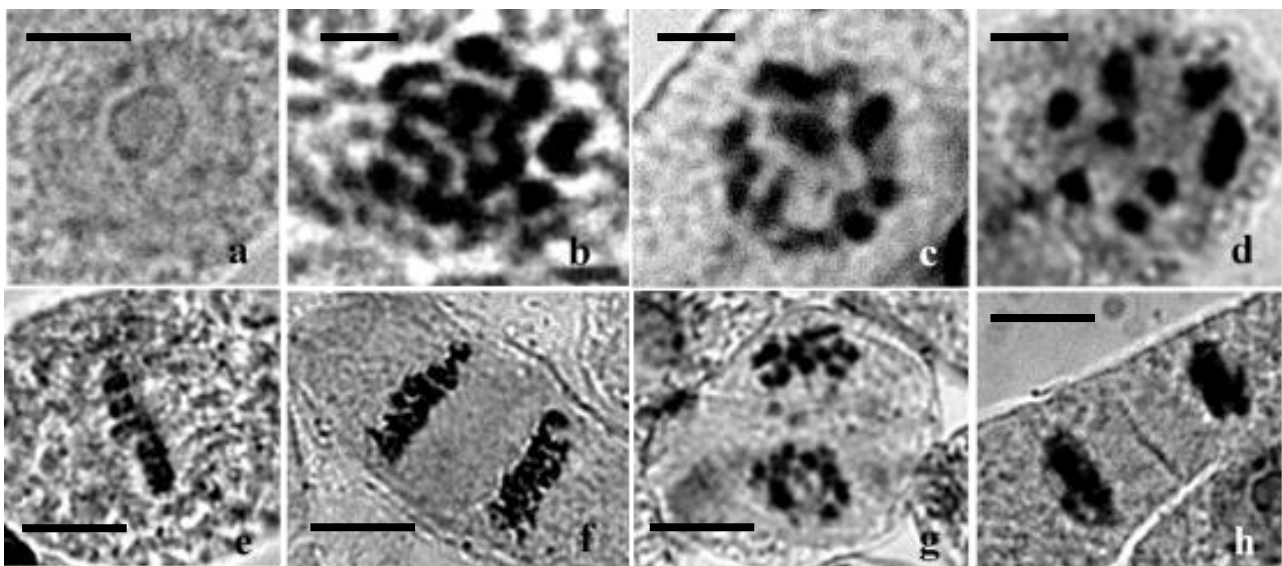


Fig. 41 a-h. *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson Laghetti di Marinello, Oliveri. (a) nucleo in interfase; nota un singolo nucleolo, scale bar= 4 μm ; (b) inizio profase, scale bar= 1 μm ; (c) tarda profase, scale bar= 1 μm ; (d) metafase in visione frontale, scale bar= 1 μm ; (e) metafase in visione laterale, scale bar= 2 μm ; (f) anafase, scale bar= 2 μm ; (g) telofase, scale bar= 2 μm ; (h) citodieresi, scale bar= 2 μm .

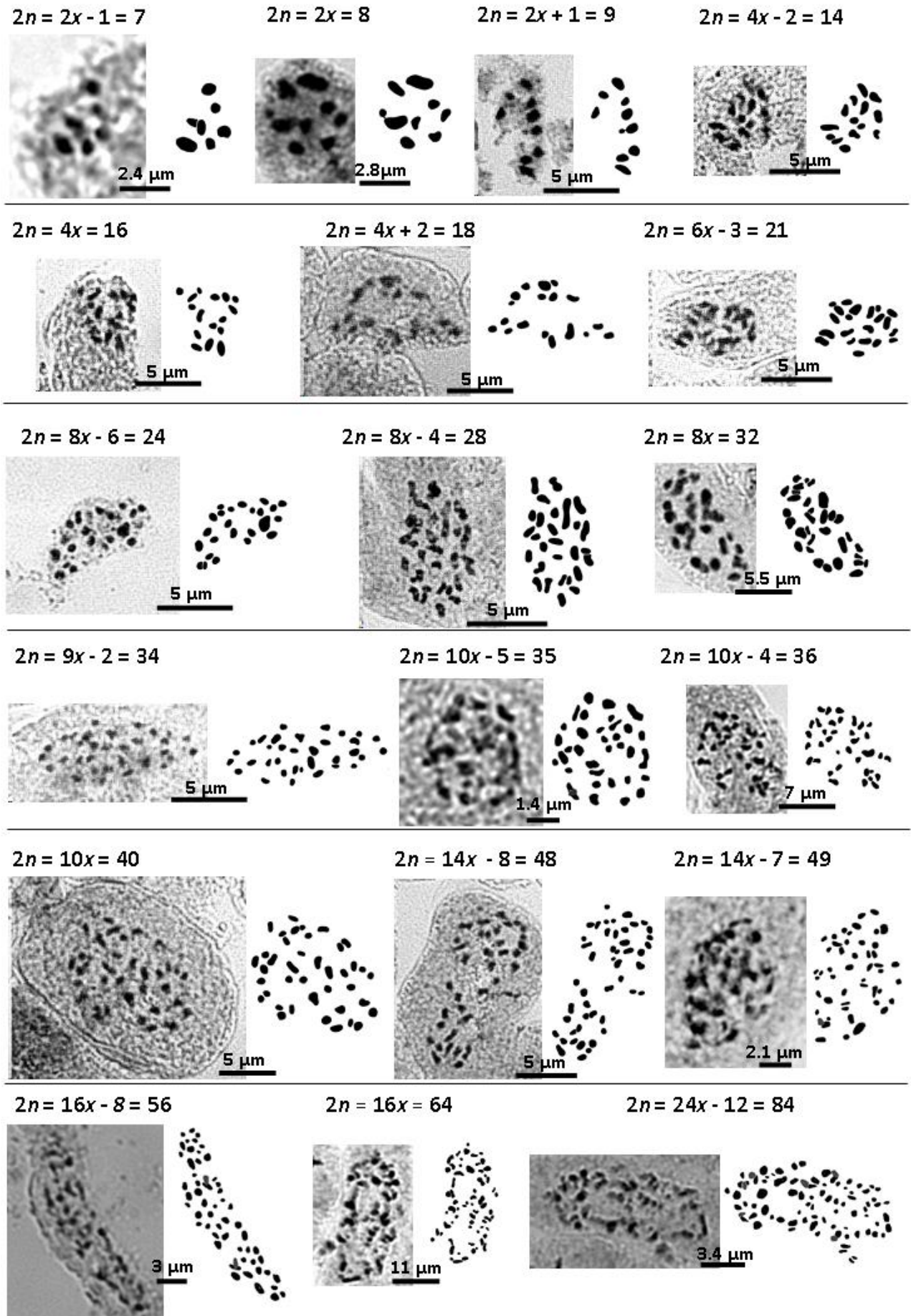


Fig. 42. *Cymodocea nodosa*. Piastre metafasiche con relativi disegni interpretativi.

Nelle altre zone dove si riscontrano divisioni, si osserva un analogo comportamento dei cromosomi in mitosi. In tali zone però il numero cromosomico riscontrato in metafase varia e si presenta simile o multiplo rispetto a quello riscontrato nelle cellule della cuffia adiacenti alle cellule meristematiche iniziali.

Nella Figura 42 sono riportati alcuni esempi di metafasi con numeri cromosomici differenti ritrovati nelle zone apicali di un singolo individuo di *C. nodosa*.

Nella Figura 43 sono riportati alcuni esempi di metafasi anomale ritrovate nelle zone meristematiche ed anche nella zona di accrescimento per divisione sia dell'apice caulinare sia radicale degli individui di *C. nodosa*. In particolare, le anomalie ritrovate riguardavano la non disgiunzione dei cromosomi, il ritardo di uno o più cromosomi in metafase o anafase, metafasi e anafasi irregolari, ponti anafasici, formazione di metafasi con più poli e micronuclei (Fig. 43).

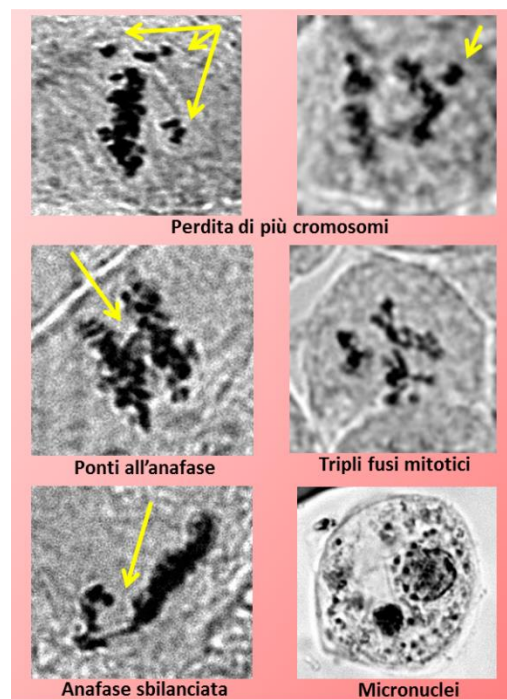


Fig. 43. *Cymodocea nodosa*. Alcuni esempi di mitosi anomale ritrovate in differenti zone apicali.

I casi di non disgiunzione dei cromosomi nella prima zona sono più frequenti mentre allontanandosi dall'apice il ritardo di uno o più cromosomi in metafase o anafase prevale.

I cromosomi sono di piccole dimensioni e mancano di evidenti caratteri morfologici (Fig. 44a). Nel citotipo $2n=8$, i cromosomi possono essere raggruppati, a coppie, in quattro categorie dimensionali diverse (Fig. 44b). La prima coppia è quella costituita dai cromosomi di dimensioni maggiori ($1.08 \pm 0.15\mu\text{m}$), probabilmente metacentrici, con uno dei cromosomi che occasionalmente mostra la presenza di un satellite. Nella seconda e nella terza categoria dimensionale, i cromosomi, anch'essi

probabilmente metacentrici, misurano $0.71 \pm 0.04 \mu\text{m}$ e $0.58 \pm 0.05 \mu\text{m}$ in lunghezza, rispettivamente. Alla quarta categoria appartengono i cromosomi di minori dimensioni ($0.50 \pm 0.03 \mu\text{m}$), anch'essi presumibilmente metacentrici.

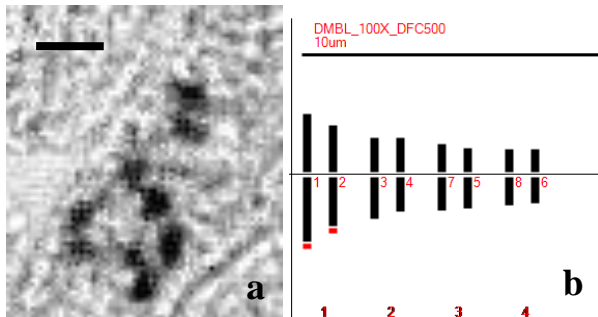


Fig. 44a-b. *Cymodocea nodosa* Laghetti di Marinello, Oliveri. (a) piastra metafasica, scale bar= 1 µm; (b) ideogramma.

Karyotype asymmetry degree (Stebbins, 1971): 1B						
Karyotype formula (Levan et al., 1964): $2n = 2x = 1M + 7m(2sat)$						
Original Table (L: long arms; S: short arms; 0: no satellite; 1: on the long arm; 2: on the short arm; 3: intercalary satellite)						
ID	L	S	L+S	L-S	L/S	Group ID Satellites
1	0.64	0.58	1.22	0.07	1.11	1 1
2	0.48	0.47	0.95	0.02	1.03	1 1
3	0.41	0.34	0.75	0.07	1.22	2 0
4	0.34	0.34	0.68	0.00	1.01	2 0
5	0.31	0.24	0.55	0.08	1.32	3 0
6	0.26	0.22	0.48	0.04	1.16	4 0
7	0.33	0.28	0.61	0.05	1.17	3 0
8	0.28	0.23	0.51	0.05	1.22	4 0
Haploid Table						
Group ID	L	S	L+S	L-S	S/L+S(%)	L/S
1	0.56	0.52	1.08	0.04	48.13	1.08
2	0.38	0.34	0.71	0.04	47.34	1.11
3	0.32	0.26	0.58	0.06	44.67	1.24
4	0.27	0.23	0.50	0.04	45.67	1.19
Other Information						
longest/shortest = 2.54						
The total haploid length of the chromosome set (Peruzzi et al., 2009), THL = 2.87						
Coefficient of Variation of Centromeric Index (Paszko, 2006), CVCI = 3.38						
Coefficient of Variation of Chromosome Length (Paszko, 2006), CVCL = 36.01						
Mean Centromeric Asymmetry (Peruzzi and Eroglu, 2013), MCA = 7.10						
Karyotype parameters table						
x	2n	THL	CVCI	CVCL	MCA	
4	8	2.87	3.38	36.01	7.10	
The relative length						
Group	L(%)	S(%)	L+S (%)	L/S	Type	
1	19.54	18.13	19.54+18.13	1.08	m	
2	13.08	11.76	13.08+11.76	1.11	M	
3	11.17	9.02	11.17+9.02	1.24	m	
4	9.39	7.90	9.39+7.90	1.19	m	
ID	L(%)	S(%)	L+S (%)	L/S	Type	
1	11.18	10.04	11.18+10.04	1.11	m	
2	8.36	8.09	8.36+8.09	1.03	m	
3	7.19	5.90	7.19+5.90	1.22	m	
4	5.90	5.86	5.90+5.86	1.01	M	
5	5.45	4.12	5.45+4.12	1.32	m	
6	4.50	3.87	4.50+3.87	1.16	m	
7	5.72	4.91	5.72+4.91	1.17	m	
8	4.89	4.03	4.89+4.03	1.22	m	

Tabella 27. Dati cariomorfometrici dei cromosomi e Indici di Asimmetria (AI) di *C. nodosa* proveniente dai Laghetti di Marinello (ME).

La lunghezza totale del complemento aploide dei cromosomi (TCL) è $2.87 \mu\text{m}$, mentre il rapporto tra il cromosoma più lungo del complemento e quello più corto è di 2.54. Nelle piastre con numeri cromosomici multipli sono sempre riconoscibili le quattro categorie dimensionali all'interno dei loro complementi cromosomali. Anche le dimensioni dei singoli cromosomi sono mantenute all'interno delle categorie dimensionali di appartenenza. In questa relazione sono riportate solamente le medie

dei dati morfometrici ottenuti su 5 piastre con citotipo $2n=8$ (Tab. 27). Inoltre, sono riportati anche i dati relativi all'analisi del cariotipo (es. indici di asimmetria) sempre in riferimento alle stesse metafasi analizzate.

✚ **Analisi di citogenetica molecolare**

❖ *Estrazione, purificazione e amplificazione del DNA*

Le analisi di citogenetica molecolare della popolazione di *Cymodocea nodosa* (Ucria) proveniente dalla Baia di Brucoli (Siracusa), eseguite durante il soggiorno presso il laboratorio dell'IPK (Gatersleben, Germania), hanno previsto l'estrazione, la purificazione e l'amplificazione di DNA genomico di giovani foglie di individui di *C. nodosa* mantenuti in acquario in condizioni controllate (Figg. 7a-m, 8a-h e 5a-b). Le analisi per l'isolamento del DNA sono state duplicate (*Cymodocea_nodosa_1* e *Cymodocea_nodosa_2*) per evitare contaminazioni che avrebbero potuto ostacolare le successive fasi di processamento.

La purezza di entrambi i campioni di DNA di *C. nodosa*, è stata valutata mediante analisi spettrofotometriche al NanoDrop 2000/2000c (Tab. 28). Le misurazioni allo spettrofotometro a microvolume sono state replicate 3 volte per ciascun campione per evitare errori durante la lettura dei risultati. In Tabella 1 sono mostrati i dati relativi alla composizione del DNA estratto. In base alle diverse lunghezze d'onda assorbite dai differenti composti presenti nel campione (260 nm per gli acidi nucleici, 230 nm per i polisaccaridi, 280 nm per le proteine) è stato possibile avere delle indicazioni sulla qualità dei campioni estratti e purificati. Il rapporto di purezza tra l'assorbanza del DNA e quella delle proteine (A260/A280) era mediamente 1,9 per i campioni di DNA del primo individuo di *C. nodosa* e 1,7 per il secondo rientrando tra i valori attesi di ~1,8 per il DNA (Tab. 1).

Tabella 28. Report analisi acidi nucleici di individui di *Cymodocea nodosa* (*Cymodocea_nodosa_1* e *Cymodocea_nodosa_2*) esaminati al NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific).

Sample	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
<i>Cymodocea_nodosa_1</i>	194,44	3,889	1,995	1,95	1,24
<i>Cymodocea_nodosa_1</i>	204,69	4,094	2,109	1,94	1,26
<i>Cymodocea_nodosa_1</i>	213,63	4,273	2,208	1,93	1,24
<i>Cymodocea_nodosa_2</i>	98,81	1,976	1,143	1,73	0,57
<i>Cymodocea_nodosa_2</i>	104,7	2,094	1,273	1,65	0,58
<i>Cymodocea_nodosa_2</i>	101,43	2,029	1,144	1,77	0,58

Il rapporto di purezza tra le assorbanze del DNA e dell'RNA (A260/A230) era 1,2 per *Cymodocea_nodosa_1* e 0,6 per *Cymodocea_nodosa_2* (Tab. 28). Questa seconda misura di controllo

del DNA, nel secondo campione era significativamente inferiore rispetto ai valori attesi compresi tra 1,8 e 2,2, indicando che la tecnica di estrazione e purificazione del DNA utilizzata richiede un'ottimizzazione poiché probabilmente sono presenti tracce di polisaccaridi e/o da agenti esterni.

Come si evince dalla Figura 44a-b, mostrandone una misurazione per ciascun campione dello spettro di assorbimento della soluzione contenente DNA isolato di *C. nodosa*, il primo individuo presenta un picco a 260nm mentre il secondo intorno a 230nm. Il grafici riportati evidenziano la differenza tra la curva del DNA puro, non contaminato (Fig. 44a) e quella del Dna impuro (Fig. 44b). Questo è determinato da errori ed imprecisioni durante l'estrazione del DNA e quindi da residui proteici e/o da agenti esterni. Il secondo spettro di assorbanza indica chiaramente che il campione di DNA di *Cymodocea_nodosa_2* è contaminato.

Tuttavia al valore di assorbanza a 260nm, la concentrazione media di DNA misurata, espressa in ng/ μ l, era 204 per *Cymodocea_nodosa_1* rispetto al 101 per *Cymodocea_nodosa_2* (Tab. 28).



Fig. 44a-b. Misure dello spettro di assorbimento del contenuto di DNA isolato dai campioni di foglie di *Cymodocea nodosa* al Nanodrop Spectrophotometer. (a) individuo 1 (*Cymodocea_nodosa_1*); (b) individuo 2 (*Cymodocea_nodosa_2*).

L'integrità del DNA purificato di *Cymodocea_nodosa_1* è stata verificata tramite le analisi del gel di agarosio dopo la corsa elettroforetica (Fig. 45).

DNA genomico isolato dal campione del primo individuo di *C. nodosa* è stato quindi usato come modello per amplificare le sequenze conservate dei geni ribosomiali (rDNA) con coppie di primer progettati 5S-rDNA, 18S-rDNA e 26S-rDNA. La quantità e la qualità dei prodotti PCR sono stati valutati tramite analisi elettrofotometriche.



Fig. 45. Analisi corsa elettroforetica su gel di agarosio. Note: 1= regioni di telomeri umani a concentrazione 0.1 μ l (hutelo_0.1); 2= regioni di telomeri umani a concentrazione 1 μ l (hutelo_0.1); 3= gene rules 100bp; 4= DNA isolato di *Zostera_noltei_1*; 5= DNA isolato di *Cymodocea_nodosa_1*; 6= DNA isolato di *Posidonia_oceanica_1*.

In Figura 46 sono riportate le dimensioni dei frammenti di rDNA amplificati (primer 5S-rDNA_Cym_1, 18S-rDNA_Cym_1 e 26S-rDNA_Cym_1) controllate tramite l'elettroforesi su gel di agarosio.



Fig. 46. Analisi corsa elettroforetica su gel di agarosio delle sequenze ribosomiali 5S-rDNA, 18S-rDNA e 26S-rDNA di *Cymodocea_nodosa* (5S-rDNA_Cym_1, 18S-rDNA_Cym_1 e 26S-rDNA_Cym_1). Note: 1= 5S-rDNA_Zos_1; 2= 5S-rDNA_Cym_1; 3= NC (controllo); 4= 18S-rDNA_Zos_1; 5= 18S-rDNA_Cym_1; 6= NC (controllo); 7= 26S-rDNA_Zos_1; 8= 26S-rDNA_Cym_1; 9= NC (controllo); 10= gene rules.

I dati ottenuti tramite la corsa elettroforetica su gel mostravano che solamente le sequenze ribosomiali 18S e 26S amplificate dal campione di *Cymodocea nodosa_1* (18S-rDNA_Cym_1 e 26S-rDNA_Cym_1) migravano. Questi dati indicavano che i campioni amplificati 18S-rDNA_Cym_1 e 26S-rDNA_Cym_1 erano puri, mentre le sequenze del campione ribosomiali 5S amplificato (5S-rDNA_Cym_1) erano contaminate. L'analisi dei dati è stata confermata dalla quantificazione del contenuto di acidi nucleici al NanoDrop. In Figura 47a-d sono riportati alcuni grafici rappresentativi di assorbanza alle diverse lunghezze d'onda dei composti in soluzioni contenenti rDNA 18S e 26 S di *C. nodosa* e di telomeri umani a diverse concentrazioni (0,1µl e 1µl).

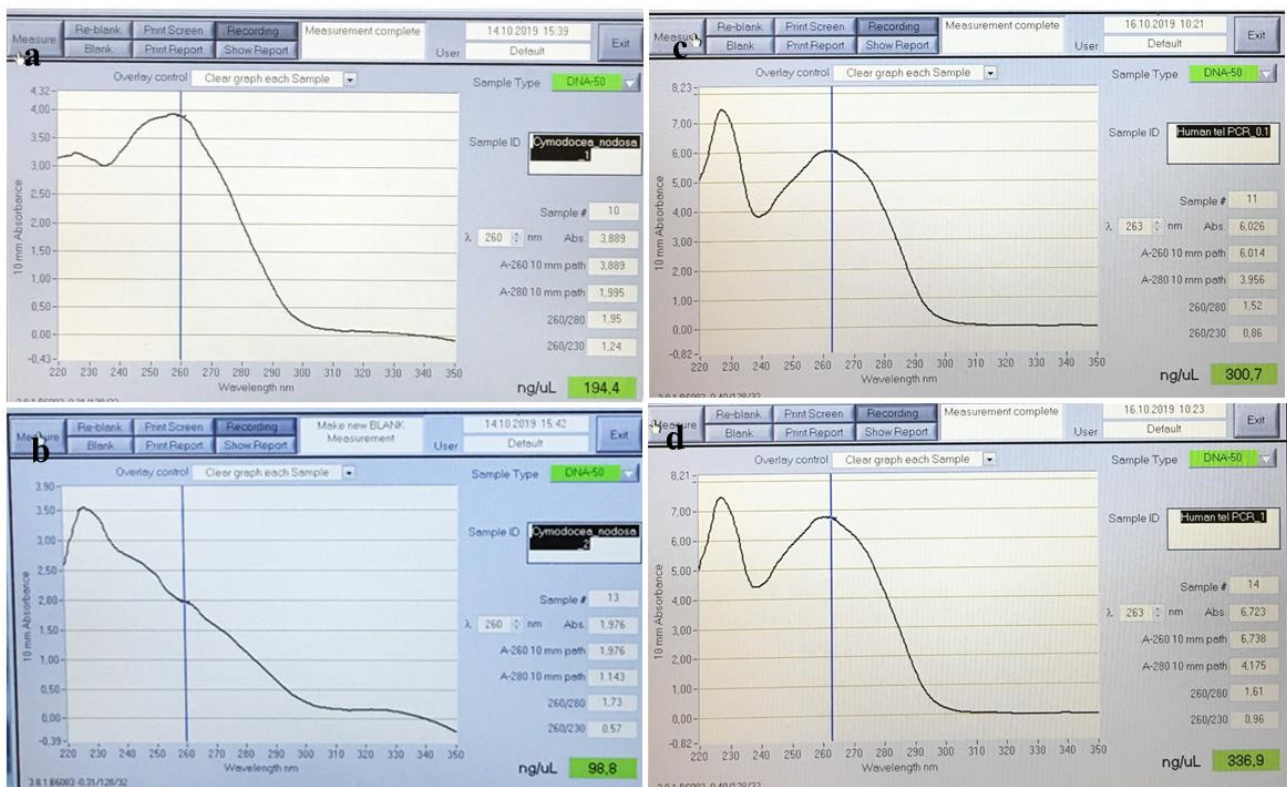


Fig. 47a-d. Misure del contenuto di acidi nucleici al Nanodrop Spectrophotometer di campioni di foglie di *Cymodocea nodosa*. (a) e (b) primer ribosomiali 18S-rDNA di *C. nodosa* (18 PCR Cym_1); (c) e (d) primer di telomeri di tipo umano amplificati rispettivamente con concentrazioni 0.1 e 1 (Human_tel_0.1 e Human_tel_1).

Osservando entrambi gli spettri di assorbanza dei campioni di 18S-rDNA e 26S-rDNA, è possibile notare la presenza di un picco a 230nm e una ‘gobba’ a 260nm (Fig. 47a-d). I valori dei rapporti di purezza tra le assorbanze 260/230 e 260/280 erano significativamente inferiori rispetto a quelli attesi. Ciò indica la presenza di contaminazione (come es. polisaccaridi) durante le procedure di estrazione del DNA.

Il rapporto di purezza tra l’assorbanza del DNA e quella delle proteine era 1,5 e quello tra il DNA e l’RNA era 0.5. Questo indicava la presenza di proteine, fenolo o altri contaminanti che assorbono

fortemente nei pressi di 280 nm. Nonostante le impurità presenti nei campioni, la concentrazione media di DNA misurata era 300 ng/μl per 18S-rDNA e 324 ng/μl per 26S-rDNA.

❖ *Fluorescent in situ hybridation (FISH) e Immunolabeling*

La Fluorescent in situ hybridation (FISH) è stata applicata su apici radicali di individui di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson per localizzare le sequenze conservate organizzate come unità ripetitive in tandem dei geni ribosomiali (rDNA) e le sequenze altamente ripetute di DNA telomerico per ottenere informazioni sul cariotipo delle specie e per il conteggio dei cromosomi in metafase.

I prodotti PCR delle regioni ribosomiali (18 PCR *Cym_1* e 26 PCR *Cym_1*) di DNA genomico isolato dal primo individuo di *C. nodosa* (*Cymodocea_nodosa_1*) e delle regioni telomeriche umane a concentrazioni 0.1μl e 1μl (human telomere_0.1 e human telomere_1) sono stati usati come modelli per l'etichettatura PCR o nick-translation per generare le corrispondenti sonde FISH.

Ciascuno di questi prodotti ottenuti è stato etichettato con tre diversi coloranti fluorescenti (per un totale di 12 reazioni) e precipitato come descritto in Hoang e Schubert (2017). I fluorocromi utilizzati per l'etichettatura diretta tramite la reazione della nick-translation erano Cy3-dUTP (Cy3), Alexa Fluor 488-5-dUTP (a488) e Texas Red-12-dUTP (TXR), mentre quelli per la marcatura indiretta erano Biotin-11-dUTP (Bio) e Digoxigenin-11-dUTP (Dig).

Le sonde generate per la marcatura diretta del campione di *C. nodosa* 18 PCR *Cym_1* e 26 PCR *Cym_1* con i fluorocromi Cy3, a488 e TXR erano rispettivamente 18S.cy3, 18S.a488, 18S.TXR e 26S.cy3, 26S.a448, 26S.TXR. Mentre quelle telomeriche di tipo-*Arabidopsis* (telo) erano telo.cy3, telo.a488 e telo.TXR.



Fig. 48. Migrazione dei dei frammenti nick generati durante la corsa elettroforetica su gel. Note: **1**= 18S.cy3; **2**= 26S.cy3; **3**= hutelo.0.1.cy3; **4**= hutelo.1.cy3; **5**= 18S.a488; **6**= 26S.a448; **7**= hutelo.0.1.a488; **8**= hutelo.1.a488; **9**=V gene ruler (controllo); **10**V 18S.TXR; **11**= 26S.TXR; **12**= hutelo.0.1.TXR; **13**= hutelo.1.TXR.

Le sonde per la marcatura diretta del campione human telomere_0.1 e human telomere _1 erano hutelo.0.1.cy3, hutelo.0.1.a488, hutelo.0.1.TXR, hutelo.1.cy3, hutelo.1.a488, hutelo.1.TXR, rispettivamente, mentre quelle per l'etichettatura indiretta con Dig e Bio erano Dig Hutelo 14S, Bio Hutelo 14S.

Le sonde sono state analizzate su gel di agarosio tramite l'elettroforesi per determinare la qualità e le dimensioni dei frammenti prodotti. In Figura 48 è mostrato il gel della corsa elettroforetica con la migrazione di ciascuno delle 12 sonde generate. Nel gel è possibile notare un buon range dei frammenti nick.

Studiando in dettaglio tutte le fasi della preparazione dei vetrini per ottenere piastre metafasiche ben distese e prive di parete cellulare e citoplasma, è stato messo a punto la tecnica di 'schiacciamento' ('Squashing Method' in accordo Cao *et al.* 2016) per la FISH e per il processo di Immunomarcatura o *Immunolabeling* su apici radicali di individui di *C. nodosa* provenienti da Lago di Ganzirri (Me) e dalla Baia di Brucoli (Sr). Utilizzando differenti combinazioni di sonde fluorescenti per la FISH, diverse prove sono state sperimentate per localizzare i loci del gene 45S rDNA (18S rDNA e 26S rDNA) e siti dei telomeri dei cromosomi della specie presa in esame. Solo i vetrini essiccati all'aria con numerose e buone metafasi diffuse (1h a temperatura ambiente (a) sia a freddo (f) sia a temperatura ambiente (a) con 8-idrossichinolina vedi Tab. 16a) sono stati utilizzati per la FISH e l'immunolabeling.

I primi esperimenti sono stati effettuati utilizzando sonde telomeriche di tipo *Arabidopsis* (telo) (TTAGGG)_n e di tipo umano (hutelo.0.1 e hutelo.1) (TTTAGGG)_n, marcate con i metodi diretti e indiretti, per comprendere che tipo di ripetizioni telomeriche erano presenti sui cromosomi di apici radicali di *C. nodosa*.

Le sonde di tipo vegetale e di tipo umano sono state ibridate, in modo indipendente, su piastre in metafase di *C. nodosa*. L'ibridazione dei cromosomi di *C. nodosa* con la sonda di tipo umano non ha rivelato alcun segnale, mentre, utilizzando la sonda di tipo vegetale, sono stati osservati segnali intensi, ma non sempre chiari, nella maggior parte delle estremità cromosomiche.

Come controllo per l'ibridazione dei telomeri di tipo umano nelle piante, sono stati utilizzati i cromosomi di topo che si sono etichettati con la sonda di tipo umano nello stesso esperimento (dati non mostrati).

Per caratterizzare ulteriormente la struttura cromosomica, è stato eseguito l'rDNA-FISH insieme alle sonde telomeriche di tipo vegetale. Utilizzando sonde rDNA 18S, 26S e sonde telomeriche marcate con fluorocromi con differente spettro di emissione, è stata ottenuta l'ibridazione contemporanea di 3 sonde rese visibili con un diverso colore su ogni piastra analizzata.

Le immagini dei segnali di fluorescenza dai cromosomi in metafase, catturate separatamente per ogni fluorocromo usando gli appositi filtri al microscopio a fluorescenza (Axioplan 2) su cui era stata montata una fotocamera (Spot 2e), sono state acquisite e combinate con il software di analisi d'immagine Metavue. Le piastrine metafasiche più chiare sono state poi elaborate e sovrapposte usando il software Adobe Photoshop CS6.

I primi test di ibridazione sono stati effettuati su vetrini di apici radicali di *C. nodosa* trattati a 1.30 h con il mix di enzimi pectinasi/cellulasi (PC) e 5 min con pepsina (PE) per (*Cym_Gan.01.08.19_1hf-8HDQ_1.30-PC_5min-P*).

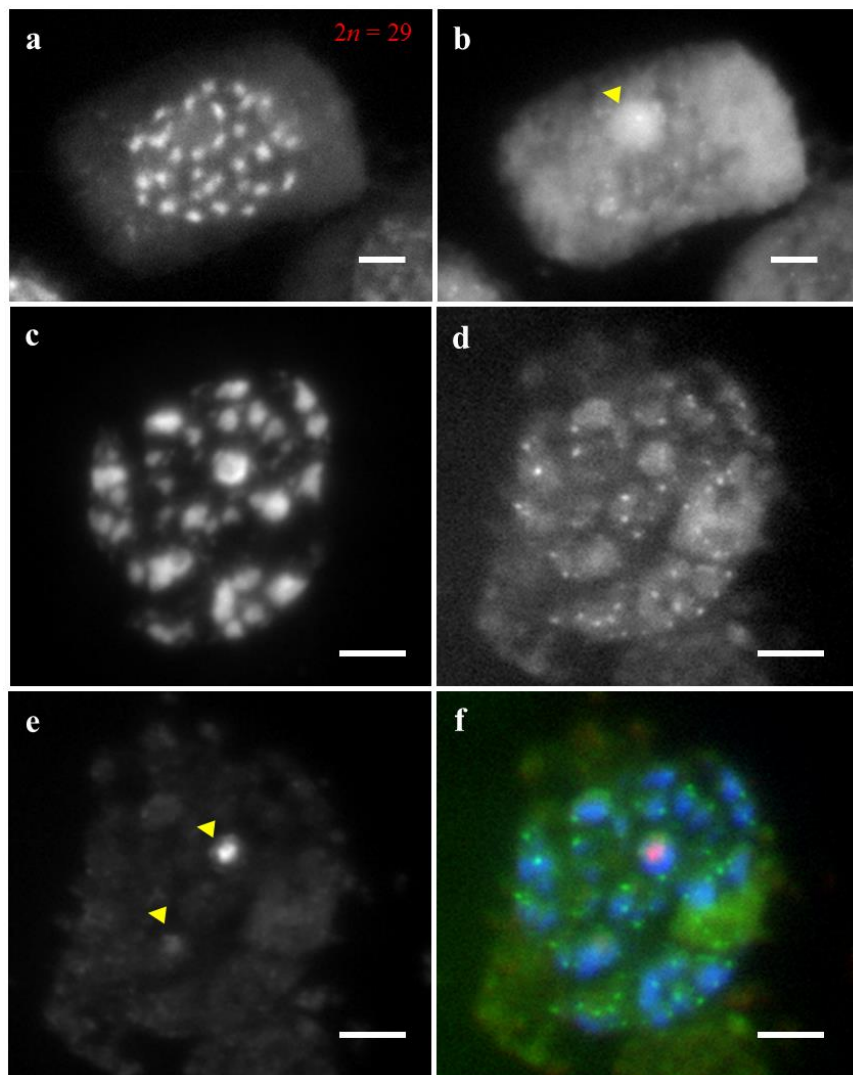


Fig. 49a-f. Fluorescent in situ hybridization a tre colori (giallo per 26S rDNA, rosso per 18S rDNA e verde per i telomeri [26S.cy3_Telo.a488_18S.TXR]) di apici radicali di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri incubati a 1h a freddo con 8-idrossichinolina e trattati per 1.30h con pectinasi/cellulasi e per 5min con pepsina (*Cym_Gan_01.08.19_1hf-8HDQ_1.30PC_5minP*). Immagine: (a) piastra metafasica ($2n = 29$) in DAPI, (b) sonda Telo.a488 (nota la presenza del nucleolo indicata con il triangolo). Immagine: (c) nucleo a cromocentri in DAPI, (d) sonda Telo.a488, (e) sonda 18S.TXR e (f) combinazione sonde 26S.cy3, Telo.a488 e 18S.TXR. Scale bar: 5 μ m.

In Figura 49a-f sono riportate alcune immagini rappresentative delle prove di ibridazione fluorescente in situ a tre colori utilizzando le sonde 26S-rDNA, 18S-rDNA e telomeriche etichettate rispettivamente in Cy3, Alexa 488 e Texas Red (26S.cy3_Telo.a488_18S.TXR) su campioni di *C. nodosa* dal Lago Ganzirri (Me).

Sebbene sia stato rilevato la presenza di un segnale in nuclei a cromocentri (Fig. 49d-f) o in interfase, non era possibile visualizzarlo e catturarlo in piastre di cromosomi in metafase (Fig. 49b).

Vetrini di apici radicali di *C. nodosa* da Ganzirri sono stati così trattati per 1.30 h con il mix di enzimi PC e per 10 min con P (*Cym_Gan_01.08.19_1ha-8HDQ_1.30PC_10minP*) e ibridati con le sonde telomeriche etichettate in Cy3 e ribosomiali 18S e 26S in a488 e TXR (*Telo2.cy3_18S.a488_26S.TXR*). Alcune immagini indicative dei vetrini sui quali è stata effettuata la FISH a tre colori, sono mostrate in Figura 50a-h.

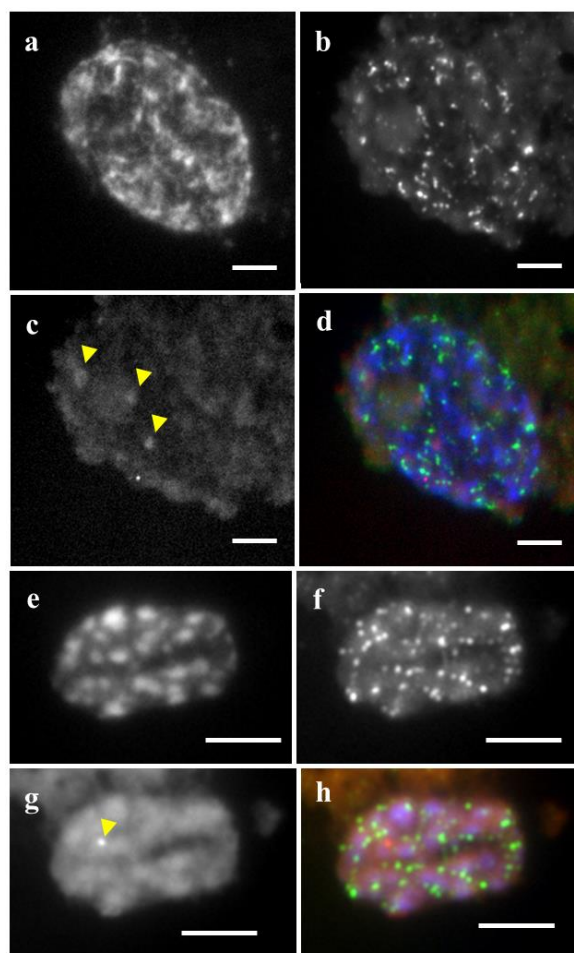


Fig. 50a-f. Fluorescent in situ hybridation a tre colori (verde per i telomeri, giallo per 18S rDNA e rosso per 26S rDNA [*Telo.cy3_18S.a488_26S.TXR*]) di apici radicali di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri incubati a 1h a temperatura ambiente con 8-idrossichinolina e trattati per 1.30h con pectinasi/cellulasi e per 10min con pepsina (*Cym_Gan_01.08.19_1ha-8HDQ_1.30PC_10minP*). Immagine: (a) nucleo in interfase in DAPI, (b) sonda Telo.cy3, (c) sonda 26S.TXR e (d) sovrapposta con Telo.cy3, 18S.a488 e 26S.TXR. Immagine: (e) nucleo in profase precoce, (f) sonda Telo.cy3, (g) sonda 18S.TXR e (h) sonde sovrapposte Telo.cy3, 18S.a488 e 26S.TXR. Scale bar: 5µm.

Come si evince dalle foto, i segnali delle sonde dei telomeri marcati in Cy3 sono stati visualizzati chiaramente in nuclei solo in interfase (Fig. 50b) e profase precoce (Fig. 50f) o in combinazione con le altre sonde ribosomiali utilizzate (Fig. 50d,h) a differenza di quest'ultime che, a volte, erano poco visibili (Fig. 50c) e difficili da catturare sovrapponendo le immagini a causa della presenza di citoplasma (Fig. 50d).

La stessa combinazione di sonde telomeriche e ribosomiali FISH (Telo.cy3_18S.a488_26S.TXR) è stata nuovamente impiegata su campioni di *C. nodosa* da Ganzirri trattati sempre con il mix di enzimi PC per 1.30 ma per 20min con pepsina (*Cym_Gan_01.08.19_1ha-8HDQ_1.30PC_30minP*).

In Figura 51a-i sono riportate alcune immagini, generate dall'ibridazione fluorescente tricolore, delle sole sequenze marcate dei siti telomerici di *C. nodosa*. Queste non mostravano alcun segnale rilevabile di ibridazione con le sonde ribosomiali 18S.a488 e 26S.TXR, ed inoltre, era possibile notare ancora un'abbondante presenza di citoplasma e parete cellulare (Fig. 51a-i).

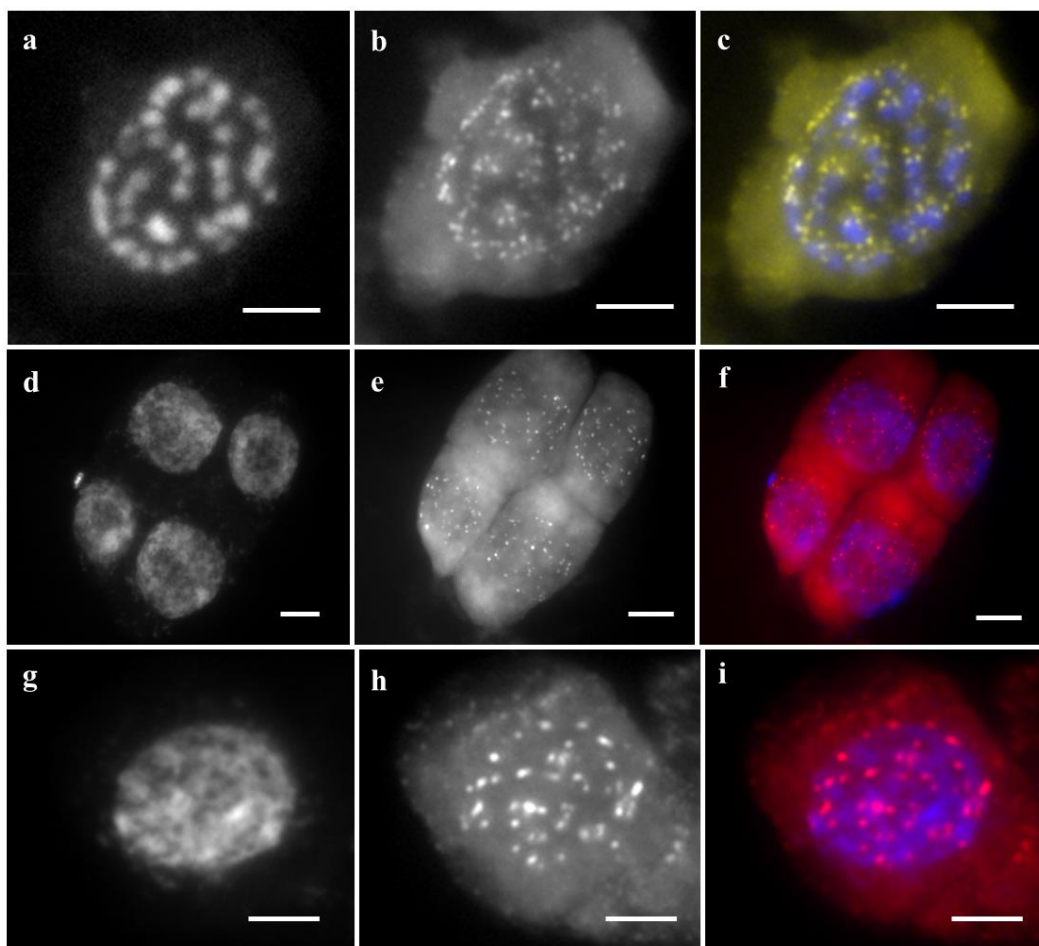


Fig. 51a-i. Apici radicali di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri incubati a 1h a temperatura ambiente con 8-idrossichinolina e trattati per 1.30h con pectinasi/cellulasi e per 15min con pepsina (*Cym_Gan_01.08.19_1ha-8HDQ_1.30PC_15minP*) per la FISH a tre colori (Telo.cy3_18S.a488_26S.TXR). Immagine: (a) metafase precoce, (b) sonda Telo.cy3; (c) DAPI e Telo.cy3. Immagine: (d) citodieresi; (e) sonda Telo.cy3; (f) DAPI e Telo.cy3. Immagine: (g) interfase; (h) sonda Telo.cy3; (i) DAPI e Telo.cy3. Scale bar: 5µm.

Poiché quasi nessuna piastra cromosomica presente mostrava la presenza di segnali fluorescenti evidenti, sono stati ulteriormente incrementati i tempi di trattamento con la pepsina fino a 30 min (*Cym_Gan_01.08.19_1ha-8HDQ_1.30PC_30minP*) e infine ibridati con la stessa combinazione di sonde fluorescenti utilizzate per la FISH precedente (*Tel.cy3_18s.a488_26s.TXR*).

Piastre rappresentative di cromosomi metafasici ibridati con sonde telomeriche marcate in Cy3 mediante ibridazione fluorescente *Tel.cy3_18s.a488_26s.TXR*, sono riportate in Figura 52a-h.

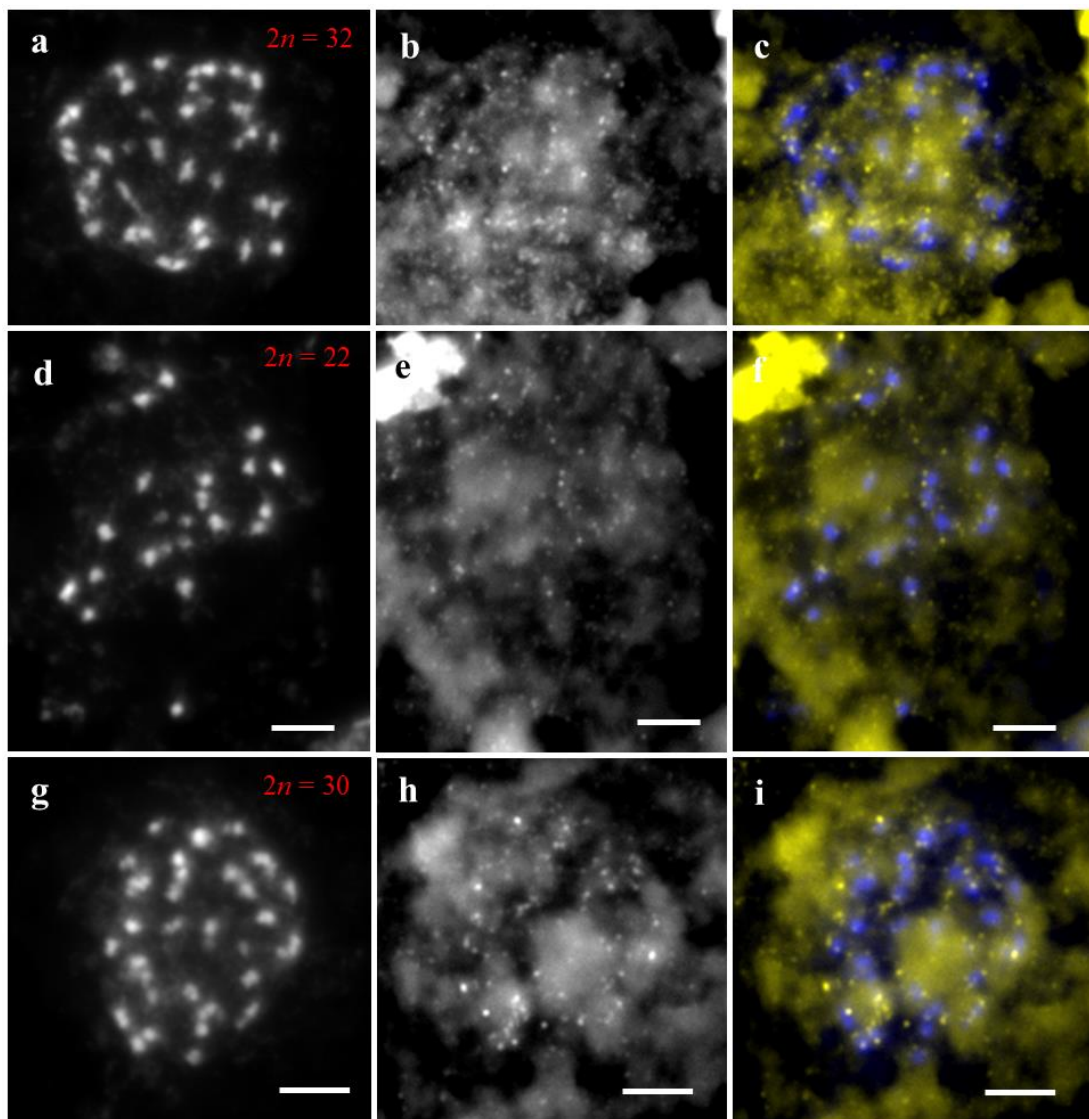


Fig. 52a-i. Piastre metafasiche di apici radicali di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri incubati a 1h a temperatura ambiente con 8-idrossichinolina e trattati per 1.30h con pectinasi/cellulasi e per 30min con pepsina (*Cym_Gan_01.08.19_1ha-8HDQ_1.30PC_30minP*) e ibridati con sonde fluorescenti telomeriche in Cy3 mediante FISH a tre colori (*Telo.cy3_18S.a488_26S.TXR*). Immagine: (a) piastra metafasica ($2n = 32$) in DAPI, (b) sonda Telo.cy3, (c) sovrapposta, DAPI e Telo.cy3. Immagine (d) piastra metafasica ($2n = 22$) in DAPI, (e) solo sonda Telo.cy3, (f) sovrapposta, DAPI e Telo.cy3. Immagine: (g) piastra metafasica ($2n = 30$) in DAPI, (h) Telo.a488, (i) sovrapposta, DAPI e Telo.cy3. Scale bar: 5 μ m.

Le immagini dei cromosomi in metafase catturate al microscopio a fluorescenza, mostravano la presenza di segnali telomerici nonostante la presenza di citoplasma non del tutto idrolizzato durante il pretrattamento dei vetrini con pepsina.

Successivi esperimenti di ibridazione fluorescente in situ con diverse combinazioni di sonde telomeriche e ribosomiali marcate direttamente con i fluorocromi Alexa Fluor-488, Cy-3 e Texas-Red, sono stati condotti su apici radicali di individui di *Cymodocea nodosa* provenienti da popolazioni del Lago Ganzirri e dalla Baia di Brucoli. Gli apici radicali di ciascuna popolazione sono stati incubati con tempi crescenti di trattamento con enzimi catalitici (prova pepsina 40 min e 1h; prova pectinasi/cellulasi per 2.45 h, 3h e 3.30h).

In entrambe le popolazioni, sono stati identificati e localizzati i loci 18S rDNA e 26S rDNA del gene 45S ed i siti telomerici.

Nelle Figure 53-66 sono mostrate alcune piastre metafasiche rappresentative dei diversi numeri cromosomici riscontrati nelle popolazioni di Ganzirri e di Brucoli della specie presa in esame, nelle quali è stata effettuata la FISH utilizzando le sonde 18S-rDNA, Telo e 26S-rDNA marcate rispettivamente in Cy3, a488 e TXR (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR).

Le popolazioni di *C. nodosa* da Ganzirri presentavano in una grande variabilità nel numero e nella posizione dei loci del gene 45S-rDNA (Figg. 53-59). In particolare, come mostrato in Fig. 53a-b, piastre metafasiche con un numero basso di cromosomi (tra 14-18) presentavano il gene 45 rDNA all'interno di una coppia cromosomica, di cui uno era localizzato al centro e l'altro in posizione terminale (Fig. 53a-b). Metafasi con un numero cromosomico intermedio (circa 24-28) mostravano due siti in posizione terminale ed uno intercalare (Fig. 54), mentre quelle con numero più alto (intorno ai 30-36) presentavano almeno un locus 45S (Figg. 55a-b, 56a-b) anche se la maggior parte presentava due locus localizzati entrambi in posizione terminale sui cromosomi più grandi (Fig. 57b), uno intercalare sui grandi e l'altro terminale sui piccoli (Fig. 58) oppure in tre terminali ed uno più piccolo intercalare (Fig. 57a). Inoltre, nei nuclei in interfase e nei nuclei a cromocentri, sono stati visualizzati da 1 fino a 5 segnali ribosomiali (Fig. 59a-d).

Anche l'intensità del segnale dei loci di rDNA variava (Figg. 53-59). Nuclei che presentavano un solo segnale, solitamente questo era intenso (Fig. 59b-d). In presenza di un singolo locus 45S, il segnale era debole in posizione terminale ed uno intenso e centrale (Fig. 53a-b). In presenza di tre segnali di r-DNA, invece, un segnale forte localizzato al centro nel cromosoma di dimensioni medie (Fig. 54) o terminale nei più piccoli (Figg. 55a, 56b), e due deboli intercalari e terminali (Figg. 54, 55a).

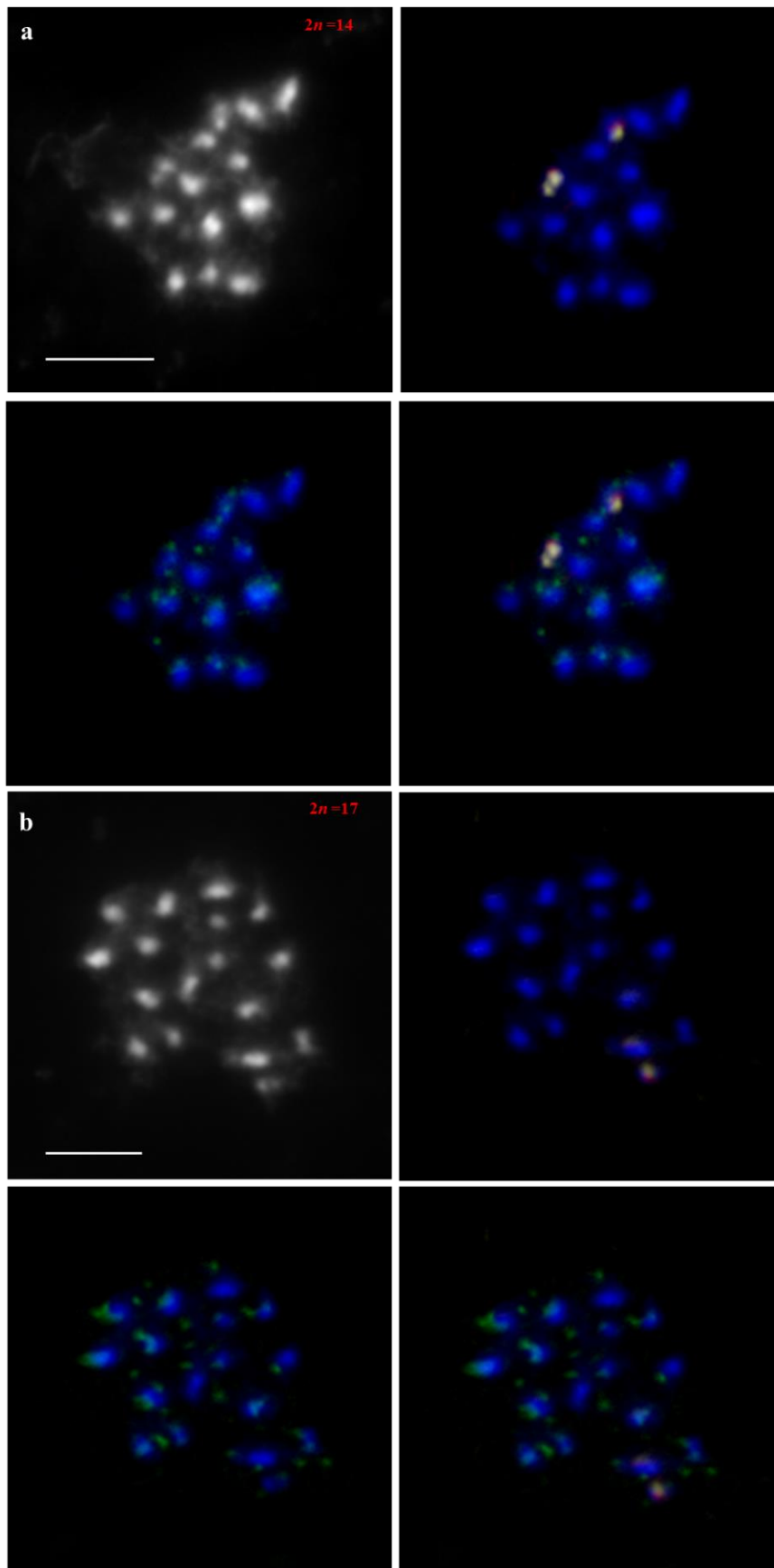


Fig. 53a-b. Numero e posizione dei loci 45S rDNA (rosso per 26S rDNA e giallo per 18S rDNA) e siti telomerici (verde) in apici radicali di popolazioni di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri (Me), trattati con 1h-a-HDQ_3h-PC_40min-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Un singolo locus del gene r-DNA caratterizzato da un segnale debole e terminale ed uno intenso e centrale; (b) un segnale forte e terminale in un cromosoma piccolo ed uno debole interstiziale. Scale bar = 5 μ m.

Aumentando il numero di loci di r-DNA (2 loci del gene), si osservava la presenza di almeno due segnali forti in posizione terminale (Fig. 57a-b) e due deboli nei cromosomi più grandi in posizione terminale (Fig. 57b) o terminale nel grande e intercalare nel più piccolo (Fig. 57a).

Le popolazioni di *C. nodosa* da Brucoli presentavano anch'esse diverse variazioni nel numero, la posizione e l'intensità del segnale dei loci del gene 45S-rDNA (Figg. 60-66).

Spesso il locus nel gene 45S si trovava all'interno di una sola coppia cromosomica (Figg. 60a-b – 62a, 63a-b -66). Analizzando diverse piastre di cromosomi in metafase con differenti numeri cromosomici, l'intensità dei segnali FISH delle sonde 18S e 26S cambiava notevolmente in relazione alla posizione all'interno della coppia di cromosomi. Infatti all'interno di un singolo locus, il 45S rDNA occupava o posizioni terminali nella coppia di cromosomi di dimensioni maggiori o intercalari all'interno della coppia di dimensioni minori, producendo, rispettivamente, due segnali intensi (Figg. 60a, 63a) o due deboli (Fig. 64b). Altre volte, invece, esso era localizzato su entrambe le posizioni differendo per intensità di segnale.

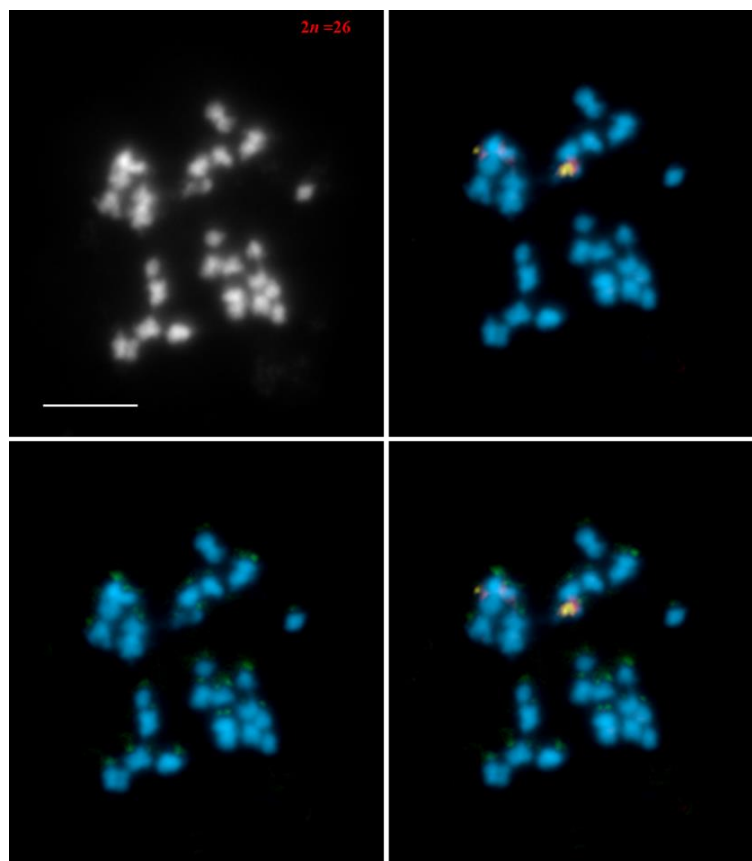


Fig. 54. Loci 45S rDNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti telomerici (verde) di una piastra metafase ($2n = 26$) di un apice radicale di *C. nodosa* da Ganzirri (Me), trattati con 1h-a-HDQ_3h-PC_40min-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Piastra metafase ($2n = 26$) mostrandote tre siti di r-DNA: un segnale intenso e intercalare e due segnali deboli di cui uno posizionati in un cromosoma grande al centro ed in uno piccolo terminale. Scale bar = 5 μ m.

Come mostrato nelle Figure 65b e 66, nelle quali sono mostrate immagini di piastre metafasiche $2n = 36$, i loci del gene 45S si trovavano anche all'interno di due coppie di cromosomi, producendo due segnali intensi nella porzione terminale di un cromosoma grande e due segnali al centro di uno di piccole dimensioni. Inoltre, in alcune piastre metafasiche, le sonde 18S e 26S hanno prodotto anche tre segnali, dei quali uno intenso in posizione terminale di uno dei cromosomi di dimensioni maggiori mentre due erano debolmente associati ai terminali di cromosomi di piccole dimensioni (Figg. 65b, 66).

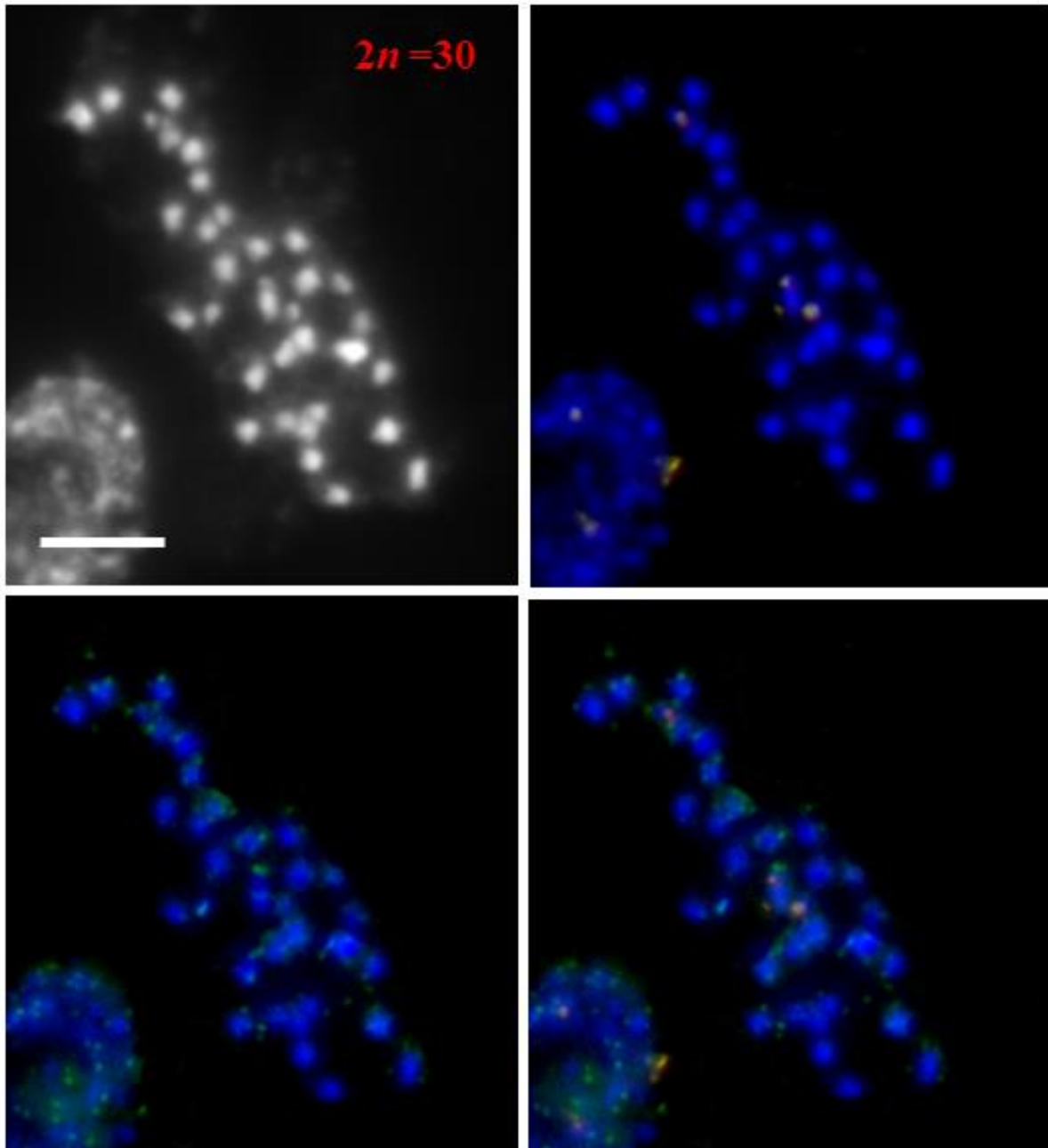


Fig. 55. Numero e posizione dei loci 45S rDNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti telomerici (verde) di una piastra metafasica ($2n = 30$) di un apice radicale di *C. nodosa* da Ganzirri (Me), trattato con 1h-a-HDQ_3h-PC_40min-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Piastra metafasica ($2n= 30$) mostrandote tre siti di r-DNA: un segnale intenso in posizione terminale di un cromosoma di piccole dimensioni e due segnali deboli di cui uno posizionato al centro di un cromosoma piccolo e l'altro terminale su uno più grande. Scale bar = 5 μ m.

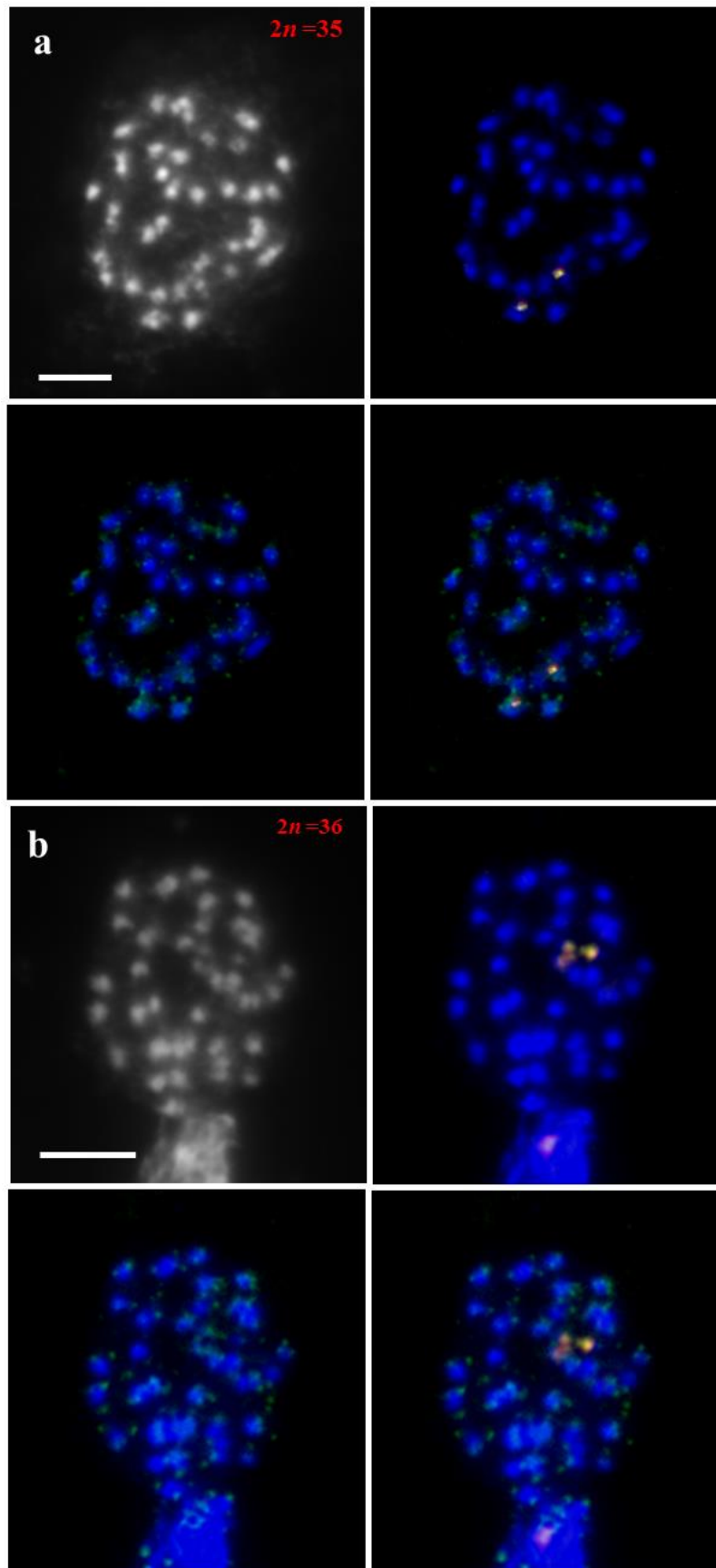


Fig. 56a-b. Numero e posizione dei loci 45S rDNA (rosso per 26S rDNA e giallo per 18S rDNA) e siti telomerici (verde) in apici radicali di popolazioni di *C. nodosa* da Ganzirri (Me), trattati con 1h-a-HDQ_3h-PC_40min-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Locus del gene 45Sr-DNA caratterizzato da: **(a)** da due segnali forti in posizione terminale; **(b)** due segnali forti in posizione terminale dei piccoli cromosomi ed un segnale debole. Scale bar = 5 μ m.

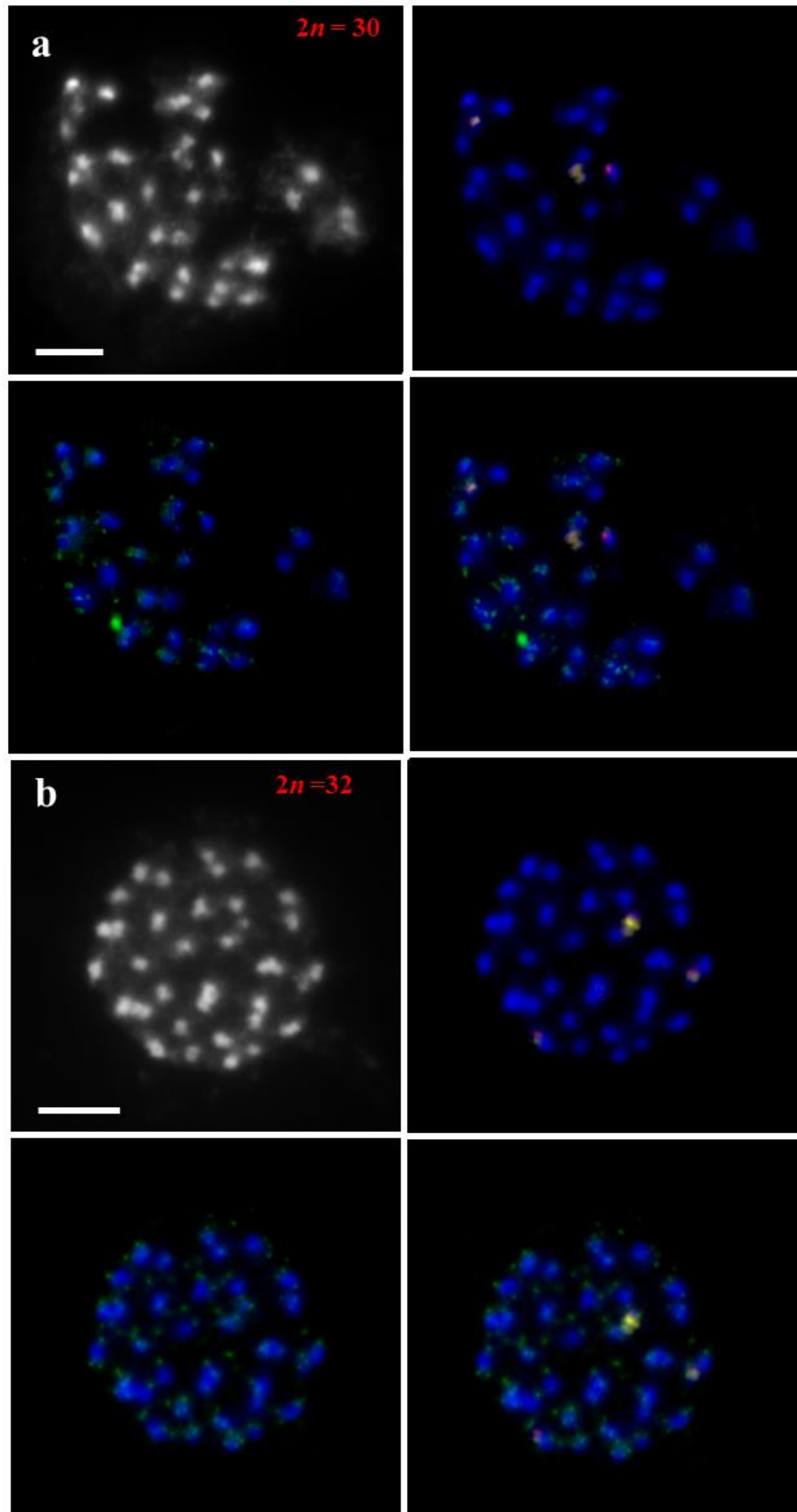


Fig. 57a-b. Variazione del numero e posizione dei loci 45S rDNA (rosso per 26S rDNA e giallo per 18S rDNA) e siti telomerici (verde) in apici radicali di popolazioni di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri (Me), trattati con 1h-a-HDQ_3h-PC_40min-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Due locus del gene 45Sr-DNA caratterizzato da: **(a)** due segnali deboli (intercalare e terminale) e due intensi in posizione terminale; **(b)** un segnale forte e terminale in un cromosoma piccolo ed uno debole interstiziale. Scale bar = 5 μ m.

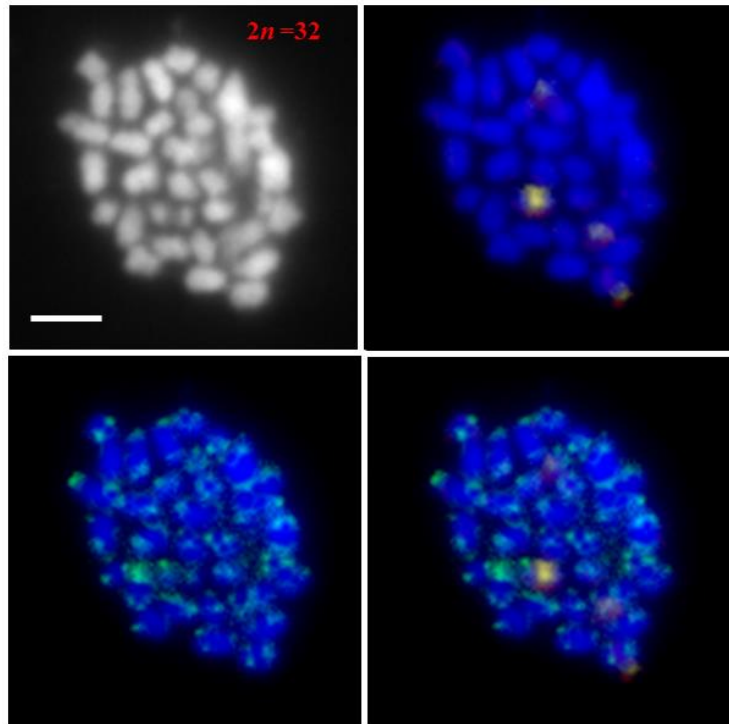


Fig. 58. Posizione dei loci 45S rDNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti telomerici (verde) di una piastra metafasica ($2n = 32$) di un apice radicale di *C. nodosa* da Ganzirri (Me), trattato con 1h-f-HDQ_2.45h-PC_40min-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Due locus del gene 45Sr-DNA caratterizzati da due segnali intensi al centro di cromosomi più grandi e due deboli terminali sui più piccoli. Scale bar = $2\mu\text{m}$.

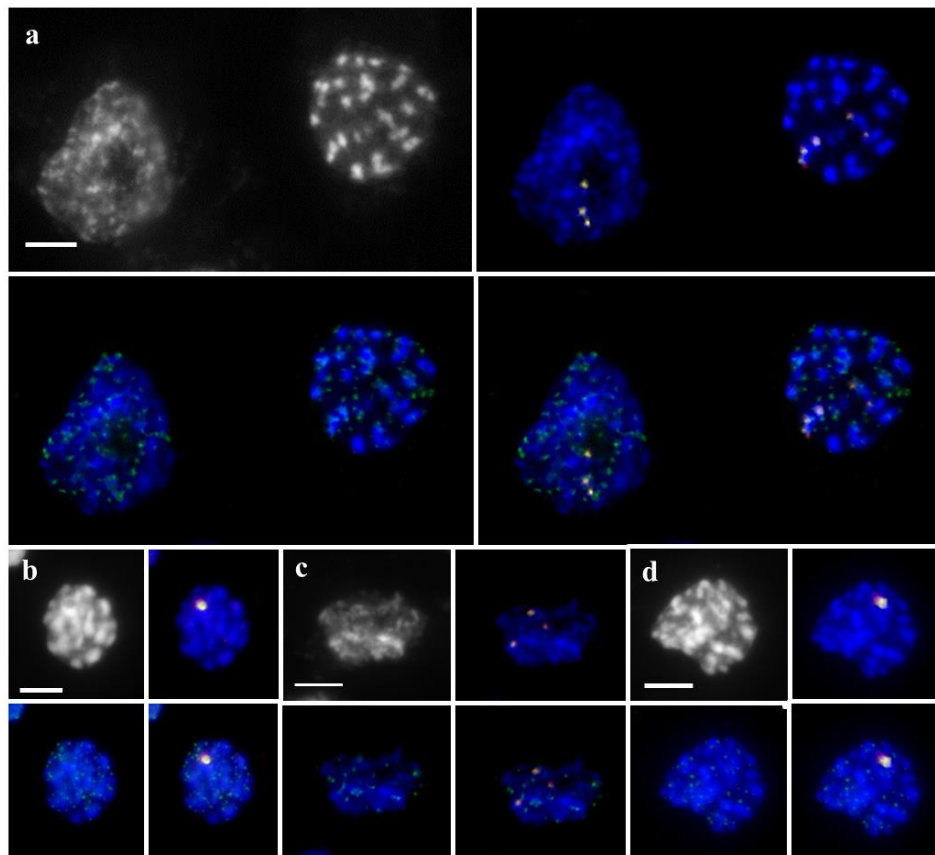


Fig. 59a-d. Variabilità nel numero e posizione dei loci 45S rDNA (rosso per 26S rDNA e giallo per 18S rDNA) e siti telomerici (verde) in apici radicali di popolazioni di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri (Me), trattati con 1h-a-HDQ_3h-PC_40min-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Loci del gene 45Sr-DNA caratterizzati da: **(a)** tre segnali forti (sinistra) e due segnali forti (intercalare e terminale) e tre deboli in posizione terminale (a destra); **(b)** un segnale forte; **(c)** tre segnali intensi; **(d)** un segnale forte. Scale bar = $5\mu\text{m}$.

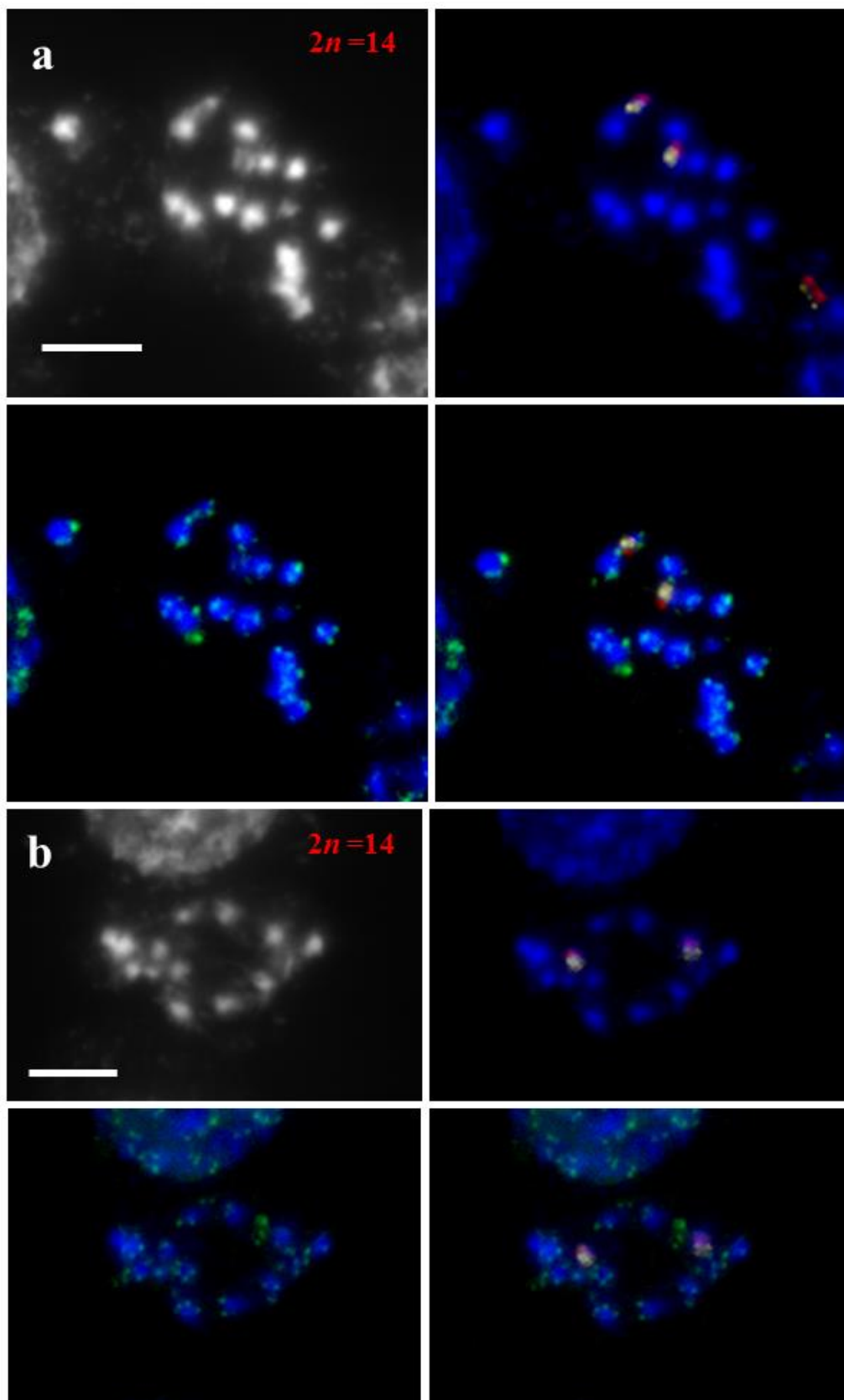


Fig. 60a-b. Localizzazione dei loci 45S rDNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti telomerici (verde) di piastre metafasiche ($2n = 14$) di un apice radicale di *C. nodosa* da Brucoli (Sr), trattato con 1h-f-HDQ_3.30h-PC_1h-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Singolo locus del gene 45Sr-DNA caratterizzato da: (a) due intensi segnali terminali di cromosomi più grandi; (b) un segnale intenso intercalare e uno debole terminale. Scale bar = 5 μ m.

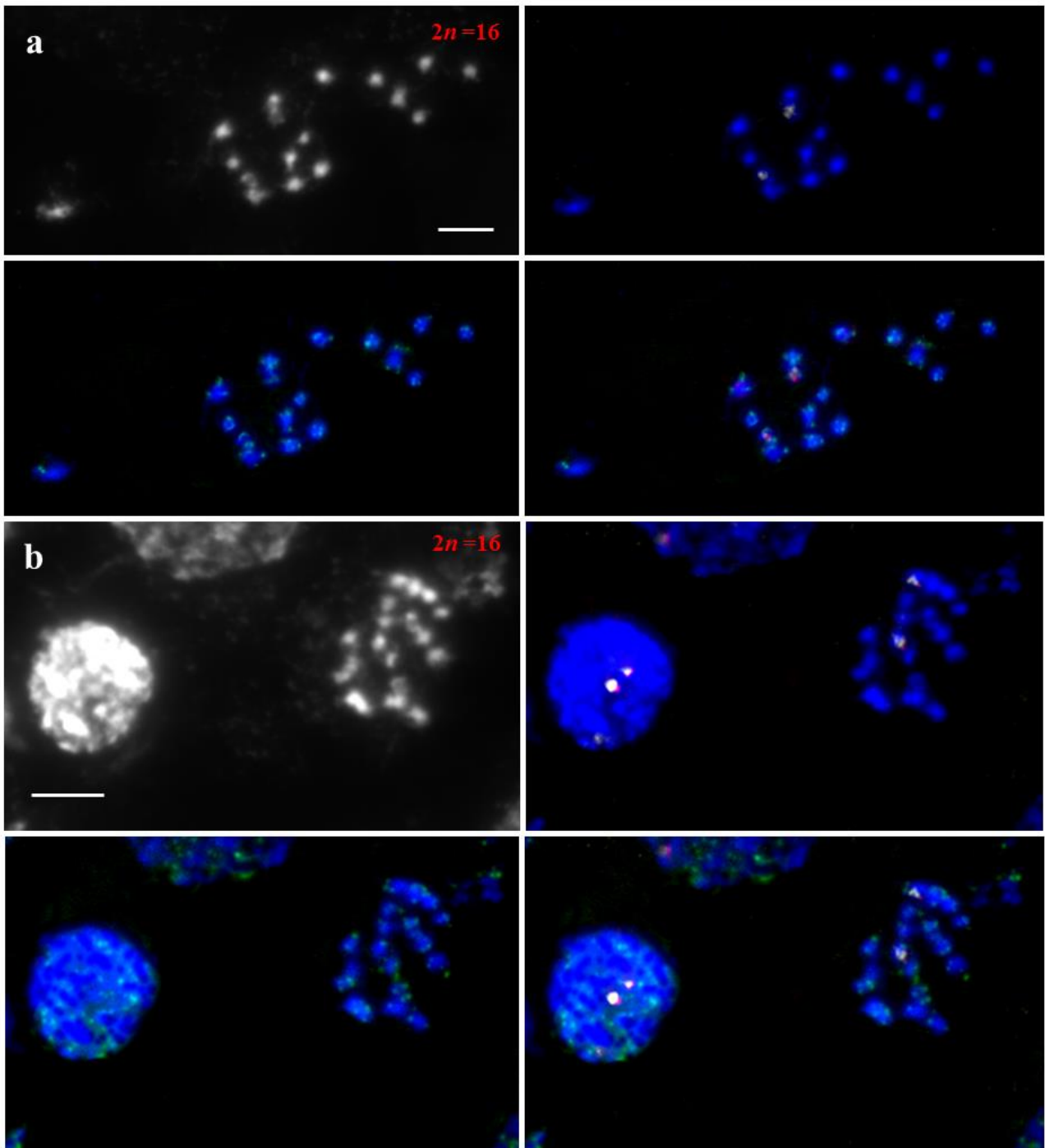


Fig. 61a-b. Localizzazione dei loci 45S r-DNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti dei telomeri (verde) di piastre metafasiche ($2n = 16$) di un apice radicale di *C. nodosa* da Brucoli (SR), trattato con 1h-f-HDQ_3.30h-PC_1h-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Singolo locus del gene 45Sr-DNA caratterizzato da due deboli segnali terminali (a) in cromosomi di grandi e piccole dimensioni; (b) in piccoli. Scale bar = 5 μ m.

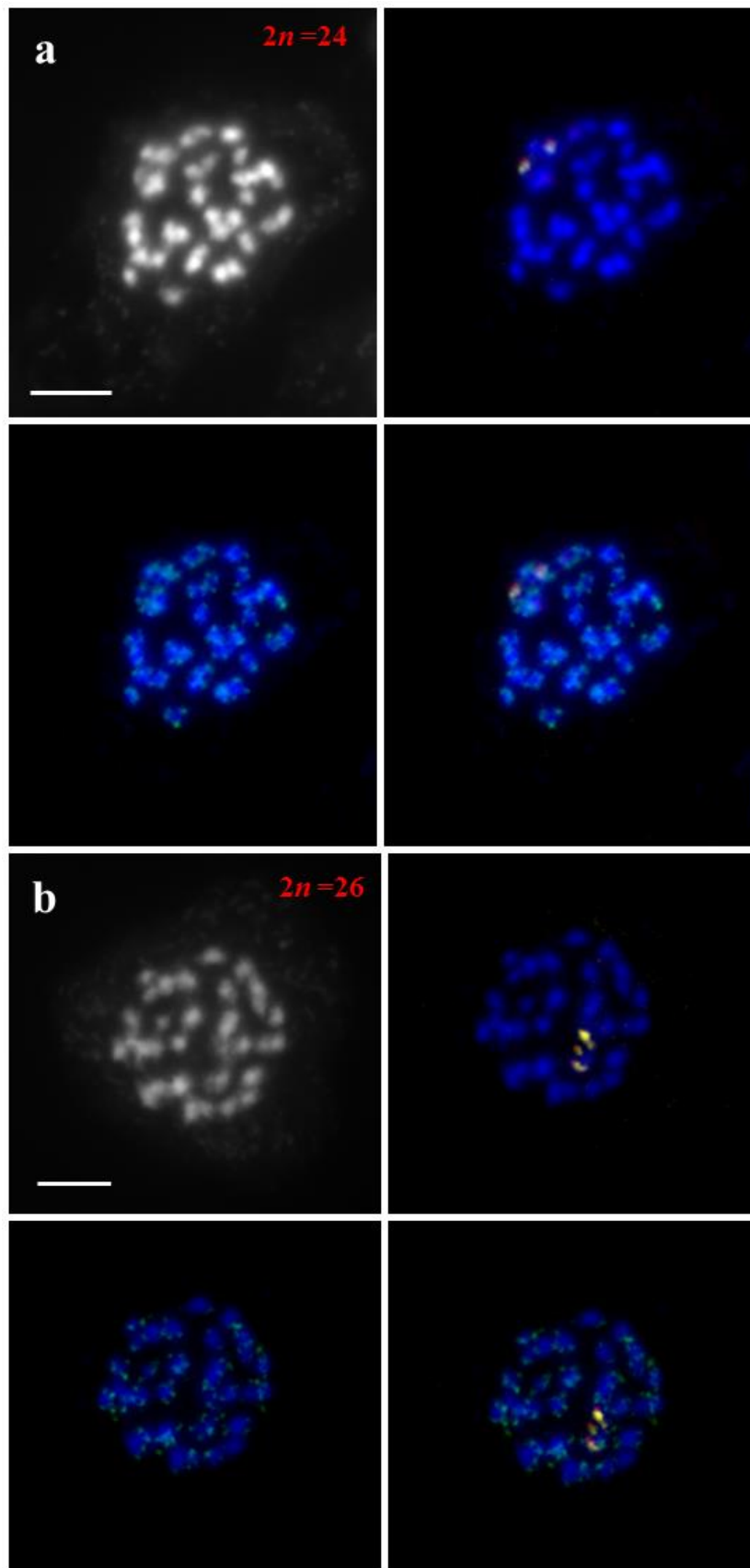


Fig. 62a-b. Variazione del numero e della posizione dei loci 45S r-DNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti dei telomeri (verde) di piastre metafasiche ($2n = 24, 26$) di un apice radicale di *C. nodosa* da Brucoli (SR), trattato con 1h-f-HDQ_3.30h-PC_1h-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Singolo locus del gene 45Sr-DNA caratterizzato da: **(a)** due segnali intensi terminali e intercalari in cromosomi di grandi e piccole dimensioni; **(b)** da un segnale intenso terminale in un cromosoma grande, e due terminale nei piccoli. Scale bar = 5 μ m.

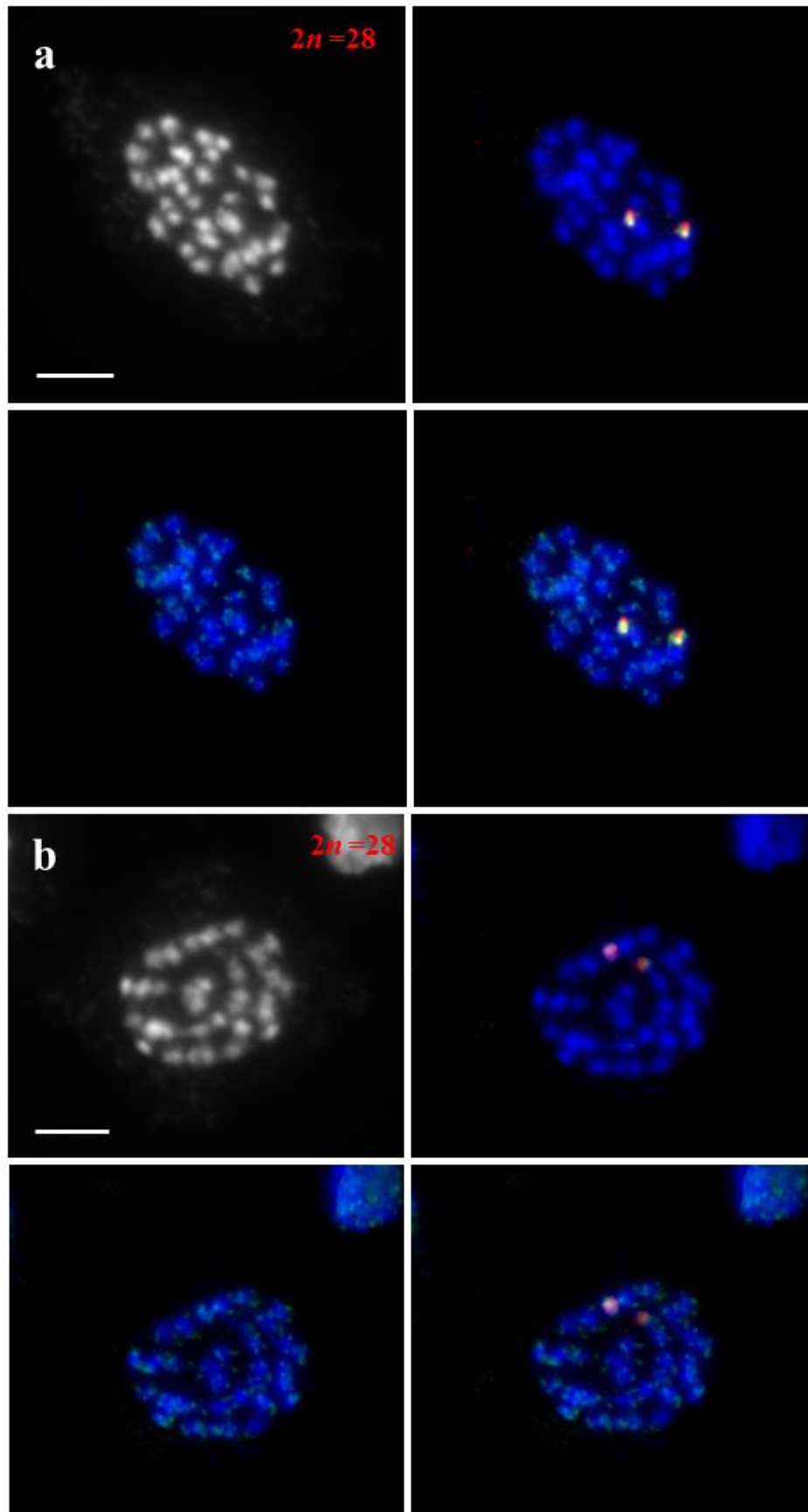


Fig. 63a-b. Distribuzione dei loci 45S r-DNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti dei telomeri (verde) di piastre metafasiche ($2n = 28$) di un apice radicale di *C. nodosa* da Brucoli (SR), trattato con 1h-f-HDQ_3.30h-PC_1h-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Singolo locus del gene 45S distinto da: **(a)** due segnali intensi terminali in cromosomi di grandi dimensioni; **(b)** due segnali intensi al centro e uno grande terminale su piccoli. Scale bar = 5 μ m.

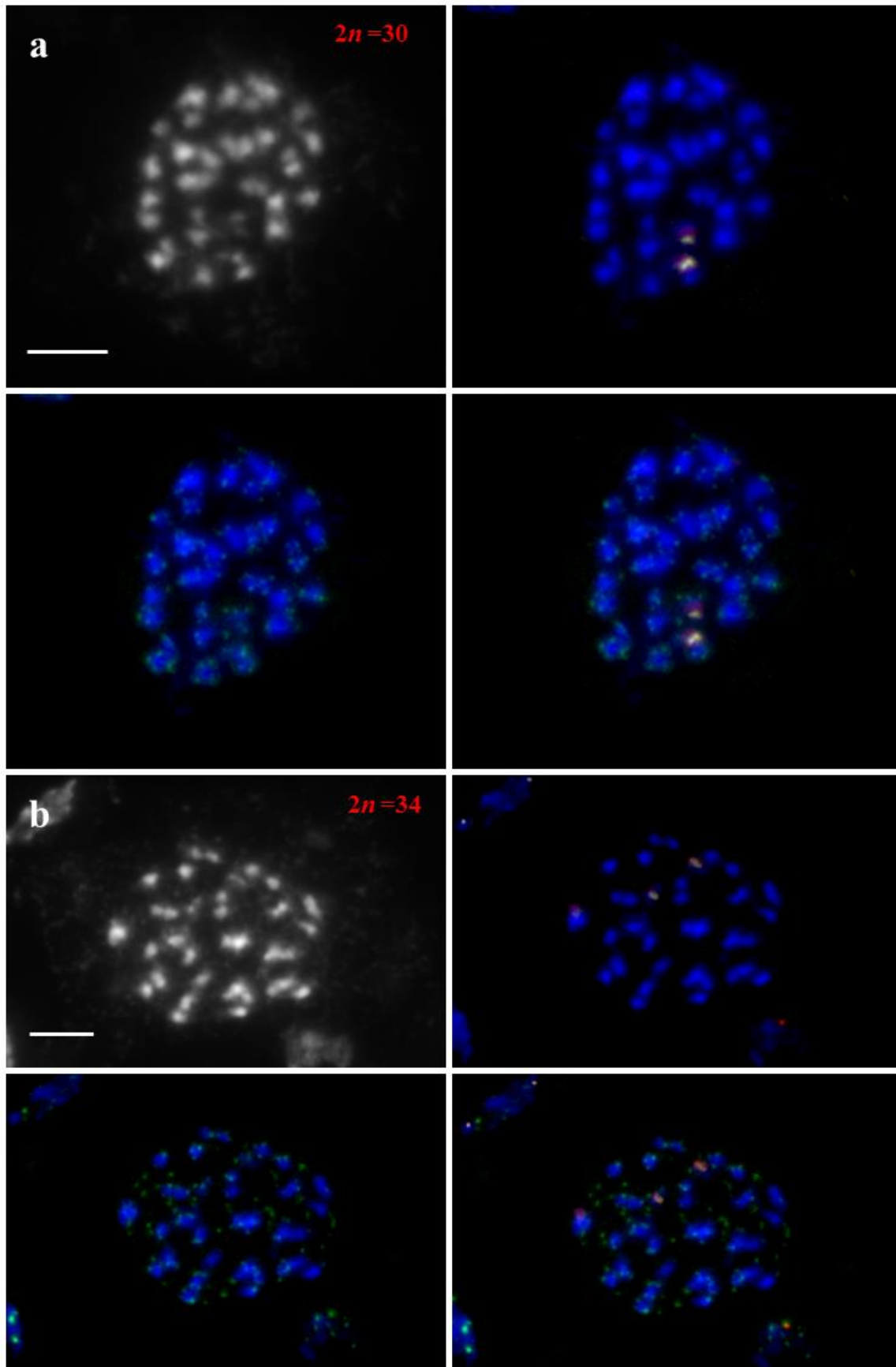


Fig. 64a-b. Loci 45S r-DNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti dei telomeri (verde) di piastre metafasiche ($2n = 30$, 34) di un apice radicale di *C. nodosa* da Brucoli (SR), trattato con 1h-f-HDQ_3.30h-PC_1h-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Singolo locus del gene 45S distinto da: **(a)** due segnali intensi terminali in cromosomi di grandi dimensioni; **(b)** due deboli segnali intercalari su piccoli cromosomi. Scale bar = 5 μ m.

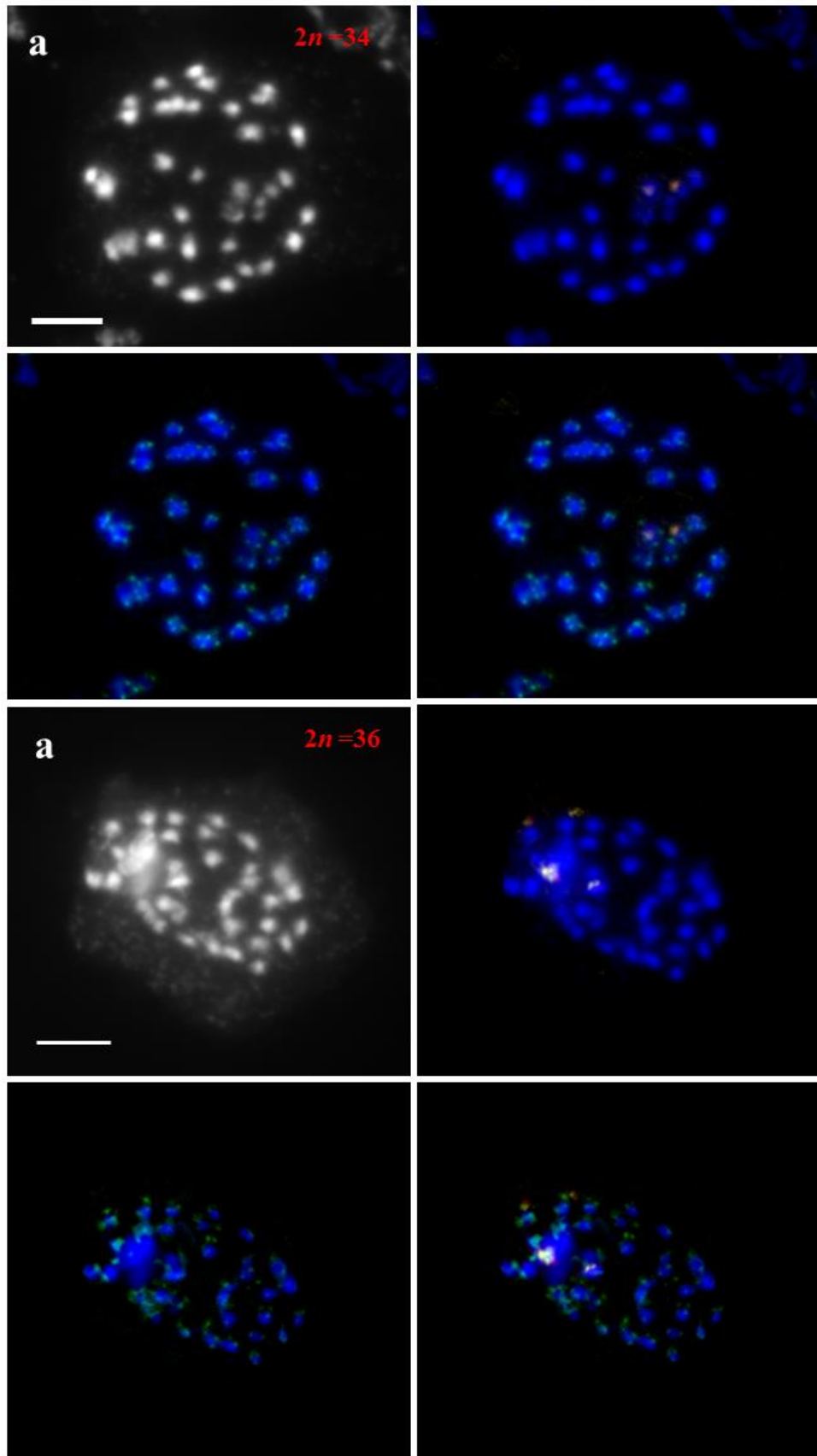


Fig. 65a-b. Distribuzione dei loci 45S r-DNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti dei telomeri (verde) di piastre metafasiche ($2n = 34, 36$) di un apice radicale di *C. nodosa* da Brucoli (SR), trattato con 1h-f-HDQ_3.30h-PC_1h-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). 2 Loci del gene 45S: (a) due segnali intensi terminali in cromosomi di grandi dimensioni; (b) due segnali terminali intensi terminali su grandi cromosomi e due intercalari sui piccoli. Scale bar = 5 μ m.

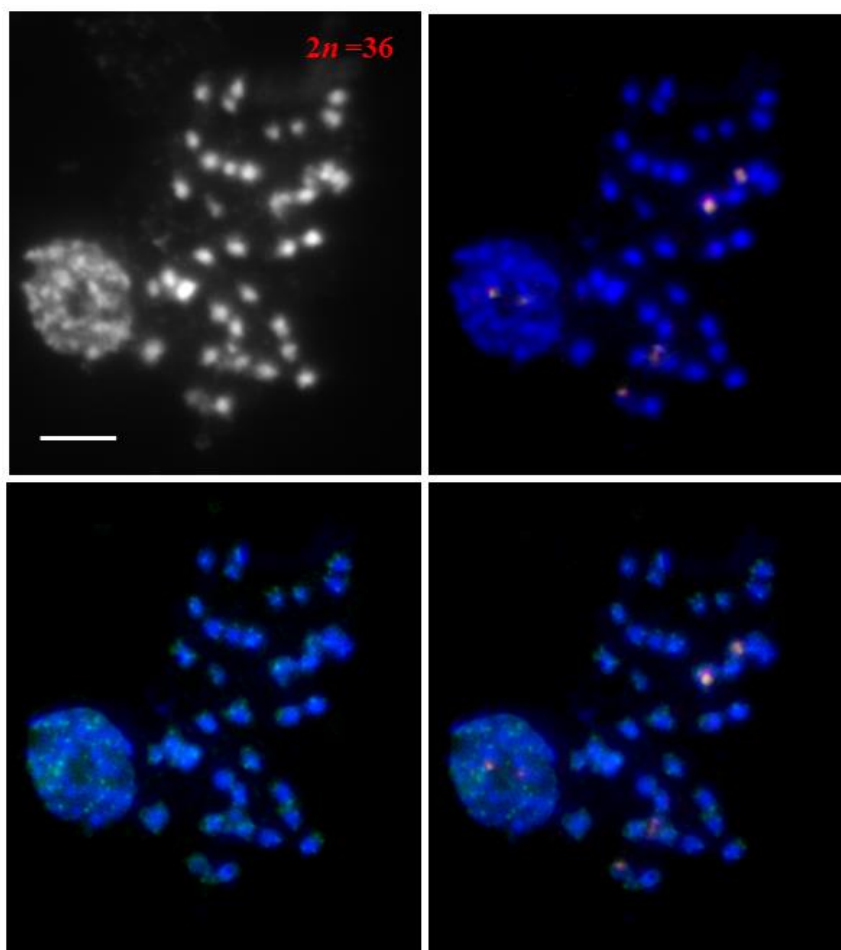


Fig. 66. Posizione dei loci 45S rDNA (rosso per 26S e giallo per 18S) e siti telomerici (verde) di una piastra metafasica ($2n = 36$) di un apice radicale di *C. nodosa* da Ganzirri (Me), trattato con 1h-f-HDQ_2.45h-PC_40min-P (F_18s.cy3_telo.a488_26s.TXR). Due locus del gene 45Sr-DNA caratterizzati da due segnali intensi terminali di cromosomi più grandi e due deboli terminali sui più piccoli. Scale bar = 2 μ m.

❖ *Analisi microscopia ad alta risoluzione*

Per garantire corretta interpretazione dei segnali delle sonde fluorescenti precedentemente utilizzate per la Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) è stata eseguita ‘super-resolution imaging’ su vetrini di *Cymodocea nodosa* con nuclei in metafase mitotica diffusa. Tale tecnica ha consentito di analizzare l'ultrastruttura e la disposizione spaziale dei segnali fluorescenti e della cromatina a una risoluzione laterale di ~ 120 nm (super risoluzione, ottenuta con un laser a 488 nm). Pertanto, applicando la tecnica di microscopia a illuminazione strutturata 3D (3D-SIM), è stato possibile analizzare più strutture etichettate a una risoluzione molto elevata, rilevando le strutture della cromatina in modo differenziato nei tessuti fissati.

In particolare, essa è stata applicata per localizzare le sequenze conservate organizzate come unità ripetitive in tandem dei geni ribosomiali (rDNA) e le sequenze altamente ripetute di DNA telomerico di apici radicali di individui di *Cymodocea nodosa*. Solo in vetrini con buone metafasi diffuse, pretrattati secondo Cao *et al.* (2016), sono state testate le sonde per la FISH etichettate con Cy3-dUTP (GE Healthcare Life Science), Alexa Fluor 488-5-dUTP e Texas Red-12-dUTP (Life Technologies),

rispettivamente per il 18S rDNA, i telomeri ed il 26S rDNA (F_18S.cy3_telo.a488_26S.TXR), e precipitate come descritto in Hoang e Schubert (2017).

Dopo aver selezionato le piastre in metafase con cromosomi ben distesi, pile di immagini ('stack') di dati grezzi SIM sono state catturate separatamente per ciascun fluorocromo usando le linee laser 561, 488 e 405 nm per l'eccitazione (Weisshart *et al.* 2016).

L'acquisizione dello stack di immagini fino a 30 sezioni per ciascuna metafase a una distanza di ~100 nm alla massima risoluzione (~1024 × 1024 pixel, 80 μm × 80 μm FOV), ha richiesto circa 4-5 minuti per ogni esperimento sequenziale a 3 colori. Una volta salvate le immagini di dati grezzi della SIM, sono state combinate tutte le sezioni di ciascuna immagine in un'unica immagine SIM in 3D (MIP, 'maximum intensity projection') tramite Zeiss Imaging Software ZEN 2.6 (blue edition) / ZEN 2.3 SP1 (black edition) (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Nelle Figura 67-71 sono mostrate piastre metafasiche con diversi numeri cromosomici riportati in apici radicali di *C. nodosa* da Ganzirri (*Cym_Gan_1h-f-HDQ_2.45h-PC_40min-P*) trattati per la FISH tricolore 18S.cy3_telo.a488_26S.TXR (siti dei telomeri in verde ed i loci del gene 45S rDNA in rosso).

Nella Figura 67a-b sono visibili le sonde telomeriche che evidenziano la presenza di $2n = 21$ cromosomi (a) e $2n = 36$ (b). In Figura 68a-b sono riconoscibili segnali telomerici (verde) che evidenziano la presenza di 18 cromosomi nella piastra (a) e 24 cromosomi nella piastra (b). Inoltre, mentre le sonde ribosomiali (rosso) per il 45S non sono localizzabili poiché presentano una colorazione diffusa.

Le piastre riportate nella Figura 69a-b mostrano le sonde telomeriche prevalentemente in posizione terminale, come meglio visibili negli ingrandimenti riportati. La piastra (a) mostra $2n = 33$, mentre quella (b) $2n = 34$ e la 8(c) $2n = 35$. Le immagini riportate in Figura 70a-b sonde ribosomiali dei geni 45S-rDNA in rosso oltre a segnali telomerici in verde. Come visibile nell'ingrandimento dell'immagine 70a il gene 45S rDNA si trova in posizione mediana in uno dei cromosomi di piccole dimensioni, mentre gli altri due sono localizzati in una posizione terminale sia in un cromosoma di piccole dimensioni sia in uno di taglia maggiore. Nella piastra metafasica della Fig. 70a-b sono stati contanti $2n = 34$ cromosomi (a) e $2n = 30$ cromosomi (b). In Figura 71a-c sono sempre riportate piastre cromosomiche in cui sono visibili i segnali dei siti telomerici. I numeri cromosomici ritrovati sono $2n = 36$, $2n = 32$, $2n = 34$ e $2n = 36$, rispettivamente nelle Figure 71a, 71b, 71c e 71d. Inoltre, le immagini ingrandite dei cromosomi evidenziano come la struttura subnucleare della cromatina, visibile al microscopio ad alta risoluzione, indica la sua integrità, confermando che la fissazione dei cromosomi è avvenuta in modo corretto (Fig.71a-d).

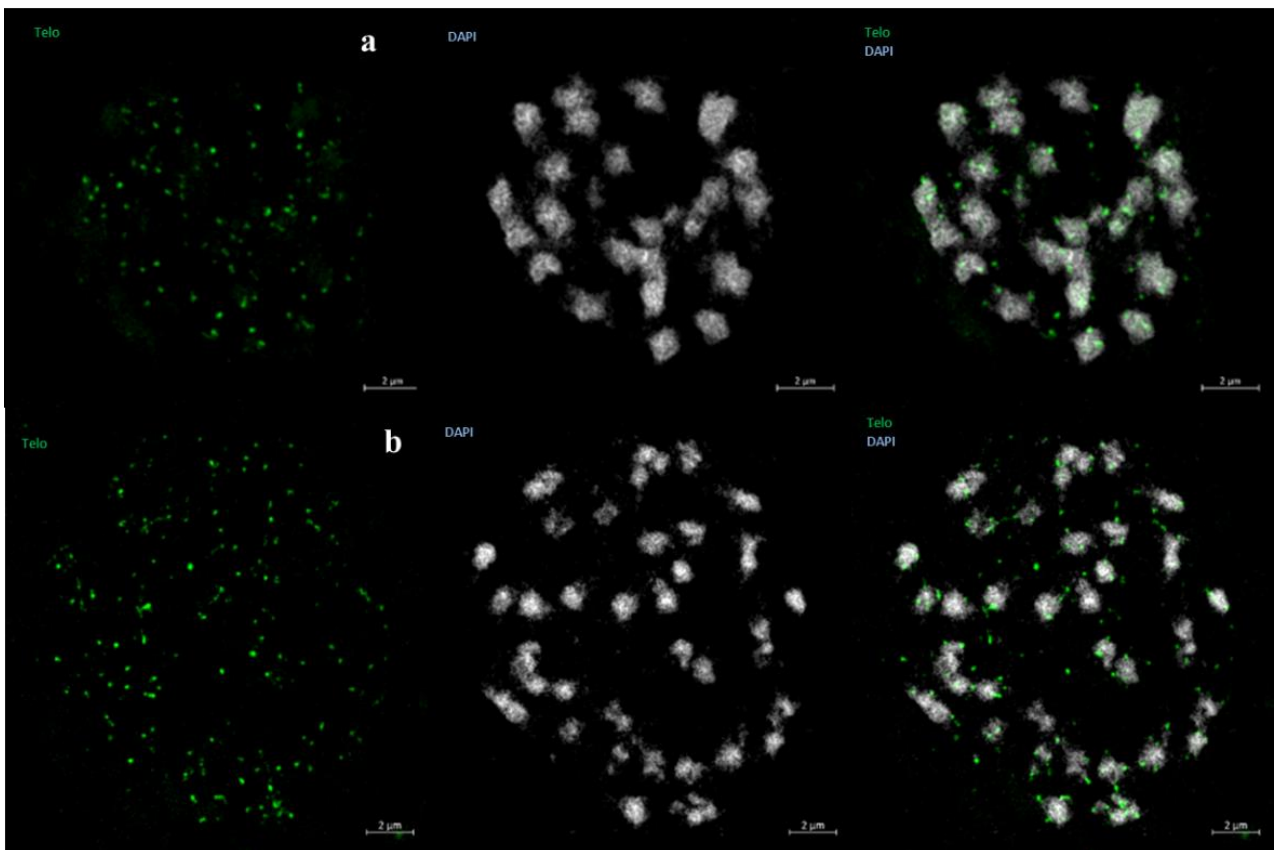


Fig. 67a-b. Immagini di piastre metafasiche ottenute con la super-resolution imaging per la Fluorescent in situ hibridation a tre colori in apici radicali di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri. Piastre metafasiche: **(a)** $2n = 21$; **(b)** $2n = 36$.

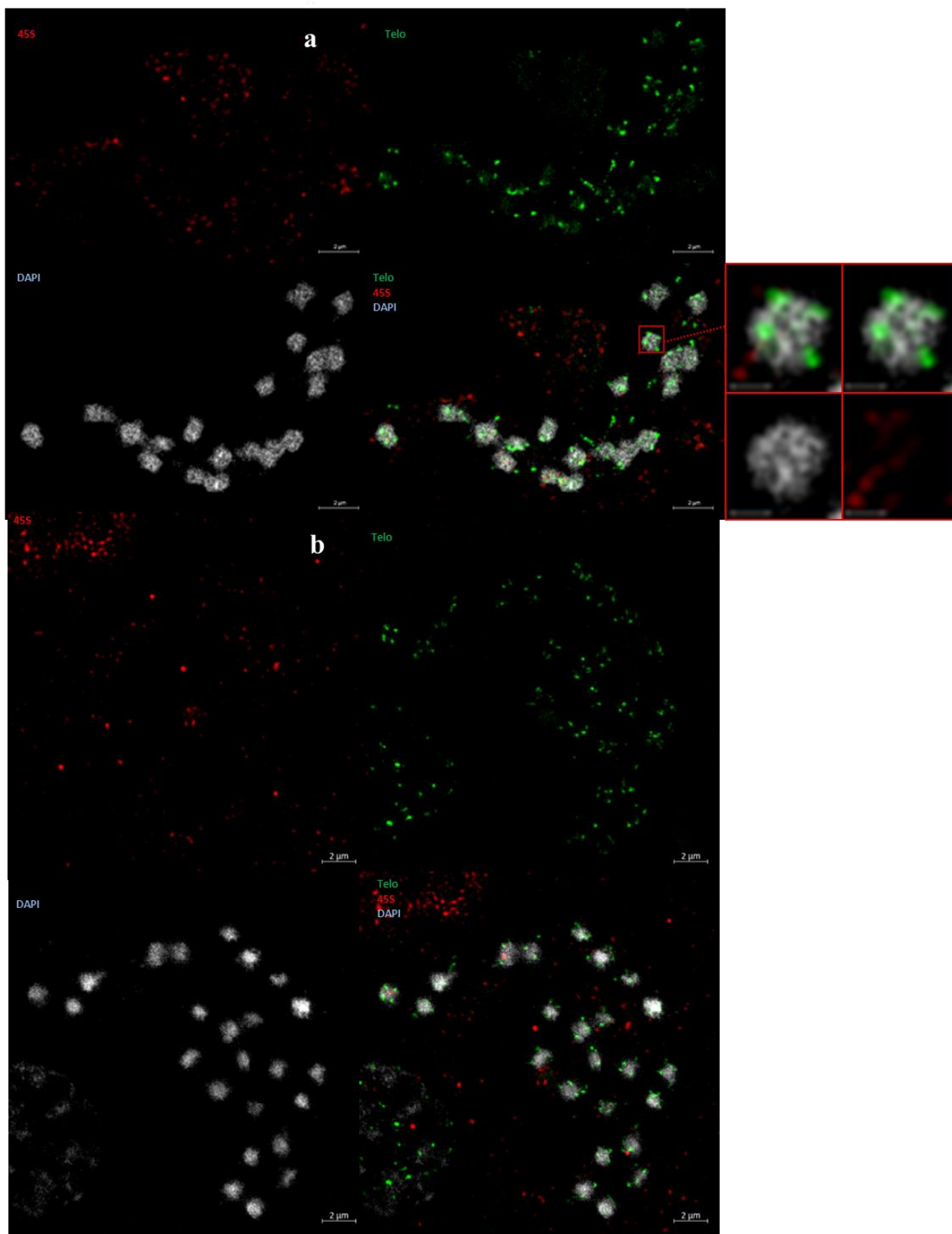


Fig. 68a-b. Immagini di piastre metafasiche ottenute con la super-resolution imaging per la Fluorescent in situ ibridation a tre colori (in rosso le sonde ribosomiali del gene 45S-rDNA ed in verde quelle telomeriche) in apici radicali di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri. Piastre metafasiche: (a) $2n = 18$; (b) $2n = 24$. Nota nell'ingrandimento di uno dei cromosomi più piccoli della piastra (a) in cui sono visibili i segnali telomerici.

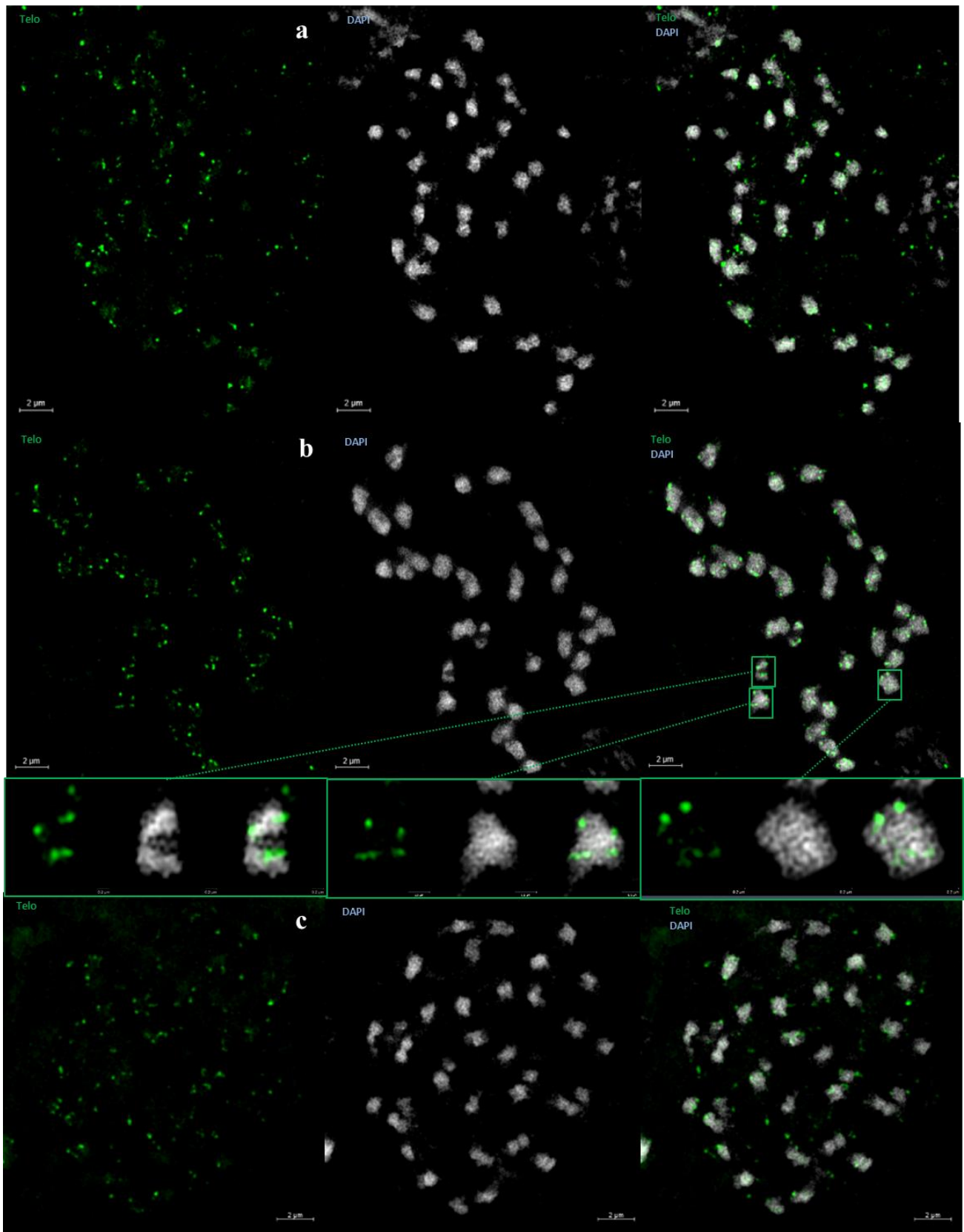


Fig. 69a-b. Immagini di piastre metafasiche ottenute con la super-resolution imaging per la Fluorescent in situ ibridation a tre colori in apici radicali di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri. Piastre metafasiche: (a) $2n = 33$; (b) $2n = 34$; (c) $2n = 35$. Nota negli ingrandimenti della piastra (b) i segnali telomerici in tre cromosomi di dimensioni diverse.

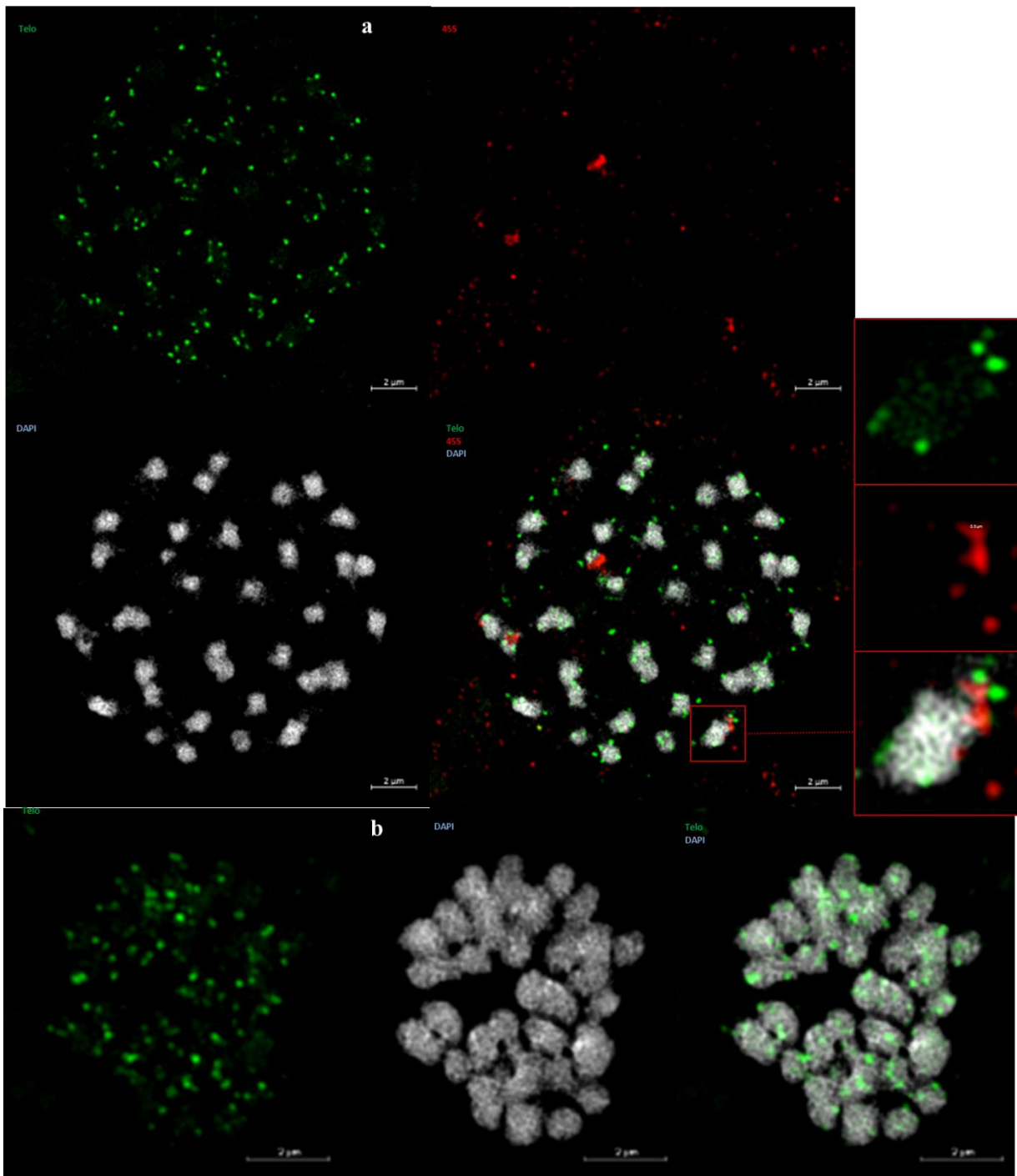


Fig. 70a-b. Immagini di piastre metafasiche ottenute con la super-resolution imaging per la Fluorescent in situ ibridation a tre colori (i siti telomerici in verde e numero dei loci recanti il gene 45S rDNA in rosso). Cromosomi di individui di *C. nodosa* da Ganzirri recanti Piastre metafasiche: (a) $2n = 34$; (b) $2n = 30$. Nota la presenza di chiari segnali ribosomiali in cromosomi di diverse dimensioni.

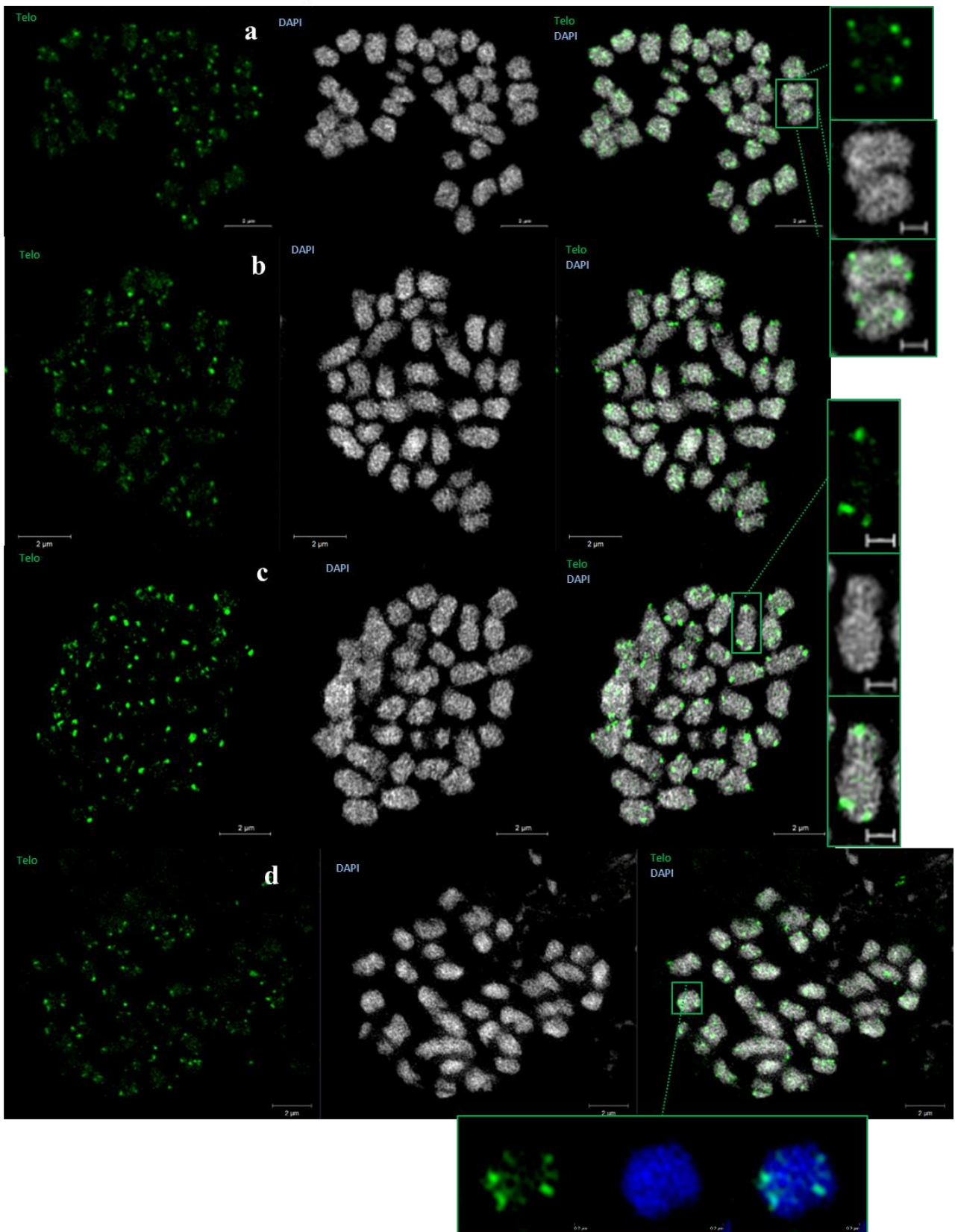


Fig. 71a-b. Immagini di piastre metafasiche ottenute con la super-resolution imaging per la Fluorescent in situ hibridation a tre colori in apici radicali di *Cymodocea nodosa* da Ganzirri. Piastre metafasiche: (a) $2n = 36$; (b) $2n = 32$; (c) $2n = 34$ e (d) $2n = 36$. Nota negli ingrandimenti della piastra i segnali telomerici in cromosomi di dimensioni diverse.

3.2.3. *Posidonia oceanica*

✚ Cariotipo: metodi classici e molecolari

✚ Analisi di Citogenetica classica

Apici radicali e caulinari di una popolazione di *Posidonia oceanica* (L.) Delile proveniente da Baia di Brucoli (Siracusa), sono stati utilizzati per la costruzione dei cariotipi di alcune delle piastre ritrovate.

Le osservazioni condotte sugli apici radicali e caulinari della popolazione studiata hanno mostrato che le divisioni mitotiche sono state ritrovate principalmente nelle cellule meristematiche iniziali, sebbene anche cellule distanti da questa zona possano andare incontro a tale fenomeno.

La mitosi è risultata regolare in quasi tutte le piastre osservate (Fig. 72a-g). Il nucleo interfaseico (~10µm Ø) è caratterizzato da cromatina in fase dispersa senza strutture eterocromatiche evidenti (Fig. 72a-g). Negli stadi iniziali della profase (Fig. 72b) la cromatina inizia a condensarsi e i cromosomi diventano visibili sotto forma di lunghi filamenti e contemporaneamente si osserva la scomparsa del nucleolo, in tarda profase (Fig. 72c), infatti, sono già riconoscibili 20 cromosomi. In metafase la membrana nucleare si dissolve e i cromosomi, che sono vicini al loro punto di massima condensazione, in visione laterale, si presentano regolarmente disposti sul piano equatoriale (Fig. 72d). In anafase inizia la separazione dei cromatidi ai poli opposti della cellula (Fig. 72e), seguita dalla telofase in cui la membrana nucleare si riforma attorno ai due gruppi di cromosomi (Fig. 72f). Gradualmente i cromosomi si despiralizzano tanto da non essere più distinguibili e la citodieresi inizia con la formazione di una nuova parete cellulare (Fig. 72g). L'unica anomalia osservata durante la mitosi è rappresentata dalla presenza di ponti inter-cromosomali in anafase (Fig. 72h).

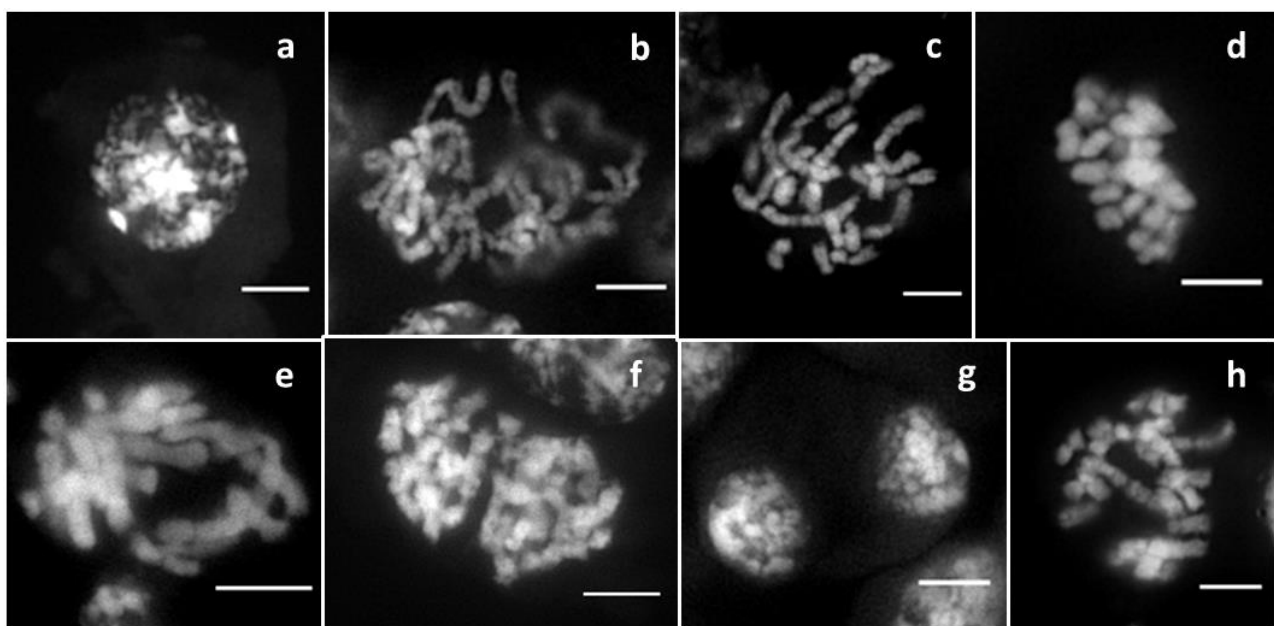


Fig.7 2a-h. (a) nucleo in interfase; (b) inizio profase; (c) tarda profase; (d) metafase in visione laterale; (e) anafase; (f) telofase; (g) citodieresi; (h) ponti in anafase. Scale bar= 5µm.

Il numero cromosomico ritrovato in tutte le metafasi studiate è $2n=20$ (Fig. 73a). La lunghezza dei cromosomi varia da 1.57µm a 5.83µm (Tab. 29).

Il cariotipo (Fig. 73b) mostra un complemento costituito da 4 paia di cromosomi di dimensioni maggiori (range 3.14-5.23µm), con la prima coppia submetacentrica, e la seconda e terza metacentriche, la quarta subtelocentrica con cromosomi che mostrano la presenza di un satellite (Fig. 73b,c; Tab. 29).

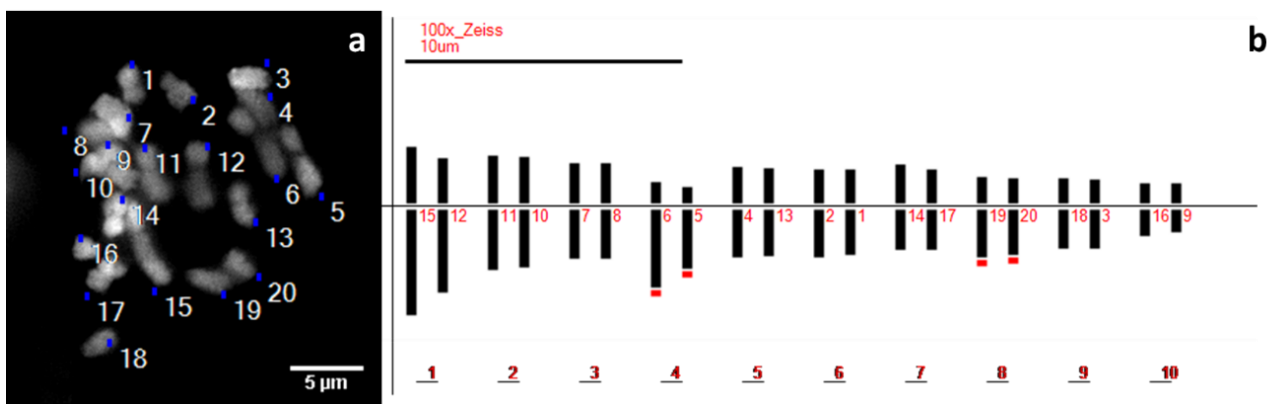


Fig. 73a-b. *Posidonia oceanica* (L.) Delile del Golfo di Brucoli (Siracusa, Italia). (a) piastra metafasica; (b) ideogramma.

La quinta, la sesta e la settima coppia si presentano tutte metacentriche con dimensioni medie (range 2.74-2.98 µm). Le altre, di dimensioni medie minori (range 1.63-2.61 µm) si presentano con la ottava submetacentrica con presenza di satelliti, e la nona e decima metacentriche, sebbene i valori assoluti della nona si approssimano ai valori stabiliti per considerarle submetacentriche (Fig. 73a,b; Tab. 29). Il rapporto tra la lunghezza relativa media dei singoli cromosomi e il numero cromosomico aploide evidenzia una leggera tendenza del cariotipo a presentare due gruppi di cromosomi con dimensioni diverse. L'analisi dell'ideogramma conferma queste osservazioni (Fig. 73b). Il rapporto tra la media delle lunghezze relative dei singoli cromosomi del complemento aploide e il valore del rapporto tra braccio lungo e braccio corto conferma la presenza nel complemento di sette coppie di cromosomi metacentrici, due coppie di submetacentriche ed una coppia di subtelocentrici. La prima coppia tra le submetacentriche è composta da cromosomi che presentano dimensioni leggermente maggiori rispetto a tutte le altre coppie. La formula cariotipica è $2n= 2x= 20= 14m(3sat) + 4sm(1sat) + 2st$. La lunghezza totale del complemento aploide dei cromosomi (THL) è di 30.56µm, mentre il rapporto tra il cromosoma più lungo del complemento e quello più corto è di 3.71. L'indice asimmetrico (AI) è 6.07. Tutti i dati morfometrici dei cromosomi sono riportati in Tab. 29.

Tabella 29. Dati cariomorfometrici dei cromosomi e Indici di Asimmetria (AI) di *Posidonia oceanica* (L.) Delile proveniente dal Golfo di Brucoli (SR).

Karyotype asymmetry degree (Stebbins, 1971): 2B							Karyotype parameters table						
Karyotype formula (Levan et al., 1964): 2n = 2x = 14m(3sat) + 4sm(1sat) + 2st							x	2n	THL	CVCI	CVCL	MCA	
Original Table (L: long arms; S: short arms; 0: no satellite; 1: on the long arm; 2: on the short arm; 3: intercalary satellite)							10	20	30.56	19.30	31.44	20.09	
ID	L	S	L+S	L-S	L/S	Group ID	Satellites	The relative length					
								Group	L(%)	S(%)	L+S (%)	L/S	Type
1	1.64	1.20	2.84	0.44	1.36	6	0	1	11.13	5.97	11.13+5.97=17.10	1.86	m
2	1.70	1.24	2.93	0.46	1.37	6	0	2	6.94	5.60	6.94+5.60=12.54	1.24	m
3	1.40	0.86	2.26	0.54	1.63	9	0	3	5.82	4.76	5.82+4.76=10.58	1.22	st
4	1.72	1.33	3.05	0.39	1.30	5	0	4	8.04	2.23	8.04+2.23=10.26	3.61	m
5	2.12	0.59	2.71	1.53	3.58	4	1	5	5.52	4.23	5.52+4.23=9.75	1.30	m
6	2.80	0.77	3.57	2.03	3.63	4	1	6	5.46	3.99	5.46+3.99=9.45	1.37	sm
7	1.78	1.46	3.25	0.32	1.22	3	0	7	4.67	4.29	4.67+4.29=8.96	1.09	m
8	1.78	1.44	3.22	0.33	1.23	3	0	8	5.48	3.06	5.48+3.06=8.54	1.79	m
9	0.83	0.74	1.57	0.10	1.13	10	0	9	4.60	2.89	4.60+2.89=7.49	1.59	m
10	2.07	1.69	3.76	0.38	1.23	2	0	10	2.91	2.41	2.91+2.41=5.32	1.21	sm
11	2.17	1.74	3.91	0.43	1.25	2	0						
12	2.99	1.63	4.62	1.37	1.84	1	0	ID	L(%)	S(%)	L+S (%)	L/S	Type
13	1.65	1.26	2.91	0.39	1.31	5	0	1	2.68	1.97	2.68+1.97=4.65	1.36	m
14	1.43	1.39	2.82	0.04	1.03	7	0	2	2.78	2.02	2.78+2.02=4.80	1.37	m
15	3.81	2.02	5.83	1.78	1.88	1	0	3	2.29	1.41	2.29+1.41=3.70	1.63	m
16	0.94	0.74	1.68	0.21	1.28	10	0	4	2.81	2.17	2.81+2.17=4.99	1.30	m
17	1.43	1.23	2.66	0.19	1.16	7	0	5	3.46	0.97	3.46+0.97=4.43	3.58	st
18	1.41	0.91	2.32	0.51	1.56	9	0	6	4.58	1.26	4.58+1.26=5.84	3.63	st
19	1.73	0.95	2.68	0.78	1.82	8	1	7	2.91	2.39	2.91+2.39=5.31	1.22	m
20	1.62	0.92	2.54	0.70	1.77	8	1	8	2.90	2.36	2.90+2.36=5.27	1.23	m
								9	1.37	1.21	1.37+1.21=2.57	1.13	m
								10	3.39	2.76	3.39+2.76=6.15	1.23	m
								11	3.55	2.84	3.55+2.84=6.39	1.25	m
								12	4.90	2.66	4.90+2.66=7.56	1.84	sm
								13	2.70	2.06	2.70+2.06=4.77	1.31	m
								14	2.34	2.28	2.34+2.28=4.61	1.03	m
								15	6.23	3.31	6.23+3.31=9.54	1.88	sm
								16	1.55	1.21	1.55+1.21=2.75	1.28	m
								17	2.33	2.02	2.33+2.02=4.35	1.16	m
								18	2.31	1.48	2.31+1.48=3.79	1.56	m
								19	2.83	1.56	2.83+1.56=4.39	1.82	sm
								20	2.65	1.50	2.65+1.50=4.15	1.77	sm

Haploid Table					
Group ID	L	S	L+S	L-S	L/S
1	3.40	1.82	5.23	1.58	34.92
2	2.12	1.71	3.83	0.41	44.68
3	1.78	1.45	3.23	0.32	44.98
4	2.46	0.68	3.14	1.78	21.69
5	1.69	1.29	2.98	0.39	43.42
6	1.67	1.22	2.89	0.45	42.24
7	1.43	1.31	2.74	0.11	47.90
8	1.67	0.93	2.61	0.74	35.81
9	1.41	0.88	2.29	0.52	38.58
10	0.89	0.74	1.63	0.15	45.33

Other Information
longest/shortest = 3.71
The total haploid length of the chromosome set (Peruzzi et al., 2009), THL = 30.56
Coefficient of Variation of Centromeric Index (Paszko, 2006), CVCI = 19.30
Coefficient of Variation of Chromosome Length (Paszko, 2006), CVCL = 31.44
Mean Centromeric Asymmetry (Peruzzi and Eroglu, 2013), MCA = 20.09

Number of chromosome which (long arm/short arm) > 2: 2 (10.00%)
The Karyotype asymmetry index (Arano, 1963), Ask% = 60.56%
The total form percent (Huziwara, 1962), TF% = 39.44%
The index of Karyotype symmetry (Greilhuber and Speta, 1976), S_{yi} = 65.12%
The index of chromosomal size resemblance (Greilhuber and Speta, 1976), Rec = 52.41%
The intra chromosomal asymmetry index (Romero Zarco, 1986), A₁ = 0.31
The inter chromosomal asymmetry index (Romero Zarco, 1986), A₂ = 0.31
The degree of asymmetry of Karyotype (Watanabe et al., 1999), A = 0.20
The dispersion index (Lavania and Srivastava, 1992), DI = 13.47
The asymmetry index (Paszko, 2006), AI = 6.07

✚ Analisi di citogenetica molecolare

❖ Estrazione, purificazione e amplificazione del DNA

Le analisi di citogenetica molecolare della popolazione di *Posidonia oceanica* (L.) Delile proveniente dalla Baia di Brucoli (Siracusa), eseguite durante il soggiorno presso il laboratorio dell'IPK (Gatersleben, Germania), hanno previsto l'estrazione di DNA genomico da giovani foglie di individui di mantenuti in acquario in condizioni controllate (Figg. 7a-m, 8a-h e 5a-b). Le analisi per l'isolamento del DNA sono state duplicate (*Posidonia_oceanica_1* e *Posidonia_oceanica_2*) per evitare contaminazioni che avrebbero potuto ostacolare le successive fasi di processamento.

I quantitativi di DNA purificato di entrambi campioni di DNA di *P. oceanica*, sono stati verificati grazie allo spettrofotometro a microvolume NanoDrop (Fig. 11). Le misurazioni allo spettrofotometro a microvolume sono state replicate 3 volte per ciascun campione per ottenere informazioni In base alle sulla qualità dei campioni estratti e purificati grazie all'analisi delle diverse lunghezze d'onda assorbite dai differenti composti presenti nel campione.

In Tabella 30 sono mostrati i risultati ottenuti su entrambi i campioni di DNA di *P. oceanica*. In particolare, sono riportati i dati sul quantitativo di DNA estratto (ng/μl).

Tabella 30. Report analisi acidi nucleici di individui di *Posidonia oceanica* (*Posidonia_oceanica_1* e *Posidonia_oceanica_2*) esaminati al NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific).

Sample	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
<i>Posidonia_oceanica_1</i>	55,52	1,11	0,769	1,44	0,52
<i>Posidonia_oceanica_1</i>	61,41	1,228	0,83	1,48	0,53
<i>Posidonia_oceanica_1</i>	64,17	1,283	0,817	1,57	0,53
<i>Posidonia_oceanica_2</i>	88,25	1,765	1,269	1,39	0,46
<i>Posidonia_oceanica_2</i>	91,75	1,835	1,317	1,39	0,47
<i>Posidonia_oceanica_2</i>	96,51	1,93	1,35	1,43	0,48

Al valore di assorbanza a 260nm, il quantitativo medio di DNA espresso in ng/μl era 60 per *Posidonia_oceanica_1* e 92 per *Posidonia_oceanica_2* (Tab. 30).

Il rapporto di purezza tra l'assorbanza del DNA e quella delle proteine (A260/A280) era mediamente 1,5 per i campioni di DNA del primo individuo di *P. oceanica* (Fig. 74a) e 1.4 per il secondo (Fig. 74b). Il rapporto tra le due assorbanze 260/280 era più basso rispetto ai valori ottimali di ~1,8 per il DNA (Tab. 30). Questo indica la presenza di proteine, fenolo o altri contaminanti che assorbono fortemente nei pressi di 280 nm.

Il rapporto di purezza medio tra le assorbanze del DNA e dell'RNA (A260/A230) era 1,5 per entrambi i campioni di *Posidonia_oceanica_1* e *Posidonia_oceanica_2* (Tab. 30). Anche questa seconda misura di controllo del DNA, in entrambi i campioni di *P. oceanica*, era significativamente inferiore rispetto ai valori attesi compresi tra 1,8 e 2,2, indicando che la tecnica di estrazione e purificazione del DNA utilizzata richiede ulteriori sperimentazioni.

In Figura 74a-b sono mostrati i grafici di assorbanza alle diverse lunghezze d'onda dei composti presenti nelle soluzioni di DNA genomico dei due campioni di *P. oceanica*. Entrambi gli spettri di assorbanza dei campioni mostrano la presenza di un picco a 230nm e l'assenza del picco a 260nm.

Dunque i grafici riportati evidenziano la presenza di DNA impuro, contaminato da tracce di polisaccaridi, residui proteici e/o da agenti esterni (Fig. 74a-b). Questo è determinato da errori ed imprecisioni durante le procedure di estrazione del DNA.

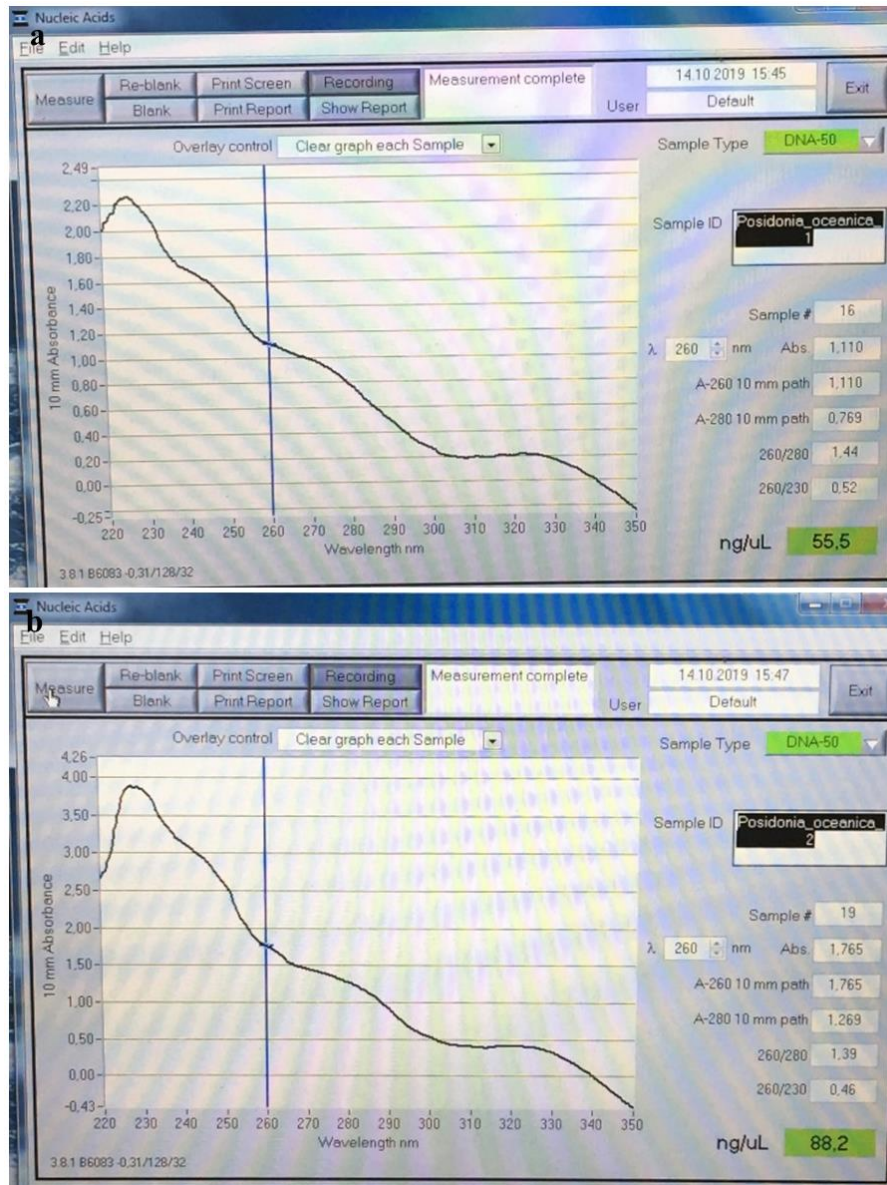


Fig. 74a-b. Misure dello spettro di assorbimento del contenuto di DNA isolato dai campioni di foglie di *Posidonia oceanica* al Nanodrop Spectrophotometer. **(a)** individuo 1 (*Posidonia_oceanica_1*); **(b)** individuo 2 (*Posidonia_oceanica_2*).

L'integrità del DNA purificato di *Posidonia_oceanica_1*, è stata ulteriormente verificata tramite le analisi della corsa elettroforetica su gel di agarosio (Fig. 75). Queste analisi, come si evince dal gel in Fig. 3, confermavano la presenza di contaminazione del DNA isolato.

Di conseguenza i campioni di DNA genomico isolato da individui di *P. oceanica* non sono stati utilizzati come modello per amplificare le sequenze conservate dei geni ribosomiali (rDNA) con coppie di primer progettati 5S-rDNA, 18S-rDNA e 26S-rDNA.

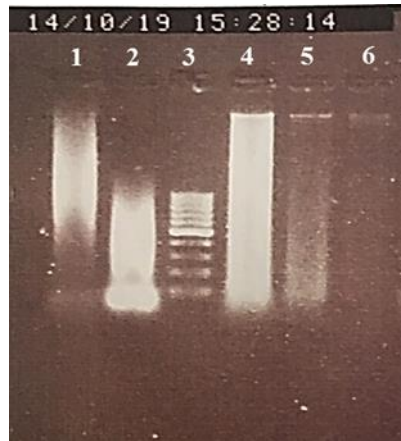


Fig. 75. Analisi corsa elettroforetica su gel di agarosio. Note: **1**= regioni di telomeri umani a concentrazione 0.1 μ l (hutelo_0.1); **2**= regioni di telomeri umani a concentrazione 1 μ l (hutelo_0.1); **3**= gene rules 100bp; **4**= DNA isolato di *Zostera_noltei_1*; **5**= DNA isolato di *Cymodocea_nodosa_1*; **6**= DNA isolato di *Posidonia_oceanica_1*.

❖ *Fluorescent in situ hybridation (FISH)*

La Fluorescent in situ ibridation (FISH) è stata applicata su apici radicali di individui di *Posidonia oceanica* (L.) Delile per localizzare le sequenze altamente ripetute di DNA telomerico e le sequenze conservate dei geni ribosomiali 18S e 16S rDNA) e per ottenere informazioni sul cariotipo delle specie e per il conteggio dei cromosomi in metafase.

Le sonde dei prodotti PCR delle regioni ribosomiali (18 PCR *Cym_1* e 26 PCR *Cym_1*) di DNA genomico isolato dal primo individuo di *Cymodocea. nodosa* (*Cymodocea_nodosa_1*) e delle regioni telomeriche umane a concentrazioni 0.1 μ l e 1 μ l (human telomere_0.1 e human telomere _1) etichettate mediante il metodo della nick-translation rispettivamente con la marcatura diretta in Cy3-dUTP (Cy3), Alexa Fluor 488-5-dUTP (a488) e Texas Red-12-dUTP (TXR) (18S.cy3, 18S.a488, 18S.TXR e 26S.cy3, 26S.a448, 26S.TXR; hutelo.0.1.cy3, hutelo.0.1.a488, hutelo.0.1.TXR, hutelo.1.cy3, hutelo.1.a488, hutelo.1.TXR), e indiretta in Biotin-11-dUTP (Bio) e Digoxigenin-11-dUTP (Dig) (Dig Hutelo 14S, Bio Hutelo 14S.), sono state utilizzate per gli esperimenti FISH su campioni di individui di *P. oceanica*.

Studiando le diverse fasi di preparazione dei vetrini per ottenere piastre metafasiche ben distese e prive di parete cellulare e citoplasma, si è dato inizio alla messa a punto della tecnica di ‘schiacciamento’ (‘Squashing Method’ in accordo Cao *et al.* 2016) per la FISH e per il processo di Immunomarcatura o *Immunolabeling* su apici radicali di individui di *P. oceanica* provenienti dalla Baia di Brucoli (Sr). Utilizzando differenti combinazioni di sonde fluorescenti per la FISH, solo in pochi vetrini essiccati all'aria con buone metafasi diffuse (Tab. 1) sono state sperimentate le sonde per la FISH e l’immunolabeling per localizzare i loci del gene 45S rDNA (18S rDNA e 26S rDNA)

e siti dei telomeri dei cromosomi della specie presa in esame. Per questo motivo probabilmente non sono stati ottenuti risultati chiari nelle piastre di apici radicali di campioni di *P. oceanica*.

3.2.4. *Zostera noltei*

✚ Cariotipo: metodi classici e molecolari

✚ *Analisi di Citogenetica classica*

Apici radicali e caulinari di una popolazione di *Zostera noltei* Hornemann proveniente dal Golfo di Brucoli (Siracusa, Italia), sono stati utilizzati per la costruzione dei cariotipi di alcune delle piastre ritrovate.

Le osservazioni condotte sugli apici radicali e caulinari della popolazione studiata hanno mostrato che le divisioni mitotiche ritrovate principalmente nelle cellule meristematiche iniziali, risultavano regolari in quasi tutte le piastre osservate (Fig. 76a-i). Il nucleo interfascico (circa 6µm Ø) è caratterizzato da cromatina in fase dispersa senza strutture eterocromatiche evidenti (Fig. 76a).

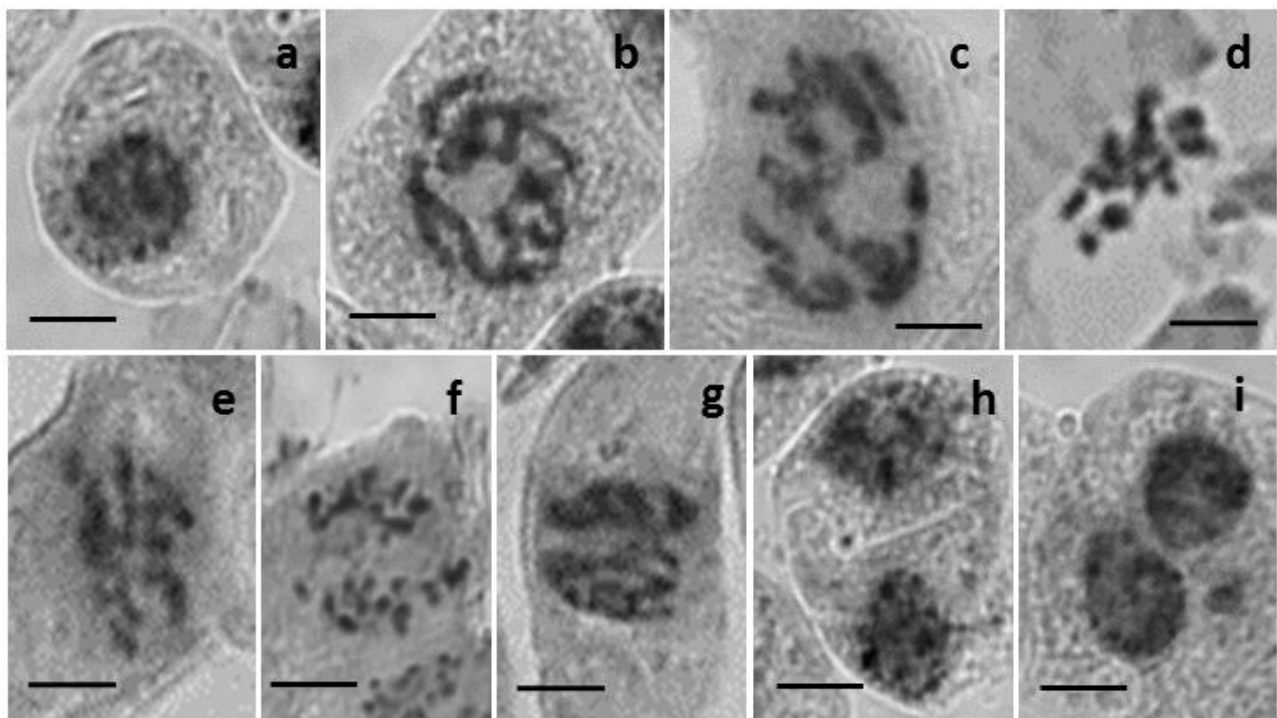


Fig. 76 a-h. *Zostera noltei* Hornemann proveniente dal Golfo di Brucoli (Siracusa, Italia). (a) nucleo in interfase; (b) profase; (c) metafase in visione frontale; (d) metafase in visione laterale; (e) inizio anafase; (f) tarda anafase; (g) telofase; (h) citodieresi; (i) micronucleo. Scale bar= 5µm.

Durante i primi stadi della profase la cromatina inizia a condensarsi, i cromosomi diventano visibili sotto forma di lunghi filamenti e, in tarda profase, si osserva la scomparsa del nucleolo (Fig. 76b). In metafase la membrana nucleare si dissolve (Fig. 76c) e i cromosomi, che sono vicini al loro punto di

massima condensazione, in visione laterale, si presentano regolarmente disposti sul piano equatoriale (Fig. 76d). Nei primi stadi dell'anafase inizia la separazione dei cromatidi (Fig. 76e), e in tarda anafase si osserva la completa migrazione ai poli opposti della cellula (Fig. 76f). In telofase si riforma la membrana nucleare attorno ai due gruppi di cromosomi e, gradualmente, i cromosomi despiralizzano tanto da non essere più distinguibili (Fig. 76g). La citodieresi inizia con la formazione di una nuova parete cellulare (Fig. 76h). L'unica anomalia osservata durante la mitosi è rappresentata dalla presenza di micronuclei (Fig. 76i).

In tutte le metafasi studiate il numero cromosomico ritrovato è $2n=12$ (Fig. 77a) e la lunghezza dei cromosomi varia da $1.57\mu\text{m}$ a $3.18\mu\text{m}$ (Tab. 31). In particolare, il cariotipo (Fig. 77b) mostra un complemento costituito da 2 paia di cromosomi di dimensioni maggiori (range $2.50\text{-}2.95\mu\text{m}$), con la prima coppia submetentrica e la seconda metacentrica. Tutte le altre, di dimensioni medie minori (range $1.57\text{-}2.18\mu\text{m}$) si presentano metacentriche, sebbene i valori assoluti della quarta si approssimano ai valori stabiliti per considerarle submetentriche (Fig. 77a, b; Tab. 31).

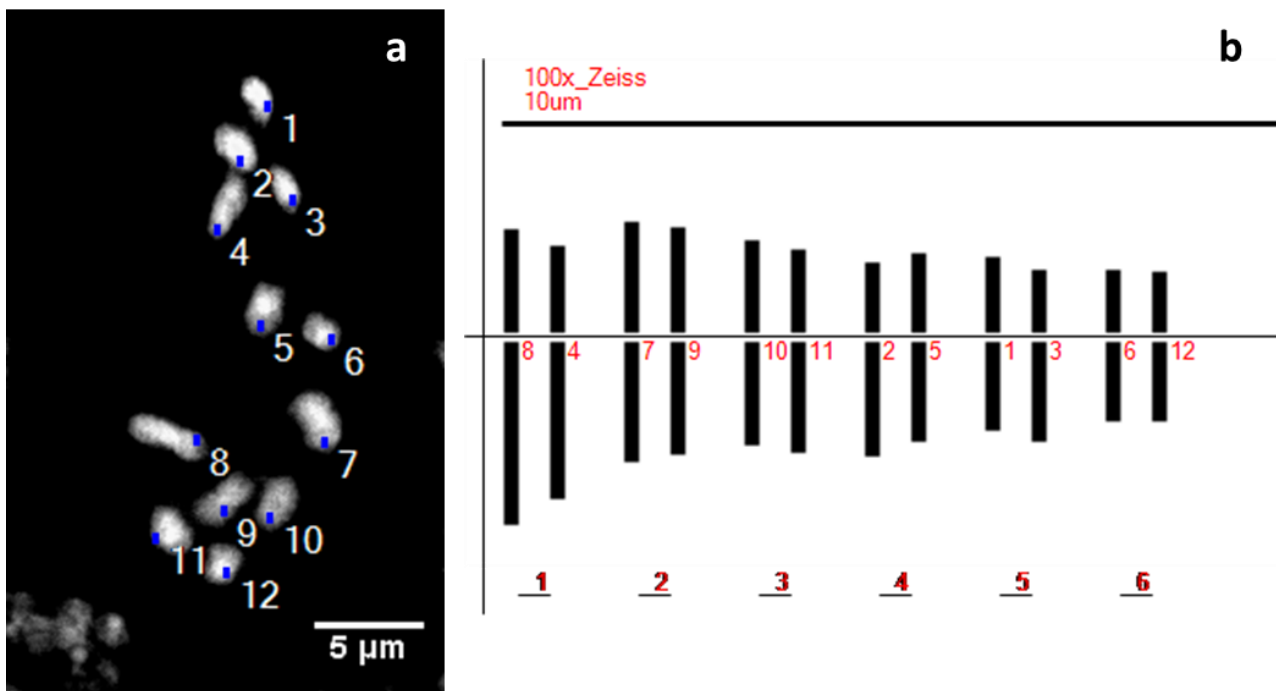


Fig. 77a-b. *Zostera noltei* proveniente dal Golfo di Brucoli (SR). (a) piastra metafasica; (b) ideogramma.

Infatti, il rapporto tra la media delle lunghezze relative dei singoli cromosomi del complemento aploide e il valore del rapporto tra braccio lungo e braccio corto conferma la presenza nel complemento di quattro coppie di cromosomi metacentrici e due coppie di submetentrici. La prima coppia tra le submetentriche è composta da cromosomi che presentano dimensioni leggermente maggiori rispetto a tutte le altre coppie. L'analisi dell'ideogramma conferma queste osservazioni (Fig. 77b). La formula cariotipica è $2n=2x=12=10m+2sm$. La lunghezza totale del complemento aploide

dei cromosomi (THL) è di 13.07µm e l'indice asimmetrico (AI) è 2.24. Tutti i dati morfometrici dei cromosomi sono riportati in Tab. 31.

Tabella 31. Dati cariomorfometrici dei cromosomi e Indici di Asimmetria (AI) di *Zostera noltei* Hornemann proveniente dal Golfo di Brucoli (SR).

Karyotype asymmetry degree (Stebbins, 1971): 1B														
Karyotype formula (Levan et al., 1964): 2n = 2x = 10m + 2sm														
Original Table (L: long arms; S: short arms; 0: no satellite; 1: on the long arm; 2: on the short arm; 3: intercalary satellite)														
ID	L	S	L+S	L-S	L/S	Group ID	Satellites	The relative length				Type		
								Group	L(%)	S(%)	L+S (%)	L/S		
1	0.99	0.85	1.84	0.14	1.17	5	0							
2	1.29	0.78	2.07	0.51	1.66	4	0	1	14.51	8.07	14.51+8.07	1.80	m	
3	1.12	0.71	1.83	0.41	1.58	5	0	2	9.88	9.21	9.88+9.21	1.07	sm	
4	1.76	0.97	2.72	0.79	1.82	1	0	3	9.12	7.52	9.12+7.52	1.21	m	
5	1.12	0.89	2.01	0.23	1.26	4	0	4	9.22	6.37	9.22+6.37	1.45	sm	
6	0.88	0.70	1.58	0.18	1.25	6	0	5	8.09	5.97	8.09+5.97	1.36	m	
7	1.34	1.24	2.57	0.10	1.08	2	0	6	6.75	5.28	6.75+5.28	1.28	m	
8	2.04	1.15	3.18	0.89	1.78	1	0							
9	1.25	1.17	2.42	0.08	1.07	2	0	ID	L(%)	S(%)	L+S (%)	L/S	Type	
10	1.15	1.03	2.18	0.12	1.11	3	0	1	3.80	3.25	3.80+3.25	1.17	m	
11	1.24	0.93	2.17	0.30	1.33	3	0	2	4.93	2.98	4.93+2.98	1.66	m	
12	0.89	0.68	1.57	0.21	1.31	6	0	3	4.29	2.71	4.29+2.71	1.58	m	
								4	6.72	3.69	6.72+3.69	1.82	sm	
Haploid Table								5	4.29	3.40	4.29+3.40	1.26	m	
Group ID	L	S	L+S	L-S	S/L+S(%)	L/S		6	3.35	2.68	3.35+2.68	1.25	m	
1	1.90	1.06	2.95	0.84	35.75	1.80		7	5.11	4.73	5.11+4.73	1.08	m	
2	1.29	1.20	2.50	0.09	48.25	1.07		8	7.79	4.38	7.79+4.38	1.78	sm	
3	1.19	0.98	2.18	0.21	45.18	1.21		9	4.78	4.48	4.78+4.48	1.07	m	
4	1.21	0.83	2.04	0.37	40.87	1.45		10	4.39	3.95	4.39+3.95	1.11	m	
5	1.06	0.78	1.84	0.28	42.45	1.36		11	4.73	3.57	4.73+3.57	1.33	m	
6	0.88	0.69	1.57	0.19	43.88	1.28		12	3.40	2.60	3.40+2.60	1.31	m	
Karyotype parameters table														
x	2n	THL	CVCI	CVCL	MCA									
6	12	13.07	9.93	22.52	14.54									
Other Information														
longest/shortest = 2.03														
The total haploid length of the chromosome set (Peruzzi et al., 2009), THL = 13.07														
Coefficient of Variation of Centromeric Index (Paszko, 2006), CVCI = 9.93														
Coefficient of Variation of Chromosome Length (Paszko, 2006), CVCL = 22.52														
Mean Centromeric Asymmetry (Peruzzi and Eroglu, 2013), MCA = 14.54														

Number of chromosome which (long arm/short arm) > 2: 0 (0.00%)														
The Karyotype asymmetry index (Arano, 1963), AsK% = 57.58%														
The total form percent (Huziwara, 1962), TF% = 42.42%														
The index of Karyotype symmetry (Greilhuber and Speta, 1976), Syi = 73.68%														
The index of chromosomal size resemblance (Greilhuber and Speta, 1976), Rec = 68.47%														
The intra chromosomal asymmetry index (Romero Zarco, 1986), A1 = 0.25														
The inter chromosomal asymmetry index (Romero Zarco, 1986), A2 = 0.23														
The degree of asymmetry of Karyotype (Watanabe et al., 1999), A = 0.15														
The dispersion index (Lavania and Srivastava, 1992), DI = 9.71														
The asymmetry index (Paszko, 2006), AI = 2.24														

🚦 Analisi di citogenetica molecolare

❖ Estrazione, purificazione e amplificazione del DNA

Le analisi di citogenetica molecolare della popolazione di *Zostera noltei* Hornemann proveniente dalla Baia di Brucoli (Siracusa), eseguite durante il soggiorno presso il laboratorio dell'IPK

(Gatersleben, Germania), hanno previsto l'estrazione, la purificazione e l'amplificazione di DNA genomico di giovani foglie di individui di *Zostera noltei* coltivati in acquario in condizioni controllate (Figg. 7a-m, 8a-h e 5a-b). Per evitare contaminazioni che avrebbero potuto ostacolare le successive fasi di processamento, le analisi per l'isolamento del DNA sono state duplicate (*Zostera_noltei_1* e *Zostera_noltei_2*).

Poiché la soluzione di DNA isolato dal secondo campione di *Z. noltei* risultava visibilmente contaminata, solo il primo campione di DNA isolato di *Z. noltei* è stato utilizzato per effettuare le analisi allo spettrofotometro a microvolume NanoDrop 2000/2000c e quindi determinare la purezza della soluzione estratta (Tab. 32). Per evitare errori durante la lettura dei risultati, le misurazioni spettrofotometriche sono state replicate 3 volte sul campione di *Zostera_noltei_1*.

In Tabella 32 è presente il report delle analisi spettrofotometriche relative alla composizione del DNA estratto. In base alle diverse lunghezze d'onda assorbite dai differenti composti presenti nel campione (260 nm per gli acidi nucleici, 230 nm per i polisaccaridi, 280 nm per le proteine) è stato possibile avere delle indicazioni precise sulla qualità dei campioni estratti e purificati.

Tabella 32. Report analisi acidi nucleici del primo campione di *Zostera noltei* (*Zostera_noltei_1*) esaminati al NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific).

Sample	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
<i>Zostera_noltei_1</i>	473,6	9,472	4,837	1,96	1,93
<i>Zostera_noltei_1</i>	477,69	9,554	4,865	1,96	1,94
<i>Zostera_noltei_1</i>	489,44	9,789	5,016	1,95	1,94

Il rapporto di purezza tra l'assorbanza del DNA e quella delle proteine (A260/A280) rientrava perfettamente tra i valori attesi di ~1,8 per il DNA. Infatti, la soluzione del campione di *Zostera_noltei_1* risultava mediamente 1,9 (Tab. 32). La seconda misura di controllo del DNA, ovvero il rapporto di purezza tra le assorbanze del DNA e dell'RNA (A260/A230), era mediamente 1,9 (Tab.32). Anche in questo caso rientrava perfettamente tra i valori attesi di compresi tra 1,8 e 2,2, indicando che la tecnica di estrazione e purificazione del DNA utilizzata non richiedeva ulteriori ottimizzazioni poiché il DNA estratto risultava privo di contaminazioni.

Infatti, osservando lo spettro di assorbanza della soluzione contenente il DNA di *Z. noltei* alle diverse lunghezze d'onda dei diversi composti, in Figura 78 è possibile notare che il campione di DNA è puro. Lo spettro presenta un picco netto a 260nm.

La concentrazione media di DNA misurata al valore di assorbanza a 260nm del campione di *Zostera_noltei_1* era di 480 ng/μl (Tab. 32).

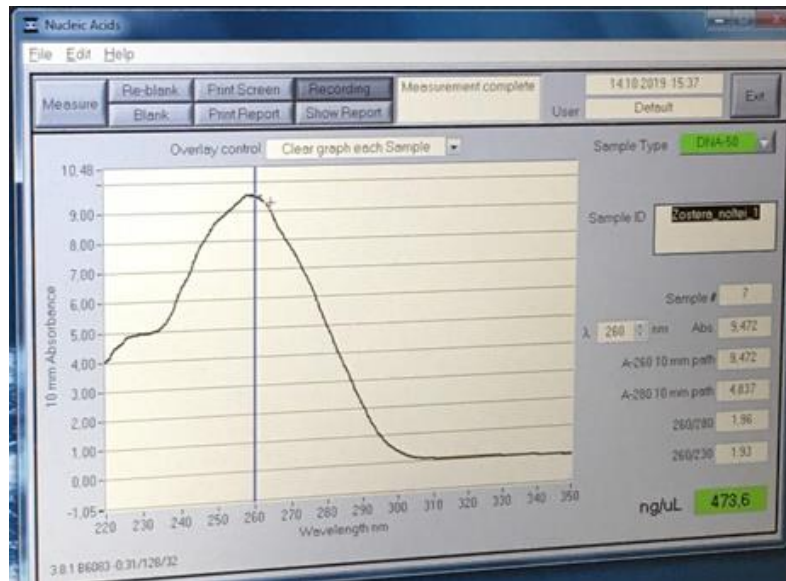


Fig. 78. Analisi dello spettro di assorbimento al Nanodrop Spectrophotometer del contenuto di DNA isolato da foglie di un campione di *Zostera noltei* (*Zostera_noltei_1*).

Campioni di DNA genomico di *Z. noltei* sono stati ulteriormente esaminati tramite le analisi di elettroforesi su gel per valutarne la quantità e qualità del DNA (Fig. 79).

Come mostrato in Figura 79, l'analisi del gel mediante l'elettroforesi della soluzione di DNA isolato di campione *Zostera_noltei_1*, dimostrava palesemente che il campione di *Z. noltei* risultava integro e di buona qualità.

DNA genomico isolato dal campione del primo individuo di *Z. noltei* è stato quindi usato come modello per amplificare le sequenze conservate dei geni ribosomiali (rDNA) con coppie di primer progettati 5S-rDNA, 18S-rDNA e 26S-rDNA (primer 5S-rDNA_Zos_1, 18S-rDNA_Zos_1 e 26S-rDNA_Zos_1). La quantità e la qualità dei prodotti PCR sono stati valutati tramite analisi elettrofotometriche.



Fig. 79. Analisi corsa elettroforetica su gel di agarosio. Note: 1= regioni di telomeri umani a concentrazione 0.1μl (hutelo_0.1); 2= regioni di telomeri umani a concentrazione 1μl (hutelo_0.1); 3= gene rules 100bp; 4= DNA isolato di *Zostera_noltei_1*; 5= DNA isolato di *Cymodocea_nodosa_1*; 6= DNA isolato di *Posidonia_oceanica_1*.

In Figura 80 sono riportate le dimensioni dei frammenti dei primer di rDNA 5S-rDNA_Zos_1, 18S-rDNA_Zos_1 e 26S-rDNA_Zos_1 amplificati controllate tramite l'elettroforesi su gel di agarosio.

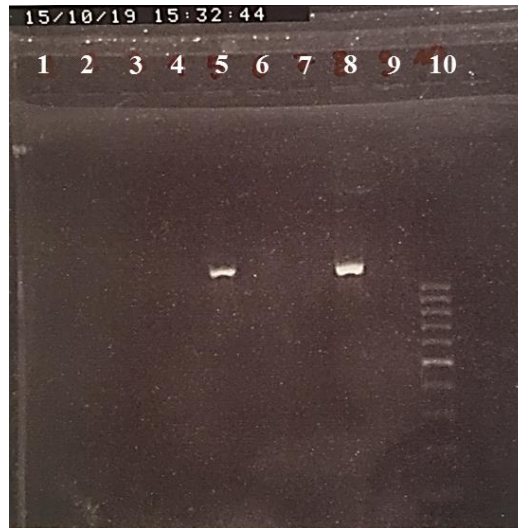


Fig. 80. Analisi corsa elettroforetica su gel di agarosio delle sequenze ribosomiali 5S-rDNA, 18S-rDNA e 26S-rDNA di *Cymodocea nodosa* (5S-rDNA_Cym_1, 18S-rDNA_Cym_1 e 26S-rDNA_Cym_1). Note: 1= 5S-rDNA_Zos_1; 2= 5S-rDNA_Cym_1; 3= NC (controllo); 4= 18S-rDNA_Zos_1; 5= 18S-rDNA_Cym_1; 6= NC (controllo); 7= 26S-rDNA_Zos_1; 8= 26S-rDNA_Cym_1; 9= NC (controllo); 10= gene rules.

Tuttavia, i dati ottenuti tramite la corsa elettroforetica su gel, nonostante i campioni di DNA isolato di *Z. noltei* risultassero perfettamente puri, mostravano che solamente le sequenze ribosomiali 18S e 26S amplificate dal campione di *Cymodocea nodosa_1* (18S-rDNA_Cym_1 e 26S-rDNA_Cym_1) migravano, mentre i frammenti dei primer 5S-rDNA_Zos_1, 18S-rDNA_Zos_1 e 26S-rDNA_Zos_1 di *Z. noltei* risultavano assenti. Probabilmente, la procedura di amplificazione delle sequenze dei geni ribosomiali richiedeva ulteriori modifiche nella programmazione dei diversi tempi e temperature dei vari step al termociclatore. Quindi era necessario settare i parametri del protocollo, quali temperatura annealing, tempi in base alla lunghezza del frammento, ecc. al fine di migliorarne il prodotto di amplificazione.

❖ **Fluorescent in situ ibridation (FISH)**

La Fluorescent in situ ibridation (FISH) è stata applicata su apici radicali di individui di *Zostera noltei* Hornemann per localizzare le sequenze conservate organizzate come unità ripetitive in tandem dei geni ribosomiali (rDNA) e le sequenze altamente ripetute di DNA telomerico per ottenere informazioni sul cariotipo delle specie e per il conteggio dei cromosomi in metafase.

Per gli esperimenti FISH su campioni di individui di *Z. noltei*, sono stati utilizzati le sonde dei prodotti PCR delle regioni ribosomiali (18 PCR *Cym_1* e 26 PCR *Cym_1*) di DNA genomico isolato dal primo individuo di *Cymodocea nodosa* (*Cymodocea_nodosa_1*) e delle regioni telomeriche umane a concentrazioni 0.1µl e 1µl (human telomere_0.1 e human telomere_1) etichettate rispettivamente con la marcatura diretta in Cy3-dUTP (Cy3), Alexa Fluor 488-5-dUTP (a488) e Texas Red-12-dUTP (TXR) (18S.cy3, 18S.a488, 18S.TXR e 26S.cy3, 26S.a448, 26S.TXR; hutelo.0.1.cy3, hutelo.0.1.a488, hutelo.0.1.TXR, hutelo.1.cy3, hutelo.1.a488, hutelo.1.TXR), e indiretta in Biotin-11-dUTP (Bio) e Digoxigenin-11-dUTP (Dig) (Dig Hutelo 14S, Bio Hutelo 14S.), mediante il metodo della nick-translation.

Studiando in dettaglio tutte le fasi della preparazione dei vetrini per ottenere piastre metafasiche ben distese e prive di parete cellulare e citoplasma, è stato messo a punto la tecnica di ‘schiacciamento’ (‘Squashing Method’ in accordo Cao *et al.* 2016) per la FISH e per il processo di Immunomarcatura o *Immunolabeling* su apici radicali di individui di *Z. noltei* provenienti dalla Baia di Brucoli (Sr). Utilizzando differenti combinazioni di sonde fluorescenti per la FISH, diverse prove sono state sperimentate per localizzare i loci del gene 45S rDNA (18S rDNA e 26S rDNA) e siti dei telomeri dei cromosomi della specie presa in esame. Solo i vetrini essiccati all'aria con numerose e buone metafasi diffuse (Tab. 1) sono stati utilizzati per la FISH e l'immunolabeling.

Tuttavia, non sono stati ottenuti risultati chiari nelle piastre di apici radicali di campioni di *Z. noltei*.

3.3. ANALISI DI GENOME SIZE E LIVELLI DI PLOIDIA

3.3.1. *Halophila*

Citometria d'Immagine

La quantità di DNA nucleare è stata misurata in popolazioni raccolte in Mar Rosso di *Halophila stipulacea* (Fig. 81c).

La distribuzione della frequenza dei valori relativi di DNA per ciascun nucleo, dopo la colorazione Fuelgen, è stata riportata in Fig. 81a-c. Il confronto dei dati ottenuti sulla popolazione del Mar Rosso con quelli precedentemente ottenuti da popolazioni mediterranee (Vulcano= *H_sti_Vul*; Stretto di Messina= *H_sti_StM*) ha evidenziato la presenza di un modello comune (Fig. 81a-c).

I valori IOD sono stati convertiti in pg usando *Pisum sativum* L. cv. "Nano Samish" (2C-value = 9,05 pg) come standard interno (Tab. 33). Il 2C-value era di $13,71 \pm 0,29$ pg per la popolazione *H_sti_StM* (4C-value = $27,14 \pm 0,39$ pg), $12,27 \pm 0,24$ pg per quello di *H_sti_Vul* (4C-value = $24,11 \pm 0,84$ pg) e $12,26 \pm 0,2$ per *H_sti_RS* (4C-value = $23,54 \pm 0,58$ pg) (Fig. 82).

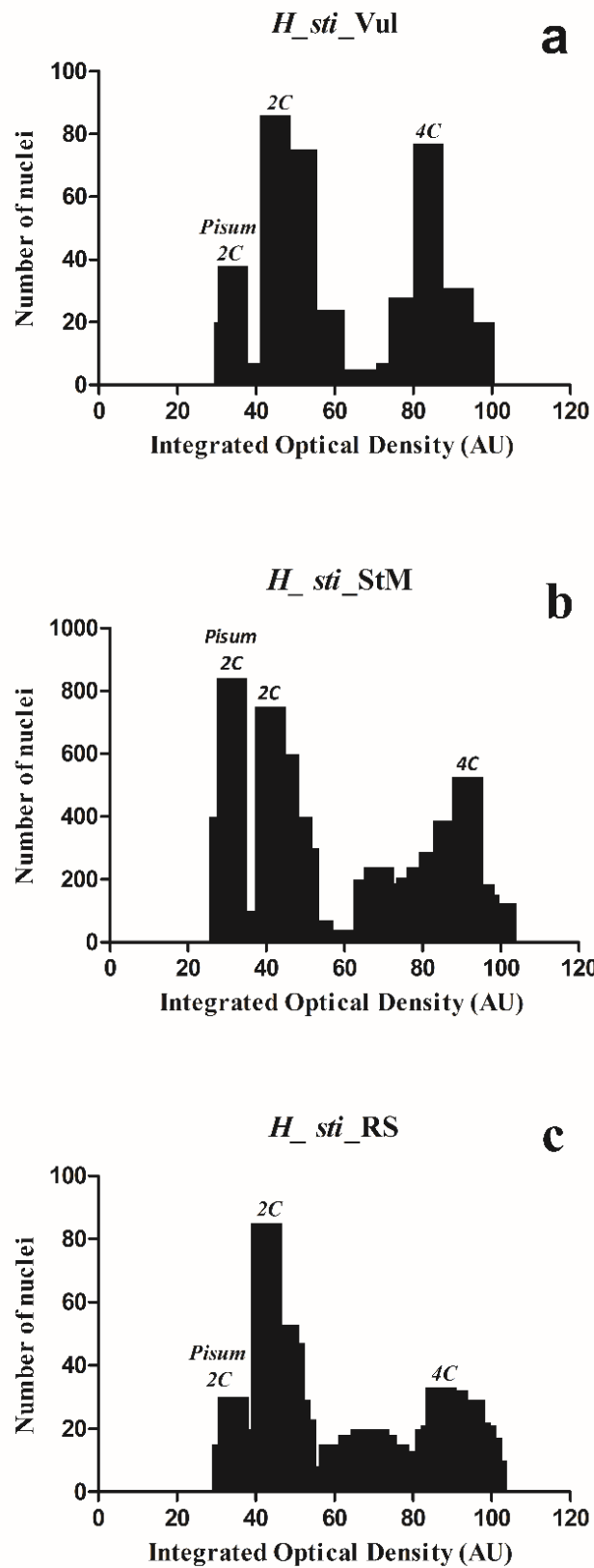


Fig. 81a-c. Istogrammi del contenuto di DNA relativo alle tre popolazioni di *H. stipulacea*: **a**) da Vulcano (*H_sti_Vul*); **b**) dallo Stretto di Messina (*H_sti_StM*); **c**) dal Golfo di Aqaba, Mar Rosso (*H_sti_RS*).

I valori medi tra le popolazioni di *H. stipulacea* (*H_sti_m*) erano $12,27 \pm 0,24$ pg (2C-value) e $24,93 \pm 0,78$ pg (4C-value). Il coefficiente di variazione dei picchi 2C, per ciascuno vetrino misurato, era sempre al di sotto del limite suggerito (CVp <6%). Il contenuto di DNA nucleare 2C e 4C di ciascuna popolazione di *Halophila* è riportato in Tab. 33. In Figura 82 è mostrato un confronto tra le dimensioni del genoma delle diverse specie di *Halophila* studiate.

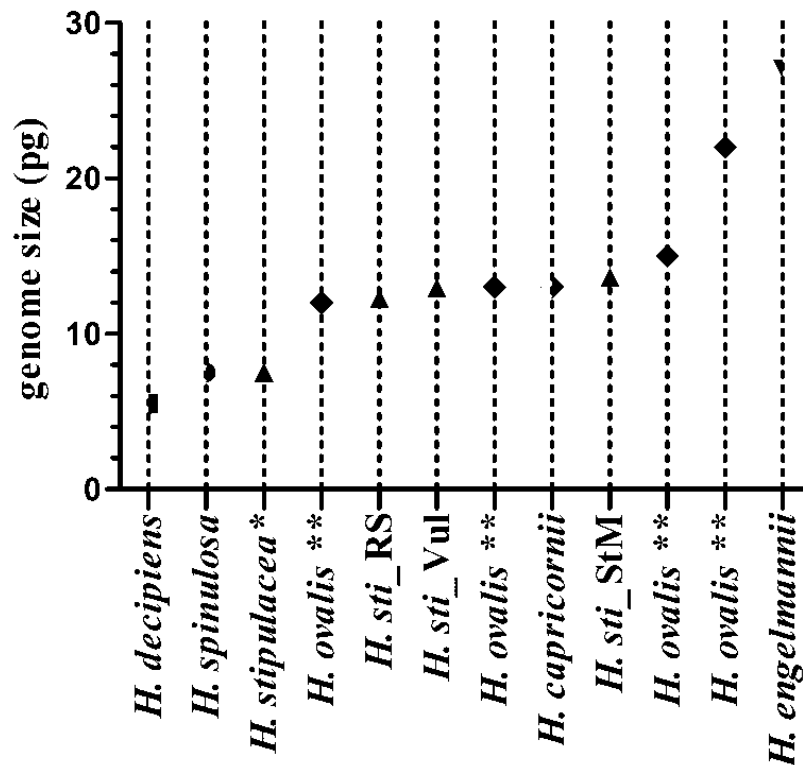


Fig. 82. Confronto tra le dimensioni del genoma delle diverse specie di *Halophila*. **H. stipulacea* da York (2005); ***H. ovalis* (= *H. hawaiiiana*, *H. johnsonii*, *H. ovalis*, and *H. minor*, Uchimura et al. (2008).

Tabella 33. Quantitativo di DNA nucleare delle specie/popolazioni studiate o riesaminate in questo studio.

Taxon	Ch n°	2C-value (pg)	4C-value (pg)
<i>H_sti_Rip</i> *	18	x	x
<i>H_sti_Rip</i> **	18	x	x
<i>H_sti_RS</i>	18	$12,26 \pm 0,2$	$23,54 \pm 0,58$
<i>H_sti_StM</i>	18	$13,71 \pm 0,29$	$27,14 \pm 0,93$
<i>H_sti_Vul</i>	18	$12,27 \pm 0,24$	$24,11 \pm 0,84$
<i>H_sti_m</i>	18	$12,74 \pm 0,24$	$24,93 \pm 0,78$
<i>H_bec_HK</i>	18	x	x
<i>H_ova_HK</i>	18	x	x
<i>H_min_CN</i>	28	x	x

✚ Modello di differenziamento dei tessuti della radice: analisi densitometriche

Le misure densitometriche nella radice degli individui di *Halophila stipulacea* dal Mar Rosso hanno evidenziato la presenza di nuclei con diverso livello di ploidia (Figg. 83, 84).

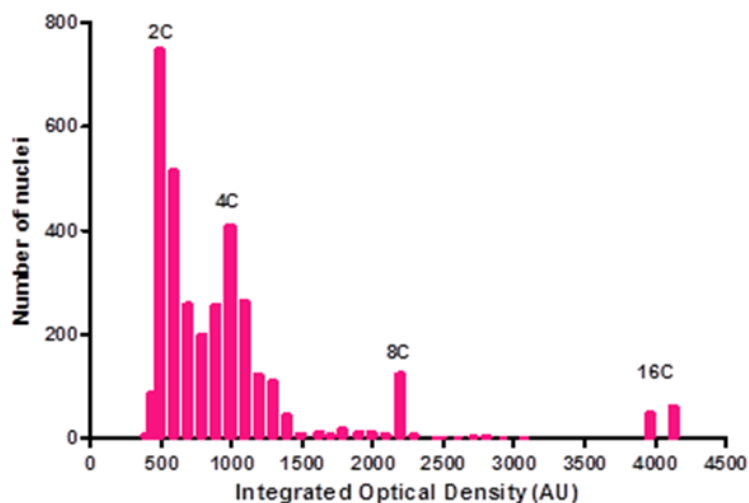


Fig. 83. Istogramma dei valori dei diversi livelli di ploidia ritrovati nelle radici di *Halophila stipulacea* ottenuti mediante misure densitometriche.

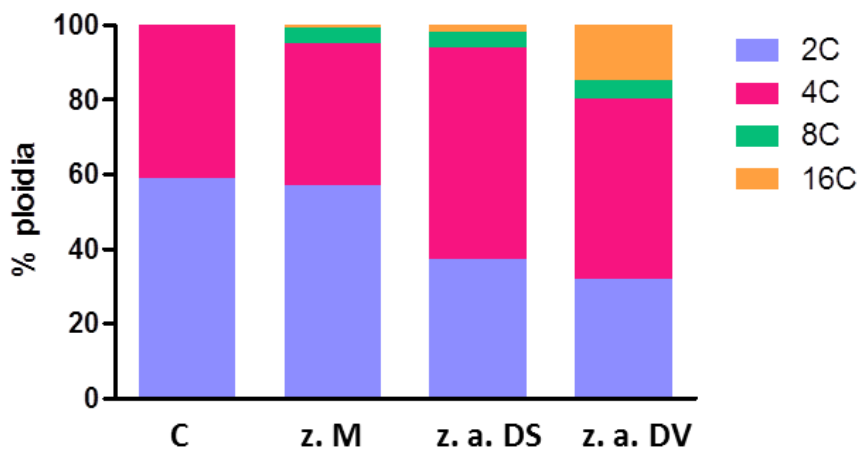


Fig. 84. Confronto delle percentuali di ploidia relative a ciascuna delle quattro zone della radice di *H. stipulacea*: cuffia (C), zona meristemica (z.M), zona di accrescimento per divisione, (z.a.DS) e zona di accrescimento per distensione (z.a.DV).

Nella cuffia i valori ritrovati sono stati 2C e 4C (Fig. 85). I nuclei 2C sono i più rappresentati, 58%. Seguono i nuclei 4C che rappresentano il 42% (Fig. 86).

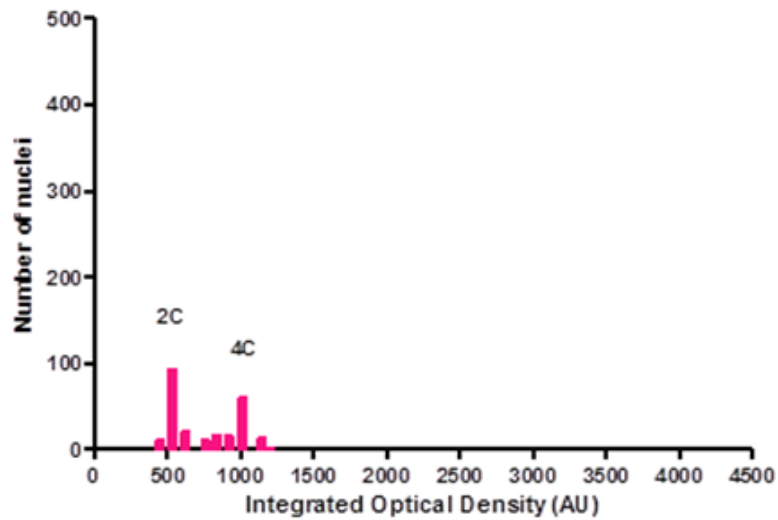


Fig. 85. Istogramma dei valori dei diversi livelli di ploidia riscontrati nella cuffia della radice di *H. stipulacea* ottenuti mediante misure densitometriche.

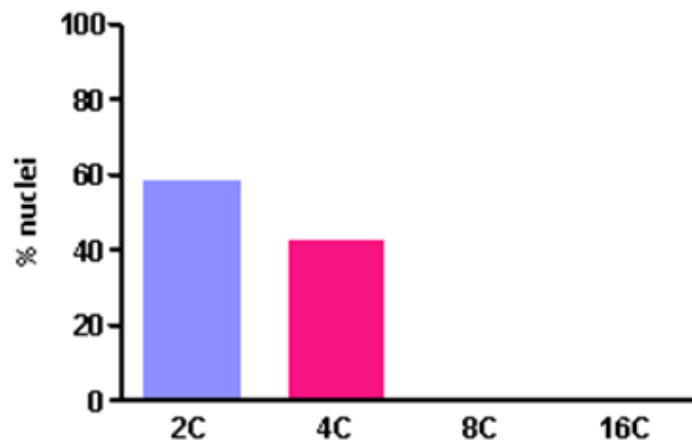


Fig. 86. Rappresentazione grafica delle percentuali di nuclei a diverso livello di ploidia nella cuffia di *H. stipulacea*.

Nella zona meristemica i più rappresentati sono i nuclei 2C e 4C con il 56% e 39%, rispettivamente (Figg. 87, 88). Sono presenti anche nuclei 8C (4%) e 16C (1%) (Fig. 88).

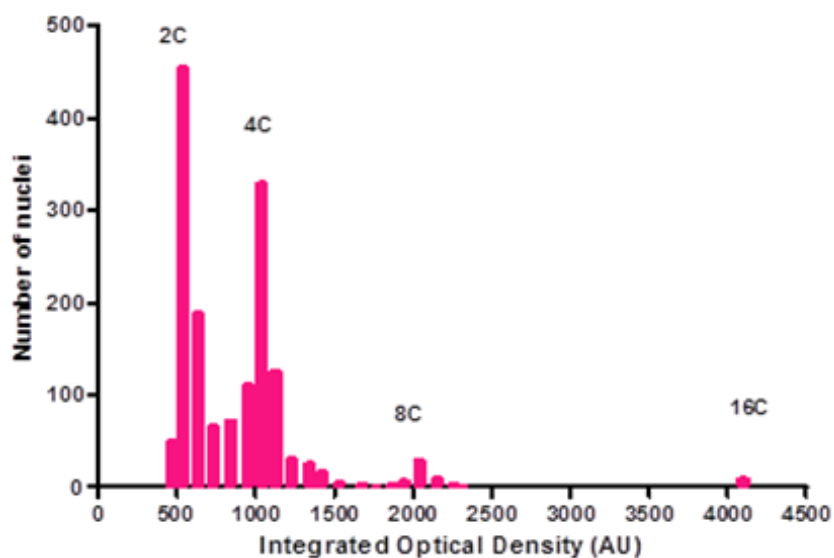


Fig. 87. Istogramma dei valori dei diversi livelli di ploidia riscontrati nella zona meristemica di *H. stipulacea* ottenuti mediante misure densitometriche.

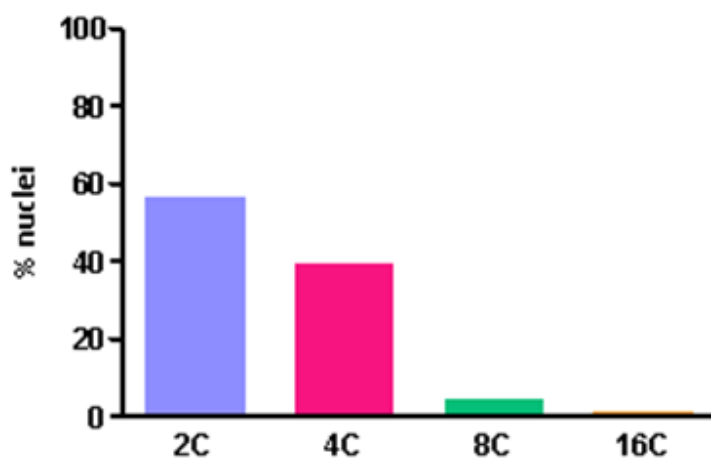


Fig. 88. Rappresentazione grafica delle percentuali di nuclei a diverso livello di ploidia nella zona meristemica di *H. stipulacea*.

Nella zona di accrescimento per divisione, i nuclei maggiormente rappresentati sono i 2C (49%) seguiti dai 4C (41%) (Figg. 89, 90). Come nella zona meristemica sono presenti pochi nuclei 8C (6%), mentre i nuclei 16C (4%) aumentano rispetto alla sezione precedente (Fig. 90).

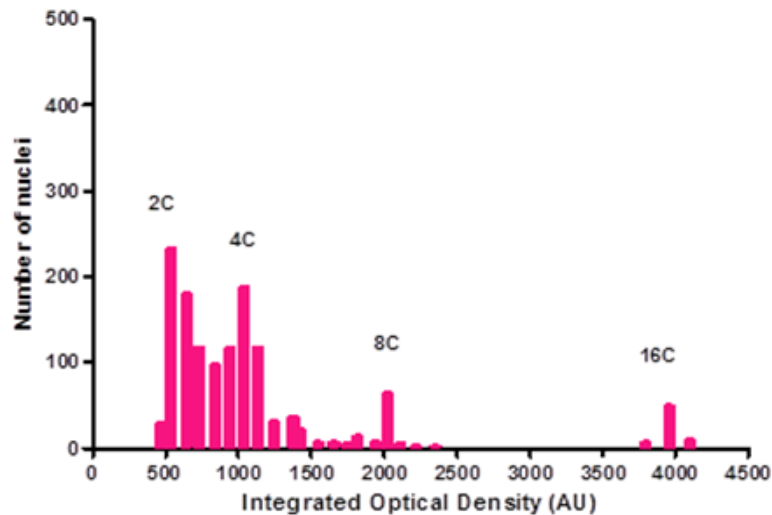


Fig. 89. Istogramma dei valori dei diversi livelli di ploidia riscontrati nella zona di accrescimento per divisione della radice di *H. stipulacea* ottenuti mediante misure densitometriche.

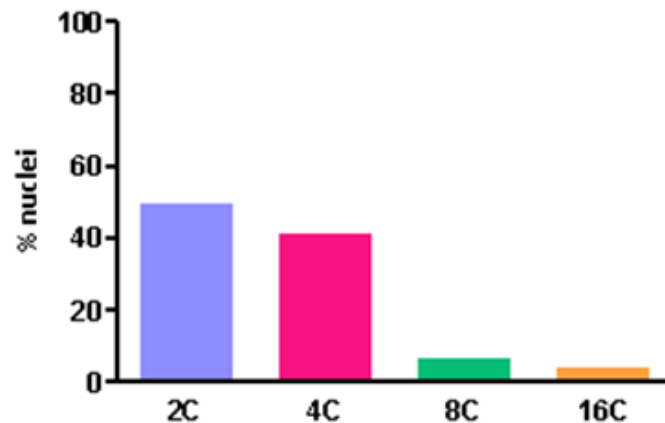


Fig. 90. Rappresentazione grafica delle percentuali di nuclei a diverso livello di ploidia nella zona di accrescimento per divisione di *H. stipulacea*.

Nella zona di accrescimento per distensione prevalgono i nuclei 4C (50%) insieme ai 2C (43%) (Figg. 91, 92). I nuclei 8C e 16C sono rappresentati col 3% e 4% rispettivamente (Fig. 92). In Figura 84 sono messe a confronto le percentuali di ploidia relative a ciascuna zona della radice. Nelle radici di *H. stipulacea* studiate sono stati riscontrati diversi livelli di ploidia, con nuclei da 2C a 16C. Il cycle-value per queste radici è di 0.6. Tali valori, secondo i limiti proposti da Barow e Meister (2003), sono indice di un basso livello di endopoliploidizzazione.

In Figura 93 si propone un primo tentativo di ricostruzione di un modello di endopoliploidizzazione delle radici del genere *Halophila*. La distribuzione di nuclei con diverso livello di ploidia differisce tra le diverse linee cellulari e aumenta all'aumentare della distanza dall'apice.

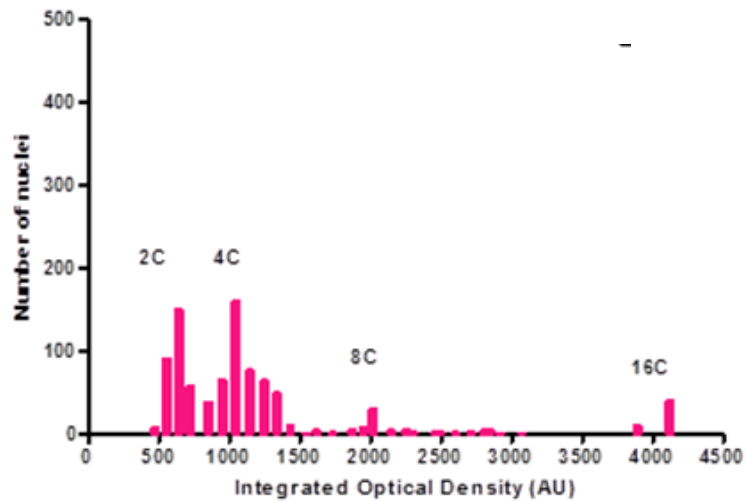


Fig. 91. Istogramma dei valori dei diversi livelli di ploidia riscontrati nella zona di accrescimento per distensione della radice di *H. stipulacea* ottenuti mediante misure densitometriche.

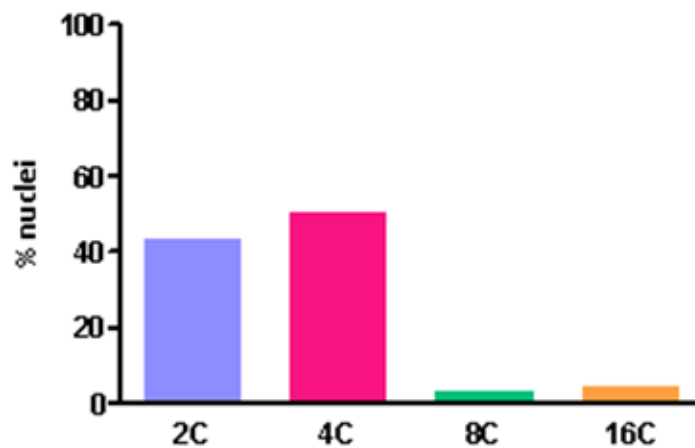


Fig. 92. Rappresentazione grafica delle percentuali di nuclei a diverso livello di ploidia nella zona di accrescimento per distensione di *H. stipulacea*.

Inoltre, non tutte le linee cellulari seguono lo stesso modello di endopoliploidizzazione e cellule con differente livello di ploidia possono ritrovarsi nella stessa regione. Le cellule basali della cuffia presentano nuclei 2C e 4C, mentre quelle che si ritrovano esternamente alle zone meristemica, di accrescimento per divisione e per distensione, hanno livelli di ploidia che variano da 4C a 8C. Nella zona meristemica i nuclei sono prevalentemente 2C e 4C. Tali livelli di ploidia sono riscontrati nelle cellule della parte centrale (stele) della radice fino alla zona di differenziamento. Simile distribuzione presentano i nuclei delle cellule del cilindro corticale. Mentre le cellule epidermiche, che iniziano a differenziarsi precocemente, presentano, nella parte più vicina alle cellule meristematiche valori 2C e 4C, ma ben presto si riscontrano valori 8C e 16C. In particolare, nuclei 16C si ritrovano nelle cellule madri dei tricoblasti.

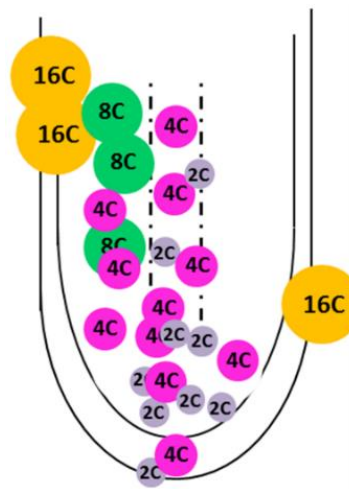


Fig. 93. Tentativo di ricostruzione di un modello di endopoliploidizzazione nella radice di *Halophila stipulacea*.

3.3.2. *Cymodocea nodosa*

✚ Citometria d'Immagine

La quantificazione della dimensione del genoma di individui di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson raccolti presso il Lago di Ganzirri (ME) e la Baia di Brucoli (SR), è stata condotta su apici radicali precedentemente trattati per misurazioni densitometriche di Feulgen (eseguite secondo Greilhuber e Tensch 2001), utilizzando il metodo dei picchi interfase (interphase-peak method) riportato in Vilhar *et al.* (2001). Utilizzando la tecnica di *Image Cytometry* (IC) o Citometria d'Immagine, sono stati individuati non soltanto nuclei a differente ploidia ma sono state eseguite anche misure di *genome size*.

Le immagini di nuclei interfase catturate utilizzando il solo canale verde della telecamera CCD con testa raffreddata montata su un microscopio ottico, in accordo con quanto richiesto per le misure di *genome size* (Vilhar *et al.* 2001), hanno permesso di misurare diverse centinaia di nuclei di ciascuna popolazione studiata grazie al sistema di analisi d'immagine *ImageSharp*. Dal confronto con la specie standard di calibrazione interna (*Pisum sativum* L. "Ctirad" con 2C-value = 9,09 pg) processata nelle stesse fiale contenenti gli apici radicali di *C. nodosa*, sono stati così ottenuti i picchi del DNA nucleare 2C e 4C.

L'analisi citometrica delle radici ha rivelato la presenza di nuclei con una grande variabilità nel contenuto di DNA (Fig. 94a-b). In Figura 94a-b sono riportati gli istogrammi dei valori relativi del contenuto di DNA di popolazioni di *C. nodosa* di Ganzirri (*Cym_nod_Gan*) e di Brucoli (*Cym_nod_Bru*) determinato mediante IC.

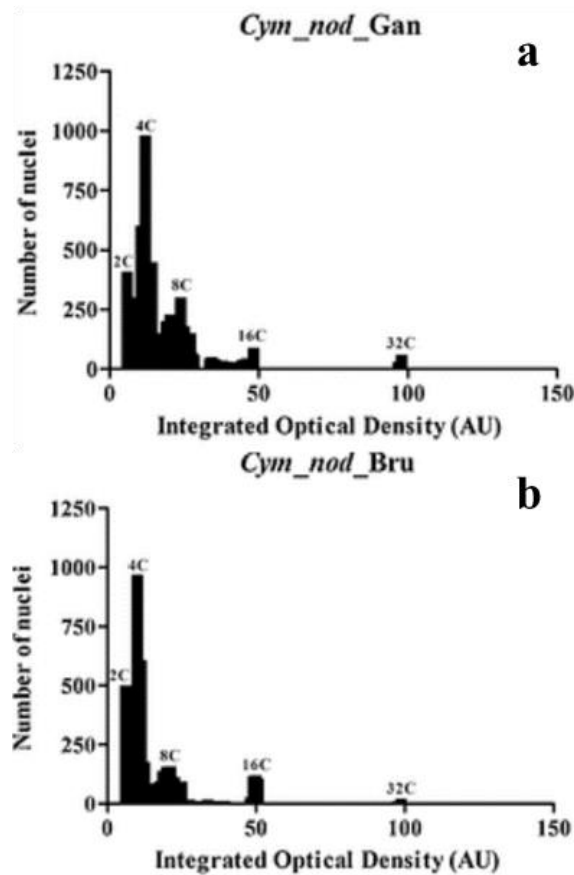


Fig. 94a-b. *Cymodocea nodosa*. Istogrammi del contenuto relativo di DNA di popolazioni determinate mediante citometria per immagini (IC) su materiale precedentemente trattato per misure Feulgen-densitometriche, utilizzando il metodo interfase-picco. a) Baia di Brucoli (*Cym_nod_Bru*); b) Lago di Ganzirri (*Cym_nod_Gan*).

Le popolazioni di *C. nodosa* di Ganzirri e di Brucoli non mostravano differenze significative. Gli istogrammi, infatti, hanno rivelato cinque picchi in ciascuna popolazione che indicano la presenza di nuclei endopoliploidi con una quantità di DNA fino a 32C (Fig. 94a-b). La maggior parte dei nuclei erano 4C, mentre quelli con 32C erano scarsamente rappresentati.

Il quantitativo di DNA ritrovato nelle popolazioni studiate di *C. nodosa* era ca. 1,1 pg ed il livello di ploidia della radice calcolato sulla base della media del numero di endocicli per nucleo delle cellule studiate era di 1.47 pg.

✚ *Citometria di Flusso*

La quantificazione del DNA genomico ed i livelli di ploidia di piante di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson mediante la tecnica della Citometria di Flusso, sono state condotte in giovani foglie, rizomi e radici d'individui coltivati in acquario provenienti dalla Baia di Brucoli (Siracusa, Italia) e da materiale raccolto nel Lago Ganzirri (ME, Riserva Naturale Orientata Capo Peloro).

Per l'isolamento dei nuclei e la colorazione del DNA è stato utilizzato lo standard di riferimento interno *Raphanus sativus* "Vorán" (numero di accesso alla banca genetica IPK RA 34; 2C = 1,11 pg). Il quantitativo di DNA assoluto (pg / 2C) è stato calcolato in base ai valori delle medie dei picchi G1 e alle corrispondenti dimensioni del genoma (Mbp / 1C) in accordo con Dolezel et al. (2003). In totale, sono state eseguite almeno sei misurazioni indipendenti in giorni diversi.

Le stime sul quantitativo di DNA nelle giovani foglie di *C. nodosa* hanno evidenziato la presenza di nuclei con una grande variabilità nel contenuto di DNA (Fig. 95). In particolare, l'istogramma dei valori di DNA in *C. nodosa* ha rivelato cinque picchi che indicano la presenza di nuclei endopoliploidi con una quantità di DNA fino a 32C (Fig. 95). La maggior parte dei nuclei erano 4C, mentre quelli con 32C erano scarsamente rappresentati. Il contenuto medio di DNA 2C riscontrato in *C. nodosa* era molto basso, circa 0,85 pg.

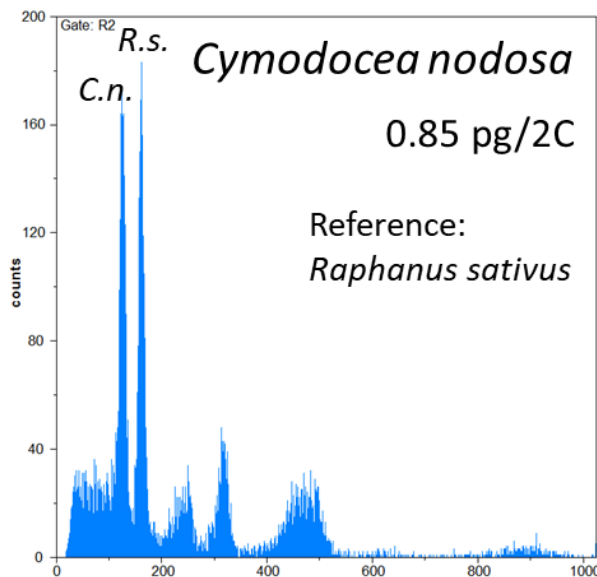


Fig. 95. Iistogramma del quantitativo di DNA in cellule di giovani foglie di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson da Bruccoli (Sr).

Per chiarire gli aspetti correlati al contenuto di DNA presente negli individui di *Cymodocea nodosa* ed evidenziare la presenza di fenomeni di poliploidia somatica nelle diverse porzioni della pianta, sono state anche eseguite misure citofluorimetriche sui rizomi e le rispettive foglie di ciascun nodo di due individui raccolti nel Lago di Faro presso la Riserva naturale orientata di Capo Peloro (Messina) e spediti in Germania in fogli di giornale umidi.

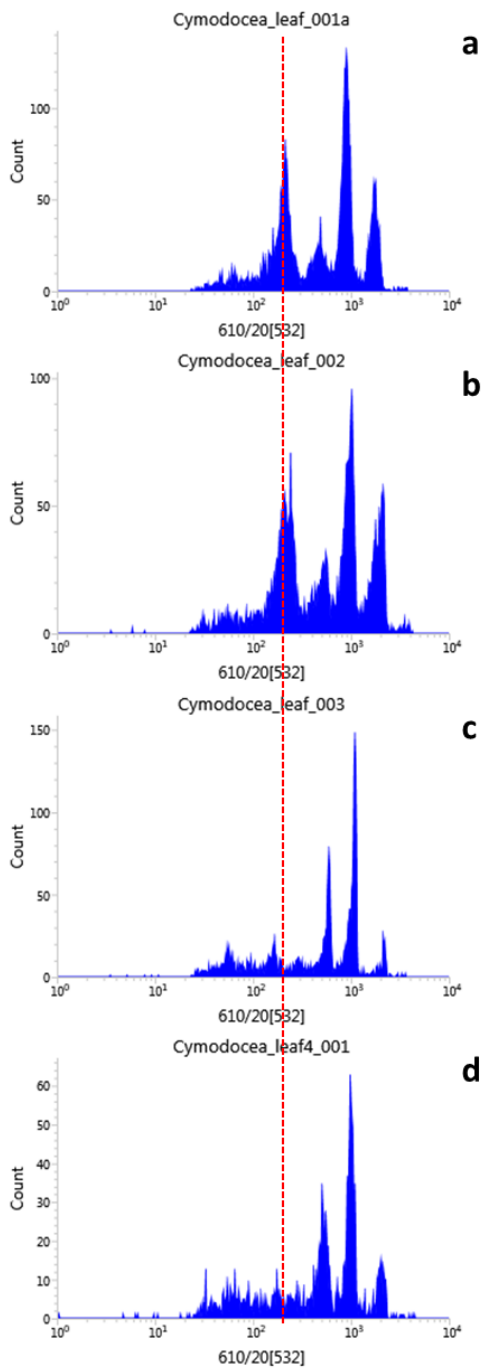
Le misurazioni al citofluorimetro di flusso di per ogni individuo analizzato, hanno richiesto almeno 4 prove per ciascun internodo del rizoma partendo da quello in rapida crescita (vedi istogrammi in Figure 96a-i e 97a-h).

Le stime sul quantitativo di DNA delle foglie e dei rizomi di *C. nodosa* hanno evidenziato, anche qui, la presenza di nuclei con una grande variabilità nel contenuto di DNA (Fig. 96a-i, 97a-h).

Gli istogrammi dei valori di DNA degli internodi di ciascun individuo hanno rivelato la presenza di almeno 4 picchi variabili (Fig. 96e-i, 97e-h). In particolare gli istogrammi relativi agli internodi del secondo individuo mostrano una diversa alternanza del numero di nuclei 4C, 8C e 2C (Fig. 97e-h). Infatti, procedendo dalle zone giovani a quelle mature, i nuclei più rappresentati nel primo ed nel terzo internodo erano l'8C, seguiti dal 4C, 2C e 16C (Fig. 97e, g), mentre nel secondo e quarto internodo erano i 4C, seguiti da 8C, 2C e 16C (Fig. 96f, h). Tuttavia, le misure effettuate negli internodi del primo individuo presentano valori più o meno omogenei con nuclei 4C maggiormente rappresentati, seguiti da valori medi di nuclei 2C e 8C fino ai 16C scarsamente rappresentati (Fig. 96 e-i). Le misure densitometriche nelle giovani foglie invece evidenziavano la presenza di nuclei che variavano da 2C a 32C (Fig. 96a-d, 97a-d). Procedendo dalle foglie della porzione più giovane del rizoma alla più matura, i picchi dei nuclei 2C tendevano a spostarsi verso sinistra (Fig. 96a-d, 97d) e decrescere (Fig. 96a-d). In particolare, nelle foglie corrispondenti al primo e secondo internodo del primo individuo si ritrovavano prevalentemente nuclei 8C seguiti dal 2C e 16C, 4C ed infine 32C (Fig. 96a-b) a differenza di quelle corrispondenti al terzo e quarto internodo che presentavano prevalentemente nuclei 16C, seguiti da 8C, 32C e valori 2C e 4C scarsamente rappresentati e spostati verso sinistra (Fig. 96c-d). Gli istogrammi relativi alle foglie del secondo individuo mostravano una prevalenza di nuclei 8C, e, mentre i nuclei 16C decrescevano spostandosi verso le foglie corrispondenti agli internodi più maturi rispetto ai 4C e 2C, i nuclei 4C aumentavano (Fig. 97a-d). Inoltre, sono state trovate anche differenze qualitative nella chiarezza degli istogrammi relativi alle foglie. In particolare, le foglie mostravano una maggiore quantità di detriti fluorescenti (vedi Fig. 97d) rispetto agli internodi dei rizomi che generalmente erano privi (Fig. 96e-i, 97e-h).

Plant 1

leaves



internodes

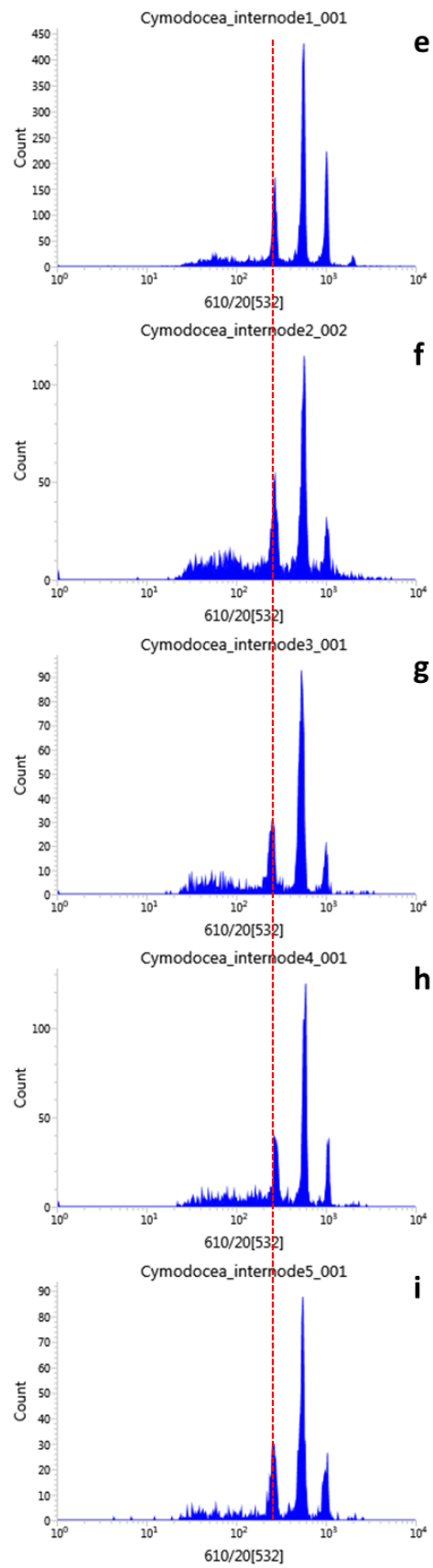


Fig. 96 a-i. Istogrammi dei valori di DNA delle foglie e degli internodi del campione 1 di *C. nodosa*. Livelli di ploidia riscontrati nelle foglie (**a-d**) e negli internodi (**e-i**).

Plant 2

leaves

internodes

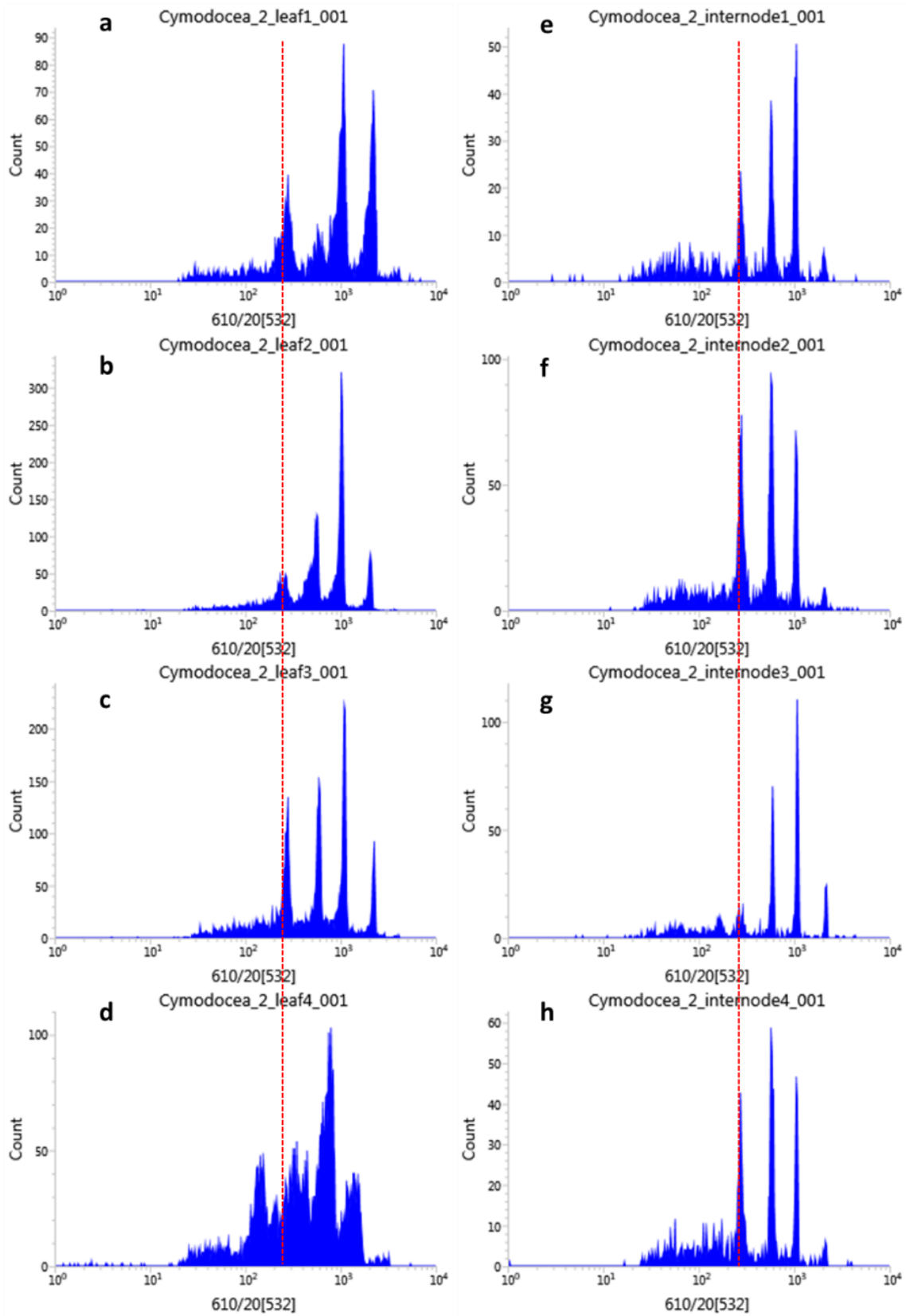


Fig. 97 a-h. Istogrammi dei valori di DNA delle foglie e degli internodi del campione 1 di *C. nodosa*. Livelli di ploidia riscontrati nelle foglie (a-d) e negli internodi (e-h).

✚ *Modello di differenziamento dei tessuti della radice: analisi densitometriche*

Utilizzando la tecnica di citometria d'immagine (CI) combinata con i dati istologici, è stato costruito un modello di differenziamento dei tessuti della radice di individui di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson raccolta presso la Riserva Naturale Orientata dei Laghetti di Marinello (Messina).

Le misure densitometriche sulla distribuzione dei nuclei ed sul contenuto in DNA di cellule delle differenti zone della radice hanno evidenziato la presenza di nuclei con diverso livello di ploidia (Figg. 99a, b; 101a, b; 103a-c; 105a, b).

Nella regione della cuffia ritroviamo cellule di diverse dimensioni e morfologia. In queste cellule i valori ritrovati variano da 2C a 64C (Figg. 98a-f; 99a, b). Quelle vicine alle cellule meristematiche iniziali si presentano quadrangolari con un nucleo sferoidale che occupa la maggior parte del volume cellulare (Fig. 98c, d). Nei nuclei in interfase sono osservabili due modelli strutturali. Nel primo caso la cromatina ha un'apparenza granulare ed è distribuita omogeneamente nell'intera regione nucleare, pertanto non sono chiaramente visibili porzioni di eterocromatina (cromocentri). Nel secondo caso, porzioni di eterocromatina, con forma da sferica a irregolare, sono distribuite in modo eterogeneo all'interno della regione nucleare. Il numero di questi cromocentri è spesso uguale a otto. Un singolo nucleolo è presente nella porzione centrale del nucleo. In queste cellule i valori di DNA ritrovati sono prevalentemente tra 2C e 4C (Fig. 99a, b). Nella regione sottostante sono riconoscibili cellule con dimensioni maggiori rispetto alle precedenti (Fig. 98c, e). In queste cellule, la parete continua a essere sottile, la vacuolizzazione è molto più evidente e i nuclei sono spostati in posizione laterale. Questi ultimi presentano dimensioni eterogenee sebbene maggiori rispetto a quelle dei nuclei delle zone precedenti. Anche in questo caso i nuclei in interfase presentano un'organizzazione a cromocentri. Il citoplasma è ricco di granuli d'amido. In questa zona nuclei con livello di ploidia 2C sono poco rappresentati, mentre la maggior parte di essi ha valori compresi tra 4C e 8C, raggiungendo un massimo di 16C (Fig. 99a, b). Lateralmente alla zona centrale e nella parte apicale della cuffia, le cellule si presentano allungate e hanno dimensioni variabili (Fig. 98a-c). Il nucleo è posizionato lateralmente e la vacuolizzazione è molto più evidente. Nel citoplasma di queste cellule sono presenti granuli d'amido. Anche in questo caso i nuclei in interfase presentano un'organizzazione a cromocentri. Le cellule della porzione di cuffia che si estende fino alla zona di accrescimento per divisione presentano dimensioni maggiori e un grosso nucleo (Fig. 98f). La parete delle cellule è piuttosto sottile (le cellule più esterne della cuffia producono mucillagini) e il citoplasma appare granulare per la presenza di amido. La strutturazione dei nuclei in interfase si presenta sempre a cromocentri, con un numero variabile. I valori di DNA riscontrati in questa zona sono compresi tra 8C e 64C, con i 16C maggiormente rappresentati (Fig. 99a, b). Le cellule con nuclei a 64C sono prevalentemente posizionate nella porzione affianco alla zona di accrescimento per divisione.

Le cellule meristematiche iniziali si trovano al centro dell'apice radicale, nella zona protetta dalla cuffia (Fig. 100a). Presentano dimensioni ridotte e una forma quadrangolare (Fig. 100a-c). La parete appare poco ispessita e il citoplasma denso. Il nucleo occupa quasi l'intero volume cellulare e mantiene costante le sue dimensioni in tutte le cellule. I nuclei in interfase presentano cromocentri il cui numero è solitamente otto. In questa zona i più rappresentati sono i nuclei 2C e 4C (Fig. 101a, b). Sono presenti anche pochi nuclei 8C (Fig. 101a, b).

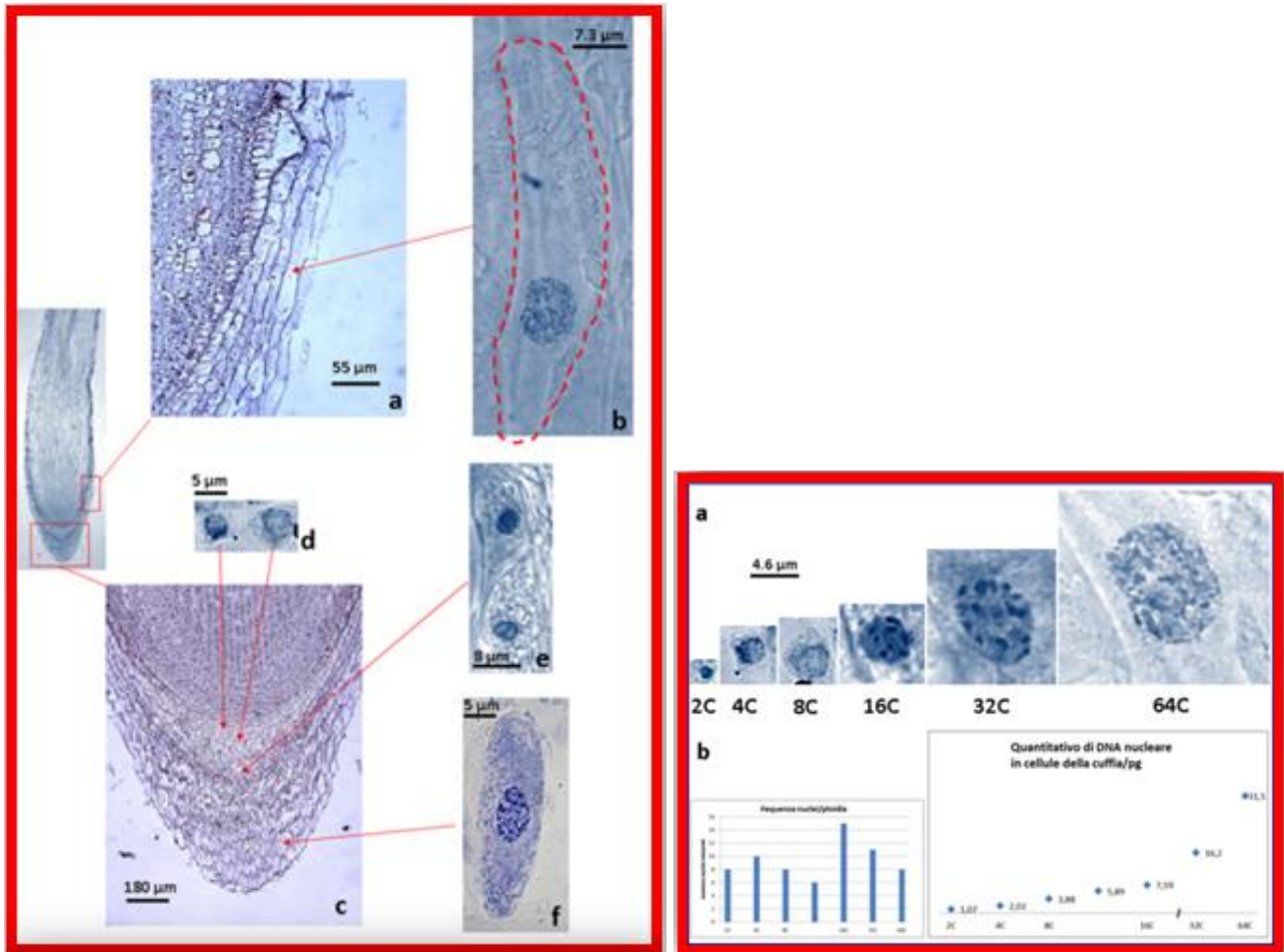


Fig. 98a-f. Sezione longitudinale della cuffia dell'apice radicale di *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson da Marinello. (a) cellule laterali; (b) immagine ingrandita di una cellula laterale; (c) regione della cuffia; (d) particolare delle cellule della zona centrale; (e) ingrandimento delle cellule sottostanti la zona centrale; (f) immagine ingrandita di una cellula della zona apicale.

Fig. 99a-b. Porzione della cuffia della radice di *C. nodosa* da Marinello. (a) nuclei di cellule da diverse zone della cuffia con livello di ploidia differente; (b) istogramma della frequenza di nuclei ai vari livelli di ploidia e quantitativo di DNA nucleare in cellule della cuffia.

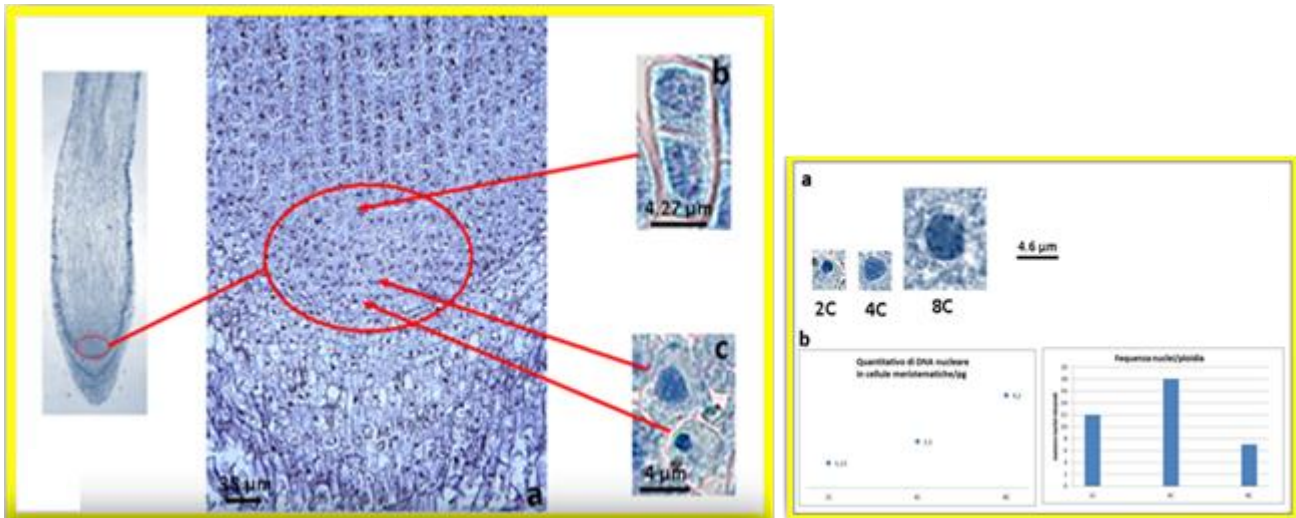


Fig. 100a-c. Sezione longitudinale dell'apice radicale mostrante la regione meristemica in *C. nodosa* da Marinello (Me). (a) zona meristemica; (b) immagine ingrandita di cellule meristematiche nella zona superiore; c) particolare delle cellule della zona centrale.

Fig. 101a-b. Zona meristemica della radice di *C. nodosa* da Marinello (Me). (a) nuclei di cellule da diverse zone della regione meristemica con livello di ploidia differente; (b) istogramma della frequenza di nuclei ai vari livelli di ploidia e quantitativo di DNA nucleare in cellule della zona meristemica.

Nella zona di accrescimento per divisione, immediatamente al di sopra di quella meristemica, le cellule appaiono disposte in file ordinate. Col procedere delle divisioni, nella parte centrale, le cellule appaiono di dimensioni leggermente maggiori e di forma quadrangolare (Fig. 102a, b). Il nucleo sferoidale occupa quasi tutto il volume cellulare e presenta un'organizzazione a cromocentri (Fig. 102b). In queste cellule i valori ritrovati variano da 8C a 16C (Fig. 103a, b). Nella regione superiore, le cellule hanno dimensioni maggiori, si presentano allungate con parete sempre primaria e sottile e citoplasma denso. Il nucleo di forma sferica, con un singolo nucleolo, occupa una posizione centrale (Fig. 102a, c). In queste cellule i valori di DNA ritrovati sono prevalentemente simili a quelli delle cellule precedenti (8C, 16C) (Fig. 103a, b). Nelle regioni laterali, in corrispondenza delle cellule basali della zona di accrescimento per divisione, sono già evidenti segni del differenziamento (Fig. 102a). Infatti, le cellule sono vacuolizzate e la parete è leggermente ispessita. Tali cellule sono quelle che daranno origine alle cellule corticali. Le cellule iniziali dell'epidermide mostrano i primi segni di differenziamento. L'epidermide origina da cellule che si trovano nella zona di passaggio tra la cuffia e le cellule meristematiche (Fig. 102a). Le cellule iniziali dell'epidermide si dividono solo anticlinalmente, costituendo così uno strato distinto. La zona di accrescimento per divisione, nella parte centrale, si può estendere per alcuni millimetri e può variare da una radice all'altra.

Nella parte centrale della zona di accrescimento per distensione le cellule si presentano allungate e con segni evidenti di differenziamento (Fig. 104a-c). La maggior parte del volume cellulare è occupata da un grosso vacuolo e il citoplasma è confinato a ridosso delle pareti che si presentano

ispessite. Il nucleo anche in questo caso si presenta a cromocentri (Fig. 104a-c). Le dimensioni di queste cellule variano in relazione alla loro distanza dall'apice (Fig. 98b, c). I valori di DNA ritrovati in queste cellule corrispondono ad un livello di 16C (Fig. 105a, b). Nella parte basale di questa regione le cellule hanno dimensioni minori rispetto a quelle prossime alla zona di differenziamento. Nella porzione laterale della zona di accrescimento per distensione le cellule interne del cilindro corticale si presentano leggermente allungate (Fig. 104a). Le cellule esterne del cilindro corticale mostrano un livello di differenziamento maggiore nella parte prossimale all'apice (Fig. 104a).

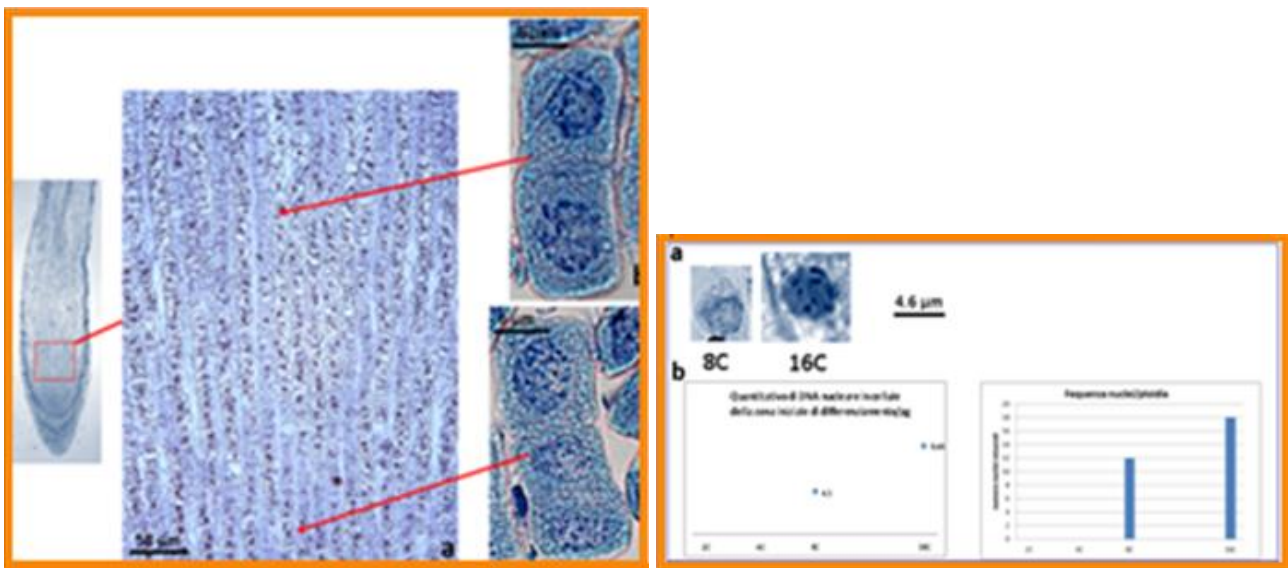


Fig. 102a-c. Sezione longitudinale dell'apice radicale di *C. nodosa* da Marinello (Me). (a) zona di accrescimento per divisione; (b) immagine ingrandita di una cellula della zona centrale; (c) ingrandimento delle cellule sottostanti la zona centrale.

Fig. 103a-b. Zona di accrescimento per divisione della radice di *C. nodosa* da Marinello (Me). (a) nuclei di cellule con livello di ploidia differente; (b) istogramma della frequenza di nuclei ai vari livelli di ploidia e quantitativo di DNA nucleare.

I valori di DNA maggiormente rappresentati in questa zona sono i 16C (Fig. 105a, b). Tra le cellule epidermiche sono presenti le cellule iniziali dei tricoblasti. In questa zona della radice le divisioni sono molto rare. In Figura 106a è mostrato il modello di ploidizzazione dell'intera radice di *Cymodocea nodosa*. In particolare, è messo in evidenza la presenza di una diversità di comportamento dei nuclei nelle diverse zone della radice. Nella cuffia i valori ritrovati variano da 2C a 16C (Fig. 106a, b). I nuclei 16C sono i più rappresentati (41%) e sono riscontrati nelle cellule apicali e laterali alte della cuffia (Fig. 1b). Seguono i nuclei 8C e 4C che rappresentano rispettivamente il 31% e il 22%. Essi si ritrovano prevalentemente nella parte centrale, costituita dalle cellule adiacenti a quelle iniziali della cuffia e della zona sottostante (Fig. 106b). Poco rappresentati (6%) sono i nuclei con livello di ploidia 2C, che si ritrovano vicini alle cellule meristematiche iniziali (Fig. 106a, b).

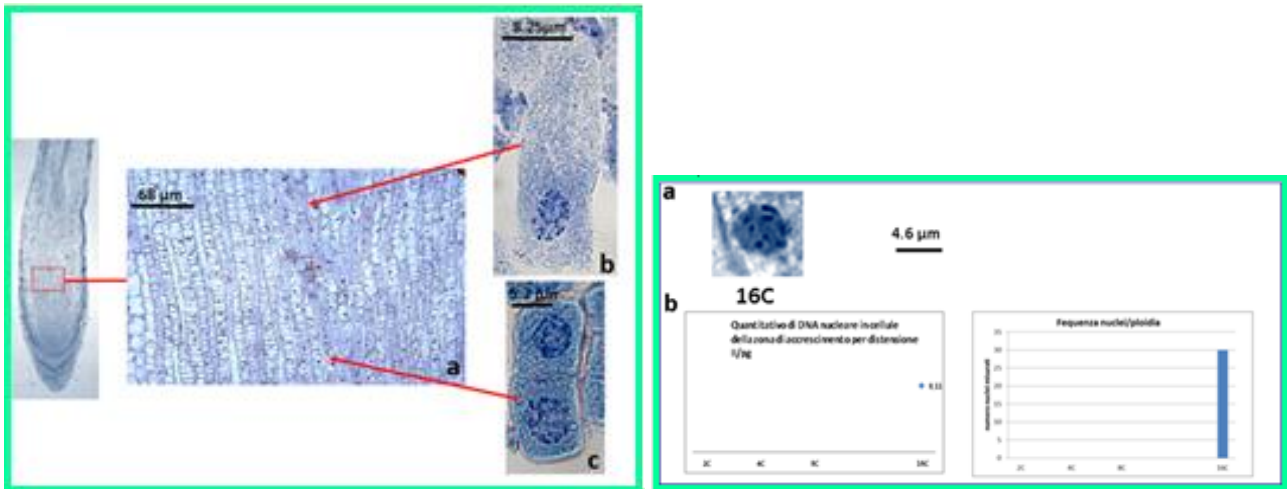


Fig. 104a-c. Sezione longitudinale dell'apice radicale di *C. nodosa* da Marinello (Me). **(a)** zona di accrescimento per distensione; **(b)** immagine ingrandita di cellule nella zona superiore; **(c)** particolare delle cellule della zona centrale.

Fig. 105a-b. Zona di accrescimento per distensione della radice di *C. nodosa* da Marinello (Me). **(a)** nucleo di una cellula della zona di accrescimento per distensione con livello di ploidia 16C; **(b)** istogramma della frequenza di nuclei ai vari livelli di ploidia e quantitativo di DNA nucleare.

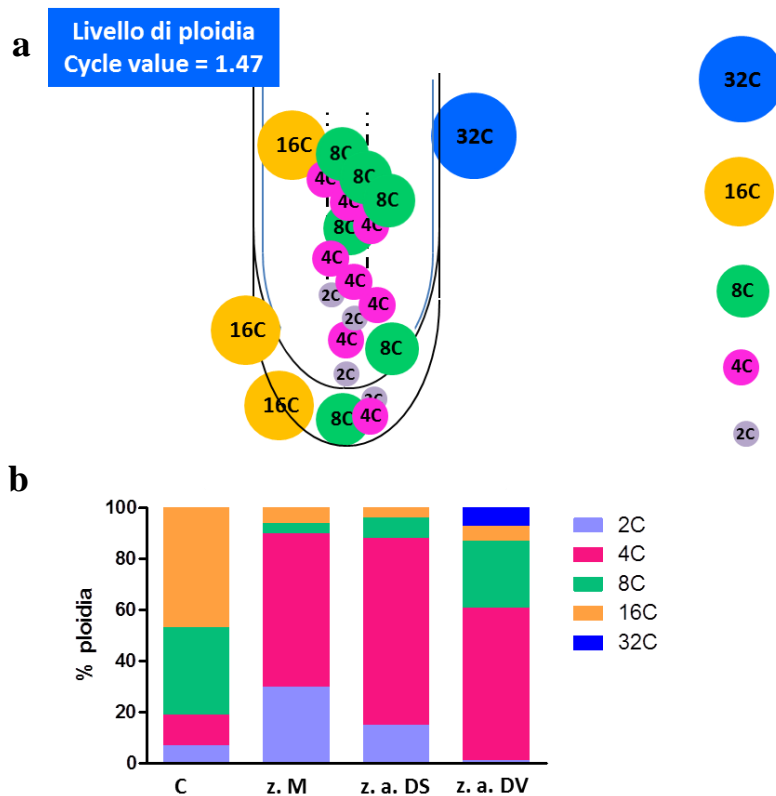


Fig. 106a-b. *Cymodocea nodosa* raccolti presso la Riserva Naturale Orientata dei Laghetti di Marinello (Messina). **(a)** modello di ploidizzazione della radice di individui di *C. nodosa*; **(b)** media delle percentuali di nuclei ai vari livelli di ploidia riportate per le diverse zone della radice. C= cuffia, z.M= zona meristematica, z.a.DS= zona di accrescimento per distensione, z.a.DV= zona di accrescimento per divisione.

Nella zona meristemica i più rappresentati sono i nuclei 2C e 4C con il 31% e 59%, rispettivamente (Fig. 106b). Sono presenti anche nuclei 8C (4%) e 16C (6%) relativi alle cellule della cuffia che si trovano esternamente a tale zona (Fig. 106a, b).

Nella zona di accrescimento per divisione i nuclei 4C sono quelli maggiormente rappresentati (84%) seguiti dai 2C (10%) (Fig. 106b). Come nella zona meristemica, sono presenti pochi nuclei 8C (5%) e 16C (1%), anche questi relativi alle cellule della cuffia, ancora presente in questa zona (Fig. 106a, b).

Nella zona di accrescimento per distensione i nuclei 8C (50%) prevalgono insieme ai 4C (28%) (Fig. 106b). Si riduce notevolmente la presenza dei nuclei 2C (3%). La percentuale di nuclei 16C (18%) aumenta rispetto alle altre zone e si ritrovano anche nuclei 32C (1%). Questi ultimi sono nuclei delle cellule epidermiche e delle iniziali dei peli radicali (Fig. 106a, b).

3.3.3. *Posidonia oceanica*

✚ Analisi quantitativo di DNA

Le indagini di Citometria di Flusso sono state condotte su individui di *Posidonia oceanica* (L.) Delile, raccolte presso la Baia di Brucoli (Siracusa, Italia), spedite e allestite in vasi di plastica con sedimento sintetico in un acquario presso il Laboratorio del Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, Germania).

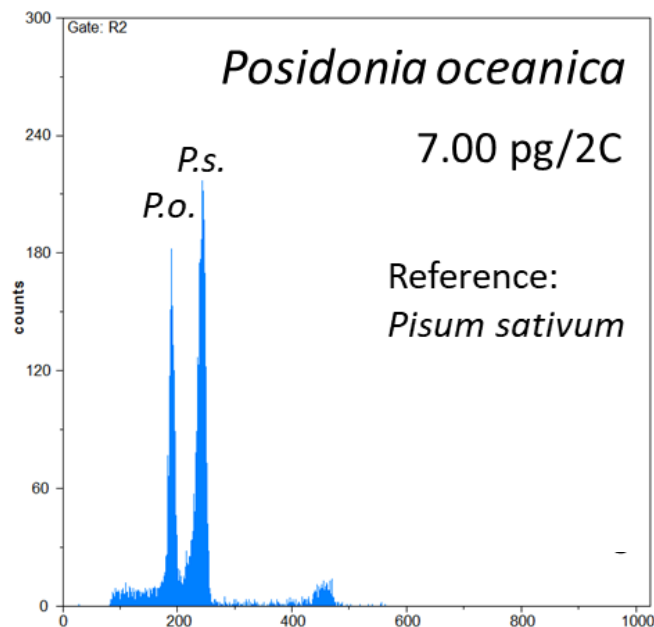


Fig. 107. Istogramma del quantitativo di DNA in cellule di giovani foglie di *Posidonia oceanica* (L.) Delile da Brucoli (Sr).

Le misure delle dimensioni del genoma, eseguite secondo Doležel *et al.* (2017) usando il Citofluorimetro CyFlow Space (Sysmex / Partec), sono state eseguite in giorni diversi con almeno sei misurazioni indipendenti. L'isolamento dei nuclei e la colorazione del DNA, sono stati effettuati contemporaneamente allo standard di riferimento interno, *Pisum sativum* cv. “Viktoria, Kifejtő Borsó” (numero di accesso alla banca genetica IPK PIS 630; 2C = 9.09 pg) (Doležel *et al.* 1998). Il quantitativo di DNA assoluto (pg / 2C) è stato calcolato in base ai valori delle medie dei picchi G1 e alle corrispondenti dimensioni del genoma (Mbp / 1C) in accordo con Doležel *et al.* (2003). L'analisi citofluorimetrica delle giovani foglie di *P. oceanica*, essa non ha rivelato la presenza di nuclei con diverso livello di ploidia ed il contenuto di DNA 2C ritrovato è 7.00 pg (Fig. 107). In Figura 107 è mostrato l'istogramma relativo al quantitativo di DNA di giovani foglie di *Posidonia oceanica* proveniente da Brucoli (Siracusa).

3.3.4. *Zostera noltei*

✚ Analisi quantitativo di DNA

Le analisi di Citometria di Flusso, realizzate durante il soggiorno presso il Laboratorio del Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, Germania), sono state effettuate su giovani foglie di individui di *Zostera noltei* Hornemann provenienti da Brucoli (Siracusa, Italia).

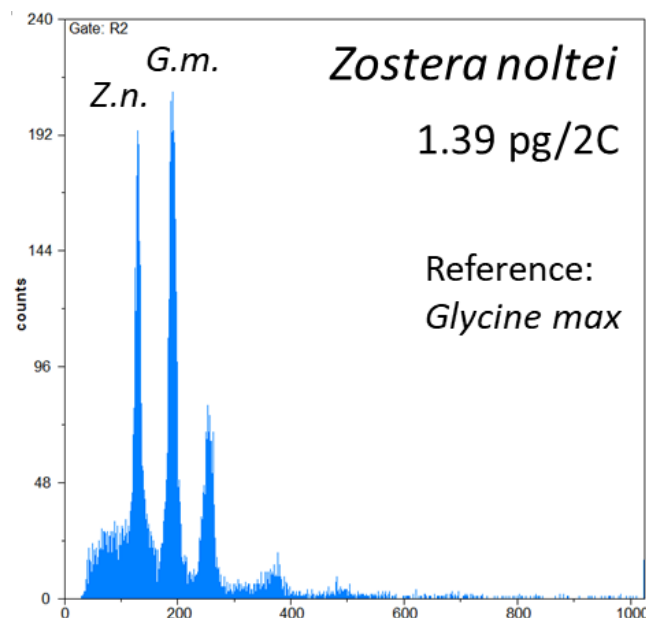


Fig. 108. Iistogramma del quantitativo di DNA in cellule di giovani foglie di *Zostera noltei* Hornemann da Brucoli (Sr).

Le piante, spedite in Germania, sono state sistemate in vasi di plastica in cui è stato aggiunto il sedimento sintetico e allestite in un acquario per assicurare la possibilità di utilizzare materiale vivo, indispensabile, per procedere a una corretta sperimentazione durante i mesi di soggiorno.

Le misure delle dimensioni del genoma, sono state eseguite secondo Dolezel *et al.* (2017) in giorni diversi con almeno sei misurazioni indipendenti usando il Citofluorimetro CyFlow Space (Sysmex / Partec). Come standard di riferimento interno è stato utilizzato il *Glycine max* (L.) Merr. convar. *max var. max*, Cina 5202 (numero di accesso alla banca genetica IPK SOJA 32; 2C = 2.21 pg).

Il quantitativo di DNA assoluto (pg / 2C) è stato calcolato in base ai valori delle medie dei picchi G1 e alle corrispondenti dimensioni del genoma (Mbp / 1C) in accordo con Dolezel *et al.* (2003).

Le stime sul quantitativo di DNA nelle giovani foglie di *Z. noltei* hanno evidenziato la presenza di nuclei con una quantità di DNA fino a 8C (Fig. 108). L'istogramma dei valori di DNA mostrato in Figura 108, ha rivelato infatti tre picchi. La maggior parte dei nuclei erano 2C, a seguire i 4C, mentre quelli con 8C erano scarsamente rappresentati. Il contenuto medio di DNA 2C ritrovato in *Z. noltei* è di 1.39 pg.

3. DISCUSSIONE

3.1. CITOGENETICA CLASSICA E MOLECOLARE, GENOME SIZE

Su tutte le popolazioni di fanerogame marine prese in esame sono stati eseguiti gli studi di citogenetica di base e la quantificazione del DNA nucleare, utilizzando le metodiche classiche e la Citometria d'Immagine (CI) o quella di Flusso (CF). L'analisi della letteratura esistente ha messo in evidenza la carenza di dati di questo tipo relativi alle fanerogame marine (Larkum *et al.* 2006, Larkum *et al.* 2018; Gargiulo *et al.* 2019, Gargiulo *et al.* 2020). Nonostante i dati cariologici siano considerati di fondamentale importanza, spesso in questo gruppo di organismi, risultavano frammentari e incompleti, riferendosi a poche popolazioni e/o limitandosi al solo numero cromosomico, che comunque talvolta necessitava di essere verificato. Per ogni popolazione è stato verificato il numero cromosomico, confermando e in taluni casi, come per esempio in *C. nodosa*, stabilendone uno nuovo; inoltre, si è provveduto allo studio del cariotipo e ed è stata eseguita anche un'analisi di quest'ultimo per capire i meccanismi coinvolti nella sua evoluzione.

Non molto diverso appariva il quadro esistente sui dati di *genome size* in fanerogame marine (Release 7.1, April 2019. Leitch IJ, Johnston E, Pellicer J, Hidalgo O, Bennett MD <https://cvalues.science.kew.org/>). Anche in questo caso gli studi erano scarsi e riferiti ad un numero limitato di popolazioni (Cavallini *et al.* 1995; Hanson *et al.* 2003; Koce *et al.* 2003; Koce *et al.* 2008). Per di più, per il bacino del Mediterraneo, i dati esistenti erano relativi solo a quattro popolazioni delle specie *C. nodosa*, *P. oceanica*, *Z. marina* e *Z. noltii*, analizzate da Koce *et al.* (2003) nel Nord Adriatico. Per tutte le popolazioni di fanerogame marine studiate, i risultati di *genome size* ottenuti rappresentano i primi dati riferiti a popolazioni siciliane e in particolare il primo report di 2C-value segnalato per *Halophila stipulacea* del Mar Rosso (area tipo della specie).

Sostanzialmente assenti sono i dati di citogenetica molecolare attinenti alle angiosperme marine. Solo recentemente è stato pubblicato un lavoro relativo al genere *Zostera* (Peska *et al.* 2020) in cui è descritta in *Z. marina* la presenza di una sequenza telomerica di tipo animale piuttosto che di tipo pianta. In relazione alle specie studiate, a parte *H. stipulacea*, su tutte le altre specie sono stati messi a punto i protocolli per l'estrazione, la purificazione e l'amplificazione di DNA genomico per preparare le sonde da utilizzare per l'ibridazione in situ (FISH). In particolare, il DNA genomico isolato è stato usato come modello per amplificare le regioni di rDNA con coppie di primer progettate per 18S-rDNA, 26S-rDNA, 5S-rDNA. Usando tetrameri di ripetizioni di telomeri di tipo *Arabidopsis* (TTTAGGG)_n e di tipo umano (TTAGGG)_n, sono state generate dalla PCR sonde telomeriche specifiche. I prodotti PCR sono stati usati come modelli per l'etichettatura tramite il metodo della 'Nick-translation' per generare le corrispondenti sonde FISH. Le sonde 18S-rDNA, 26S-rDNA di *C.*

nodosa e le sonde telomeriche di *Arabidopsis*, sono state etichettate con coloranti ammino-reattivi attraverso una marcatura diretta con Cy3-dUTP, Alexa Fluor 488-5-dUTP e Texas Red-12-dUTP, mentre le sonde telomeriche umane con apteni sono state inoltre marcate con Dig. e Bio mediante il metodo indiretto di marcatura (*Imm labeling*). Dati attendibili sono stati ottenuti solamente su individui di *C. nodosa*, mentre per *P. oceanica* e *Z. noltei* sia le sonde telomeriche che quelle ribosomiali non hanno dato risultati apprezzabili. Comunque, i dati ottenuti su *C. nodosa* rappresentano in assoluto i primi dati per questo genere.

3.2. GENERE *HALOPHILA*

3.2.1. Citogenetica di base e quantitativo di DNA

Il confronto dei dati citogenetici ottenuti dalla popolazione di *H. stipulacea* del Mar Rosso con quelli di altre popolazioni o specie riportati in letteratura hanno consentito di elaborare alcune considerazioni generali sui meccanismi coinvolti nell'evoluzione del cariotipo e del *genome size* in questo genere.

Un numero cromosomico diploide di $2n = 18$ è stato riportato per la prima volta da den Hartog *et al.* (1987) in una popolazione di *H. stipulacea* di Malta, ma senza includere informazioni sulla morfologia cromosomica. Il primo tentativo di studio del cariotipo in questo genere è stato quello di Famà (1995-96) su una popolazione di *H. stipulacea* di Riposto, Sicilia (*H_sti_Rip*). Essa presentava un numero cromosomico $2n = 18$ con una formula cariotipica $2n = 14m + 2sm + 2st$ ed, inoltre, costrizioni secondarie su diversi cromosomi. Ad oggi non sono stati riportati altri dati per questa specie.

Le nostre osservazioni hanno confermato la presenza in *H. stipulacea* di $2n = 18$ cromosomi, ma hanno messo in evidenza differenze morfologiche e dimensionali nei cromosomi riportati per le diverse specie in letteratura ed in particolare tra la popolazione di *H. stipulacea* dal Mar Rosso e quella proveniente da Riposto. La lunghezza dei cromosomi in *H_sti_Rip*, come descritta da Famà (1995-96), differisce ampiamente da quelli di *H_sti_StMe*, *H_sti_Vul*, *H_sti_RS*. Inoltre, in *H_sti_Rip* la coppia I si presenta submetacentrica e le coppie III, VI, IX metacentriche, mentre nelle altre popolazioni sono rispettivamente metacentriche, sub-telocentriche, sub-telocentriche e submetacentriche. Restrizioni secondarie non sono state osservate in *H_sti_StMe*, *H_sti_Vul*, *H_sti_RS*. I dati ottenuti dalla ri-misurazione delle piastre metafasiche originali della popolazione di Riposto (*H_sti_Rip* *) e quelli ottenuti da nuovi individui della stessa popolazione (*H_sti_Rip* **), hanno mostrato che la loro lunghezza cromosomica e la loro morfologia sono in accordo con quelli descritti per le altre popolazioni di *H. stipulacea* compresa quella del Mar Rosso. L'analisi del cariotipo mSCL / mCA e l'asimmetria del cariotipo evidenziano la corrispondenza tra *H. stipulacea* da Riposto e tutti

gli altri individui del Mediterraneo e del Mar Rosso. I valori di asimmetria del cariotipo, espressi come MCA e CVCL, indicano l'esistenza di una corrispondenza morfologica tra i cromosomi. Inoltre, i dati indicano l'assenza di variazioni intercromosomiche e intracromosomiche tra le popolazioni e nelle popolazioni. Pertanto, questi valori suggeriscono che le differenze cromosomiche morfologiche tra *H_sti_Rip* * e *H_sti_Rip* **, *H_sti_StMe*, *H_sti_Vul* e *H_sti_RS* sono attribuibili più a una contrazione non sincronizzata dei bracci cromosomici che a un reale cambiamento nella loro morfologia. Questa ipotesi è supportata anche dai dati ottenuti con gli altri metodi impiegati per valutare l'asimmetria del cariotipo (TF%, CVCL / CVCI). I valori relativamente bassi di asimmetria intercromosomica (CVCL) tra *H_sti_StMe*, *H_sti_Vul*, *H_sti_RS*, *H_sti_Rip* * e *H_sti_Rip* ** suggeriscono una variazione di dimensioni cromosomiche trascurabile tra le rispettive coppie cromosomiche dei loro complementi. L'assenza di differenze nella dimensione cromosomica tra i taxa studiati è stata supportata anche dal Coefficiente di Variazione dell'Indice Centromerico (CVCI). Questo valore potrebbe essere utile, soprattutto quando la variazione delle dimensioni dei cromosomi è insignificante, come parametro opzionale per rivelare le relazioni cariotipiche tra gli organismi (Peruzzi e Eroğlu 2013). Inoltre, le costrizioni secondarie costituiscono un parametro cromosomico altamente variabile e possono essere o meno espresse nella cellula (Sato *et al.* 1980; Guerra 2000, 2012; Feitoza *et al.* 2009). Su queste basi, sembra ragionevole supporre che tutte le popolazioni di *H. stipulacea* abbiano un cariotipo leggermente bimodale con formula cariotipica $2n = 18 = 10m + 2sm + 6st$.

La ri-esaminazione dei dati presenti in letteratura ha evidenziato una corrispondenza del cariotipo di *H. stipulacea* con le altre specie studiate ad eccezione di quelli riportati per *Halophila minor* e *Halophila ovata* (Huang *et al.* 2010; Hiranphan *et al.* 2014; Wenjie *et al.* 2012; Vanitha *et al.* 2016). Analogamente a quanto riscontrato nella popolazione di Riposto, sono stati rilevati possibili errori morfologici e dimensionali con altre specie di *Halophila* (Subramanian 2000; Xiang-Xu *et al.* 2010; Wenjie *et al.* 2012; Hiranphan *et al.* 2014; Vanitha *et al.* 2016). Tutti i taxa analizzati hanno $2n = 18$ cromosomi, ad eccezione di *H. minor* (Zollinger) den Hartog dalla Cina con $2n = 28$ (Wenjie *et al.* 2012) e *H. ovata* dalla costa di Mandapan (India) con $2n = 16$ (Subramanian 2000). Vanitha *et al.* (2016), nella loro analisi citomorfometrica sulle fanerogame delle famiglie Hydrocharitaceae e Cymodoceaceae dall'India, studiavano alcuni taxa di *Halophila*. *H. beccari* era l'unica a possedere una lunghezza cromosomica aploide totale di $37,86 \pm 0,38 \mu\text{m}$, mentre tutte le altre specie di *Halophila* avevano valori compresi tra $7,81 \pm 0,08 \mu\text{m}$ e $8,78 \pm 0,05 \mu\text{m}$. Questi ultimi valori sono notevolmente diversi da quelli conosciuti per le altre specie di questo genere, suggerendo un possibile errore di scala dimensionale nelle misure come ritrovato nella popolazione *H_sti_Rip*. Questa ipotesi è rafforzata da un'indicazione evidentemente errata d'ingrandimento per tutte le immagini riportate

nella loro tabella (Vanitha *et al.* 2016: fig. 1, x1000), rendendo in ogni caso impossibile una verifica delle misure da loro riportate. Diverse imprecisioni nell' "Appendice" supportano anche la possibilità che siamo di fronte a un errore computazionale. Tuttavia, è interessante notare che le formule cariotipiche di *H. ovalis* sottospecie *ramamurthiana* e *H. ovata*, le uniche le cui immagini metafasiche risultano chiare, sono identiche o molto simili a quelle descritte nelle nostre popolazioni. Tuttavia, i dati presentati da Vanitha *et al.* (2016), esclusi i numeri cromosomici, devono essere confermati prima di poter essere utilizzati.

Solo piccole differenze sono state rilevate tra il cariotipo *H. stipulacea* e quello di *H. ovalis* e *H. beccari* da Hong Kong (Xiang-Xu *et al.* 2010). In particolare, le differenze morfologiche nelle coppie II e III tra le nostre popolazioni e quelle cinesi sono probabilmente dovute a un'errata interpretazione della loro morfologia. Le immagini presentate da Xiang-Xu *et al.* (2010; fig. 1c, d) mostrano chiaramente che entrambe le coppie di cromosomi sono sub-telocentriche e non sub-metacentriche sia in *H. ovalis* che in *H. beccari*. Anche in questo caso, le variazioni interspecifiche nella morfologia dei cromosomi tra *H. stipulacea* e queste specie sembrano più attribuibili alla variabilità nel grado di condensazione dei cromosomi che a una reale differenza tra loro. Questa interpretazione è supportata dal confronto dei dati cariomorfologici delle specie cinesi, ottenuti dalle immagini originali, con quelli di *H. stipulacea*.

Subramanian (2000) ha riportato in *H. ovata* da Camp Mandapan (Golfo di Mannar, India) $2n = 16$ cromosomi. Questo è in disaccordo con i dati recentemente riportati per una popolazione di *H. ovata* proveniente dalla costa di Tamilnadu (India), in cui sono stati osservati $2n = 18$ cromosomi (Vanitha *et al.* 2016). I dati descritti da Hiranphan *et al.* (2014) su *H. ovalis*, *H. beccari* e *H. major* dalla Thailandia sostengono parzialmente la nostra ipotesi di un cariotipo costante, confermando la presenza di $2n = 18$ cromosomi in tutti i taxa. Inoltre, *H. ovalis* dalla Thailandia presenta la stessa formula del cariotipo delle nostre popolazioni di *Halophila*, mentre *H. beccari* differisce da questi per la presenza di una coppia sub-metacentrica e sub-telocentrica in sostituzione di due coppie metacentriche e *H. major* per una coppia sub-metacentrica invece di una metacentrica. Sfortunatamente, questi dati sono stati riportati solo in un abstract presentato all'11° International Seagrass Biology Workshop e non sono reperibili i dati morfologici o le immagini relative.

H. minor dalla Cina (Wenjie *et al.* 2012) merita un'attenzione particolare in relazione al suo numero cromosomico. Diverse ipotesi, sull'origine di $2n = 28$ cromosomi, potrebbero essere proposte considerando $x = 9$ come numero base. Una delle possibilità è che questo numero cromosomico potrebbe essere nato da un evento di paleoploidizzazione seguito da una diploidizzazione citologica (Leicht e Leicht 2013). La distinzione tra autoploidia e allopoliploidia, specialmente in eventi poliploidi lontani, può essere piuttosto difficile e a volte impossibile (Doyle e Egan, 2010). Tuttavia,

l'effetto più evidente dell'autopoliploidia o dell'alloploidia su un cariotipo è l'aumento del numero di cromosomi (Weiss-Schneeweiss e Schneeweiss, 2013). Durante l'evoluzione di una specie, anche i numeri cromosomici poliploidi possono essere considerevolmente ridotti, anche al di sotto del livello originale dei taxa diploidi ancestrali (Lysák *et al.* 2006). La possibilità che un evento poliploide seguito da diploidizzazione abbia avuto luogo in *H. minor* è in parte supportata dall'analisi del suo cariotipo. Consiste di quattordici coppie di cromosomi, nove dei quali corrispondono per dimensioni e morfologia a quelli presenti nel cariotipo di tutte le altre popolazioni di *Halophila* studiate. Le altre coppie extra rappresentano copie delle più grandi coppie meta-subtelocentriche (I / IV e II / III) e di quella piccola subtelocentrica VI risultante in un complemento di base parziale in cui, escludendo la coppia VI, tutte le altre copie delle coppie di piccole dimensioni sembrano essere state eliminate. Tuttavia, dobbiamo anche considerare che i dati sono stati ottenuti utilizzando la colchicina, e quindi non è possibile escludere del tutto la possibilità che, dopo la duplicazione del genoma, alcuni dei più piccoli cromosomi siano stati persi in seguito a schiacciamento. È chiaro che in questo momento non abbiamo dati sufficienti per capire quali eventi sono stati coinvolti nella formazione di questo cariotipo. A nostro avviso, i conteggi cromosomici di *H. ovata* ($2n = 16$) dall'India e *H. minor* ($2n = 28$) dalla Cina devono essere controllati prima che possano essere accettati come validi. In ogni caso il ritrovamento di $2n = 28$ cromosomi in questa specie apre la possibilità che in questo genere la poliploidia abbia avuto un ruolo nella speciazione.

Questa ipotesi è supportata dai dati riportati da York (2005) il quale osservava una differenza tra il quantitativo di DNA presente in alcune specie di *Halophila*. L'analisi dei dati di *genome size* riportati in letteratura insieme a quelli sulle diverse popolazioni mediterranee di *H. stipulacea* e a quella ottenuta da popolazioni del Mar Rosso ha evidenziato tre gruppi dimensionali (5.5-7.5 pg; 12.26-15 pg e 22-27 pg), che riflettono una serie poliploide.

York (2005) ipotizzava che la linea ancestrale che portava al genere *Halophila* aveva un basso contenuto in DNA e un numero cromosomico ridotto. Dati filogenetici mostrano due gruppi identificabili (Waycott *et al.* 2002; York 2005; Uchimura *et al.* 2008; Les and Tippery 2013). Tra questi il clade comprensivo di specie con fillotassi complessa e alto contenuto di DNA (*H. engelmannii*) risultava basale a quello comprensivo di specie con fillotassi semplice e basso contenuto di DNA (*H. decipiens*, *H. stipulacea*) suggerendo che in questo genere la tendenza sembra procedere nella direzione di una diminuzione della complessità morfologica e del quantitativo di DNA. Questa tendenza è in contrasto con quanto ipotizzato da Hawkins *et al.* (2008), i quali sostenevano che, nella maggior parte dei casi, la direzionalità dell'evoluzione della dimensione del genoma della pianta è orientata verso la crescita, con meccanismi di perdita di DNA che agiscono per attenuare (ma non invertire) la marcia verso l'“obesità”.

Da quanto evidenziato dai nostri dati, possiamo affermare che in questo genere sono presenti taxa con cariotipo costante (numero e morfologia uguali) ma con un genoma con differenti quantitativi di DNA. I meccanismi che portano ad un cambio nel numero cromosomico sono diversi da quelli che producono cambi nel quantitativo di DNA così che le dimensioni del genoma non riflettono necessariamente una variazione nel numero cromosomico (Leitch e Leitch 2013; Wendel *et al.* 2016). L'incremento o la diminuzione del contenuto in DNA è causato principalmente da fenomeni di poliploidia e/o dall'amplificazione di elementi genetici trasponibili (Bennetzen *et al.* 2005; Hawkins *et al.* 2008). Come ipotizzato da Poggio *et al.* (2014) per il genere *Hippeastrum*, la presenza di un cariotipo identico nelle specie di *Halophila* suggerisce l'azione di meccanismi selettivi per conservarne la costanza nel numero e nella morfologia. La presenza di taxa con cariotipi aventi tali caratteristiche è generalmente considerata il risultato di una evoluzione ortogenetica del cariotipo (karyotype orthoselection) o una conservazione del cariotipo (karyotype conservation) (White 1973; Poggio *et al.* 2007).

I nostri dati hanno mostrato una leggera variazione nella quantità di DNA tra le popolazioni di *H. stipulacea* dai diversi siti studiati in contrasto con la relativa costanza della lunghezza totale del cromosoma. Oltre alla possibilità che i metodi utilizzati per stimare le dimensioni del genoma siano imprecisi, le variazioni di intrapopolazione che si estendono entro il 10% esistono (Šmarda e Bureš, 2010). Tuttavia, York (2005) ha riportato per gli individui di *H. stipulacea* dalla Giordania, un valore 2C circa la metà (7.5 pg) di quello trovato da noi per la popolazione *H_sti_RS* con $2n = 18$ cromosomi della stessa area (12.26 pg.), aprendo la possibilità alla presenza contemporanea di individui o popolazioni con diversa quantità di DNA ma stesso numero di cromosomi. Sfortunatamente, York (2005) non ha riportato alcun conteggio cromosomico per i suoi taxa studiati. Ovviamente, è necessaria una ricerca più ampia sulle popolazioni di diverse località del Mar Rosso al fine di trarre conclusioni corrette.

Tuttavia, poiché le dimensioni del genoma e i dati cromosomici attualmente disponibili sulle diverse specie di *Halophila* sono frammentari e non sempre attribuibili allo stesso individuo / popolazione, è possibile fare solo considerazioni generali. È ragionevole presumere che vi sia uniformità nella morfologia del cariotipo in tutti i taxa di *Halophila* esaminati. Le specie / popolazioni analizzate, comprese quelle riportate in letteratura, presentavano un numero cromosomico di base $x = 9$ e tutte erano diploidi ($2n = 18$), mostrando un complemento aploide leggermente bimodale con quattro cromosomi grandi e cinque piccoli. *H. minor* dalla Cina e *H. ovata* dall'India rappresentano un'eccezione ma, come discusso in precedenza, i dati riportati per questi taxa devono essere confermati. Il cariotipo bimodale è presente in molte piante e animali e rappresenta una delle linee di evoluzione cromosomica di maggior successo e un caso speciale di asimmetria (Vosa 2005; Poggio

et al. 2007). Secondo Leicht *et al.* (2010), un'organizzazione del cariotipo bimodale è più comune nelle monocotiledoni che nei dicotiledoni. Vosa (2005) ha suggerito che i complementi cromosomici bimodali hanno un'origine molto antica. Sono stati ipotizzati due processi per dare origine a distribuzioni di dimensioni cromosomiche bimodali (McKain *et al.* 2012). Il primo dovuto a un riarrangiamento cromosomico che coinvolge eventi di fusione-fissione (Schubert e Lysak 2011) attribuito a uno shock genomico associato a un evento allopoliploide (Wendel 2000; Comai *et al.* 2003; Chen e Ni 2006). Un secondo meccanismo ipotizzato a causa di un evento di allopoliplodizzazione che coinvolge specie parentali con diverse dimensioni cromosomiche. Al momento non si può dire nulla in merito perché, anche considerando validi $2n = 28$ cromosomi nella popolazione di *H. minor* proveniente dalla Cina, tutte le specie presentano cariotipi uniformi che rendono difficile distinguere l'origine dei cromosomi. Infatti tutte le specie di *Halophila*, oltre all'organizzazione bimodale, hanno mostrato uniformità nel numero, dimensione e morfologia dei cromosomi. L'esistenza di gruppi di taxa con tale complemento è generalmente considerata il risultato dell'ortoselezione del cariotipo o della conservazione del cariotipo (White 1973; Poggio *et al.* 2007). Come riportato da Vosa (2005) nella tribù Aloineae (Asphodelaceae), l'uniformità del cariotipo può essere la conseguenza della stabilità climatica e della somiglianza dell'habitat. L'ambiente marino rappresenta un sistema più stabile rispetto a quello terrestre e presumibilmente ha contribuito alla convergenza morfologica nell'habitus delle fanerogame. Attualmente, cariotipi bimodali sono stati riportati in altre fanerogame marine come *Posidonia*, *Halodule* e *Ruppia* (Kuo *et al.* 1990; Semroud *et al.* 1992; Talavera *et al.* 1993; Uchiyama 1989, 1993). Tuttavia, potrebbe essere vantaggioso testare tale ipotesi su taxa filogeneticamente distanti ma che condividono un habitat con parametri molto più stabili.

In conclusione, sembra quindi che nel genere *Halophila* il cambiamento cromosomico evolutivo comporti un'alterazione della quantità di DNA mentre allo stesso tempo mantiene l'ortoselezione / conservazione del cariotipo e preserva le proporzioni relative e il numero dei membri del set cromosomico. Come ipotizzato da Poggio *et al.* (2014) per il genere *Hippeastrum*, il cariotipo conservato in questi taxa suggerisce la presenza di meccanismi che selezionano per la costanza, o contro i cambiamenti, nella morfologia del cariotipo. Inoltre, questi meccanismi nel genere *Halophila* sembrano funzionare anche per preservare il numero cromosomico. La costanza del cariotipo, sia nel numero che nella struttura dei cromosomi, deriva dalla necessaria fedeltà della replicazione cromosomica e garantisce il trasferimento fedele del materiale genetico alla generazione successiva (Weiss-Schneeweiss e Schneeweiss 2013). I principali gruppi di gimnosperme hanno una complessiva uniformità di numero di cromosomi e cariotipo ma anche in questo caso siamo lontani dal chiarire il meccanismo selettivo alla base della loro evoluzione del cariotipo (Murray 2013).

3.2.2. Citogenetica molecolare

Sia nel periodo di allestimento delle vasche di coltura presso l'Università di Messina che durante il periodo di soggiorno presso il laboratori di Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK, Gatersleben, Germania) non è stato possibile campionare materiale vivo da popolazioni mediterranee o del Mar Rosso di *H. stipulacea*, fondamentale per le analisi di citogenetica molecolare. Conseguentemente, tali analisi su questa specie sono state rimandate a “tempi migliori”.

3.3. GENERE *CYMODOCEA*

3.3.1. Citogenetica di base e quantitativo di DNA

Gli studi di citogenetica nel genere *Cymodocea* sono limitati a pochi lavori (Miège, 1960; den Hartog *et al.* 1987; Sivakamasundari e Selvaraj 1999; Koce *et al.* 2003; Kuo 2013. In particolare, delle quattro specie attualmente riconosciute per questo genere, ad oggi, sono state studiate solo sei popolazioni di *C. nodosa*, due di *C. serrulata* e una popolazione di *C. angustata* e *C. rotundata*. Inoltre, le osservazioni sono spesso limitate al solo numero cromosomico senza il supporto di immagini; solo Miège (1960) e den Hartog *et al.* (1987) riportano il disegno di una piastra metafasica, rispettivamente per la popolazione di *C. nodosa* con $2n = 14$ del Senegal e di quella greca con $2n = 28$. Infine Kuo (2013) presenta le immagini relative a *C. angustata*, *C. rotundata* e *C. serrulata* di tre popolazioni australiane.

In *C. nodosa* due citotipi, $2n = 14$ e $2n = 28$, sono stati ritrovati in popolazioni mediterranee dalle coste spagnole, francesi e greche (den Hartog *et al.* 1987). Il citotipo $2n = 14$ è stato osservato anche in una popolazione del Senegal (Miège 1960). *C. nodosa* con $2n = 28$ è stata segnalata anche per una popolazione di *C. nodosa* in Croazia, nel Nord Adriatico (Koce *et al.*,2003). Sulla base di questi dati den Hartog *et al.* (1987) dimostravano la presenza di popolazioni diploidi e tetraploidi, anche nella stessa area, ed ipotizzavano la possibilità dell'esistenza di taxa infraspecifici in *C. nodosa*. La loro ipotesi era anche supportata da dati molecolari (McMillan *et al.* 1983) e dalla plasticità morfologica delle varie popolazioni. Un certo grado di diversità genetica, misurata sull'analisi di loci microsatellitari, è stata dimostrata da Alberto *et al.* (2008) nel loro lavoro su popolazioni mediterranee ed atlantiche di *C. nodosa*, tuttavia non sono state prese decisioni di tipo tassonomico collegate a tale diversità.

La presenza di diversi citotipi ($2n = 14$ e $2n = 28$) consentiva anche di supporre che la poliploidia potesse essere uno dei meccanismi di speciazione in questo genere e che il numero base del genere fosse $x = 7$. L'unico lavoro, su di una popolazione indiana di *C. serrulata*, riporta un citotipo $2n = 16$

(Sivakamasundari e Selvaraj 1999). Questo dato consente di supporre che l'aneuploidia abbia giocato un ruolo nella speciazione in questo genere.

I dati cariologici relativi alla popolazione di *Cymodocea nodosa* raccolta presso la Riserva Naturale Orientata Laghetti di Marinello (Oliveri, Messina), ottenuti da apici radicali e caulinari, hanno evidenziato la presenza in cellule somatiche di nuclei con differente numero cromosomico (poliploidia somatica). Tale variabilità era osservata sia nell'ambito di una stessa popolazione sia nel singolo individuo. La ploidizzazione delle cellule, da noi osservata, è facilmente dedotta dalla presenza nello stesso individuo di metafasi a monocromosomi diploidi, tetraploidi o a ploidia maggiore. Le osservazioni evidenziavano infatti che alcune cellule seguono un regolare andamento delle fasi mitotiche, che porta a cellule con nuclei diploidi ($2n = 8$) o ploiploidi (16, 32, ... n^x), altre mostrano numeri cromosomici variabili non riconducibili a eventi strettamente poliploidi. La presenza di nuclei con diverso grado di poliploidia in un singolo organismo, polisomatia, è un fenomeno largamente riscontrato in tessuti differenziati o in differenziamento, sia in piante che animali (Barow 2006; Barow e Jovtchev 2007; Maluszynska *et al.* 2013). Alcune cellule sviluppano un contenuto di DNA poliploide durante il normale ciclo biologico dell'organismo e possono essere classificate come cellule poliploidi obbligate (programmate). Altre, diventano poliploidi solo in risposta a certi stimoli, così come un grosso stress funzionale o per invecchiamento.

In circa il 90% delle angiosperme, in molte pteridofite e in alcune gimnosperme, il processo di differenziamento istologico è in concomitanza con l'aumento dei valori di DNA nelle cellule coinvolte in tale processo. Secondo quanto riportato in letteratura, i meccanismi che consentono a queste cellule di cambiare il loro stato di ploidia sono diversi. In accordo con D'Amato (1964; 1984; 1989), i metodi di ploidizzazione cellulare conosciuti, sia in organismi animali che vegetali, sono la mitosi acitocinetica, la fusione del fuso, la mitosi restituzionale, l'endomitosi ed infine l'endoreduplicazione dei cromosomi (politenia). Quest'ultima rappresenta il meccanismo più comune ritrovato in cellule di tessuti vegetali (Barow e Jovtchev 2007; Leitch e Dodsworth 2017; Maluszynska *et al.* 2013). A causa della sua frequenza tra differenti taxa e tipi cellulari, si pensa che l'endoreduplicazione ha un importante ruolo nello sviluppo e nel differenziamento delle cellule. Tale fenomeno sembra particolarmente presente in piante che posseggono genomi di piccole dimensioni, aumentando nelle cellule la disponibilità di "nuclear templates", la sintesi di DNA, e regolando probabilmente l'espressione genica (Scholes e Paige 2014). I dati, ritrovati negli individui della popolazione siciliana, hanno evidenziato la presenza di cellule con numeri cromosomici organizzabili in tre serie poliploidi più alcuni numeri aneuploidi. La prima linea caratterizzata da cellule con numeri cromosomici uguali ad 8 o suoi multipli; mentre le altre due caratterizzate da numeri pari a 7 e a 9 o loro multipli. Secondo quanto osservato durante la fase di sviluppo nelle radici di *C. nodosa*, i nuclei

delle cellule mitoticamente attive della zona meristemica vanno incontro a diversi endocicli alternati da mitosi regolari o anomale. Le diverse anomalie osservate, quali la non disgiunzione dei cromosomi e la perdita di un singolo cromosoma in metafase o la presenza di cromosomi ritardatari in anafase, potrebbero essere all'origine delle linee a 7 o 9 cromosomi. I nuclei aneuploidi con numeri cromosomici maggiori, in zone progressivamente distanti dall'apice, potrebbero anche esse essere attribuite a mitosi anomale in cellule che hanno già avuto endocicli.

La variazione di numeri cromosomici nello stesso individuo è un fenomeno conosciuto, aneusomatia, in specie o varietà di piante cresciute sia in natura che coltivate (D'Amato 1995; D'Amato e Bayliss 1985). Anomalie all'anafase o alla metafase sono ritenute responsabili della variazione numerica dei cromosomi (Cardone *et al.* 2009; D'Amato 1995; Greilhuber e Weber 1975). Tale fenomeno, sebbene attualmente considerato raro, è stato riportato in altri generi di angiosperme terrestri e sembra sia molto più diffuso di quanto non riportato in letteratura. Le osservazioni fatte sugli individui della popolazione siciliana sono in accordo con quanto descritto nella maggior parte di piante in cui l'aneusomatia è stata descritta negli apici vegetativi meristemici dovuta a mitosi anomale, per poi continuare nelle altre zone durante le fasi di crescita e differenziamento della pianta (D'Amato 1995). In popolazioni naturali la frequenza di individui aneusomatici si è dimostrata variabile (Cardone *et al.* 2009; Greilhuber e Weber 1975; Lewis 1970; Speckmann e Van Dijk 1972). In *C. nodosa*, praticamente, tutti gli individui studiati mostravano tale fenomeno. Una simile frequenza di individui aneusomatici era osservata in popolazioni naturali di *Poa pratensis* L. provenienti da differenti località (Speckmann e Van Dijk 1972). La popolazione siciliana di *C. nodosa* condivide con questa specie anche una alta variabilità nel numero dei cromosomi presenti nelle loro radici. Su queste basi, sembra ragionevole ipotizzare che la variabilità riportata in letteratura per *C. nodosa* (den Hartog *et al.* 1987) potrebbe essere correlata alla presenza in queste popolazioni sia di aneusomatia che endopoliploidia.

L'azione combinata di endoreduplicazione e mitosi anomale sembrerebbe all'origine della formazione di nuclei con numeri cromosomici e livelli di ploidia diversi. Una simile conclusione potrebbe essere proposta per le specie australiane nelle quali è stata riportata la presenza di variazioni cromosomiche nelle popolazioni (Kuo 2013). È interessante notare che le immagini riportate da Kuo (2013) mostrano nuclei con un differente livello di ploidia. Ovviamente ulteriori studi saranno necessari, ed in particolare sulle specie Indo-Pacifiche, prima di formulare conclusioni circa la possibilità che questi meccanismi possano rappresentare una caratteristica intrinseca a livello di specie o di genere. Comunque, se la presenza di aneusomatia fosse confermata nelle altre specie del genere *Cymodocea*, sarebbe interessante considerare la possibilità che questo fenomeno fosse presente da prima che esse andassero incontro a speciazione.

Cavallini *et al.* (1988) and Cremonini *et al.* (1991) hanno dimostrato che l'aneusomatia è una caratteristica largamente diffusa a livello di specie e varietà in *Helianthus annuus* L. (girasole). Inoltre, va ricordato che è stato dimostrato che l'aneusomatia si trasmette alla progenie e che è un carattere dominante (Ogura 1978). La dominanza di questo carattere nelle nostre popolazioni può essere ipotizzata grazie alla presenza di individui aneusomatici di nuova generazione che continuano a germinare in natura, come ritrovato nei generi *Poa* L. and *Orobancha* L. (D'Amato 1995).

Il destino dell'aneusomatia nella popolazione siciliana di *C. nodosa* non è ancora del tutto chiarito perché al momento non è stato possibile studiare la meiosi in individui fertili. Comunque, è stato dimostrato che in vere specie diploidi, quelle in cui il numero cromosomico è uguale al numero di base, come sembrerebbe essere il caso di *C. nodosa*, opera una selezione diplontica così da mantenere le cellule dei tessuti sporigeni sempre diploidi e la progenie uniformemente diploide (D'Amato 1995). La presenza costante nelle cellule meristematiche di 8 cromosomi e il loro costante livello di ploidia (2C) negli apici radicali e caulinare di tutti gli individui studiati suggerisce che tale meccanismo di selezione diplontica potrebbe essere presente anche in *C. nodosa*.

Le indagini effettuate mediante l'utilizzo della Citometria d'Immagine (IC) su individui di *C. nodosa* di Marinello, hanno messo in evidenza la presenza di fenomeni di poliploidia somatica.

Tale fenomeno è supportato dalle misure densitometriche sulla distribuzione dei nuclei ed sul contenuto in DNA di cellule delle differenti zone della radice. Il modello di differenziamento dell'intera radice di *C. nodosa*, infatti, ha mostrato una diversità di comportamento dei nuclei nelle diverse zone. Inoltre, per chiarire gli aspetti correlati al contenuto di DNA presente negli individui di *C. nodosa* ed evidenziare la presenza di fenomeni di poliploidia somatica anche nelle altre porzioni della pianta, è stato completato lo studio del quantitativo di DNA presente nelle cellule di giovani foglie e fusti attraverso la tecnica di Citometria di Flusso (CF). Le stime sul quantitativo di DNA nelle giovani foglie e negli internodi di *C. nodosa* hanno evidenziato la presenza di nuclei con una grande variabilità nel contenuto di DNA. Gli istogrammi dei valori di DNA degli internodi di ciascun individuo hanno rivelato la presenza di 4 picchi variabili che senza dubbio indicano l'esistenza di nuclei endopoliploidi con una quantità di DNA fino a 16C. Le misure densitometriche nelle giovani foglie invece evidenziavano la presenza di nuclei che variavano da 2C a 32C.

I dati fino ad ora ottenuti, indicano senz'altro una diversità di comportamento dei nuclei nelle differenti zone della radice, del fusto e delle foglie di *Cymodocea nodosa* con un andamento che è tipico di serie poliploidi. Tale andamento correlato con i numeri cromosomici e le anomalie ritrovate nella radice di singoli individui sembrano confermare la presenza di aneusomatia, almeno in questo organo.

Il quantitativo di DNA ottenuto grazie alla Citometria di Immagine (CI) in radici di individui della popolazione di *C. nodosa* da Brucoli è risultato essere di 1.43 ± 0.01 pg; mentre i dati ottenuti con la Citometria di Flusso (CF), su foglie sempre della stessa popolazione, indicano un valore medio di 0.85 ± 01 pg. Gli unici dati esistenti in letteratura di *genome size*, relativi ad una popolazione di *C. nodosa* del Nord Adriatico (Croazia), sono quelli riportati da Koce *et al.* (2003) con un *2C-value* di 1.08 ± 0.06 pg e di 0.64 ± 0.01 pg ottenuti da foglie con la CI e la CF, rispettivamente. Le differenze riscontrate tra le due metodiche potrebbero essere spiegate con la presenza di sostanze che interferiscono con la lettura come riportato da Price *et al.* (2000) in girasole. In ogni caso, è chiaro che saranno necessarie ulteriori indagini su altre popolazioni per comprendere se alcune differenze possono essere attribuite alle diverse tecniche utilizzate o a effettive differenze tra popolazioni.

3.3.2. Citogenetica molecolare

Per confermare i dati ottenuti dalla citogenetica classica e per studiare le porzioni ripetute o altamente ripetute del DNA nei cromosomi di *C. nodosa* si è fatto uso di una tecnica di microscopia a illuminazione strutturata 3D (3D-SIM) utilizzando il Super-Resolution Microscope System Elyra PS.1 e il software d'immagini ZENblack 2.1 SP3 (Carl Zeiss GmbH) con l'obiettivo 63x / 1.4 Oil Plan-Apochromat ed un'illuminazione X-Cite (LED). In particolare, La tecnica è stata applicata per localizzare le sequenze conservate organizzate come unità ripetitive in tandem dei geni ribosomiali (rDNA) e le sequenze altamente ripetute di DNA telomerico. Le variazioni riguardanti il numero e le distribuzioni cromosomiche dei loci 45S (18S e 26S) rDNA e la locazione delle regioni telomeriche sono importanti marcatori informativi per discriminare rispettivamente i cariotipi delle specie e per il conteggio dei cromosomi in metafase.

In passato, la microscopia ottica per il DNA e le proteine specificamente marcate con fluorocromi rispettivamente mediante FISH e immunostaining, così come l'imaging di cellule vive basato su proteine ricombinanti fluorescenti, ha aumentato significativamente le nostre conoscenze sull'organizzazione e la funzione delle cellule ed essa rappresenta un vantaggio importante rispetto alla microscopia elettronica (Schubert 2017). Tuttavia, mentre la microscopia elettronica consente di identificare le sottostrutture cellulari fino a una risoluzione di ~ 1 nm, la risoluzione della microscopia a fluorescenza è limitata a ~ 200 nm a causa del limite di diffrazione della luce (Pawley, 1995). Pertanto, questa risoluzione limitata non ha permesso di identificare singole molecole e strutture con la risoluzione ottenuta mediante microscopia elettronica. Per superare questa restrizione e colmare il gap di risoluzione tra microscopia ottica ed elettronica, sono state sviluppate le cosiddette tecniche di super risoluzione (anche denominate nanoscopia ottica) come Structured Illumination Microscopy

(SIM), Photoactivated Localization Microscopy (PALM), Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) e Stimulated Emission Depletion (STED) che consentono di analizzare strutture e molecole oltre il limite di diffrazione della luce (Schubert 2017). Questi metodi di "subdiffrazione" possono essere suddivisi in due diversi principi: (i) localizzazione nel campione dei singoli fluorocromi con precisione di subdiffrazione (PALM, STORM) e (ii) strutturazione della luce di illuminazione per raccogliere alte frequenze spaziali nell'immagine che contengono informazioni ad alta risoluzione (SIM, STED) (Rego *et al.* 2012).

Di recente si è assistito ad una crescente applicazione di queste tecniche nella biologia cellulare (Rouquette *et al.* 2010; Han *et al.* 2013; Fornasiero e Opazo 2015) su campioni fissati e in vivo sia di procarioti che di eucarioti che ha permesso di scoprire nuove strutture e di studiare le interazioni tra diverse cellule, organelli cellulari e nuclei. Tali esperimenti sono stati la base per quantificare e colocalizzare polisaccaridi, proteine e DNA e si sono già applicati con successo per seguire lo sviluppo di componenti citoscheletrici, proteine di membrana e strutture di infezione fungina (Bell e Oparka 2011, 2015; Bozkurt *et al.* 2014; Dong *et al.* 2015; Durst *et al.* 2014; Kleine-Vehn *et al.* 2011; Komis *et al.* 2014; Komis *et al.* 2015a; Liesche *et al.* 2013; Hosy *et al.* 2015).

I risultati ottenuti *Flourescence in situ Hybridization* (FISH) confermano la variabilità nel numero cromosomico ritrovato in *C. nodosa* e suggeriscono.

La posizione, il numero e l'intensità del segnale relativo ai loci del gene 45S, variavano nelle differenti metafasi a seconda del numero dei cromosomi che le costituivano.

Infatti, nella maggior parte dei casi, il gene 45S rDNA si trovava all'interno di una coppia cromosomica in piastre metafasiche con numeri cromosomici all'incirca tra 14/21 presentando due segnali in un singolo locus del 45S con diversa intensità (un segnale debole in uno dei cromosomi e forte nell'altro). Mentre, in piastre con numeri cromosomici maggiori (28/36) i segnali, nella maggior parte dei casi, erano quattro di cui due con debole intensità e due con maggiore intensità, confermando l'andamento tipico di una serie poliploide. Inoltre, piastre con numeri cromosomici intermedi mostravano spesso tre segnali con posizione ed intensità variabile, riflettendo una differenza nel numero di copie di 18S e 26S r-DNA spiegabile dalla presenza di aneusomatia.

Dunque, questi dati sembrano confermare l'ipotesi che si tratta di una specie poliploide e che la perdita di cromosomi, dovuta a fenomeni anomali durante la divisione, possa condizionare il numero di loci presenti. Infatti apparentemente in alcuni casi si è verificata una perdita di loci di rDNA o il silenziamento dei geni, per cui l'espressione avviene in un unico cromosoma producendo un solo segnale o tre segnali fluorescenti.

In particolare, ma non esclusivamente nelle specie poliploidi, è stata osservata una variabilità intraspecifica del numero di loci di rDNA (ad es. *Arabidopsis thaliana*) (Ali *et al.* 2004). La variabilità intraspecifica nel numero e nella posizione dei loci di rDNA è stata descritta anche per i loci di 5S rDNA in *Pisum* (Fuchs *et al.* 1998). In particolare per i NOR terminali di specie *Allium*, è stata mostrata la mobilità posizionale (Schubert e Wobus 1985).

Per questa specie, è il primo rapporto di mappatura dell'rDNA cromosomico. Questi dati suggeriscono non solo la presenza di poliploidizzazione in questa specie, ma forniscono anche punti di ancoraggio per mappature genetiche (comparative) e potrebbero essere importanti per gli studi sull'evoluzione dei tipi di sequenza interna trascritti dell'rDNA nelle piante di *Cymodocea nodosa*.

3.4. GENERE POSIDONIA

3.4.1. Citogenetica di base e quantitativo di DNA

I primi dati sul numero cromosomico riportati per il genere *Posidonia* sono quelli di Keighery e Coates, (1981) relativi alle cinque specie australiane allora note. Tutte le specie osservate mostravano numero cromosomico $n=10$ e $2n=20$ con cromosomi di piccole dimensioni in cui non era riconoscibile nessun carattere morfologico. Nel 1984 Contrandiopoulos e Verlaque riportavano per la prima volta il numero cromosomico in *P. oceanica*, studiando quattro popolazioni della costa mediterranea francese. In tutte le popolazioni, lo studio delle metafasi somatiche mostrava la presenza di un numero cromosomico $2n=20$.

Den Hartog *et al.* nel 1987 studiavano altre cinque popolazioni mediterranee di *P. oceanica* sulle coste francesi, greche e italiane, confermando il numero cromosomico $2n=20$ per tutte le popolazioni.

Nel 1990, Kuo *et al.* studiavano le otto specie di *Posidonia* australiane confermando il numero cromosomico somatico $2n=20$. Essi, sebbene non riportavano uno studio dettagliato del cariotipo, dimostravano, diversamente da quanto affermato da Keighery e Coates (1981), che tutte le specie studiate presentavano cinque paia di cromosomi di grosse dimensioni e cinque paia di dimensioni minori. Semroud *et al.* (1992) confermavano per tre popolazioni di *P. oceanica*, due delle coste francesi e una delle coste algerine (La Marsa) che il numero cromosomico per tutte le popolazioni studiate era $2n=20$. Gli individui di quest'ultima differivano da quelli della forma tipica per le dimensioni delle foglie.

L'analisi del cariotipo relativa alla popolazione di *Posidonia oceanica* (L.) Delile del Golfo di Brucoli (Siracusa, Italia) conferma il numero cromosomico tipico di $2n=20$ in tutte le linee cellulari. La morfologia dei cromosomi è prevalentemente metacentrica ad eccezione della coppia IV che sembra essere subtelocentrica. Le nostre osservazioni confermano che nell'ambito del genere *Posidonia* il numero cromosomico è costante così come non sono osservabili modificazioni strutturali dei

cromosomi. Pertanto sembra che la speciazione in questo genere si sia attuata attraverso meccanismi diversi dai classici meccanismi di aneuploidia e poliploidia.

I dati di *genome size* da noi ottenuti tramite Citometria di Flusso, 6.88 ± 0.02 pg, sono più bassi rispetto a quelli riportati da Koce *et al.* (2003) per una popolazione di *P. oceanica* slovena, 7.27 ± 0.10 pg, ottenuti mediante la stessa tecnica. Mentre risultano più alti rispetto a quelli ottenuti dagli stessi autori, 6.25 ± 0.13 pg, sempre per la stessa popolazione ma utilizzando la Citometria d'Immagine. Un valore di 5.58 pg era riportato da Cavallini *et al.* (1995) per una popolazione di *P. oceanica* raccolta a Livorno utilizzando analisi citofotometrica su apici radicali.

3.4.2. Citogenetica Molecolare

Le analisi effettuate sui campioni di *Posidonia oceanica* raccolti in Sicilia non hanno prodotto risultati affidabili. Al momento non esistono dati bibliografici relativi ad una mappatura genica per le specie appartenenti a questo genere.

3.5. GENERE ZOSTERA

3.5.1. Citogenetica di base e quantitativo di DNA

Dal punto di vista cariologico, il genere *Zostera* è certamente uno dei più studiati. Infatti, si conoscono i numeri cromosomici di numerose popolazioni da diverse parti del mondo (vedi Tanaka *et al.* 2003). Per il Mediterraneo, dove sono riportate le specie *Z. marina* e *Z. noltei*, solo due popolazioni della seconda, una greca e l'altra delle coste francesi, sono state studiate, riportando un numero cromosomico di $2n=12$ (den Hartog *et al.* 1987). Nel subgenere *Zosterella*, cui appartiene *Z. noltei*, oltre a $2n=12$ è stato riportato anche $2n=24$ per le specie australiane e neozelandesi (Kuo 2001). Nel subgenere *Zostera*, in cui è compresa *Z. marina*, il numero cromosomico ritrovato per tutte le specie è $2n=12$ (Kuo 2001). Una correlazione tra il numero cromosomico e la distribuzione geografica delle specie è stata proposta da diversi autori (Kuo 2001; Tanaka *et al.* 2003). Il numero cromosomico delle specie dell'emisfero nord appartenenti al subgenere *Zosterella* e quelle del subgenere *Zostera* è $2n=12$, mentre quello delle specie appartenenti al subgenere *Zosterella* presenti nell'emisfero sud è $2n=24$. Il numero cromosomico $2n=12$ è considerato probabilmente il numero cromosomico paleodiploide (Kuo 2001). Tale ipotesi è stata confermata da Tanaka *et al.* (2003) utilizzando un albero filogenetico molecolare basato sul gene *matK*. Dai dati osservati in letteratura, sembrerebbe che la poliploidia, associata a variazioni strutturali nella morfologia dei cromosomi, abbia giocato un ruolo nella speciazione di questo genere.

I dati di citogenetica di base ottenuti su campioni di *Zostera noltei* Hornemann raccolta nel Golfo di Brucoli (Siracusa, Italia) ed utilizzati per l'analisi del cariotipo, confermano il numero cromosomico tipico di $2n=12$.

Il quantitativo di DNA ritrovato per la popolazione da noi studiata è di 1.35 ± 0.02 pg utilizzando la Citometria di Flusso. Gli unici dati di *genome size* esistenti in letteratura per *Z. noltii* si riferiscono ad una popolazione del nord Adriatico con *2C-value* di 1.54 ± 0.04 pg e di 0.94 ± 0.03 ottenuti tramite Citometria d'Immagine e di Flusso, rispettivamente. Anche in questo caso i dati ottenuti evidenziano delle discrepanze tra l'uso delle due tecniche che richiedono ulteriori indagini per valutarne l'esatta natura.

3.5.2. Citogenetica Molecolare

Le analisi effettuate sui campioni di *Zostera noltei* raccolti in Sicilia non hanno prodotto risultati affidabili. Recentemente, Peska *et al.* (2020), riportano la presenza di ripetizioni dei telomeri di tipo umano sui cromosomi di *Zostera marina*. In particolare, eseguendo uno screening telomerico genomico di popolazioni mediterranee di *Z. marina* e *Z. noltei*, mostravano che le ripetizioni telomeriche di *Z. marina* erano esclusivamente di tipo umano con un'alta percentuale nella porzione del genoma del DNA telomerico, mentre quelle di *Z. noltii* presentavano telomeri di tipo vegetale e in confronto, la sequenza di tipo umano rappresentava sempre una sequenza molto inferiore in proporzione al genoma. I dati erano confermati anche da analisi citogenetiche molecolari su *Zostera*, i quali dimostravano che queste sequenze si localizzavano effettivamente alle estremità cromosomiche.

3.6. CONCLUSIONI

In generale si può affermare che le informazioni di citogenetica di base, riguardanti il numero e la morfologia dei cromosomi, non sono obsolete e che associate a quelle ottenute con metodologie molecolari risultano essenziali per chiarire e affrontare aspetti sia di ricerca di base che applicati. Il loro contributo risulta importante nei vari campi di ricerca che vanno dalla citotassonomia all'evoluzione del cariotipo alla loro propagazione. I valori sulla quantità di DNA associate a dati citogenetici di base e molecolare sono indispensabili per indagare la direzione dei cambiamenti a vario livello all'interno di questo gruppo di organismi.

I dati riportati in questa tesi insieme alle nuove tecniche molecolari, attualmente utilizzate, potranno migliorare la comprensione delle relazioni filogenetiche tra i diversi lignaggi di fanerogame marine, e offriranno una migliore percezione del processo evolutivo che ha progettato l'evoluzione del cariotipo di questo gruppo di piante molto interessante.

BIBLIOGRAFIA

- Ackerman J. D., 1993.** Pollen germination and pollen tube growth in the marine angiosperm, *Zostera marina* L. *Aquat. Bot.*, 46: 189-202.
- Ackerman J. D., 1995.** Convergence of filiform pollen morphologies in seagrasses: Functional mechanisms. *Evol. Ecol.*, 9: 139-153.
- Adl M. S., Simpson A. G. B., Farmer M. A., Andersen R. A., Anderson O. R., Barta J. R., Bowser S. S., Brugerolle G., Fensome R. A., Fredericq S., James T. Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C. E., Lewis L. A., Lodge J., Lynn D. H., Mann D. G., McCourt R. M., Mendoza L., Moestrup Ø, Mozley-Standridge S. E., Nerad T. A., Shearer C. A, Smirnov A. V., Spiegelz F. W. and Taylor M. F. J. R., 2005.** The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 52: 399-451.
- Albergoni F. G., Basso B. and Tedesco G., 1978.** Considérations sur l'Anatomie de *Posidonia oceanica* (Zosteraceae). Milano. *Pl. Syst. Evol.*, 130: 191-201.
- Ali H.B.M., Lysak M.A., Schubert I., 2004.** Genomic in situ hybridization in plants with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific *Arabidopsis* hybrids. *Genome*, 47: 954-960.
- Ali H.B.M., Lysak M.A., Schubert I., 2005.** Chromosomal localization of rDNA in the Brassicaceae. *Genome*, 48: 341-346. doi: 10.1139/g04-116.
- Altinordu, F., Peruzzi, L., Yu, Y., He, X., 2016.** A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType. *Taxon*, 65: 586-592.
- Ambros P.F., Matzke M.A. and Matzke A.J.M., 1986.** Detection of a 17 kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 94:11-18.
- Anamthawat-Jonsson K., 2003.** Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and in situ hybridization. *Methods Cell Sci.*, 25:91-95.
- Andras S.C., Hartman T.P.V., Marshall J.A., Marchant R., Power J.B., Cocking E.C. and Davey .R., 1999.** A drop-spreading technique to produce cytoplasm free mitotic preparations from plants with small chromosomes. *Chromosome Res.*, 7:641-647.
- Anrini M. and Jha S., 2009.** Characterization of podophyllotoxin yielding cell lines of *Podophyllum hexandrum*. *Caryologia*, 62: 220-235.
- Antosz W., Pfab A., Ehrnsberger H.F., Holzinger H., Köllen K., Mortensen S.A., Bruckmann A., Schubert T., Längst G., Griesenbeck J., Schubert V., Grasser M. and Grasser K.D., 2017.** The composition of the *Arabidopsis* RNA polymerase II transcript elongation complex reveals the interplay between elongation and mRNA processing factors. *Plant Cell*.doi: 10.1105/tpc.16.00735.

- Arano H., 1963.** Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan. IX. The karyotype analysis and phylogenetic consideration of *Pertya* and *Ainsliaea*. *Bot Mag.*, 76: 32-39.
- Arber A., 1963.** Water Plants; a study of Aquatic Angiosperms. New York. J. Cramer.
- Balfour B., 1879.** On the genus *Halophila*. *Edinb. Trans. Bot. Soc.*, 13: 290-3.
- Barnabas A.D., 1994b.** Anatomical, histochemical and ultrastructural features of the seagrass *Phyllospadix scouleri* Hook. *Aquat. Bot.*, 49: 167-182.
- Barnabas A.D., 1996.** Casparian band-like structures in the root hypodermis of some aquatic angiosperms. *Aquat. Bot.*, 55: 217-225.
- Barnabas A.D. and Arnott H.J., 1987.** *Zostera capensis* Setchell: Root structure in relation to function. *Aquat. Bot.*, 27: 309-322.
- Barnabas A.D., Butler V. and Steinke T.D., 1977.** *Zostera capensis* Setchell. Vol. I. Observations on the fine structure of the leaf epidermis. *Z. Pflanzenphysiol.*, 85: 417-427.
- Barnabas A.D., Butler V. and Steinke T.D., 1982.** *Zostera capensis* Setchell. Vol. III. Some aspects of wall ingrowths development in leaf blade epidermal cells. *Protoplasma*, 110: 87-94.
- Barow M., 2006.** Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays*, 28: 271-281.
- Barow M. and Jovtchev G., 2007.** Endopolyploidy in plants and its analysis by flow cytometry. In: Doležel J., Greilhuber J. and Suda J. (Eds). *Flow cytometry in plant cells*. Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 349-372.
- Barow M. and Meister A., 2003.** Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematic, organ, life strategy and genome size. *Plant, Cell and Environment*, 26: 571-584.
- Beck M. W., Heck Jr. K. L., Able K. W., Childers D. L., Eggleston D. B., Gillanders B. M., Halpern B., Hays C. G., Hoshino K., Minello T.J., Orth R.J., Sheridan P. F. and Weinstein M. P., 2001.** The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *Bio-science*, 51(8): 633-641.
- Beckman T. and Viane R. L. L., 2000.** Embedding thin plant specimens for oriented sectioning. *Biotechnic and Histochemistry*, 75: 23-26.
- Bell D. J., 1952.** The "cross and bevan" cellulose of *Posidonia australis*. *J. Chem. Soc.*, pp. 3649-3650.
- Bell K. and Oparka K., 2011.** Imaging plasmodesmata. *Protoplasma*, 248: 9-25. doi: 10.1007/s00709-010-0233-6.
- Bell K. and Oparka K., 2015.** Preparative methods for imaging plasmodesmata at super-resolution. *Methods Mol. Biol.*, 1217: 67-79. doi: 10.1007/978-1-4939-1523-1_4.
- Belling J., 1921.** On counting chromosomes in pollen-mother cells. *Am. Nat.*, 55: 573-574.

- Benedict C.R. and Scott J.R., 1976.** Photosynthetic carbon metabolism of a marine grass. *Plant Physiol.*, 57: 876-880.
- Bennet M.D. e Leitch I., 2011.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: Targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany*, 107(3): 467-590. doi: 10.1093/aob/mcq258.
- Bennetzen J.L., Ma J. and Devos K.M., 2005.** Mechanisms of Recent Genome Size Variation in Flowering Plants. *Annals of Botany*, 95: 127-132.
- Birch W.R., 1974.** The unusual epidermis of the marine angiosperm *Halophila* Thou. *Jena. Flora*, 163: 410-414.
- Böcking A., Giroud F. and Reith A., 1995.** Consensus report of the ESACP task force on standardisation of diagnostic DNA image cytometry. *Analytical Cellular Pathology*, 8: 67-74.
- Bolland D.J., King M.R., Reik W., Corcoran A.E. and Krueger C., 2013.** Robust 3D DNA FISH Using Directly Labeled Probes. *J. Vis. Exp.*, 78: 1-8.
- Bornet E., 1864.** Recherches sur le *Phucagrostis major* Cavol. *Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 5*, 1: 5-51.
- Borowitzka M.A., Lavery P.S. and Keulen van M., 2006.** Epiphytes of Seagrasses. In: Larkum A.W.D., McComb A.J., Shepherd S.A. (Eds.). *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer Dordrecht, Netherlands, pp. 441-461.
- Borum J., Duarte C.M., Krause-Jensen D. and Greve T.M., 2004.** *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*. EU project Monitoring and Management of European Seagrass Beds, pp. 88.
- Borum J., Sand-Jensen K., Binzer T., Pedersen O. and Greve T.M., 2006.** Oxygen Movement in Seagrasses. In: Larkum A.W.D., McComb A.J., Shepherd S.A. (Eds.). *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer Dordrecht, Netherlands, pp. 263-265.
- Bourdon M., Frangne N., Mathieu-Rivet E., Nafati M., Cheniclet C., Renaudin, J.P. and Bozkurt T.O., Richardson A., Dagdas Y.F., Mongrand S., Kamoun S. and Raffaele S., 2014.** The plant membrane-associated REMORIN1.3 accumulates in discrete perihyphal domains and enhances susceptibility to *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 165: 1005-1018. doi: 10.1104/pp.114.235804.
- Brown K., 2002.** Visualizing nuclear proteins together with transcribed and inactive genes in structurally preserved cells. *Methods*. 26: 10-18.
- Calvo S., Tomasello A., Di Maida G., Pirrotta M., Buia M. C., Cinelli F., Cormaci M., Furnari G., Giaccone G., Luzzu F., Mazzola A., Orestano C., Procaccini G., Sarà G., Scannavino A. and Vizzini A., 2010.** Seagrasses along the Sicilian coasts. *Chemistry and Ecology*, 26: 249-266.

- Cambridge M. L. and Kuo J., 1982.** Morphology, anatomy and histochemistry of the Australian seagrasses of the genus *Posidonia* König (Posidoniaceae). Vol III. *Posidonia sinuosa* Cambridge & Kuo. Amsterdam. *Aquat. Bot.*, 14: 1-14.
- Cambridge M.L. vaand Lambers H., 1998.** Specific leaf area and functional anatomy in Western Australian seagrasses. In: Lambers H., Poorter H., van Vuuren M.M.I. (Eds.). *Inherent Variation in Plant Growth: Physiological Mechanisms and Ecological Consequences*. Backhuys Publication, Leiden, The Netherlands, pp. 1-11.
- Cao H.X., Vu G.T.H., Wang W., Messing J. and Schubert I., 2014.** Chromatin organisation in duckweed interphase nuclei in relation to the nuclear DNA content. *Plant Biology*. doi:10.1111/plb.12194.
- Cao H. X., Vu G.T.H., Wang W., Appenroth K. J., Messing J., Schubert I., 2015.** The map-based genome sequence of *Spirodela polyrhiza* aligned with its chromosomes, a reference for karyotype evolution. *New Phytologist*. Doi: 10.1111/nph.13592.
- Cardone S., Sawatani P., Rush P., García A. M., Poggio L. and Schrauf G., 2009.** Karyological studies in *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biol.*, 32: 427
- Carvalho C.R. and Saraiva L.S., 1993.** An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. *Biotech. Histochem.*, 68:142-145.
- Cavallini A. and Cremonini R., 1985.** Aneusomy in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Zeitschrift für Pflanzenzuchtung*, 95: 118-121.
- Cavallini A., Natali L., Giordani T., Polizzi E., Balestri E., Cinelli F., Maserti B.E., Ferrara R., 1995.** Cytophotometric and biochemical characterization of *Posidonia oceanica* L. (Potamogetonaceae) genome. *Caryologia*.
- Chen Z.J. and Ni Z., 2006.** Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays*, 28:240-252.
- Chevalier C., 2010.** Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits. *Progress in Botany*, 71: 101-132.
- Claussen U., 1980.** The pipette method: a new rapid technique for chromosome analysis in prenatal diagnosis. *Hum. Genet.*, 54:277-278.
- Clowes F.A.L. and Juniper B.E., 1968.** *Plant Cells*. Oxford. Blackwell Scientific Publications, pp. 546.
- Comai L., Madlung A., Josefsson C. and Tyagi. A., 2003.** Do the different parental „heteromes“ cause genomic shock in newly formed allopolyploids? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 358: 1149-1155.
- Cox P. A., 1988.** Hydrophilous pollination. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 19: 261-280.

- Cremonini R. and Cavallini A., 1986.** Origin and fate of aneusomaty in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant breeding*, 97: 89-92.
- D'Amato F., 1964.** Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. *Caryologia*, 17: 41-52.
- D'Amato F., 1984.** Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. In: Johri B. M. (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. Springer Verlag, New York, pp. 523-566.
- D'Amato F., 1995.** Aneusomaty in vivo and in vitro in higher plants. *Caryologia*, 48: 85-103.
- D'Amato F., 1989.** Polyploidy in cell differentiation. *Caryologia*, 42: 183-211.
- D'Amato F. and Bayliss M.W., 1985.** Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 3:1, 73-112
- D'Amato F. and Durante M., 2002.** *Polyploidy*. Encyclopedia of life sciences, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net, pp. 1-8.
- Dahlgren R.M.T., Clifford H.T. and Yeo P.F., 1985.** *The Families of the Monocotyledons: Structure, evolution and taxonomy*. Springer Verlag, Berlin, pp. 1-520.
- Danilova T.V. and Birchler J.A., 2008.** Integrated cytogenetic map of mitotic metaphase chromosome 9 of maize: resolution, sensitivity, and banding paint development. *Chromosoma*, 117: 345-356.
- den Hartog C., 1957.** Hydrocharitaceae. In: Steenis van C. G. G. J. (Ed.). *Flora Malesiana*, 5: 381-4.
- den Hartog C., 1970.** The seagrasses of the World. *Verh. K. Ned. Akad. Wet. Natuurk.*, 59(1): 275.
- den Hartog C., 1971.** The dynamic aspect in the ecology of seagrass communities. *Thalass. Jugosl.*, 7: 101-112.
- den Hartog C., 1979.** Seagrasses and seagrass ecosystems, an appraisal of the research approach. *Aquat. Bot.*, 7: 105-117.
- den Hartog C., Hennen J., Noten Th. M.P.A. and van Wijk R.J., 1987.** Chromosomes numbers of the European seagrasses. *Plant Systematics and Evolution* 156: 55-99.
- den Hartog C., 2006.** Seagrass morphology, anatomy, and ultrastructure. In: Larkum A. W. D., McComb A. J. and Shepherd S. A. (Eds.). *Seagrasses: biology, ecology and conservation*. Springer Dordrecht, The Netherlands, pp. 51-87.
- den Hartog C. and Kuo J., 2006.** Taxonomy and biogeography of seagrasses. In: Larkum A. W. D., McComb A. J. and Shepherd, S. A. (Eds.). *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer Dordrecht, Netherlands, pp. 1-23.
- Deng W., Tsao S.W., Lucas J.N., Leung C.S., Cheung A.L.M., 2003.** A new method for improving metaphase chromosome spreading. *Cytometry*, 51(1):46-51.

- Di Dat P., Fresi E. and Scardi M., 2000.** A lepidochronological study of *Posidonia oceanica*: Further analyses on annual leaf production time series. *Biol. Mar. Mediterr.*, 7: 39-42.
- Doležel J. and Bartoš J., 2005.** Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, 95: 99-110.
- Dolezel J., Greilhuber J. and Suda J., 2017.** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc*, 2: 2233-2244. Doi: 10.1038/nprot.2007.310.
- Dolezel J., Bartos J., Voglmayr H. and Greilhuber J., 2003.** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A*, 51: 127-128. Doi: 10.1002/cyto.a.10013.
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M.A., Nardi L., Obermayers R., 1998.** Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82: 17-26.
- Dong B., Yang X., Zhu S., Bassham D.C. and Fang N., 2015.** Stochastic optical reconstruction microscopy imaging of microtubule arrays in intact *Arabidopsis thaliana* seedling roots. *Sci. Rep.*, 5: 15694. doi: 10.1038/srep15694.
- Doohan M. E. and Newcomb E. H., 1976.** Leaf ultrastructure and $\delta^{13}\text{C}$ values of three from the Great Barrier Reef. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 3: 9-23.
- Doyle J.J., Egan A.N., 2010.** Dating the origins of polyploidy events. *New Phytologist*, 186: 73-85.
- Duarte C.M., Borum J., Short F.T. and Walker D.I., 2008.** Seagrass Ecosystems: Their Global Status and Prospects. In: N.V.C. Polunin (Ed.). *Aquatic Ecosystems: Trends and Global Prospects*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 281-306.
- Dürr J., Lolas I.B., Sorensen B.B., Schubert V., Houben A., Melzer M., Grasser M. and Grasser K.D., 2014.** The transcript elongation factor SPT4/SPT5 is involved in auxin-related gene expression in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.*, 42: 4332-4347. doi:10.1093/nar/gku096
- Durst S., Hedde P. N., Brochhausen L., Nick P., Nienhaus G. U., Maisch J., 2014.** Organization of perinuclear actin in live tobacco cells observed by PALM with optical sectioning. *J. Plant Physiol.*, 171: 97-108. doi: 10.1016/j.jplph.2013.10.007.
- Esau K., 1977.** *Anatomy of Seed Plants*. 2nd edn. Wiley, New York, pp. 550.
- Famà P., 1995-1996.** Osservazioni cario-morfologiche su *Halophila stipulacea* (Forssk.) Aschers. (Hydrocharitaceae). University of Messina, Degree thesis.
- Feitoza L.L., Felix L.P., Castro A.A.J.F. and Carvalho R., 2009.** Cytogenetics of Alismatales ss: chromosomal evolution and C-banding. *Plant Systematics and Evolution*, 280: 119-131.
- Findley S.D., Cannon S., Varala K., Du J., Ma J., Hudson M.E., Birchler J.A. and Stacey G., 2010.** A fluorescence in situ hybridization system for karyotyping soybean. *Genetics*, 185(3): 727-744.

- Fornasiero E.F. and Opazo F., 2015.** Super-resolution imaging for cell biologists: concepts, applications, current challenges and developments. *Bioessays*, 37: 436-451. doi: 10.1002/bies.201400170.
- Fox, D.P. (1969).** Some characteristics of the cold hydrolysis technique for staining plant tissues by the Feulgen reaction. *J. Hystochem. Cytochem.* 17: 266-272. doi: 10.1177/17.4.266.
- Fuchs J., Kühne M. and Schubert I., 1998.** Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma*, 107: 272- 276.
- Fukui K. and Iijima K., 1991.** Somatic chromosome map of rice by imaging methods. *Theor. Appl. Genet.*, 81:589-596.
- Gargiulo G.M., Gemelli F., Cambria G., Bonanno Ferraro G. and Crosca A., 2019.** A rapid method to obtain high quality nuclear and chromosome images directly from living cells in Charophyceae. *Phycological Research*, 67(1): 72-76. doi: 10.1111/pre.12335.
- Gargiulo G.M., Vilardo I., Cambrea G., Gemelli F., Crosca A., 2018.** Karyomorphology and DNA quantification in the marine angiosperm *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson from Mediterranean and Red Seas. *Aquatic Botany*, 148: 1-9.
- Gargiulo G.M., Vilardo I., Gemelli F., Cambrea G., Crosca A., 2020.** Aneusomaty and polysomaty in *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson from Mediterranean Sea (Sicily, Italy). *Aquatic Botany*, 162.
- Gessner F., 1968.** Die Zellwand mariner Phanerogamen. *Mar. Biol.*, 1: 191-200.
- Geber G. and Schweizer D., 1988.** Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Syst. Evol.*, 158:97-106. 19.
- Gessner F., 1971.** The water economy of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Mar. Biol.*, 10: 258-260.
- Gill N., Findley S., Walling J.G., Hans C., Ma J., Doyle J., Stacey G. and Jackson S.A., 2009.** Molecular and chromosomal evidence for allopolyploidy in soybean. *Plant Physiol.*, 151(3): 1167-1174.
- Gottlob-McHugh S.G., Levesque M., Mackenzie K., Olsen M., Yarash D. and Johnson D.A., 1990.** Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. *Genome*, 33: 486-494. Doi: 10.1139/g90-072#.XsQzWNUzbIU.
- Graphodatsky A.S., Trifonov V.A. and Stanyon R., 2011.** The genome diversity and karyotype evolution of Mammals. *Molecular Cytogenetics*, 4: 22-37.

- Green E. P. and Short F. T., 2003.** *World Atlas of Seagrasses: Present Status and Future Conservation*. Green E. P. and Short F. T. (Eds.). The University of California Press, Berkeley, pp.310.
- Greilhuber J., 1986.** Severely distorted Feulgen DNA amounts in *Pinus* (Coniferophytina) after nonadditive fixations as a result of meristematic self-tanning with vacuole contents. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 28: 409-415.
- Greilhuber J., 2008.** Cytochemistry and C-values: the less-well-known world of nuclear DNA amounts. *Annals of Botany*, 101: 791-804.
- Greilhuber J., Ebert I., 1994.** Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome*, 37: 646-655.
- Greilhuber J., and Speta F. (1976).** C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica*, and *Puschkinia* (Liliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 126: 149-188.
- Greilhuber J., and Temsch E.M., 2001.** Feulgen densitometry: some observations relevant to best practice in quantitative nuclear DNA content determination. *Acta Botanica Croatica*, 60: 285-298.
- Greilhuber J. and Weber A., 1975.** Aneusomaty in *Orobanche gracilis*. *Plant Systematics and Evolution*, 124: 67-77.
- Grenier C., 1860.** Recherches sur le *Posidonia caulini* König. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 7: 362-367, 419-426 e 448-452.
- Guerra M., 2000.** Chromosome number variation and evolution in monocots, In: Wilson K.L. and Morrison D.A. (Eds). *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, pp. 127-136.
- Guerra M., 2012.** Cytotaxonomy. The end of childhood. *Plant Biosystems*, 146:703-710.
- Guiry M.D. and Guiry G.M., 2017.** *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway, <http://www.algaebase.org>.
- Gunning B.E.S., 1972.** Transfer cells and their roles in transport of solutes in plants. Oxford. *Sci. Prog.*, 64: 539-568.
- Gunning B.E.S. and Pate J.S., 1969.** "Transfer cells"-the plant cells with wall in-growths, specialized in relation to short transport of solutes-their occurrence, structure and development. *Protoplasma*, 68: 107-133.
- Han R., Li Z., Fan Y. and Jiang Y., 2013.** Recent advances in super-resolution fluorescence imaging and its applications in biology. *J. Genet. Genomics*, 40: 583-595. doi: 10.1016/j.jgg.2013.11.003.
- Harada I., 1956.** Cytological studies in Helobiae. Vol. I. Chromosome idiograms and a list of chromosome numbers in seven families. *Cytologia*, 21: 306-328.
- Hardie D.C., Gregory T.R., Hebert P.D.N., 2002.** From pixels to picograms: a beginner's guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50: 735-749.

- Harper J. L., 1977.** *Population Biology of Plants*. Academic Press, New York.
- Harvey B.M., Wheeler C. B. and Cunningham M.W., 1994.** Random Prime Labeling of DNA Probes with Fluorescein-II-dUTP. In: Isaac P.G. (Eds.). *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. Vol. 28. Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 93-100.
- Hawkins J.S., Grover C.E., Wendel J.F., 2008.** Repeated big bangs and the expanding universe: Directionality in plant genome size evolution. *Plant Science*, 174: 557-562.
- Hemminga M.A. and Duarte C.M., 2000.** *Seagrass Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-298.
- Hewitt S.L., Yin B., Ji Y., Chaumeil J., Marszalek K., Tenthorey J., Salvagiotto G., Steinel N., Ramsey L.B., Ghysdael J., Farrar M.A., Sleckman B.P., Schatz D.G., Busslinger M., Bassing C.H. and Skok J.A., 2009.** RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat. Immunol.* 10: 655-664.
- Hiranphan R., Eksomtramage L., Mayakul S., Tuntiprapas P., Prathep A., 2014.** Chromosome numbers and karyotypes of some *Halophila* species in Thailand. The 11th International Seagrass Biology Workshop, p. 88.
- Hoang P.T.N. and Schubert I., 2017.** Reconstruction of chromosome rearrangements between the two most ancestral duckweed species *Spirodela polyrhiza* and *S. intermedia*. *Chromosoma*, 126: 729-739. Doi: 10.1007/s00412-017-0636-7.
- Hoang P.N.T., Michael T.P., Gilbert S., Chu P., Motley S.T., Appenroth K.J., Schubert I., Lam E., 2018.** Generating a high-confidence reference genome map of the Greater Duckweed by integration of cytogenomic, optical mapping, and Oxford Nanopore technologies. *The Plant Journal*. Doi: 10.1111/tbj.14049.
- Hoang P.T.N., Schubert V., Meister A., Fuchs J., Schubert I., 2019.** Variation in genome size, cell and nucleus volume, chromosome number and rDNA loci among duckweeds. *Scientific Reports*. Doi: 10.1038/s41598-019-39332-w.
- Hosy E., Martiniere A., Choquet D., Maurel C. and Luu D.T., 2015.** Super-resolved and dynamic imaging of membrane proteins in plant cells reveal contrasting kinetic profiles and multiple confinement mechanisms. *Mol. Plant*, 8: 339-342. Doi: 10.1016/j.molp.2014.10.006.
- Huang X., Yan Y., Yi Q., Xing F., 2010.** Karyomorphological studies of *Halophila* (Hydrocharitaceae) from Hong Kong, China. *J. Trop. Subtrop. Bot.*, 18: 391-393.
- Husband B. C., Balduin S. J. and Suda J., 2013.** The incidence of polyploidy in natural plant populations: major patterns and evolutionary processes. In: Leitch I. J., Greilhuber J., Doležel J. and

Wendel J. F. (Eds). *Plant genome diversity. Vol. 2. Physical structure, behavior and evolution of plant genomes*. Springer Verlag, Wien, pp. 255-276.

Huziwara Y., 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *American Journal of Botany*, 49: 116-119.

Ijdo J.W., Wells R.A., Baldini A. and Reeders S.T., 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res*, 19: 4780.

Inglis G.J. and Waycott M., 2001. Methods for assessing seagrass seed ecology and population genetics. In: Short F. T. and Coles R. G. (Eds.). *Global Seagrass Research Methods*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 123-140.

Isaac F.M., 1968. Marine botany of the Kenya Coast. Vol. 4. Angiosperms. *J. East-Afr. Nat. Hist. Soc.*, 27: 29-47.

IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species, Version 2011.2, <http://www.iucnredlist.org>.

Jagel R.H., 1973. Studies of a marine grass *Thalassia testudinum*. Vol. I. Ultrastructure of osmoregulatory leaf cells. *Am. J. Bot.*, 60: 1003-1009.

Jagels R., 1983. Further evidence for osmoregulation in epidermal leaf cells of seagrasses. *Am. J. Bot.*, 70: 327-333.

Jewell D.C. and Islam-Faridi N., 1994. A Technique for Somatic Chromosome Preparation and C-Banding of Maize. In: Freeling M, Walbot V. (Eds). *The Maize Handbook*. New York: Springer-Verlag, pp.484-493.

Jovtchev G., Schubert V., Meister A., Barow M. and Schubert I., 2006. Nuclear DNA content and nuclear and cell volume are positively correlated in angiosperms. *Cytogenetic and Genome Research*, 114: 77-82.

Karp A., 1994. Use of Biotin-Labeled Probes on Plant Chromosomes. In: Isaac P.G. (Eds.). *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. Vol. 28. Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 161-166.

Kato A., Lamb J.C. and Birchler J.A., 2004. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:13554-13559.

Kato A., Albert P.S., Vega J.M. and Birchler J.A., 2006. Sensitive fluorescence in situ hybridization signal detection in maize using directly labeled probes produced by high concentration DNA polymerase nick translation. *Biotech. Histochem.*, 81(2-3):71-78.

Kiernan J.A., 1990. Histological e histochemical methods: theory e practis. II ed. Pergamon Press.

Kindermann D, Hilgers CH. 1994. Glare-correction in DNA image cytometry. *Analytical Cellular Pathology*, 6: 165-180.

- Kirov I., Divashuk M., Van Laere K., Soloviev A., Khrustaleva L., 2014.** An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. *Molecular Cytogenetics*, 7:21.
- Kleine-Vehn, J., Wabnik, K., Martiniere, A., Langowski, L., Willig, K., Naramoto, S., Leitner J., Tanaka H., Jakobs S., Robert S., Luschig C., Govaerts W., Hell S.W., Runions J. and Friml J., 2011.** Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol. Syst. Biol.*, 7: 540. Doi: 10.1038/msb.2011.72.
- Koce J.D., Vilhar B., Bohanec B., Dermastia M., 2003.** Genome size of Adriatic seagrasses. *Aquatic Botany*, 77: 17-25.
- Koch E.W., Ackerman J.D., Verduin J. and van Keulen M., 2006.** Fluid dynamics in seagrass ecology - from molecules to ecosystems. In: Larkum A. W. D, Orth R. J. and Duarte C. M. (Eds.). *Seagrass: Biology, Ecology and Conservation*. Springer Dordrecht, Netherlands, pp. 193-225.
- Kocová V., Straková N., Kolarčík V., Rákai A. and Mártonfi P., 2016.** Endoreduplication as a part of flower ontogeny in *Trifolium pratense* cultivars. *Bot. Stud.*, 57: 34-42.
- Komis G., Mistrik M., Samajova O., Doskocilova A., Ovecká M., Illes P., Bartek J. and Samaj J., 2014.** Dynamics and organization of cortical microtubules as revealed by superresolution structured illumination microscopy. *Plant Physiol.*, 165: 129-148. Doi: 10.1104/pp.114.238477.
- Komis G., Mistrik M., Samajova O., Ovecká M., Bartek J. and Samaj J., 2015a.** Superresolution live imaging of plant cells using structured illumination microscopy. *Nat. Protocols*, 10: 1248-1263. Doi: 10.1038/nprot.2015.083.
- Komuro S., Endo R., Shikata K. and Kato A., 2013.** Genomic and chromosomal distribution patterns of various repeated DNA sequences in wheat revealed by a fluorescence in situ hybridization procedure. *Genome*, 56(3): 131-137.
- Krueger C., King M.R., Krueger F., Branco M.R., Osborne C.S., Niakan K.K., Higgins M.J. and Reik W., 2012.** Pairing of homologous regions in the mouse genome is associated with transcription but not imprinting status. *PLoS One*. 7(7): e38983.
- Kuo J., 1978.** Morphology, anatomy and histochemistry of the Australian seagrasses of the Australian seagrasses of the genus *Posidonia* König (Posidoniaceae). Vol I. Leaf blade and leaf sheath of *Posidonia australis* Hook. f. *Aquat. Bot.*, 5: 171-190.
- Kuo J., 1983b.** Nacreous wall sieve elements in marine Angiosperms. *Amer. J. Bot.*, 70: 159-164.
- Kuo J., 1993a.** Functional leaf anatomy and ultrastructure in a marine angiosperm, *Syringodium isoetifolium* (Aschers.) Dandy (Cymodoceaceae). *Aust J. Marine Freshwater Res.*, 44: 59-73.
- Kuo J., 1993b.** Root Anatomy and Rhizosphere Ultrastructure in Tropical Seagrasses. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 44: 75-84.

- Kuo J., 2001.** Chromosome numbers of the Australian Zosteraceae. *Plant Syst. Evol.* doi:10.1007/s006060170063.
- Kuo J., 2013.** Chromosome numbers of the Australian Cymodoceaceae. *Plant Syst. Evol.* doi:10.1007/s00606-013-0806-x
- Kuo J., 2005.** A revision on the genus *Heterozostera* (Zosteraceae). *Aquat. Bot.*, 81: 97-140.
- Kuo J. and Cambridge M.L., 1978.** Morphology, anatomy and histochemistry of the Australian seagrasses of the genus *Posidonia* König (Posidoniaceae). Vol II. Rhizome and root of *Posidonia australis* Hook. f. *Aquat. Bot.*, 5: 191-206.
- Kuo J. and den Hartog C., 2006.** Seagrass Morphology, Anatomy, and Ultrastructure. In: Larkum A. W. D., McComb A. J. and Shepherd, S. A., (Eds.). *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer Dordrecht, The Netherlands, pp. 51-87.
- Kuo J. and Kirkman H., 1987.** Floral and seedling morphology and anatomy of *Thalassodendron pachyrhizum* den Hartog (Cymodoceaceae). *Aquat. Bot.*, 29: 1-7.
- Kuo J. and McComb A. J., 1989.** Seagrass taxonomy, structure and development. In: Larkum A. W. D., McComb A. J. and Shepherd S. A. (Eds). *Biology of Seagrasses: A Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region*. Elsevier Amsterdam, The Netherland, pp. 6-73.
- Kuo J. and Stewart J. G., 1995.** Leaf anatomy and ultrastructure of the north American marine angiosperm *Phyllospadix* (Zosteraceae). *Can. J. Bot.*, 73: 827-842.
- Kuo J., James S. H. and den Hartog C. 1990.** Chromosome numbers and their systematic implication in Australian marine angiosperms in the Posidoniaceae. *Plant Systematic and Evolution*, 171: 199-204.
- Kuo J., Aioi K. and Iizumi H., 1988.** Comparative leaf structure and its functional significance in *Phyllospadix iwatensis* Makino and *Phyllospadix japonicus* Makino. *Aquat. Bot.*, 30: 169-187.
- Kuo J., Coles R. G., Lee Long W. J. and Mellors J. E., 1991.** Fruits and seeds of *Thalassia hemprichii* (Hydrocharitaceae) from Queensland, Australia. *Aquat. Bot.*, 40: 65-174.
- Kuzoff R.K., Sweere J.A., Soltis D.E., Soltis P.S., Zimmer E.A. 1998.** The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. *Mol. Biol. Evol.*, 15: 251-263.
- Larkum A.W.D., Drew E. A. and Ralph P. J., 2006.** *Photosynthesis and Metabolism in Seagrasses at the Cellular Level*. In: Larkum A. W. D., Orth R. J. and Duarte C. M. (Eds.). *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer Dordrecht, The Netherlands, pp. 323-349.
- Larkum A.W.D., McComb A. J., Shepherd S. A., 2006.** *Biology of Seagrasses*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-814.
- Larkum A.W.D., Kendrick G.A. and Ralph P.J. 2018.** *Seagrasses of Australia*, 3-29. Springer.

- Larkum A.W.D., Roberts G. D., Kuo J. and Strother S., 1989.** Gas movement in seagrasses. In: Larkum A. W. D., McComb A. J. and Shepherd S. A. (Eds.). *Biology of Seagrasses: A Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region*. Elsevier Amsterdam, The Netherlands, pp. 686-722.
- Lavania U.C., Srivastava S., 1992.** A simple parameter of dispersion index that serves as an adjunct to karyotype asymmetry. *Journal of Biosciences*, 17: 179-182.
- Leitch I. J. and Heslop-Harrison J. S., 1994.** Detection of Digoxigenin-Labeled DNA Probes Hybridized to Plant Chromosomes In Situ. In: Isaac P.G. (Eds.). *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. Vol. 28. Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 177-185.
- Leitch I. J. and Leitch A. R., 2013.** Genome size diversity and evolution in land plants. In: Leitch I.J., Greilhuber J., Doležel J. and Wendel J.F. (Eds.). *Plant genome diversity. Vol. 2. Physical structure, behavior and evolution of plant genomes*. Springer Verlag, Wien, pp. 307-322.
- Les D.H., Tippery N.P., 2013.** In time and with water . . . the systematics of alismatid monocotyledons. In: Wilkin P., Mayo S.J. (Eds.), *Early events in monocot evolution*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 118-164.
- Les D.H., Cleland M.A. and Waycott M., 1997.** Phylogenetic studies in Alismatidae, II-evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Systematic Botany*, 22: 443-463.
- Levin D.A., 2002.** The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. Oxford University Press, Inc., New York, pp. 1-229.
- Lewis W.H., 1970.** Extreme Instability of Chromosome Number in *Claytonia virginica*. *Taxon*, 19: 180-182.
- Liesche J., Ziomkiewicz I. and Schulz A., 2013.** Super-resolution imaging with Pontamine Fast Scarlet 4BS enables direct visualization of cellulose orientation and cell connection architecture in onion epidermis cells. *BMC Plant Biol.*, 13: 226. Doi: 10.1186/1471-2229-13-226.
- Lysák M., Fransz P. and Schubert I. 2006.** Cytogenetic analyses of Arabidopsis. *Methods in Molecular Biology*, 323: 173-186.
- Lysák M.A., Berr A., Pecinka A., Schmidt R., McBreen K. and Schubert I., 2006.** Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 5224-5229.
- Maluszynska J., Kolano B. and Sas-Nowosielska H., 2013.** Endopolyploidy in Plants. In: Leitch I.J., Greilhuber J., Doležel J. and Wendel J.F. (Eds.). *Plant genome diversity. Vol. 2. Physical structure, behavior and evolution of plant genomes*. Springer Verlag, Wien, pp. 99-120.

- Mandakova T. and Lysak M.A., 2008.** Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in $x=7$ crucifer species (Brassicaceae). *Plant Cell*, 20(10): 2559–2570.
- McConchie C.A. and Knox R.B., 1989b.** Pollen–stigma interaction in the seagrass *Posidonia australis*. *Ann. Bot.*, 63: 235–248.
- McKain M.R., Wickett N., Zhang Y., Ayyampalayam S., McCombie W.R., Chase M.W., Pires J.C., Depamphilis C.W. and Leebens-Mack J., 2012.** Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates Co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). *American Journal of Botany*, 99: 397-406.
- McMillan C., 1983.** Seed germination for an annual form of *Zostera marina* from the Sea of Cortez. Mexico. *Aquat. Bot.*, 9: 105-110.
- Miège J., 1960.** Nombres chromosomiques des plantes d’Afrique occidentale. *Revue de cytologie et de cytophysiologie vegetales* 21, 373–384.
- Monoyer A., 1928.** Contribution à l'anatomie et l'écologie des Monocotylées aquatiques. Mém. Acad. Roy. Belges. *Cl. Sci.*, 10(3): 196.
- Moralli D., Yusuf M., Mandegar M., Khoja S., Monaco Z.L. and Volpi E.V., 2011.** An improved technique for chromosomal analysis of human ES and iPS cells. *Stem. Cell. Rev.*, 7:471–477.
- Mouras A., Salesses G. and Lutz A., 1978.** Sur l’utilisation des protoplastes en cytologie: amelioration d’une methode recente en vue de l’identification des chromosomes mitotiques genres *Nzcutiana* et *Prunus*. *Caryologia*, 31:117-127.
- Mouras A., Saul M.W., Essad S., Potrykus I., 1987.** Localization by in situ hybridization of a low copy chimaeric resistance gene introduced into plants by direct gene transfer. *Mol. Gen. Genet.*, 207: 204-209.
- Murata M., 1983.** Staining air dried protoplasts for study of plant chromosomes. *Stain Technol.*, 58:101-106.
- Murray B.G., 2013.** Karyotype Variation and Evolution in Gymnosperms. In: Leitch I.J., Greilhuber J., Doležel J. and Wendel J.F. (Eds.). *Plant genome diversity. Vol 2. Physical structure, behavior and evolution of plant genomes*. Springer-Verlag, Wien, pp. 231-243.
- Natali L. and Cavallini A., 1987.** Nuclear cytology of callus and plantlets regenerated from pea (*Pisum sativum* L.) meristems. *Protoplasma*, 141:121-125.
- O'Brien T.P. and Carr D.J., 1970.** A suberized layer in the cell wall of the bundle sheath of grasses. *Aust. J. Bot. Sci.*, 23: 275-287.
- Ogura H., 1978.** Genetic control of chromosomal chimerism found in a regenerate from tobacco callus. *Japanese Journal of Genetics*, 53.

- Ollivier G.M., 1929.** Étude de la flore marine de la Côte d'Azur. Ann. Inst. Océanogr. Monaco. *Nouv. série*, 7: 53-173.
- Orth R.J., Luckenbach M. and Moore K.A., 1994.** Seed dispersal in a marine macrophyte: implications for colonization and restoration. *Ecology*, 75: 1927-1939.
- Orth R.J., Carruthers T.J.B., Dennison W.C., Duarte C.M., Fourqurean J. W., Heck Jr. K.L., Hughes A.R., Kendrick G.A., Kenworthy W.J., Olyarnik S., Short F.T., Waycott M. and Williams S.L., 2006.** A global contemporary crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience*, 56: 987-996.
- Ostenfeld C.H., 1916.** Contributions to West Australian Botany. Vol. I. *Dam Bot. Ark.*, 2(6): 44.
- Ostenfeld C.H., 1918.** Seagrasses. *Rep. Dans. Oceanogr. Exped. Mediterr.*, 5: 18.
- Paszko A., 2006.** A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution*, 258: 39-48.
- Pate J.S. and Gunning B.E.S., 1972.** Transfer cells. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 23: 173-196.
- Pawley J.B., 1995.** *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York, NY: Plenum Press.
- Pergent G., 1990.** Lepidochronological analysis of the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile: A standardized approach. *Aquat. Bot.*, 37: 39-54.
- Peruzzi L. and Eroğlu H.E., 2013.** Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure? *CompCytogen*, 7: 1-9.
- Peruzzi L., Leitch I.J. and Caparelli K.F., 2009.** Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. *Ann. Bot.*, 103: 459-475.
- Pettitt J.M., 1984.** Aspects of flowering and pollination in marine angiosperms. *Oceanography Marine Biol. Annu. Rev.*, 22: 315-342.
- Pettitt J.M. and Jermy A.C., 1975.** Pollen in hydrophilous angiosperms. *Micron*, 5: 377-405.
- Phillips R.C., McMillan C. and Bridges K.W., 1983a.** Phenology of eelgrass, *Zostera marina* L., along latitudinal gradients in North America. *Aquat. Bot.*, 15: 145-156.
- Pijnacker L.P. and Ferwerda M.A., 1984.** Giemsa C-banding of potato chromosomes. *Can J. Genet. Cytol.*, 26: 415-419.
- Plummer J.A., Shan F., Galwey N., Yan G., 2003.** New methods for comparison of chromosomes within and between species. *Caryologia*, 56: 227-231.
- Poggio L., González G., Naranjo C.A., 2007.** Chromosome studies in *Hippeastrum* (Amaryllidaceae): variation in genome size. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155: 171-178.
- Poggio L., Realini M.F., Fourastié M.F., García A.M. and González G.E., 2014.** Genome downsizing and karyotype constancy in diploid and polyploid congeners: a model of genome size variation. *AoB PLANTS* 6: plu029, doi:10.1093/aobpla/plu029

- Provan J., Wilson S., Portig A.A. and Maggs C.A., 2007.** The importance of reproductive strategies in population genetic approaches to conservation: an example from the marine angiosperm genus *Zostera*. *Conservation Genetics*, 9: 271-280.
- Puech M. and Giroud F., 1999.** Standardisation of DNA quantitation by image analysis: quality control of instrumentation. *Cytometry*, 36: 11-17.
- Rasheed A.M., 1999.** Recovery of experimentally created gaps within a tropical *Zostera capricorni* (Aschers.) seagrass meadow. Queensland. Australia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 235: 183-200.
- Read J. and Smith H.G., 1919.** An investigation of the "marine fibre" of *Posidonia australis*. Comm. Aust. Inst. Sci. Ind. Government Printer. Melbourne. *Bull. 14*, pp. 60.
- Rego, E.H., Shao, L., Macklin, J.J., Winoto, L., Johansson, G.A., Kamps-Hughes, N., Davidson M.W. and Gustafsson M.G., 2012.** Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109: E135-E143. Doi: 10.1073/pnas.1107547108.
- Ried T., Baldini A., Rand T.C. and Ward D.C., 1992.** Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1388-1392.
- Roberts D.G., 1993.** Root-hair structure and development in the seagrass *Halophila ovalis* (R. Br.) Hook. f. *Aust. J. Marine Freshwater Res.*, 44: 85-100.
- Roberts D.G. and Moriarty D.J.W., 1987.** Lacunal gas discharge as a measure of production in the seagrasses *Zostera capricorni*, *Cymodocea serrulata* and *Syringodium isoetifolium*. *Aquat. Bot.*, 28: 143-160.
- Roberts D.G., McComb A.J. and Kuo J., 1984.** The structure and continuity of the lacunae system of the seagrass *Halophila ovalis* (R. Br.) Hook. f. (Hydrocharitaceae). *Aquat. Bot.*, 18: 377-388.
- Roberts D.G., McComb A.J. and Kuo J., 1985.** Root development in the seagrass *Halophila ovalis* (R. Br.) Hook. f. (Hydrocharitaceae), with particular reference to the root lacunae. *New Phytol.*, 100: 25-36.
- Robertson, A.I, Mann, K.H., 1984.** Disturbance by ice and life history adaptations of the seagrass *Zostera marina*. *Mar. Biol.*, 80: 131-142.
- Rónne M., 1990.** Chromosome preparation and high resolution banding (review). *J. Dairy. Sci.*, 4: 337-365.
- Romero-Zarco C., 1986.** A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon*, 35: 526-526.
- Rothfels K.H. and Siminovitch L., 1958.** An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Biotech. Histochem.*, 33(2):73-77.

- Rouquette J., Cremer C., Cremer T. and Fakan S., 2010.** Functional nuclear architecture studied by microscopy: present and future. *Intern. Rev. Cell Mol. Biol.*, 282: 1-90. Doi: 10.1016/S1937-6448(10)82001-5.
- Ruiz H. and Ballantine D. L., 2004.** Occurrence of the seagrass *Halophila stipulacea* in the tropical west Atlantic. *Bull.Mar. Sci.*, 75: 131-135.
- Sambrook, J. and Russell, D., 2000.** Molecular Cloning: A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sato S., Ohta S. and Kuroki Y. 1980.** Heteromorphic appearance of acrocentric nucleolus organizer regions in *Nothoscordum fragrans*. *Cytologia*, 45: 87-96.
- Sauvageau C., 1889.** Contribution a l'étude du système mécanique dans la racine des plantes aquatiques: les *Zostera*, *Cymodocea* et *Posidonia*. Paris. *J. Bot.*, 3: 169-181.
- Sauvageau C., 1890.** Observations sur la structure des feuilles des plantes aquatiques. Chapitre III. *Posidonia* König. Paris. *J. Bot.*, 4: 221-229, 237-245, 269-295.
- Sauvageau C., 1891.** Sur la Feuille de Quelques Monocotyledones Aquatiques. Chapitre III. *Posidonia* Aschs. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 13: 159-173.
- Sauvageau C., 1891.** Sur la tige des Cymodocees Aschs. *J. Bot. (Paris)*, 5: 205-11, 235-43.
- Schubert V., 2014.** RNA polymerase II forms transcription networks in rye and *Arabidopsis* nuclei and its amount increases with endopolyploidy. *Cytogenet. Genome Res.*, 143: 69-77. Doi: 10.1159/000365233.
- Schubert V., 2017.** Super-resolution Microscopy – Applications in Plant Cell Research. *Front. Plant Sci.*, 8: 531. Doi: 10.3389/fpls.2017.00531.
- Schubert I. and Wobus U., 1985.** In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma*, 92(2):143-148. Doi: 10.1007/BF00328466.
- Schubert I. and Lysak M.A., 2011.** Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27: 207-216.
- Schubert V. and Weisshart K., 2015.** Abundance and distribution of RNA polymerase II in *Arabidopsis* interphase nuclei. *J. Exp. Bot.*, 66: 1687-1698. Doi: 10.1093/jxb/erv091.
- Schwatuacher T. and Heslop-Harrison J.S., 1994.** Direct Fluorochrome-Labeled DNA Probes for Direct Fluorescent In Situ Hybridization to Chromosomes. In: Isaac P.G. (Eds.). *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. Vol. 28. Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 167-176.
- Schwarzacher T. and Leitch A.R., 1994.** Enzymatic Treatment of Plant Material to Spread Chromosomes for In Situ Hybridization. In: Isaac P.G. (Eds.). *Protocols for Nucleic Acid Analysis*

by *Nonradioactive Probes*. Vol. 28. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 153-160.

Schwarzacher T., Ambros P., Schweizer D., 1980. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst. Evol.*, 134: 293-297.

Scot L. I. and Prestley J. H., 1924. Leaf and stem anatomy of *Tradescantia fluminensis* Vell. *J. Linn. Soc. (Bot.)*, 1: 28.

Sculthorpe C. D., 1967. *The Biology of Aquatic Vascular Plants*. St. Martins Press, N.Y., pp. 610.

Semroud R., Verlaque R., Crouze A. and Boudoresque C. F., 1992. On a broad-leaved form of the seagrass *Posidonia oceanica* (Posidoniaceae) from Algiers (Algeria). *Aquatic Botany* 43: 181-198.

Šesek P., Kump B. and Bohanec B., 2005. Interphase structure of endoreduplicated nuclei in diploid and tetraploid *Brassica oleracea* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47: 93-99.

Sessions S.K., 1996. Chromosomes: molecular cytogenetics. In: Hillis D. M., Moritz C., Mable B.K. (Eds.) *Molecular systematic*. Sunderland, MA, Sinauer Associates, pp. 121-168.

Setchell W.A., 1929. Morphological and phenological notes on *Zostera marina* L. Univ. Calif. *Publ. Bot.*, 14: 389-452.

Setchell W.A., 1933. A preliminary survey of the species of *Zostera*. *Wash. Proc. natn. Acad. Sci.*, 19: 810-817.

Short F.T. and Short C.A., 1984. The seagrass filter: purification of coastal water. In: Kennedy V. S. (Ed.) *The Estuary as a Filter*. Academic Press, pp. 395-413.

Short F.T. and Wyllie-Echeverria S., 1996. Natural and human-induced disturbances of seagrass. *Environ. Conserv.*, 23: 17-27.

Short F.T. and Neckles A.H., 1999. The effects of global climate change on seagrasses. *Aquat. Bot.*, 63: 169-196.

Short Short F.T. and Coles R.G., 2001. *Global Seagrass Research Methods*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 482.

Short F.T., Koch E., Creed J.C., Magalhaes K.M., Fernandez E. and Gaeckle J.L., 2006b. Seagrasses monitoring across the Americas: case studies of seagrass decline. *Mar. Ecol.*, 27: 277-289.

Short F., Carruthers T., Dennison W. and Waycott M., 2007. Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 350: 3-20.

Shoup S. and Lewis L.A., 2003. Polyphyletic origin of parallel basal bodies in swimming cells of chlorophycean green algae (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 39: 789-796. Doi: 10.1046/j.1529-8817.2003.03009.x.

- Singh R. J., 2003.** *Plant cytogenetics*. CRC Press, Boca Raton, pp. 488.
- Šmarda P. and P. Bureš, 2010.** Understanding intraspecific variation in genome size in plants. *Preslia*, 82: 41-61.
- Solerender H. and Meyer F.J., 1933.** Systematische Anatomie der Monokotyledonen. Berlin, Gebrüder Borntraeger.
- Soltis P.S., Marchant D.B., de Peer Y.V. and Soltis D.E., 2015.** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, 35: 119-125.
- Solovei I., 2002.** FISH on three-dimensionally preserved nuclei. In: Beatty B., Mai S. and Squire J. *FISH: A Practical Approach*. (Eds.). Oxford University Press, Oxford, UK.
- Solovei I., Cavallo A., Schermelleh L., Jaunin F., Scasselati C., Cmarko D., Cremer C., Fakan S. and Cremer T., 2002.** Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence *in situ* hybridization (3D-FISH). *Experimental Cell Research*. 276: 10-23.
- Spalding M., Taylor M., Ravilious C., Short F. and Green E., 2003.** Global overview: the distribution and status of seagrasses. In: Green E. P. and Short F. T. (Eds.). *World Atlas of Seagrasses*. University of California Press, Berkeley, pp. 5-26.
- Speckmann G.J. and Van Dijk G.E., 1972.** Chromosome number and plant morphology in some ecotypes of *Poa pratensis* L. *Euphytica*, 21: 171-180.
- Speicher M.R., 2006.** Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Techniques. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons. Doi: 10.1038/npg.els.0005779.
- Spurberck J.L., Zinmeister A.R., Meyer K.J., Jalal S.M., 1996.** Dynamics of chromosome spreading. *Am. J. Med. Genet.*, 61:387–393.
- Stace C.A., 2000.** Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*, 49: 451-477.
- Subramanian D., 2000.** Cytological studies in salt water species of Angiosperm. *Seaweed Res. Utiln.*, 22: 159-160.
- Talavera S., Garcia-Murillo P. and Herrera J., 1993.** Chromosome numbers and a new model for karyotype evolution in *Ruppia* L. (Ruppiaceae). *Aquatic Botany*, 45: 1-13.
- Tippery N.P., Les D.H. and Crawford D.J., 2015.** Evaluation of phylogenetic relationships in Lemnaceae using nuclear ribosomal data. *Plant Biol.*, 17 (Suppl 1): 50-58. Doi:10.1111/plb.12203.
- Tyerman S.D., 1989.** Solute and water relations of seagrasses. In: Larkum A. W. D., McComb A. J. and Shepherd S. A. (Eds). *Biology of Seagrasses: A Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region*. Elsevier Amsterdam, The Netherlands, pp. 723-759.

- Tomlinson P.B., 1969.** On the morphology and anatomy of turtle grass, *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). Vol. II. Anatomy and development of the root in relation to function. *Bull. Mar. Sci.*, 19: 57-71.
- Tomlinson P.B., 1972.** On the morphology and anatomy of turtle grass *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). Vol. IV. Leaf anatomy and development. *Bull. Mar. Sci.*, 22: 75-92.
- Tomlinson P.B., 1974.** Vegetative morphology and meristem dependence the foundation of productivity in seagrasses. *Aquaculture*, 4: 107-130.
- Tomlinson P.B., 1982.** *Anatomy of the Monocotyledons*. Vol. VII. Helobiae (Alismatidae). Oxford University Press, pp. 544.
- Uchimura M., Faye E.J., Shimada S., Inoue T., Nakamura Y., 2008.** A reassessment of *Halophila* species (Hydrocharitaceae) diversity with special reference to Japanese representatives. *Botanica Marina*, 51: 258-268.
- Uchiyama H., 1989.** Karyological studies on some taxa of Helobiae. *J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B* 22: 271-352.
- Uchiyama H., 1993.** Karyomorphology of seagrasses and their allied genera. In: Proceedings of the International workshop on Seagrass Biology, Kominato. Ocean Research Institute, University of Tokyo, Japan, Tokyo, 51-56.
- Vanitha K., Subhashini Pon., Thangaradjou T., 2016.** Karyomorphometric analysis of somatic chromosomes of selected seagrasses of families Hydrocharitaceae and Cymodoceaceae. *Aquatic Botany*, 133: 45-49.
- Vilardo I., Gargiulo G.M., 2014.** Karyotype analysis and nuclear DNA amount in *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson from Sicily (Italy). *Seagrasses in Europe: Threats, Responses and Management*, Olhao, Portugal.
- Vilhar B. and Dermastia M., 2002.** Standardisation of instrumentation in plant DNA image cytometry. *Acta Botanica Croat*, 61: 11-26.
- Vilhar B., Greilhuber J., Koce J.D., Temsch E.M., Dermastia M., 2001.** Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany*, 87: 719-728.
- Vosa C.G., 2005.** On chromosome uniformity, bimodality and evolution in the tribe Aloineae (Asphodelaceae). *Caryologia*, 58: 83-85.
- Wang L.G., Zhao B., Huang B., 2011.** Karyotype analysis of *Thalassia hemprichii*. *Trop. Oceanogr.*, 5, 1-4.
- Ward L.G., Kemp W.M., Boynton W.R., 1984.** The influence of water depth and submerged vascular plants on resuspended particles in a shallow estuarine embayment. *Mar. Geol.*, 59: 85-103.

- Watanabe K, Yahara T, Denda T, Kosuge K., 1999.** Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. *J. Plant Res.*, 112: 145-161.
- Waycott M., Freshwater D.W., York R.A., Calladine A., Kenworthy W.J., 2002.** Evolutionary trends in the seagrass genus *Halophila* (Thouars): insights from molecular phylogeny. *Bulletin of marine science*, 71: 1299-1308.
- Waycott M., Procaccini G., Les D.H. and Reusch Th. B.H. (2006).** Seagrass evolution, ecology and conservation: a genetic perspective. In: Larkum, A. W. D., McComb A. J. and Shepherd S. A. (Eds.) *Seagrasses: biology, ecology and conservation*. Springer Dordrecht, The Netherlands, pp. 25-50.
- Weber H., 1956.** Über das Wachstum des Rhizoms von *Posidonia caulini* Kön. (= *P. oceanica* Delile). *Jena. Flora*, 143: 269-280.
- Webster J. and Stone B.A., 1994a.** Isolation, structure and monosaccharide composition of the walls of root hairs from *Heterozostera tasmanica* (Martens ex Aschers.) den Hartog. *Aquat. Bot.*, 47: 29-38.
- Weisshart K., Fuchs J. and Schubert V., 2016.** Structured Illumination Microscopy (SIM) and Photoactivated Localization Microscopy (PALM) to Analyze the Abundance and Distribution of RNA Polymerase II Molecules on Flow-sorted Arabidopsis Nuclei. *Bio-protocol*, 6(3): e1725.
- Weiss-Schneeweiss H., Schneeweiss G.M., 2013.** Karyotype Diversity and Evolutionary Trends in Angiosperms. In: Leitch I.J., Greilhuber J., Doležel J., Wendel J.F. (Eds.), *Plant Genome Diversity. Vol. 2. Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes*, Springer, Wien, pp. 209-230.
- Wendel J.F., 2000.** Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol.*, 42: 225-49.
- Wendel J.F., Jackson S.A., Meyers B.C., Wing R.A., 2016.** Evolution of plant genome architecture. *Genome Biology*, 17: 37-50.
- Wenjie Y., Bo H., Renen W., Yu Z., 2012.** Chromosome and karyotypes of three seagrass species of Hydrocharitaceae. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 40: 10163-10165.
- White M.J.D., 1973.** *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press.
- Wilson J.G. and Bennett I.J., 2008.** Nutrient requirements of in vitro cultured *Halophila ovalis* and *Posidonia coriacea*: nitrogen source. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 92: 155-163.
- Winterbottom D.C., 1917.** Marine fibre. Dept. Chemistry. South Australia. *Bull. No. 4*, pp. 1-36.
- Xiang-Xu H., Yue-hong Y., Qi-fei Y., Fu-wu X., 2010.** Karyomorphological studies of *Halophila* (Hydrocharitaceae) from Hong Kong, China. *J. Trop. Subtroph. Bot.*, 18: 391-393.
- York R.A., 2005.** Megagametogenesis and nuclear DNA content estimation in *Halophila* (Hydrocharitaceae). *Doctoral dissertation*, University of North Carolina.