

INTRODUZIONE

Recenti studi sulla variabilità molecolare in popolazioni ittiche di ambiente marino, hanno descritto differenti pattern che vanno da situazioni di panmissia con alto flusso genico fra i siti a un'elevata strutturazione genetica con popolazioni distintamente separate fra di loro (Bernardi, 2000; Bernardi et al., 2001; Bargelloni et al., 2003; Bernardi et al., 2003; Bernardi e Vagelli, 2004; Costagliola et al., 2004; Bekkevold et al., 2005; Debes et al., 2008; Domingues et al., 2008a; Burford, 2009). Tradizionalmente, la diversità genetica in popolazioni di specie ittiche marine, a causa della carenza o assenza di barriere al flusso genico, è stata considerata minore di quella delle specie dulcacquicole e anadrome. Infatti, in specie d'acqua dolce, sono stati descritti spesso pattern di strutturazione genetica che vengono interpretati sulla base della presenza di barriere fisiche al flusso genico; tali casi di strutturazione sono stati citati in Cyprinidae (Durand et al., 1999; Wang et al., 2000; Wang et al., 2004; Lin et al., 2009) e Cyprinodontidi (Stockwell et al., 1998; Maltagliati, 1998, 1999; Ferrito et al., 2003; Tigano et al., 2004, 2006; Haney et al., 2007; Rocco et al., 2007; Pappalardo et al., 2008). Per quanto riguarda le specie ittiche marine, diversi studi hanno riportato risultati che ben si adeguano ad un modello di mancanza di strutturazione genetica e minore diversità rispetto alle specie d'acqua dolce (Gyllenstein, 1985; Ward et al., 1994; Fruciano et al 2011). Tuttavia, in tempi più recenti, è stato osservato che diversi fattori, tra cui ad esempio la ritenzione larvale, possono determinare, anche in specie con fase larvale planctonica, una certa divergenza genetica tra le popolazioni (Palumbi, 1994; Knutsen et al., 2003),

in particolare Gerlach et al. (2007) hanno dimostrato che le larve planctoniche sono in grado di distinguere le tracce olfattive dei loro reef natali, ipotizzando che le larve possano seguire la corrente ritornando preferenzialmente ai loro siti natali. Pertanto, l'idea che le popolazioni di specie marine siano difficilmente strutturate dal punto di vista genetico, è stata messa in discussione da una serie di casi in cui è stata riscontrata una evidente strutturazione genetica (Burford, 2009; Debes et al., 2008). Inoltre, la strutturazione genetica delle popolazioni può essere correlata a variabili ambientali e, in accordo con Bergek e Bjorklund (2009) "il flusso genico potrebbe essere limitato per molte possibili ragioni e pattern potrebbero essere presenti in luoghi e a scale geografiche imprevedibili specialmente negli ambienti acquatici in cui le barriere alla dispersione sono difficili da individuare".

I Blennidi sono una famiglia di Teleostei Perciformi i cui rappresentanti sono tipicamente marini e bentonici, viventi soprattutto lungo le coste dei mari caldi e temperati, e, in qualche caso anche in acqua dolce. Nel Mar Mediterraneo e nell'Atlantico nord-orientale sono presenti 22 specie di Blennidi, alcune delle quali sono intertidali, e solo raramente pelagiche. La loro sedentarietà, dimostrata dal fatto che una volta insediatisi nel loro ambiente effettuano scarsi movimenti e tendono a rimanere vicino a pietre, massi ed altri rifugi, rende i blennidi un gruppo particolarmente interessante in studi di strutturazione genetica di specie marine. Tuttavia, sulla struttura di popolazione delle singole specie esistono pochi dati; in particolare, Muss et al. (2001) hanno studiato *Ophioblennius atlanticus* e *O. steindachneri* utilizzando la regione mitocondriale del citocromo b; mentre, sulla base dell'analisi delle sequenze della regione di controllo mitocondriale (D-

Loop), Domingues et al. (2007) hanno condotto uno studio sulla specie *Coryphoblennius galerita* e Stefanni et al., 2006 e Francisco et al., 2006 in *Lipophrys pholis*. Recentemente, Almada et al. (2009), hanno studiato i rapporti filogenetici esistenti all'interno del genere *Salaria*, confrontando il livello di variabilità genetica intraspecifica in *S. pavo* e *S. fluviatilis*. Ancora più carenti sono i dati sulla struttura di popolazione di *Parablennius sanguinolentus*, (Pallas, 1814); le poche informazioni che esistono sono riportate in Domingues et al. (2008b), i quali hanno preso in esame le sequenze della regione di controllo mitocondriale al fine di studiare la filogeografia e la demografia storica di *P. parvicornis* e *P. sanguinolentus* sebbene di quest'ultima specie vengano analizzate soltanto due popolazioni di cui una portoghese e l'altra spagnola.

Parablennius sanguinolentus (Pallas, 1814) è un blennide ampiamente distribuito nel Mediterraneo, Mar Nero e costa Atlantica dal Marocco alla Loira in Francia. È una specie intertidale che produce uova che vengono attaccate sotto le pietre o nelle conchiglie vuote e vengono poi tenute sotto controllo dal maschio. Questa specie presenta larve pelagiche, della durata di 34 giorni, con dispersione di tipo "inshore" in quanto le larve non vengono generalmente riscontrate oltre un miglio di distanza dalla costa (Raventos e Macpherson, 2001). Gibson (1999) riporta che *Blennius* (= *Parablennius*) *sanguinolentus* è capace di ritornare nei luoghi precedentemente occupati (comportamento di homing) nell' 83% dei casi esaminati, dopo aver percorso distanze che variano da 10 ai 120 metri; tale comportamento è stato dimostrato anche nella specie *P. parvicornis*, strettamente affine (Thyssen, 2010). Oltre che suscitare interesse per gli studi di strutturazione genetica, recentemente, *P. sanguinolentus* si è rivelato anche un

valido bioindicatore nella valutazione della qualità dell'ambiente costiero in una ristretta area della costa ionica siciliana (Tigano et al. 2009). A tal riguardo, negli ultimi decenni, l'approccio multimarker con l'utilizzo di pesci bioindicatori, ha rappresentato un valido strumento d'indagine (Akcha et al., 2004; Kilemade et al., 2004; Gabbianelli et al., 2003; Moraes de Andrade et al., 2004; Frenzilli et al., 2004; Pereira et al., 2010; Tlilli et al., 2010; Fonseca et al., 2011; Tsangaris et al., 2011) e, anche l'analisi molecolare ha fornito un ottimo contributo alla valutazione della qualità ambientale associata ad indicatori della contaminazione ambientale, quali il bioaccumulo dei metalli nel muscolo e l'analisi chimica dei biotopi (Bickham 2001, 2011, Bourret et al., 2008; Knapen et al., 2009; Maes et al., 2005; Mulvey et al., 2003; Rinner et al., 2011). Sulla base della considerazione che sia gli studi di strutturazione genetica che quelli sulla bioindicazione di *P. sanguinolentus* sono stati ad oggi svolti su scala locale, obiettivo dello studio sono: a) l'analisi della struttura genetica di popolazioni campionate in 10 siti di aree costiere italiane attraverso lo studio della variazione delle sequenze della regione di controllo mitocondriale; b) l'utilizzo, negli stessi siti, di *P. sanguinolentus* quale valido bioindicatore, prendendo in esame l'analisi chimica dei siti, il bioaccumulo e biomarker molecolari.

1. I BLENNIIDAE

1.1. EVOLUZIONE, FILOGENESI E DISTRIBUZIONE DEI BLENNIIDAE NEL MEDITERRANEO

Fra i Perciformi, il sottordine Blennioidei ha preso origine nell'Eocene (Berg, 1958). Le specie di questo taxon oggi si trovano negli oceani di tutto il mondo e, alcune di esse, sono anche in grado di vivere in acqua dolce. Diversi eventi paleostorici dal Miocene al Pleistocene hanno influenzato notevolmente la distribuzione e l'ulteriore evoluzione dei Blennioidei (Eckman, 1953; Mars, 1963; Ruggieri, 1967) nell'area mediterranea.

Dal confronto della ricchezza faunistica dei Blennidi presenti nel Mar Mediterraneo, nell'Africa occidentale e nell'Atlantico nord-orientale emerge che il Mar Mediterraneo presenta una fauna comparativamente più ricca caratterizzata da specie endemiche (11% del numero totale delle specie atlantiche) e da specie che, pur non essendo strettamente endemiche, si sono probabilmente evolute nel Mediterraneo, da cui si sono disperse in aree adiacenti. Sulla speciazione dei Blennioidei nel Mediterraneo sono stati proposti diversi modelli (Tortonese, 1964; Eckman, 1967; Zander, 1973, 1980; Wirtz, 1978) che comunque individuano nella crisi di salinità del Messiniano (6,5 milioni di anni fa) l'evento che ha determinato, dopo il Miocene, la colonizzazione del Mediterraneo da parte di specie (molte delle quali vivono attualmente in questo mare) che si sono evolute da stock provenienti dall'Atlantico. Gli effetti degli eventi paleoclimatici del Pleistocene sui Blennidi del Mediterraneo sono stati diversamente interpretati. Zander (1973) suppone che durante il Pleistocene la

maggior parte delle specie di Blennioidi non avrebbe potuto sopravvivere nel Mediterraneo e che gli antenati delle forme qui presenti dovrebbero essere sopravvissute nei rifugi più caldi sulle coste dell'Africa occidentale. In una seconda ipotesi, lo stesso autore (Zander 1980) suggerisce che, per alcune linee di Blennidi, la speciazione potrebbe aver seguito un percorso diverso, con popolazioni che colonizzarono e si isolarono nelle isole Atlantiche della Macaronesia da cui invasero nuovamente l'Atlantico orientale e il Mediterraneo.

In contrapposizione all'ipotesi che il Mar Mediterraneo durante le glaciazioni si trasformò in un mare inospitale per la bassa temperatura dell'acqua, è stato dimostrato che, almeno nella parte meridionale del Mediterraneo, la temperatura dell'acqua fu soltanto di pochi gradi inferiore rispetto a quella attuale (Thiede, 1978). Di conseguenza, la maggior parte dei blennidi che attualmente vivono lungo le coste settentrionali del Mediterraneo, furono probabilmente in grado di sopravvivere, durante le glaciazioni, lungo le coste meridionali dello stesso mare piuttosto che rifugiarsi lungo le coste dell'Africa occidentale. Sulla base di tale constatazione Almada et al (2001) hanno ipotizzato che, durante le fasi glaciali, sia il Mediterraneo che la costa occidentale dell'Africa sono servite come rifugio per le specie termofile e che durante i periodi interglaciali, queste due aree geografiche sono rimaste separate a causa dell'aumento del livello del mare che si verificò lungo la costa della Mauritania (vedi Marañón et al., 2001). Questo modello implica che, oltre a un centro di speciazione primaria di elevata diversità nei tropici, il Mediterraneo può aver agito come un centro di speciazione secondaria, divenendo un rifugio per specie atlantiche di acque caldo-temperate che, successivamente, si sarebbero disperse

fuori da questo mare. L'abbassamento del livello del mare durante le glaciazioni e il confinamento delle acque calde in zone del Mediterraneo meridionale potrebbero spiegare, inoltre, il verificarsi di differenze, sia a livello di specie che di sottospecie, tra il Mediterraneo orientale e occidentale (Thiede, 1978; Wirtz, 1980). Se questo scenario si rivelasse vero, gli eventi di speciazione che hanno portato all'attuale fauna di Blennidi del Mediterraneo e dell'adiacente Atlantico sarebbero relativamente recenti essendosi verificati durante il Pleistocene.

1.2. TASSONOMIA DEI BLENNIIDAE

Tra i primi dati bibliografici presenti in letteratura sulla tassonomia dei Blennidi, Norman (1943) indica che la famiglia dei Blenniidae comprende tre sottofamiglie, Ophioblenniinae, Salariinae e Blenniinae; l'Autore inserisce la maggior parte dei Blennidi dell'Atlantico nord-orientale e del Mediterraneo nel genere *Blennius* che viene suddiviso in tre sottogeneri: *Blennius*, *Lipophrys* e *Salaria*, e segnala, altresì, l'esistenza di un genere monospecifico *Coryphoblennius* con *Coryphoblennius galerita* (Linnaeus, 1758).

Studi tassonomici di Springer (1968), Springer e Smith-Vaniz (1972) e Smith-Vaniz (1976) sulla famiglia Blenniidae hanno indicato, all'interno dei Blenniidae, sei linee filetiche, mentre Bock e Zander (1986) hanno segnalato in questa famiglia le seguenti sei tribù: Salariinae, Blenniini, Parablenniini, Omobranchini, Phenablenniini e Nemophini. Ulteriori studi di Nelson (1994) sulla tassonomia dei Blennidi inseriscono la maggior parte delle specie dell'Atlantico nord orientale e del Mediterraneo nella tribù Parablenniini, la specie *Ophioblennius atlanticus*

(Valenciennes, 1836) nella tribù dei Salariini e *Blennius ocellaris* (Linnaeus, 1758) nella tribù dei Blenniini.

Bath (1977) in "Revision der Blenniini (Pisces: Blenniidae)" indica che *Parablennius* è un genere polifiletico ed inserisce, altresì, alcune specie (attualmente facenti parte di questo genere) nel genere *Pictiblennius* (ipotesi non più sostenuta, Bath 1996); l'Autore, inoltre, indica che *Lipophrys* deve essere considerato un genere e propone un nuovo genere monospecifico con la specie *Paralipophrys trigloides* (Valenciennes, 1836). Anche Zander (1978) mantiene separati i due generi *Parablennius* e *Pictiblennius* mentre considera inclusi nell'unico genere *Lipophrys* i due generi *Paralipophrys* e *Salaria*; tale ipotesi è stata successivamente sostenuta anche da Bock e Zander (1986) e Nelson (1994). Nel lavoro del 1996, Bath individua nel genere *Parablennius* cinque gruppi distinti ed indica che i generi *Lipophrys* e *Salaria* sono più strettamente correlati tra loro rispetto a qualsiasi altro genere.

Richtarski & Patzner (2000), in uno studio condotto sulla morfologia del sistema riproduttivo del maschio dei Blennidi del Mediterraneo hanno indicato che *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814) è più strettamente affine a *Salaria pavo* (Risso, 1810) piuttosto che a *Lipophrys*, in accordo con quanto riportato da Garcia et al. (1987) sulla base di dati sulla cariologia di alcuni Blennidi; inoltre, gli Autori hanno indicato una stretta somiglianza tra i due generi *Lipophrys* e *Blennius*. E ancora, Nieder e Busse (1992) hanno studiato ulteriormente la sistematica della tribù Parablenniini confrontando i pattern di bande elettroforetiche del siero sanguigno proveniente da sette specie di Blennidi, e individuando tre gruppi: *Parablennius*, *Lipophrys* e *Scartella*. Infine, il primo

approccio molecolare e cladistico alla filogenesi dei Blennioidi è stato condotto da Stepien et al. (1997). Sulla base di dati molecolari su un frammento di rDNA mitocondriale 12S, gli Autori hanno suggerito che: (1) la famiglia Blenniidae è monofiletica, (2) la tribù Parablenniini è monofiletica, la tribù Salariini è parafiletica e (3) i Salariini, con l'eccezione di *Ophioblennius*, sono sister group dei Parablenniini; Stepien et al. (1997) hanno anche preso in esame alcune relazioni all'interno del sottordine Blennioidei, precisando che i Tripterygiidae sono la sister family dei Blenniidae, come già osservato da Williams (1990).

Infine, i risultati di Almada et al. (2005a) su *O. atlanticus* sostengono le conclusioni di Stepien et al. (1997) e Bath (2001) per la forte affinità tra *Ophioblennius* e il gruppo Blenniini/Parablenniini. Gli Autori hanno indicato che *Parablennius* non è chiaramente riconosciuto come clade monofiletico; in esso, sono inclusi tre cladi: (1) *P. sanguinolentus* e *P. parvicornis*, (2) *P. gattorugine* e *P. ruber*, e (3) *P. pilicornis* (Cuvier, 1829), *P. salensis* (Bath, 1990); *P. tentacularis*, *P. rouxi*, *P. incognitus* (Bath 1968) e *P. zvonimiri* (Kolombatovic, 1892); gli Autori indicano, inoltre, che la divergenza tra il clade *P. parvicornis/P. sanguinolentus* e gli altri *Parablennius* appare considerevole; queste due specie, infatti, sono morfologicamente e ecologicamente molto specializzate, essendo tipicamente pesci erbivori viventi in acque molto basse, in habitat rocciosi e in pozze intertidali (Gibson, 1968; Goldschmid et al, 1980;. Santos e Almada, 1988).

1.3. MORFOLOGIA E BIOLOGIA DI *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814)

La specie presenta un corpo ingrossato anteriormente e schiacciato posteriormente, la testa è tondeggianti e l'occhio è sormontato da una brevissima appendice dermica frangiata. La bocca è munita di 34-38 denti. La pinna dorsale è unica e di altezza quasi uniforme, con una lieve indentatura tra i raggi spinosi e quelli molli, e termina al peduncolo codale, a cui si collega con una piccola membrana. L'anale è più bassa della dorsale ed è collegata al peduncolo codale da una breve membrana. Le pettorali sono ampie e lunghe quanto la testa. Le ventrali sono filiformi. La codale è arrotondata. Raggi dorsali: XII-XIII. 19-22; presenta 11 raggi anali, 13-14 raggi pettorali estesi fino all'origine dell'anale o quasi. La colorazione è variabile, su una tinta neutra grigiasta risaltano macchie e strie vermicolari chiare e scure. Presenti macchie rosse sulle pettorali e sulla coda. La pinna anale ha spesso un margine nero, con punte bianche dei raggi, in quella dorsale si nota quasi sempre una macchia nera tra i primi due raggi (Fig. 1a). Preferisce climi caldi (50°N - 30°N, 18°W - 42°E) e oltre che nel Mediterraneo (è comune sulle coste italiane) e nell'Adriatico, si ritrova nel mar Nero e nell'Atlantico (dal Portogallo al Congo) e nelle isole Azzorre (Fig. 1b). Ha scarso interesse commerciale. Si lascia avvicinare, ma resta sempre sospettosa; si cattura con nasse e retini a bilancia, nei tramagli costieri. Abocca facilmente agli ami e può raggiungere i 20 cm di lunghezza, con una media di 15 cm.

a)



b)

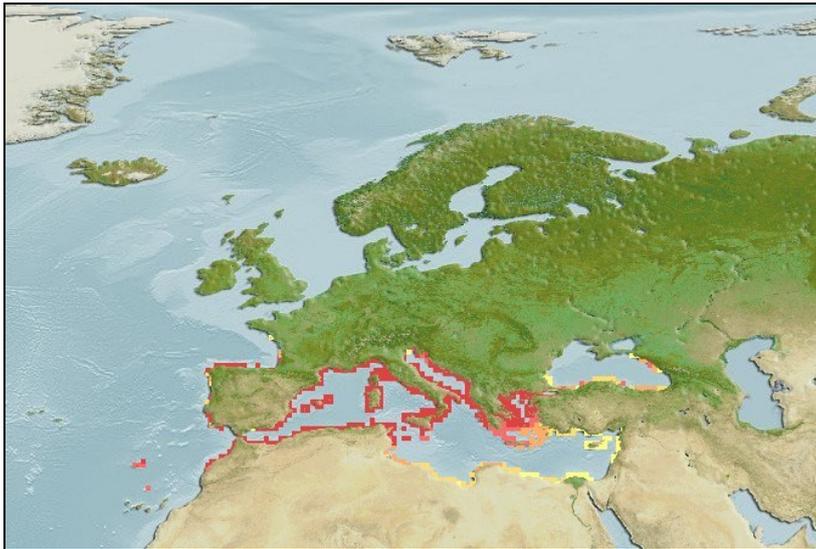


Figura 1 - a) esemplare di *Parablennius sanguinolentus*; b) distribuzione della specie

È una specie intertidale, vive fra le posidonie, i ciottoli o ai margini delle rocce coperte da alghe (di cui si nutre) filamentose, ripide e esposte a luce solare, in attesa delle prede. Percorre sott'acqua lunghe distanze "a volo". E' una specie euriterma, vive a profondità raramente superiore al metro ed è ovipara. Maschi e femmine si ritrovano insieme al di fuori della stagione della fecondazione. Si riproduce da Aprile a Luglio e le uova prodotte da Maggio a Luglio, vengono attaccate sotto le pietre o nelle conchiglie vuote e vengono sorvegliate dal maschio. Le larve sono pelagiche e si trovano nei mesi da Giugno ad Agosto; la loro dispersione viene definita "inshore", poiché non supera il miglio di distanza

dalla costa (Macpherson e Raventos, 2006). La vita pelagica dura 34 giorni (Raventos e Macpherson, 2001) e termina quando raggiungono circa 30 mm di lunghezza. Santos (1956) riporta un comportamento di homing.

2.

2.1. I PESCI BIOINDICATORI

Per bioindicatori si intendono tutti quegli organismi che, mediante reazioni identificabili (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, corologiche), forniscono informazioni sulla qualità dell'ambiente; possono essere utilizzati come bioindicatori sia popolamenti naturali sia organismi introdotti nell'ambiente. La scelta dell'organismo indicatore deve tenere presente una serie di caratteristiche relative alla sua fisiologia, al tipo di alimentazione, all'habitat, allo stile di vita (Fossi, 1998). Molti gruppi di organismi sono stati proposti come indicatori di cambiamenti ambientali ed ecologici; sebbene non esista un gruppo che metta d'accordo tutti i biologi, sembra che i pesci abbiano ricevuto notevoli attenzioni. I pesci, infatti, sono stati utilizzati con successo come bioindicatori dei cambiamenti della qualità dell'ambiente in una grande varietà di habitat acquatici in quanto presentano numerosi vantaggi al fine del monitoraggio ambientale: 1) sono tipicamente presenti in tutti i sistemi acquatici, con l'eccezione di acque altamente inquinate; 2) per molte specie sono disponibili numerose informazioni riguardo la risposta ambientale; 3) rispetto a molti invertebrati, i pesci sono relativamente facili da identificare e molti esemplari possono essere processati sul campo, e rilasciati in acqua (in caso di campionamento non distruttivo); 4) le comunità dei pesci includono specie che rappresentano una ampia varietà di livelli trofici; 5) i pesci sono comparativamente più longevi di organismi invertebrati e forniscono, quindi, registrazioni a lungo termine dello stress ambientale. In particolare la "salute"

dei pesci viene sfruttata come eccellente biomarker: la "salute" cellulare, rappresenta l'integrità strutturale delle componenti cellulari e il mantenimento dei processi cellulari a livello biochimico; la "salute" individuale, descrive la condizione strutturale, morfologica e funzionale dell'intero organismo; la "salute" della popolazione, rappresenta la sostenibilità ed il mantenimento della popolazione di una particolare specie; la "salute" della comunità, rappresenta l'appropriato insieme di organismi e le relazioni tra le specie di questo insieme. Correlato alla salute dei pesci, è lo "stress", cioè l'effetto cumulativo e quantificabile di fattori o combinazioni di essi, che operano su un individuo, una popolazione, una comunità o un ecosistema e che spesso riduce la fitness di sopravvivenza di ogni livello biologico di organizzazione (Withfield and Elliott, 2002). I pesci possono, inoltre, costituire un sistema per individuare dei potenziali rischi per la salute umana e un sistema di verifica dell'efficienza d'interventi di riqualificazione degli ambienti acquatici (Tancioni et al, 2005).

2.2. NOTE DI ECOTOSSICOLOGIA

2.2.1. I BIOMARKER (da Fossi, 1998)

Quando un contaminante raggiunge un ecosistema, sia questo marino, terrestre o di acqua dolce, esso può provocare una serie di alterazioni o danni a diversi livelli di complessità strutturale che, partendo dal danno molecolare, seguendo la complessità dell'organizzazione gerarchica dei viventi, giungono fino ad alterazioni su popolazioni e comunità biologiche.

Uno degli aspetti fondamentali su cui si basa la moderna tossicologia ambientale è l'identificazione del bersaglio primario d'azione di un composto inquinante. La tossicità primaria di un contaminante si esercita, infatti, in linea generale a livello biochimico e molecolare (modificazione delle attività enzimatiche, danni al DNA, ecc) e solo, successivamente gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, ai livelli superiori dell'organizzazione gerarchica, fino a giungere al livello di popolazione e di comunità. Parallelamente all'impatto negativo del composto tossico ai diversi livelli strutturali, si sviluppano delle risposte adattative allo "stress chimico" che tendono a riportare il sistema ad uno stato di omeostasi. Si potrebbe quindi affermare che le diverse risposte, omeostatiche e non, che un organismo genera nei confronti di uno stress rappresentano dei potenziali marker di contaminazione ambientale.

La National Academy of Science statunitense descrive un biomarker come: "...quella variazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico."

Depledge (1989) definisce come biomarker ecotossicologico "...quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello di un intero organismo (individuo o popolazione) che dà evidenza di esposizione e/o effetto di uno o più composti inquinanti (e/o radiazioni)."

In sintesi, l'utilizzo di biomarker permette, attraverso lo studio delle risposte immediate (induzione dei sistemi detossificanti, alterazioni del DNA, ecc), di prevedere il verificarsi di effetti negativi a lungo termine. Il ruolo dei biomarker

non è quello di dare informazioni quantitative sui livelli di esposizione di un organismo, ma è quello di fornire indicazioni sul suo “stato di salute” come segnale potenziale di alterazioni ambientali.

I principali vantaggi dell’uso di biomarker nei programmi di monitoraggio sono i seguenti:

- forniscono una risposta integrata all’esposizione della specie sentinella o bioindicatore, tenendo conto sia delle diverse vie di assunzione che delle esposizioni, nel tempo ed entro una determinata area;
- danno una risposta integrata dell’insieme delle interazioni tossicologiche e farmacocinetiche della miscela di composti a cui è sottoposto l’organismo;
- forniscono una risposta immediata all’esposizione degli agenti tossici (ore – giorni) che può essere impiegata per prevedere effetti a lungo termine.

L’applicazione di questo approccio metodologico deve tenere conto tuttavia della presenza di alcuni fattori di disturbo. Ad esempio, certe reazioni enzimatiche, subiscono modificazioni in funzione dello stato ormonale, dell’età e del sesso dell’organismo.

La conoscenza però dei cicli riproduttivi dell’organismo “sentinella”, o bioindicatore, delle sue caratteristiche fisiologiche, della variabilità tra individui, permette in parte di eliminare tali fattori.

I biomarker vengono comunemente classificati a seconda del significato del loro segnale in: Biomarker di esposizione e Biomarker di effetto. I primi sono rappresentati da tutte quelle risposte di un organismo, ai diversi livelli di complessità strutturale, che indicano l’esposizione ad un composto chimico o ad una classe di composti chimici, ma che non forniscono nessuna indicazione dei

reali effetti tossicologici sull'organismo. Fanno parte invece dei biomarker di effetto tutte quelle risposte che indicano sia l'esposizione che l'effetto di un composto tossico.

I marcatori biologici si possono dividere anche in specifici e generali, a seconda della loro specificità di risposta nei confronti di agenti inquinanti. Ai primi appartengono tutte quelle risposte molecolari e biochimiche che si realizzano in un organismo a seguito dell'esposizione ad una specifica classe di contaminanti. Si definiscono invece biomarker generali le risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico, che non possono essere direttamente ricondotte ad una sola classe di contaminanti, ma che rappresentano lo stato generale di stress dell'organismo (ad'esempio, alcuni danni al DNA.). Entrambe queste famiglie di biomarker sono indispensabili nei programmi di biomonitoraggio ambientale, infatti si collocano in due diverse fasi dell'attività conoscitiva.

I biomarker vengono comunemente classificati in funzione della diversa risposta a livello gerarchico nelle seguenti categorie:

- Alterazioni del DNA (ad esempio, test Comet e test del micronucleo)
- Risposte di proteine
- Prodotti metabolici
- Variazioni a carico del sistema immunitario
- Alterazioni osteopatologiche
- Biomarker non specifici e fisiologici

2.2.2. CENNI DI TOSSICOLOGIA EVOLUTIVA

La Tossicologia Evolutiva è lo studio degli effetti degli inquinanti chimici sulla genetica delle popolazioni naturali. Le ricerche in tossicologia evolutiva, utilizzano disegni sperimentali familiari all'ecotossicologo, con corrispondenti siti di riferimento e siti contaminati e la selezione di specie sentinella. Secondo Bickham et al. (2011), uno dei quattro capisaldi della Tossicologia Evolutiva analizza i cambiamenti della diversità genetica nell'intero genoma degli organismi esposti a sostanze inquinanti. Quando le popolazioni sono inizialmente esposte all'inquinamento c'è spesso una drastica riduzione della dimensione della popolazione. Questo processo di riduzione può portare alla perdita di variabilità genetica attraverso la deriva genetica e l'esame della diversità aploipica e nucleotidica rappresenta una delle diverse modalità di valutazione della diversità genetica. Una differenza fondamentale tra Tossicologia Evolutiva e le altre aree della ricerca ecotossicologica è che queste ultime si occupano, principalmente, della salute degli individui, mentre la Tossicologia Evolutiva studia le popolazioni naturali e focalizza la sua attenzione sul benessere delle popolazioni.

3. MATERIALI E METODI

3.1. CAMPIONAMENTO

Sono stati analizzati 250 esemplari di *Parablennius sanguinolentus* provenienti da

10 siti di campionamento riportate in tab. I e fig. 2.

Tabella I – Siti di campionamento degli esemplari di *P. sanguinolentus*

Localizzazione	Località	Grado di inquinamento	Coordinate geografiche	Anno di campionamento	n. di esemplari	Abbreviazione
Mar Tirreno	Rapallo (Genova)	Sito con inquinamento antropico	44°20'54" N – 09°13'53" E	2009	25	GE
	Antignano (Livorno)	Sito con inquinamento antropico	43°29'47" N – 10°19'20" E	2010	25	LI
	Santa Marinella (Roma)	Sito con inquinamento antropico	42°01'55" N – 11°49'56" E	2009	25	SM
Mar Adriatico	Brindisi	Area portuale	40°39'45" N – 17°57'49" E	2010	25	BR
	Cupra marittima (Fermo)	Sito con inquinamento antropico	43°01'34" N – 13°51'43" E	2009	25	AN
Sicilia	"Plemmirio" – Siracusa	Area Marina Protetta	37°00'53" N – 15°18'01" E	2009	25	A.M.P.PL
	Riposto (Catania)	Sito con inquinamento antropico	37°43'35" N – 15°12'36" E	2008	25	RI
	Trapani	Area portuale	38°00'49" N – 12°31'14" E	2009	25	TP
	"Isola dei Ciclopi – Acitrezza (Catania)	Area Marina Protetta	37°33'49" N – 15°09'41" E	2009	25	A.M.P. AC
	Augusta (Siracusa)	Area portuale	37°14'42" N – 15°12'27" E	2008/2009	25	AU



Figura 2 – Posizionamento geografico dei siti di campionamento di *P. sanguinolentus* (per le abbreviazioni, vedi Tab.I)

Da ogni esemplare sono state prelevate, in campo, porzioni di muscolo per l'analisi molecolare e per la valutazione del bioaccumulo dei metalli, nonché campioni di sangue, tramite puntura dalla vena caudale, per la determinazione della presenza di micronuclei e di anomalie nucleari. Contemporaneamente, sono stati campionati, in ogni sito, acque e sedimenti per sottoporli ad analisi chimiche.

3.2. ANALISI MOLECOLARE

3.2.1. ANALISI DELLE SEQUENZE

Dal tessuto muscolare (25-30 mg) conservato in etanolo, è stato estratto, utilizzando un kit di estrazione SIGMA secondo il protocollo suggerito dal produttore, il DNA genomico totale. La reazione di PCR, per l'amplificazione del frammento di DNA mitocondriale, è stata eseguita in un volume di 50 µl, mediante BIOMETRA Personal Cycler. L'estremità 5' del frammento utilizzato è stato amplificato mediante i seguenti primer: L-pro1 (5'-ACT CTC ACC CCT AGC TCC CAA AG-3') e H-DL1 (5'-CCT GAA GTA GGA ACC AGA TGC CAG-3') (Ostellari et al., 1996). Per la reazione sono stati utilizzati: 2 µl di DNA genomico, 0.25 µl di Taq Polimerasi (INVITROGEN), 2,5 µl Buffer (fornito con la Taq Polimerasi), 1 µl MgCl₂ (fornito con la Taq Polimerasi), 0,5 µl dNTPmix (INVITROGEN), 1 µl Primer L-pro1 e 1 µl Primer H-DL1. Le condizioni di PCR sono state le seguenti: una denaturazione iniziale a 94°C per 2 min, seguita da 30 cicli di denaturazione a 94°C per 1 min, annealing a 52°C per 45 sec ed estensione a 72°C per 45 sec, seguiti da uno step di estensione finale a 72°C per 7 min. L'assenza di prodotto di PCR aspecifico è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%. I prodotti di PCR sono stati sequenziati tramite un servizio di sequenziamento esterno.

3.2.2. ANALISI STATISTICA

Le sequenze sono state allineate con il software CLUSTAL X (Thompson et al., 1997). L'analisi della saturazione è stata effettuata tramite il software DAMBE

(Xia, 2007), utilizzando il calcolo dell'Indice di saturazione di sostituzione (Iss). Al fine di valutare la variabilità genetica sono stati calcolati gli indici di diversità aplotipica (h) e nucleotidica (π) per ogni sito di campionamento. La differenziazione genetica a coppie tra siti di campionamento è stata stimata calcolando i valori di F_{st} (Wright 1969; 1978) e testata con la procedura di permutazione implementata nel software ARLEQUIN ver. 3.0 (Excoffier et al., 2005). L'analisi della divergenza genetica è stata effettuato tramite il software ARLEQUIN ver. 3.0 (Excoffier et al., 2005) che ha calcolato i valori di divergenza tra le popolazioni e le corrispondenti probabilità. La correlazione tra distanze genetiche e distanze geografiche tra i campioni è stata testata mediante il test di Mantel (Mantel, 1967) utilizzando come matrici di distanze i valori di divergenza genetica e le distanze geografiche. Le distanze geografiche tra le località, espresse in chilometri, sono state misurate sia come distanze "in linea d'aria" (Fig. 3a) sia come distanze "via mare" (Fig. 3b) ottenute utilizzando l'atlante digitale del software GOOGLE EARTH, utilizzando il software NTSYSpc 2.2 (Rohlf, 2007).

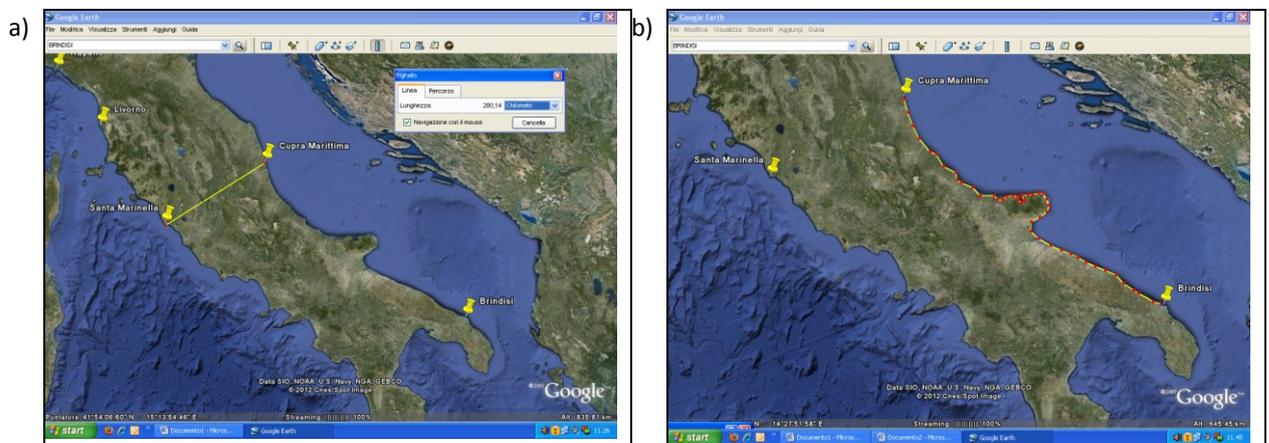


Figura 4 - a) Esempio di calcolo di distanza "in linea d'aria" tra due siti (AN e SM);
 b) esempio di calcolo di distanza "via mare" tra due siti (AN e BR)

Le relazioni tra gli aplotipi sono state rappresentate con un network median joining (Bryant e Moulton, 2004), ottenuto con il software NETWORK (Fluxus Technology, Ltd). Le relazioni tra gli aplotipi sono state analizzate con la realizzazione di alberi filogenetici, “maximum-likelihood” e “neighbour-joining”, utilizzando *Salaria pavo* come outgroup, utilizzando il software MEGA 5 (Tamura et al., 2011). La struttura di popolazione è stata valutata tramite un’analisi di varianza molecolare (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) con l’uso del software ARLEQUIN ver. 3.0 (Excoffier et al., 2005), raggruppando, dapprima, tutte le popolazioni su base geografica, distinguendo, cioè le popolazioni siciliane (A.M.P.AC, AU, A.M.P.PL, RI, TP), tirreniche (GE, LI, SM) ed adriatiche (AN, BR); successivamente, l’analisi è stata ripetuta separando le popolazioni in orientali (A.M.P.AC, AN, AU, BR, A.M.P.PL, RI) ed occidentali (GE, LI, SM, TP). Il test D di Tajima (Tajima, 1989) e il test Fs di Fu (Fu, 1997) sono stati utilizzati per valutare il possibile discostamento da un modello di evoluzione neutrale per ogni popolazione; inoltre, è stata effettuata l’analisi della distribuzione delle frequenze delle differenze a coppia delle sequenze (mismatch analysis) per verificare se le popolazioni hanno subito una espansione demografica (Li, 1977; Rogers, 1995; Harpending, 1994; Schneider e Excoffier, 1999; Excoffier, 2004). Differenze statisticamente significative tra distribuzione attesa ed osservata sono state valutate utilizzando due indici: “sum of squared deviation (SSD)” e “Harpending’s raggedness index (hg)” per rigettare l’ipotesi di espansione. Tutti i test sono stati effettuati con il software ARLEQUIN ver. 3.0 (Excoffier et al., 2005).

3.3. ANALISI DEI CONTAMINANTI E APPROCCIO MULTIMARKER

3.3.1. ANALISI CHIMICA DEI SEDIMENTI DEI BIOTOPI

I sedimenti provenienti da ciascun sito sono stati sottoposti ad analisi chimiche al fine di valutare la concentrazione di alcuni metalli pesanti, quali Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Piombo (Pb), Arsenico (As), Zinco (Zn), Rame (Cu), Nichel (Ni), Selenio (Se), Ferro (Fe), Cobalto (Co), Manganese (Mn), Vanadio (V), Alluminio (Al), Antimonio (Sb).

I campioni di sedimenti sono stati raccolti in appositi contenitori di teflon, precedentemente trattati con HNO₃ 1 M per 12 ore e poi lavati con acqua bidistillata (Merk) e/o bottiglie di vetro scuro dotati di tappi a vite rivestiti di teflon. I campioni d'acqua sono stati stabilizzati con l'aggiunta di 1 ml di HNO₃ al 65% per ogni campione da 1 litro per l'analisi di cromo (Cr), Mercurio (Hg), Piombo (Pb), cadmio (Cd), Arsenico (As) e conservati a -4° C. L'analisi dei metalli nei sedimenti è stata effettuata con il metodo EPA 3051A per As, Cr, Cd, Pb, Hg. Per la quantificazione dei metalli nei sedimenti è stato utilizzato un ICP Optima 2000 DV (Perkin Elmer). Hg è stato analizzato con un FIAS 100 (Perkin Elmer) utilizzando la tecnica della cattura di vapore freddo (Perkin Elmer). Il limite di lettura stimato è: Hg 0.006, Se 0.004, As 0.013, Cd 0.0003, Cr 0.003, Pb 0.001, Mn 0.055, Ni 0.007, V 0.002, Zn 1.09. (mg/kg w.w.).

Per tre siti (*A.M.P.AC, AU, RI*) è stata riportata (Tigano et al., 2009; Tomasello et al., 2012) anche la presenza di Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) nei sedimenti.

I valori delle concentrazioni dei metalli e degli IPA sono stati confrontati con il Decreto del Ministero Ambiente e Tutela del Territorio (Decr. Min. Amb.) n.367 del 6 Novembre 2003, per gli standard di qualità delle acque e dei sedimenti; e infine, con i valori riportati nella guida alla valutazione della qualità dei sedimenti marini fornita dall'Agenzia di protezione ambientale americana (SQG-EPA; MacDonald, D.D., 1994).

3.3.2. BIOACCUMULO DEI METALLI NEL MUSCOLO

Il muscolo di tutti gli esemplari è stato sottoposto ad analisi al fine di stimare il bioaccumulo di alcuni metalli pesanti, quali Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Piombo (Pb), Arsenico (As), Zinco (Zn), Rame (Cu), Nichel (Ni), Selenio (Se), Manganese (Mn), Ferro (Fe), Cobalto (Co), Litio (Li), Vanadio (V), Uranio (U).

Utilizzando una miscela riscaldata di acidi forti, un grammo di tessuto muscolare per esemplare è stato mineralizzato in un sistema a microonde Ethos TC (Milestone). Il metodo per tessuti animali richiede una soluzione di digestione preparata con 6 ml di HNO₃ 65% (Carlo Erba) e 2 ml di H₂O₂ al 30% (Carlo Erba) per 50 min, con cicli di operazione a 200°C. Dopo mineralizzazione, i campioni sono stati portati a 20 ml con l'aggiunta di acqua ultra pura (Merck), poi sono stati divisi in due aliquote di 10 ml ciascuno: una per la misurazione Hg e la seconda per gli altri metalli. Il campione per l'analisi Hg è stata ossidata con permanganato di potassio al 5% (KMnO₄), per ottenere la conversione di Hg organica in Hg inorganico, poi neutralizzato con idrossilammina cloridrato (NH₂OH · HCl) 1.5%. Hg è stato analizzato con FIAS 100 (Perkin Elmer) usando la tecnica di cattura di vapore freddo, mentre l'analisi degli altri metalli è stata

effettuata con ICP-MS Elan-DRC-e (Perkin Elmer). Le curve per la calibrazione dello strumento sono stati preparati sulla base del mono-elemento di riferimento certificati AAS soluzione standard (Merck).

Sono stati applicati test statistici per valutare la significatività delle concentrazione dei metalli sia tra le popolazioni (Test ANOVA "one-way") che tra ciascun metallo indicati nel Regolamento CE n. 1881/2006 (Pb, Cd). I valori delle concentrazioni dei metalli sono stati confrontati con i limiti stabiliti dal Regolamento CE n. 1881 del 19 Dicembre 2006.

Inoltre, è stato calcolato l'indice IMBI (Indice di Bioaccumulo Medio Individuale) come:

$$\text{IMBI} = \frac{\sum_{i=1}^n C_i / C_{i\max}}{n}$$

dove n è il numero totale di metalli, C_i la concentrazione individuale del metallo i , $C_{i\max}$ la massima concentrazione osservata del metallo i ; $0 < \text{IMBI} < 1$. Per comparare il bioaccumulo dei metalli tra i siti è stata eseguita dell'ANOVA sui valori IMBI, seguita da un'analisi post hoc (Test di Tukey) (Maes et al., 2005) con software STATISTICA (StatSoft, Italia).

3.3.3. DANNO AL DNA

A) TEST DEI MICRONUCLEI

La tecnica è stata eseguita in accordo con Al-Sabti (1995). Una goccia di sangue, prelevata con siringa eparinizzata, è stata strisciata su un vetrino portaoggetto. I

vetrini, dopo avere asciugato all'aria per 24 h, sono stati fissati in metanolo per 10 min e colorata con una soluzione di GIEMSA al 10% per 15 min. Ogni vetrino è stato osservato al microscopio luce ad un ingrandimento di 100X e sono stati contati 2000 nuclei. Sono state incluse in tale conteggio soltanto le cellule chiaramente distinguibili e sono stati interpretati come "micronuclei" quelle strutture nucleari di forma tondeggianti simili alla cromatina per colore e struttura, con un diametro da 1/3 ad 1/50 del nucleo principale e chiaramente separate da esso. Le altre anomalie nucleari sono state classificate come suggerito da Carrasco et al (1990). L'analisi statistica è stata condotta applicando il test t di Student, applicando una significatività pari al 5% ed utilizzando il software STATISTICA (StatSoft, Italia).

B) COMET ASSAY

I dati relativi al test Comet ai campioni provenienti dalle località di *A.M.P. AC* e *RI* sono stati riportati da Tigano et al. (2009). Per quanto riguarda i campioni di *AU*, il test è stato effettuato su sangue intero e su nuclei epatici isolati secondo il protocollo standardizzato riportato in Tigano et al. (2009). Prima del test, la vitalità sia degli eritrociti che degli epatociti è stata valutata con trypan blu ed una vitalità cellulare pari a 85% è stata giudicata idonea per il test. Il protocollo FPG- comet (Trevigen Fpg-flare kit[®]) è stato eseguito come già descritto in Tigano et al. (2009). L'elettroforesi è stata condotta in ambiente alcalino (pH 21). Per ciascun campione sono stati preparati due minigel con cellule o nuclei incorporati in agarosio ed incubati in camera umida per 40 min, coprendo ogni minigel con 100 µl di soluzione di enzima FPG (1:1000) o soltanto con 100 µl Fpg

Flare reaction buffer (kit), come controllo negativo. I campioni sono stati analizzati usando un microscopio a fluorescenza (Leica), equipaggiato con una fotocamera e software CASP (1.2.2) per l'analisi dell'immagine. Ogni fase è stata eseguita al buio e tutte le analisi sono state effettuate in triplicato, identificando 50 nucleoidi a caso per campione e calcolando la percentuale di DNA della coda (TDNA%), secondo le linee guida ESCODD (2003). I valori di riferimento di TDNA% sono stati valutati in esperimenti separati, attraverso una taratura indiretta ottenuta esponendo eritrociti di *P. sanguinolentus* ai raggi X (Collins et al., 1996).

3.3.4. VARIABILITA' GENETICA E CONTAMINANTI

E' stata condotta un'analisi di regressione lineare al fine di evidenziare la correlazione esistente tra variabilità genetica (h e π) delle popolazioni e: 1) concentrazione dei metalli nel muscolo e 2) percentuale di micronuclei ed anomalie nucleari negli eritrociti. Per quanto riguarda l'indice di correlazione è stato utilizzato il coefficiente di regressione (R^2), calcolato con il software Excell del pacchetto applicativo Windows Office 2007.

4. RISULTATI

4.1. STRUTTURA GENETICA DELLE POPOLAZIONI

4.1.1. ANALISI DELLE SEQUENZE

Una porzione di 392 pb della regione di controllo mitocondriale è stata sequenziata in 250 campioni di *Parablennius sanguinolentus* provenienti da 10 popolazioni del Mar Mediterraneo. La composizione in basi mostra che il contenuto A+T (pari al 67%) è tipica di questa regione mitocondriale; l'analisi della saturazione mostra che i dati della regione di controllo supportano un basso grado di saturazione (con un Indice I_{ss} significativamente minore rispetto all'Indice I_{ss.c}), indicando che i nostri dati possono essere utilizzati nell'analisi filogenetica.

Sono stati individuati 41 aplotipi; di questi, 37 sono popolazione-specifici (presenti con frequenza che varia da 0,46% a 6,48%). Per quanto riguarda gli aplotipi condivisi, l'aplotipo H28 risulta il più frequente ed è presente nel 46,76% dei campioni e in tutte le popolazioni, ad eccezione di *LI*, *SM*, *TP*, mentre gli aplotipi H13 e H32 sono entrambi presenti nelle popolazioni siciliane (ad eccezione di *TP*) e in quella di *AN*, infine, l'aplotipo H18 è condiviso soltanto dalle popolazioni di *AN* e *RI* (fig. 4 e Tab. II).

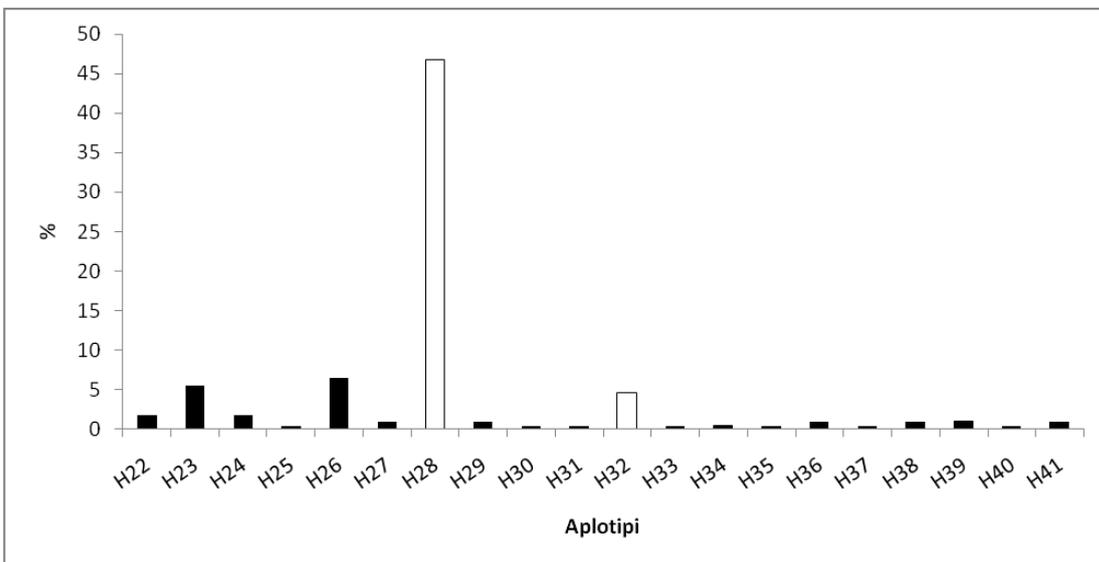
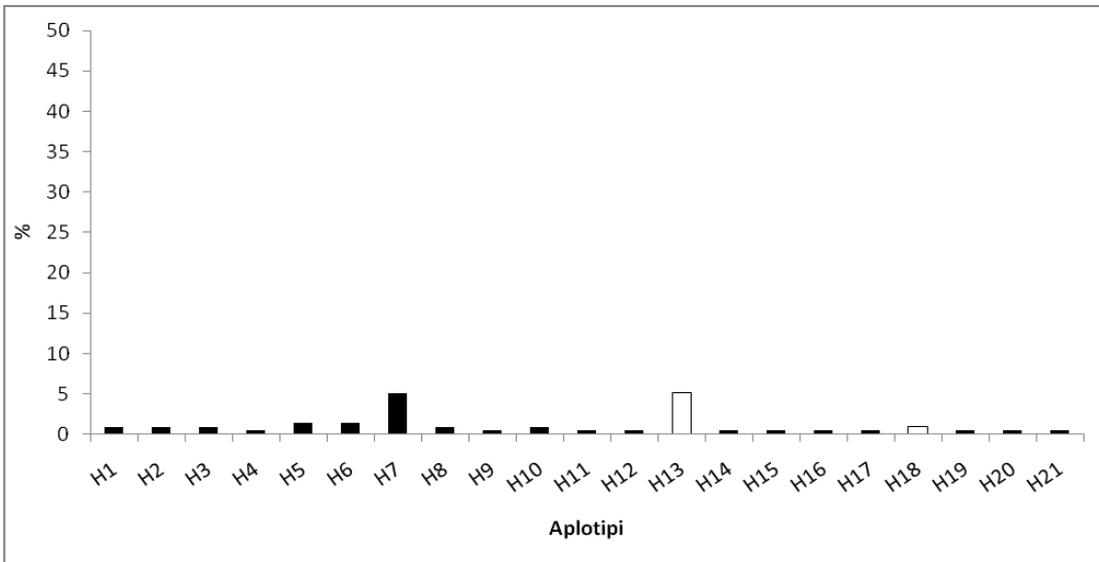


Figura 4 - Istogrammi di frequenza degli aplotipi; in bianco: aplotipi condivisi, in nero: aplotipi popolazione-specifici (vedi Tab. II)

Tabella II - Distribuzione degli aplotipi nelle 10 popolazioni di *P. sanguinolentus*;
 %: percentuale di presenza dell'aplotipo; in grassetto: aplotipi condivisi (per le abbreviazioni, vedi Tab.I).

	%	A.M.P.AC	AN	AU	BR	GE	LI	A.M.P.PL	RI	SM	TP
H1	0,92				2						
H2	0,92				2						
H3	0,92									2	
H4	0,46									1	
H5	1,39									3	
H6	1,39									3	
H7	5,1									11	
H8	0,92				2						
H9	0,46								1		
H10	0,92										2
H11	0,46										1
H12	0,46		1								
H13	5,1	3	4	1	1			2			
H14	0,46								1		
H15	0,46								1		
H16	0,46					1					
H17	0,46		1								
H18	0,92		1						1		
H19	0,46	1									
H20	0,46										1
H21	0,46	1									
H22	1,85						4				
H23	5,55						12				
H24	1,85						4				
H25	0,46										1
H26	6,48										15
H27	0,92					2					
H28	46,76	17	9	18	8	15		18	16		
H29	0,92					2					
H30	0,46		1								
H31	0,46		1								
H32	4,6	2	4	1				1	2		
H33	0,46								1		
H34	0,46							1			
H35	0,46							1			
H36	0,92		2								
H37	0,46							1			
H38	0,92				2						
H39	0,92				2						
H40	0,46							1			
H41	0,92				2						

I valori di diversità aplotipica (h) sono compresi tra 0,2714 (*AU*) e 0,8224 (*AN*), mentre i valori di diversità nucleotidica (π) sono compresi tra 0.00077 (*AU*) e 0,0122 (*AN*); infine, il numero di aplotipi varia da 9 (*AN*) a 3 (*LI*) (Tab. III).

Tabella III - Numero di aplotipi (n), diversità aplotipica (h) e diversità nucleotidica (π) nelle 10 popolazioni (per le abbreviazioni vedi Tab. I); in neretto: i valori più alti, cerchiati: i valori più bassi; SD= deviazione standard.

Popolazioni	n	$h \pm SD$	$\pi \pm SD$
<i>A.M.P.AC</i>	5	0,4927 \pm 0,1222	0,0014 \pm 0,0013
<i>AN</i>	9	0,8224 \pm 0,0825	0,0122 \pm 0,0069
<i>AU</i>	4	0,2714 \pm 0,1145	0,0008 \pm 0,0009
<i>BR</i>	7	0,8211 \pm 0,0707	0,0050 \pm 0,0033
<i>GE</i>	4	0,4368 \pm 0,1295	0,0015 \pm 0,0014
<i>LI</i>	3	0,5895 \pm 0,0926	0,0017 \pm 0,0015
<i>A.M.P.PL</i>	7	0,4867 \pm 0,1309	0,0012 \pm 0,0012
<i>RI</i>	7	0,5217 \pm 0,1332	0,0018 \pm 0,0015
<i>SM</i>	5	0,6737 \pm 0,0560	0,0013 \pm 0,0013
<i>TP</i>	5	0,4620 \pm 0,1284	0,0027 \pm 0,0021

4.1.2. RELAZIONI TRA APLOTIPI

Gli alberi filogenetici (non riportati), sia neighbour joining, sia maximum likelihood, mostrano una bassa differenziazione tra le popolazioni, indicati dai bassi valori di boot-strap.

Il network mostra un aplotipo comune a tutte le popolazioni, ad eccezione di quella di *TP* e *SM*; sono presenti, inoltre, altri due aplotipi condivisi da *AN*, *A.M.P.AC*, *AU*, *BR*, *RI*. Gli aplotipi di *TP* sono privati e nettamente staccati dagli altri, così come risultano staccati dagli altri quelli di *BR* che sono ad una notevole distanza dall'aplotipo centrale per l'alto numero di mutazioni. Infine, risultano privati anche quelli di *SM*, pur essendo a poche mutazioni da quello centrale (Fig. 6).

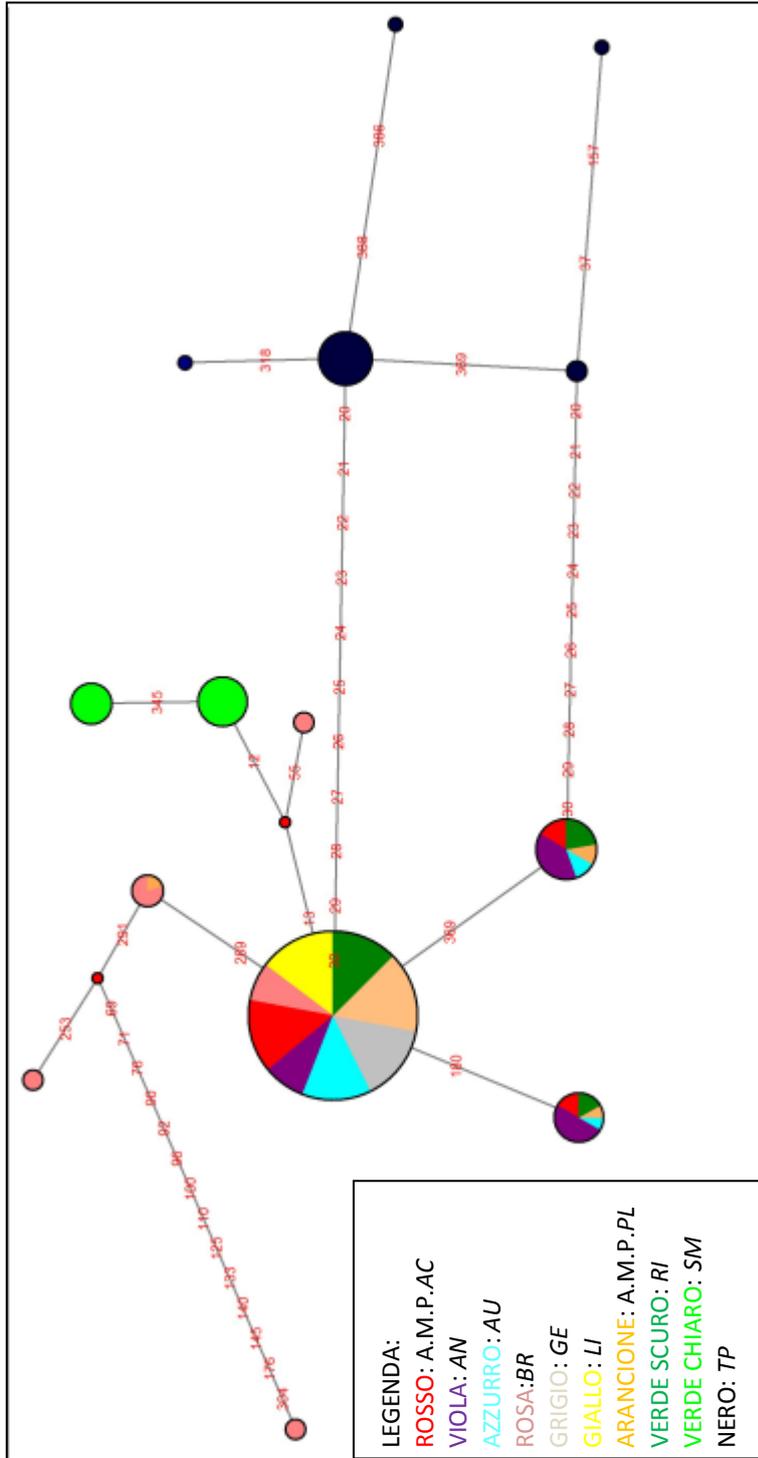


Figura 6 - Network degli aplotipi (per le abbreviazioni, vedi Tab.I)

4.1.3. STRUTTURA DI POPOLAZIONE E DIVERGENZA GENETICA

L'indice F_{ST} (pari a 0,72), è significativo rispetto all'ipotesi nulla di panmissia, indicando un elevato grado di strutturazione nelle popolazioni. Il valore più basso dei confronti a coppia degli F_{ST} si riscontra tra *A.M.P.AC* e *RI* (- 0,006) (giustificato dalla vicinanza dei siti) , mentre sono significativi i confronti tra *BR*, *LI*, *SM* e tutte le altre popolazioni e i confronti tra *AN/GE*, *AN/A.M.P.PL*, *GE/TP*, *GE/RI*. La divergenza genetica calcolata correggendo le distanze con il modello di sostituzione nucleotidica TrN+G, mostra che il valore maggiore si riscontra tra *BR* e *SM* (0,015). Risultano particolarmente significativi tutti i confronti a coppia con *BR*, *LI*, *SM*, ed inoltre tra *AN/GE* (Tab. IV).

Tabella IV - Confronti a coppia degli indici F_{ST} (sotto la diagonale) e Distanza genetica (sopra la diagonale); in neretto: i confronti più significativi (per le abbreviazioni, vedi Tab. I).

	<i>A.M.P.AC</i>	<i>AN</i>	<i>AU</i>	<i>BR</i>	<i>GE</i>	<i>LI</i>	<i>A.M.P.PL</i>	<i>RI</i>	<i>SM</i>	<i>TP</i>
<i>A.M.P.AC</i>	-	0,003	0,001	0,01	0,001	0,004	0,001	0,002	0,008	0,001
<i>AN</i>	0.024	-	0,003	0,011	0,003	0,006	0,003	0,003	0,010	0,003
<i>AU</i>	-0.009	0.059	-	0,008	0,001	0,004	0,001	0,001	0,008	0,001
<i>BR</i>	0.114	0.115	0.113	-	0,008	0,011	0,009	0,009	0,015	0,009
<i>GE</i>	0.052	0.090	0.012	0.110	-	0,004	0,001	0,001	0,008	0,001
<i>LI</i>	0.732	0.573	0.773	0.422	0.728	-	0,004	0,004	0,011	0,004
<i>A.M.P.PL</i>	-0.017	0.036	-0.025	0.111	0.029	0.741	-	0,002	0,008	0,002
<i>RI</i>	-0.006	0.064	-0.01	0.095	0.024	0.707	-0.003	-	0,008	0,002
<i>SM</i>	0.803	0.647	0.842	0.463	0.799	0.866	0.812	0.783	-	0,008
<i>TP</i>	0.933	0.881	0.944	0.797	0.933	0.933	0.936	0.928	0.945	-

L'analisi AMOVA condotta nei tre gruppi (popolazioni siciliane-popolazioni adriatiche-popolazioni tirreniche) ha mostrato una variazione molto elevata (81%) tra le popolazioni all'interno dei gruppi; l'analisi AMOVA ripetuta suddividendo le popolazioni in due gruppi est – ovest, sebbene abbia indicato una elevata variazione tra le popolazioni all'interno dei gruppi (64%), ha,

comunque, evidenziato un aumento della variazione tra i gruppi (9%) rispetto all'analisi precedente (Tab. V).

Tabella V - Analisi AMOVA a) nei tre gruppi su base geografica (siciliane – adriatiche – tirreniche); b) nei due gruppi su base della collocazione est - ovest

a)	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
	Among groups	2	42.942	-0.194 Va	-9.56
	Among population within groups	7	234.513	1.646 Vb	81.13
	Within populations	190	109.600	0.577 Vc	28.43
	Total	199	387.055	2.029	

b)	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
	Among groups	1	47.918	0.200 Va	9.17
	Among population within groups	8	229.537	1.406 Vb	64.40
	Within populations	190	109.600	0.577 Vc	26.43
	Total	199	387.055	2.183	

Il test di Mantel ha indicato significative correlazioni tra la matrice delle distanze genetiche e la matrice delle distanze “in linea d’aria” ($R=0,28$, $p=0,001$) e “via mare” ($R=0,42$, $p=0,03$), indicando che all’aumentare della distanza geografica aumenta la distanza genetica tra le popolazioni esaminate.

4.1.4. TEST DI NEUTRALITÀ E MISMATCH ANALYSIS

I risultati dell'analisi Mismatch e del test di neutralità suggeriscono che le popolazioni di *AN*, *AU*, *A.M.P.PL*, *RI*, seguono un modello di evoluzione non neutrale, avendo probabilmente subito una espansione demografica; le popolazioni di *LI* e *SM* sembrano seguire un modello di evoluzione neutrale, supportato dai valori significativi di SSD, che rigettano l'ipotesi di una espansione demografica improvvisa (Tab. VI).

Tabella VI – Analisi mismatch e test di neutralità nelle 10 popolazioni (per le abbreviazioni, vedi Tab. I). $p(SSD)$ = p-value sum of squared deviation; $p(hg)$ = p-value Harpending's raggedness index. Tra parentesi: p-value dell'indice D di Tajima's e dell'indice F_s di Fu

	Sudden-expansion model		Tajima's D	Fu's F_s test
	$p(SSD)$	$p(hg)$		
<i>A.M.P.AC</i>	0,145	0,321	-1,319 (0,093)	-1,166 (0,091)
<i>AN</i>	0,776	0,928	-1,229 (0,098)	-3,013 (0,032)
<i>AU</i>	0,263	0,670	-1,457 (0,063)	-2,199 (0,004)
<i>BR</i>	0,172	0,419	-0,749 (0,226)	1,477 (0,771)
<i>GE</i>	0,962	0,806	-1,441 (0,064)	-0,674 (0,230)
<i>LI</i>	0,043	0,103	0,352 (0,776)	0,721 (0,476)
<i>A.M.P.PL</i>	0,698	0,810	-2,036 (0,002)	-2,978 (0,012)
<i>RI</i>	0,731	0,778	-1,359 (0,082)	-3,046 (0,003)
<i>SM</i>	0,025	0,094	0,621 (0,756)	-1,009 (0,176)
<i>TP</i>	0,680	0,783	-1,410 (0,076)	2,738 (0,918)

4.2 ANALISI DEI CONTAMINANTI E APPROCCIO MULTIMARKER

4.2.1. ANALISI CHIMICA DEI BIOTOPPI

I valori delle concentrazioni dei metalli nei sedimenti sono stati confrontati con i valori di Cd, Cr, Hg, Pb, Ni, stabiliti dal Decr. Min. Amb. n. 367/2003. Da tale confronto emerge che, nei siti di *AU* e *SM*, la presenza di Hg supera i limiti normativi; analogamente, in *GE* le concentrazioni di Cr, Pb e Ni sono superiori alla soglia fissata, così come i valori di Pb a *TP* e di Cr e Ni a *LI* (Fig. 7 e Tab. VII).

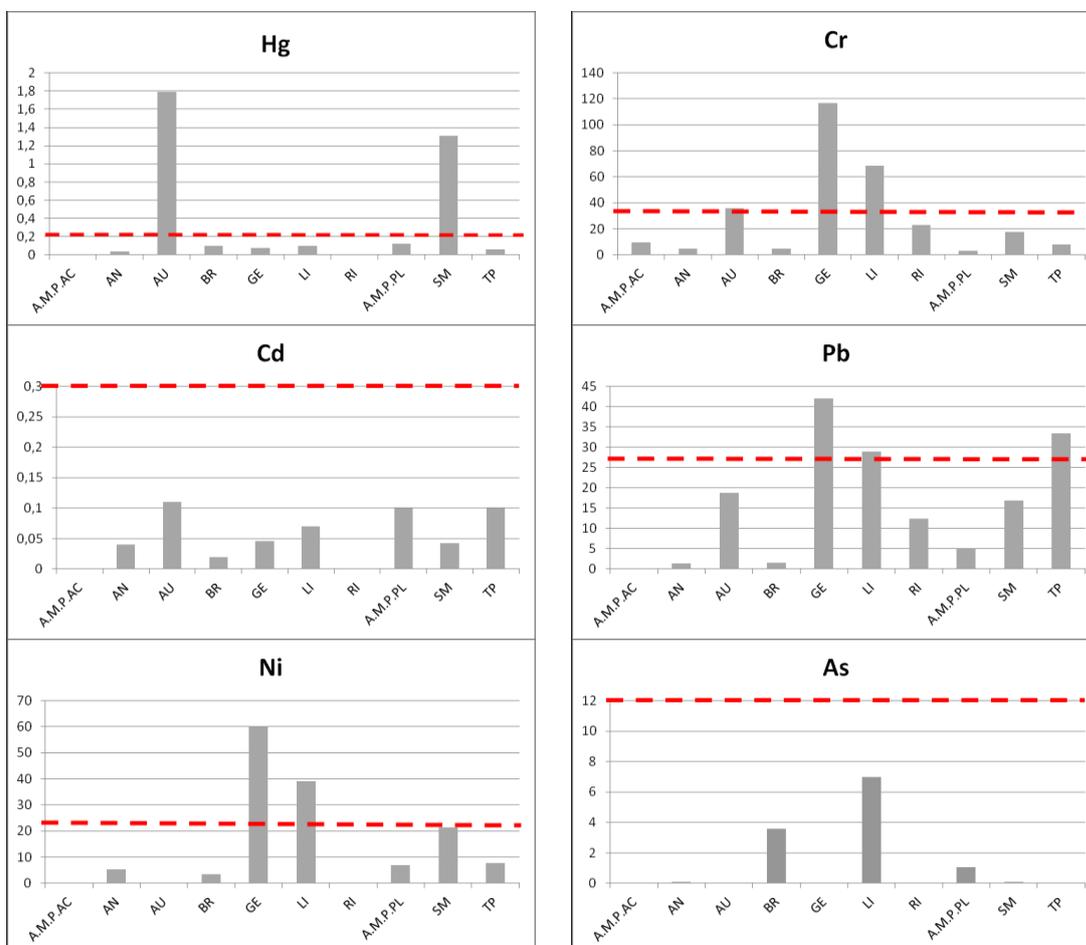


Figura 7 - Valori della concentrazione di alcuni metalli nei sedimenti; in tratteggiato: limite stabilito dal Decreto Ministeriale n. 367/2003

Tabella VII - Analisi chimiche dei sedimenti; valori soglia indicate nel Decreto del Ministero Ambiente e Tutela del Territorio n.367/ 2003; valori riportati nella guida alla valutazione della qualità dei sedimenti marini fornita dall'EPA (SQG-EPA; MacDonald, D.D., 1994)
in rosso: valori superiori al Decreto del Ministero Ambiente e Tutela del Territorio n.367/ 2003; in grassetto: valori più elevati per singolo elemento; TEL: valori al di sotto dei quali non ci si aspettano effetti avversi; PEL: valori al di sopra dei quali ci si aspettano effetti avversi; NC non contaminato; MC moderatamente contaminato; HC altamente contaminato; #: valori superiori a valori PEL; \$: valori superiori a valori HC; n.d.: non disponibile.
(tutte le concentrazioni sono espresse in mg/kg)

	ANALISI CHIMICA DEI BIOTOPPI											Valori Soglia	SQG- EPA				
	A.M.P.AC	AN	AU	BR	GE	LI	A.M.P.PL	RI	SM	TP			TEL	PEL	NC	MC	HC
Hg	<0,006	0,04	1,79 \$	0,1	0,07	0,1	0,12	<0,006	1,31 \$	0,06	0,3	0,13	0,7				
Cr	9,76	4,8	35,9	4,7	116 #	68,5	3,41	22,9	17,6	7,87	50	52,3	160	<25	25 - 75	>75	
Cd	0,001	0,04	0,11	0,02	0,05	0,07	0,1	<0,013	0,04	0,1	0,3	0,68	4,21	/	/	>6	
Pb	0,25	1,5	18,7	1,5	42,1	29	5,15	12,4	16,8	33,4	30	30,2	112	<40	40 - 60	>60	
Ni	n.d.	5,23	14,5	3,4	60,2 # \$	39	6,99	n.d.	21,4	7,73	30	156	42,8	<20	20 - 50	>50	
As	<0,013	0,08	<0,013	3,6	0,02	7	1,04	<0,013	0,09	0,002	12						
Mn	n.d.	155	n.d.	n.d.	202	n.d.	119	n.d.	254	63,5							
Co	n.d.	1,69	n.d.	n.d.	4,8	n.d.	2,06	n.d.	3,77	1,18							
Al	n.d.	1450	n.d.	n.d.	5172	n.d.	1288	n.d.	7829	4743							
Cu	n.d.	0,93	n.d.	0,7	6,35	57 #	1,87	n.d.	10,3	17,2		18,7	108	<25	25 - 50	>50	
Zn	n.d.	2,71	n.d.	1,2	11,9	48	2,19	n.d.	18,5	21,4		124	271	<90	90 - 200	>200	
V	n.d.	4,60	n.d.	n.d.	12,4	n.d.	16,5	n.d.	26	9,75							
Sb	n.d.	0	n.d.	n.d.	0,18	n.d.	0,26	n.d.	048	0,3							
Fe	n.d.	3239	n.d.	n.d.	10241	n.d.	6035	n.d.	13999	6594							
ΣIPA	0,045	n.d.	2,42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,007	n.d.	n.d.	0,2						

I valori delle concentrazioni dei metalli non inclusi nel Decr. Min. Amb. n.367/2003, in *SM* sono più elevati per quanto riguarda Mn, Al, V, Sb e Fe; in *LI* per Cu e per Zn, mentre, il Co si trova in concentrazione maggiore in *GE*, rispetto agli altri siti. I dati sulla concentrazione totale di IPA nei sedimenti, indicano che in *AU* è presente una concentrazione molto elevata, superiore ai limiti imposti dal Decr. N. 367/2003 (Tomasello et al., 2012). Prendendo in esame la tabella SQG-EPA si evince che *GE* è un sito altamente contaminato da Cr e Ni; in particolare, la concentrazione di Ni è tale da causare, potenzialmente, effetti avversi. In *AU* e in *SM* vi è una moderata contaminazione, rispettivamente da Cr e da Ni; mentre la presenza di Hg, in questi due siti di campionamento, è superiore alla soglia sopra la quale ci si aspettano effetti avversi. Infine, nel sito di *LI* vi è una moderata contaminazione da Cr e Ni ed una elevata contaminazione da Cu (Tab. VII).

4.2.2. BIOACCUMULO DEI METALLI NEL MUSCOLO

Il Test ANOVA “one-way”, applicato alle dieci popolazioni prese in esame, mostra valori altamente significativi ($p < 0,001$) per le concentrazioni di Pb, Cr, As nel muscolo degli esemplari (Tab. 8a). Il T di Student applicato alle concentrazioni di ciascun metallo (Pb, Cd) indicati nel Regolamento CE n. 1881/2006 mostra che per quanto riguarda il Cd, sono altamente significativi ($p < 0,001$), la maggiorparte dei confronti tra *AU* e le altre popolazioni (*AN*, *GE*, *A.M.P.PL*, *TP*). Per quanto riguarda le concentrazioni di Pb, risultano altamente significativi la maggiorparte dei confronti tra *A.M.P.AC* e le altre popolazioni (*AN*, *A.M.P.PL*, *RI*, *TP*), così come i confronti *AU/RI*, *AU/TP* (Tab. 8b).

Tabella VIII – a) Test ANOVA one-way applicato ai valori delle concentrazioni dei metalli nelle dieci popolazioni. b) Test T di Student applicato alle concentrazioni di ciascun metallo indicato nel Reg. CE n. 188172006; al di sotto della diagonale, i confronti relativi al Cd; al di sopra della diagonale, i confronti relativi al Pb.

***: confronto altamente significativo ($p < 0,001$); **: confronto mediamente significativo ($p < 0,01$); *: confronto significativo ($p < 0,05$); n.s.: confronto non significativo.

a)

	Significatività
Pb	***
Cd	n.s.
Cr	***
As	***
Mn	n.s.
Cu	n.s.
Co	n.s.
Ni	n.s.
Se	n.s.
V	n.s.
Zn	n.s.

b)

	<i>A.M.P.(AC)</i>	<i>AN</i>	<i>AU</i>	<i>GE</i>	<i>A.M.P.(PL)</i>	<i>RI</i>	<i>SM</i>	<i>TP</i>
<i>A.M.P.(AC)</i>	-	***	*	n.s.	***	***	*	***
<i>AN</i>	n.s.	-	*	*	n.s.	*	n.s.	n.s.
<i>AU</i>	**	***	-	n.s.	n.s.	***	n.s.	***
<i>GE</i>	n.s.		***	-	*	**	n.s.	**
<i>A.M.P.PL</i>	n.s.	n.s.	***	n.s.	-	ns	n.s.	n.s.
<i>RI</i>	*	**	n.s.	*	*	-	*	n.s.
<i>SM</i>	*	*	**	n.s.	n.s.	*	-	*
<i>TP</i>	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	**	n.s.	-

Dal confronto fra i valori del bioaccumulo di Pb, Cd e Hg con i valori soglia stabiliti dal suddetto Regolamento, emerge che i valori della concentrazione di Hg in *A.M.P.AC* superano il limite normativo. Per quanto riguarda le concentrazioni di Pb, la soglia stabilita dal Reg. CE viene superata in *A.M.P.AC*, *AU*, *GE*, *SM*; in *RI* i valori, seppur elevati, non superano i limiti normativi. Nelle popolazioni di *AN* e *A.M.P.PL*, sebbene la media del bioaccumulo di Pb sia sotto i limiti normativi, tali soglie sono superate, rispettivamente, nel 22% e 20% degli individui esaminati (Fig. 8 e Tab. IX).

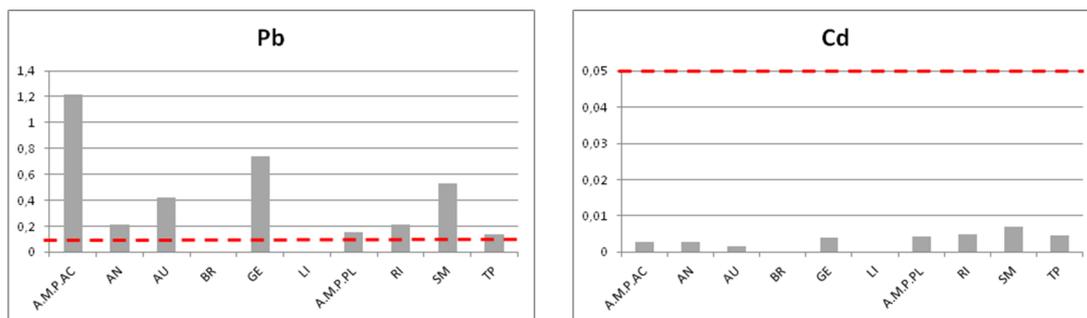


Figura 8 - Valori del bioaccumulo di Pb E Cd; in tratteggiato: limite fissato dal Regolamento EU 1881/2006

Le concentrazioni dei metalli non inclusi nel Reg. CE 1881/2006 presentano indicazioni quanto segue: 1) in A.M.P.AC i valori più elevati per As e V; 2) in AU per Cr; 3) in GE per Zn; 4) in RI per Mn, Co, Ni; 5) in TP per Cu (Tab. IX).

Tabella IX – Valori medi del bioaccumulo dei metalli (esprese in mg/Kg); in rosso: valori superiori ai limiti del Regolamento CE n.1881 del 19 Dicembre 2006; n.d.: non riportato; in grassetto: valori più alti per singolo elemento (per le abbreviazioni, vedi Tab. I)

	A.M.P.AC	AN	AU	BR	GE	LI	A.M.P.PL	RI	SM	TP	1881/2006
Pb	1,22	0,21	0,42	n.d.	0,74	n.d.	0,15	0,21	0,53	0,14	0,3
Cd	0,003	0,003	0,001	n.d.	0,004	n.d.	0,004	0,005	0,007	0,005	0,05
Hg	0,31	n.d.	0,32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,5
Cr	0,63	0,57	1,71	n.d.	0,54	n.d.	0,5	0,41	0,59	0,49	
As	12,3	3,2	1,7	n.d.	2,4	n.d.	7,3	2,05	3,43	5,47	
Mn	3,06	0,74	0,41	n.d.	0,51	n.d.	0,92	3,27	1,93	0,84	
Cu	1,22	0,58	0,34	n.d.	0,67	n.d.	0,45	0,94	0,57	1,26	
Co	0,04	0,04	0,01	n.d.	0,02	n.d.	0,02	0,16	0,04	0,02	
Ni	0,21	0,18	0,06	n.d.	0,14	n.d.	0,13	0,35	0,14	0,21	
Se	0,27	0,45	0,15	n.d.	0,44	n.d.	0,62	0,29	0,31	0,40	
V	0,34	0,17	0,02	n.d.	0,16	n.d.	0,23	0,28	0,21	0,25	
Zn	37,5	28,5	13,8	n.d.	55,5	n.d.	41,6	25,4	29,6	34,9	

I valori del bioaccumulo sono stati utilizzati per calcolare l'Indice IMBI; il valore maggiore si riscontra nei campioni del sito di AU, mentre il valore più basso si riscontra nel sito di RI. L'analisi ANOVA "one-way" seguita dal test post hoc di Tuckey sui dati ottenuti dall'Indice IMBI, indica che i valori del bioaccumulo nel

sito di *AU* sono significativi sia rispetto *GE*, *AC*, *A.M.P.PL*, *AN* ($p < 0.05$) che *TP*, *RI*, *SM* ($p < 0,001$) (Fig. 9).

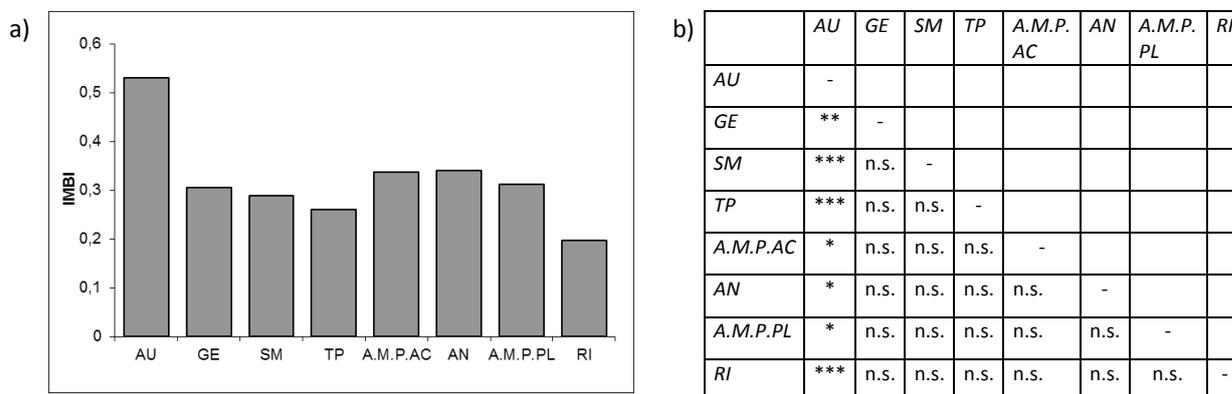


Figura 9 - a)Indice Medio Bioaccumulo Individuale (IMBI); b) risultati del test ANOVA one way.
 ***: confronto altamente significativo ($p < 0,001$); *: confronto significativo ($p < 0,05$); n.s.: confronto non significativo (per le abbreviazioni, vedi Tab. I).

Sulla base dei dati indicati dall'analisi chimica dei biotopi e dal bioaccumulo dei metalli nel muscolo, è possibile separare le 10 popolazioni in due gruppi: GRUPPO 1 - (*AU*, *GE*, *LI*, *SM*, *TP*) in cui vengono superati i limiti normativi almeno in uno dei due casi; GRUPPO 2 - (*A.M.P.AC*, *AN*, *BR*, *A.M.P.PL*, *RI*) in cui la presenza di metalli si mantiene al di sotto della soglia stabilita dalla legge (Tabella X).

Tabella X – Siti appartenenti al GRUPPO 1 e al GRUPPO 2

GRUPPO 1 -		GRUPPO 2 -	
Sito	Codice	Sito	Codice
Augusta	<i>AU</i>	A.M.P. "Isola dei Ciclopi"	<i>A.M.P.AC</i>
Rapallo	<i>GE</i>	Cupra marittima	<i>AN</i>
Livorno	<i>LI</i>	Brindisi	<i>BR</i>
Santa Marinella	<i>SM</i>	A.M.P. "Plemmirio"	<i>A.M.P.PL</i>
Trapani	<i>TP</i>	Riposto	<i>RI</i>

L'analisi AMOVA, ottenuta distinguendo le popolazioni del GRUPPO 1 da quelle del GRUPPO 2, ha evidenziando una maggiore variazione, pari al 71%, tra le popolazioni all'interno dei gruppi, piuttosto che tra i gruppi (0,92%) (Tab. XI).

Tabella XI - Analisi AMOVA nei due GRUPPI

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance Components	Percentage of variation
Among groups	1	32,545	0,019 Va	0,92
Among populations within groups	8	244,910	1,502 Vb	71,58
Within populations	190	109,600	0,577 Vc	27,49
Total	199	387,055	2,098	

4.2.3. DANNO AL DNA

A) TEST DEI MICRONUCLEI

Le percentuali maggiori sia di micronuclei e di anomalie nucleari sono state riscontrate in due siti di *AU* e *GE*; mentre le percentuali minori di micronuclei e anomalie nucleari sono presenti, rispettivamente, nei campioni di *RI* (GRUPPO 2) e di *TP* (GRUPPO 1) (Fig. 10). Il Test T di Student ha rivelato che le percentuali sia di micronuclei che di anomalie nucleari in *AU* e *GE* sono significativamente elevati ($p < 0,005$) rispetto i restanti siti di campionamento.

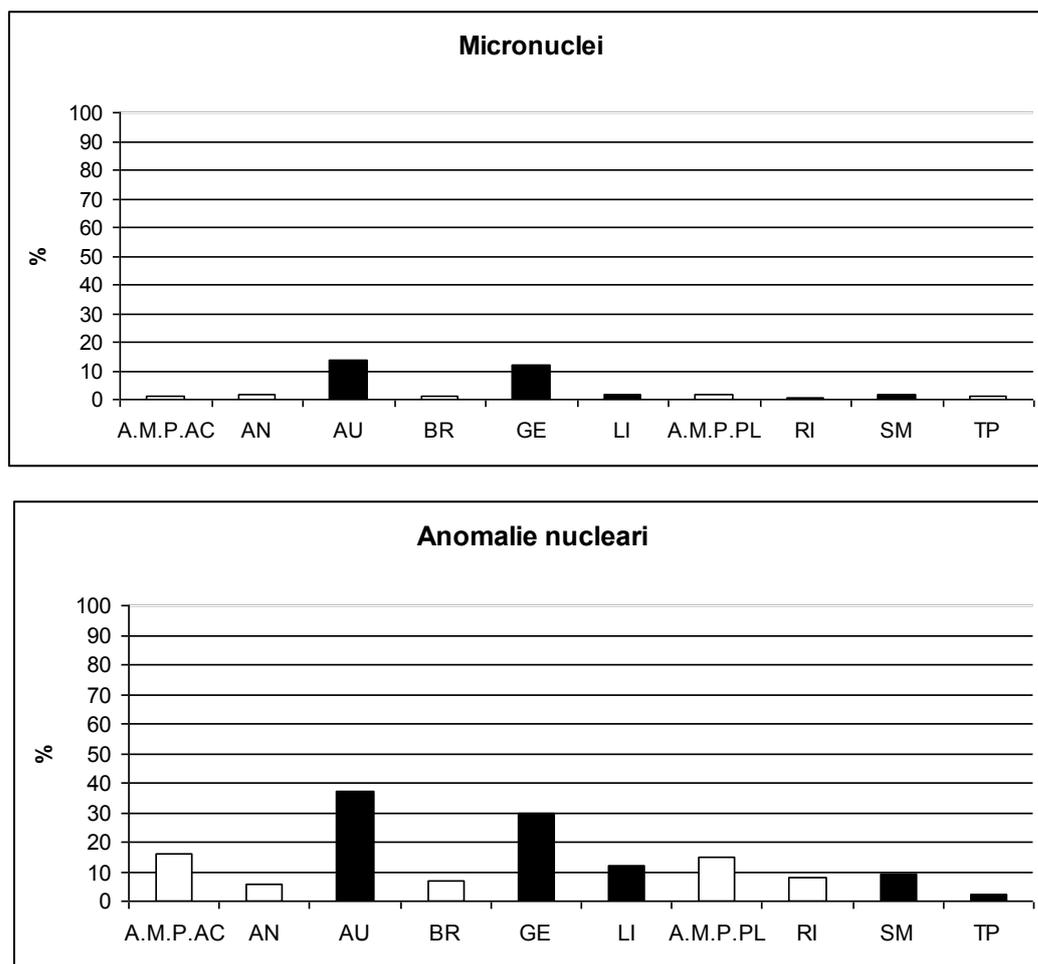


Figura 10 – Percentuali (%) di Micronuclei e di Anomalie Nucleari rilevate negli eritrociti degli esemplari esaminati (per le abbreviazioni, vedi Tab. I).
 In nero: GRUPPO 1 e in bianco: GRUPPO 2 (vedi Tab. IX).

B) COMET ASSAY

Il test Comet ha rilevato una maggiore frammentazione negli eritrociti e negli epatociti di *AU* (sito in cui sono superati i limiti legislativi), sia per quanto riguarda il danno totale, sia per quanto riguarda il danno ossidativo; inoltre, per quanto riguarda le cellule del sangue, il danno minore (sia come danno totale sia come danno ossidativo) si riscontra nell'*A.M.P.AC* (sito incluso tra quelli in cui non vengono superati i limiti dei Decreti), mentre per le cellule del fegato la minore frammentazione del DNA si rileva in *RI* (GRUPPO 2) (Fig. 11).

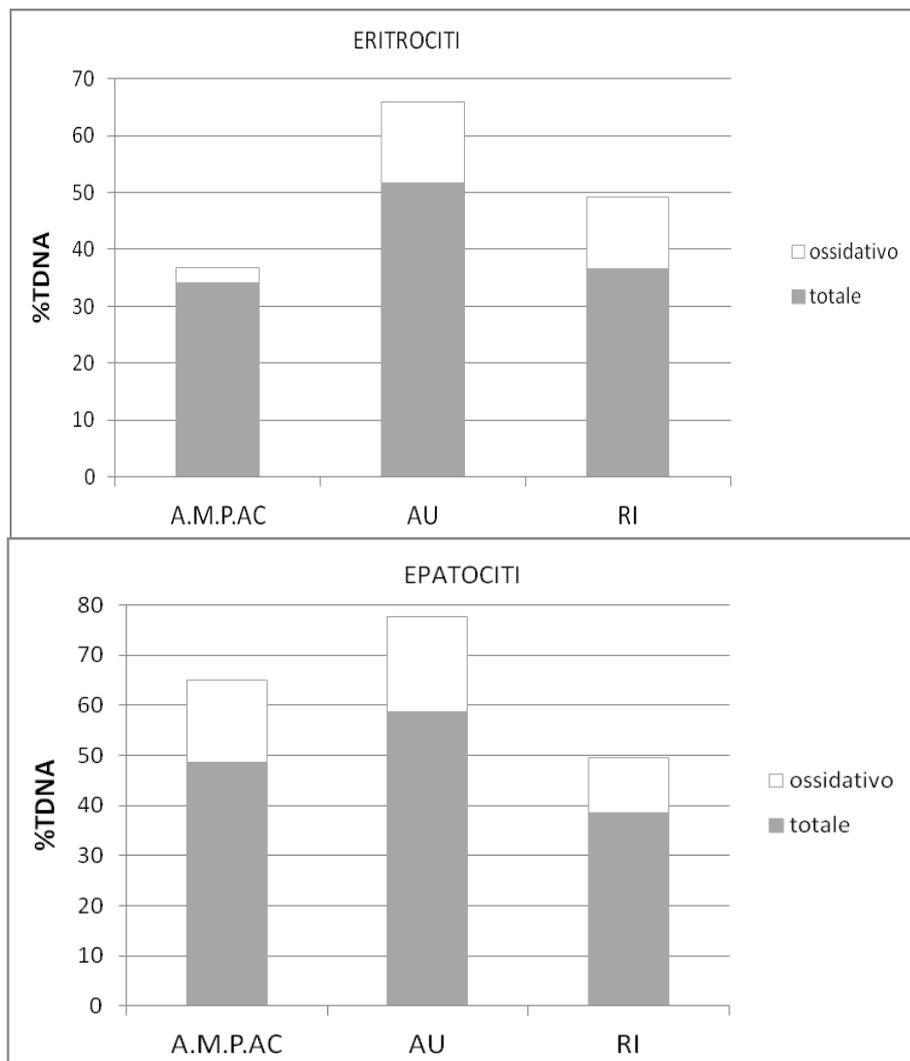


Figura 11 - Test Comet effettuato negli eritrociti e negli epatociti degli esemplari esaminati; da Tigano et al. (2009) (per le abbreviazioni, vedi Tab. I)

4.2.4. VARIABILITA' GENETICA E CONTAMINANTI

Nei due gruppi di popolazioni presi in esame il GRUPPO 1 (AU, GE, LI, SM, TP), presenta, nella maggiorparte, dei casi una variabilità nucleotidica, aplo tipica e un numero di aplotipi con valori piuttosto bassi (h da 0,27 a 0,67; π da 0,0008 a 0,0013; n da 3 a 5); in questo GRUPPO le due popolazioni di LI e SM presentano valori di variabilità genetica più elevati. Le due Aree Marine Protette (A.M.P.AC, A.M.P.PL), pur appartenendo al GRUPPO 2 in cui il grado di inquinamento risulta

più moderato, presentano una variabilità nucleotidica, aplotipica e numero di aplotipi con valori bassi (Tab XII).

Tabella XII - Numero di aplotipi (n) , diversità aplotipica (h) nucleotidica (π) nei due gruppi (per le abbreviazioni, vedi Tab. I)

GRUPPO 1	n	h	π
<i>SM</i>	5	0,6737	0,001292
<i>LI</i>	3	0,5895	0,00172
<i>TP</i>	5	0,4620	0,002673
<i>GE</i>	4	0,4368	0,001477
<i>AU</i>	4	0,2714	0,00077

GRUPPO2	n	h	π
<i>AN</i>	9	0,8224	0,012169
<i>BR</i>	7	0,8211	0,005034
<i>RI</i>	7	0,5217	0,001763
<i>A.M.P.AC</i>	5	0,4927	0,001427
<i>A.M.P.PL</i>	7	0,4867	0,001252

Nel GRUPPO 1 sono stati riscontrati valori elevati dei coefficienti di correlazione. Per quanto riguarda i metalli una correlazione negativa è stata rilevata tra gli indici di variabilità genetica e le concentrazioni di alcuni metalli nel muscolo; in particolare con Cr ($R^2=0,53$ e $0,48$) (fig. 12a e b) e Co ($R^2=0,53$) (fig. 12c). Diversamente, è presente una correlazione positiva tra uno dei due indici di variabilità genetica e bioaccumulo nel muscolo di Cd, Co, Mn e Cu (fig. 12 d, e, f, g).

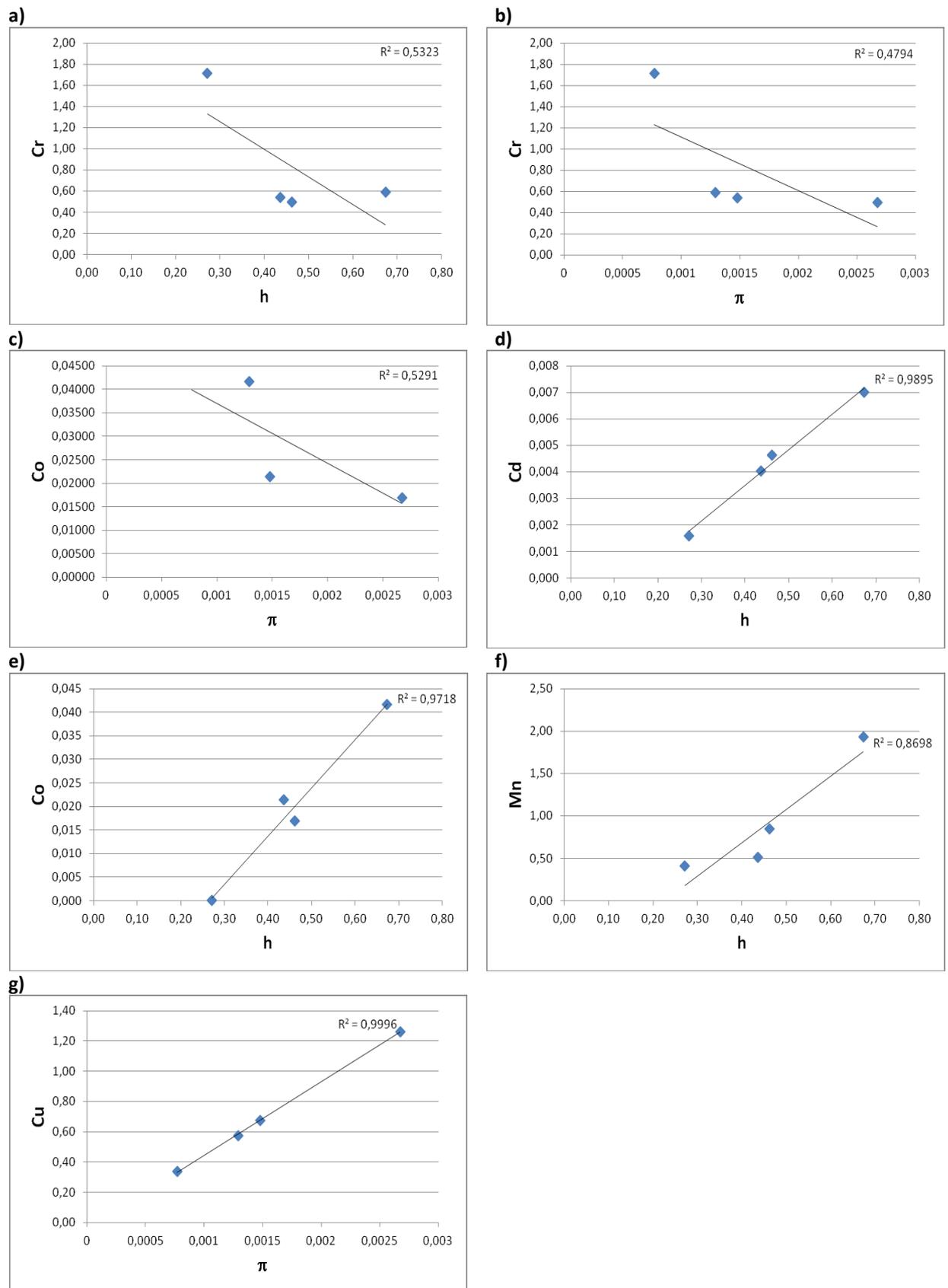


Figura 12 – Regressione lineare tra variabilità genetica e bioaccumulo di alcuni metalli.

Una correlazione negativa è stata sempre trovata tra gli indici di variabilità genetica e le percentuali di Micronuclei ($R^2=0,65$ e $0,52$) (fig. 13a e b) e di Anomalie Nucleari ($R^2=0,44$ e $0,61$) (fig. 13c e d).

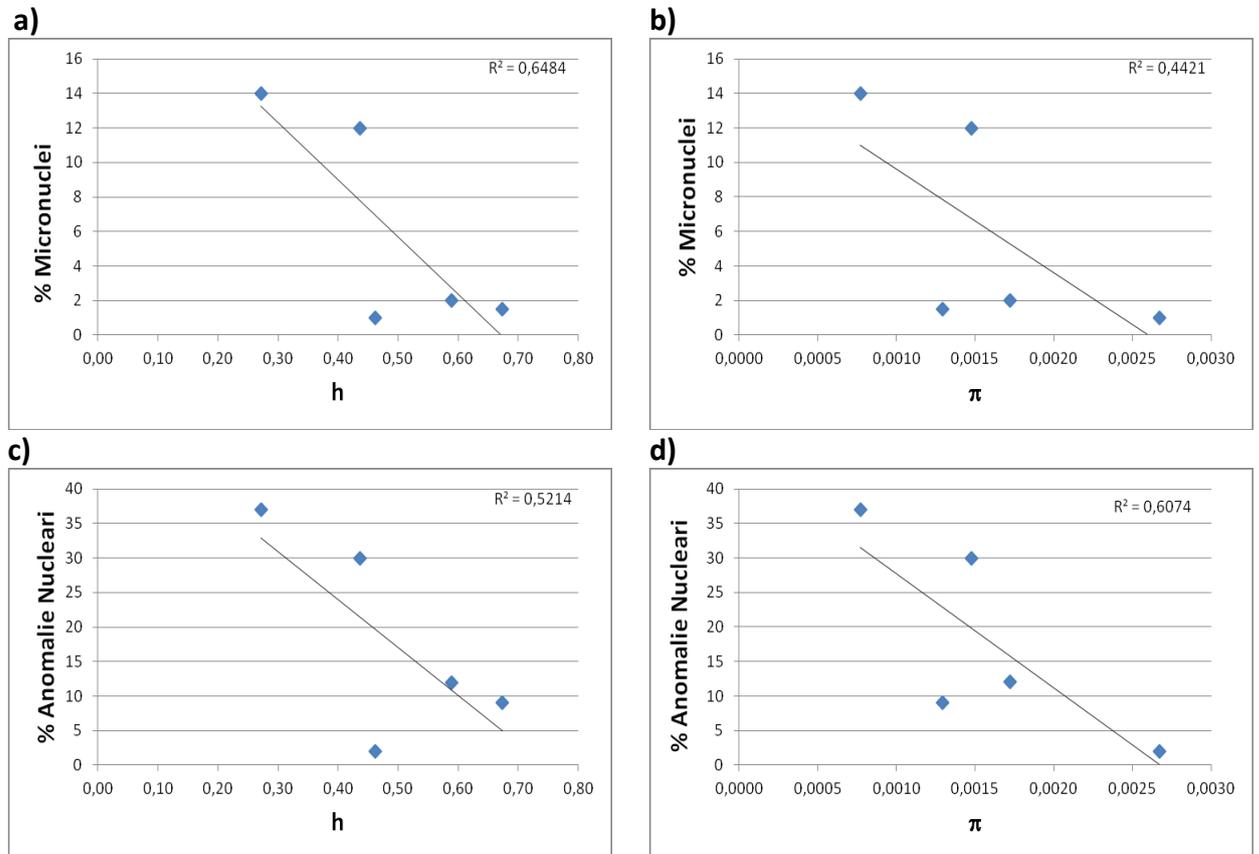


Figura 13 - Regressione lineare tra variabilità genetica e le percentuali di micronuclei ed anomalie nucleari negli eritrociti.

Diversamente per i siti del GRUPPO 2 non esiste alcuna correlazione tra gli indici di variabilità genetica e le concentrazioni dei metalli bioaccumulo, né con le percentuali di micronuclei e anomalie nucleari.

5. DISCUSSIONE

5.1. ANALISI MOLECOLARE

Almada et al. (2001) suggeriscono che gli eventi di speciazione, che hanno portato all'attuale fauna di Blennidi del Mediterraneo e dell'adiacente Atlantico, sarebbero relativamente recenti essendosi verificati durante il Pleistocene. Tale affermazione si basa sull'ipotesi che le isole dell'Atlantico, le coste tropicali dell'Africa nonché le aree del Mediterraneo meridionale hanno costituito aree di rifugio durante i periodi glaciali. La successiva dispersione da tali rifugi ha determinato il differenziamento dei Blennidi che attualmente occupano le coste occidentali dell'Africa e le isole Atlantiche (Azzorre, Madeira e Canarie) nonché il Mediterraneo e le adiacenti coste dell'Atlantico europeo (Domingues et al., 2007).

Lo studio ora condotto ha indicato che *P. sanguinolentus* presenta una forte strutturazione genetica ($F_{st}=0,72$); tale valore, piuttosto elevato, non è frequente in ambiente marino e in specie caratterizzate da uno stadio larvale planctonico. Tuttavia, il comportamento di homing dimostrato per questa specie (Gibson, 1999) e le caratteristiche biologiche della larva con dispersione "inshore" (Raventos e Macpherson, 2001; Macpherson e Raventos, 2006), potrebbero giustificare l'elevato livello di strutturazione genetica. Diversamente, Francisco et al. (2006) non hanno rilevato alcuna strutturazione genetica ($F_{st}=-0,0017$) nel Blenniidae *Lipophrys pholis* proveniente da tre popolazioni portoghesi, indicando, come possibile motivazione che la larva pur avendo anch'essa una diffusione di tipo "inshore", potrebbe essere condizionata dalla presenza nei siti

di campionamento di due grandi correnti oceaniche che determinerebbe un incremento del flusso genico causato proprio dalla dispersione larvale.

I dati ora ottenuti su *P. sanguinolentus* mostrano bassi valori di variabilità genetica, la diversità aplotipica e nucleotidica varia dai valori più elevati di *AN* (h : 0,82 e π : 0,012) a quelli più bassi di *AU* (h : 0,27 e π : 0,00077). Tali dati concordano con quelli riportati da Domingues et al. (2008b) in una popolazione di *P. sanguinolentus* dove i valori di diversità aplotipica (h) e nucleotidica (π), relativi al Dloop, sono, rispettivamente, a 0,6 e 0,001 e da Domingues et al. (2007) in quattro popolazioni mediterranee di *Coryphoblennius galerita* (h : da 0,33 a 0,66; π : da 0,005 a 0,055); diversamente, valori più elevati di indici di variabilità sono stati riscontrati in specie di Blennidi provenienti dall'Atlantico, in particolare, in *P. parvicornis* (h : da 0,74 a 0,99; π : 0,002 a 0,005) (Domingues et al., 2008b), in *Lipophrys pholis* (h : 0,99; π : 0,03) (Francisco et al., 2006 e 2011) e in due specie di *Ophioblennius* (h : da 0,42 a 1,00; π : da 0,001 a 0,013) (Muss et al., 2001). Inoltre, la bassa variabilità genetica ora riscontrata in *P. sanguinolentus* trova conferma nel fatto che circa il 60% degli esemplari esaminati condivide tre aplotipi di cui uno ampiamente rappresentato (46,76% dei campioni).

Per quanto riguarda la divergenza genetica, i valori ora riscontrati sono piuttosto bassi (da 0,0010 a 0,015); anche Almada et al. (2009) riportano per il genere *Salaria*, strettamente correlato a *Parablennius* (Almada et al., 2005a), bassi livelli di divergenza genetica in *S. pavo*; tali valori vengono attribuiti ad un drastico evento di bottleneck probabilmente verificatosi nell'ultima glaciazione (Dias et al., 1997; Loncaric et al., 1998); in particolare, le temperature non adatte alla

riproduzione di questa specie e le sue peculiari esigenze per quanto riguarda l'habitat ne avrebbero determinato l'estinzione nell'Atlantico e la sua sopravvivenza nelle aree più calde del Mediterraneo. Gli Autori, inoltre, ipotizzano che la bassa divergenza potrebbe essere stata causata da un elevato flusso genico, che giustificherebbe, in tal caso, la mancanza di un pattern geografico di distribuzione della variazione, come riscontrato anche in *P. sanguinolentus*. I risultati del test di Mantel indicano nelle dieci popolazioni ora esaminate correlazione tra la distanza geografica e la distanza genetica. Tuttavia, alcuni dati sono contraddittori; un esempio è il valore della divergenza genetica tra BR e AN che risulta significativamente elevato, pur essendo questi siti relativamente vicini e posti lungo lo stesso versante adriatico. Zardoya et al. (2004) spiegano risultati simili ottenuti per il genere *Scomber* del mar Adriatico che sono da attribuire alla peculiare idrografia di questo mare ed il modello delle correnti; in particolare, gli Autori sostengono che la presenza di due forti correnti circolari abbia condotto alla separazione dell'Adriatico meridionale (in cui si trova BR) dall'Adriatico centrale e settentrionale (dove è localizzato AN), come pure dal resto del Mediterraneo (vedi figura in APPENDICE B). La presenza di tali "barriere" fisiche date dall'andamento delle correnti marine, potrebbe spiegare come possano essere significativi anche i confronti tra LI e SM con siti relativamente vicini.

Sebbene la maggiore percentuale di variazione resti tra le popolazioni all'interno dei gruppi, indicando la strutturazione delle popolazioni, il confronto dei risultati dell'analisi AMOVA tra i tre gruppi su base geografica (siciliane – adriatiche – tirreniche) e i due gruppi est – ovest (sulla base della collocazione dei siti di

campionamento) ha mostrato un trend nel differenziamento con una maggiore percentuale di variazione tra i gruppi est – ovest. Differenze genetiche tra la parte occidentale ed orientale del Mediterraneo sono state osservate in alcuni pesci marini (Bahri-Sfar et al., 2000; Stefanni e Thorley, 2003; Zardoya et al., 2004); tali differenze vengono spiegate sulla base del regime idrografico del bacino (Astraldi et al., 1999; Béranger et al., 2004). La batimetria delle aree attorno lo stretto siculo-tunisino è molto complessa ed esercita una forte influenza sulle masse d’acqua che lo attraversano, causando la formazione di correnti locali che creano una miscelazione turbolenta dei corpi idrici di questo braccio di mare; tale modello idrografico, quindi, potrebbe limitare la dispersione naturale delle specie attraverso lo stretto siculo-tunisino, permettendo una progressiva differenziazione genetica delle specie ed esercitando una forte influenza sui meccanismi che contrastano il flusso genico. Inoltre, le oscillazioni climatiche verificatesi durante il periodo Plio-Pleistocenico determinarono variazioni cicliche del livello del mare e della temperatura superficiale delle acque (Lambeck et al., 2002) che influenzarono significativamente la connessione fisica tra le masse d’acqua occidentali e orientali e le popolazioni delle specie che vi vivevano (Mejri et al., 2009).

5.2 ANALISI DEI CONTAMINANTI E APPROCCIO MULTIMARKER

Nel biomonitoraggio degli ecosistemi acquatici l’approccio multimarker permette di ottenere un quadro esauriente della qualità dell’ambiente insieme ai dati forniti dalle analisi chimico-fisiche dei biotopi presi in esame (Ferrito et al., 2008).

Dai dati ottenuti nei dieci siti esaminati emerge che la concentrazione di Pb nei sedimenti è significativamente più elevata rispetto a tutti gli altri metalli. Inoltre, si osserva un'elevata contaminazione da metalli (Cr, Pb, Ni) nei sedimenti del sito di *GE* che potrebbe essere attribuita ad attività connesse al porticciolo turistico presente in questo sito. Analogamente, la notevole contaminazione di Hg e IPA nel sito di *AU* (Pulvirenti et al., 2012) potrebbe derivare dall'intensa attività petrolchimica del porto. Per quanto riguarda il sito di *LI*, i livelli di concentrazione di Cr e Ni qui ottenuti sono in accordo con quelli riportati da Lafabrie et al. (2007) e potrebbero essere conseguenza della presenza degli impianti chimici della vicina (15 Km) Rosignano. Le concentrazioni dei metalli nei sedimenti dei dieci siti esaminati, sebbene in alcuni casi molto elevati, rientrano nel range dei valori riportati per il bacino del Mediterraneo (Alomary e Belhadj, 2007; Benamar et al., 1999; Bernardello et al., 2006; Caredda et al., 1999; Feldstein et al., 2003; Mzoughi e Chouba, 2011). Anche i valori di bioaccumulo del Pb nelle dieci popolazioni rientrano nei valori riportati in pesci demersali del Mediterraneo (Giorgi et al., 2009; Storelli e Marcotrigiano, 2005; Tepe et al., 2009). In alcuni casi i dati riguardanti il bioaccumulo del Pb sono concordanti con le concentrazioni rilevate nei sedimenti (ad esempio, *GE*). Invece, per quanto riguarda *A.M.P.AC* si riscontrano discordanze tra i dati delle analisi chimiche del biotopo e quelli del bioaccumulo, infatti, pur essendo un sito scarsamente inquinato da metalli, la concentrazione media di Pb nel muscolo è la più elevata; tale contaminazione potrebbe derivare dalle attività legate al porto turistico e peschereccio presente in questo sito. Inoltre, appare interessante la situazione riscontrata nel sito di *AU* dove i valori dell'Indice Medio di Bioaccumulo

Individuale sono significativamente più elevati rispetto agli altri siti. In questa località, negli ultimi anni, è stata osservata una grave difficoltà nella reperibilità dei campioni, che associata alla sensibile riduzione di diversità genetica ora riscontrata potrebbe avere compromesso, in accordo con Silbiger et al. (2001), la capacità di risposta ai cambiamenti ambientali degli organismi e, di conseguenza, la vitalità delle popolazioni. Il test Comet e il test dei micronuclei sono due strumenti molto utili per determinare il grado di frammentazione del DNA e, di conseguenza, la potenziale genotossicità degli inquinanti acquatici; infatti, la presenza di una più elevata contaminazione da metalli sia nei sedimenti sia nel muscolo in *AU* concorda con i dati del test Comet disponibili. Analogamente, diversi Autori (Hartl et al., 2007; Šrut et al., 2010; Tomasello et al., 2012) osservano una notevole frammentazione del DNA in esemplari di Teleostei catturati in ambienti particolarmente contaminati da metalli ed IPA. La maggiore frammentazione del DNA rilevata, attraverso il Test Comet, negli epatociti degli esemplari di *P. sanguinolentus* presi in esame rispetto agli eritrociti, potrebbe derivare dalla funzione di detossificazione svolta dal fegato, per cui gli inquinanti vi si accumulerebbero, causando effetti genotossici (Ingelman-Sundberg e Hagbjork, 1982; Lemaire et al, 1994). Le cellule circolanti sarebbero meno sensibili rispetto agli epatociti o alle cellule branchiali, in quanto gli eritrociti hanno una scarsa capacità di metabolizzazione ed un elevato turnover (Tomasello et al., 2012). Infine, le percentuali di micronuclei e di anomalie nucleari presenti negli eritrociti delle popolazioni di *AU* e *GE* sono in accordo con la contaminazione dei siti, così come riportato anche da Ali et al. (2008) e Saleh

(2010), i quali evidenziano che la presenza di micronuclei in diverse specie di Teleostei aumenti in siti inquinati.

Secondo Bickham (2011), un altro effetto dell'esposizione ai contaminanti, è la diminuzione della variabilità genetica. Questo è il caso delle popolazioni di *AU* e *GE* che presentano bassi valori di indici di variabilità genetica, in presenza di valori elevati di metalli nel muscolo degli esemplari dei due siti. Nelle popolazioni del GRUPPO 1 l'analisi della regressione lineare applicata tra i valori della diversità aplo-tipica e nucleotidica e la concentrazione dei metalli, quali Cr e Co, potrebbe essere in accordo con tale ipotesi. Appare, altresì, interessante la correlazione negativa riscontrata in questo GRUPPO tra diversità aplo-tipica e bioaccumulo di Cr ($R^2=0,53$), un metallo capace di indurre importanti effetti tossici, anche se non possono essere prevedibili le modalità con cui l'inquinante esplica la sua tossicità (Bickam, 2011). I dati sono in accordo con Matson et al. (2006) che (utilizzando come marcatore genetico il D-loop) hanno osservato che nelle popolazioni di *Rana ridibunda* (Pallas, 1771) di aree industriali altamente contaminate la diversità aplo-tipica è più bassa rispetto a quella riscontrata in aree incontaminate di riferimento. Analogamente, Maes et al. (2005) e Bourret et al. (2008) hanno indicato una ridotta variabilità genetica (valutata con l'utilizzo dei microsatelliti, quali marcatori genetici) rispettivamente, in *Anguilla anguilla* (L. 1758) e in *Perca flavescens* (L. 1758) che presentano elevate concentrazioni di metalli nel muscolo. Tuttavia, in altri studi (Berckmoes et al., 2005; Roark et al., 2005; McMillan et al., 2006) non sono riportati effetti significativi dei contaminanti sulla diversità genetica. In particolare, McMillan et al. (2006) sostengono che vi sono diverse motivazioni perché la genetica di

popolazione si modifichi e perché gli effetti di tale contaminazione non possono essere previsti prendendo in considerazione soltanto l'ampiezza dell'esposizione ai contaminanti; secondo questi Autori, ad esempio, l'espansione della popolazione e l'immigrazione con successo di nuovi individui potrebbero aiutare la popolazione a contrastare la perdita di diversità genetica. E ancora, Berckmoes et al. (2005) sostengono che lo stress indotto dai contaminanti, ovvero il tempo di esposizione ad essi, potrebbero non essere sufficienti per provocare risposte genetiche nella popolazione; inoltre, gli Autori suggeriscono che il flusso genico potrebbe mascherare gli effetti dei metalli, come già osservato da Matson et al. (2006) in uno studio sulle rane di palude, evidenziando la presenza di un flusso di migranti diretto verso le aree fortemente inquinate e proveniente dalle aree circostanti che probabilmente ha compensato il relativamente povero successo riproduttivo o la sopravvivenza negli habitat contaminati. Studi di Mulvey et al. (2003) hanno indicato un aumento della diversità genetica del mtDNA in *Fundulus heteroclitus* proveniente da siti contaminati da IPA attribuendo tale risultato alla presenza di un tasso di migranti tale da compensare la perdita di diversità genetica. Infine, Baker et al. (2001), Cohen (2002), Shugart et al. (2010), Theodorakis e Shugart (1997) riportano un aumento della diversità genetica in popolazioni provenienti da siti contaminati per effetti di diversi fattori quali migrazione, mescolanza delle popolazioni, selezione diversificata o aumento dei tassi di mutazione (Shugart et al., 2010). Comunque, la difficoltà nello spiegare alcuni dati ottenuti potrebbe derivare da diversi fattori come, ad esempio, il marcatore molecolare prescelto, infatti, sebbene il DNA mitocondriale sia un mezzo sensibile per rivelare gli

effetti genetici del bottleneck e sia un efficace sistema genetico per monitorare il declino della popolazione, l'utilizzo dei microsatelliti può rappresentare uno strumento di indagine più valido nel monitoraggio degli ambienti inquinati (Bickham et al., 2000).

6. CONCLUSIONI

- 1) *P. sanguinolentus* presenta una forte strutturazione genetica ($F_{st}=0,72$) dovuta, probabilmente, al tipo di dispersione larvale “in shore” e ad un comportamento di “homing” che dovrebbe essere ulteriormente studiato; tale strutturazione non è, comunque, associata ad una elevata divergenza genetica delle sue popolazioni probabilmente a causa del loro recente differenziamento, successivo alle glaciazioni;
- 2) i valori della diversità aplotipica (da 0,27 a 0,82) e della diversità nucleotidica (da 0,0008 a 0,012) rientrano nel quadro della variabilità genetica riscontrata nei Blennidi del Mediterraneo (Domingues et al., 2007 e 2008b).
- 3) La popolazione di *TP* è peculiare per la presenza negli aplotipi privati di una delezione di 11pb.
- 4) I dati del bioaccumulo e quelli relativi al test Comet e al test dei micronuclei, confermano che *P. sanguinolentus* può essere considerato un valido bioindicatore.
- 5) Per quanto riguarda le Aree Marine Protette prese in esame, malgrado il moderato grado di contaminazione dei sedimenti e di bioaccumulo dei contaminanti nel muscolo degli esemplari esaminati, presentano una bassa variabilità genetica; le aree marine protette sono di notevole interesse per la conservazione della biodiversità, tuttavia la loro contiguità con aree fortemente antropizzate influenza negativamente la qualità ambientale come dimostrato ad esempio dalla elevata concentrazione di Pb nel muscolo degli esemplari di *A.M.P.AC*.

- 6) Le popolazioni di *AU* e *GE* presentano una elevata contaminazione da inquinanti genotossici sia nei sedimenti che nel muscolo e i più bassi valori degli indici di variabilità genetica.
- 7) Dai dati ottenuti, si ritiene di poter concordare con quanto asserito da Bickham (2011), il quale sostiene che “ gli impatti genetici sono conseguenza dell’esposizione delle popolazioni ai contaminanti, tuttavia, non sono non sono direttamente prevedibili dalla modalità con cui l’inquinante esplica la propria tossicità”.
- 8) Infine, dati recenti in letteratura indicano l’approccio multidisciplinare come uno strumento valido per monitorare gli effetti avversi acuti e cronici causati dagli inquinanti. Infatti, l’uso di un singolo approccio, per analizzare lo stato degli ecosistemi marini, sottostima la complessità dell’impatto antropico e, generalmente, conduce ad una conoscenza non chiara e distorta delle conseguenze (Tomasello et al., 2012).

7. BIBLIOGRAFIA

Akcha F., Leday G., Pfohl-Leszkowicz A. (2004) Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutation Research* 552, 197–207.

Ali F.K., El-Shehawi A.M., Seehy M.A. (2008) Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution *African Journal of Biotechnology* 7 (5), 606-612.

Almada V.C., Oliveira R.I. Gonçalves E.J., Almeida A.J., Santos R.S., Wirtz P. (2001) Patterns of diversity of the north-eastern Atlantic blenniid fish fauna (Pisces: Blenniidae). *Global Ecology & Biogeography* 10, 411–422.

Almada F., Almada V.C., Guillemaud T., Wirtz P. (2005a) Phylogenetic relationships of the north-eastern Atlantic and Mediterranean blenniids. *Biological Journal of the Linnean Society*, 86, 283–295.

Almada V.C., Robalo J.I. , Levy A., Freyhof J., Bernardi G., Doadrio I. (2009) Phylogenetic analysis of Peri-Mediterranean blennies of the genus *Salaria*: Molecular insights on the colonization of freshwaters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52 (2) 424-431.

Alomary A.A., Belhadj S. (2007) Determination of heavy metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) by ICP-OES and their speciation in Algerian Mediterranean Sea sediments after a five-stage sequential extraction procedure. *Environmental Monitoring and Assessment* 135, 265–280.

Al-Sabti K. (1995), An in vitro binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. *Mutation Research* 335 (2) 109-120.

Astraldi M., Balopoulos S., Candela J., Font J., Gacic M., Gasparini G.P., Manca B., Theocharis A., Tintore J. (1999) The role of straits and channels in understanding the characteristics of Mediterranean circulation. *Progress in Oceanography* 44, 65–108.

Bahri-Sfar L., Lemaire C., Ben Hassine O.K., Bonhomme F. (2000) Fragmentation of sea bass populations in the western and eastern Mediterranean as revealed by microsatellite polymorphism. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 267, 929–935.

Baker R., Bickham A., Bondarkov M., Gaschak S., Matson C., Rodgers B., Wickliffe J., Chesser R. (2001) Consequences of polluted environments on population structure: The bank vole (*Clethrionomys glareolus*) at Chernobyl. *Ecotoxicology* 10, 211–216.

Bargelloni L., Alarcon J.A., Alvarez M.C., Penzo E., Magoulas A., Reis C., Patarnello T. (2003) Discord in the family Sparidae (Teleostei): divergent phylogeographical patterns across the Atlantic–Mediterranean divide. *J Evolution Biol* 16, 1149–1158.

Bath H. (1968) Untersuchung von *Blennius zvonimiri* Kolombatovic und Beschreibung von *Blennius incognitus* n. sp. Aus dem Mittelmeer (Pisces, Blennioidea, Blenniidae). *Senckenbergiana Biologica* 49, 367–386.

Bath H. (1977) Revision der Blenniini (Pisces: Blenniidae). *Senckenbergiana Biologica* 57, 167–234.

Bath H. (1990) Taxonomie und Verbreitung von *Parablennius* Ribeiro 1915 an der W-Küste Afrikas und den Kapverdischen Inseln mit Revalidation von *P. verryckeni* (Poll 1959) und Beschreibung drei neuer Arten (Pisces: Blenniidae). *Senckenbergiana Biologica* 70, 15–69.

Bath H. (1996) Beitrag zur Osteologie der Arten der Tribus Parablenniini Die Beziehungen der Knochen des Schädeldaches zum Seitenorgan-System und zu den Weichteilbildungen der Kopfoberseite Sowie die Systematische Bedeutung der Befunde nebst Bemerkungen zu *Lupinoblennius dispar* Herre 1942 (Pisces: Blenniidae). *Senckenbergiana Biologica* 76, 65–92.

Bath H. (2001) Osteology and morphology of fishes of the subfamily Salariaiini and its junior synonym Parablenniinae (Pisces: Blenniidae). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkund – Serie A* 628, 1–42.

Bekkevold M.A., André C., Dahlgren T.G., Clausen L.A.W., Torstensen E., Mosegaard H., Carvalho G.R., Christensen T.B., Norlinder E., Ruzzante D.E. (2005) Environmental correlates of population differentiation in Atlantic herring. *59 (12)* 2656-2668.

Benamar M.A., Toumert I., Tobbeche S., Tchantchane A., Chalabi A. (1999) Assessment of the state of pollution by heavy metals in the surficial sediments of Algiers Bay. *Applied Radiation and Isotopes* 50, 975-980.

Béranger K., Mortier L., Gasparini G.P., Gervasio L., Astraldi M., Crépon M. (2004) The dynamics of the Sicily Strait: a comprehensive study from observations and models. *Deep-Sea Research II* 51, 411–440.

Berckmoes V., Scheirs J., Jordaens K., Blust R., Backeljau T., Verhagen R. (2005) Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (11), 2898–2907.

Berg L.S. (1958) System der rezenten und fossilen Fischartigen und Fische. Berlin, 310.

Bergek S., Bjorklund M. (2009) Genetic and morphological divergence reveals local subdivision of perch (*Perca fluviatilis* L.). Biol J Linn Soc 96, 746–758.

Bernardello M., Secco T., Pellizzato F., Chinellato M., Sfriso A., Pavoni B. (2006) The changing state of contamination in the Lagoon of Venice. Part 2: Heavy metals. Chemosphere 64, 1334–1345.

Bernardi G. (2000) Barriers to gene flow in *Embiotoca jacksoni*, a marine fish lacking a pelagic larval stage. Evolution 54 (1) 226-237.

Bernardi G., Holbrook S.J., Schmitt R.J. (2001) Gene flow at three spatial scales in a coral reef fish, the three-spot damselfish, *Dascyllus trimaculatus*. Marine Biology 138, 457-465.

Bernardi G., Holbrook S.J., Schmitt R.J., Crane N.L. (2003) Genetic evidence for two distinct clades in a French Polynesian population of the reef three-spot damelfish, *Dascyllus trimaculatus*. Marine Biology 143, 485-490.

Bernardi G., Vagelli A. (2004) Population structure in Banggai cardinalfish, *Pterapogon kauderni*, a coral reef species lacking a pelagic larval phase. Marine Biology 145, 803-810.

Bickham J. W., Sandhu S., Hebert P.D.N., Chikhi L., Athwal R. (2000) Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. Mutation Research 463, 33-51.

Bickham J. W. (2011) The four cornerstones of Evolutionary Toxicology. Ecotoxicology 20, 497–502.

Bock M., Zander C.D. (1986) Osteological characteres as tools for Blenniid taxonomy – a generic revision of European Blenniidae (Percomorphi; Pisces). Zeitschrift fur Zoologische Systematik und Evolutionsforschung 24, 138–143.

Bourret V., Couture P., Campbell P.G.C., Bernatchez L. (2008) Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. Aquatic Toxicology 86, 76–90.

Bryant D., Moulton V. (2004) Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. Molecular Biology and Evolution 21, 255–265.

Burford M.O. (2009) Demographic history, geographical distribution and reproductive isolation of distinct lineages of blue rockfish (*Sebastes mystinus*), a marine fish with a high dispersal potential. J Evol Biol 22 (7), 1471–1486.

Caredda A.M., Cristini A., Ferrara C., Lobina M.F., Baroli M. (1999) Distribution of heavy metals in the Piscinas beach sediments (SW Sardinia, Italy). *Environmental Geology* 38, 91-100.

Carrasco K.R., Tilbur K.L., Myers M.S. (1990) An assessment of piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effect. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 47, 2123-2136.

Cohen S. (2002) Strong positive selection and habitat-specific amino acid substitution patterns in MHC from an estuarine fish under intense pollution stress. *Mol Biol Evol* 19, 1870–1880.

Collins A.R., Dusinska M., Gedik C.M., Stetina R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.* 104, 465–469.

Costagliola D., Robertson D.R., Guidetti P., Stefanni S., Wirtz P., Heiser J.B., Bernardi G. (2004) Evolution of coral reef fish *Thalassoma* spp. (Labridae). 2. Evolution of the eastern Atlantic species. *Marine Biology* 144, 377–383.

Cuvier G. (1829) *Le Règne Animal, distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée.* Paris.

Debes P.V., Zachos F.E., Hanel R. (2008) Mitochondrial phylogeography of the European sprat (*Sprattus sprattus* L., Clupeidae) reveals isolated climatically vulnerable populations in the Mediterranean Sea and range expansion in the northeast Atlantic. *Molecular Ecology* 17, 3873–3888.

Depledge M. (1989) The rational basis for detection of the early effects of marine pollutants using physiological indicators. *Ambio* 18, 301-302.

Dias J.A., Rodrigues A., Magalhães F. (1997) Evolução da linha de costa em Portugal, desde o último máximo glaciário até a actualidade: síntese dos conhecimentos. *Estudos do Quaternário* 1, 53–66.

Domingues V. S., Faria C., Stefanni S., Santos R.S., Brito A., Almada V.C. (2007) Genetic divergence in the Atlantic–Mediterranean Montagu's blenny, *Coryphoblennius galerita* (Linnaeus 1758) revealed by molecular and morphological characters. *Molecular Ecology* 16, 3592–3605.

Domingues V.S., Alexandrou M., Almada V.C., Robertson D.R., Brito A., Santos R.S., Bernardi G. (2008a) Tropical fishes in a temperate sea: evolution of the wrasse *Thalassoma pavo* and the parrot fish *Sparisoma cretense* in the Mediterranean and the adjacent Macaronesian and Cape Verde Archipelagos. *Marine Biology* 154, 465–474.

Domingues V. S., Stefanni S., Brito A., Santos R.S., Almada V.C. (2008b) Phylogeography and demography of the Blenniid *Parablennius parvicornis* and its sister species *P. sanguinolentus* from the northeastern Atlantic Ocean and the western Mediterranean Sea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46, 397–402.

Durand J.D., Templeton A.R., Guinand B., Imsiridou A., Bouvet Y. (1999) Nested clade and phylogeographic analyses of the chub, *Leuciscus cephalus* (Teleostei, Cyprinidae), in Greece: implication for Balkan peninsula biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13, 566-580.

Eckman S. (1953) *Zoogeography of the sea*. London, 417.

Eckman, S. (1967) *Zoogeography of the Sea*. Sidgwick & Jackson, London.

ESCODD (The European Standards Committee on Oxidative DNA Damage, 2003) Measurement of DNA oxidation in human cell by chromatographic and enzymic methods. *Free Rad. Biol. Med.* 34, 1089–1099.

Excoffier I., Smouse P.E., Quattro J.E. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotype: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.

Excoffier L. (2004) Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 3, 853-864.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.

Feldstein T., Kashman Y., Abelson A., Fishelson L., Mokady O., Bresler V., Erel Y. (2003) Marine molluscs in environmental monitoring III. Trace metals and organic pollutants in animal tissue and sediments. *Helgol Mar Res* 57, 212–219.

Ferrito V., Maltagliati F., Mauceri F., Adorno A., Tigano C. (2003) Morphological and genetic variation in four Italian population of *Lebias fasciata* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Italian Journal of Zoology* 70 (2) 115-121.

Ferrito V., Copat C., Pulvirenti V., Marino A., Fruciano C., Pappalardo A.M., Sciacca S., Tigano C. (2008) Approccio multimarker in due specie di Teleostei bioindicatori: *Coris julis* (Linneo, 1758) e *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814). Atti 69° Congresso Nazionale dell'Unione Zoologica Italiana. Riassunti dei contributi scientifici p. 45

Fonseca V.F., França S., Serafim A., Company R., Lopes B., Bebianno M.J., Cabrala H.N. (2011) Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in

three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquatic Toxicology* 102 (3-4) 216–227.

Fossi M. C. (1998) Biomarker: strumenti diagnostici e prognostici di «salute» ambientale. *Ecotossicologia*. UTET.

Francisco S.M., Vieira M.N., Almada V.C. (2006) Genetic structure and historical demography of the shanny *Lipophrys pholis* in the Portuguese coast based on mitochondrial DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39, 288–292.

Francisco S.M., Faria C., Lengkeek W., Vieira M.N., Velasco E.M., Almada V.C. (2011) Phylogeography of the shanny *Lipophrys pholis* (Pisces: Blenniidae) in the NE Atlantic records signs of major expansion event older than the last glaciations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 403, 14-20.

Frenzilli G., Scarcelli V., Del Barga I., Nigro M., Förlin L., Bolognesi C., Sturve J. (2004) DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbor. *Mutation Research* 552, 187–195.

Fruciano C., Hanel R., Debes P.V., Tigano C., Ferrito V. (2011) Atlantic-Mediterranean and within-Mediterranean molecular variation in *Coris julis* (L. 1758) (Teleostei, Labridae). *Marine Biology* 158, 1271-1286.

Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925.

Gabbianelli R., Lupidi G., Villarini M., Falcioni G. (2003) DNA damage induced by copper on erythrocytes of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* and mollusk *Scapharca inaequivalvis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 350–356.

Garcia E., Alvarez M.C., Thode G. (1987) Chromosome relationships in the genus *Blennius* (Blenniidae Perciformes) C-banding patterns suggest two karyoevolutional pathways. *Genetica* 72, 27–36.

Gerlach G., Atema J., Kingsford M.J., Black K.P., Miller-Sims V. (2007) Smelling home can prevent dispersal of reef fish larvae. *PNAS* 104, 858–863.

Gibson R.N. (1968) The agonistic behaviour of juvenile *Blennius pholis* L. (Teleostei). *Behaviour* 30, 192–217.

Gibson R.N. (1999) Movement and homing in intertidal fishes in: Horn H.H., Martin K.L.M., Chotkowski M.A. *Intertidal Fishes. Life in two worlds*.

Giorgi I., Abete M.C., Squadrone S., Tarasco R., Arsieni P., Pellegrino M., Leogrande M., Prearo M. (2009) Contaminazione da metalli pesanti nel pescato del Mar Ligure. *A.I.V.I.*, 6.

Goldschmid A., Kotrschal K., Krautgartner W.D., Adam H. (1980) Morphologie des Gebisses und Nahrungspräferenzen von Dreizehn Adriatischen Blenniden (Teleostei, Perciformes). *Zoologica Scripta* 9, 67–78.

Gyllenstein U. (1985) The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous and freshwater species. *Journal of Fish Biology* 26, 691-699.

Haney R.A., Silliman B.R., Fry A.J., Layman C.A., Rand D.M. (2007) The Pleistocene history of the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*): non-equilibrium evolutionary dynamics within a diversifying species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43, 743-754.

Harpending R.C. (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66, 591-600.

Hartl M.G., Kilemade M., Sheehan D., Mothersill C., O'Halloran J., O'Brien N.M., van Pelt F.N. (2007) Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot. *Scophthalmus maximus* L. *Marine environmental research* 64, 191–208.

Ingelman-Sundberg M., Hagbjork A.L. (1982) On the significance of the cytochrome P-450-dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 12, 673–686.

Kilemade M.F., Hartl M.G.J., Sheehan D., Mothersill C., van Pelt F.N.A.M., O'Halloran J., O'Brien N.M. (2004) Genotoxicity of field-collected intertidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44, 56 –64.

Knapen D., Knapkens G., Bervoets L., Verheyen E., Eens M. (2009) High microsatellite genetic variability of the stone loach, *Barbatula barbatula*, in anthropogenically disturbed watercourses. *Fisheries Management and Ecology* 16, 112–120.

Knutsen H., Jorde P.E., André C., Stenseth N.C. (2003) Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Molecular Ecology* 12, 385-394.

Kolombatovic J. (1892) *Blennius zvonimiri* n. sp., nova vrsta babice dalmatinskoga mora. *Glasniku Hrvatskog Naravoslovnog Drutstva* 7, 107–112.

Lafabrie C., Pergent G., Kantin R., Pergent-Martini C., Gonzalez J.-L. (2007) Trace metals assessment in water, sediment, mussel and seagrass species - Validation

of the the use of *Posidonia oceanica* as a metal biomonitor. *Chemosphere* 68 (11), 2033-2039.

Lambeck K., Esat T.M., Potter E.K. (2002) Links between climate and sea levels for the past three million years. *Nature* 419, 199–206.

Lemaire P., Matthews A., Forlin L., Livingstone D.R. (1994) Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 191–200.

Li W.H. (1977) Distribution of nucleotide differences between two randomly chosen cistrons in a finite population. *Genetics* 85, 331-337.

Lin C.J., Lin H.D., wang J.P., Chao S.C., Chiang T.Y. (2009) Phylogeography of *Hemibarbus labeo* (Cyprinidae): secondary contact of ancient lineages of mtDNA. *Zoologica Scripta*.

Linnaeus C. (1758) *Systema Naturae* (Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata) Holmiae. Stockholm.

Loncaric N., Auffret G.A., Abrantes F., Baas J.H., Gaspar L., Pujol C. (1998) Late quaternary sedimentation patterns on the Meriadzek Terrace, Bay of Biscay (ESSCAMP 02 core: 47 N 9 W). *Mar. Geol.* 152, 57–73.

MacDonald, D.D. (1994) Approach to the assessment of sediment quality in Florida coastal waters. vol. 1 – Development and evaluation of sediment quality assessment guidelines. Florida Department of Environmental Protection Office of Water Policy.

Macpherson E., Raventos N. (2006) Relationship between pelagic larval duration and geographic distribution of Mediterranean littoral fishes. *Marine Ecology Progress Series*, 327, 257–265.

Maes G.E., Raeymaekers J.A.M., Pampoulie C., Seynaeve A., Goemans G., Belpaire C., Volckaert F.A.M. (2005) The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: Relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquatic Toxicology* 73, 99–114.

Maltagliati F. (1998) Does the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Teleostei: Cyprinodontidae) fit the one-dimensional stepping-stone model of gene flow? *Environmental Biology of Fishes* 53 (4) 385-392.

Mantel N.A. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.

Marañón E., Holligan P.M., Barciela R., González N., Mouriño B., Pazó M.J., Varela M. (2001) Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments. *Marine Ecology Progress Series* 216, 43–56.

Mars P. (1963) Les faunes et la stratigraphie du Quaternaire méditerranéen, *Rec. Trav. Sta. Mar. Endoume* 26, 61-97.

Matson C.W., Lambert M.M., McDonald T. J., Autenrieth R.L., Donnelly K.C., Islamzadeh A., Politov D.I., Bickham J.W. (2006) Evolutionary Toxicology: population-level effects of chronic contaminant exposure on the Marsh Frogs (*Rana ridibunda*) of Azerbaijan. *Environmental Health Perspectives* 114 (4) 547-552.

McMillan A.M., Bagley M.J., Jackson S.A., Nacci D.E. (2006) Genetic diversity and structure of an estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) indigenous to sites associated with a highly contaminated urban harbor. *Ecotoxicology* 15, 539–548.

Mejri R., Lo Brutto S., Ben Hassine O.K., Arculeo M. (2009) A study on *Pomatoschistus tortonesei* Miller 1968 (Perciformes, Gobiidae) reveals the Siculo-Tunisian Strait (STS) as a breakpoint to gene flow in the Mediterranean basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53, 596–601.

Moraes de Andrade V., de Freitas T. R.O., da Silva J. (2004) Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research* 560, 57–67.

Mulvey M., Newman M.C., Vogelbein W.K., Unger M.A., Ownby D. R. (2003) Genetic structure and mtDNA diversity of *Fundulus heteroclitus* populations from polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (3) 671–677.

Muss A., Robertson D.R., Stepien C.A., Wirtz P., Bowen B.W. (2001) Phylogeography of *Ophioblennius*: the role of Ocean current and geography in reef fish evolution. *Evolution*, 55 (3) 561–572.

Mzoughi N., Chouba L. (2011) Distribution of trace metals, aliphatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment cores from Sicily Channel and the Gulf of Tunis (south-western Mediterranean Sea). *Environmental Technology* 32 (1-2) 43-54.

Nelson J.S. (1994) *Fishes of the world*, 3rd edn. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Nieder J., Busse K. (1992) Remarks on the systematics of the tribe Parablenniini based on blood serum electrophoresis (Pisces: Blenniidae). *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 30, 123–128.

Norman J.R. (1943) Notes on the Blennioid fishes – I. A provisional synopsis of the genera of the family Blenniidae. *Annals and Magazine of Natural History* 72, 793–812.

Ostellari L., Bargelloni L., Penzo E., Patarnello P., Patarnello T. (1996) Optimization of single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of the mitochondrial control region in *Pagellus bogaraveo* (Sparidae, Teleostei): rationalized tools in fish population biology. *Animal Genetics* 27 (6), 423–427.

Pallas P.S. (1814) *Zoographia Rosso-Asiatica, sistens omnium animalium in extenso Imperio Rossico et adjacentibus maribus observatorum recensionem, domicilia, mores et descriptiones, anatomen atque icones plurimorum*. Petropoli, Academiae Scientiarum St. Petersburg.

Palumbi S.R. (1994) Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annu Rev Ecol Syst* 25:547–572

Pappalardo A.M., Ferrito V., Messina A., Guarino F., Patarnello T., De Pinto V., Tigano C. (2008) Genetic structure of the killifish *Aphanius fasciatus*, Nardo 1827 (Teleostei: Cyprinodontidae), results of mitochondrial DNA analysis. *Journal of Fish Biology* 72 (5) 1154–1173.

Pereira P., de Pablo H., Vale C., Pacheco M. (2010) Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metal-contaminated coastal system – Gills reflect environmental contamination. *Marine Environmental Research* 69, 53–62.

Pulvirenti V., Ferrito V., Copat C., Sciacca S., Tigano C. (2012) Biomonitoring of a particularly polluted site on the Ionic Sicilian coast: port of Augusta. *IL GRIFONE*. In press

Raventos N., Macpherson E. (2001) Planktonic larval duration and settlement marks on the otoliths of Mediterranean littoral fishes. *Marine Biology* 138, 1115–1120.

Richtarski U., Patzner R.A. (2000) Comparative morphology of male reproductive systems in Mediterranean blennies (Blenniidae). *Journal of Fish Biology* 56: 22–36.

Rinner B. P., Matson C.W., Islamzadeh A., McDonald T.J., Donnelly K.C., Bickham J.W. (2011) Evolutionary toxicology: contaminant-induced genetic mutations in mosquitofish from Sumgayit, Azerbaijan. *Ecotoxicology* 20, 365–376.

Roark S.A., Nacci D., Coiro L., Champlin D., Guttman S.I. (2005) Population genetic structure of a non migratory estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) across a strong gradient of polychlorinated biphenyl contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (3) 717–725.

- Rocco L., Ferrito V., Costagliola D., Marsilio A., Pappalardo A.M., Stingo V., Tigano C. (2007) Genetic divergence among and within four Italian population of *Aphanius fasciatus* (Teleostei, Cyprinodontiformes). *Italian Journal of Zoology* 74 (4) 371-379.
- Rogers A. (1995) genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49, 608-615.
- Rohlf F.J. (2007) NTSYSpc: numerical taxonomy system, ver. 2.20. Exeter Publishing Ltd, Setauket, NY.
- Ruggieri G. (1967) The Miocene and later evolution of the Mediterranean Sea, *Syst. Assoc. Publ.* 7, 283-290.
- Saleh K.A.J. (2010) The Intensity of Pollutant Genotoxicity in Lake Uluabat. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6 (4) 625–631.
- Santos R.S., Almada V.C. (1988) Intraspecific variations in reproductive tactics in males of the rocky intertidal fish *Blennius sanguinolentus* in the Azores. In: Chelazzi G., Vannini M., eds. Behaviour adaptation to intertidal life. *Nato Asi Series: Life Sciences* 151, 421–447.
- Schneider S., Excoffier L. (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152, 1079-1089.
- Shugart L.R., Theodorakis C.W., Bickham J.W. (2010) Evolutionary toxicology. In: DeWoody J.A., Bickham J.W., Michler C.H., Nichols K.M., Rhodes O.E., Woeste K.W. (eds) *Molecular Approaches in Natural Resource Conservation and Management*. Cambridge University Press, New York, 320–362.
- Silbiger R.N., Leonard A.C., Dimsoski P., Forè S., Guttman S.I., Roth A.C., Gordon D.A., Wessendarp T., Toth G.P., Smith M.K. (2001) Use of molecular markers to study the effects of environmental impacts on genetic diversity in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) populations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2580-2587.
- Smith-Vaniz W.F. (1976) The saber-toothed blennies, tribe Nemophini (Pisces Blenniidae). *Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 19, 1–196.
- Springer V.G. (1968) Osteology and classification of the fishes of the family Blenniidae. *U.S. National Museum Bulletin* 284, 1–97.
- Springer V.G., Smith-Vaniz W.F. (1972) A new tribe (Phenablenniini) and genus (*Phenablennius*) of blennioid fishes based on *Petroscirtes heyligeri* Bleeker. *Copeia* 1, 64–71.

Šrut M., Štambuk A., Pavlica M., Klobučar G.I.V. (2010) Cage exposure of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) for in situ assessment of pollution-related genotoxicity. *Arh Hig Rada Toksicol* 61, 29-36.

Stefanni S., Domingues V., Bouton N., Santos R.S., Almada F., Almada V. (2006) Phylogeny of the shanny, *Lipophrys pholis*, from the NE Atlantic using mitochondrial DNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39, 282–287.

Stefanni S., Thorley J.S. (2003) Mitochondrial DNA phylogeography reveals the existence of an Evolutionarily Significant Unit of the sand goby *Pomatoschistus minutus* in the Adriatic (Eastern Mediterranean). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28, 601–609.

Stepien C.A., Dillon A.K., Brooks M.J., Chase K.L., Hubers A.N. (1997) The evolution of blennioid fishes based on an analysis of mitochondrial 12S rDNA. In: Kocher T., Stepien C., eds. *Molecular systematics of fishes*. New York: Academic Press, 245–269.

Stockwell C.A., Mulvey M., Jones A.G. (1998) Genetic evidence for two evolutionarily significant units of With Sands pupfish. *Animal Conservation* 1, 213-225.

Storelli M.M., Marcotrigiano G.O. (2005) Bioindicator organisms: heavy metal pollution evaluation in the Ionian Sea (Mediterranean Sea–Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* 102, 159–166.

Tajima F. (1989) Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

Tancioni L., Scardi M., Cataudella S. (2005) I Pesci Nella Valutazione Dello Stato Ecologico Dei Sistemi Acquatici. *Ann. Ist. Super Sanità* 41 (3), 399-402.

Tepe Y. (2009) Metal concentrations in eight fish species from Aegean and Mediterranean Seas. *Environmental Monitoring and Assessment* 159, 501-509.

Theodorakis C.W., Shugart L.R. (1997) Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in radionuclide-contaminated mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicology* 6, 335–354.

Thiede J. (1978) A glacial Mediterranean. *Nature* 276, 680–683.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882.

Thyssen L. (2010) Homing behaviour of *Parablennius parvicornis* (Pisces: Blenniidae). *Anales Universitarios de Etología* 4: 25-30.

Tigano C., Canapa A., Ferrito V., Barucca M., arcidiacono I., Olmo E. (2004) Morphological and molecular analysis of three Sicilian population of *Lebias fasciata* (Teleostei, Cyprinodontidae). *Italian Journal of Zoology* 71, 107-113.

Tigano C., Tomasello B., Sciacca S., Pulvirenti V., Ferrito V., Carpinteri G., Copat C., Renis M. (2006) Danno al DNA di *Parablennius sanguinolentus* della costa ionica siciliana. *Atti 67° Congresso Nazionale dell'Unione Zoologica Italiana. Riassunti dei contributi scientifici* p.52.

Tigano C., Tomasello B., Pulvirenti V., Ferrito V., Copat C., Carpinteri G., Mollica E., Sciacca S., Renis M. (2009) Assessment of environmental stress in *Parablennius sanguinolentus* (Pallas, 1814) of the Sicilian Ionian coast. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1278–1286.

Tlili S., Jebali J., Banni M., Haouas Z., Mlayah A., Helal A.N., Boussetta H. (2010) Multimarker approach analysis in common carp *Cyprinus carpio* sampled from three freshwater sites. *Environmental Monitoring and Assessment* 168, 285–298.

Tsangaris C., Vergolyas M., Fountoulaki E., Nizheradze K. (2011) Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in Grey Mullet (*Mugil cephalus*) from a polluted environment in Saronikos Gulf, Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61 (3) 482-490.

Tomasello B., Copat C., Pulvirenti V., Ferrito V., Ferrante M., Renis M., Sciacca S., Tigano C. (2012) Biochemical and bioaccumulation approaches for investigating marine pollution using Mediterranean rainbow wrasse, *Coris julis* (Linnaeus 1798). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 86, 168–175.

Tortonese E. (1964) The main biogeographical features and problems of the Mediterranean fish fauna. *Copeia* 1964, 98–107.

Valenciennes A. (1836) Histoire naturelle des poissons. De la famille des Gobioides. Paris: Tome onzième Livre quatorzième.

Wang J.P., Hsu K.C., Chiang T.Y. (2000) Mitochondrial DNA phylogeography of *Acrossocheilus paradoxus* (Cyprinidae) in Taiwan. *Molecular Ecology* 9, 1483-1494.

Wang J.P., Lin H.D., Huang S., Pan C.H., Chen X.L., Chiang T.Y.(2004) Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on

nucleotide variation of mtDNA and allozymes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31, 1143-1156.

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

Whitehead P.J.P., Bauchot M.-L., Hureau J.-C., Nielsen J., Tortonese E. (1986) *Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO.

Withfield A.K., Elliot M. (2002) Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. *Journal of Fish Biology* 61, 229-250.

Williams J.T. (1990) Phylogenetic relationship and revision of the blennioid fish genus *Scartichthys*. *Smithsonian Contributions to Zoology* 492, 1–30.

Wirtz P. (1978) The behaviour of the Mediterranean Tripterygion species (Pisces, Blennioidei). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 48, 142–174.

Wirtz P. (1980) A revision of the eastern-Atlantic Tripterygiidae (Pisces, Blennioidei) and notes on some West African blennioid fish. *Cybius*, 3e Serie, 11, 83–101.

Wright, S. (1969) *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. 2. University of Chicago Press, Chicago.

Wright, S. (1978) *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. 4. University of Chicago Press, Chicago.

Xia, X. (2007) *Bioinformatics and the cell: modern computational approaches in genomics, proteomics and transcriptomics*. Springer. 361 pp.

Zander C.D. (1973) Evolution of Blennioidei in the Mediterranean sea. *Revue Travaux de L'Institut de Pêches Maritimes*, 37, 215–221.

Zander C.D. (1978) Kritische Anmerkungen Zur 'Revision der Blenniini (Pisces: Blenniidae)' von H. Bath (1977). *Zeitschrift Fur Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 16, 290–296.

Zander C.D. (1980) Zoogeography and speciation of Mediterranean blennioids. *Journées de Etudes Systématiques et Biogéographiques de Mediterranen*, CIESM, Cagliari, 13–38.

Zardoya R., Castilho R., Grande C., Favre-Krey L., Caetano S., Marcato S., Krey G., Patarnello T. (2004) Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 13, 1785–1798.

APPENDICE A – Chiavi di riconoscimento per la determinazione del genere e della specie (da Whitehead et al., 1986).

Chiave di riconoscimento per la determinazione del genere

1	Membrana della branchia formante piega attraverso l'istmo	3
	Membrana della branchia non unita e non formante piega attraverso l'istmo	2
2	Parte anteriore della pinna dorsale cospicuamente più alta della parte posteriore, raggi anteriori elongati oltre la membrana della pinna	<i>Biennius</i>
	Parte anteriore della pinna dorsale non cospicuamente più alta della parte posteriore, raggi anteriori non elongati	<i>Hypleurochilus</i>
3	Mascella superiore con 50 o più denti; impari, triangolari, tentacoli frangiati carnosi sulla nuca seguiti da parecchi piccoli tentacoli	<i>Coryphoblennius</i>
	Mascella superiore con 40 denti o meno; se presentano tentacoli, non triangolari, carnosi e frangiati	4
4	Tentacoli sopra-orbitali assenti	<i>Lipophrys</i>
	Tentacoli sopra-orbitali presenti	5
5	Pinna dorsale con incisura distintiva tra parte spinosa e molle	6
	Pinna dorsale senza incisura distintiva tra parte spinosa e molle	<i>Parablennius</i>
6	Tentacolo sopra-orbitale di ogni occhio un singolo, non diramato, filamento filiforme (solo raramente filamento ramoso in cima); area blu con un margine rosso dietro gli occhi	<i>Aidablennius</i>
	Tentacoli sopra-orbitali spessi e/o ramosi alla base; nessuna area blu dietro gli occhi	7
7	Raggi della pinna dorsale molli 14-15; tentacoli nicali presenti; nessun canino sulla mascella superiore	<i>Scartella</i>
	Raggi della pinna dorsale molli 17-21; tentacoli nicali presenti o assenti; canini su entrambe le mascelle	<i>Parablennius</i>

Chiave di riconoscimento per la determinazione della specie

1	Pinna dorsale con incisura distinta tra parte spinosa e soffice	2
	Pinna dorsale senza incisura distinta tra parte spinosa e soffice	3
2	Tentacoli nucali spesso presenti; corpo brunastro con 5-7 chiazze bianche lungo la base della pinna dorsale; generalmente una chiazza brunastro variegata alla base della pinna caudale	<i>P. zvonimiri</i>
	Tentacoli nucali assenti; corpo verde-verdastro; nessuna chiazza lungo la base della pinna dorsale o alla base della pinna caudale	<i>P. incognitus</i>
3	Pinna dorsale con 13-14 spine; nessun canino nelle mascelle superiore	4
	Pinna dorsale con 11-12 spine; canini su entrambe le mascelle	5
4	Parte posteriore del sistema della linea laterale senza ramificazioni	<i>P. gattorugine</i>
	Parte posteriore del sistema della linea laterale con ramificazioni	<i>P. ruber</i>
5	Corpo bianco, solo una striscia scura dall'occhio alla base della pinna caudale	<i>P. rouxi</i>
	Corpo non bianco; almeno una seconda striscia scura presente lungo la base della pinna dorsale (<i>P. pilicoris</i>)	6
6	Tentacoli sopra-orbitali consistenti di uno spesso elemento che potrebbe portare estensioni simili a lembi solo sul lato posteriore	<i>P. tentacularis</i>
	Tentacoli sopra-orbitali consistenti in un gruppo di filamenti piccoli, sottili, simili a fili	7
7	14 raggi delle pinne pettorali	<i>P. pilicoris</i>
	13 raggi delle pinne pettorali	8
8	11 spine dorsali	<i>P. parvicornis</i>
	12 spine dorsali	<i>P. sanguinolentus</i>

APPENDICE B - Andamento delle correnti nel bacino del Mediterraneo



APPENDICE C – RIEPILOGO

