



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CNR ISTITUTO DI SCIENZE MARINE – VENEZIA



DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA

XX Ciclo

**EVOLUZIONE CARIOLOGICA E CITOTASSONOMIA IN
ANFIPODI**

**Supervisore: Ch.mo Professore Alessandro Minelli (Università di Padova)
Co-supervisore: Dottor Angelo Libertini (CNR-ISMAR Venezia)**

Dottorando: Massimiliano Rampin

31 gennaio 2008

INDICE

INDICE	1
RIASSUNTO	5
ABSTRACT	7
INTRODUZIONE	9
MATERIALI E METODI	12
Campionamento	14
Selezione	14
Metodo dell'“Hot Drying”	14
Colorazione convenzionale con Giemsa	15
Bandeggio C	16
Colorazione con Nitrato d'Argento (Ag NOR staining)	16
Colture batteriche e produzione di sonde	17
Sonda 5S rDNA	18
Sonda telomerica	18
Marcatura delle sonde mediante Nick Translation	18
Ibridazione <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	19
Estrazione del DNA genomico	19
RAPD-PCR	20
Determinazione del contenuto di DNA nucleare	21
RISULTATI	22
CITOGENETICA Metodologia	22
SOTTORDINE GAMMARIDEA	23
<i>Dexamine spinosa</i> cfr.	24
<i>Dexamine thea</i>	26
<i>Apherusa chiereghinii</i>	28
<i>Calliopius laevisculus</i>	30
<i>Dikerogammarus villosus</i>	32
<i>Echinogammarus finmarchicus</i>	34
<i>Echinogammarus obtusatus</i> cfr.	36

<i>Echinogammarus olivii</i>	38
<i>Gammarus aequicauda</i>	40
<i>Gammarus oceanicus</i>	42
<i>Gammarus</i> sp.	44
<i>Stenothoe tergestina</i>	46
<i>Apohyale crassipes</i>	48
<i>Apohyale prevostii</i>	50
<i>Orchestia prope cavimana</i>	52
<i>Orchestia gammarellus</i>	54
<i>Orchestia mediterranea</i>	56
<i>Orchestia montagui</i>	58
<i>Platorchestia platensis</i>	60
<i>Sardorchestia pelacaniformis</i>	62
<i>Talitrus saltator</i>	62
SOTTORDINE CORPHIIDEA	64
<i>Aoridae</i> sp.	65
<i>Microdeutopus anomalus</i> cfr.	67
<i>Microdeutopus versiculatus</i>	69
<i>Caprella dilatata</i>	71
<i>Caprella equilibra</i>	73
<i>Caprella septentrionalis</i>	75
<i>Phtisica marina</i>	77
<i>Ampithoe riedli</i>	79
<i>Corophium acutum</i>	81
<i>Corophium orientale</i>	83
<i>Corophium sextonae</i>	83
<i>Ericthonius argenteus</i>	85
<i>Ischyrocerus anguipes</i>	87
<i>Jassa marmorata</i>	89
<i>Jassa cadetta</i> n. sp.	91
RAPD-PCR in <i>Jassa</i>	93

DISCUSSIONE	95
Tabelle riassuntive dei dati citogenetici	95
Numero di cromosomi	103
Morfologia del cariotipo	103
FISH	104
Complesso maggiore dei geni ribosomali (18S-5.8S-28S rDNA)	104
Complesso minore dei geni ribosomali (5S rDNA)	105
Identificazione del repeat telomerico	106
Contenuto di DNA nucleare (Genome size)	108
Correlazione tra i parametri citogenetici	109
Esempi di comparazioni a livello di Superfamiglia e Famiglia	110
Superfamiglia Talitroidea	110
Famiglia Gammaridae	112
Famiglia Ischyroceridae	114
Famiglia Caprellidae	116
BIBLIOGRAFIA	117
RINGRAZIAMENTI	125

Il presente piano di ricerca è stato svolto presso l'Istituto di Scienze Marine (già Istituto di Biologia del Mare) del CNR di Venezia, sotto la supervisione del Prof. Alessandro Minelli (Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Biologia) ed in collaborazione con Dott. Angelo Libertini (CNR-ISMAR Venezia).

RIASSUNTO

L'analisi citogenetica può contribuire con caratteri non convenzionali alla ricostruzione filogenetica e ad identificare particolari percorsi evolutivi. L'ordine Amphipoda (Crustacea) è quasi inesplorato sotto questo profilo: delle circa 8000 specie descritte le conoscenze cariologiche riguardavano prevalentemente il numero di cromosomi per un centinaio di esse e l'impiego della citogenetica molecolare era limitato a sole due.

Nel corso del Dottorato sono state studiate una quarantina di specie di anfipodi per le quali sono stati analizzati i seguenti parametri cariologici: numero di cromosomi, morfologia del cariotipo, distribuzione e composizione dell'eterocromatina costitutiva, localizzazione nei cromosomi di particolari sequenze genomiche ripetute (geni ribosomali, sequenze telomeriche), e quantità di DNA nucleare. L'apporto recato da questa tesi alle conoscenze cariologiche degli anfipodi è riassunto nella tabella seguente.

parametro	totale specie conosciute	di cui studiate in questa tesi	contributo %
Numero cromosomi	130	27	21
Formula cariotipica	47	27	57
Contenuto di DNA nucleare	41	24	59
18S rDNA	31	30	97
5S rDNA	4	4	100
Telomeri	16	15	94
Bandeggio-C	9	8	89

Un'ampia variabilità nel numero cromosomico caratterizza le famiglie Aoridae, Gammaridae e Ischyroceridae, mentre tale parametro risulta relativamente costante nelle famiglie Talitridae, Niphargidae, Gammaridae e Caprellidae. Tra gli Aoridae e gli Ischyroceridae si riscontrano le specie con il numero di cromosomi più basso tra tutti gli anfipodi. Il cariotipo degli anfipodi è generalmente caratterizzato da un'alta simmetria dovuta alla preponderante presenza di cromosomi a centromero mediano. L'eventuale presenza di cromosomi sub-telocentrici e/o acrocentrici, vista la relativa rarità, può

rappresentare un buon diagnostico tra specie affini. L'ibridazione *in situ* fluorescente ha efficacemente consentito di localizzare sui cromosomi i geni del complesso ribosomale maggiore. Questo cluster genico è più frequentemente situato in posizione terminale, in un singolo paio di omologhi, ma vi sono specie nelle quali possono essere coinvolte più paia di omologhi. Diversi gradi di polimorfismo possono interessare le NOR, sia in termini dimensionali che numerici. La maggiore frequenza con cui è stata riscontrata un solo paio di cromosomi NOR porta a supporre che questa sia la condizione ancestrale, analogamente a quanto teorizzato per vertebrati e per molluschi.

I tentativi per localizzare i geni ribosomali minori (5S rDNA) hanno dato esito positivo solo su quattro specie. I telomeri di tutti gli anfipodi analizzati sono caratterizzati dalla sequenza pentamerica ripetuta TTAGG, presunta come carattere citogenetico plesiomorfo degli artropodi, derivato dall'esamero TTAGGG, presente in gran parte degli invertebrati ed in tutti i vertebrati. I dati relativi alla quantità di DNA nucleare evidenziano un'ampia variabilità di tale parametro all'interno delle famiglie e l'assenza di una correlazione diretta con il numero di cromosomi, anche in specie per le quali è stato supposto un aumento del numero di cromosomi per poliploidizzazione.

L'incremento del contenuto di DNA nel nucleo potrebbe essere stato un carattere pre-adattativo nelle specie che vivono in condizioni estreme quali, ad esempio, quelle che hanno colonizzato gli ambienti terrestri o semiterrestri oppure che sono distribuite nelle aree geografiche alle più alte latitudini.

Un'analisi comparata dei risultati per alcune famiglie e/o superfamiglie ha portato a valutare l'eventuale ruolo della poliploidizzazione nel giustificare numeri di cromosomi largamente diversi. Nelle famiglie Ischyroceridae e Caprellidae si osserva una correlazione tra numero di elementi NOR e numero di cromosomi che renderebbe plausibile tale ipotesi.

Infine, su base citogenetica è stato possibile identificare nella Laguna di Venezia la presenza di una nuova specie di *Jassa*, *J. cadetta*, morfologicamente affine a *J. marmorata*, la cui differenziazione è stata ulteriormente corroborata dall'analisi dei profili specie-specifici ottenuti tramite RAPD PCR.

ABSTRACT

Cytogenetics may contribute with non conventional characters to the phylogenetic reconstruction and to identify peculiar evolutionary paths. The order Amphipoda (Crustacea) is almost cytogenetically unexplored: out of 8000 described species karyological knowledge concerned chromosome number for a hundred of them and the use of the molecular cytogenetics was limited to only two species.

During the PhD course, karyological investigations have been carried out for about forty amphipod species and the following parameters were analyzed: chromosome number, karyotype morphology, distribution and composition of constitutive heterochromatin, location in the chromosomes of specific repeated genomic sequences (ribosomal genes, telomeric sequences), and nuclear DNA amount. The contribution of present thesis to the cytogenetical knowledge on amphipods is summarized in the following table.

parameter	total of known species	herein studied species	contribution %
Chromosome number	130	27	21
Karyotype formula	47	27	57
Nuclear DNA content	41	24	59
18S rDNA	31	30	97
5S rDNA	4	4	100
Telomeric sequence	16	15	94
C-banding	9	8	89

A wide variability in chromosome number characterizes the families Aoridae, Gammaridae and Ischyroceridae, whereas such parameter is relatively constant in the families Talitridae, Niphargidae, Gammaridae and Caprellidae. Within Amphipoda the lowest chromosome numbers were found in Aoridae and Ischyroceridae.

Amphipod karyotypes are generally characterized by a high symmetry due to the preponderant presence of median centromere chromosomes. Due to their relative rarity,

the possible presence of sub-telocentric and/or acrocentric chromosomes may be taken into account as a diagnostic tool for related species.

Fluorescent *in situ* hybridization allowed to locate on the chromosomes the major complex of ribosomal genes. This gene cluster is more frequently located in terminal position, in a single homologous pair, but there are species where NORs involve more homologous pairs.

Different degrees of polymorphism may interest the NORs, both in dimensional and numerical terms. Being the most frequent condition, a single pair of NOR bearing chromosomes is supposed as the ancestral condition for amphipods, as well as it was assumed for vertebrates and molluscs.

The attempts to locate the minor complex of ribosomal genes (5S rDNA) gave positive results only for four species.

The chromosome telomeres of all the analyzed amphipods are characterized by the repeated pentameric sequence TTAGG. This sequence is presumed as the cytogenetical plesiomorphic character for the arthropods and was derived from the hexamer TTAGGG, present in most of invertebrates and in all vertebrates.

The data on the nuclear DNA content pointed out a wide variability of such parameter at family level, and the absence of a direct correlation with chromosome number, also in species for which an increase of chromosome number by polyploidization was supposed.

The increase of Genome Size may be a pre-adaptive character in those species living under extreme conditions like, for instance, those colonizing terrestrial or semi-terrestrial environments or those distributed in the highest latitude geographical areas.

A comparative analysis of the results for some families and/or super-families was carried out. The possible role of polyploidization to justify largely different chromosome numbers was considered. In the families Ischyroceridae and Caprellidae a correlation between number of NOR elements and chromosome number was found, this fact would make reasonable an evolution by polyploidization.

Finally, on a cytogenetical base it was possible to identify a new specie of *Jassa*, *J. cadetta*, in the Venice Lagoon. This new species is morphologically close to *J. marmorata*, and its differentiation was also enhanced by the comparison of species-specific profiles given by RAPD-PCR.

INTRODUZIONE

M. J. D. White (1984), uno dei padri della moderna citogenetica, in uno dei suoi ultimi lavori, pubblicato postumo, affermava: “Il meccanismo genetico è un sistema altamente variabile. La quantità totale di DNA, il numero di cromosomi in cui esso è suddiviso, l’architettura molecolare di quei cromosomi in tutta la loro complessità, il loro comportamento alla meiosi e agli altri stadi iniziali nel ciclo vitale così come tutti gli aspetti della riproduzione variano da specie a specie e da un gruppo di organismi ad un altro. In altri termini, il sistema genetico, che è alla base dell’intero processo evolutivo, è anch’esso andato incontro ad una propria evoluzione”.

Pertanto, si evince come l’analisi citogenetica possa fornire un valido contributo nel comprendere i processi macro- e micro-evolutivi di un dato taxon nell’ambito di un approccio multidisciplinare allo studio dell’evoluzione. Stingo e Rocco (2001) hanno evidenziato come indagini sulla fisiologia, la biochimica e di genetica molecolare (comprendenti anche la cariologia), considerate in chiave cladistica, abbiano fornito un supporto fondamentale alla classica ricerca anatomo-paleontologica. D’altronde, sia Farris (1978) che Dobigny *et al.* (2004) hanno evidenziato come la citogenetica possa contribuire con ulteriori caratteri, non convenzionali, allo studio della filogenesi.

Recentemente è stato ripreso, con rinnovato vigore, il dibattito sul ruolo delle dimensioni del genoma (C-value o Genome Size) nel corso dell’evoluzione e se la presenza di DNA non codificante (bulk DNA), maggiore responsabile dell’entità C-value, abbia o meno un valore adattativo (Gregory ed Hebert, 1999; Petrov, 2001; Gregory , 2004; 2005).

Nel caso degli anfipodi, oggetto della presente tesi, la loro sistematica è stata più volte oggetto di revisioni, sia nell’organizzazione generale che nella definizione delle specie (AA VV (Ruffo ed.), 1982-1998; Bousfield ed Hendrycks, 2002; Tafani *et al.*, 2002; Myers e Lowry, 2003; Serejo, 2004; Myers *et al.*, 2007), tali revisioni sono state prevalentemente causate da una progressiva definizione di parametri sempre più accurati per la distinguere o caratterizzare le specie.

Costa (2004a) sottolinea come l’identificazione sistematica di un anfipode sia un’operazione non sempre semplice, che richiede uno studio approfondito al microscopio dell’anatomia generale e delle appendici. Per tale approccio morfologico sussistono, tuttavia, notevoli difficoltà nell’attribuire gli individui ad una determinata specie, a causa della variabilità intraspecifica e delle generalmente ridotte dimensioni degli organismi, a

cui possono contribuire variazioni nel ciclo ontogenetico e dimorfismo sessuale (Conlan, 1989; 1990).

Le diverse tecniche analitiche della Biologia Molecolare, tra le quali anche la citogenetica, possono costituire un valido supporto alternativo nella definizione dei parametri diagnostici a livello di specie e/o per taxa di rango superiore. Tuttavia, la citogenetica riferibile ai crostacei dell'ordine Amphipoda rappresenta un territorio quasi inesplorato. Già Coleman (1994) sottolineava che problemi legati alle tecniche erano responsabili dello scarso sviluppo delle indagini kariologiche su questi crostacei. Allo stato attuale sono noti pochi dati su alcuni parametri kariologici, relativi ad un centinaio di specie (per una rassegna si vedano: Lop, 1989; Libertini e Lazzaretto, 1993; Coleman, 1994 e citazioni ivi contenute; Salemaa e Kamal'tynov, 1994; Lecher *et al.*, 1995; Libertini e Krapp-Schickel, 2000; Krapp *et al.*, 2006; Rees *et al.* 2007), su le circa 8000 descritte secondo Vader (2003). Il numero di cromosomi è stato descritto per 130 specie, mentre per circa 20 è nota la morfologia del cariotipo (Libertini e Krapp-Schickel, 2000 e citazioni ivi contenute). Per solo 17 specie si è a conoscenza del contenuto di DNA nucleare (Bachmann e Rheinsmith, 1973; Rheinsmith *et al.*, 1974; Libertini *et al.* 2000; Libertini *et al.*, 2003; Krapp *et al.*, 2006; Rees *et al.*, 2007). Riguardo alla citogenetica molecolare, si è a conoscenza della localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore solo per *Jassa marmorata* (Libertini *et al.*, 2000) e la sequenza telomerica è stata caratterizzata per *Gammarus pulex* (Sahara *et al.*, 1999); nessuna specie è stata fino ad ora indagata per quel che riguarda i geni ribosomali minori (5S rDNA). *J. marmorata*, inoltre, è la sola specie per cui è nota la distribuzione dell'eterocromatina costitutiva (Libertini *et al.*, 2000).

Anche se la maggior parte delle specie risulta, al momento, caratterizzata da un complemento aploide di $n=25-26$ cromosomi, ci sono famiglie nelle quali il numero di cromosomi è pressoché costante, come ad esempio i Talitridae e i Niphargidae (Coleman, 1994), ed altre dove esso è ampiamente variabile come nei Gammaridae, Melitidae e Hyalidae (Coleman, 1994; Libertini e Krapp-Schickel, 2000), tale dato, già di per se stesso, testimonia una diversa evoluzione dei parametri citogenetici a livello di genere e specie. Per altro, in molti dei casi studiati per altri taxon, in cui era stata riscontrata un'apparente omogeneità a livello cariotipico con tecniche d'indagine convenzionali, tale uniformità è poi venuta meno non appena sono state impiegate ulteriori tecniche citogenetiche, quali il bandeggio, l'ibridazione *in situ* fluorescente e la valutazione del contenuto di DNA nucleare. Un tipico esempio d'apparente uniformità venuta meno con

l'applicazione di tecniche di bandeggio cromosomico è quello fornito dalle specie di anfibi anuri dei generi *Bufo*, *Litoria*, *Hyla* e *Rana* (King, 1980).

Pertanto, in questa tesi è stato previsto di ampliare la conoscenza a livello citogenetico sugli anfipodi rivolgendosi a specie europee, principalmente della Laguna Veneta e del Nord Atlantico (Islanda) applicando sia tecniche convenzionali, sia molecolari.

Le indagini sono state volte alla definizione d'alcuni parametri citogenetici fondamentali: numero di cromosomi, formula cariotipica, distribuzione dell'eterocromatina, localizzazione di particolari sequenze ripetute sui cromosomi (geni del complesso ribosomale maggiore e minore, repeat telomerici), e quantità di DNA nucleare (Genome Size).

Con l'elaborazione dei dati ottenuti s'intendono formulare ipotesi sull'evoluzione dei parametri citogenetici nei diversi taxa e valutare la possibilità di usare tali caratteri nell'analisi filogenetica, identificando quali possano essere considerati plesiomorfici o apomorfici.

Inoltre, la ricostruzione filogenetica e/o citotassonomica ottenuta in base ai caratteri citogenetici sarà confrontata con quanto ottenuto da un'analogha comparazione basata su caratteri "convenzionali" morfo-ecologici.

MATERIALI E METODI

Durante il corso di questo progetto di ricerca sono state studiate 36 specie di anfipodi provenienti da diverse aree geografiche e da diverse tipologie di ambiente (marino, salmastro, dulciacquicolo e semi-terrestre) (Tab. 1). L'identificazione delle specie è stata eseguita dal Prof. Sandro Ruffo del Museo Civico di Storia Naturale di Verona e dalla dottoressa Traudl Krapp-Schickel del "Zoologisches Forschungsinstitut und Museum A. Koenig" di Bonn (Germania).

Lo schema tassonomico impiegato nella classificazione degli anfipodi fa riferimento, in generale, a quanto proposto dagli Autori di "The Amphipoda of the Mediterranean" (vol 1-4 Ruffo ed., 1982-1998), integrato per le specie atlantiche con Myers *et al.* (2007). Su consiglio degli esperti, la nomenclatura tassonomica degli Hyalidae è in conformità a quanto riportato in Bousfield e Hendrycks (2002) mentre per i Talitridae è stata integrata con quanto proposto da Tafani *et al.* (2002); per il Sottordine Corophiidea si fa riferimento alla revisione di Myers e Lowry (2003).

Le popolazioni del Lago di Garda e di altri siti del Nord Europa, descritte fino ad ora come *Orchestia cavimana* Heller 1865, sono al momento sottoposte ad una revisione sistematica (Ketmaier *et al.* 2003, Ruffo comunicazione personale) e saranno probabilmente attribuite ad una nuova specie (*Orchestia garbinii* n. sp.) geneticamente affine alla tipica *O. cavimana* (De Matthaeis e Ruffo, comunicazione personale). Quindi, la popolazione del Lago di Garda è stata qui riportata come *Orchestia prope cavimana*. Alcuni autori (Stephensen, 1940; Ingolfsson, 1977) attribuiscono lo Hyalidae che vive nella zona intertidale lungo le coste islandesi alla specie *Apohyale nilssonii* Rathke 1843, che è considerata sinonimo di *Apohyale prevostii* Milne Edwards 1830 e, pertanto, così riportata in seguito.

Per le specie indicate come Aoridae sp. e *Gammarus* sp. non è stato possibile identificare con maggiore chiarezza la specie, dal momento che la determinazione è avvenuta su individui femmine e le chiavi tassonomiche si riferiscono principalmente alla morfologia del maschio.

Jassa cadetta (Ischyroceridae) è una specie nuova per la sistematica e la sua descrizione è stata eseguita nel corso del dottorato dalla Dott. Traudl Krapp-Schickel, basandosi sull'identificazione di popolazioni distinte in Laguna di Venezia per mezzo delle analisi carilogiche e dei marcatori RAPD-PCR eseguite nella presente serie di studi.

Tabella 1: quadro riassuntivo relativo alle specie esaminate e ai siti di campionamento

Specie	Sito di campionamento	Ambiente
<i>Ampithoe riedli</i> Schickel, 1968	Laguna di Venezia	Marino
<i>Aoridae</i> sp.	Laguna di Venezia	Marino
<i>Apherusa chiereghinii</i> Giordani-Soika, 1950	Laguna di Venezia	Marino
<i>Apohyale crassipes</i> Heller, 1866	Laguna di Venezia	Marino intertidale
<i>Apohyale prevostii</i> H. Milne Edwards, 1830	Islanda	Marino intertidale
<i>Calliopius laevisculus</i> Krøyer, 1838	Islanda	Marino
<i>Caprella dilatata</i> Krøyer, 1843	Laguna di Venezia	Marino
<i>Caprella equilibra</i> Say, 1818	Laguna di Venezia	Marino
<i>Caprella septentrionalis</i> Krøyer, 1838	Islanda	Marino
<i>Corophium acutum</i> Chevreux, 1908	Laguna di Venezia	Marino
<i>Corophium orientale</i> Schellenberg, 1928	Laguna di Venezia	Marino
<i>Corophium sextonae</i> Crawford, 1937	Laguna di Venezia	Marino
<i>Dexamine spinosa</i> cfr. Montagu, 1813	Laguna di Venezia	Marino
<i>Dexamine thea</i> Boeck, 1861	Islanda	Marino
<i>Dikerogammarus villosus</i> Sowinsky, 1894	Lago di Garda	Dulciacquicolo
<i>Echinogammarus finmarchicus</i> E. Dahl, 1938	Islanda	Marino intertidale
<i>Echinogammarus obtusatus</i> cfr. E. Dahl, 1938	Islanda	Marino intertidale
<i>Echinogammarus olivi</i> H. Milne Edwards, 1830	Laguna di Venezia	Marino intertidale
<i>Erichthonius argenteus</i> Krapp-Schickel, 1993	Laguna di Venezia	Marino
<i>Gammarus aequicauda</i> Martynov, 1931	Laguna di Venezia	Salmastro
<i>Gammarus</i> sp.	Islanda	Marino intertidale
<i>Gammarus oceanicus</i> Segerstråle, 1947	Islanda	Marino intertidale
<i>Ischyrocerus anguipes</i> Krøyer, 1838	Islanda	Marino
<i>Jassa cadetta</i> n. sp.	Laguna di Venezia	Marino
<i>Jassa marmorata</i> Holmes, 1903	Laguna di Venezia	Marino
<i>Microdeutopus anomalus</i> cfr Rathke, 1843	Laguna di Venezia	Marino
<i>Microdeutopus versiculatus</i> Bate, 1856	Laguna di Venezia	Marino
<i>Orchestia prope cavimana</i> Heller, 1865	Lago di Garda	Semi terrestre
<i>Orchestia gammarellus</i> Pallas, 1766	Laguna di Venezia	Semi terrestre
<i>Orchestia mediterranea</i> A. Costa, 1853	Laguna di Venezia	Semi terrestre
<i>Orchestia montagui</i> Aoudouin, 1826	Laguna di Venezia	Semi terrestre
<i>Phtisica marina</i> Slabber, 1769	Laguna di Venezia	Marino
<i>Platorchestia platensis</i> Krøyer, 1845	Laguna di Venezia	Semi terrestre
<i>Sardorchestia pelacaniformis</i> Bellan-Santini e Ruffo, 1986	Sardegna	Semi terrestre
<i>Stenothoe tergestina</i> Nebeski, 1881	Laguna di Venezia	Marino
<i>Talitrus saltator</i> Montagu, 1808	Isola di Creta, Grecia	Semi terrestre

Campionamento

Molte delle specie di anfipodi qui analizzate vivono nel fouling sommerso, biocenosi incrostante che si trova su pali, rocce e su substrati presenti nei fondali (mitili, alghe e spugne). Tali biocenosi sono state rimosse utilizzando un raschietto provvisto di retino e gli animali ricercati al loro interno. Altri anfipodi bentonici, quali i gammaridi di grossa taglia, sono stati catturati a vista mediante un retino. I Talitridi che vivono in zone umide semiterrestri sono stati catturati tramite trappole.

Il campionamento è stato finalizzato principalmente alla cattura di femmine ovigere con embrioni o maschi adulti da destinare alle analisi citogenetiche. Negli anfipodi gli embrioni precoci si sono dimostrati uno dei materiali migliori per ottenere preparati ricchi di cellule in mitosi, mentre gli embrioni in stadio avanzato o maschi immaturi, sono invece materiali ottimali da destinare ad analisi citofluorimetriche (Libertini *et al.* 2000). Il colore e la forma delle uova, e la presenza di strutture particolari, quali l'abbozzo di organi, permette di distinguere tra stadi precoci e stadi avanzati di sviluppo.

Selezione

In prima istanza gli animali sono stati selezionati cercando di individuare femmine ovigere, ossia femmine che presentano la tasca incubatrice con le uova, e maschi di dimensioni non troppo ridotte. Gli organismi sono stati osservati uno ad uno allo stereomicroscopio, in modo da stabilire indicativamente la specie o per lo meno il genere e per valutare la loro idoneità agli esperimenti successivi.

Metodo dell'“Hot Drying”

Sia per gli studi di citogenetica classica che per quelli di citogenetica molecolare, i preparati metafasici sono stati allestiti utilizzando la tecnica dello “Hot Drying” (Libertini *et al.* 2000), che prevede l'allestimento di una sospensione cellulare da proiettare su vetrini preriscaldati. Per l'allestimento dei preparati è stato utilizzato un numero variabile d'individui delle diverse specie studiate (da 5 a 50), in dipendenza della maggiore o minore disponibilità degli animali.

Le femmine ovigere precedentemente selezionate sono state trattate con colchicina alla concentrazione di 10^{-4} M in acqua di mare o dolce. La colchicina è un inibitore del fuso e blocca le cellule in metafase mitotica. La durata del trattamento è stata di circa 3

ore. Al termine del trattamento con colchicina gli animali sono stati sottoposti ad uno shock ipotonico, necessario a favorire il distanziamento tra i cromosomi nelle piastre mitotiche e ad indebolire le forze di coesione tra le cellule. A tal proposito si lascia agire una soluzione ipotonica di KCl 0.56 % (peso/volume) preparata a fresco per una decina di secondi. Per alcune specie è stata utilizzata la gonade maschile (Salemaa, 1979); in questo caso si è proceduto alla dissezione dell'animale e all'isolamento dei testicoli, sottoposti a trattamento ipotonico per circa 2 minuti.

Dopo aver rimosso la soluzione ipotonica i campioni sono stati fissati sottoponendoli a tre successive fissazioni con una miscela di alcool metilico e acido acetico glaciale, nelle proporzioni di 3:1 (Carnoy modificato). Ogni passaggio aveva una durata di circa 30 minuti. Al termine dell'ultima fissazione i campioni sono stati posti in freezer, a -20°C , dove possono essere conservati anche per mesi. Ciononostante, i trattamenti successivi erano preferibilmente svolti nei giorni seguenti, perché nel tempo il materiale può deteriorarsi.

In seguito, da ogni campione di femmina ovigera, le uova sono state distaccate dal corpo materno mediante l'utilizzo di aghi da entomologo. Le uova sono state dilacerate ed è stato aggiunto dell'acido acetico 50%. Analogamente, per i maschi, il testicolo è stato prelevato dal fissativo, dilacerato dopo aver prosciugato il Carnoy e trasformato in una sospensione cellulare mediante l'aggiunta di acido acetico 50%. Il corpo della femmina ovigera da cui erano stati asportati gli embrioni e i frammenti dei maschi dissezionati, sono stati conservati in Etanolo 70 % per una successiva e più precisa determinazione, oppure in Etanolo assoluto per eventuali estrazioni di DNA genomico, finalizzate ad ulteriori analisi genetiche.

Le sospensioni cellulari provenienti da embrioni precoci o testicolo sono state proiettate su vetrini preriscaldati. I preparati così ottenuti sono stati osservati al microscopio a contrasto di fase per valutarne la qualità. Prima di queste operazioni si era provveduto a pulire dei vetrini portaoggetto con acido acetico 50% e a porli su di una piastra termica ad una temperatura di circa 50°C . La buona pulizia e la qualità dei vetrini sono dei fattori importanti che influiscono in maniera determinante sulla qualità dei preparati che si otterranno.

Colorazione convenzionale con Giemsa

Per i preparati giudicati validi, nei giorni immediatamente seguenti l'allestimento, si è proceduto alla colorazione con colorante Giemsa diluito al 5% in tampone fosfato a pH

6.8. La durata della colorazione varia dai 15 ai 30 minuti. Di seguito a tale incubazione si risciacquano in vetrini con acqua corrente e acqua deionizzata; quindi si lasciano asciugare all'aria.

Per la ricerca delle cellule in mitosi e per il conteggio dei cromosomi è stato utilizzato un microscopio Aus Jena Jenamed 2 equipaggiato con una telecamera in bianco e nero a passo C, collegata con un Personal Computer dotato di uno specifico software per l'analisi e l'acquisizione delle immagini (Image Measure, versione 4.04, Microscience Inc., USA). Il numero di cromosomi (aploide e/o diploide) è stato determinato effettuando conteggi su almeno 30 piastre per ciascuna specie presa in esame. Mediante la telecamera sono state acquisite immagini digitalizzate delle piastre giudicate migliori. A partire dalle immagini digitalizzate i cromosomi sono stati ordinati in un carigramma mediante l'uso di un software per il fotoritocco (The GIMP 2.2; Corel Photo Paint 10). I cariotipi sono stati costruiti conformemente alle dimensioni dei cromosomi e la posizione del centromero. La classificazione dei cromosomi si è basata su Levan *et al.* (1964) e l'indice centromerico è stato valutato utilizzando il metodo pratico proposto da Naranjo *et al.* (1983). Sono stati esaminati almeno 5 carigrammi colorati con Giemsa per ciascuna specie.

Bandeggio C

Il bandeggio C dei cromosomi, utile per evidenziare l'eventuale presenza di eterocromatina costitutiva, è stato ottenuto tramite trattamento con Idrossido di Bario e colorazione Giemsa seguendo il metodo di Sumner (1972), riducendo però il trattamento con la soluzione alcalina a 30-60 secondi secondo quanto suggerito da Libertini *et al.* (2000). Su preparati allestiti il giorno stesso della fissazione o invecchiati da 1 a 7 giorni, è stato effettuato un pretrattamento in HCl al 5-6% per 1 ora a temperatura ambiente. I vetrini sono stati quindi risciacquati in H₂O ultra pura (Milli-Q) e immersi in una soluzione di Idrossido di Bario a 50°C per 30-60 secondi. Dopo il trattamento con questa soluzione alcalina si è proceduto ad un abbondante lavaggio in acqua deionizzata seguito da un'incubazione in SSC2X A 60°C per un'ora. I preparati sono stati quindi risciacquati brevemente e lasciati asciugare. Una volta asciutti, si è proceduto con colorazione Giemsa.

Colorazione con Nitrato d'Argento (Ag NOR staining)

La colorazione con Nitrato d'Argento delle regioni organizzatrici del nucleolo (NORs) è stata effettuata con l'usuale metodo di Howell e Black (1980). Questa metodica prevede l'uso di due soluzioni: una soluzione sviluppano colloidale contenente gelatina al 2% (peso/volume) cui viene aggiunto acido formico ad una concentrazione finale dell' 1%; la seconda soluzione contiene Nitrato d'Argento al 50% in acqua deionizzata. Sui vetrini sono stati depositi 25µl della prima soluzione e 50µl della seconda. Quindi sul materiale è stato posto un coprioggetto e il vetrino collocato su una piastra termica a 60-65°C per circa due minuti. Durante tale tempo la soluzione con Argento vira al marrone dorato. Dopo aver tolto il coprioggetto, i vetrini sono stati risciacquati in acqua deionizzata e lasciati asciugare all'aria. In caso di successo dell'esperimento, le zone NOR e i nucleoli apparivano colorati di nero-marrone molto intenso, mentre il resto del materiale nucleare era giallo oro-marrone chiaro. Non sono stati ottenuti risultati eccetto che per *Phtisica marina*.

Colture batteriche e produzione di sonde

La localizzazione cromosomica del complesso ribosomale maggiore è stata effettuata utilizzando una sonda contenente i geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5.8S-28S) e lo spaziatore intergenico di *Drosophila melanogaster* (pDm 238) (Roiha *et al.* 1981) clonati nel plasmide pBR322 di *E. coli* (ceppo JM109). Il clone è stato gentilmente fornito dalle Dottoresse Ana Insua e Josefina Mendez dell'Università di La Coruña (Spagna).

Per ottenere una quantità di sonda sufficiente per numerosi esperimenti, è stato necessario allestire delle midi preparazioni di DNA plasmidico (Sambrook *et al.* 1989). Il DNA plasmidico è stato isolato da colture batteriche di 20-50ml tramite un trattamento con alcali ed SDS (Sambrook *et al.* 1989).

Il DNA estratto è stato quantificato mediante elettroforesi su gel di agarosio confrontando l'intensità luminosa delle bande relative al DNA plasmidico con l'intensità luminosa delle bande di un marker di pesi molecolari appropriato, quindi precipitato mediante Etanolo/Sodio Acetato e risospeso in H₂O ultra pura sterile (Milli-Q) ad una concentrazione di 1µg/16µl e conservato a -20°C. Il DNA plasmidico risultante, purificato da DNA genomico e da residui di varia natura, è adatto alla marcatura con diversi apteni. Una piccola frazione della coltura batterica è stata conservata a -80°C in una soluzione contenente glicerolo al 50% avente funzione crioprotettiva.

Sonda 5S rDNA

Nei tentativi di localizzazione dei cluster genici 5S rDNA (sub-unità minore dei geni ribosomali), le sonde sono state ottenute tramite PCR utilizzando come stampo il DNA genomico di diverse specie di anfipodi (*Gammarus oceanicus*, *Jassa marmorata* e *Apohyale prevostii*) e due primers derivati dalla sequenza del 5SrDNA dell'isopode *Proasellus coxalis* Dolfus, 1892 (F 5'-GAAAGCACCACTTCTCGTCC-3'; R 5'-AACGTGGTATGGCCGTTGAC-3'), disegnati in modo che fosse amplificato anche lo spaziatore intergenico (Pelliccia *et al.* 1998). L'amplificazione è stata effettuata seguendo il protocollo di Mandrioli *et al.* (2000) utilizzando però una temperatura di annealing inferiore, pari a 57°C. I prodotti dell'amplificazione, in genere frammenti di DNA delle dimensioni di circa 220bp comprendenti una copia della regione codificante e una copia dello spaziatore intergenico, oppure prodotti di dimensioni maggiori (circa 700bp) comprendenti più copie di queste sequenze, sono stati quantificati dopo elettroforesi, precipitati mediante Etanolo/Sodio Acetato, risospesi in H₂O ultra pura sterile (Milli-Q) ad una concentrazione di 1µg/16µl e conservati a -20°C.

Sonda telomerica

Per identificare il repeat telomerico in diverse specie di anfipodi, sono state preparate due sonde tramite PCR, utilizzando i primers pentamerici F (TTAGG)₅ ed R (CCTAA)₅ ed i primers esamerici R (TTAGGG)₆ ed F (CCCTAA)₆ in assenza di DNA stampo, come descritto da Ijdo *et al.* (1991). Questa metodica prevede che l'appaiamento (annealing) sfalsato dei primers fornisca lo stampo a singolo filamento per l'estensione da parte della *Taq* polimerasi. I primers hanno quindi una funzione di DNA stampo nei primi cicli di PCR, mentre i filamenti neoformati servono sia da primers che da stampo per i cicli successivi di amplificazione. Questo porta alla produzione di un insieme (pool) di prodotti d'amplificazione di dimensioni variabili tra 100bp e oltre 25kb, che, una volta marcati, serviranno come sonda negli esperimenti di ibridazione.

Marcatura delle sonde mediante Nick Translation

Il DNA sonda ottenuto in precedenza è stato marcato tramite Nick Translation seguendo il protocollo indicato dal fornitore. Per le reazioni sono stati utilizzati i kit commerciali Nick Translation Mix (Roche Applied Science) e BioNick Labeling System

(Invitrogen). Come nucleotidi marcati sono stati utilizzati Digossigenina-11-dUTP (Roche) e Biotina-14-dATP (Invitrogen) che vengono incorporati in ragione del 30%-35% rispetto ai loro competitori naturali, il dTTP e dATP. La sonda marcata prodotta viene infine risospesa ad una concentrazione di 40ng/μl in un mix di ibridazione contenente Formamide purissima e Destran Solfato e conservata a -20°C.

Ibridazione *in situ* fluorescente (FISH)

Gli esperimenti d'ibridazione con le varie sonde sono stati eseguiti seguendo il protocollo tratto da: "Nonradioactive *In Situ* Hybridization Application Manual" Roche Applied Science (2003) con alcune modifiche. Per ciascun vetrino sono stati utilizzati circa 100ng di sonda marcata. Il fluorocromo utilizzato nel passaggio di rilevazione della marcatura con digossigenina è la "fluoresceina isotiocianato" (FITC) che presenta un massimo di assorbimento a $\lambda=495\text{nm}$ ed un massimo di emissione a $\lambda=523\text{nm}$ (verde); mentre per la rilevazione della marcatura con biotina è stato utilizzato il fluorocromo Cy3 (Cianina 3) che presenta un massimo di assorbimento a $\lambda=550\text{nm}$ ed un massimo di emissione a $\lambda=570\text{nm}$ (rosso). I vetrini sono stati montati in soluzione antifade AF1 (Citifluor) contenente, in aggiunta, 2μg/ml di DAPI, controcolorante fluorescente che consente di visualizzare i cromosomi in blu sottoponendo il preparato ad illuminazione ultravioletta. DAPI presenta un massimo di assorbimento a $\lambda=358\text{nm}$ ed un massimo di emissione a $\lambda=461\text{nm}$ (blu). L'analisi dei risultati è stata compiuta con microscopio JenaMed (Carl Zeiss Jena, Germany) equipaggiato dei set di filtri per la fluorescenza in luce visibile e ultravioletta, e di una fotocamera digitale Canon EOS 10D. Sono state fotografate piastre con cromosomi ben contrastati, ben distinguibili e con segnali d'ibridazione evidenti. Sono state acquisite, in luce ultravioletta, immagini delle piastre metafasiche colorate con DAPI e, in luce blu o verde, immagini delle stesse metafasi marcate con FITC (colorate in giallo-verde) o Cy3 (in rosso). Con l'ausilio del software Adobe Photoshop Elements 2.0 è stata eseguita la sovrapposizione delle immagini con lo scopo di evidenziare la corretta posizione, il numero e la morfologia dei segnali d'ibridazione sui cromosomi.

Estrazione del DNA genomico

Al fine di produrre le sonde dei cluster genici 5S rDNA e per confrontare le popolazioni di *Jassa* sulla base di marcatori RAPD si è proceduto all'estrazione del DNA genomico delle seguenti specie di anfipodi: *Gammarus oceanicus*, *Apohyale prevostii*, *Jassa marmorata* e *Jassa cadetta* n. sp.

L'estrazione è stata effettuata con il kit "Sigma GenElute Mammalian Genomic Miniprep Kit" seguendo il protocollo indicato dal produttore. Ultimata la procedura d'estrazione è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio per valutare se il DNA genomico estratto si era degradato durante le operazioni. Si è proceduto quindi con la precipitazione del DNA con Sodio Acetato ed Etanolo assoluto e alla sua quantificazione mediante spettrofotometro. Di seguito alla quantificazione, il DNA è stato riprecipitato e risospeso in H₂O ultra pura sterile (Milli-Q) ad una concentrazione di 50ng/μl. La sospensione ottenuta è stata conservata a -20°C.

RAPD-PCR

In questo lavoro è stata utilizzata RAPD-PCR per evidenziare ulteriori ed eventuali differenze in base al pattern elettroforetico di marcatori molecolari tra due popolazioni di *Jassa* apparentemente indistinguibili dal punto di vista morfologico, ma cariologicamente differenziate. Il protocollo RAPD-PCR è stato eseguito seguendo il metodo proposto da Costa *et al.* (2004a, 2004b), applicato con successo su *Gammarus locusta*, con alcune modifiche, utilizzando il kit PCR Ready-Mix Sigma. Per gli esperimenti sono stati utilizzati 10 campioni della popolazione di *Jassa* a 12 cromosomi e 6 campioni di *Jassa* a 10 cromosomi, in seguito identificate come appartenenti a due specie diverse: *J. marmorata* Holmes e *J. cadetta* n. sp. Tutti gli individui analizzati erano di sesso maschile. Da essi erano stati asportati in precedenza i testicoli al fine di allestire preparati metafasici utili a verificare con certezza il numero di cromosomi.

È stata preliminarmente effettuata una prova con un singolo campione per ciascuna popolazione di *Jassa* ed un solo primer (A2) per stabilire i parametri ottimali di temperatura e di concentrazione di MgCl₂ in un termociclatore a gradiente (Eppendorf Mastercycler gradient). È stato verificato il protocollo a due diverse temperature di annealing (37°C e 42°C) e due diverse concentrazioni di MgCl₂ (3mM e 2,5mM). Il test ha dato migliori risultati con una temperatura d'annealing di 37°C e una concentrazione di MgCl₂ 2,5mM. Dopo la messa a punto, sono stati utilizzati 8 primers su tutti i campioni disponibili e gli esperimenti sono stati eseguiti due volte. I primers sono stati scelti tra quelli utilizzati con successo da Costa *et al.* (2004b) su *Gammarus locusta* (Tab. 2)

Tabella 2: denominazione e sequenza dei primers utilizzati per RAPD-PCR

Primer	Sequenza
A-2	5'-TGCCGAGCTG-3'
A-9	5'-GGGTAACGCC-3'
A-10	5'-GTGATCGCAG-3'
A-16	5'-AGCCAGCGAA-3'
D-2	5'-GGACCCAACC-3'
D-3	5'-GTCGCCGTCA-3'
D-5	5'-TGAGCGGACA-3'
D-7	5'-TTGGCACGGG-3'

Le reazioni di PCR sono state eseguite in provette da 0,2µl e la miscela di reazione aveva, per ciascun campione, un volume finale di 25µl. Il programma PCR definitivo consisteva di una denaturazione iniziale a 95°C per 5' seguita da 40 cicli d'amplificazione (denaturazione a 93°C per 40 secondi, annealing a 37°C per 1 minuto, estensione a 72°C per 1 minuto) e di un'estensione finale a 72°C per 6 minuti.

L'elettroforesi per il controllo del risultato dell'amplificazione è stata effettuata su gel di agarosio al 2,5% in TAE1X e la corsa elettroforetica è stata condotta a 90V per 2,5h. Nei gel d'agarosio sono fatti correre anche un controllo negativo ed un marker per i pesi molecolari (Sigma Direct Load 50-3000bp).

Determinazione del contenuto di DNA nucleare

Il contenuto di DNA nucleare (di seguito indicato come GS) è stato determinato mediante citometria a flusso su sospensioni cellulari da embrioni tardivi o da un insieme di organi interni di campioni adulti. La sospensione cellulare è stata preparata seguendo il metodo di Libertini *et al.* (2000). È stato utilizzato un citometro con lampada allo Xenon Mercurio (BRYTE-HS, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA). Come standard interno sono stati aggiunti alla sospensione cellulare di anfipodi, eritrociti di sangue periferico di pollo (2C GS = 2,5pg) (Tiersch *et al.*, 1989). I nuclei sono stati colorati con Ioduro di Propidio. Sono state esaminate almeno 3000 cellule per campione e il DNA index (valore medio in canali del picco G1/G0 delle cellule dell'anfipode fratto il medesimo valore per le cellule del pollo) è stato valutato dopo elaborazione dei dati di fluorescenza per mezzo del software Modifit (Verity Software House Inc., Topsham, Maine, USA). La media degli indici del DNA dei campioni, moltiplicato per la metà del contenuto in picogrammi del DNA nucleare dello standard, fornisce il valore aploide (C-value) assegnato a ciascuna specie. I dati sono stati riportati come media ± deviazione standard.

RISULTATI

CITOGENETICA

Metodologia

Uno dei risultati conseguiti dalla presente tesi è stato quello di affinare le tecniche per eseguire l'ibridazione *in situ* fluorescente su preparati cromosomici prevalentemente allestiti da embrioni precoci. Questi preparati, in genere, presentano una residua quantità di tuorlo e materiale citoplasmatico che limita la diffusione delle sonde di DNA marcate, riducendo l'efficienza dell'ibridazione, rende più flebile la controcolorazione con DAPI e origina un maggiore rumore di fondo dovuto al legame con gli anticorpi fluorescenti. Si è ovviato a tale problema con una pre-trattamento con pepsina, di durata variabile da 1' a 10', secondo la quantità di materiale residuo visibile nei preparati. Inoltre, rispetto ai protocolli standard comunemente utilizzati, è stato necessario ridurre la temperatura di denaturazione del DNA per preservare l'aspetto dei cromosomi. Questa serie d'accorgimenti ha consentito di ottenere un sostanziale miglioramento della qualità dei risultati, portando, nella maggior parte dei casi, ad una chiara localizzazione dei frammenti di DNA ibridati.

Per ciascuna delle specie analizzate I risultati cariologici sono riportati in forma di schede, organizzate secondo l'ordine alfabetico delle superfamiglie, esponendo prima i dati relativi al Sottordine Gammaridea seguito dal Sottordine Corophiidea.

SOTTORDINE GAMMARIDEA

***Dexamine spinosa* cfr. Montagu, 1813**

Superfamiglia:	Dexaminoidea
Famiglia:	Dexaminidae
Genere:	<i>Dexamine</i>
Specie:	<i>Dexamine spinosa</i> cfr.

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

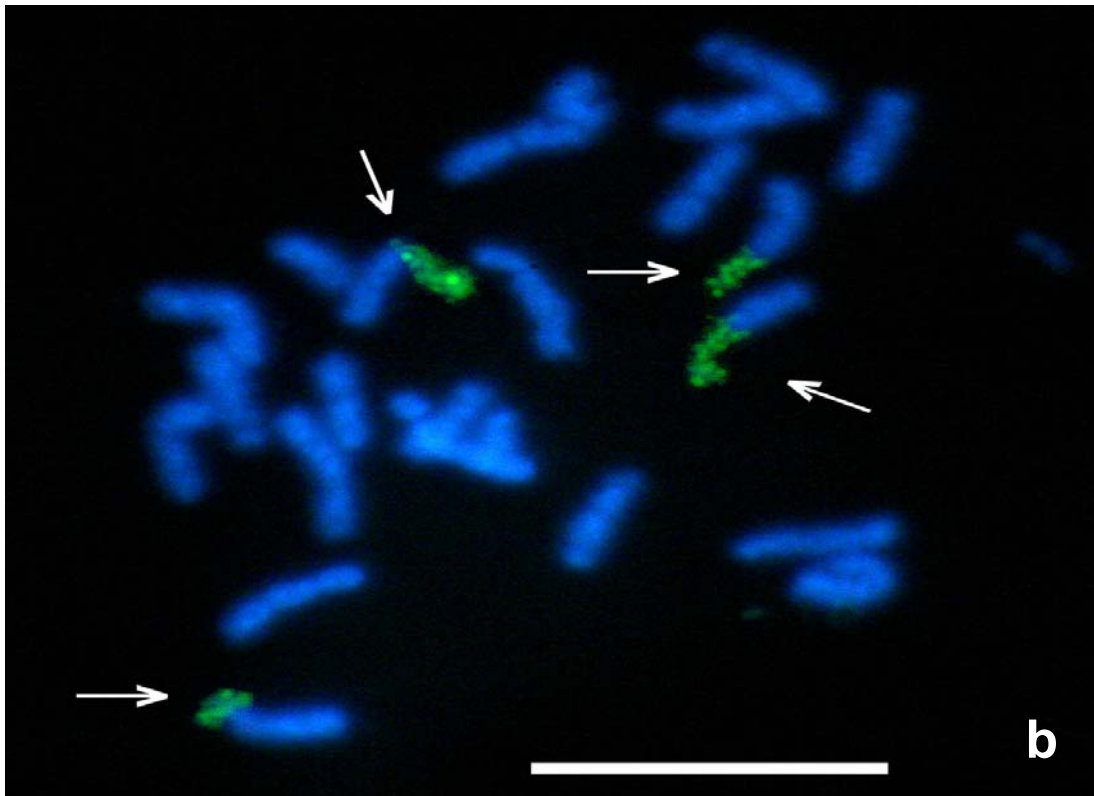
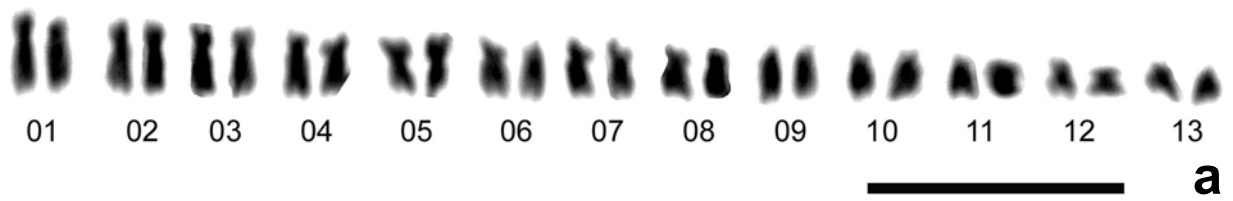
In tutte le metafasi osservate è stato riscontrato un numero diploide di cromosomi $2n=26$ e 13 coppie di cromosomi, di cui 11 a centromero mediano e 2 a centromero sub-terminale (Fig. 1a, coppie 9 e 13), ne costituiscono il cariotipo, pertanto il numero fondamentale delle braccia cromosomiche è $FN=48$.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

I geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) risultano essere localizzati in posizione terminale sul braccio corto di 4 elementi di media grandezza (Fig. 1b), la cui posizione del centromero non è chiaramente identificabile. Per questo parametro sono state esaminate 8 metafasi mitotiche allestite a partire da 2 individui.

Genome Size: $0,95 \pm 0,02$ pg

Tavola 1 *Dexamine spinosa*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcromazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Dexamine thea* Boeck, 1861**

Superfamiglia:	Dexaminoidea
Famiglia:	Dexaminidae
Genere:	<i>Dexamine</i>
Specie:	<i>Dexamine thea</i>

Caratteristiche cariologiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

In questa specie il conteggio del numero di cromosomi effettuato su piastre in metafase mitotica ha fornito un numero diploide di cromosomi pari a $2n=24$ (Fig. 2a). Il cariotipo risulta essere costituito da 11 coppie di cromosomi a centromero mediano (meta- e submetacentrici) e 1 coppia di cromosomi subtelocentrici (Fig. 2a, paio n°5), corrispondente ad un “fundamental number” di braccia cromosomiche FN=46.

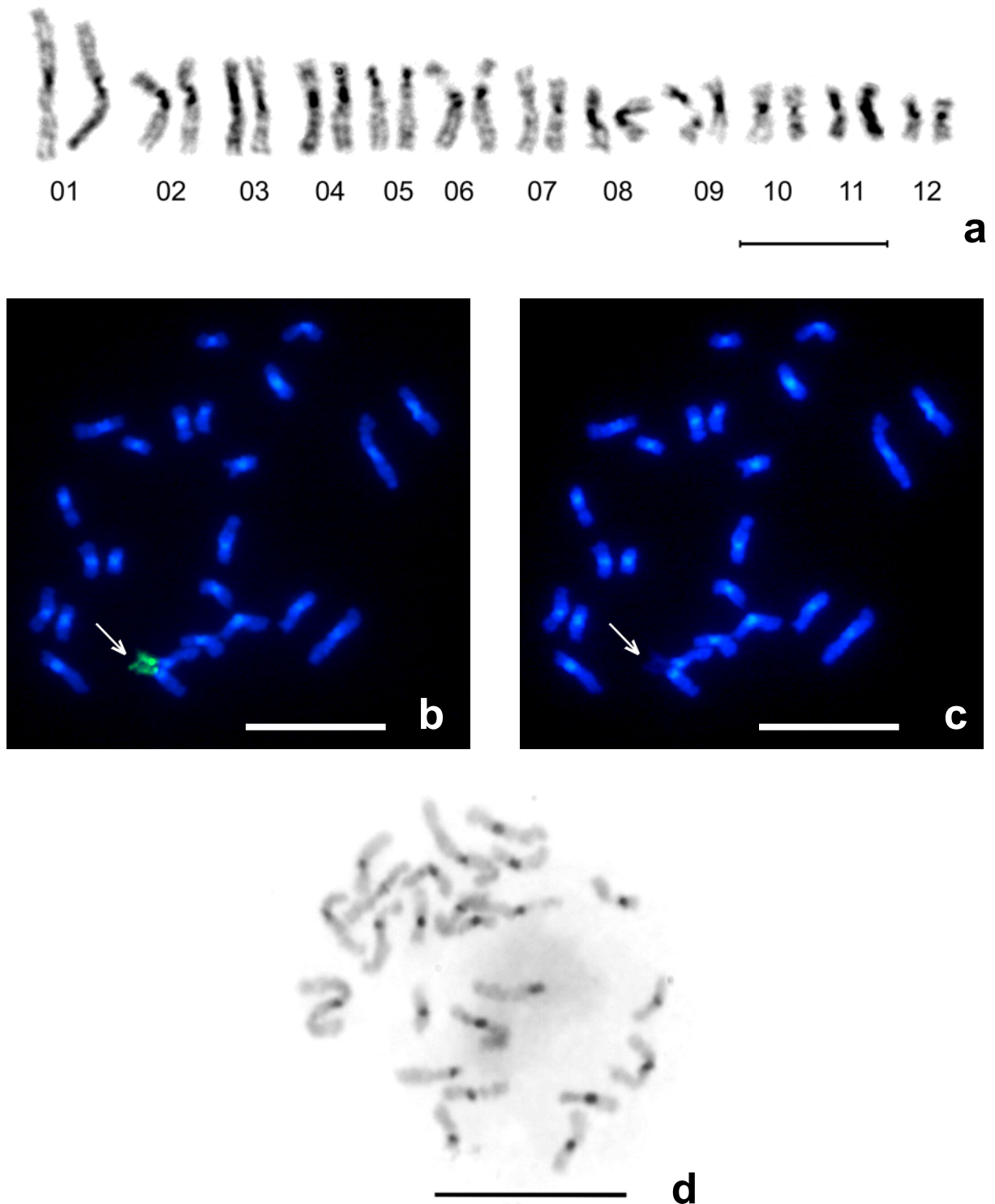
Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

L'analisi di 8 piastre metafasiche, ottenute da 2 femmine ovigere, sottoposte a ibridazione *in situ* fluorescente ha permesso di localizzare i geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) in posizione terminale sul braccio corto di una coppia di cromosomi (Fig. 2b). Come si vede dall'immagine della stessa piastra con la sola colorazione con DAPI le NOR sono in corrispondenza di costrizioni secondarie (Fig. 2c, freccia); si denota, inoltre, come tutte le zone centromeriche siano più intensamente colorate.

Bandeggio C

Il bandeggio C evidenzia la presenza blocchi di eterocromatina costitutiva localizzati a livello centromerico in tutti i cromosomi (Fig. 2c). La corrispondenza di questo risultato con quanto evidenziato a livello centromerico dal DAPI, indicherebbe queste zone come ricche in Adenina-Timina.

Tavola 2 *Dexamine thea*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, bandeggio con DAPI (la freccia indica le costrizioni secondarie dei due elementi NOR)

d: metafase mitotica embrionale, bandeggio C

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Apherusa chiereghinii* Giordani-Soika, 1950**

Superfamiglia:	Eusiroidea
Famiglia:	Calliopiidae
Genere:	<i>Apherusa</i>
Specie:	<i>Apherusa chiereghinii</i>

Caratteristiche carilogiche

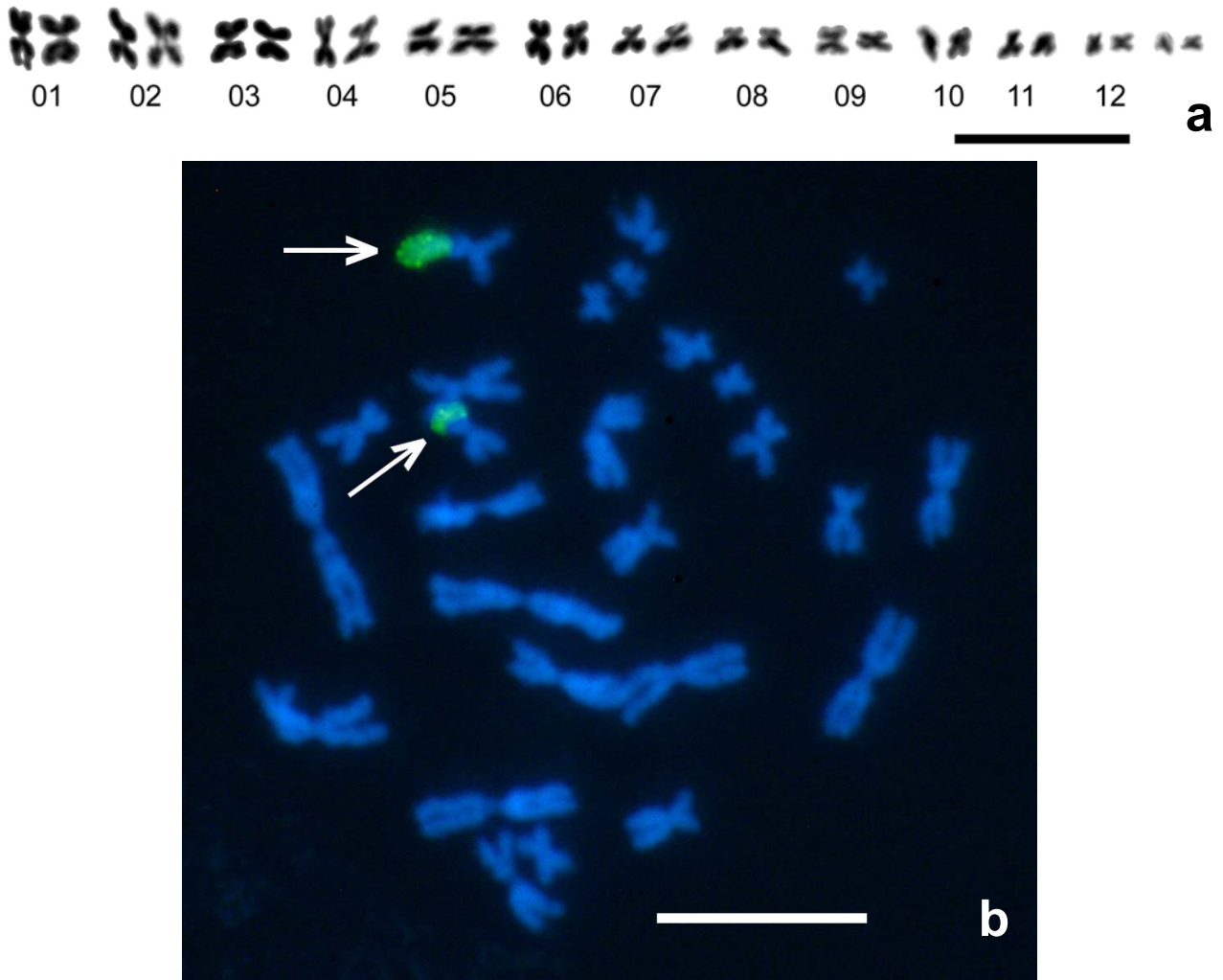
Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Questa specie risulta caratterizzata da un numero diploide di cromosomi $2n=26$ e 13 coppie di cromosomi a centromero mediano ne costituiscono il cariotipo, Il corrispondente numero fondamentale di braccia cromosomiche è pari a $FN=52$ (Fig. 3a). Le lunghezze dei cromosomi decrescono in modo graduale.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

Dall'analisi di 34 metafasi mitotiche, ottenute da 3 individui, su cui è stata eseguita la FISH con i geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA), si evince che tali geni risultano essere localizzati in posizione terminale sul braccio corto di una coppia di omologhi metacentrici di media grandezza (Fig. 3b). In tutte le metafasi i segnali di ibridazione sono sempre di dimensioni nettamente diverse a dimostrare una sostanziale differenza, nei due omologhi, del numero di ripetizioni nei cluster genici.

Tavola 3 *Apherusa chiereghini*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10 μ m

***Calliopius laevisculus* Krøyer, 1838**

Superfamiglia:	Eusiroidea
Famiglia:	Calliopidae
Genere:	<i>Calliopius</i>
Specie:	<i>Calliopius laevisculus</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

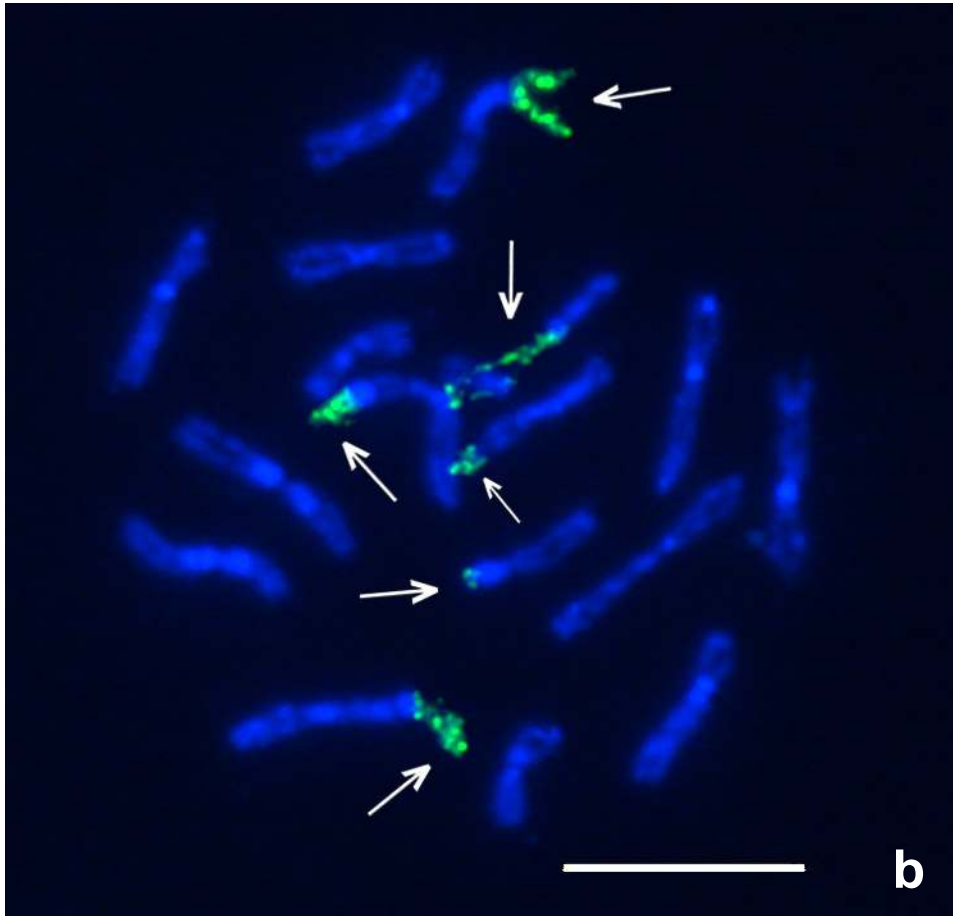
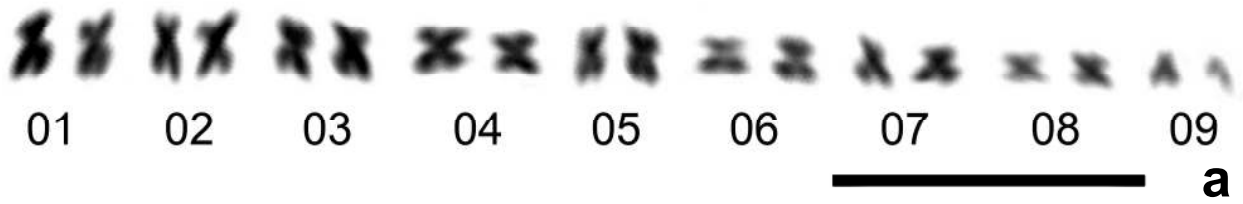
È stato riscontrato un numero diploide di cromosomi $2n=18$ (Fig. 4a) e il cariotipo risulta essere costituita da 9 coppie di cromosomi, di cui 8 coppie di metacentrici ed una, la più piccola, di cromosomi subtelo-submetacentrici (Fig. 4a, coppia 9), corrispondente ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=34-36$. Salemaa (1988) aveva già riportato un numero aploide di 9 per questa specie, a conferma del presente risultato.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

Dall'osservazione di 33 piastre sottoposte a FISH provenienti da 3 individui, le NOR risultano essere localizzate in posizione terminale di 4-6 cromosomi a centromero mediano (Fig. 4b).

Genome Size: $2,84 \pm 0,02$ pg

Tavola 4 *Calliopiopus laevisculus*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Dikerogammarus villosus* Sowinsky, 1894**

Superfamiglia:	Gammaroidea
Famiglia:	Gammaridae
Genere:	<i>Dikerogammarus</i>
Specie:	<i>Dikerogammarus villosus</i>

Caratteristiche cariologiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

In questa specie sono stati impiegati preparati provenienti da testicolo che sono stati esclusivamente impiegati in esperimenti d'ibridazione *in situ*. Nelle piastre in metafase I spermatocitaria si sono riscontrati più frequentemente 26 bivalenti (Fig. 5a,b) e nelle mitosi spermatogoniali 52 cromosomi (Fig. 5c), gli elementi colorati con DAPI hanno sempre presentato le zone centromeriche come più intensamente colorate.

Nel cariotipo, per quanto dedotto dalla mera osservazione delle mitosi spermatogoniali, sono presenti in maggioranza cromosomi a centromero mediano.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

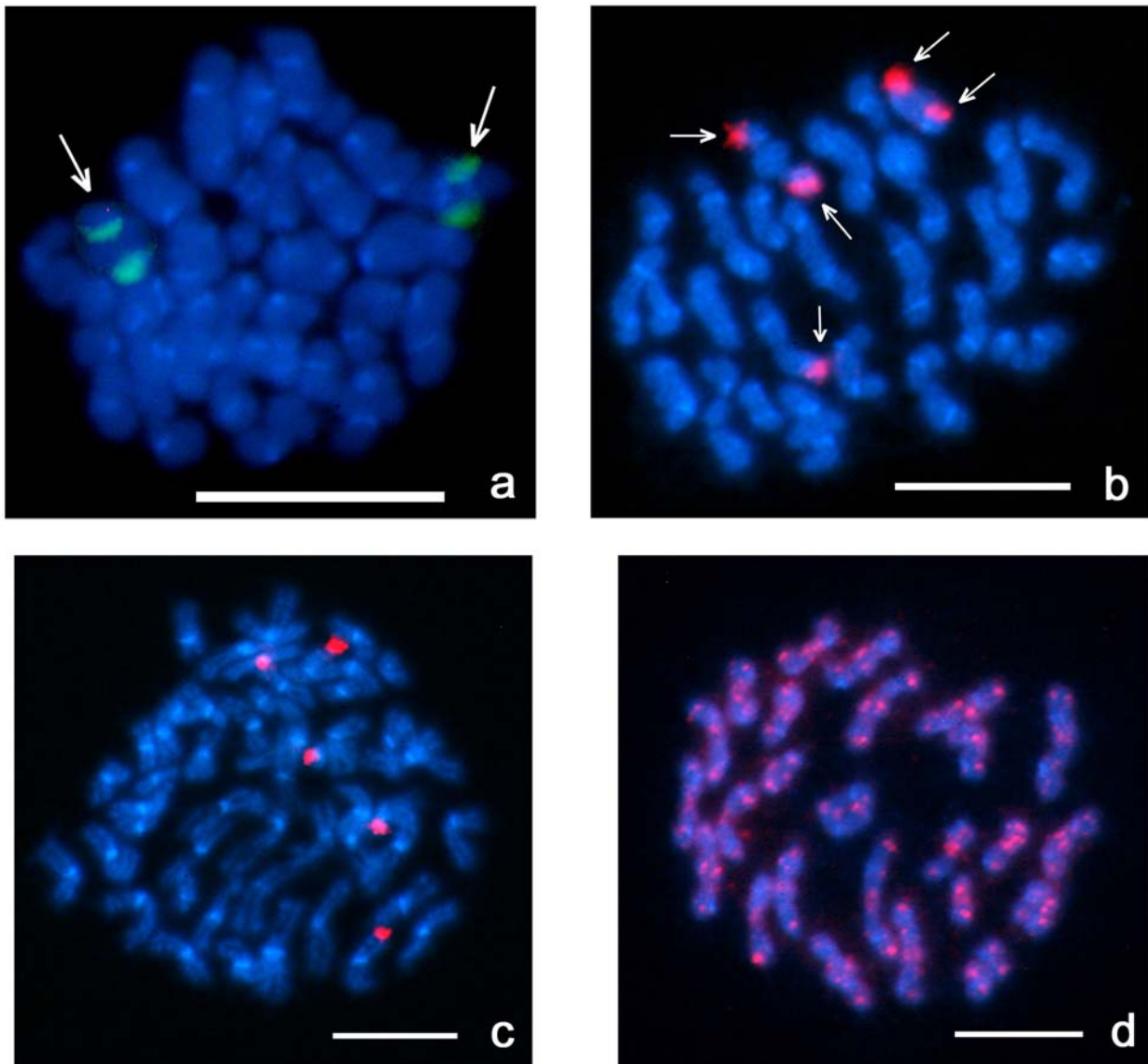
Per due individui si sono analizzati tramite FISH i bivalenti spermatocitari. In uno di essi (Fig. 5a, 24 nuclei osservati) due bivalenti risultano positivi all'ibridazione e ciascun elemento presenta due segnali contrapposti; nell'altro (Fig. 5b, 24 nuclei osservati) oltre ai due su citati bivalenti, un terzo elemento presenta un singolo segnale. La possibilità che il numero massimo di cromosomi interessati dalle NOR possa essere dispari e uguale a 5 è confermato dalle metafasi spermatogoniali di un terzo individuo (Fig. 5c, 7 nuclei osservati) nelle quale sono proprio 5 gli elementi che hanno ibridato con la sonda ribosomale.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

La sonda (TTAGG)_n ha ibridato positivamente tutti i bivalenti metafasici fornendo segnali multipli e cospicui in ciascun bivalente (Fig. 5d). Sono state analizzate 7 piastre in metafase spermatocitaria I allestite a partire da un singolo individuo.

Genome Size: 5,32 ± 0,07 pg

Tavola 5 *Dikerogammarus villosus*



a: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

b: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: mitosi spermatogoniale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore)

d: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcromazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10μm

***Echinogammarus finmarchicus* E. Dahl, 1938**

Superfamiglia:	Gammaroidea
Famiglia:	Gammaridae
Genere:	Echinogammarus
Specie:	<i>Echinogammarus finmarchicus</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Anche in questa specie sono stati impiegati preparati provenienti da testicolo che sono stati esclusivamente impiegati in esperimenti d'ibridazione *in situ*. Nelle piastre in metafase I spermatocitaria si sono riscontrati più frequentemente 26 bivalenti (Fig. 6a) e nelle mitosi spermatogoniali 52 cromosomi (Fig. 6b), colorati con DAPI gli elementi esibiscono le zone centromeriche come più intensamente colorate. Nel cariotipo, dedotto dalle mitosi spermatogoniali, sono presenti in maggioranza cromosomi a centromero mediano.

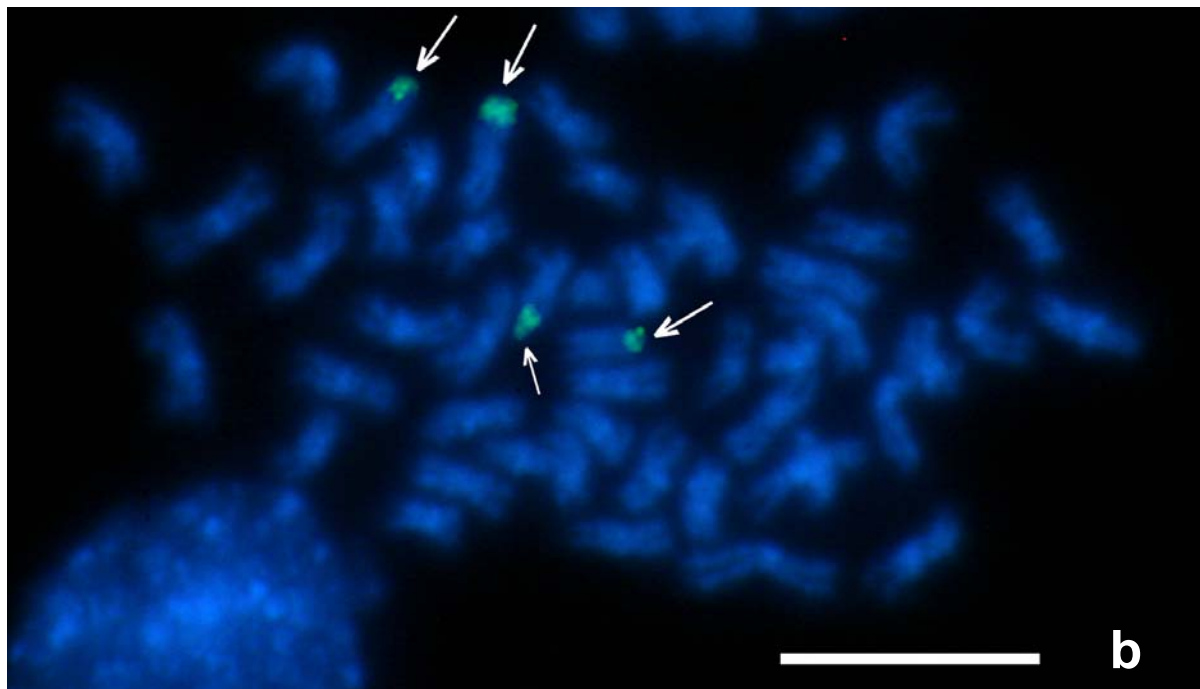
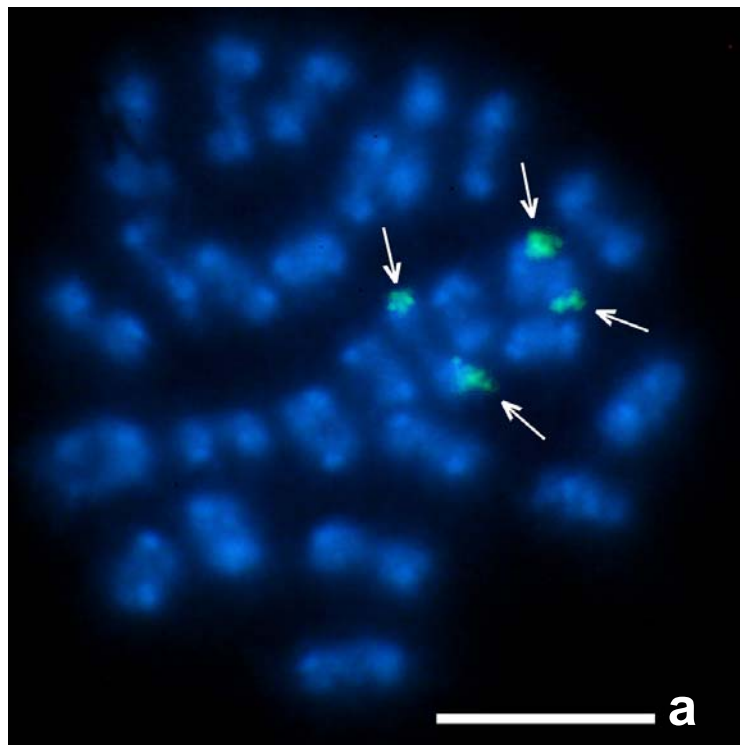
A conferma dei dati ottenuti, Orian e Callan (1957) avevano già riportato il numero aploide $n = 26$ per questa specie.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

I geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) risultano localizzati in 2 bivalenti dando in ciascuno due larghi segnali contrapposti (18 nuclei esaminati appartenenti ad 1 maschio), (Fig. 6a). Tale dato è confermato dalla presenza nelle mitosi spermatogoniali (Fig. 6b) di 4 cromosomi a centromero mediano (2 nuclei esaminati) che presentano segnali di ibridazione, in posizione terminale, sul braccio corto.

Genome Size: $7,00 \pm 0,05$ pg

Tavola 6 *Echinogammarus finmarchicus*



a: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

b: mitosi spermatogonale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10 μ m

***Echinogammarus obtusatus* cfr. E. Dahl, 1938**

Superfamiglia:	Gammaroidea
Famiglia:	Gammaridae
Genere:	<i>Echinogammarus</i> (Sinonimo <i>Eulimnogammarus</i>)
Specie:	<i>Echinogammarus obtusatus</i> cfr.

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

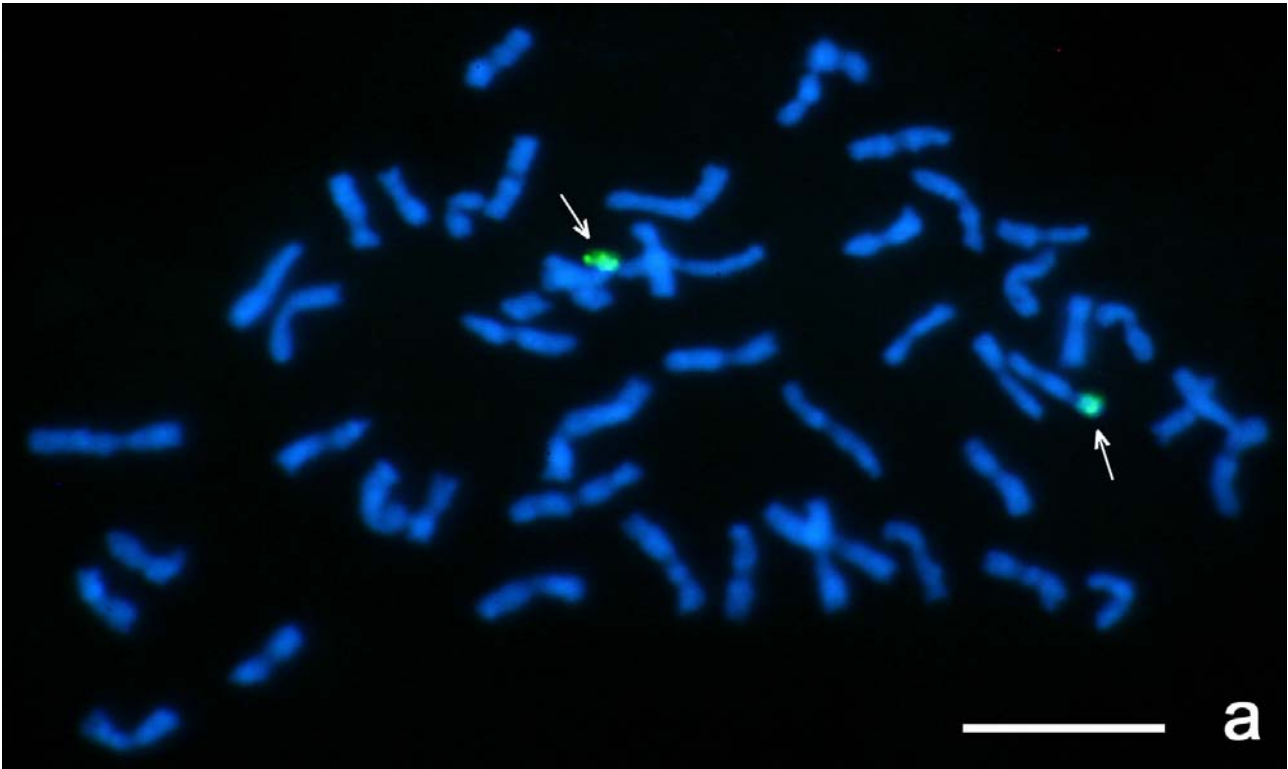
In questa specie sono stati impiegati preparati provenienti da embrioni che sono stati esclusivamente impiegati in esperimenti d'ibridazione *in situ*.

Nelle 15 piastre metafasiche osservate (Fig. 7a) è stato riscontrato un numero diploide di cromosomi $2n=52$, il cariotipo appare composto in prevalenza da cromosomi a centromero mediano. Per questa specie era già stato riportato il dato relativo al numero aploide di cromosomi pari a $n = 26$ (Orian e Callan, 1957) e il dato qui presentato lo conferma.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

I geni del complesso ribosomale maggiore sono localizzati in posizione terminale di una coppia di omologhi, molto probabilmente a centromero mediano (Fig. 7a, frecce).

Tavola 7 *Echinogammarus obtusatus*



a: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10 μ m

***Echinogammarus olivii* H. Milne Edwards, 1830**

Superfamiglia:	Gammaroidea
Famiglia:	Gammaridae
Genere:	<i>Echinogammarus</i>
Specie:	<i>Echinogammarus olivii</i>

Caratteristiche cariologiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Sono stati analizzate sia metafasi mitotiche (da embrioni e spermatogoniali) sia metafasi I spermatocitarie che sono state impiegate esclusivamente per esperimenti d'ibridazione *in situ*. Nelle 18 metafasi mitotiche osservate, ottenute da 3 femmine ovigere, è stato riscontrato un numero diploide di cromosomi $2n=46$ (Fig. 8a). Nelle piastre in metafase I (19 nuclei esaminati ottenuti da 2 individui) sono stati sempre riscontrati 23 bivalenti (Fig. 8b) confermando il dato ottenuto dalle mitosi. Anche in questa specie il cariotipo, dedotto dalle metafasi mitotiche, sembra in prevalenza essere costituito da cromosomi a centromero mediano.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

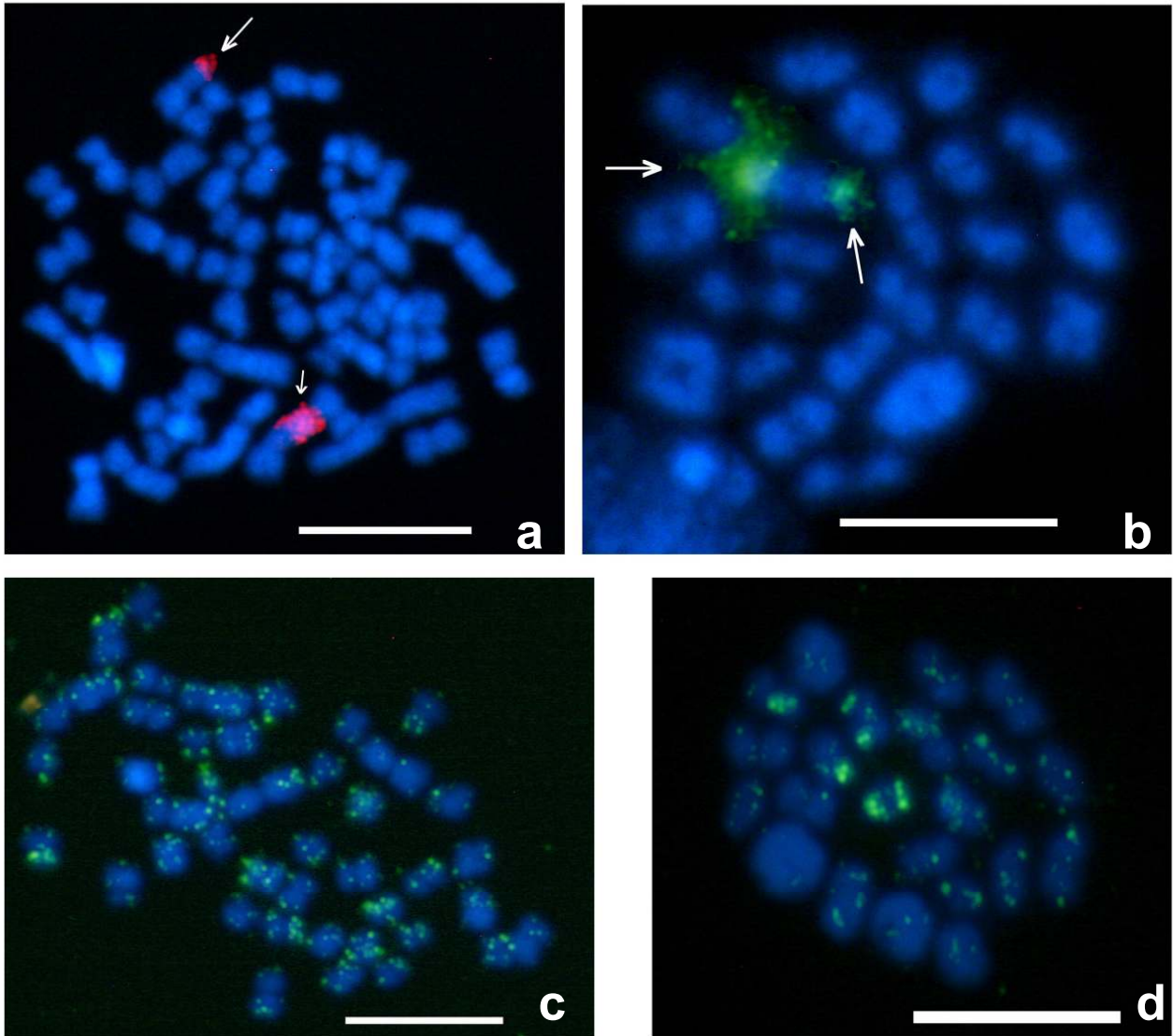
Nelle metafasi mitotiche, la sonda di 18S-5,8S-28S rDNA ha sempre ibridato in posizione terminale sul braccio più lungo di una coppia di omologhi a centromero mediano, in corrispondenza di una zona di cromatina decondensata (osservabile nella medesima piastra con la sola colorazione DAPI) (Fig. 8a). Nelle metafasi I spermatocitarie (Fig. 8b), confermando la precedente osservazione, un unico bivalente è interessato da questi geni. I due segnali di ibridazione sono sempre di dimensioni notevolmente differenti, indicando cluster genici contenenti un numero di repeats nettamente diverso negli omologhi. Per questo parametro sono state valutate positivamente 17 piastre metafasiche allestite a partire da 3 femmine e 19 piastre in metafase spermatocitaria I allestite a partire da 2 maschi.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

La sonda $(TTAGG)_n$ ha ibridato positivamente sia sulle metafasi mitotiche (Fig. 8c) che sui bivalenti metafasici (Fig. 8d), originando in generale segnali di piccole dimensioni, ma in 4 cromosomi (o 2 bivalenti) i segnali sono sempre risultati più marcati. Per questo parametro sono state analizzate 8 piastre in metafase mitotica allestite a partire da 1 femmina e 10 piastre in metafase I spermatocitaria ottenute da 2 maschi.

Genome Size: $2,25 \pm 0,04$ pg.

Tavola 8 *Echinogammarus olivii*



- a:** metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)
b: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)
c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)
d: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Gammarus aequicauda* Martynov, 1931**

Superfamiglia:	Gammaroidea
Famiglia:	Gammaridae
Genere:	<i>Gammarus</i>
Specie:	<i>Gammarus aequicauda</i>

Caratteristiche cariologiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Sono stati eseguiti i conteggi su 21 piastre metafasiche ottenute dagli embrioni di 3 femmine ovigere e il numero diploide di cromosomi riscontrato più frequentemente è stato $2n=52$. Il cariotipo risulta essere costituito da 26 coppie di cromosomi a centromero mediano (m-sm) per un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=104$ (Fig. 9a).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

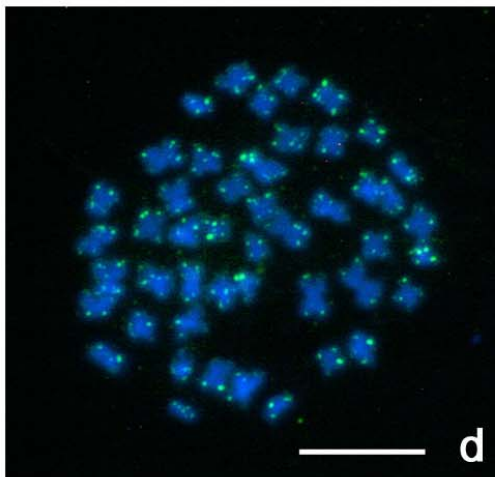
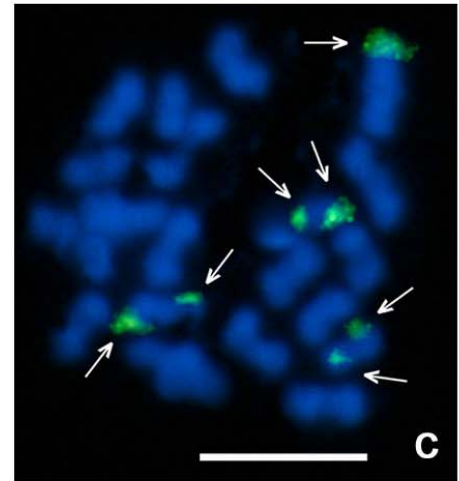
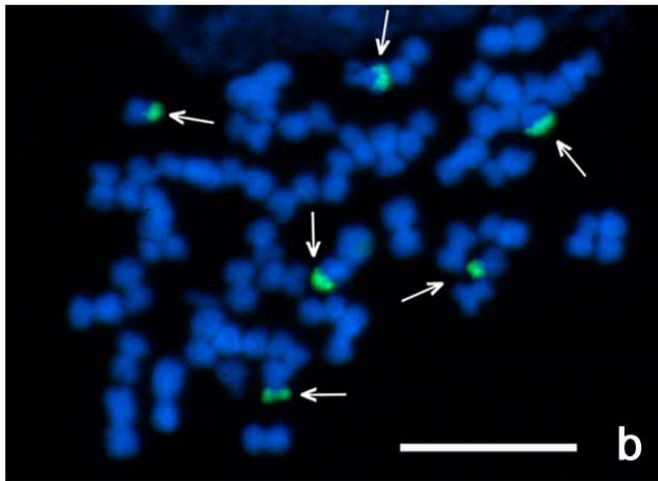
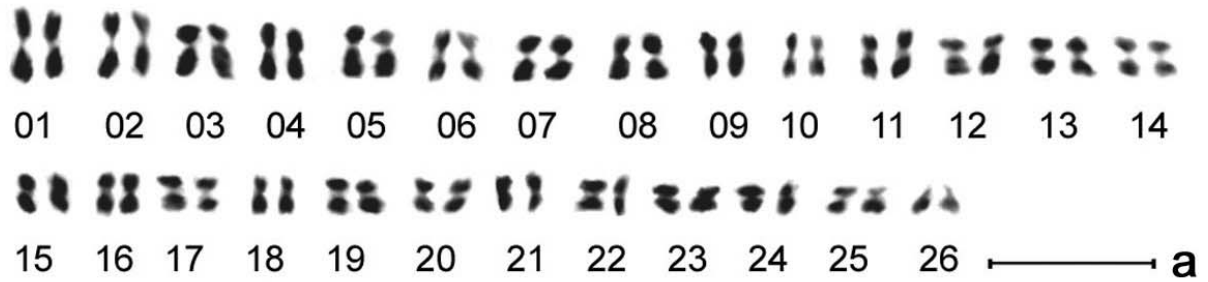
Nelle metafasi embrionali, i geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) risultano essere localizzati in posizione terminale in almeno 6 cromosomi (Fig. 9b). Le osservazioni condotte sui bivalenti spermatocitari rivelano che 3-4 coppie di omologhi dovrebbero essere interessate dalle NOR, confermando il precedente risultato (Fig. 9c). I dati sono ricavati dall'osservazione di 16 metafasi mitotiche ottenute da 3 femmine e di 30 metafasi I spermatocitarie allestite a partire da 3 maschi.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

La sonda $(TTAGG)_n$ ha ibridato positivamente tutti i cromosomi in metafase mitotica (Fig. 9d). Sono state analizzate 8 piastre allestite a partire dagli embrioni di 2 femmine.

Genome Size: $3,02 \pm 0,03$ pg

Tavola 9 *Gammarus aequicauda*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

d: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Gammarus oceanicus* Segerstråle, 1947**

Superfamiglia:	Gammaroidea
Famiglia:	Gammaridae
Genere:	<i>Gammarus</i>
Specie:	<i>Gammarus oceanicus</i> Segerstråle, 1947

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

In questa specie l'analisi di cromosomi spermatocitari ha consentito di riscontrare più frequentemente un numero di bivalenti pari a 27 (Fig. 10a). Per una popolazione finlandese della medesima specie, Salemaa (1988) aveva riportato un numero aploide di cromosomi di 26-27, a conferma del dato riscontrato in questo lavoro.

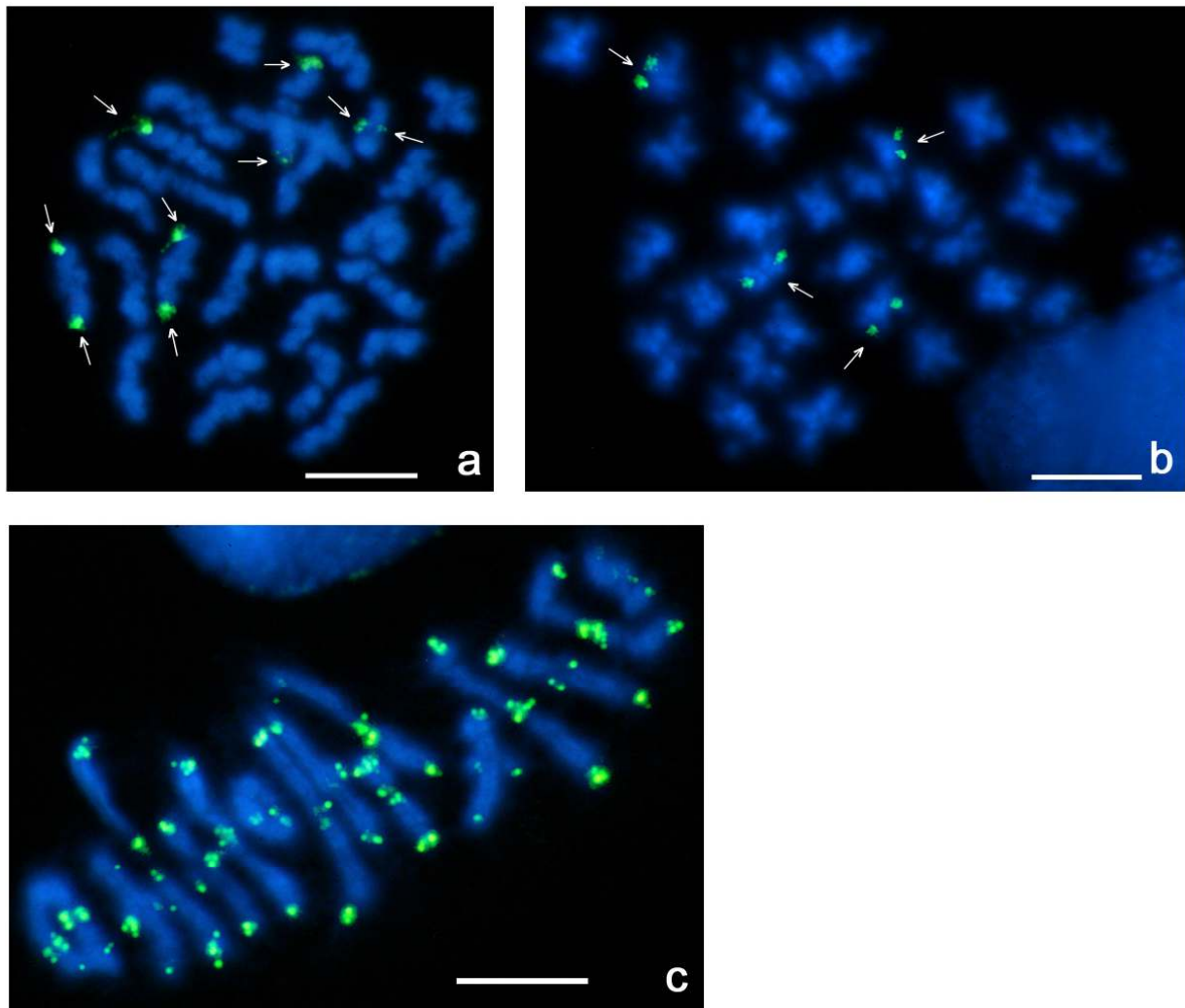
Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

Per i geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) 4 bivalenti sono più frequentemente interessati da una coppia di segnali mentre un singolo segnale interessa un quinto bivalente (Fig. 10b). Il precedente risultato è confermato dalla presenza di 4 o 5 cromosomi che riportano segnali di ibridazione nelle metafasi II (Fig. 10c). Questi risultati sono stati ricavati dall'esame di 19 piastre in metafase I spermatocitaria e di 7 metafasi II spermatocitarie allestite a partire da 1 individuo.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

La specie è caratterizzata a livello telomerico dal pentamero (TTAGG)_n (Fig. 10c), la cui sonda ibrida dando segnali di notevole intensità ed estensione in tutti i bivalenti spermatocitari (Fig. 10c). Per questo parametro sono state valutate positivamente 9 piastre in metafase spermatocitaria I, allestite a partire da un singolo individuo.

Tavola 10 *Gammarus oceanicus*



a: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

b: metafase II spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Gammarus* sp.**

Superfamiglia:	Gammaroidea
Famiglia:	Gammaridae
Genere:	<i>Gammarus</i>
Specie:	<i>Gammarus</i> sp.

Caratteristiche cariologiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Per questa specie islandese, non precisamente identificata, è stato possibile analizzare esclusivamente i cromosomi spermatocitari, impiegati esclusivamente per esperimenti d'ibridazione *in situ*. Si riscontrano più frequentemente 26 elementi nelle piastre in metafase I (Fig. 11a) e metafase II e in alcune di quest'ultime è talvolta presente un piccolo univalente soprannumerario (B-chromosome) a centromero terminale (Fig. 11b, freccia). Nel cariotipo, dedotto dalle metafasi II, sono presenti in maggioranza cromosomi a centromero mediano.

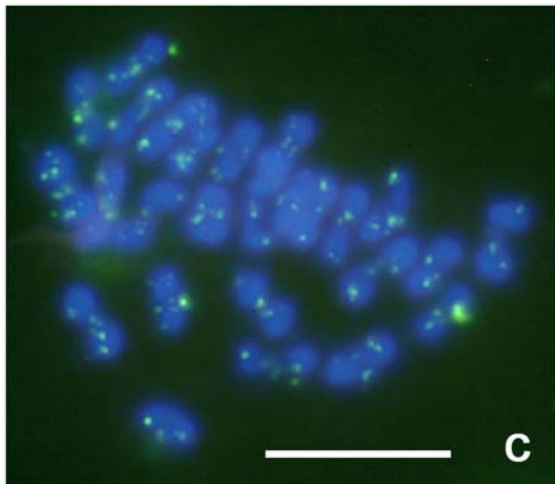
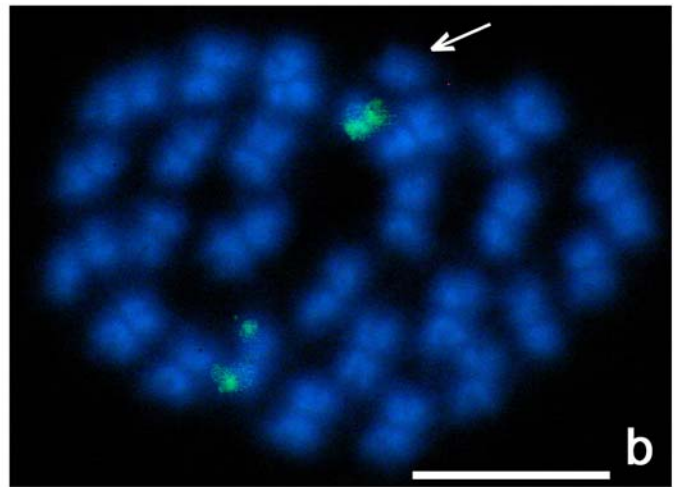
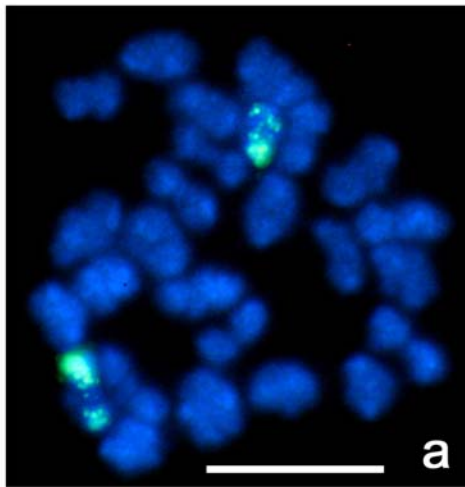
Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

I geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) risultano essere localizzati in posizione terminale di 2 bivalenti (27 nuclei esaminati appartenenti a 2 maschi), di dimensioni nettamente diverse (Fig. 11a). Il precedente dato è confermato dalla presenza nelle metafasi II (Fig. 11b) di 2 cromosomi (6 nuclei esaminati) che presentano segnali di ibridazione.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

I bivalenti delle metafasi I spermatocitarie (Fig. 11c) sono caratterizzati a livello telomerico da piccoli segnali di ibridazione con la sonda (TTAGG)_n. Tale risultato è stato osservato su 8 piastre sottoposte a FISH, allestite a partire da 2 individui.

Tavola 11 *Gammarus* sp.



- a:** metafase I spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore)
b: metafase spermatocitaria II, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (la freccia indica un cromosoma soprannumerario)
c: metafase spermatocitaria I, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Stenothoe tergestina* Nebeski, 1881**

Superfamiglia:	Leucothoidea
Famiglia:	Stenothoidae
Genere:	<i>Stenothoe</i>
Specie:	<i>Stenothoe tergestina</i>

Caratteristiche carilogiche:

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Il cariotipo di questa specie era già stato descritto da Libertini e Krapp-Schickel (2000), e consta di 11 coppie di elementi metacentrici/submetacentrici ($2n=22$, $FN=44$; vedi Fig. 12a).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

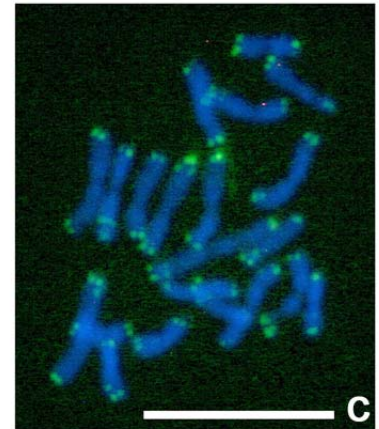
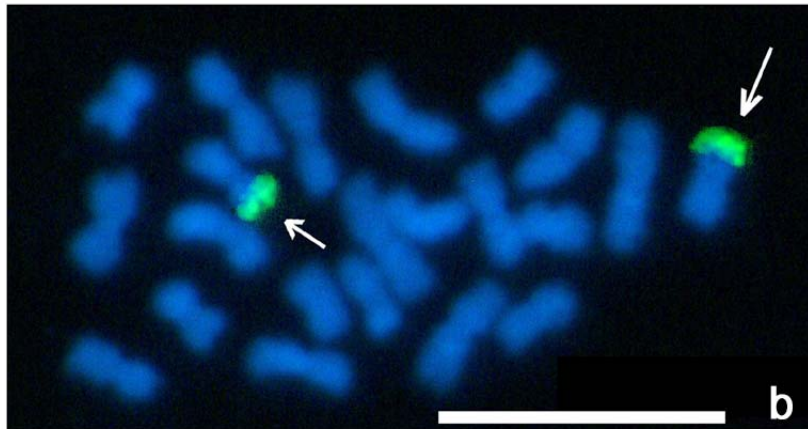
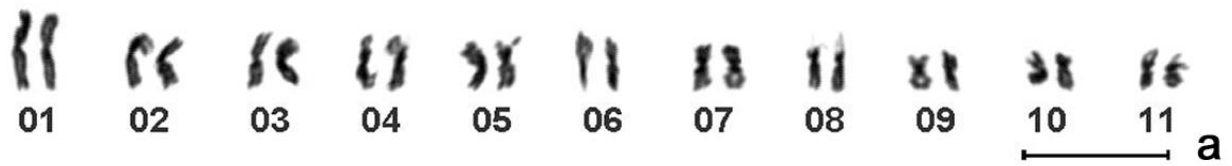
Gli esperimenti di FISH, eseguiti su 25 metafasi embrionali ottenute da 2 femmine ovigere, indicano che i geni del complesso ribosomale maggiore sono localizzati in posizione terminale sul braccio corto di una coppia di omologhi (Fig. 12b).

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

La sonda $(TTAGG)_n$ ha ibridato positivamente su tutti i cromosomi, dando origine a dei segnali nettamente distinguibili (Fig. 12c). Tale risultato potrebbe indicare che questa specie è caratterizzata a livello telomerico da un elevato numero di ripetizioni del pentamero $(TTAGG)_n$. Per questo parametro sono state osservate 10 piastre metafasiche embrionali allestite a partire da una femmina ovigera.

Genome Size: $0,80 \pm 0,02$ pg

Tavola 12 *Stenothoe tergestina*



a: cariotipo (immagine tratta da Libertini e Krapp-Schickel, 2000)

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Apohyale crassipes* Heller, 1866**

Superfamiglia:	Talitroidea
Famiglia:	Hyalidae
Genere:	Apohyale
Specie:	<i>Apohyale Crassipes</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Il numero di cromosomi e il cariotipo erano già stati descritti da Libertini e Krapp-Schickel (2000). Questi autori hanno riscontrato un numero diploide di cromosomi $2n=50$ e descritto la morfologia del cariotipo, che risulta costituita da 19 coppie di cromosomi a centromero mediano (1-19)(meta- o sub-metacentrici) 5 coppie di sub-telocentrici (20-24) e 1 coppia di elementi acrocentrici (25) (Fig. 13a). Il conseguente numero fondamentale di braccia cromosomiche è quindi $FN=88$.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

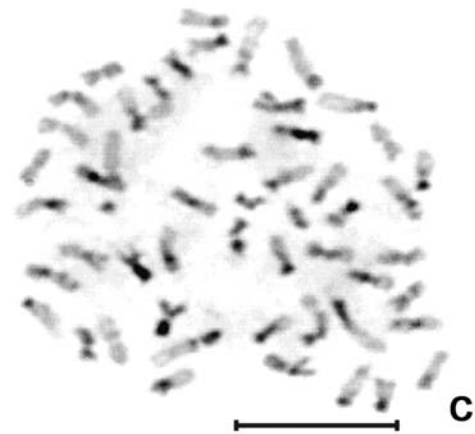
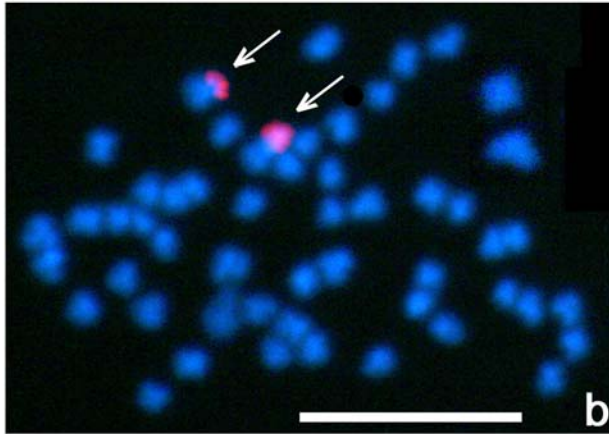
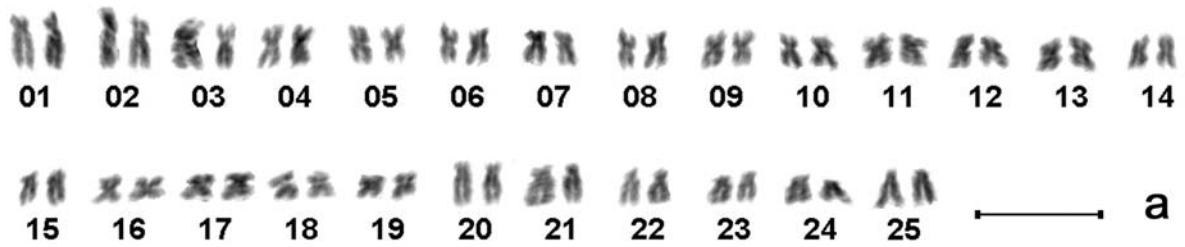
La FISH con la sonda 18S-5,8S-28S rDNA è stata eseguita su piastre metafasiche allestite a partire dagli embrioni di 2 femmine ovigere. Dall'osservazione di 17 metafasi mitotiche i geni del complesso ribosomale maggiore risultano localizzati in posizione terminale del braccio corto di una coppia di cromosomi a centromero mediano di dimensioni medio-grandi (Fig. 13b).

Bandeggio C

L'esame di metafasi mitotiche su cui è stato eseguito il bandeggio C con alcali evidenzia la presenza di piccoli blocchi di eterocromatina costitutiva localizzata in area centromerica in circa la metà dei cromosomi (Fig. 13c).

Genome Size: $0,94 \pm 0,03$ pg

Tavola 13 *Apohyale crassipes*



a: cariotipo (immagine tratta da Libertini e Krapp-Schickel, 2000)

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, bandeggio C

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Apohyale prevostii* H. Milne Edwards, 1830**

Superfamiglia:	Talitroidea
Famiglia:	Hyalidae
Genere:	<i>Apohyale</i>
Specie:	<i>Apohyale prevostii</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Il numero diploide di cromosomi risultante dai conteggi effettuati su metafasi mitotiche è $2n=50$ e il cariotipo risulta essere costituito da 25 coppie di cromosomi a centromero mediano (meta- o sub-metacentrici) corrispondente ad un FN=100 (Fig. 14a). Coleman (1994) aveva già riportato il numero aploide $n = 25$ per questa specie, a conferma del numero diploide qui riscontrato.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

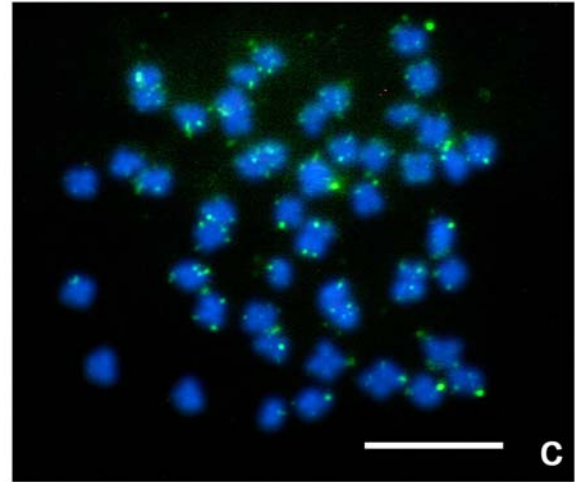
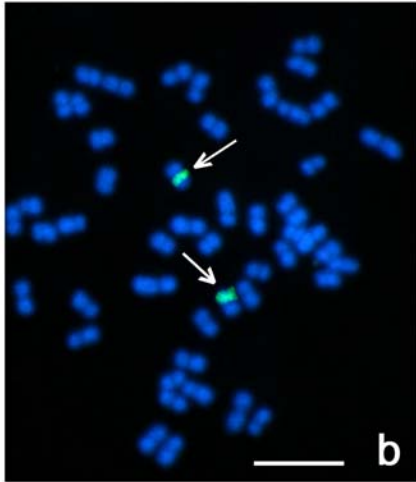
Dall'osservazione di 15 piastre metafasiche allestite a partire da 3 individui e ibridate con la sonda 18S-5,8S-28S rDNA, i geni del complesso ribosomale maggiore si localizzano in posizione sub-terminale di una coppia di omologhi a centromero mediano di media grandezza (Fig. 14b).

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

L'ibridazione *in situ* fluorescente mostra che la sonda (TTAGG)_n ha ibridato positivamente in gran parte dei cromosomi metafasici. I segnali di ibridazione si presentano di intensità non particolarmente accentuata e molto eterogenei (Fig. 14c). Questo parametro è stato valutato dall'osservazione di 5 piastre metafasiche allestite a partire da 1 femmina ovigera.

Genome Size: $1,89 \pm 0,05$ pg

Tavola 14 *Apohyale prevostii*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Orchestia prope cavimana* Heller, 1865**

Superfamiglia:	Talitroidea
Famiglia:	Talitridae
Genere:	<i>Orchestia</i>
Specie:	<i>Orchestia prope cavimana</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Questa specie è caratterizzata da un numero diploide di cromosomi $2n=50$ e 25 paia di cromosomi a centromero mediano (meta- o sub-metacentrici) ne costituiscono il cariotipo (Fig. 15a). Il numero fondamentale delle braccia cromosomiche è $FN=100$. Questo dato è confermato anche dalla rilevazione di 25 bivalenti chiasmatici nelle metafasi I spermatocitarie (Fig. 15b).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

La localizzazione e quantificazione dei cluster contenenti geni del complesso ribosomale maggiore è risultata assai difficoltosa in questa specie per la presenza, nelle metafasi mitotiche, di un elevato numero di segnali, diversi dei quali di piccole dimensioni. Dall'analisi di 15 piastre metafasiche provenienti da 5 individui, da 10 a 14 elementi sembrano essere interessati da segnali di ibridazione (Fig. 15c).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale minore (5SrDNA)

Tramite FISH, condotta su 4 piastre metafasiche allestite a partire da una femmina, è stato possibile localizzare i geni del complesso ribosomale minore (5S rDNA) in questa specie. Essi risultano localizzati in posizione terminale su una coppia di omologhi a centromero mediano (Fig. 15d). La sonda è stata prodotta tramite PCR a partire dal DNA genomico di *A. crassipes*.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

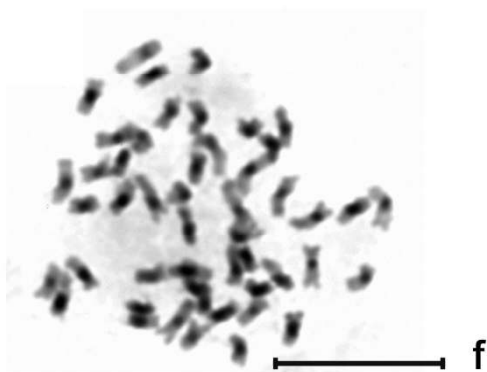
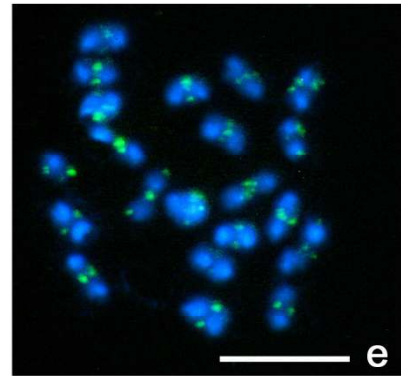
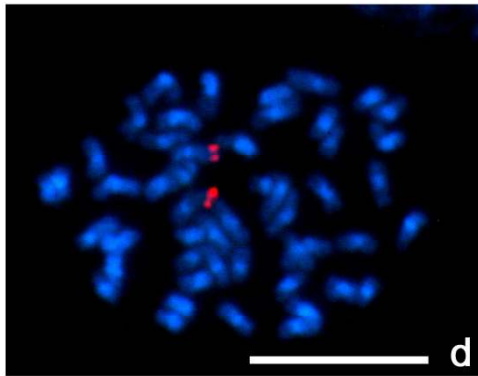
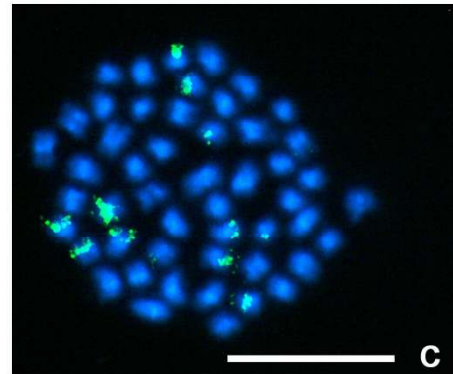
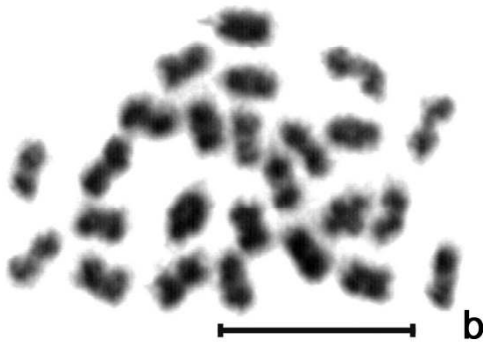
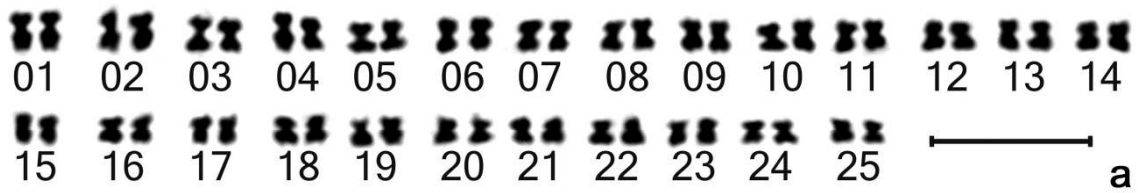
La sonda $(TTAGG)_n$ hanno ibridato positivamente tutti i bivalenti metafasici (Fig. 15e). Questo parametro è stato determinato esaminando 11 piastre in metafase spermatocitaria I allestite da un singolo maschio

Bandeggio C

Il bandeggio C, eseguito su preparati in metafase mitotica, evidenzia la presenza di eterocromatina costitutiva paracentromerica, costituita da blocchi di discrete dimensioni (Fig. 15f).

Genome Size: $1,77 \pm 0,04$ pg

Tavola 15 *Orchestia prope cavimana*



- a:** cariotipo
- b:** metafase I spermatocitaria
- c:** mitosi spermatogonale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore)
- d:** metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 5S rDNA (in colore)
- e:** metafase I spermatocitaria, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)
- f:** metafase mitotica embrionale, bandeggio C

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Orchestia gammarellus* Pallas, 1776**

Superfamiglia:	Talitroidea
Famiglia:	Talitridae
Genere:	<i>Orchestia</i>
Specie:	<i>Orchestia gammarellus</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

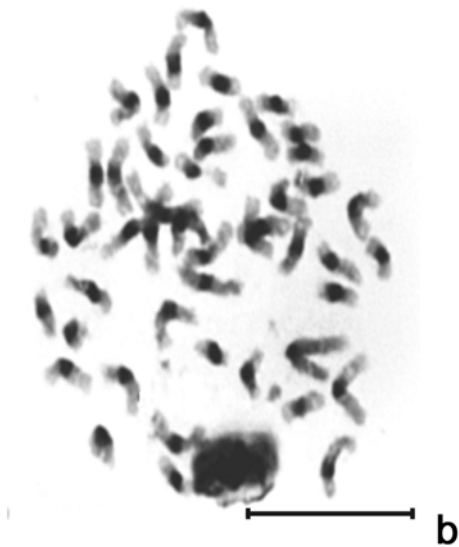
Il numero diploide di cromosomi più frequentemente riscontrato per questa specie è $2n=50$ e il cariotipo risulta essere costituita da 25 paia di cromosomi a centromero mediano (meta- o sub-metacentrici) corrispondente ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=100$ (Fig. 16a). Altri autori avevano già riportato per questa specie il numero aploide di cromosomi $n=25$ (Poisson e Le Calvez, 1948).

Bandeggio C

L'analisi di piastre metafasiche, eseguita dopo bandeggio C, rivela zone di rilevanti dimensioni di eterocromatina costitutiva paracentromerica in tutti i cromosomi (Fig. 16b).

Genome Size: $2,81 \pm 0,03$ pg

Tavola 16 *Orchestia gammarellus*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, bandeggio C

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Orchestia mediterranea* A. Costa, 1853**

Superfamiglia:	Talitroidea
Famiglia:	Talitridae
Genere:	<i>Orchestia</i>
Specie:	<i>Orchestia mediterranea</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Anche questo Talitridae presenta un numero diploide di cromosomi pari a $2n=50$ e il suo cariotipo risulta essere costituito a 25 paia di cromosomi a centromero mediano (meta- o sub-metacentrici), corrispondente ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=100$. (Fig. 17a). Il dato qui presentato conferma quanto Le Calvez e Certain (1951) avevano già riportato relativamente al numero aploide di cromosomi, che è pari a $n=25$.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

I geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) risultano localizzati in posizione terminale del braccio corto di una coppia di omologhi a centromero mediano di media grandezza (Fig. 17b). Le dimensioni dei segnali di ibridazione sono analoghe nei due omologhi. Per questo parametro sono state osservate 13 piastre metafasiche allestite a partire da 2 femmine ovigere.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

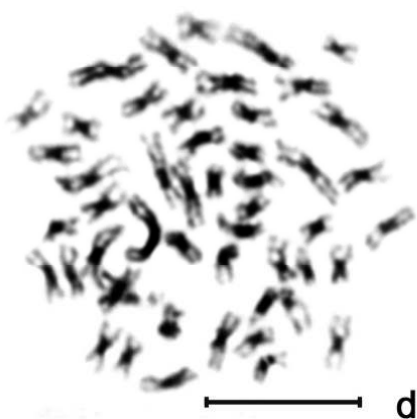
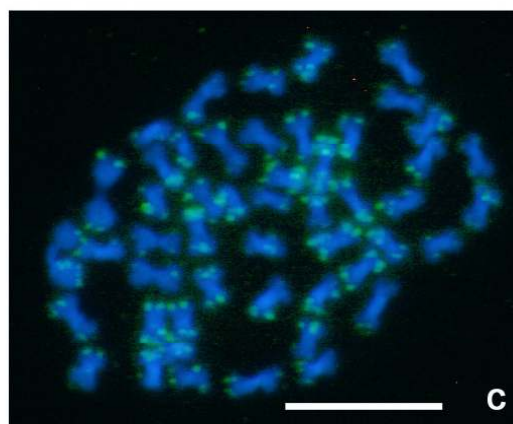
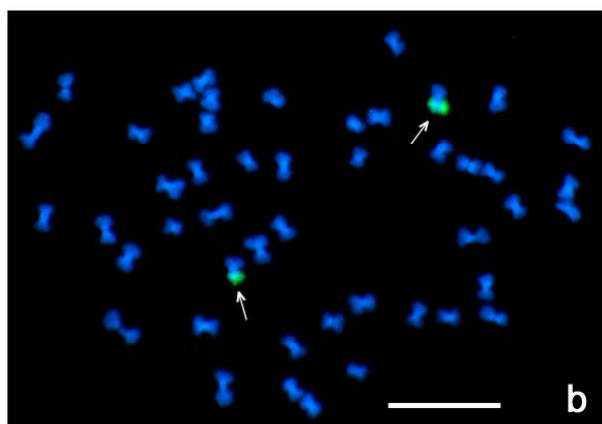
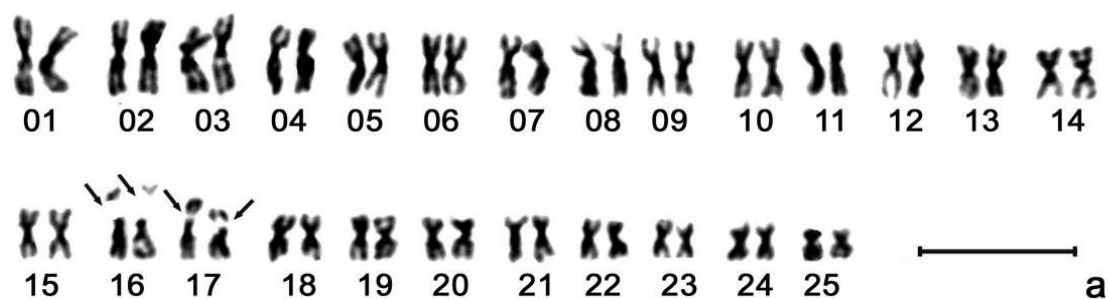
Dall'analisi di 6 metafasi embrionali, anche per questa specie, si è confermata la presenza, a livello telomerico, del repeat $(TTAGG)_n$ (Fig. 17c).

Bandeggio C

Il bandeggio C rivela blocchi di rilevanti dimensioni di eterocromatina costitutiva paracentromerica in tutti i cromosomi (Fig. 17d).

Genome Size: $2,28 \pm 0,04$ pg

Tavola 17 *Orchestia mediterranea*



- a:** cariotipo, le frecce indicano le costrizioni secondarie
b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)
c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)
d: metafase mitotica embrionale, bandeggio C

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Orchestia montagui* Aodouin, 1826**

Superfamiglia:	Talitroidea
Famiglia:	Talitridae
Genere:	<i>Orchestia</i>
Specie:	<i>Orchestia montagui</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Il numero diploide di cromosomi più frequentemente riscontrato per *O. montagui* è $2n=50$ e il cariotipo risulta essere costituito da 25 paia di cromosomi a centromero mediano (meta- o sub-metacentrici) corrispondenti ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=100$ (Fig. 18a).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

I geni del complesso ribosomale maggiore risultano essere localizzati in posizione terminale di 2 coppie di omologhi a centromero mediano (Fig. 18b). In una coppia di omologhi i segnali di occupano gran parte del terminale nel braccio più corto, nell'altro paio di omologhi i segnali sono puntiformi e sempre localizzati terminalmente nel braccio corto. Per determinare questo parametro sono state studiate 50 metafasi embrionali allestite da 3 femmine ovigere.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

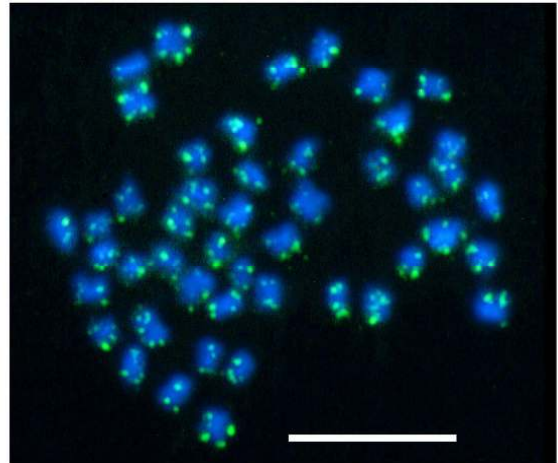
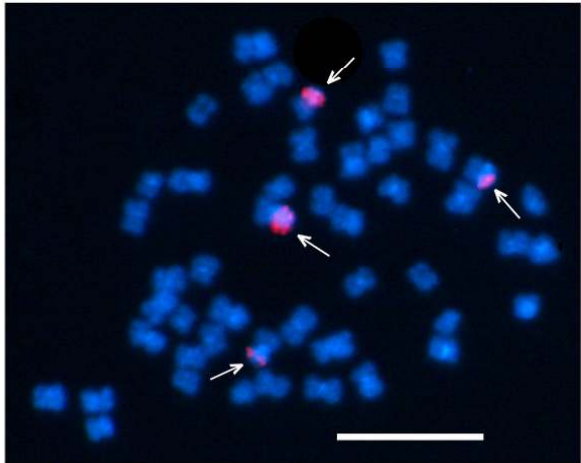
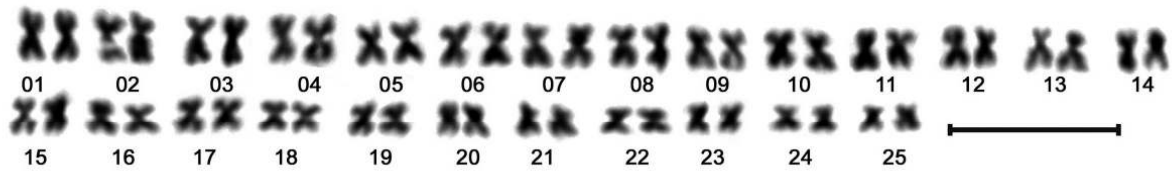
Dall'analisi di 7 metafasi risulta che la specie è caratterizzata a livello telomerico dal pentamero $(TTAGG)_n$ (Fig. 18c).

Bandeggio C

Anche in questa specie il bandeggio C con alcali rivela, in tutti i cromosomi, blocchi eterocromatinici di rilevanti dimensioni in posizione paracentromerica (Fig. 18d).

Genome Size: $1,71 \pm 0,03$ pg

Tavola 18 *Orchestia montagui*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

d: metafase mitotica embrionale, bandeggio C

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Platorchestia platensis* Krøyer, 1845**

Superfamiglia:	Talitroidea
Famiglia:	Talitridae
Genere:	<i>Platorchestia</i>
Specie:	<i>Platorchestia platensis</i>

Caratteristiche cariologiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

È stato riscontrato un numero diploide di cromosomi $2n=50$ e il cariotipo risulta essere costituito da 25 paia di cromosomi a centromero mediano (meta- o sub-metacentrici) corrispondenti ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=100$ (Fig. 19a).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

In posizione sub-terminale su di una coppia di omologhi a centromero mediano di media grandezza (Fig. 19b) risultano localizzati i geni del complesso 18S-5,8S-28S di rDNA. Sono state esaminate 45 piastre metafasiche allestite a partire dagli embrioni di 5 femmine.

Localizzazione 5SrDNA

In base all'analisi di 5 metafasi positive alla FISH con una sonda prodotta a partire dal DNA di *A. crassipes*, il 5S rDNA risulta essere localizzato in posizione intercalare su di una coppia di omologhi di media grandezza (Fig. 19c).

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

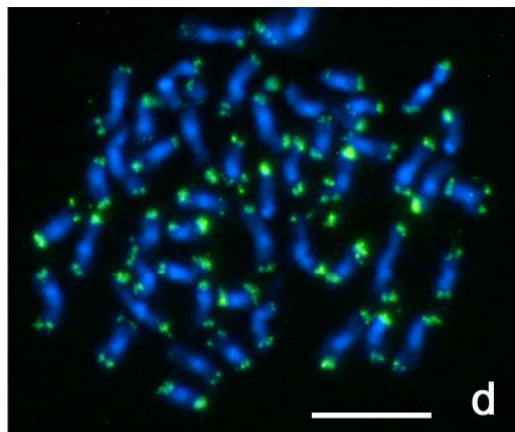
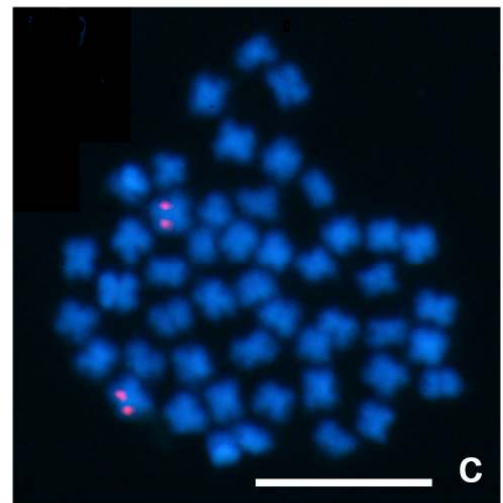
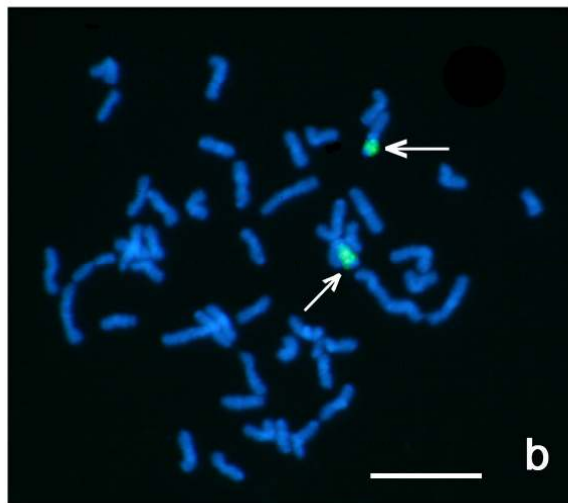
Il repeat pentamerico $(TTAGG)_n$ caratterizza i telomeri anche di *P. platensis* (Fig. 19d). Per questo parametro sono state valutate positivamente 9 piastre dagli embrioni di una singola ovigera.

Bandeggio C

L'eterocromatina costitutiva costituisce blocchi estesi nella zona paracentromerica di tutti i cromosomi di questa specie (Fig. 19e).

Genome Size: $1,86 \pm 0,03$ pg

Tavola 19 *Platorchestia platensis*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 5S rDNA (in colore)

d: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

e: metafase mitotica embrionale, bandeggio C

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Sardorchestia pelacaniformis* Bellan-Santini e Ruffo, 1986**

Superfamiglia:	Talitroidea
Famiglia:	Talitridae
Genere:	<i>Orchestia</i>
Specie:	<i>Sardorchestia pelacaniformis</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

In questa specie il numero diploide di cromosomi è $2n=50$ e 25 paia di cromosomi a centromero mediano ne costituiscono il cariotipo, per un numero fondamentale delle braccia cromosomiche (FN) pari a 100. (Fig. 20a). Il numero diploide è confermato anche dalla presenza di 25 bivalenti chiasmatici nelle metafasi I spermatocitarie (Fig. 20b).

Genome Size: $2,68 \pm 0,02$ pg

***Talitrus saltator* Montagu, 1866**

Superfamiglia:	Talitroidea
Famiglia:	Talitridae
Genere:	<i>Orchestia</i>
Specie:	<i>Talitrus saltator</i> Montagu

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

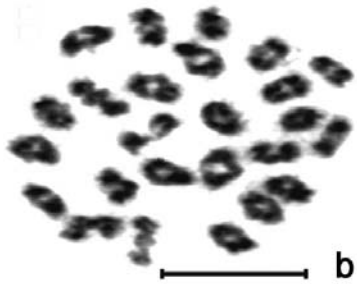
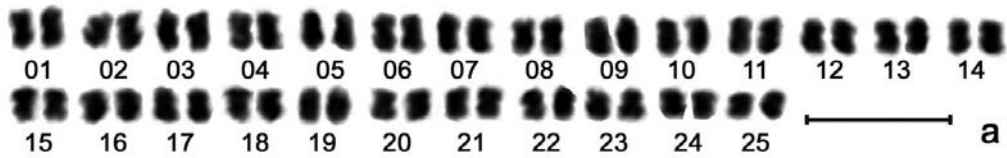
Così come in tutti gli altri Talitridae presi in esame, anche per *T. saltator* è stato riscontrato un numero diploide di cromosomi pari a $2n=50$ e un cariotipo costituito da 25 paia di cromosomi a centromero mediano (meta- o sub-metacentrici), corrispondente ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche FN=100. (Fig. 21a). Altri autori hanno riportato il dato relativo al numero aploide di cromosomi pari a $n = 25$ (Poisson e Le Calvez, 1948) e il dato qui presentato lo conferma.

Bandeggio C

Il bandeggio C rivela blocchi di eterocromatina costitutiva di cospicue dimensioni nelle zone paracentromeriche di tutti i cromosomi. (Fig. 21b)

Genome Size: $2,20 \pm 0,07$ pg

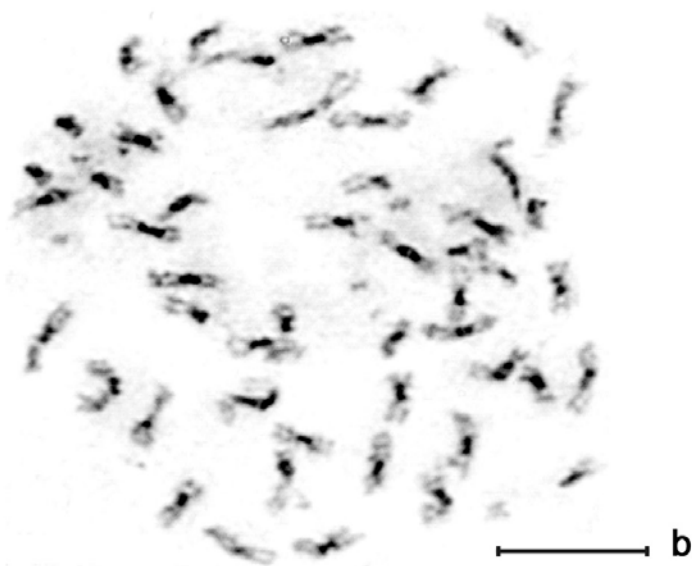
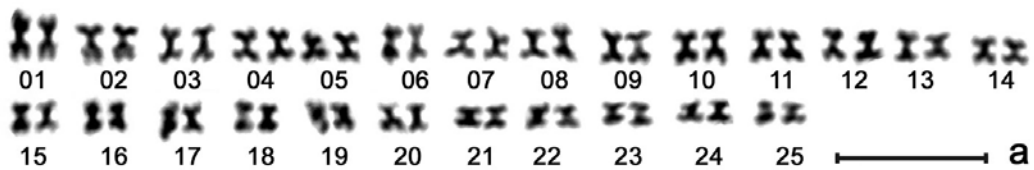
Tavola 20 *Sardorchestia pelacaniformis*



a: cariotipo

b: metafase I spermatocitaria

Tavola 21 *Talitrus saltator*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, bandeggio C

La barra rappresenta 10µm

SOTTORDINE COROPHIIDEA

Aoridae sp.

Superfamiglia: Aoroidea

Famiglia: Aoridae

Genere:

Nome indicativo per la specie: Aoridae sp.

Caratteristiche carilogiche

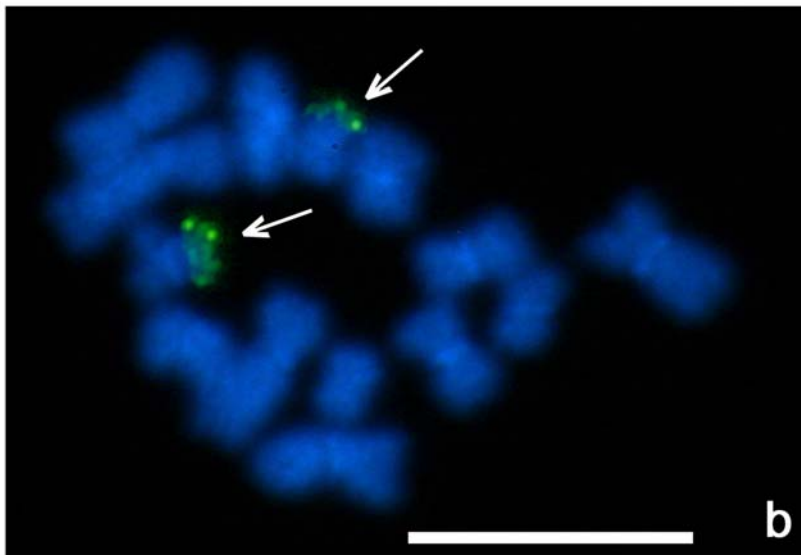
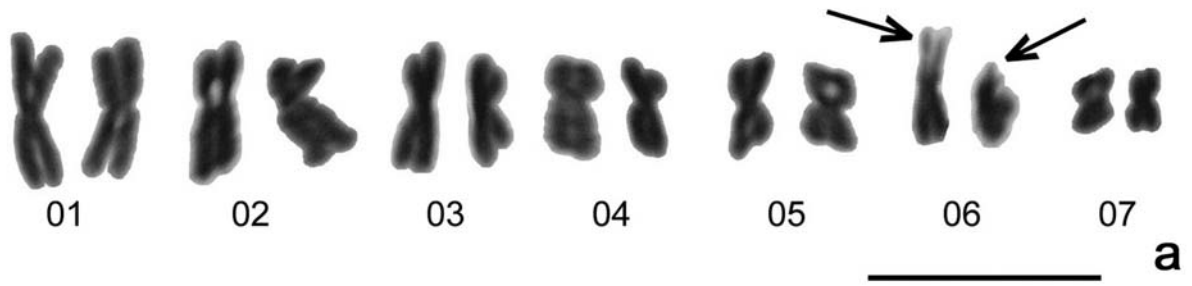
Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

L'analisi di metafasi mitotiche ha condotto al riscontro di un numero diploide di cromosomi $2n=14$ e 7 paia di cromosomi a centromero mediano ne costituiscono il cariotipo. La coppia di omologhi n°6 presenta un'evidente costrizione secondaria all'estremità del braccio cromosomico più corto (Fig. 22a, frecce), il paio n°7 sembra appartenere ad una classe dimensionale diversa dagli altri. Il "fundamental number" delle braccia cromosomiche è FN=28.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

Dall'analisi della FISH su 8 piastre metafasiche allestite a partire da un singolo individuo, risulta che i geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) sono localizzati in posizione terminale sul braccio corto di un paio di omologhi (probabilmente corrispondente al paio n°6 della fig. 22b). Nel paio di cromosomi recanti le NOR, la differenza nelle dimensioni dei segnali di ibridazione è confermata dalla diversa lunghezza delle costrizioni secondarie.

Tavola 22 Aoridae sp.



a: cariotipo

b: metafase mitotica, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcromazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10 μ m

***Microdeutopus anomalus* Rathke, 1843**

Superfamiglia:	Aoroidea
Famiglia:	Aoridae
Genere:	<i>Microdeutopus</i>
Specie:	<i>Microdeutopus anomalus</i>

Caratteristiche carilogiche

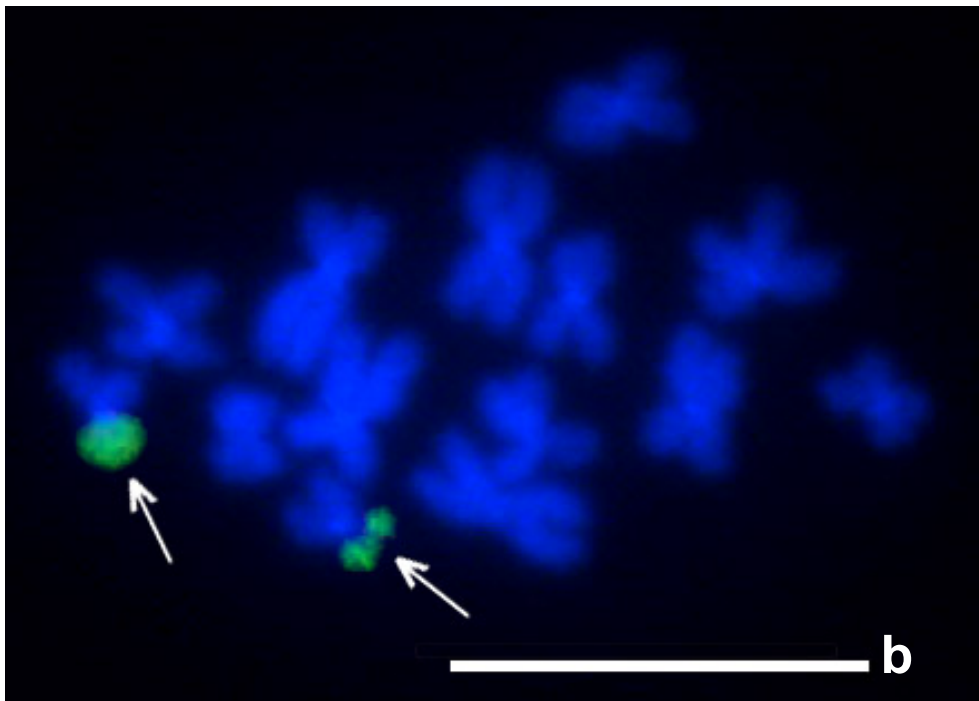
Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Anche in questo Aoridae è stato riscontrato un numero diploide di cromosomi $2n=14$. Il cariotipo risulta essere costituita da 7 coppie di cromosomi a centromero mediano (meta- e submetacentrici) (Fig. 23a). Le coppie di cromosomi n°6 e 7 si differenziano dalle altre per le ridotte dimensioni. FN risulta uguale a 26.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

Dall'osservazione di 31 piastre metafasiche allestite a partire da 5 femmine, in seguito a FISH, i geni del complesso 18S-5,8S-28S rDNA risultano localizzati in posizione terminale sul braccio corto della coppia di omologhi più piccola (n°7 in Fig. 23a) che esibiscono segnali di analoghe dimensioni (Fig. 23b).

Tavola 23 *Microdeutopus anomalus*



a: metafase mitotica

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Microdeutopus versiculatus* Bate, 1856**

Superfamiglia:	Aoroidea
Famiglia:	Aoridae
Genere:	<i>Microdeutopus</i>
Specie:	<i>Microdeutopus versiculatus</i>

Caratteristiche carilogiche

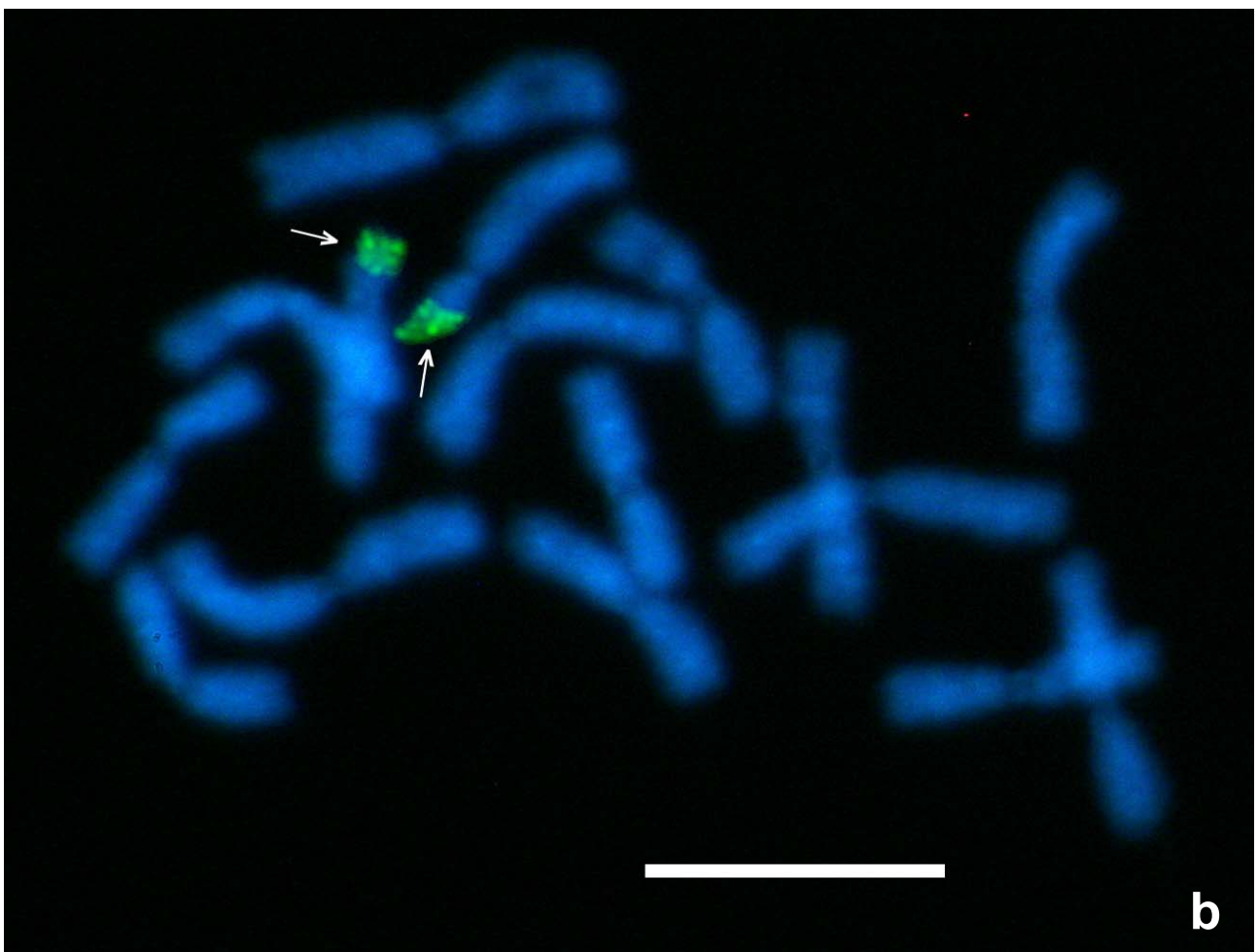
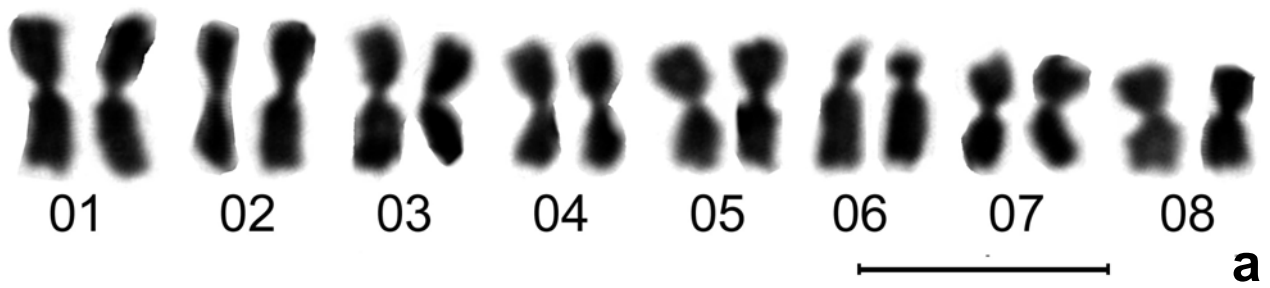
Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Il numero diploide di cromosomi per questa specie è stato definito da una serie di conteggi effettuati su metafasi mitotiche e risulta essere pari a $2n=16$. Il cariotipo, è costituito da 7 coppie di cromosomi m-sm e da 1 coppia di cromosomi st ($n^{\circ}6$) corrispondente ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=30$ (Fig. 24a).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

L'ibridazione *in situ* fluorescente, in base all'esame di 8 piastre metafasiche allestite a partire da un singola femmina ovigera, ha evidenziato che i geni del complesso ribosomale maggiore sono localizzati in posizione terminale sul braccio corto della coppia di omologhi subtelocentrici (Fig. 24b). I segnali di ibridazione sono di analoghe dimensioni.

Tavola 24 *Microdeutopus versiculatus*



a: metafase mitotica

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Caprella dilatata* Krøyer, 1843**

Superfamiglia:	Caprelloidea
Famiglia:	Caprellidae
Sottofamiglia:	Caprellinae
Genere:	<i>Caprella</i>
Specie:	<i>Caprella dilatata</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Nella maggior parte dei conteggi effettuati su metafasi mitotiche si rileva un numero diploide di cromosomi pari a $2n=24$ e 12 coppie di cromosomi a centromero mediano, corrispondente ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=48$, ne costituiscono il cariotipo (Fig. 25a).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

L'ibridazione *in situ* con la sonda 18S-5,8S-28S rDNA è stata effettuata su 17 metafasi embrionali (da 2 ovigere), 7 spermatogoniali e 15 di spermatociti primari (da 2 maschi).

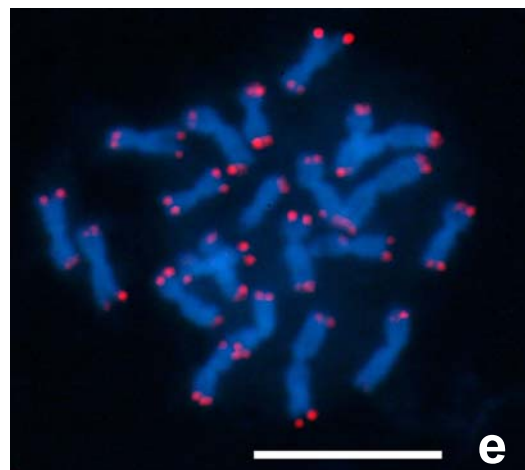
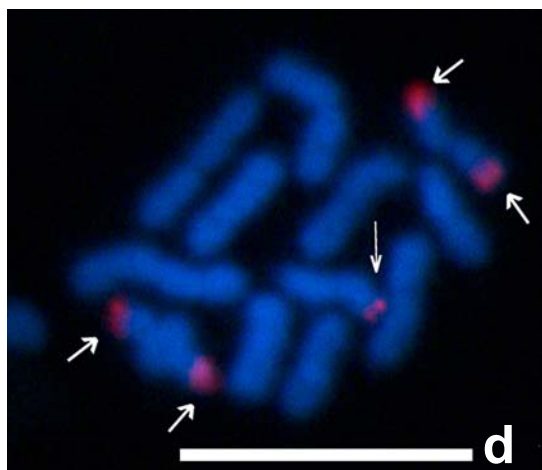
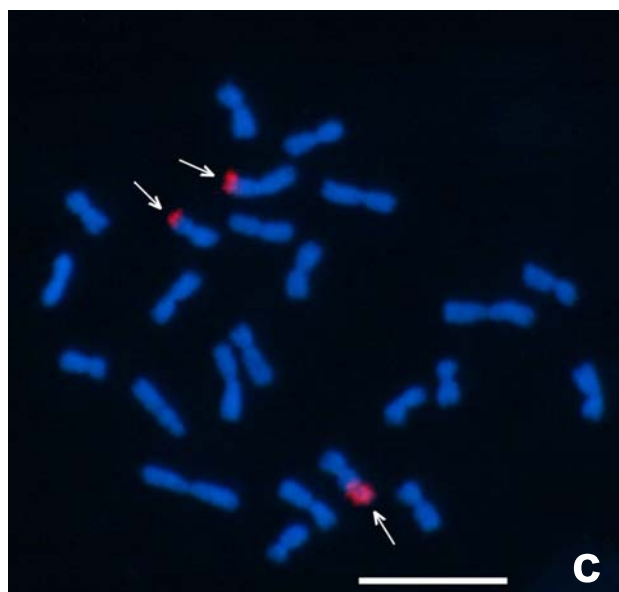
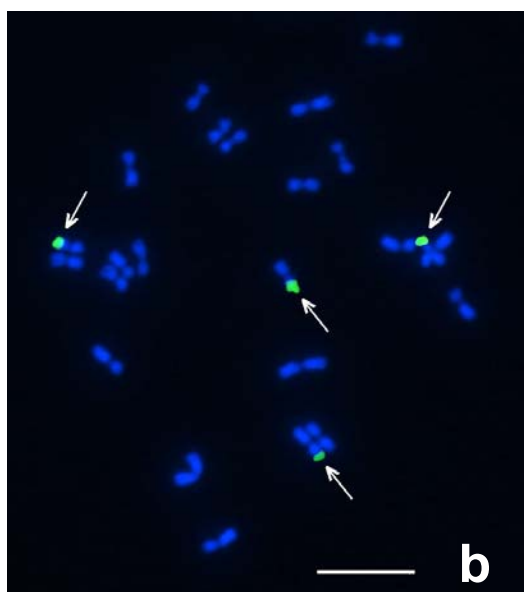
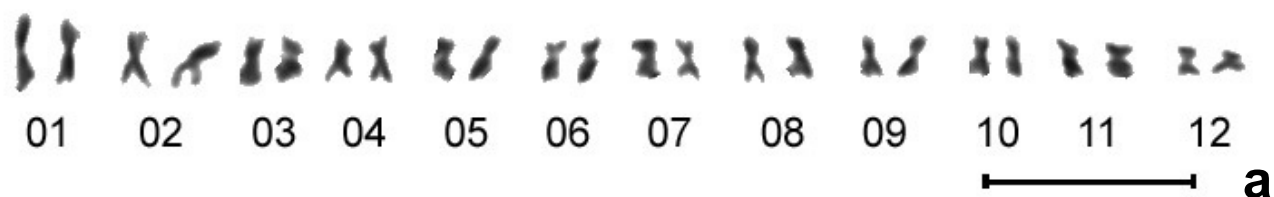
Da 3 a 5 segnali d'ibridazione sono stati osservati nei nuclei analizzati (Fig. 25b,c,d), riconducibili a massimo 3 paia di cromosomi, come confermato dalla presenza di 3 bivalenti positivi alla FISH nelle metafasi I (Fig. 25d).

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

La sonda $(TTAGG)_n$ ha ibridato positivamente i telomeri nelle piastre prese in esame: 13 metafasiche embrionali (Fig. 25e), da una femmina, e 10 spermatocitarie da un maschio.

Genome Size: $0,97 \pm 0,02$ pg

Tavola 25 *Caprella dilatata*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: mitosi spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

d: metafase I spermatocitaria, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

e: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Caprella equilibra* Say, 1818**

Superfamiglia:	Caprelloidea
Famiglia:	Caprellidae
Sottofamiglia:	Caprellinae
Genere:	<i>Caprella</i>
Specie:	<i>Caprella equilibra</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

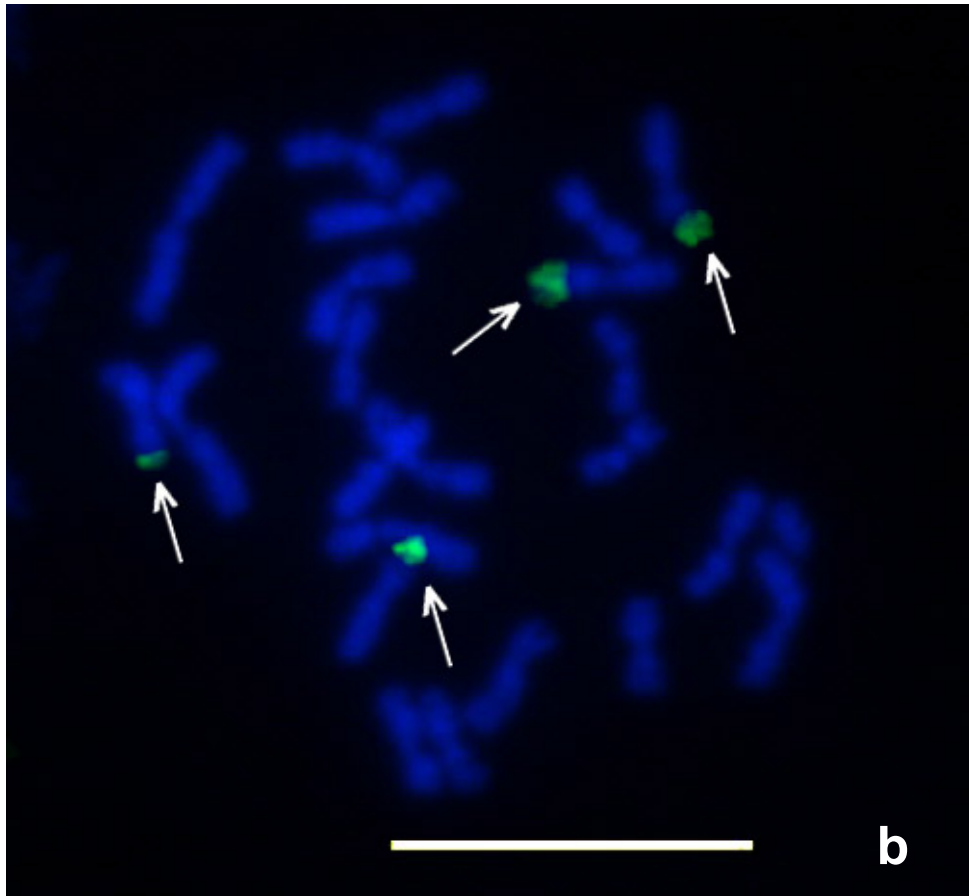
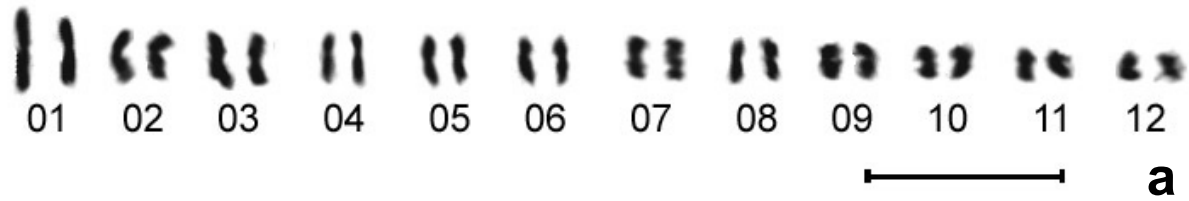
Nella maggior parte dei conteggi effettuati su metafasi mitotiche si rileva un numero diploide di cromosomi pari a $2n=24$ e il cariotipo risulta essere costituito da tutte paia di omologhi a centromero mediano (m-sm) da cui deriva un numero fondamentale $FN=48$ (Fig. 26a).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

I risultati di ibridazione *in situ* fluorescente con la sonda 18S-5,8S-28S rDNA provengono dall'osservazione di 17 metafasi mitotiche ottenute da 2 femmine. Le NOR sono localizzate in posizione terminale sul braccio corto di 4 cromosomi di media grandezza, riconducibili a due coppie di omologhi. Uno dei segnali si presenta sempre di dimensioni nettamente inferiori rispetto agli altri tre (Fig. 26b).

Genome Size: $0,69 \pm 0,02$ pg

Tavola 26 *Caprella equilibra*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcromazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10 μ m

***Caprella septentrionalis* Krøyer, 1838**

Superfamiglia:	Caprelloidea
Famiglia:	Caprellidae
Sottofamiglia:	Caprellinae
Genere:	<i>Caprella</i>
Specie:	<i>Caprella septentrionalis</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Il numero diploide $2n=24$ è stato più frequentemente riscontrato nelle oltre 120 piastre analizzate. Dodici paia di cromosomi a centromero mediano, corrispondenti ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=48$, costituiscono il cariotipo di questa specie (Fig. 27a).

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

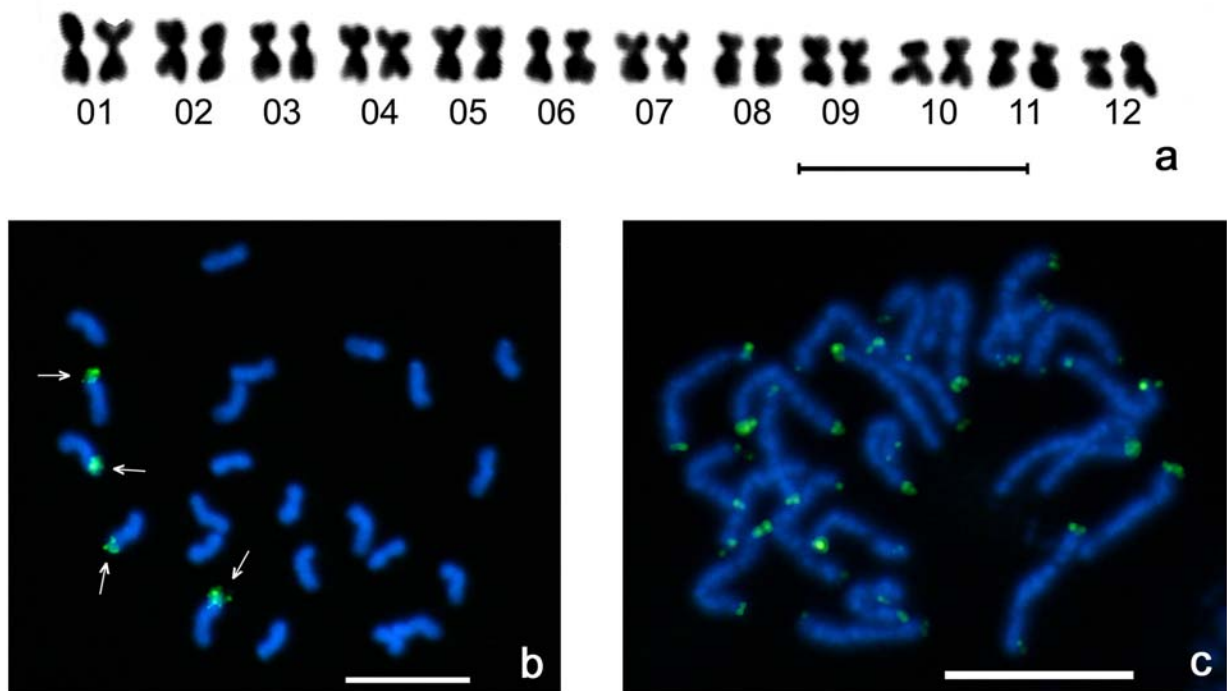
Quattro segnali in posizione terminale su due coppie di cromosomi di media grandezza, probabilmente omologhi (Fig. 27b), sono stati costantemente osservati nelle 73 metafasi mitotiche analizzate, provenienti da 6 ovigere.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

La caratterizzazione della composizione della sequenza telomerica è stata effettuata mediante FISH. Dall'analisi di 7 piastre metafasiche allestite a partire da una femmina ovigera, si è potuto stabilire che la sonda $(TTAGG)_n$ ha ibridato positivamente i telomeri di pressoché tutti i cromosomi (Fig. 27c).

Genome Size: $1,52 \pm 0,02$ pg

Tavola 27 *Caprella septentrionalis*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10μm

***Phtisica marina* Slabber, 1769**

Superfamiglia:	Caprelloidea
Famiglia:	Caprellidae
Sottofamiglia:	Phtisicinae
Genere:	<i>Phtisica</i>
Specie:	<i>Phtisica marina</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Il numero diploide $2n=10$ è stato costantemente riscontrato nelle oltre 100 piastre analizzate. Il cariotipo risulta essere costituito da 4 coppie di cromosomi a centromero mediano (1-4) e da una coppia di cromosomi subtelocentrici (5), per un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=18$ (Fig. 28a).

Impregnazione argentea

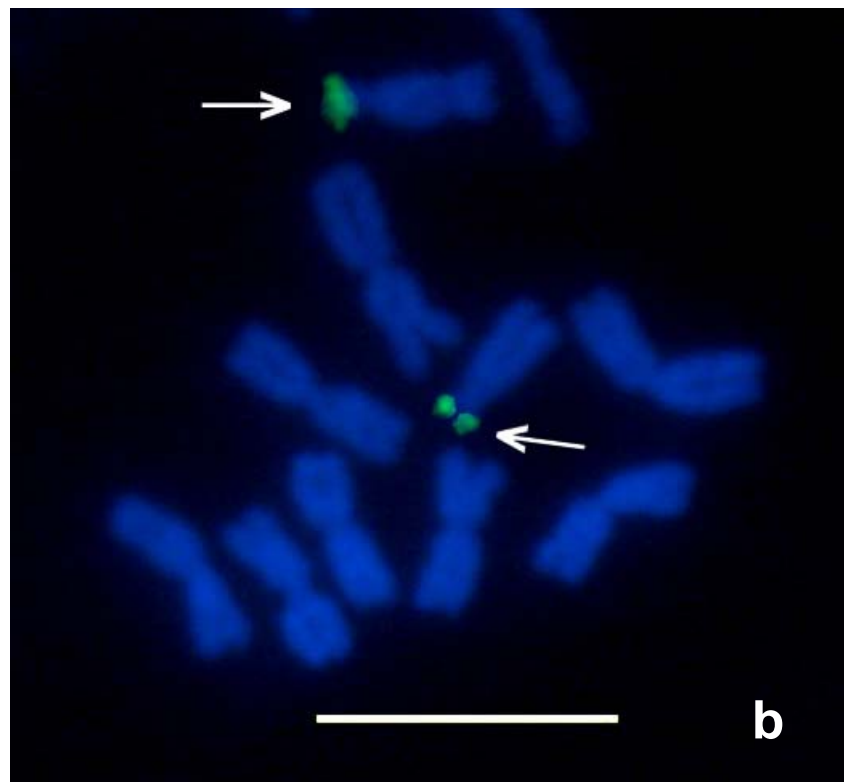
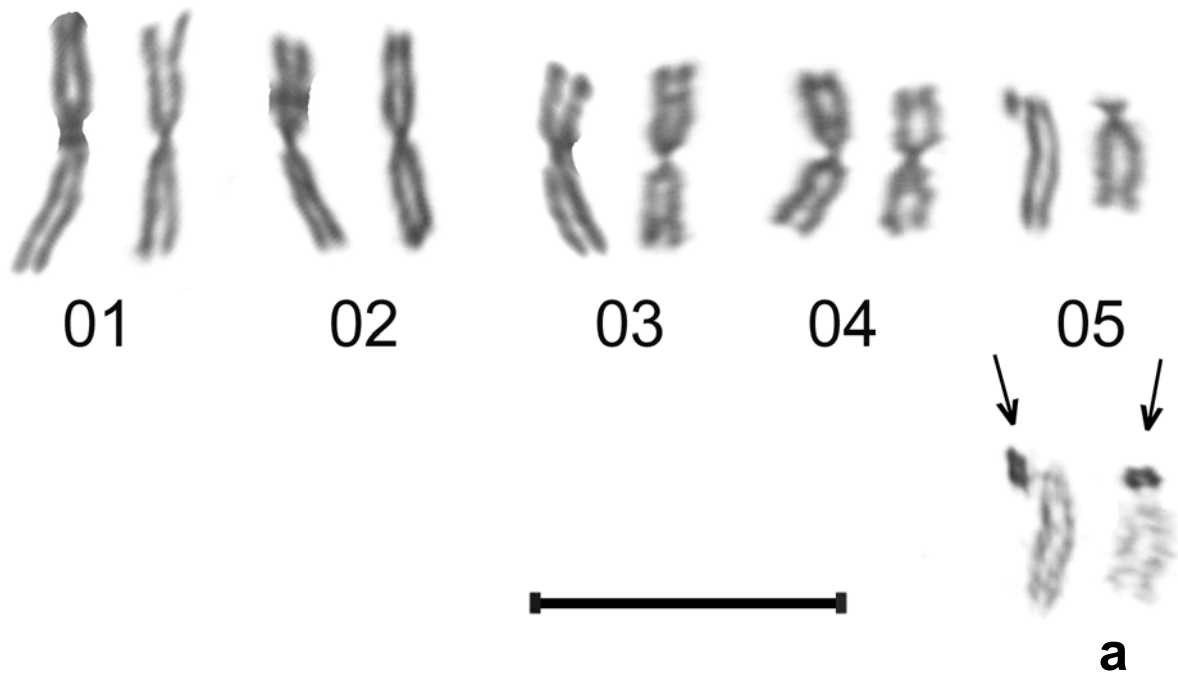
Tra le specie analizzate in questa tesi, *P. marina* è risultata l'unica che ha risposto positivamente alla colorazione con Nitrato di Argento utilizzata per evidenziare le NOR. Esse sono localizzate in posizione terminale sul braccio corto della coppia di omologhi subtelocentrici (Fig. 28a, Fig. 28b, frecce). Sono state analizzate 50 piastre ottenute da 2 individui.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

I geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) risultano essere sempre localizzati in posizione terminale sul braccio corto della coppia di omologhi subtelocentrici (Fig. 28b) in corrispondenza delle zone in precedenza identificate come positive all'argento. I segnali di ibridazione, osservati su 21 piastre metafasiche allestite a partire da 2 individui, sono sempre netti e ben evidenti, quasi sempre eteromorfi.

Genome Size: $1,10 \pm 0,01$ pg

Tavola 28 *Phtisica marina*



a: cariotipo, le frecce indicano le NORs colorate con Nitrato d'Argento.

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Ampithoe riedli* Schickel, 1968**

Superfamiglia:	Corophioidea
Famiglia:	Ampithoidae
Genere:	<i>Ampithoe</i>
Specie:	<i>Ampithoe riedli</i>

Caratteristiche cariologiche

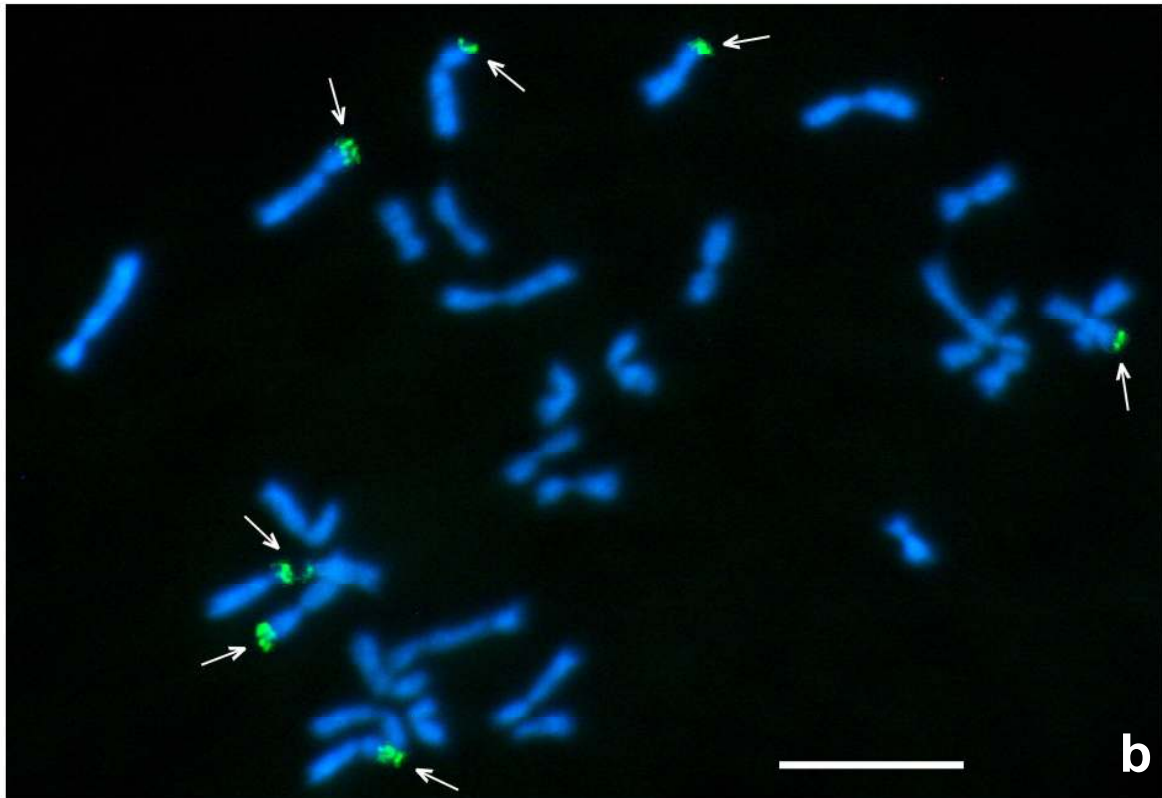
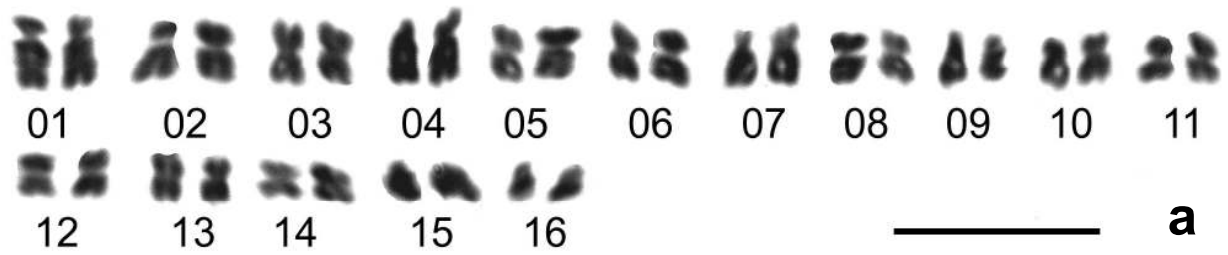
Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Il numero diploide di cromosomi più frequentemente riscontrato dall'analisi delle piastre metafasiche di questa specie è $2n=32$. Il cariotipo (Fig. 29a) risulta essere costituito da 14 paia di cromosomi a centromero mediano (m-sm) e da 2 paia di cromosomi subtelocentrici (Fig. 29a, paia 4 e 7), corrispondente ad un numero fondamentale delle braccia cromosomiche $FN=60$. Le dimensioni dei cromosomi sono ampiamente variabili, pur decrescendo in modo graduale; la coppia di omologhi più grande ha una lunghezza circa tre volte maggiore della coppia più piccola.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

Gli esperimenti d'ibridazione con i geni del complesso ribosomale maggiore, effettuati su 12 piastre metafasiche ottenute da 2 ovigere, indicano che tali geni sono localizzati in posizione terminale del braccio corto di 4 paia di cromosomi: un paio di metacentrici medio-piccoli, 2 coppie di submetacentrici di media lunghezza, e un paio di elementi subtelocentrici di dimensioni medie. Nelle diverse paia di cromosomi interessati dalle NOR, i segnali di ibridazione possono essere di dimensioni eterogenee (Fig. 29b).

Tavola 29 *Ampithoe riedli*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in chiaro, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in scuro). La barra rappresenta 10 μ m

***Corophium acutum* Chevreux, 1908**

Superfamiglia:	Corophioidea
Famiglia:	Corophiidae
Sottofamiglia:	Corophiinae
Genere:	<i>Corophium</i>
Specie:	<i>Corophium acutum</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

In *C. acutum* il numero diploide di cromosomi riscontrato con maggior frequenza nelle metafasi mitotiche è $2n=32$ e 16 paia di cromosomi a centromero mediano (m-sm) ne caratterizzano il cariotipo (Fig. 30a). Il numero fondamentale delle braccia cromosomiche risultante è $FN=64$.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

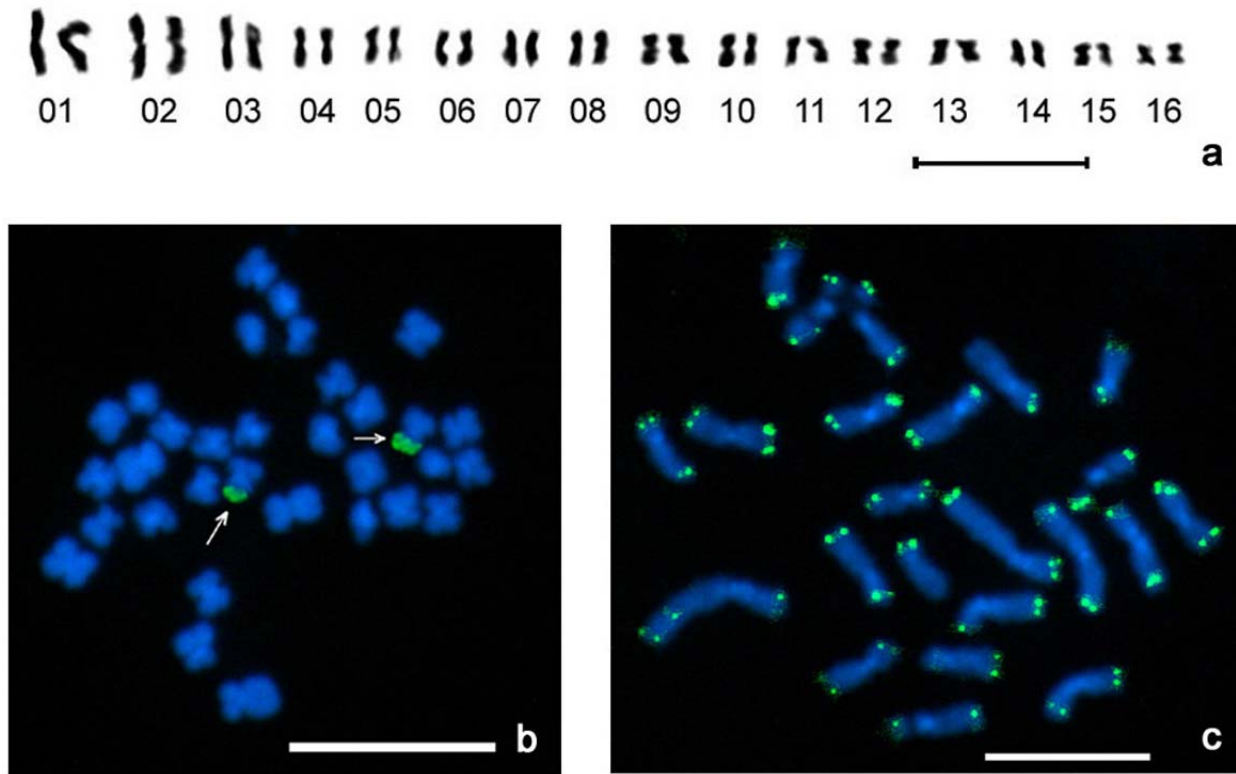
La localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA) è stata determinata mediante FISH e, dall'esame di 27 metafasi mitotiche allestite a partire da 2 femmine, questi geni risultano localizzati in posizione terminale sul braccio corto di una coppia di omologhi di media grandezza (Fig. 30b).

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

L'osservazione di 5 metafasi mitotiche, allestite da un singolo individuo, mostra che la sonda $(TTAGG)_n$ ha ibridato positivamente su tutti i telomeri dei cromosomi metafasici, dando origine a coppie di segnali appaiati ben distinguibili (Fig. 30c).

Genome Size: $1,12 \pm 0,01$ pg

Tavola 30 *Corophium acutum*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Corophium orientale* Schellenberg, 1928**

Superfamiglia:	Corophioidea
Famiglia:	Corophiidae
Sottofamiglia:	Corophiinae
Genere:	<i>Corophium</i>
Specie:	<i>Corophium orientale</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Questa specie del genere *Corophium* ha un cariotipo costituito da $2n=28$ cromosomi a centromero mediano (Fig. 31a), con il paio contrassegnato dal numero 3 che ha un indice centromerico vicino al limite tra submetacentrico e subtelocentrico. Il numero fondamentale delle braccia cromosomiche risultante è $FN=56$.

Genome Size: $1,19 \pm 0,02$ pg

***Corophium sextonae* Crawford, 1937**

Superfamiglia:	Corophioidea
Famiglia:	Corophiidae
Sottofamiglia:	Corophiinae
Genere:	<i>Corophium</i>
Specie:	<i>Corophium sextonae</i>

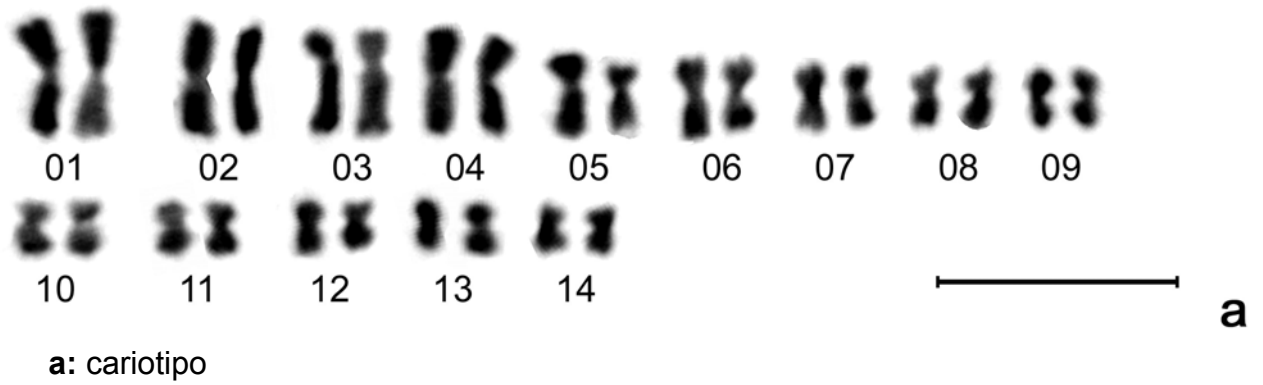
Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Un numero diploide $2n=28$ e un cariotipo costituito da 14 coppie di cromosomi omologhi a centromero mediano, corrispondenti ad un $FN=56$, caratterizzano anche *Corophium sextonae* (Fig. 32a).

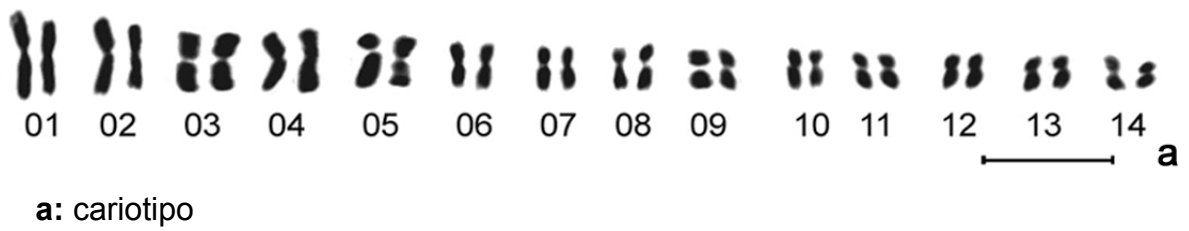
Genome Size: $1,89 \pm 0,01$ pg

Tavola 31 *Corophium orientale*



La barra rappresenta 10µm

Tavola 32 *Corophium sextonae*



La barra rappresenta 10µm

***Erichthonius argenteus* Krapp-Schickel, 1993**

Superfamiglia:	Photoidea
Famiglia:	Ischyroceridae
Sottofamiglia:	Ischyrocerinae
Tribù:	Siphonocetini
Genere:	<i>Erichthonius</i>
Specie:	<i>Erichthonius argenteus</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Il numero diploide di cromosomi riscontrato più frequentemente in questa specie è $2n=20$ (Fig. 33a) e 9 coppie di meta-submeccentrici ed una di subtelocentrici (Fig. 33a, paio n°9) ne costituiscono il cariotipo. Il risultante “fundamental number” di braccia cromosomiche è $FN=38$ (Fig. 33a)

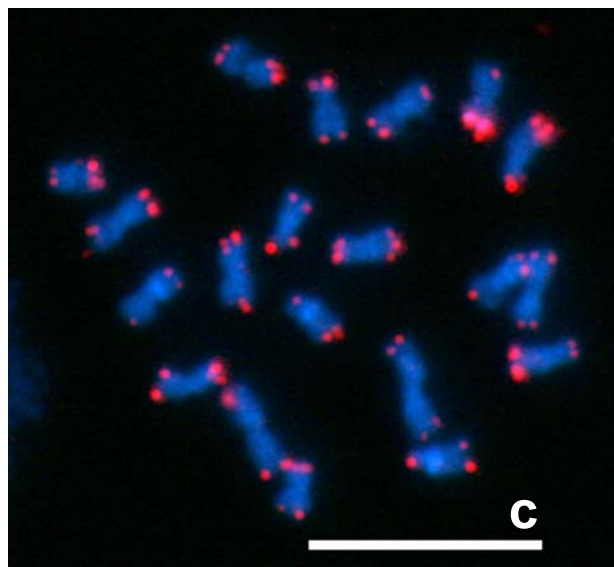
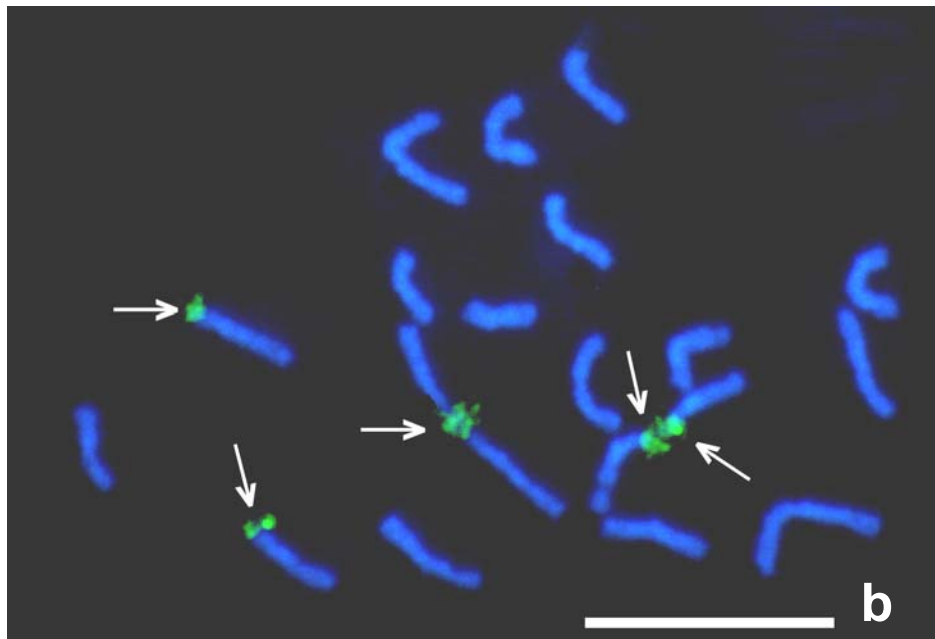
Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

Tutte le metafasi mitotiche su cui ha ibridato positivamente la sonda del complesso ribosomale maggiore (18S-5,8S-28S rDNA), presentano costantemente segnali evidenti in posizione terminale sul braccio corto di tre coppie di omologhi a centromero mediano (Fig. 33b). Sono state esaminate 31 metafasi embrionali allestite a partire da 3 femmine ovigere.

Caratterizzazione dei telomeri tramite FISH

La FISH con la sonda telomerica (TTAGG)_n ha dato come risultato segnali di ibridazione molto intensi e nettamente distinguibili all'estremità di tutti i cromosomi metafasici (Fig. 33c). Per la determinazione di questo parametro sono state osservate 16 piastre metafasiche allestite a partire da 1 individuo.

Tavola 32 *Erichthonius argenteus*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda telomerica (TTAGG)_n (in colore)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Ischyrocerus anguipes* Krøyer, 1838**

Superfamiglia:	Photoidea
Famiglia:	Ischyroceridae
Sottofamiglia:	Ischyrocerinae
Tribù:	Ischyrocerini
Genere:	<i>Ischyrocerus</i>
Specie:	<i>Ischyrocerus anguipes</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Un numero diploide pari a $2n=10$ (Fig. 34a) ed un cariotipo costituito da 4 coppie di cromosomi a centromero mediano (1-4) e una coppia di cromosomi subtelocentrici (5) (Fig. 34a), per un FN pari a 18, caratterizzano questa specie nordica. Il paio di subtelocentrici è di dimensioni decisamente più ridotte, rispetto alle altre, e presenta una costrizione secondaria sul braccio cromosomico più corto (Fig. 34a, frecce).

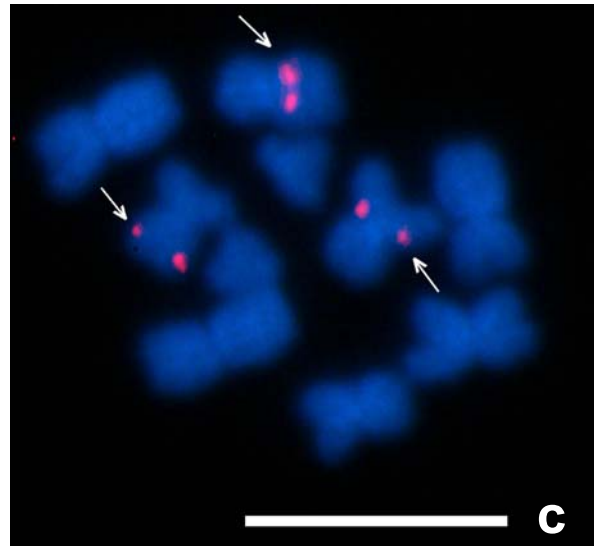
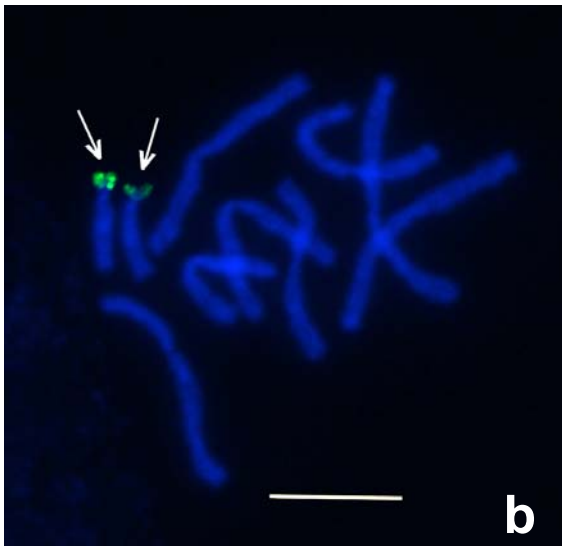
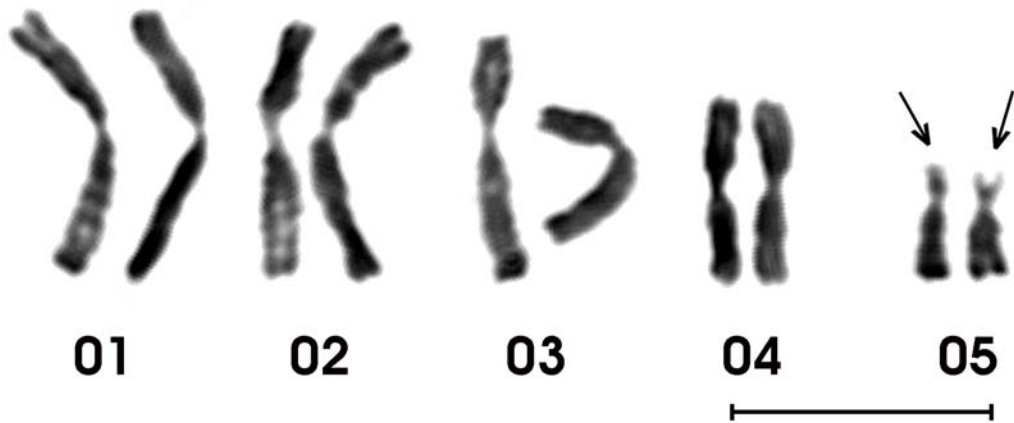
Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

Il complesso di geni 18S-5,8S-28S rDNA risulta essere localizzato in posizione terminale sul braccio corto della coppia di omologhi subtelocentrici (Fig. 34b). Le NOR, pertanto, corrispondono alla costrizione secondaria osservata in precedenza. Sono state analizzate 46 piastre metafasiche allestite a partire dagli embrioni di 5 femmine ovigere.

Localizzazione 5SrDNA

Per questa specie è stato possibile, mediante FISH, localizzare il complesso di geni 5S rDNA con una sonda prodotta a partire dal DNA genomico di *J. marmorata*. Tale parametro è stato determinato in base all'analisi di 7 piastre metafasiche allestite a partire da una singola ovigera. Una coppia di omologhi a centromero mediano di media grandezza esibisce segnali localizzati in posizione paracentromerica sul braccio lungo; in 6 piastre su 7 un ulteriore cromosoma presenta un segnale FISH in posizione subterminale sul braccio più lungo (Fig. 34c).

Tavola 34 *Ischyrocerus anguipes*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 5S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10 μ m

***Jassa marmorata* Holmes, 1903**

Superfamiglia:	Photoidea
Famiglia:	Ischyroceridae
Sottofamiglia:	Ischyrocerinae
Tribù:	Ischyrocerini
Genere:	<i>Jassa</i>
Specie:	<i>Jassa marmorata</i>

Caratteristiche carilogiche

Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

Un cariotipo di $2n=12$ cromosomi, $FN=22$, e costituito da 5 coppie di cromosomi metacentrici e da una coppia di subtelocentrici, recanti le NOR, era già stato descritto da Libertini *et al.* 2000.

Un' analoga morfologia (Fig. 35a) del cariotipo è stata costantemente riscontrata in tutti gli individui di questa specie analizzati nel corso del dottorato.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

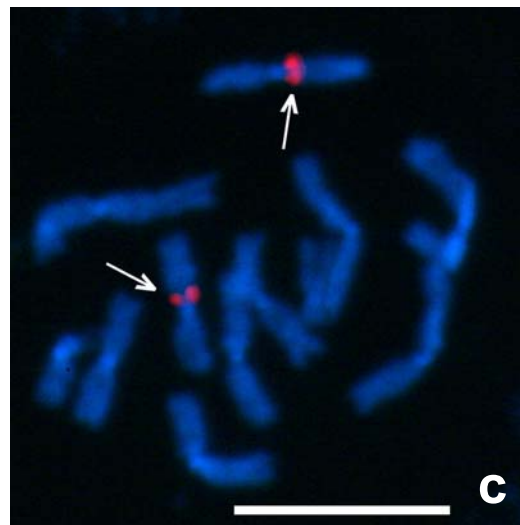
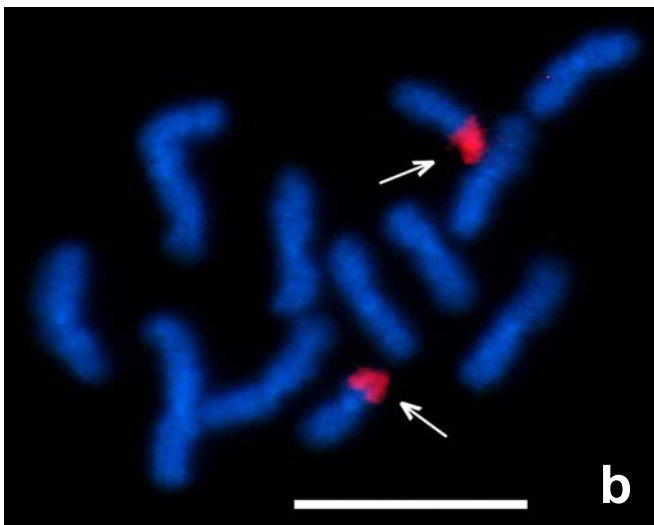
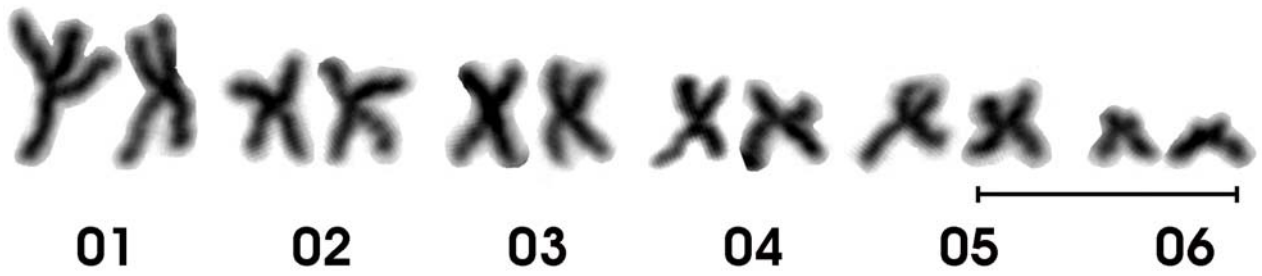
Con indagini condotte in parallelo anche su *J. cadetta* n. sp. (vedi di seguito) è stato confermato che i geni del complesso ribosomale maggiore sono localizzati in posizione terminale sul braccio corto della coppia di omologhi subtelocentrici (Libertini *et al.* 2000, Fig. 35b). Sono state valutate positivamente 20 piastre metafasiche allestite a partire da 2 individui.

Localizzazione 5SrDNA

La FISH eseguita con una sonda contenente i geni del complesso ribosomale minore (5S rDNA), costruita via PCR a partire da DNA omologo, ha consentito di stabilire che tali geni sono localizzati in posizione intercalare, in prossimità del centromero, sul braccio lungo di una coppia di omologhi a centromero mediano di media grandezza (Fig. 35c). Per definire la posizione di questo complesso genico, sono state osservate 5 piastre metafasiche allestite a partire da una singola ovigera.

Genome Size: $0,95 \pm 0,01$ pg

Tavola 35 *Jassa marmorata*



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

c: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 5S rDNA (in colore, vedi frecce)

Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

***Jassa cadetta* n. sp.**

Superfamiglia:	Photoidea
Famiglia:	Ischyroceridae
Sottofamiglia:	Ischyrocerinae
Tribù:	Ischyrocerini
Genere:	<i>Jassa</i>
Specie:	<i>Jassa cadetta</i> n. sp.

Caratteristiche carilogiche

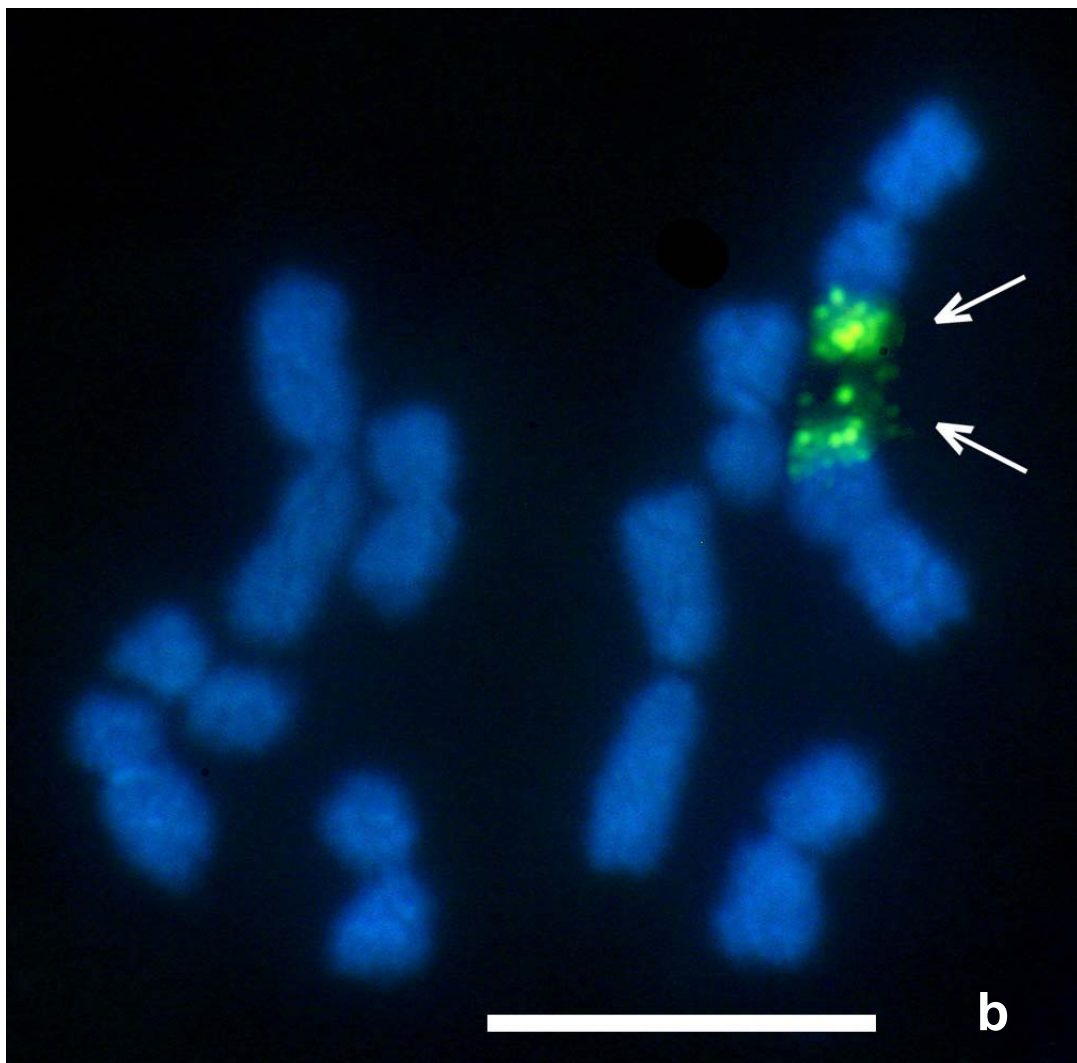
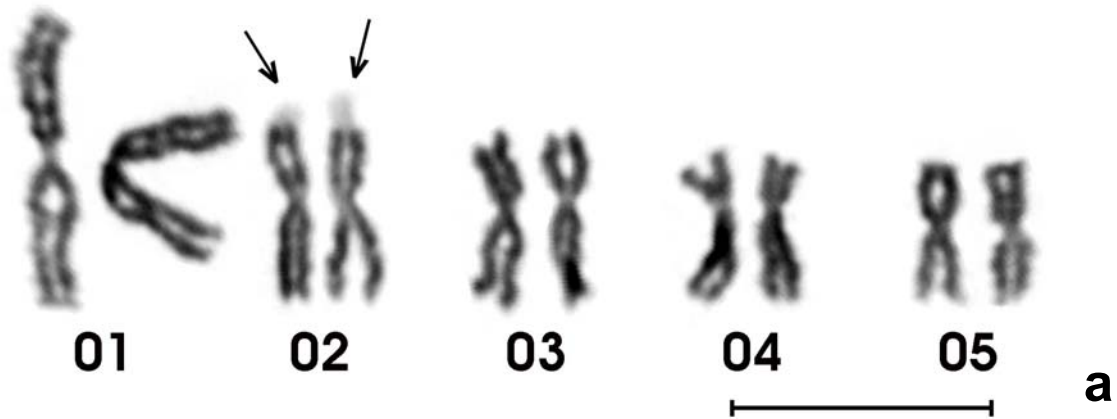
Numero di cromosomi e morfologia del cariotipo

A differenza di quanto riscontrato in *J. marmorata*, il numero diploide di cromosomi riscontrato per questa specie è pari a $2n=10$ e il cariotipo risulta essere costituito da 4 coppie di cromosomi a centromero mediano (Fig. 36a, paia 1-3 e 5) e una coppia di cromosomi sub-metacentrici (Fig. 36a, paio 4). Il numero fondamentale delle braccia cromosomiche è, pertanto, $FN=20$.

Localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore (NOR)

Questo parametro è stato valutato dall'osservazione di 44 piastre metafasiche allestite a partire da 5 femmine ovigere. La sonda del 18S-5,8S-28S rDNA ha sempre ibridato positivamente in posizione terminale sul braccio corto di una coppia di omologhi metacentrici (Fig. 36b), molto probabilmente corrispondente al paio, n°2 nel cariotipo, che esibisce delle evidenti costrizioni secondarie.

Tavola 36 *Jassa cadetta* n. sp.



a: cariotipo

b: metafase mitotica embrionale, FISH con sonda 18S-5,8S-28S rDNA (in colore, vedi frecce)

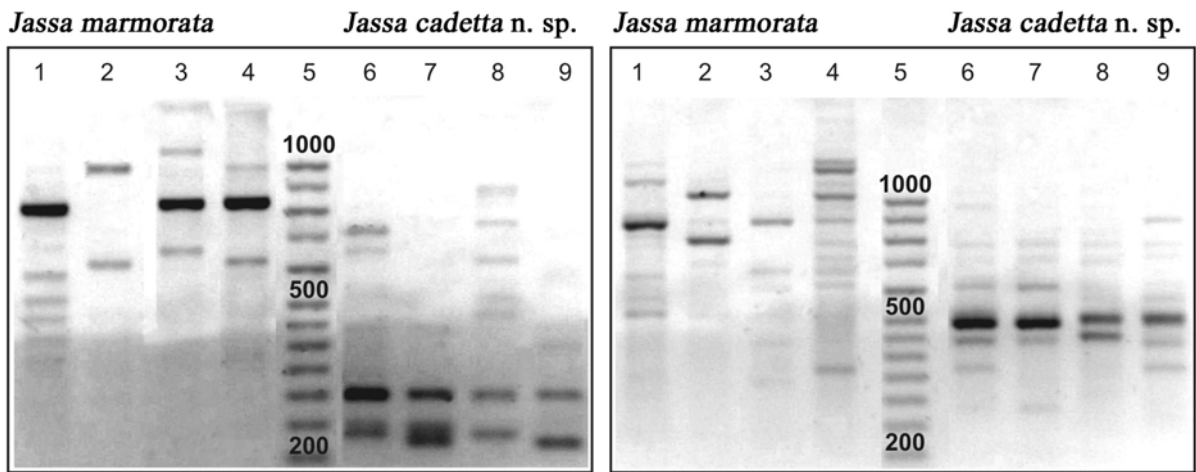
Controcolorazione con DAPI (in blu). La barra rappresenta 10µm

RAPD-PCR in *Jassa*

Le indagini carilogiche svolte su popolazioni di *Jassa* della Laguna di Venezia, inizialmente identificate come *Jassa marmorata*, hanno portato all'individuazione di due forme chiaramente distinte a livello citogenetico e per le quali non erano mai stati individuati cariotipi "ibridi" negli embrioni analizzati. Tali risultati suggerivano che, oltre a *J. marmorata*, un'altra specie di *Jassa* morfologicamente simile alla prima, potesse essere presente nella fauna bentonica Veneziana.

Al fine di ottenere un'ulteriore prova della distinzione tra le due forme carilogiche è stata eseguita, in parallelo, l'analisi di marcatori molecolari prodotti mediante RAPD-PCR. Non sempre gli esperimenti hanno fornito marcatori specie-specifici unici e/o presenti in tutte le repliche, tuttavia si sono sempre ottenuti dei finger-print distinti dove, nella forma a 12 cromosomi, le bande dei prodotti di amplificazione avevano pesi molecolari più elevati rispetto a quella a 10 cromosomi. La figura sottostante illustra un esempio ottenuto con due degli otto primers utilizzati (A2 e D2), applicati a 4 campioni di DNA per specie, dove è possibile osservare che le bande informative relative alla forma a 10 cromosomi sono particolarmente evidenti e si collocano su dimensioni inferiori alle 600bp. I risultati ottenuti con gli altri 6 primers erano simili a quelli illustrati e l'esecuzione degli esperimenti, con gli altri campioni disponibili per le due forme, ha sempre portato alla netta separazione dei due specifici finger-print.

Questi risultati, unitamente ai dati carilogici, indicavano pertanto una chiara discriminazione tra le due forme, attribuibile all'esistenza di due specie distinte. Pertanto, è stata eseguita, dalla Dott.ssa Traudl Krapp-Schickel del "Zoologisches Forschungsinstitut und Museum A. Koenig" di Bonn (Germania), un'approfondita analisi dei caratteri morfologici su individui attribuiti alle due forme. L'analisi morfologica ha confermato la distinzione delle due specie, individuando alcuni caratteri distintivi soprattutto nei maschi adulti, ed ha portato ad identificare nella forma a 10 cromosomi una nuova specie, nominata *Jassa cadetta* (Krapp *et al.*, 2007, in stampa), e confermato la presenza di *J. marmorata* nella laguna di Venezia (AAVV, The Amphipoda of the Mediterranean).



Primer A2

Primer D2

Esempi di elettroforesi su gel dei prodotti di RAPD-PCR per due specie di *Jassa* della Laguna di Venezia.

Le colonna 5 è occupata dal marcatore per i pesi molecolari (in bp)

DISCUSSIONE

Tabelle riassuntive dei dati citogenetici

Tutti i dati cariologici noti, relativi agli anfipodi sono riportati nelle tabelle 3,4 e 5.

Legenda tabelle 3,4 e 5:

n= numero aploide di cromosomi; **2n**= numero diploide di cromosomi; **FN**= numero fondamentale (fundamental number); **18S**= numero di cromosomi recanti il complesso maggiore dei geni ribosomali (18S-5,8S-25S rDNA); **5S**= numero di cromosomi recanti il complesso minore dei geni ribosomali (5S rDNA); **Tel**= presenza del pentamero telomerico (TTAGG)_n; **GS**= Quantità di DNA nucleare (C-value)

Riferimenti bibliografici:

a: Poisson e Le Calvez, 1948; **b**: Le Calvez e Certain, 1951; **c**: Bachmann e Rheinsmith, 1973; **d**: Rheinsmith *et al.*, 1974; **e**, Lop: 1989; **f**: Coleman, 1994; **g**: Salemaa e Kamaltynov, 1994; **h**: Sahara *et al.*, 1999; **i**: Libertini *et al.*, 2000; **j**: Libertini e Krapp-Schickel, 2000; **k**: Libertini *et al.*, 2003; **l**: Natyaganova *et al.*, 2003; **m**: Krapp *et al.*, 2006; **n**: Rees *et al.*, 2007; **pt**: presente tesi

Tabella 3: dati cariologici complessivi relativi al sottordine Gammaridea

Superfamiglia	Famiglia	Specie	n	2n	FN	18S	5S	Tel	C band	GS	Riferimenti Bibliografici
Ampeliscoidea	Ampeliscidae	<i>Ampelisca macrocephala</i>								64,62 pg	n
Crangonyctoidea	Niphargidae	<i>Niphargus ladmiradulti</i>	25	50							in f
Crangonyctoidea	Niphargidae	<i>Niphargus longicaudatus</i>	25	50							in f
Crangonyctoidea	Niphargidae	<i>Niphargus plateaui</i>	25								in f
Crangonyctoidea	Niphargidae	<i>Niphargus tatrentis</i>	25								in f
Crangonyctoidea	Niphargidae	<i>Niphargus virei</i>	25	50							in f
Dexaminoidea	Atylidae	<i>Atylus swammerdamei</i>	12	24							f
Dexaminoidea	Dexaminidae	<i>Dexamine spinosa</i> cfr.		26	48	4				0,95 ± 0,02 pg	pt
Dexaminoidea	Dexaminidae	<i>Dexamine thea</i>		24	46	2			+		pt
Eusiroidea	Calliopiidae	<i>Apherusa chiereghinii</i>		26	52	2					pt
Eusiroidea	Calliopiidae	<i>Calliopiopus laevisculus</i>	9	18	34-36	4-6				2,84 ± 0,02 pg	in f, pt
Eusiroidea	Calliopiidae	<i>Halirages fulvocinctus</i>		32							f
Eusiroidea	Eusiridae	<i>Rachotropis aculeata</i>								7,16 pg	n
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Acanthogammarus flavus</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Acanthogammarus grewinki</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Acanthogammarus victorii</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Boeckaxelia carpenteri</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Brandtia lata</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Dorogostaiskia parasitica</i>		52							l
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Echiuropsus macronychus</i>	32								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Echiuropsus morawitzi</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Echiuropsus rhodopthalmus</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Echiuropsus seidlitzii</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Eulimnogammarus lividus</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Eulimnogammarus maackii</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Eulimnogammarus verrucosus</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Eurybiogammarus ussolzewi</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Garjajewia cabanosi</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Hyalellopsis taczanowskii</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Ommatogammarus flavus</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Palicarinus carinulata</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Palicarinus puzylli</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Pallasaea brandti</i>	26								g

Continuazione Tab.3

Superfamiglia	Famiglia	Specie	n	2n	FN	18S	5S	Tel	C band	GS	Riferimenti Bibliografici
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Pallasaea cancelloides</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Pallasea grubei</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Pallasea kessleri</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Pallasea quadrispinosa</i>	26								in f
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Philolimnogammarus cyaneus</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Philolimnogammarus maritiji</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Philolimnogammarus vittatus</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Plesiogammarus gerstackeri</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Poekilogammarus jedorensis</i>	26								g
Gammaroidea	Acanthogammaridae	<i>Spinacanthus parasiticus</i>	26								g
Gammaroidea	Anisogammaridae	<i>Anisogammarus annandalei</i>	27								in f
Gammaroidea	Gammaracanthidae	<i>Gammaracantus lacustris</i>	19								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Chaetogammarus marinus</i>	26	52							in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Dikerogammarus villosus</i>		52		4-5		+		5,32 ± 0,07 pg	pt
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus berilloni</i>	26	52							e
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus calvus</i>	27	54							e
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus echinosetosus</i>	27	54							e
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus finmarchicus</i>	26	52		4				7,00 ± 0,05 pg	in f, pt
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus longisetosus</i>	27	54							e
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus margalefi</i>	27	54							e
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus navaensis</i>	28								e
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus obtusatus</i> cfr.		52		2					pt
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus olivii</i>		46		2		+		2,25 ± 0,04 pg	pt
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus pirloti</i>	29-32								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Echinogammarus tarragonensis</i>	25								e
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Elasmopus</i> sp.		28							j
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus aequicauda</i>	26	52	104	6		+		3,02 ± 0,03 pg	pt
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus balcanicus</i>	26								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus chevreuxi</i>	26								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus crinicornis</i>		52	102					3,22 ± 0,05 pg	j, pt
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus duebeni</i>	27								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus gauthieri</i>	26	52							e
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus lacustris</i>	26								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus locusta</i>	26-28								in f

Continuazione Tab.3

Superfamiglia	Famiglia	Specie	n	2n	FN	18S	5S	Tel	C band	GS	Riferimenti Bibliografici
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus lychnidensis</i>	34								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus macedonicus</i>	21								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus oceanicus</i>		54		8-10		+			pt
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus ochridensis</i>	25								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus parechiniformis</i>	25								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus pulex</i>	26	52-53				+			in f, h
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus pungens</i>	24								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus roeseli</i>	26								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus salemaai</i>	12								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus salinus</i>	26	52							in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus solidus</i>	25								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus</i> sp.		52+B		4		+			pt
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus</i> sp.2								2,17 pg	d
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus stankokaramani</i>	25								in f
Gammaroidea	Gammaridae	<i>Gammarus zaddachi</i>	26-27								in f
Gammaroidea	Gammaridae	Sp.1 (" <i>Gammaridea</i> sp.")								1,58 pg	d
Gammaroidea	Gammaridae	Sp.2 (" <i>Gammaridea</i> sp.")								3,80 pg	c
Gammaroidea	Macrohectopodidae	<i>Macrohectopus branickii</i>	26								g
Gammaroidea	Micruropodidae	<i>Gmelinoides fasciatus</i>	26								g
Gammaroidea	Micruropodidae	<i>Micruropus vortex</i>	26								g
Gammaroidea	Micruropodidae	<i>Micruropus wolhi</i>	26								g
Iphimedoidea	Epimeriidae	<i>Epimeria loricata</i>								13,49 pg	n
Leucothoidea	Stenothoidae	<i>Stenothoe tergestina</i>		22	44	2		+		0,80 ± 0,02 pg	j, pt
Lysianassoidea	Lysianassidae	<i>Anonyx nugax</i>								27,00 pg	n
Lysianassoidea	Lysianassidae	<i>Waldeckia obesa</i>	25	50							in f
Melitoidea	Melitidae	<i>Maera grossimana</i>	23								in f
Melitoidea	Melitidae	<i>Maera othonis</i>	23								in f
Melitoidea	Melitidae	<i>Melita palmata</i>	22	44	86						in f, j
Metacrangonyctoidea	Metacrangonyctidae	<i>Metacrangonyx longipes</i>	26								in f
Oedicerotoidea	Oedicerotidae	<i>Acanthostepheia malmgreni</i>								2,94 pg	n
Pontoporeioidea	Haustoriidae	<i>Haustorius arenarius</i>	20	40							f
Pontoporeioidea	Pontoporeiidae	<i>Monoporeia affinis</i>	26	52						8,48 pg	in f,k
Pontoporeioidea	Pontoporeiidae	<i>Pontoporeia femorata</i>	14	28						8,48 pg	in f,k
Stegocephaloidea	Stegocephalidae	<i>Stegocephalus inflatus</i>								50,91 pg	n

Continuazione Tab.3

Superfamiglia	Famiglia	Specie	n	2n	FN	18S	5S	Tel	C band	GS	Riferimenti Bibliografici
Talitroidea	Hyalidae	<i>Apohyale crassipes</i>		50	88	2			+	0,94 ± 0,03 pg	j, pt
Talitroidea	Hyalidae	<i>Apohyale prevostii</i>	25	50	100	2		+		1,89 ± 0,05 pg	f, pt
Talitroidea	Hyalidae	<i>Parhyale aquilina</i>		48	96						j
Talitroidea	Hyalidae	<i>Protohyale (Protohyale) schmidti</i>		22						1,05 ± 0,01 pg	j, pt
Talitroidea	Talitridae	<i>Desayesorchestia deshayesii</i>	25								b
Talitroidea	Talitridae	<i>Orchestia prope cavimana</i>	25	50	100	12-14	2	+	++	1,77 ± 0,04 pg	pt
Talitroidea	Talitridae	<i>Orchestia gammarellus</i>	25	50	100				+++	2,81 ± 0,03 pg	a, pt
Talitroidea	Talitridae	<i>Orchestia mediterranea</i>		50	100	2		+	+++	2,28 ± 0,04 pg	b, pt
Talitroidea	Talitridae	<i>Orchestia montagui</i>		50	100	4		+	++	1,71 ± 0,03 pg	pt
Talitroidea	Talitridae	<i>Platorchestia platensis</i>		50	100	2	2	+	++	1,86 ± 0,03 pg	pt
Talitroidea	Talitridae	<i>Sardorchestia pelacaniformis</i>	25	50	100					2,68 ± 0,02 pg	pt
Talitroidea	Talitridae	<i>Talitrus saltator</i>	25	50	100				+++	2,20 ± 0,07 pg	a, pt

Tabella 4: dati cariologici complessivi relativi al sottordine Corophiidea

Superfamiglia	Famiglia	Specie	n	2n	FN	18S	5S	Tel	C band	GS	Riferimenti Bibliografici
Aoroidea	Aoridae	<i>Aora gracilis</i>	4	8							f
Aoroidea	Aoridae	<i>Aorides columbiae</i>								5,10 pg	c
Aoroidea	Aoridae	<i>Aoridae</i> sp.		14	28	2					pt
Aoroidea	Aoridae	<i>Arctolembos arcticus</i>								16,09 pg	n
Aoroidea	Aoridae	<i>Lembos websteri</i>	18	36							f
Aoroidea	Aoridae	<i>Leptocheirus pilosus</i>		22							in f
Aoroidea	Aoridae	<i>Microdeutopus anomalus</i> cfr.		14	26	2					pt
Aoroidea	Aoridae	<i>Microdeutopus versiculatus</i>		16	30	2					pt
Caprelloidea	Caprellidae	<i>Caprella dilatata</i>		24	48	3-5		+		0,97 ± 0,02 pg	pt
Caprelloidea	Caprellidae	<i>Caprella equilibra</i>		24	48	4				0,69 ± 0,02 pg	k, pt
Caprelloidea	Caprellidae	<i>Caprella mutica (macho)</i>		24	48						j
Caprelloidea	Caprellidae	<i>Caprella scaura</i>		24	48					0,74 ± 0,01 pg	m
Caprelloidea	Caprellidae	<i>Caprella septentrionalis</i>		24	48	4		+		1,52 ± 0,02 pg	pt
Caprelloidea	Caprellidae	<i>Phtisica marina</i>		10	18	2				1,10 ± 0,01 pg	pt
Corophioidea	Ampithoidae	<i>Ampithoe riedli</i>		32	60	6-8					pt
Corophioidea	Corophiidae	<i>Corophium acutum</i>	16	32	64	2		+		1,12 ± 0,01 pg	pt
Corophioidea	Corophiidae	<i>Corophium orientale</i>		28	56					1,19 ± 0,02 pg	pt
Corophioidea	Corophiidae	<i>Corophium sextonae</i>	14	28	56					1,89 ± 0,01 pg	pt
Corophioidea	Corophiidae	<i>Corophium volutator</i>	14	28							in f
Photoidea	Ischyroceridae	<i>Erichthonius argenteus</i>		20	38	6		+			pt
Photoidea	Ischyroceridae	<i>Ischyrocerus anguipes</i>		10	18	2	3				pt
Photoidea	Ischyroceridae	<i>Jassa cadetta</i> n.sp.		10	20	2					pt
Photoidea	Ischyroceridae	<i>Jassa marmorata</i>	6	12	22	2	2		+	0,95 ± 0,01 pg	f, i

Tabella 5: dati cariologici complessivi relativi al sottordine Hyperiidea

Superfamiglia	Famiglia	Specie	n	2n	FN	18S	5S	Tel	C band	GS	Riferimenti Bibliografici
Phronimoidea	Hyperidae	<i>Hyperia galba</i>		126							f
Phronimoidea	Hyperidae	<i>Hyperia galba</i>	52	ca. 100							in f
Phronimoidea	Hyperidae	<i>Hyperiella dilatata</i>		58							in f
Phronimoidea	Hyperidae	<i>Themisto libellula</i>								3,97 pg	n
Phronimoidea	Phronimidae	<i>Phronima atlantica</i>	15	30							in f
Phronimoidea	Phronimidae	<i>Phronima sedentaria</i>	15	30							in f

Tabella 6: Contributo di questa tesi alle conoscenze citogenetiche sugli Anfipodi

Parametro	Totale specie studiate	Specie in questa tesi	Contributo %
Numero cromosomi	130	27	21
Formula cariotipica	47	27	57
Contenuto di DNA nucleare	41	24	59
18S rDNA	31	30	97
5S rDNA	4	4	100
Telomeri	16	15	94
Bandeggio-C	9	8	89

Come dimostrano i dati riportati in tabella 6, questa tesi ha dato un apporto consistente al progresso delle conoscenze nell'ambito della citogenetica degli anfipodi, creando inoltre i presupposti metodologici per sviluppare maggiormente in futuro l'acquisizione dei parametri molecolari per quest'ordine di crostacei. Infatti, rispetto a quanto conosciuto in precedenza, l'incremento delle conoscenze varia dal 21% per quanto riguarda il numero di cromosomi ad oltre il 90% per i parametri derivanti dall'applicazione della citogenetica molecolare.

Lo sviluppo che ha avuto recentemente la citogenetica degli anfipodi è molto probabilmente dovuto all'identificazione di idonee tecniche cariologiche che hanno consentito di superare i limiti metodologici delle sezioni in paraffina o dello schiacciamento, segnalati da Coleman (1994), e di estendere agli anfipodi l'analisi citometrica in flusso.

Ad esempio l'Hot Drying applicato ad embrioni precoci (Libertini *et al.*, 2000) ha permesso l'allestimento di preparati cromosomici di buona qualità anche per specie di ridotte dimensioni, consentendo accurati conteggi, lo studio del cariotipo ed analisi citogenetiche avanzate (C banding, FISH). Analogamente, l'uso di sospensioni cellulari da embrioni in stadio di sviluppo avanzato ha consentito di utilizzare più ampiamente la citometria a flusso per determinare il contenuto di DNA nucleare (Libertini *et al.*, 2000).

In prima analisi sarà preso in considerazione l'andamento dei singoli parametri a livello di ordine, sottordine e famiglia, riportati nelle tabelle 3, 4 e 5.

Numero di cromosomi

Un'ampia variabilità nel numero cromosomico caratterizza le famiglie degli Aoridae (con $8 < 2n < 36$), dei Gammaridae ($24 < 2n < 64$) e degli Ischyroceridae ($10 < 2n < 20$), mentre tale parametro risulta costante nei Talitridae ($2n=50$), nei Caprellidae ($2n=24$) e nei Niphargidae ($2n=50$). Tra gli Aoridae e gli Ischyroceridae, unitamente alla specie appartenente alla sottofamiglia Phisiticinae *Phtisica marina*, si riscontrano le specie con il numero di cromosomi più basso tra tutti gli anfipodi, mentre il numero più elevato è stato osservato tra gli Hyperiidea, in *Hyperia galba* ($2n=126$, $2n=ca.100$, vedi Coleman, 1994). In generale il sottordine Corophiidea *sensu* Myers e Lowry (2003) è caratterizzato da numeri di cromosomi più bassi ($8 < 2n < 36$) rispetto ai sottordini Gammaridea ($18 < 2n < 54$) e Hyperiidea ($30 < 2n < 126$).

Per un lungo periodo di tempo gli anfipodi sono stati considerati, relativamente uniformi dal punto di vista cariologico (Hedgecock *et al.*, 1982), dato che la maggior parte delle specie (quasi tutte appartenenti alla famiglia Gammaridae) risultava caratterizzata da un complemento diploide di 50-54 cromosomi (Lop, 1989; Coleman, 1994; Salemaa e Kamal'tynov, 1994) con un minimo grado di variazione, eventualmente dovuto alla presenza di cromosomi soprannumerari. Questa uniformità è, in seguito, venuta meno allorché sono stati studiati altri Gammaridea e Corophiidea, soprattutto specie di ridotte dimensioni, non indagati in precedenza a causa di limiti metodologici (Coleman, 1994, Libertini e Krapp-Schickel, 2000).

La variabilità nel numero di cromosomi in alcuni taxa di anfipodi è stata talvolta utilizzata come strumento nella filogenesi e nella sistematica, aiutando gli autori a chiarire controversie nella classificazione dei Melitidae (Coleman, 1994) e Hyalidae (Libertini e Krapp-Schickel, 2000; Bousfield e Hendrycks, 2002), per supportare l'origine polifiletica degli Aoridae (Coleman, 1994) o l'evoluzione tramite poliploidia dei Pontoporeidae (Salemaa, 1984; Salemaa e Heino, 1990), dei Gammaridae del lago Ohrid (Salemaa e Kamal'tynov, 1994) e degli Hyperiidea (Libertini e Lazzaretto, 1993, Coleman, 1994).

Morfologia del cariotipo

Negli anfipodi il cariotipo è generalmente caratterizzato da un'alta simmetria dovuta ad una preponderante presenza di cromosomi a centromero mediano, o costituiti da due braccia (m-sm), che porta il numero fondamentale delle braccia cromosomiche ad essere molto prossimo al doppio del valore diploide (confronta in Tab. 3, 4 le colonne "2n" e "FN"). Gli elementi a centromero terminale o sub-terminale (acrocentrici e/o subtelocentrici) sono

abbastanza rari e limitati più frequentemente ad 1 o due paia e, pertanto, possono rappresentare un buon diagnostico tra specie affini (Reygrobellet, 1974; Libertini e Krapp-Schickel, 2000). Tale ridotto numero di elementi a singolo braccio cromosomico (“monoarmed”) potrebbe indicare che eventi di fusione-fissione centrica o traslocazione robertsoniana, ritenuti da molti autori come i maggiori responsabili dei cambiamenti nel numero di cromosomi e nella morfologia del cariotipo tra specie affini, siano avvenuti raramente o siano avvenuti in tempi così remoti da non lasciarne apparente traccia nelle specie studiate (vedi anche parte sulle sequenze telomeriche). Tale mancata evidenza, tuttavia, potrebbe essere dovuta al fatto che finora poche specie tra loro realmente affini siano state investigate.

FISH

L'uso dell'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) come tecnica molecolare per la determinazione di nuovi caratteri tassonomici non convenzionali, era stata utilizzata negli anfipodi solo in due casi: nella caratterizzazione della sequenza telomerica di *Gammarus pulex* (Sahara *et al.*, 1999) e nella localizzazione dei geni del complesso ribosomale maggiore di *Jassa marmorata* (Libertini *et al.*, 2000). Al di là di quanto riportato nei suddetti lavori, l'applicazione di tale tecnica sul materiale da me impiegato ha subito mostrato risposte differenti ai trattamenti sperimentali. Di conseguenza, è stata necessaria una laboriosa messa a punto del procedimento che ha impegnato la prima parte del periodo di dottorato.

Tramite FISH, sono stati localizzati i geni del complesso ribosomale maggiore (18S-5.8S-28S rDNA), i geni del complesso ribosomale minore (5S rDNA), e caratterizzate le sequenze telomeriche. Risulta di particolare importanza la possibilità di localizzare le NOR tramite FISH dal momento che altre tecniche alternative quali il Giemsa N-banding (Funaki *et al.*, 1975) e l'Ag-NOR staining (Howell e Black, 1980) non producono soddisfacenti risultati con gli anfipodi (Libertini *et al.*, 2000).

Complesso maggiore dei geni ribosomali (18S-5.8S-28S rDNA)

Nelle 30 specie di anfipodi prese in esame per questo parametro, tale cluster genico è risultato più frequentemente localizzato in posizione terminale, generalmente sul braccio cromosomico più corto, in una singola coppia di omologhi. Ci sono, tuttavia, alcune specie nelle quali possono essere coinvolte più coppie di omologhi (fino a 6-7 in *O. prope cavimana* Tav. 15c, Tab. 3 e 4). L'analisi delle dimensioni dei segnali d'ibridazione indica

che diversi gradi di polimorfismo possono interessare le NOR: le dimensioni possono essere differenti nelle coppie di omologhi (fenomeno riscontrato in quasi tutte le specie caratterizzate), oppure, come in alcune specie di Gammaridae e in *Caprella dilatata*, un solo omologo può esserne interessato, dando origine ad un numero dispari di segnali (vedi Tav. 5b,c; Tav. 9c; Tav. 25c,d). I meccanismi che possono aver generato tali polimorfismi non sono ancora del tutto chiariti: la trasposizione dei cistroni ribosomali tramite ricombinazione non omologa o per mezzo di trasposoni associati alle NOR potrebbero essere i più probabili (Woznicki *et al.*, 2000).

La maggiore frequenza con cui è stata riscontrata una sola coppia di cromosomi omologhi, recanti i geni ribosomali maggiori, porta a supporre che questa sia la condizione ancestrale, analogamente a quanto teorizzato, ad esempio, per i vertebrati (Schmid 1978) e per i molluschi (Thirot-Quievreux e Insua 1992; Pascoe *et al.* 1996).

Complesso minore dei geni ribosomali (5S rDNA)

L'impossibilità di reperire un clone universale per la sonda dei geni ribosomali minori ha reso necessaria la produzione di tale sonda tramite PCR usando come stampo il DNA genomico di più specie. Nonostante siano stati eseguiti numerosi esperimenti incrociati su preparati di molte specie, si sono ottenuti risultati solo per quattro di esse, probabilmente a causa delle differenze tra le sequenze 5S tali da precludere l'ibridazione, o per motivi attribuibili a preparati non ottimali.

Le sonde 5S ottenute da DNA di *J. marmorata* hanno ibridato con successo sui cromosomi della medesima specie e di *I. anguipes*, mentre la sonda da *A. crassipes* è risultata positiva sui talitridi *P. platensis* e *O. prope cavimana*. Solo *I. anguipes* ha i cluster 5S localizzati su 3 cromosomi, mentre le altre 3 specie presentano un solo paio di omologhi interessati da questi geni. Tale risultato indurrebbe a pensare che un singolo paio di cluster genici 5S sia la condizione cariotipica ancestrale, essendo la situazione più frequente, come già evidenziato in vertebrati (Sørensen *et al.*, 1991; Fernandes e Martins-Santos, 2006; Morescalchi *et al.*, 2008), molluschi (Vitturi *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2007) ed echinodermi (Gornung *et al.*, 2005). Tuttavia negli isopodi, l'unico altro ordine di Malacostraci studiato per questo aspetto (Pelliccia *et al.*, 1999; Barzotti *et al.*, 2003), si trovano esclusivamente specie caratterizzate da due paia di cluster 5S, mentre nelle specie del complesso *Drosophila virilis* (Wimber e Wimber, 1977; Kress *et al.*, 2001) è stato supposto che due paia di cromosomi recanti tali geni sia la condizione ancestrale. Conseguentemente, allo stato attuale delle conoscenze, non è ancora possibile delineare

quale fosse effettivamente il numero ancestrale dei siti 5S negli anfipodi. In tutti i casi studiati non si è osservata sintonia con i geni del complesso ribosomale maggiore, contrariamente a quanto riscontrato, tra i crostacei, nei copepodi calanoidi (Drouin, 1995).

Identificazione del repeat telomerico

Per quanto concerne l'identificazione del repeat telomerico, sono stati eseguiti esperimenti d'ibridazione, in parallelo, sia con la sonda pentamerica (TTAGG)_n sia con quella esamerica (TTAGGG)_n. Nelle 15 specie studiate, i telomeri sono sempre risultati positivi alla FISH con la sonda pentamerica (TTAGG)_n. Tale risultato è in accordo con quanto riscontrato nell'unico altro anfipode studiato finora per tale aspetto (*G. pulex* in Sahara *et al.*, 1999). L'uniformità dell'esito di questi esperimenti indicherebbe come il pentamero (TTAGG)_n sia l'unico repeat telomerico nell'ordine Amphipoda, analogamente a quanto riscontrato in altri crostacei (Branchiopoda, Maxillopoda e Malacostraca, Tab. 7) (Sahara *et al.*, 1999; Vítková *et al.*; 2005). L'unica eccezione è finora rappresentata dall'isopode *Asellus aquaticus*, che presenta il repeat esamerico (TTAGGG)_n (Pelliccia *et al.*, 1994, Tab. 7).

Diversi autori (Meyne *et al.*, 1989; Sahara *et al.*, 1999; Frydrychová *et al.*, 2004; Vitková *et al.* 2005; Traut *et al.*, 2007) hanno caratterizzato il repeat telomerico di alcuni phyla animali, delineandone una possibile evoluzione tra i metazoi. In tutti i vertebrati e nella maggior parte degli invertebrati è presente l'esamero TTAGGG; invece, negli artropodi, risulta essere tipica la sequenza pentamerica TTAGG, con l'eccezione dei Diptera che hanno evoluto complesse sequenze telomeriche (Rosén e Edström, 2000; Walter *et al.*, 2001; Biessman e Mason, 2003). Anche nei nematodi è presente un esamero diverso: TTAGGC (vedi citazioni in Ahn e Winter, 2006). È stata formulata l'ipotesi che il motivo esamerico TTAGGG, presente nella maggioranza dei phyla animali e in particolare i metazoi più primitivi (Traut *et al.*, 2007), sia da considerare come quello ancestrale mentre il pentamero TTAGG degli artropodi, analogamente ad altre varianti in altri taxa, siano apomorfie (Frydrychová *et al.*, 2004; Vitková *et al.* 2005; Traut *et al.*, 2007). La figura sottostante illustra il possibile schema evolutivo dei motivi telomerici in Animalia.

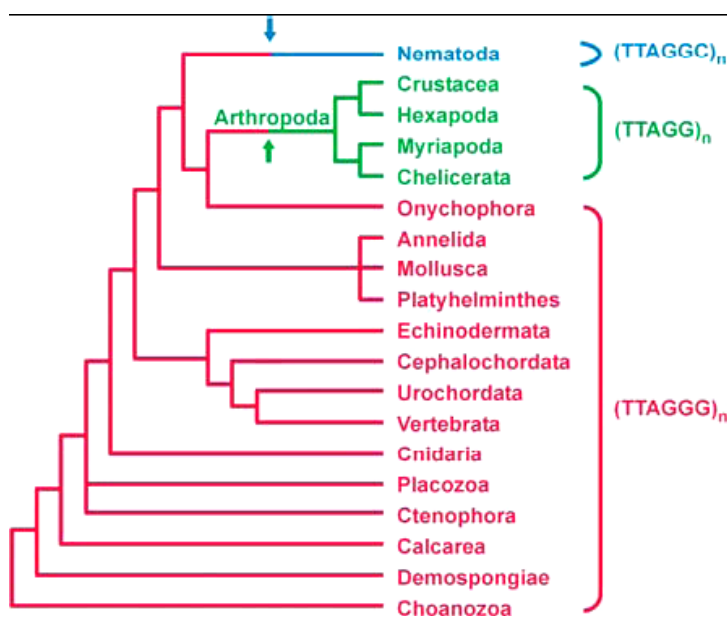
Negli anfipodi non sono mai stati riscontrati evidenti segnali d'ibridazione interstiziali, possibili testimoni di eventi di fusione tra cromosomi.

Tabella 7: quadro riassuntivo relativo alle specie di crostacei caratterizzate per il repeat telomerico

Specie	Classe -Ordine	Repeat telomerico	Riferimenti bibliografici
<i>Daphnia galeata</i>	Branchiopoda Cladocera	(TTAGG) _n	d
<i>Artemia franciscana</i>	Branchiopoda Anostraca	(TTAGG) _n	d
<i>Argulus foliaceus</i>	Maxillopoda Arguloida	(TTAGG) _n	d
<i>Penaeus semisulcatus</i>	Malacostraca Decapoda	(TTAGG) _n	a
<i>Trachelipus ratzeburgii</i>	Malacostraca Isopoda	(TTAGG) _n	d
<i>Asellus aquaticus</i>	Malacostraca Isopoda	(TTAGGG) _n	b
<i>Gammarus pulex</i>	Malacostraca Amphipoda	(TTAGG) _n	c
15 specie	Malacostraca Amphipoda	(TTAGG) _n	pt

Riferimenti bibliografici

a: Okazaki *et al.*, 1993; b: Pelliccia *et al.*, 1994; c: Sahara *et al.*, 1999; d: Vítková *et al.*, 2005; pt: presente tesi



Cladogramma dell'evoluzione del motivo telomerico in Animalia (da Traut *et al.*, 2007)

Contenuto di DNA nucleare (Genome Size)

Nell'ambito delle singole famiglie il Genome Size è ampiamente variabile (Tabb. 3, 4 e 5; colonna GS) e la variabilità è elevata anche nelle famiglie con numero di cromosomi costante. Il range di Genome Size degli anfipodi (0,68-64,62 pg) è il più esteso tra i crostacei malacostraci, essendo decisamente più ampio di quello degli isopodi e comprendendo per intero quello dei decapodi (isopodi 1,71-8,82 pg; decapodi 1,06-38 pg) (dati in Gregory, 2008).

Numerosi lavori hanno dimostrato che le differenze nelle dimensioni del genoma sono prevalentemente a carico della frazione di DNA non codificante; sul ruolo che tale frazione ha ricoperto nel corso dell'evoluzione ci sono, tuttavia, teorie contrastanti (si vedano per una rassegna Petrov, 2001; Gregory, 2005 b).

La teoria selezionista postula che l'extra DNA accumulatosi nel tempo possa avere una funzione adattativa, attribuendo alle dimensioni del genoma, piuttosto che all'informazione in esso contenuta, effetti diretti su alcuni caratteri del fenotipo. Ad esempio, la quantità di DNA è stata direttamente correlata con le dimensioni nucleari e cellulari in animali e piante, con le dimensioni corporee in mammiferi, anellidi, vermi piatti, insetti e copepodi, con la durata dello sviluppo in anfibi, coleotteri, afidi e copepodi. Inoltre il GS è inversamente correlato con il tasso metabolico in mammiferi e uccelli e con la complessità morfologica del cervello degli anfibi (si vedano le citazioni in: Vinogradov 1998; Petrov, 2001; Gregory 2005b).

Vinogradov (1998) afferma che in questi casi, le variazioni osservate nel GS riflettono le differenti contingenze adattative o l'efficacia della selezione naturale. Per contro, le teorie del "junk" o "selfish" DNA propongono che il DNA in eccesso non abbia nessuna rilevante funzione e sia stato modulato casualmente dalla deriva genetica, trasportato passivamente nei cromosomi. Il contenuto di DNA caratteristico di una data specie si determinerebbe, alla fine del processo di accumulo-perdita, attestandosi intorno alla quantità massima tollerabile dal sistema cellulare, in dipendenza delle particolari necessità ecologiche e di sviluppo dell'organismo (riferimenti bibliografici in Petrov, 2001).

Indipendentemente da quale delle due posizioni si ritenga più veritiera, l'ampia variazione del GS negli Anfipodi testimonia che tale parametro sia stato fondamentalmente coinvolto nell'evoluzione cariologica di quest'ordine di crostacei. Laddove è possibile si cercherà di verificare se la sua variazione possa aver avuto un valore adattativo e/o un effetto sul fenotipo.

Il Sottordine Gammaridea ha un intervallo di valori compreso tra 0,80 e 64,62 pg, con una media di 8,48, mentre per il Sottordine Corophiidea il GS varia da 0,68 a 16,09 pg, con una media di 2,85. Poiché il primo sottordine è caratterizzato da specie di taglia generalmente superiore rispetto al secondo, una correlazione di proporzionalità diretta tra taglia corporea e dimensioni del genoma sembra interessare gli anfipodi, analogamente a quanto riscontrato in altri taxa animali (citazioni in Vinogradov 1998).

Le specie che hanno un areale di distribuzione che interessa le zone climatiche fredde quali l'Artide, studiate da Rees *et al.* (2007), o il Sub-Artide come quelle finniche (Libertini *et al.* 2003) e islandesi (presente tesi, Tab.1), si differenziano da quelle ad esse correlabili provenienti da zone più temperate per avere quantità di DNA più elevate, talvolta in maniera molto netta. In questo caso l'aumento in dimensioni del genoma potrebbe avere un valore adattativo conferendo una maggiore resistenza alle basse temperature. Già altri autori hanno riscontrato in pesci (Morescalchi *et al.*, 1996) e molluschi gasteropodi (Battaglia *et al.*, 1992) un generale incremento nella quantità di DNA nucleare nelle specie polari o sub polari nei confronti di specie di zone temperate. Inoltre, nelle piante, è stato dimostrato che il Genome Size è correlato alla resistenza al gelo (McGillivray e Grime, 1995).

Correlazione tra i parametri citogenetici

Confrontando i dati ottenuti per diversi parametri citogenetici, non risulta particolarmente evidente alcuna correlazione tra di essi. Non sembra sussistere alcuna corrispondenza reciproca tra numero di cromosomi e dimensione del genoma, in quanto al variare dell'uno non si osserva, in nessun caso, un proporzionale cambiamento dell'altro (vedi Tabb. 3,4 e 5; colonne 2n e GS). Analogamente, anche il numero di siti NOR non è sempre correlabile con il numero di cromosomi; nel caso dei Gammaridae o dei Talitridae, ad esempio, a numeri più o meno costanti di cromosomi corrispondono numeri assai variabili di siti NOR. Entrambe le "mancate" correlazioni indeboliscono l'ipotesi che eventi di poliploidizzazione, più volte invocati per giustificare l'aumento del numero di cromosomi in determinati taxa (Salemaa e Kamaltynov, 1994; Libertini e Lazzaretto, 1993; Coleman, 1994), siano effettivamente responsabili di tali variazioni. Ad esempio, nel caso dei Pontoporeiidae l'ipotesi di Salemaa (Salemaa, 1984) che *Monoporeia affinis* (n=26) sia originata per poliploidia da una specie affine a *Pontoporeia femorata* (n=14) era già stata messa in dubbio dall'analisi dei pattern elettroforetici degli isoenzimi (Vaiola e Varvio, 1989) ed è ulteriormente avversata dall'osservazione che le loro quantità di DNA sono

identiche (Libertini *et al.*, 2003). Altri possibili casi di evoluzione per poliploidia riguardano i Talitroidea, i Caprelloidea e gli Ischyroceridae, e verranno in seguito analizzati in dettaglio.

Esempi di comparazioni a livello di Superfamiglia e Famiglia

Si intendono illustrare l'analisi e la comparazione tra i parametri cariologici nell'ambito di 4 taxa al fine di delineare alcune situazioni tipiche dell'evoluzione citogenetica negli anfipodi, nonché evidenziare un caso in cui la citogenetica, supportata da metodologie biomolecolari, ha contribuito all'identificazione di una specie criptica (citotassonomia).

Superfamiglia Talitroidea

Negli ultimi anni, in base ad analisi filogenetiche dei caratteri morfologici ed ecologici, la sistematica degli anfipodi talitroidi è stata oggetto di numerose revisioni (Serejo, 2004 e riferimenti ivi riportati). L'infraordine Talitrida, a cui appartiene la superfamiglia Talitroidea, è considerato come monofiletico (Serejo, 2004 e riferimenti ivi riportati), e i Talitridae, famiglia costituita da specie semi-terrestri (sopralitorali) e terrestri, si suppone siano evoluti da un progenitore marino appartenente agli Hyalidae (Bousfield, 1984; Friend e Richardson, 1986; Spicer *et al.*, 1987).

Nella Tabella 3 sono riassunti i dati citogenetici disponibili per le uniche due famiglie di Talitroidea finora studiate: Hyalidae e Talitridae. Nei primi, il numero cromosomico presenta un valore caratteristico per ciascuno dei tre generi analizzati: *Apothyale*, *Parthyale* e *Prothyale* ($2n=50$, $2n=48$, $2n=22$, rispettivamente). *Apothyale* e *Parthyale* sono considerati tra loro più strettamente affini che non *Prothyale* (Bousfield e Hendrycks, 2002), e presentano un numero di cromosomi simile. Pertanto, il numero di cromosomi si candiderebbe come un buon diagnostico a livello di genere negli Hyalidae, tanto più che gli stessi Bousfield e Hendrycks (2002) lo indicano come uno dei caratteri a supporto del loro innovativo schema di classificazione dei generi di questa famiglia. Tuttavia, per avvalorare la validità di tale diagnostico saranno necessarie ulteriori analisi cariologiche.

I Talitridae risultano essere più uniformi rispetto agli Hyalidae relativamente al numero di cromosomi e alla morfologia del cariotipo (FN) (Tab. 3). Una coppia di NOR accomuna gli Hyalidae e alcune specie di Talitridae. In questi ultimi però esistono anche specie con un numero più elevato di coppie implicate (*O. prope cavimana* e *O. montagui*).

La presenza di siti multipli di geni ribosomali maggiori è pertanto da considerare un carattere apomorfo a livello di famiglia-superfamiglia.

Nel caso dei Talitroidea è disponibile anche il dato relativo alla distribuzione dell'eterocromatina costitutiva; si nota che, nell'unico Hyalidae caratterizzato, *Arophyale crassipes*, l'eterocromatina è localizzata a livello centromerico ed è in quantità ridotta, mentre in tutti i Talitridae esaminati, sono presenti estese bande C paracentromeriche ampiamente distribuite (Tab. 3). Nei Talitroidea sembra esservi una correlazione diretta tra ampiezza e diffusione delle zone di eterocromatina costitutiva (bande C) e quantità di DNA nucleare, infatti ad una maggiore visibilità delle prime corrisponde sempre valori di GS più elevati. Diversi autori hanno rilevato, negli animali, differenze inter-specifiche nel Genome Size dovute alla quantità di DNA altamente ripetuto (Rees *et al.*, 1976; Rao e Rai, 1987; Black e Rai, 1988); inoltre, la diretta correlazione tra il contenuto totale in DNA e DNA eterocromatico è una regola generale per i primati (Manfredi Romanini *et al.*, 1991; Ronchetti *et al.*, 1993), e gli anfipodi talitroidi possono rappresentarne un ulteriore esempio. Nei molluschi gasteropodi, nei pesci sarcopterigi e negli anfibi, le specie terrestri o che hanno colonizzato le terre emerse sono caratterizzate da genomi di dimensioni maggiori rispetto alle specie acquatiche loro affini (Cavalier-Smith, 1985; Vinogradov, 2000; Vitturi *et al.*, 2005). Assumendo che il contenuto di DNA conferisca un vantaggio selettivo (Cavalier-Smith, 1985; Gregory e Hebert, 1999, e citazioni ivi riportate), si ritiene che un genoma di grandi dimensioni possa rappresentare un carattere pre-adattativo alla vita terrestre, conferendo resistenza all'ipossia, alle fluttuazioni nell'umidità e nella temperatura, e un metabolismo basale più basso (Shakhbasov e Ganchenko, 1990; Vinogradov, 1998). In considerazione del monofiletismo e allo stato attuale delle conoscenze cariologiche, i Talitridae sono dotati di una maggiore quantità di DNA rispetto agli Hyalidae e, assumendo un valore adattativo per questa caratteristica, un incremento del loro DNA nucleare avrebbe contribuito all'adattamento alla vita sopralitorale e terrestre. Dato che tutti i talitridi studiati sono specie sopralitorali, sarebbe interessante estendere le analisi citogenetiche a specie completamente terrestri (talitri del Gruppo IV secondo Bousfield, 1984) per confermare questa tendenza evolutiva. Inoltre, l'ipotetico Hyalidae progenitore dei talitridi sopralitorali potrebbe avere avuto un cariotipo con $2n=50$ cromosomi a centromero mediano, attualmente condiviso da tutti i Talitridae e da alcuni Hyalidae, ed una singola coppia di cromosomi recanti le NOR. D'altronde, la presenza di specie caratterizzate da un numero diploide di cromosomi prossimo a 50 ($2n=48$; $2n=50$; $2n=52$) in altre famiglie di Gammaridea, quali i Gammaridae, Lysianassidae,

Metacrangonyctidae, Niphargide e Pontoporeidae (Coleman, 1994; e citazioni ivi riportate), indicherebbe che questi valori non sono apparsi indipendentemente, ma probabilmente sono stati condivisi dai loro rispettivi progenitori e che un valore di $2n$ vicino a 50 potrebbe essere la condizione plesiomorfica a livello di sottordine. Tenendo conto di questo, il valore $2n=22$ nello Hyalidae *P. (P.) schmidti* dovrebbe essere considerato un carattere derivato (apomorfico). Per tale ragione decadrebbe un'eventuale ipotesi di poliploidia che avrebbe portato da $2n=22$ in Protohyale a $2n=48-50$ degli altri generi della famiglia.

Di particolare interesse si nota che, comparate con le specie più strettamente affini, sia *O. gammarellus* sia *A. prevostii* tendono ad occupare il livello superiore della zona intertidale o sopralitorale - con la prima che talvolta vive in habitat completamente terrestri (Spicer *et al.*, 1987; Ingolfsson, 1977) - e che la loro distribuzione geografica occupa le latitudini più nordiche (Ingolfsson, 1977; Bellan-Santini, 1993; Myers *et al.*, 2007), in luoghi dove le condizioni climatiche sono severe e possono verificarsi lunghi periodi di esposizione all'aria durante la bassa marea. *O. gammarellus* e *A. prevostii* hanno lo stesso cariotipo, e le quantità di DNA nucleari più alte nelle loro rispettive famiglie. Questo fatto potrebbe indicare una correlazione tra le caratteristiche citogenetiche e l'ambiente non solo in termini di vita sopralitorale, ma anche in relazione alla resistenza al gelo e al clima rigido.

Famiglia Gammaridae

Molte specie appartenenti alla famiglia Gammaridae sono state caratterizzate relativamente al numero di cromosomi e la maggioranza di esse esibisce un complemento aploide $n=25-27$ (diploide $2n=50-54$) (vedi Tab. 3), anche se sono presenti alcune eccezioni individuate da Salemaa e Kamaltynov (1994) tra i gammaridi del Lago Ohrid (*Gammarus salemaai* $n=12$, *Gammarus macedonicus* $n=21$, *Gammarus lychnidensis* $n=34$). Un motivo ulteriore di variabilità è dovuto all'eventuale presenza di cromosomi soprannumerari in almeno una decina di specie (Orian e Callan, 1957; Salemaa, 1986; Lop, 1989) ed osservata anche durante questo lavoro in una specie di *Gammarus* dell'Islanda (Tab. 3; Tav. 11), non precisamente identificata e nominata *Gammarus* sp., morfologicamente affine a *G. crinicornis* (Ruffo e Iannilli, comunicazione personale).

Nonostante i Gammaridae siano la famiglia di anfipodi per cui sono state studiate carilogicamente il maggior numero di specie, la formula cariotipica è stata determinata solo per due di esse: *G. crinicornis* (Libertini e Krapp-Schickel, 2000) e *G. aequicauda*

(presente tesi). In entrambe si denota la presenza nel cariotipo di pochi elementi a centromero subterminale e/o terminale che sembra essere una caratteristica comune ad altri Gammaridae. Salemaa (1984), infatti, descrive in *G. lacustris* la presenza di pochi e piccoli elementi acrocentrici. In questa famiglia, pertanto, gli elementi a centromero terminale o sub-terminale, essendo limitati più frequentemente ad 1 o due paia, potrebbero rappresentare un buon diagnostico tra specie affini.

Salemaa e Kamaltinov (1994) teorizzano che la sequenza di numeri cromosomici ($n=12, 21, 25$ e 34) riscontrata nei gammaridi del Lago Ohrid possa essere dovuta a poliploidizzazione considerando *G. salemaai* ($n=12$) come il più antico gammaride paleoendemico di quell'area geografica. Tale ipotesi non può essere scartata al momento, anche se pone alcuni dubbi. Analogamente a quanto esposto per i Talitroidea, numeri di cromosomi nell'intervallo aploide $24-26$ ($48 < 2n < 52$) sono ampiamente rappresentati in famiglie dei Gammaridea che hanno relazione filogenetica con i Gammaridae e sono da Bousfield (1983) ritenute più antiche (ad esempio Hyalidae, Talitridae, Crangonyctidae, Lysianassidae). Per poter supportare l'ipotesi di Salemaa e Kamaltinov (1994) si dovrebbe supporre che anche nelle altre famiglie gli alti numeri di cromosomi abbiano avuto singolarmente origine per poliploidia, evento, in generale, considerato come raro tra i taxa animali. Un'eventuale ulteriore osservazione parzialmente in contrasto con l'ipotesi poliploide è fornita dalla localizzazione dei geni ribosomali maggiori. Infatti, accanto a specie di gammaridi con paia multiple di cromosomi NOR (fino a cinque in *G. oceanicus*), ve ne sono anche di caratterizzate da una singolo paio ed aventi $48-52$ elementi nel loro cariotipo. Questi dati sembrerebbero suggerire maggiormente un'origine dei NOR multipli dovuta a trasposizione o ricombinazione non omologa (Woznicki, *et al.*, 2000), come testimoniano l'eteromorfismo dimensionale dei cluster ribosomali (ad esempio in *E. olivii*) ed anche la non infrequente presenza di un numero dispari di cromosomi recanti le NOR (in *D. villosus*, *G. aequicauda*, *G. oceanicus*). Il numero dispari di siti NOR, potrebbe costituire un prodromo per il differenziamento di cromosomi sessuali, generando una condizione eterogametica, la cui presenza negli anfipodi è stata supposta solo da Niiyama (1950) per *Anisogammarus annandalei*.

Pur essendo stata determinata per sole 8 specie si denota che la quantità di DNA nucleare varia ampiamente e non in dipendenza del numero di cromosomi. Tra i Gammaridae la specie che presenta il valore più alto, *E. finmarchicus*, vive nella zona intertidale ed ha distribuzione geografica sub-artica (Platvoet, 2008). Si suppone, quindi,

anche in questo caso, un valore adattativo delle dimensioni del genoma al clima freddo, in analogia con quanto precedentemente riportato in generale e per i Talitroidea.

Salemaa e Kamaltinov (1994) attribuiscono alla famiglia Gammaridae una sostanziale uniformità cariologica, giustificata dalla sostanziale costanza del numero di cromosomi, tale uniformità era già stata messa in dubbio da Lop (1989) considerando la variabilità nella forma e nelle dimensioni dei cromosomi, nella non costante presenza di elementi soprannumerari e presumibilmente della distribuzione di eterocromatina. A corroborare l'opinione di Lop (1989) andrebbero anche i presenti risultati sulla taglia del genoma e sulla localizzazione dei geni ribosomali maggiori.

Famiglia Ischyroceridae

Sono state svolte delle indagini citogenetiche su popolazioni di *Jassa* della Laguna di Venezia, inizialmente identificate come *Jassa marmorata*, che hanno portato all'individuazione di due forme chiaramente distinte a livello cariologico: una forma a 12 cromosomi (10m e 2st) e una forma a 10 cromosomi (10m). La forma a 12 cromosomi è cariologicamente identica alla *J. marmorata* di una popolazione dell'Atlantico (Millport UK), cui erano stati determinati i valori aploide e diploide di $n=6$ e $2n=12$ (Coleman, 1994), e alla *J. marmorata* della Laguna di Venezia descritta da Libertini *et al.* (2000).

Il riscontro della presenza di due cariotipi chiaramente distinguibili suggeriva che, oltre a *J. marmorata*, un'altra specie di *Jassa* morfologicamente simile alla prima, potesse essere presente nella fauna anfipodologica veneziana. In seguito all'analisi dei profili RAPD-PCR ottenuti dal DNA genomico delle due forme cariologiche, che risultano sempre in distinti fingerprints, è stato possibile individuare un ulteriore parametro utile alla discriminazione. L'approfondita analisi morfologica condotta da Traudl Krapp-Schickel sulle due popolazioni ha permesso di individuarne dei caratteri distintivi tra le due forme, ed ha portato ad identificare in quella a 10 cromosomi una nuova specie affine a *J. marmorata*, e per questo denominata *Jassa cadetta* (Krapp *et al.*, 2008, in stampa), e confermato la presenza di *J. marmorata* nella Laguna di Venezia (vedi AAVV, The Amphipoda of the Mediterranean).



Maschio di *Jassa cadetta* n.sp.

Tra gli Ischyroceridae sono state caratterizzate cariologicamente anche altre due specie: *I. anguipes* ed *E. argenteus*. Le tre specie assegnate alla tribù Ischyrocerini (Myers e Lowry, 2003), *J. marmorata*, *J. cadetta* e *I. anguipes*, presentano un cariotipo tra loro simile sia per il numero di cromosomi ($2n=12$, $2n=10$, $2n=10$, rispettivamente, vedi Tab. 4), che per la formula cariotipica (Tavv. 34, 35, 36). Inoltre esse sono caratterizzate da un singolo paio di cromosomi recanti terminalmente le NOR e dalla localizzazione intercalare dei geni ribosomali 5S. In *E. argenteus*, appartenente all'altra tribù Siphonocetini, è stato riscontrato, invece, un cariotipo con $2n=20$ cromosomi con tre paia interessate dai geni ribosomali maggiori. Questi riscontri inducono a supporre che *E. argenteus* possa essersi originato per poliploidia da una specie cariologicamente affine agli Ischyrocerini. In questo caso l'ulteriore paio di cluster 18-5,8-25S si sarebbe originato con un meccanismo diverso (trasposizione o ricombinazione non omologa). Saranno tuttavia altre indagini su altri parametri (GS) e/o specie delle due tribù che potranno confermare tale ipotesi.

I parametri citogenetici finora noti per *E. argenteus* supportano la collocazione del genere *Erichthonius* in una tribù distinta da quella di *Ischyrocerus* e *Jassa*, secondo quanto proposto da Myers e Lowry (2003).

Pertanto, i risultati ottenuti dimostrano ancora una volta come la citogenetica fornisca dei caratteri non convenzionali che possono contribuire alla sistematica, consentendo l'identificazione di specie criptiche o confermando schemi tassonomici.

Famiglia Caprellidae

L'unica specie del genere *Phtisica*, *P. marina*, si differenzia nettamente a livello carilogico dalle specie appartenenti al genere *Caprella*. La prima ha un cariotipo di $2n=10$ cromosomi, dei quali 4 paia a centromero mediano ed uno a centromero subterminale, recante le NOR. Le altre hanno tutte un cariotipo costituito da $2n=24$ cromosomi a centromero mediano e almeno due paia di elementi NOR.

P. marina ha, peraltro, un cariotipo del tutto simile a quello dell'ischirocerino *I. anguipes*, con identica localizzazione dei geni ribosomali maggiori, e ha un numero di cromosomi e di elementi NOR affine a quello presente nelle famiglie dei Corophiidea Ischyroceridae e Aoridae.

Considerando che in generale i Corophiidea hanno numeri di cromosomi bassi e che un singolo paio di cluster di geni ribosomali è da ritenere la condizione ancestrale per gli anfipodi (vedi la parte della discussione relativa alla FISH), è da supporre che il genere *Caprella* possa essersi evoluto per poliploidia (tetraploidizzazione) da un progenitore con caratteristiche carilogiche simili a quelle di *P. marina*. Parzialmente avversa a questa ipotesi sarebbe l'analisi della quantità di DNA che, con la sola eccezione di *C. septentrionalis*, è in *Caprella* generalmente più bassa che in *Phtisica*. Tale controversia potrebbe essere risolta assumendo che dopo la poliploidizzazione, parte del DNA sia stato secondariamente perduto (o secondariamente incrementato in *Phtisica*). D'altronde, in *Caprella* si riscontrano i valori di GS più bassi tra gli anfipodi e *C. septentrionalis* ha pur sempre un valore di circa una volta e mezzo quello di *Phtisica*. Il parziale mantenimento da parte di *C. septentrionalis* di una quantità di DNA elevata rispetto ad altri Caprellidae potrebbe, a sua volta, essere considerato un adattamento alle alte latitudini; in analogia con quanto riscontrato in altri anfipodi, tenendo conto della sua distribuzione geografica (Ingólfsson, 1977). Bachmann e Rheinsmith, (1973) e Rheinsmith, *et al.*, (1974) avevano già evidenziato una tendenza verso genomi di ridotte dimensioni in gruppi di crostacei evolutivamente avanzati o specializzati. La corrispondenza tra GS e stadio evolutivo si adatta anche ai Caprellidae che sono considerati una delle famiglie più specializzate tra i Corophiidea (Myers e Lowry, 2003) e in *Caprella* si è assistito ad un maggiore allontanamento dallo schema morfologico tipico dei Corophiidea rispetto a *Phtisica* (Ruffo, comunicazione personale). Un'analogia ipotesi evolutiva, che vede seguire la poliploidizzazione da una riduzione del contenuto di DNA, è stata formulata per i Syngnathidae (Vitturi *et al.*, 1998; Libertini *et al.*, 2006), una famiglia altamente specializzata tra i pesci Teleostei.

BIBLIOGRAFIA

- AAVV. 1982-1998. The Amphipoda of the Mediterranean. Vol. 1-4. Sandro Ruffo (ed.).
Memoires de l'Institut Oceanographique Monaco, 13.
- AAVV. 2003. Nonradioactive *In Situ* Hybridization Application Manual. Roche Applied
Science. URL: https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/InSitu/InSi_toc.htm.
- Ahn, I.Y., Winter, C.E. 2006. The genome of *Oscheius tipulae*: determination of size,
complexity, and structured by DNA reassociation using fluorescent dye. *Genome*, 49:
1007-1015.
- Battaglia, B., Bisol, P.M., Lazzaretto, I., Libertini, A., Marcato, S., Patarnello, T., Varotto, V.
1992: Studies on genetic differentiation in populations of Antarctic and Sub-Antarctic
marine invertebrates. In: Proceedings of the 2nd Meeting on Antarctic Biology, Padova
(Italy) Feb. 26-28. *Scienza e Cultura*, special issue, pp. 121-130.
- Bachmann, K., Rheinsmith, E.L. 1973. Nuclear DNA amounts in Pacific Crustacea.
Chromosoma, 43: 225-236.
- Barzotti, R., Pelliccia, F., Rocchi, A. 2003. Identification and characterization of U1 small
nuclear RNA genes from two crustacean isopod species. *Chromosome Research*, 11:
365-373.
- Bellan-Santini, D. 1993. Genus *Orchestia*. In Ruffo S. (ed): The Amphipoda of the
Mediterranean. Part 3. Gammaridea (Melphidippidae to Talitridae), Ingolfiellidea,
Caprellidea. Memoires de l'Institut Oceanographique Monaco, 13: 742-753.
- Biessmann, H., Mason, J.M. 2003. Telomerase-independent mechanisms of telomere
maintenance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 2325-2333.
- Black, W.C., Rai, K.S. 1988: Genome evolution in mosquitoes: intraspecific and
interspecific variation in repetitive DNA amounts and organization. *Genetical Research*,
51: 185-196.
- Bousfield, E.L. 1983. An updated phyletic classification and paleohistory of the amphipoda.
In Schram, F.R. (ed.): "Crustacean Phylogeny", San Diego Natural History Museum,
California. pp. 257-277.
- Bousfield, E.L. 1984: Recent advances in the systematics and biogeography of
landhoppers (Amphipoda: Talitridae) of the Indo-Pacific region. In Radovsky F. J.,
Raven P. H. & Sohmer S. H. (eds.): *Biogeography of the Tropical Pacific*. Bishop
Museum Special Publication. 72: pp. 171-210.

- Bousfield, E.L., Hendrycks, E.A. 2002. The Talitroidean Amphipod family Hyalidae revised, with emphasis for the North Pacific fauna: systematics and distributional ecology. *Amphipacifica*, 3: 17-134.
- Cavalier-Smith, T. 1985. Cell volume and the evolution of eukaryote Genome Size. In Cavalier-Smith T. (ed.): *The Evolution of Genome Size*. John Wiley and Sons. Chichester, UK, pp. 105-184.
- Coleman, C.O. 1994. Karyological studies in Amphipoda (Crustacea). *Ophelia*, 39: 93-105.
- Conlan, K.E. 1989. Delayed reproduction and adult dimorphism in males of the amphipod genus *Jassa* (Corophioidea: Ischyroceridae): an explanation for systematic confusion. *Journal of Crustacean Biology*, 4: 601-625.
- Conlan, K.E. 1990. Revision of the crustacean amphipod genus *Jassa* Leach (Corophioidea: Ischyroceridae). *Canadian Journal of Zoology*, 68: 2031-2075.
- Costa, F.O., Cunha, M., Neuparth, T., Theodorakis, C.W., Costa, M.H., Shugart L.R. 2004a. Application of RAPD DNA fingerprinting in taxonomic identification of amphipods: a case-study with *Gammarus* species (Crustacea: Amphipoda). *Journal of marine Biology Association UK*, 84: 171-178.
- Costa, F.O., Neuparth, T., Theodorakis, C.W., Costa, M.H., Shugart, L.R. 2004b. RAPD analysis of southern populations of *Gammarus locusta*: comparison with allozyme data and ecological inferences. *Marine Ecology Progress Series*, 277: 197-207.
- Dobigny, G., Ducroz, J., Robinson, T., Volobouev, V. 2004: Cytogenetics and cladistics. *Systematic Biology*, 53: 470-484.
- Farris, J.S. 1978. Inferring phylogenetic trees from chromosome inversion data. *Systematic Zoology*, 27: 275-284.
- Fernandes, C.A.; Martins-Santos, I.C. 2006. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the upper Paraná river basin, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 464-468.
- Friend, J.A., Richardson, A.M.M. 1986: Biology of terrestrial amphipods. *Annual Review of Entomology*, 12: 25-48.
- Frydrychová, R., Grossman, P., Trubac, P., Vítková, M., Marec, F. 2004. Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome*, 46: 163-178.
- Funaki, K., Matsui, S., Sasaki, M. 1975. Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma*, (Berlin) 49: 357-370.

- Gornung, E., Kartavenko, T., Kurchashova, S., Kireev, I., Faisc, D. 2005. Physical mapping of the 5S rRNA genes in the common sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea), by *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Genome Research*, 111: 186.
- Gregory, T.R., Hebert, P.D.N. 1999. The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome Research*, 9: 317-324.
- Gregory, T.R. 2005a. Macroevolution, hieraechy theory, and the C-value enigma. *Paleobiology*, 30: 179-202.
- Gregory, T.R. 2005b. Genome Size Evolution in Animals. In Gregory, T.R. (ed.): *The Evolution of the Genome*. Elsevier Academic Press, pp. 3-87.
- Gregory, T.R. 2008. Animal Genome Size Database. URL: <http://www.genomesize.com>.
- Howell, W.M., Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Huang, X., Hu, J., Hu, X., Zhang, C., Zhang, L., Wang, S., Lu, W., Bao, Z. 2007. Cytogenetic characterization of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians*, by multiple staining techniques and fluorescence *in situ* hybridization. *Genes & Genetic Systems*, 82: 257-263.
- Ijdo, J.W., Wells, R.A., Baldini, A., Reeders S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*, 19: 4780.
- Ingólfsson, A. 1977: Distribution and habitat preferences of some intertidal amphipods in Iceland. *Acta Naturalia Islandica*, 25: 1-28.
- Ketmaier, V., Amendola, D., Scapini, F., De Matthaeis, E. 2003: Large scale phylogeography of the landhopper *Orchestia cavimana*: combining allozymes and mtDNA. Abstract XI Colloquium on Amphipoda, Tunis, 25-30 March 2003: 15-16.
- King, M. 1980. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma*, 80: 191-217.
- Krapp, T., Lang, C., Libertini, A., Melzer, R.R. 2006. *Caprella scaura* Templeton, 1836 *sensu lato* (Amphipoda: Caprellidae) in the Mediterranean. *Organisms, Diversity & Evolution*, 6: 77-81.
- Krapp, T., Rampin, M., Libertini, A. 2008. A cytogenetical study of some Ischyroceridae (Amphipoda) allowed the identification of a new species: *Jassa cadetta* n. sp. in the Venice Lagoon. *Organism, Diversity & Evolution*, in stampa.

- Kress, H., Bechler, K., Swida, U., Maletz, S. 2001. Evolution of 5S rRNA genes in *Drosophila*. *Chromosome Research*, 9: 403-415.
- Le Calvez, J., Certain, P. 1951. *Gammarus chevreuxi* Sext. et la caryologie des gammariens. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 88: 131-141.
- Lecher, P., Defaye, D., Noel, P. 1995. Chromosome and nuclear DNA of Crustacea. *Invertebrate Reproduction and Development*, 27: 85-114.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg A.A. 1964: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Libertini, A., Lazzaretto, I. 1993. Karyotype morphology in *Hyperietta dilatata* Stebbing 1888 (Amphipoda: Hyperietidae) from the Ross Sea (Antarctica). *Polar Biology*, 13: 101-103.
- Libertini, A., Colomba, M.S, Vitturi, R. 2000a. Cytogenetics of the Amphipod *Jassa marmorata* (Corophioidea: Ischyoceridae): karyotype morphology, chromosome banding, fluorescent *in situ* hybridization, and nuclear DNA content. *Journal of Crustacean Biology*, 20: 350-356.
- Libertini, A., Krapp-Schickel, T. 2000. Chromosome number and karyotype analysis in eight marine amphipods (Crustacea) species. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 47: 465-471.
- Libertini, A., Trisolini R., Eriksson-Wiklund A.K. 2003. A preliminary survey on Genome Size in Amphipoda. Abstract XI Colloquium on Amphipoda, Tunis, 25-30 March 2003: 17.
- Libertini, A., Vitturi, R., Lannino, A., Maone, M.C., Franzoi, P., Riccato, F., Colomba, S. 2006. FISH mapping of 18S rDNA and (TTAGGG)_n sequences in two pipefish species (Gasteroisteiformes : Syngnathidae). *Journal of Genetics*, 85 : 153-156.
- Lop, A.F. 1989. Karyotypes of the *Echinogammarus berilloni*-group (Crustacea, Amphipoda) from Spain. *Genetica*, 79: 37-43.
- Mandrioli, M., Colomba, M.S, Vitturi, R. 2000. Chromosomal analysis of repeated DNAs in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces, Labridae). *Genetica*, 108: 191-195.
- Manfredi Romanini, M.G., Formenti, D., Stanyon, R., Pellicciari, C. 1991: C-heterochromatic DNA and the problem of Genome Size variability in Hominoidea. In Ghiara G., Angelini F., Olmo E. & Varano L. (eds): Proceedings of a Symposium on the Evolution of Terrestrial Vertebrates. Napoli, Italy, 9-11 June 1998. UZI Selected Symposia and Monographs, 4. Mucchi. pp. 387-397.

- McGillivray, C.W., Grime J.P. 1995: Genome Size predicts frost resistance in British herbaceous plants: implications for rates of vegetation response to global warming. *Functional Ecology*, 9: 320-325.
- Meyne, J., Ratliff, R.L., Moyzis, R.K. 1989. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85: 6622-6626.
- Morescalchi, A., Morescalchi, M.A., Odierna, G., Stingo, V., Capriglione, T. 1996: Karyotype and Genome Size of zoarcids and notothenioids (Teleostei, Perciformes) from the Ross Sea: cytotaxonomic implications. *Polar Biology*, 16: 559-564.
- Morescalchi, M.A., Liguori, I., Rocco, L., Archimandritis, A., Stingo, V. 2008. Karyotypic characterization and genomic organization of the 5S rDNA in *Polypterus senegalus* (Osteichthyes, Polypteridae). *Genetica*, 132: 179–186.
- Myers, A.A., Lowry, J.K. 2003. A phylogeny and new classification of the Corophiidea Leach, 1814 (Amphipoda). *Journal of Crustacean Biology*, 23: 443-485.
- Myers, A., McGrath, D., King R. 2007. Keys to the North East Atlantic and Mediterranean Amphipods. URL: <http://www.amphipoda.com>.
- Naranjo C.A., Poggio L., Brandham P.E. 1983: A practical method of chromosome classification on the basis of centromere position. *Genetica*, 62: 51-53.
- Natyaganova, A.V., Weinberg, I.V., Zaharova, E.S. 2003. The karyotype of the Baikalian endemic amphipoda *Dorogostaiskia parasitica* (Crustacea). In: Proceedings of the II International conference “Lake ecosystems: biological processes, anthropogenic transformation, quality of water”, Minsk-Naroch, 22-26 September 2003. Belarusian State University Press, Minsk: 482-485.
- Niiyama, H. 1950. The X-Y mechanism of the sex-chromosome in the male of *Anisogammarus annandalei* (Tattersall) (Crustacea: Amphipoda). *Annotationes Zoologicae Japonensis*, 23: 58-62.
- Okazaki, S., Tsuchida, K., Maekawa, H., Ishikawa, H., Fujiwara, H. 1993. Identification of a pentanucleotide telomeric sequence (TTAGG)_n in the silkworm *Bombyx mori* and other insects. *Molecular and Cellular Biology*, 13: 1424-1432.
- Orian, A.J., Callan, H.G. 1957. Chromosome numbers of gammarids. *Journal of marine Biology Association, UK*, 36: 129-142.
- Pelliccia, F., Volpi, E.V., Lanza, V., Gaddini, L., Baldini, A., Rocchi, A. 1994. Telomeric sequences of *Asellus aquaticus* (Crust. Isop.). *Heredity*, 72: 78-80.

- Pelliccia, F., Barzotti, R., Volpi, E.V., Bucciarelli, E., Rocchi, A. 1998. Nucleotide sequence and chromosomal mapping of the 5S rDNA repeat of the crustacean *Proasellus coxalis*. *Genome*, 41: 129-133.
- Petrov, D.A. 2001. Evolution of Genome Size: new approaches to an old problem. *Trends in Genetics*, 17: 23-28.
- Platvoet, D. (2008). Freshwater Amphipods. URL: <http://nlbif.eti.uva.nl/bis/amphipoda>.
- Poisson, R., LeCalvez, J. 1948. La garniture chromosomique de quelques crustacés amphipodes. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris*. 227: 228-230.
- Rao, P.N., Rai, K.S. 1987: Inter and intraspecific variation in nuclear DNA content in *Aedes* mosquitoes. *Heredity*, 59: 253–258.
- Rees, R.W., Fox, D.P., Maher, E.P. 1976. DNA content, reiteration and satellite in *Dermestes*. In Jones K. & Brandham P.E. (eds): *Current chromosome research*. North-Holland Publications. New York, pp. 33-41.
- Rees, D.J., Dufresne, F., Glémet, H., Belzile, C. 2007. Amphipod Genome Sizes: first estimates for Arctic species reveal genomic giants. *Genome*, 50: 151-158.
- Reygrobelle, J.L. 1974. Garnitures chromosomiques de quelques espèces du genre *Niphargus* (Amphipode, Gammaridé, Troglobie). *Annales de Spéléologie*, 29: 97-104.
- Rheinsmith, E.L., Hinegardner, R., Bachmann, K. 1974. Nuclear DNA amounts in Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 48B: 343-348.
- Rohia H., Miller, J.R., Woods, L.C., Glover, D.M. 1981. Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *D. melanogaster*. *Nature*, 290: 749-753
- Ronchetti, E., Crovella, S., Rumpler, Y., Pellicciari, C., Manfredi Romanini, M.G. 1993: Genome Size and qualitative and quantitative characteristics of C-heterochromatic DNA in *Eulemur* species and in a viable hybrid. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 63: 1-5.
- Rosén, M., Edström, J. 2000. DNA structures common for chironomid telomeres terminating with complex repeats. *Insect Molecular Biology*, 9: 341-347.
- Sahara, K., Marec, F., Traut, W. 1999. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome research*, 7: 449-460.
- Salemaa, H. 1979 .The chromosomes of *Asellus aquaticus* (L.) - a technique for isopod karyology. *Crustaceana*, 36: 316-318.
- Salemaa, H. 1984 . Polyploidy in the evolution of the glacial relict *Pontoporeia* spp. (Amphipoda, Crustacea). *Hereditas*, 100: 53-60.

- Salemaa, H. 1986. Karyology of the North-Baltic Peracaridan Crustacea. *Sarsia*, 71: 17-25.
- Salemaa, H. 1988. Chromosomes in Gammaridea. *Crustaceana Supplement*, 13: 281-282.
- Salemaa, H., Heino, T. 1990. Chromosome number of Fennoscandian glacial relict Crustacea. *Annales Zoologici Fennici*, 27: 207-210.
- Salemaa, H., Kamal'tynov, R. 1994. Chromosomal relationships of the endemic amphipoda (Crustacea) in the ancient lakes Ohrid and Baikal. *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman & Hall, London. Beaumont, A.R., 405-414.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Serejo, C.S. 2004. Cladistic revision of talitroidean amphipods (Crustacea, Gammaridea), with proposal of a new classification. *Zoologica scripta*, 33: 551-586.
- Sørensen, P.D., Lomholt, B., Frederiksen, S., Tommerup, N. 1991. Fine mapping of human 5S rRNA genes to chromosome 1q42.11-q42.13. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 57: 26-9.
- Spicer, J.I., Moore, P.G., Taylor, A.C. 1987: The physiological ecology of land invasion by the Talitridae (Crustacea: Amphipoda). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 232: 95-124.
- Stephensen K. 1940: Marine Amphipoda. *The Zoology of Iceland*, 3: 1-111.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-320.
- Shakhbasov, V.G., Ganchenko, A.V. 1990. Nonspecific tolerance and DNA content in genome of amphibians. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 314: 971-975. (in Russo).
- Stingo, V., Rocco, L. 2001. Selachian cytogenetics: a review. *Genetica*, 111: 329-347.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Tafari, B., Ugolini, A., Bazzicalupo, M., Mengoni A., Ruffo S. 2004. Phylogenetic relationships among Mediterranean sandhoppers. *Journal of Natural History*, 38: 499-508.
- Traut, W., Szczepanowski M, Vítková, M., Opitz C., Marec, F., Zrzavy, J. 2007. The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Research*, 15:371-382

- Vader W. 2003. How many amphipod species? Abstract XI Colloquium on Amphipoda, Tunis, 25-30 March 2003: 43-44.
- Vainola, R., Varvio, S. 1989. Molecular divergence and evolutionary relationships in *Pontoporeia* (Crustacea: Amphipoda). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic sciences, 46: 1705-1713.
- Vítková, M., Král, J., Traut, W., Zrzavý, J., Marec, F. 2005. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. Chromosome Research, 13: 145–156.
- Vinogradov, A.E. 1998: Genome Size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: The triangular relationship. Cytometry, 31: 100-109.
- Vinogradov, A.E. 2000: Larger genomes for molluscan land pioneers. Genome, 43: 211-212.
- Vitturi, R., Libertini, A., Campolmi, M., Calderazzo, F., Mazzola, A. 1998. Conventional karyotype, nucleolar organizer regions and Genome Size in five Mediterranean species of Syngnathidae (Pisces, Syngnathiformes). Journal of Fish Biology, 52: 677-687.
- Vitturi, R., Colomba, M.S., Pirrone, A.M., Mandrioli, M. 2002. rDNA (18S–28S and 5S) Colocalization and linkage between ribosomal genes and (TTAGGG)_n telomeric sequence in the earthworm, *Octodrilus complanatus* (Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae), revealed by single- and double-color FISH. The Journal of Heredity, 93: 279-282.
- Vitturi, R., Libertini, A., Sineo, L., Sparacio, I., Lannino, A., Colomba, M.S. 2005: Cytogenetics in the land snails *Cantareus aspersus* and *C. mazzullii* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata). Micron, 36: 351-357.
- Walter, M.F., Bozorgnia, L., Maheshwari, A., Biessmann, H. 2001. The rate of terminal nucleotide loss from a telomere of the mosquito *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology, 10: 105-110.
- White, M. J. D. 1984. Chromosomal Mechanisms in Animal Reproduction. Bollettino di Zoologia, 51: 1-24.
- Wimber, D.E., Wimber, D.R. 1977. Sites of the 5S ribosomal genes in *Drosophila*. The multiple clusters in the *virilis* group. Genetics, 1977, 86: 133-48.
- Woznicki, P., Sánchez, L., Martínez, P., Pardo, B.G., Jankun, M. 2000. A population analysis of the structure and variability of NOR in *Salmo trutta* by Ag, CMA3 and ISH. Genetica, 108: 113-118.

RINGRAZIAMENTI

Desidero esprimere la mia profonda gratitudine al Dott. Angelo Libertini (CNR ISMAR Venezia) per avermi guidato e incoraggiato durante i tre anni di corso, per aver direttamente collaborato alle ricerche e per i suoi preziosi suggerimenti e stimoli critici durante la fase di studio e di stesura della tesi.

Sono inoltre riconoscente al Prof. Alessandro Minelli (Università di Padova), per avermi consentito di svolgere il Dottorato esercitando la funzione di Supervisore.

Un ringraziamento particolare lo rivolgo al Prof. Sandro Ruffo (Museo Civico di Storia Naturale di Verona) e ai Dott. Franz e Traudl Krapp (Zoologisches Forschungsinstitut und Museum "A. Koenig", Bonn (Germania) per il fondamentale supporto fornito nell'identificazione delle specie prese in esame e nella cernita del materiale.

Va la mia gratitudine alla Prof. Antonella Russo (Università di Padova) per i preziosi suggerimenti sulle tecniche cariologiche.

Un ulteriore ringraziamento va rivolto al Prof. Gudmundur V. Helgason (University of Iceland) che ha consentito un soggiorno presso il Sandgerdi Marine Centre (Islanda), ottenuto grazie ad un finanziamento nell'ambito del "Transnational Access to Research Facilities", finalizzato allo svolgimento di ricerche inerenti le attività del dottorato.

Infine sono grato al personale del CNR ISMAR di Venezia per il supporto fornito durante lo svolgimento delle attività di ricerca.

Ma soprattutto ringrazio mio padre, a cui intendo dedicare questa tesi, per il suo fondamentale supporto morale.