

Identità dei dinoflagellati proliferanti in strutture sperimentali *in situ* nel Lago di Tovel (Nord Italia)

Graziano DI GIUSEPPE & Fernando DINI*

Dipartimento di Etologia, Ecologia ed Evoluzione, Università di Pisa, Via A. Volta 6, I-56126 Pisa

*E-mail dell'Autore per la corrispondenza: f.dini@deee.unipi.it

RIASSUNTO - *Identità dei dinoflagellati proliferanti in strutture sperimentali in situ nel Lago di Tovel (Nord Italia)* - Il Lago di Tovel rappresentava fino al 1964 un'importante attrazione naturalistica a causa del periodico arrossamento delle sue acque che avveniva durante i mesi estivi e che era dovuto a un'alga unicellulare della classe dei dinoflagellati, il *Glenodinium sanguineum* Marchesoni. Dopo il 1964 l'arrossamento delle acque cominciò a divenire irregolare e anomalo sia per intensità di colore che per periodo di comparsa. Nel corso degli anni sono state formulate diverse ipotesi per spiegare la scomparsa dell'arrossamento. Secondo una delle ipotesi più recenti, la causa del mancato arrossamento sarebbe legata alla riduzione degli apporti nutrizionali dovuti a significativi cambiamenti nelle modalità di alpeggio nella Val di Tovel. Al fine di caratterizzare la specie coinvolta in tale fenomeno, è stato condotto un approccio molecolare, prendendo in esame l'intera comunità a dinoflagellati del lago. Come marcatori genetici utili per l'identificazione delle specie, sono stati scelti tre diversi geni nucleari per gli RNA ribosomali (rRNA): 1) il gene per l'rRNA 18S, 2) gli "spaziatori", o ITS (*Internal Transcribed Spacer*), del DNA ribosomale nucleare e 3) il gene per l'rRNA 24S. I risultati conseguiti hanno permesso di identificare diversi taxa di dinoflagellati e di caratterizzare, su basi molecolari, la specie coinvolta nel fenomeno dell'arrossamento delle acque.

SUMMARY - *Identity of dinoflagellates proliferating in enclosures in Lake Tovel (North Italy)* - Lake Tovel represented until 1964 an important naturalistic attraction owing to the periodic reddening phenomenon of its waters that took place during summer months and that was due to an unicellular alga of the class of dinoflagellates, *Glenodinium sanguineum* Marchesoni. After 1964 the reddening phenomenon began to become discontinuous and anomalous both as regards its colour and period of appearance. In the course of the years different hypotheses were formulated in order to explain the disappearance of reddening. According to one of the most reliable hypotheses, the cause of the lack of reddening would be connected with the reduction of nutritional inputs due to significant alterations in the modalities of mountain summer cattle breeding in the Tovel Valley. In order to characterize the species involved in this phenomenon, a molecular approach was conducted examining the complete lake's community of dinoflagellates. Three different nuclear genes for the ribosomal RNA (rRNA) were selected as genetic markers: 1) the gene for rRNA 18S; 2) the ITS (Internal Transcribed Spacer), of the nuclear ribosomal DNA; 3) the gene for rRNA 24S. The results achieved permitted to identify different taxa of dinoflagellates and to characterize, on molecular bases, the species involved in the waters' reddening phenomenon.

Parole chiave: *Glenodinium sanguineum*, Lago di Tovel (Trento), *Polymerase Chain Reaction*, RNA ribosomali
Key words: *Glenodinium sanguineum*, Lake Tovel (Trento), *Polymerase Chain Reaction*, ribosomal RNAs

1. INTRODUZIONE

Il Lago di Tovel (Trento, Italia) è situato nella parte settentrionale delle Dolomiti del Brenta e fa parte del bacino idrografico del Noce, affluente dell'Adige; esso è ubicato nella valle omonima a 1178 m s.l.m. e è formato da due bacini a profondità diversa: uno più grande a nord-est con acque profonde e uno più piccolo a sud-ovest con una profondità massima di 5 m e denominato "Baia Rossa", in quanto è in tale

piccolo bacino che si verificava il fenomeno dell'arrossamento.

'*Glenodinium sanguineum*', l'organismo ritenuto responsabile di tale fenomeno, è una microalga appartenente alla divisione Dinophyta (classe Dinophyceae). Negli anni Quaranta si riteneva che l'alga presentasse due "forme" intercambiabili: una "rossa" e una "verde" (Baldi 1941; Marchesoni 1959). Studi condotti nel periodo 1964-2000 hanno mostrato che la "forma verde" risultava sempre prevalente ed erano finalizzati

a capire perché non avvenisse più la transizione delle “forme verdi” verso le “rosse” (Arrighetti & Siligardi 1979; Miola & Trevisan 1982). Recentemente, invece, è stato evidenziato che le diverse “forme” inizialmente descritte non sono stadi di sviluppo o fisiologici di una medesima specie ma specie diverse, di cui quella “rossa” era la responsabile del fenomeno dell’arrossamento (Flaim *et al.* 2006).

Nel presente lavoro, allo scopo di caratterizzare la specie coinvolta in tale fenomeno è stato condotto un approccio molecolare, prendendo in esame l’intera comunità a dinoflagellati del lago. I marcatori genetici scelti per l’identificazione delle specie (gene per l’rRNA 18S, regione ITS e gene per l’rRNA 24S) sono stati sottoposti ad amplificazione tramite la tecnica della PCR, o *Polymerase Chain Reaction*, clonati e sequenziati. Le sequenze così ottenute sono state comparate con quelle per gli stessi tipi di geni già disponibili per altri dinoflagellati, allineate e utilizzate per la costruzione di alberi filogenetici.

2. METODI

2.1. Campionamenti e condizioni di coltura

I campionamenti sono stati effettuati nei mesi estivi di quattro anni consecutivi, dal 2001 al 2004, in diverse stazioni del Lago di Tovel. Il campionamento del 1° anno è stato effettuato direttamente sulla parte del lago che presentava aloni di un colore rosso pallido (“baia rossa”). I campionamenti del 2° e 3° anno sono stati effettuati all’interno di speciali dispositivi cilindrici di polietilene, denominati *enclosures*, che sono stati posizionati a varie profondità del lago nella porzione antistante la Stazione Limnologica dal gruppo di ricerca del Museo Tridentino di Scienze Naturali, allo scopo di identificare i principali fattori abiotici che regolano il fenomeno dell’arrossamento. I prelevamenti del 4° anno sono stati effettuati in parti del lago che mostravano una evidenza, seppure molto flebile, di arrossamento.

I campioni di acqua sono stati trasportati in laboratorio per mezzo di contenitori termici, al fine di evitare un eccessivo innalzamento della temperatura. In laboratorio i campioni sono stati filtrati attraverso reticelle per plancton con maglie di 60 µm, al fine di eliminare gli organismi di taglia superiore ai *taxa* di protisti, e sottoposti a una prima fase di identificazione delle varie forme per mezzo di tecniche di microscopia ottica. Per mezzo di una micropipetta, sono stati isolati singolarmente individui di colorazione rossastra, al fine di avviare colture di dinoflagellati ritenuti, sulla base della colorazione e delle caratteristiche morfologiche, appartenenti alla specie *Glenodinium sanguineum*, responsabile del fenomeno di arrossamento. Vista l’esiguità di informazioni presenti in letteratura e con-

cernenti le modalità di coltivazione, l’allevamento dei singoli isolati è stato eseguito per tentativi utilizzando diversi mezzi di coltura, in situazioni controllate sia di temperatura che di alternanza di periodi luce-buio. Si è, così, allestito un sistema parallelo di coltivazione utilizzando i seguenti mezzi di coltura: a) acqua del Lago di Tovel, arricchita solo con batteri naturali presenti nel campione e selezionati tramite filtrazione con filtri Sartorius; b) SMB (KCl 0,05 mM, MgSO₄ 0,1 mM, CaCl₂ 0,4 mM, MgCl₂ 0,05 mM, NaH₂PO₄ 2mM, Na₂HPO₄ 2mM); c) SMC (MnCl₂ 0,5 µM, FeCl₃ 9,0 µM, NH₄NO₃ 1,25 mM); d) “Pringsheim medium” [Ca(NO₃)₂ 4 %, KCl 0,52 %, MgSO₄ 0,4 %, Na₂HPO₄ 0,6 %, Na₂EDTA 0,3 %]; e) DM [Ca(NO₃)₂ 0,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, MgSO₄ 0,1 mM, Na₂SiO₃ 0,1 %, FeSO₄ 1 µM, MnCl₂ 0,1 µM, niacinamide (1 mg l⁻¹), biotina (0,1 mg l⁻¹), tiamina (1 mg l⁻¹), B12 (1 µg l⁻¹).

Dai campioni di acqua sono stati, inoltre, isolati singolarmente, per mezzo di una micropipetta, individui ritenuti, sulla base delle caratteristiche morfologiche, appartenenti al genere *Gymnodinium*.

I campioni di acqua del lago filtrata, unitamente alle cellule da essi isolate, sono stati successivamente utilizzati per l’estrazione di DNA.

2.2. Estrazione di DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto secondo i protocolli standard di Sambrook *et al.* (1989), modificati e ottimizzati per l’estrazione di DNA da dinoflagellati. Le cellule (circa 250) o i campioni di acqua del lago filtrata erano centrifugati per 15 min. a 2.600 x g. I *pellet* cellulari così ottenuti erano incubati per tutta una notte a 55 °C in una soluzione di lisi (0,5 M EDTA, 1% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 9,5), contenente *proteinase K* (Sigma, Milano, Italia) alla concentrazione di 1 mg ml⁻¹. Successivamente, un trattamento con *RNase* (Amersham, Milano, Italia) era seguito da alcune estrazioni con fenolo e cloroformio.

Il DNA plasmidico dei cloni ricombinanti era estratto secondo il protocollo di “lisi alcalina” (Sambrook *et al.* 1989).

2.3. Sintesi di oligonucleotidi

Gli oligonucleotidi utilizzati come *primers* nelle reazioni di amplificazione erano, nel caso del gene per l’rRNA 18S, i *primers* eucariotici universali *forward* 18S F9 (5’-CTG GTT GAT CCT GCC AG-3’) (Medlin *et al.* 1988) e *reverse* 18S R1513 Hypo (5’-TGA TCC TTC YGC AGG TTC-3’) (Petroni *et al.* 2002); nel caso, invece, della regione ITS (ITS1, 5,8S, ITS2) sono stati utilizzati i *primers forward* EITS2 DIR (5’-GTA GGT GAA CCT GCV GAA GA-3’) e *reverse* EITS2 REV (5’-TGG GGA TCC TGT TTA GTT TC-3’) (Guillou *et al.* 2002); i do-

mini variabili D1 e D2 del gene per l'rRNA 24S sono stati amplificati usando i *primers forward* D1R (5'-ACC CGC TGA ATT TAA GCA TA-3') e *reverse* D2C (5'-CCT TGG TCC GTG TTT CAA GA-3') (Guillou *et al.* 2002). Gli oligonucleotidi usati come *primers* nelle reazioni di sequenziamento dei plasmidi ricombinanti, ottenuti dopo clonaggio dei prodotti amplificati, erano i *primers* plasmidici M13 *forward* (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3') e M13 *reverse* (5'-CAG GAA ACC AGC CCT AAT TTG GAC C-3').

2.4. Reazioni di amplificazione

Le reazioni di amplificazione dei tre tipi di marcatori genetici (rRNA 18S, regione ITS, rRNA 24S) sono state condotte con la tecnica della PCR (o *Polymerase Chain Reaction*) e sono state eseguite con una fase iniziale di denaturazione di 7 min. a 94 °C, 30-35 cicli comprendenti una fase di denaturazione di 1 min. a 94 °C, una fase di *annealing* di 1 min. a temperature variabili tra 55 e 60°C e una fase di estensione di 1 min. a 72 °C, seguiti da una fase terminale di estensione di 7 min. a 72 °C, utilizzando un apparecchio *GeneAmp PCR System 2.400* (Perkin Elmer, Foster City, CA, U.S.A.) e 1 U di Taq DNA polimerasi (Polymed, Firenze, Italia). La dimensione dei prodotti amplificati è stata stimata mediante comparazione con un opportuno DNA di riferimento (*Gene Ruler 1kb DNA Ladder* - MBI Fermentas, Vilnius, Lituania), dopo corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1,2%, colorazione del gel con bromuro di etidio (10 mg ml⁻¹) e visualizzazione del gel colorato su un transilluminatore a luce U.V. I prodotti amplificati, prima di essere sottoposti a clonaggio, sono stati purificati su colonnine *Quantum Prep PCR Kleen Spin Columns* (BIO RAD, Hercules, CA, U.S.A.), al fine di eliminare eventuali residui di *primers* e desossinucleotidi, seguendo le indicazioni della ditta fornitrice.

2.5. Clonaggio e sequenziamento

I prodotti amplificati, dopo purificazione, sono stati sottoposti a clonaggio, utilizzando il *TOPO TA Cloning kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) e seguendo le istruzioni fornite dalla ditta distributrice.

Le reazioni di sequenziamento sono state eseguite utilizzando il *Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem, Warrinton, UK), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice, ed un sequenziatore automatico multicapillare *Applied Biosystems* (Genelab-ENEA, Roma, Italia).

2.6. Analisi filogenetiche

Le sequenze ottenute sono state sottoposte a comparazione con sequenze depositate in bancadati

(GenBank/EMBL), mediante il programma BLAST (Altschul *et al.* 1990), e allineate con il programma CLUSTALX (Thompson *et al.* 1997). Il risultante allineamento automatizzato e relativo alle sequenze del gene per l'rRNA 18S è stato successivamente modificato "manualmente", utilizzando il programma BioEdit (Hall 1999), in modo da ottimizzare lo schema di accoppiamento delle basi osservato nella struttura secondaria della molecola (Van de Peer *et al.* 2000); (Wuyts *et al.* 2000).

Le analisi filogenetiche sono state condotte usando il metodo Neighbor Joining (NJ), eseguito con il programma MEGA versione 2.2 (Kumar *et al.* 2001). Per selezionare l'appropriato modello di sostituzione da usare per le analisi condotte con il metodo NJ, è stato eseguito un *Hierarchical likelihood ratio test* utilizzando il programma Modeltest 3.06 (Posada & Crandall 1998). L'affidabilità dei "rami" interni degli alberi filogenetici ottenuti era valutata usando il metodo *bootstrap* (Felsenstein 1988), con 1000 "repliche". Le tipologie degli alberi filogenetici erano create con il programma TreeView (Page 1996).

Le strutture secondarie relative alla molecola dell'rRNA 18S sono state ricostruite usando i programmi RNAViz (De Rijk & De Wachter 1977) e RNAdraw versione 1.1b2 (Matzura & Wennborg 1996), sulla base del modello di struttura fatto per *Gymnodinium breve* e disponibile al sito web *The European Ribosomal RNA database* (<http://rrna.uia.ac.be/>).

3. RISULTATI

3.1. Identificazione tassonomica delle specie

Una prima fase di analisi dei campioni raccolti ha evidenziato, per mezzo di tecniche di microscopia ottica, la presenza di diverse forme di protisti, tra cui tre specie di diatomee, *Pandorina* sp., appartenente alla classe Chlorophyceae (ordine Volvocales), un protozoo ciliato appartenente al genere *Oxytricha* e, tra i dinoflagellati, *Gymnodinium* sp., *Peridinium* sp. e una forma che più di ogni altra corrisponde alla descrizione morfologica fatta per la specie ritenuta responsabile dell'arrossamento delle acque, *Glenodinium sanguineum* (Fig. 1).

3.2. Identificazione genetica delle specie

Allo scopo di ottenere un riscontro delle identificazioni tassonomiche fatte, è stato condotto un approccio molecolare, utilizzando diverse metodologie applicabili al DNA genomico. I prodotti amplificati e relativi ai tre tipi di marcatori genetici scelti sono mostrati in figura 2. In particolare, relativamente ai campionamenti effettuati nel primo anno di studio (2001), le reazioni di amplificazione sono

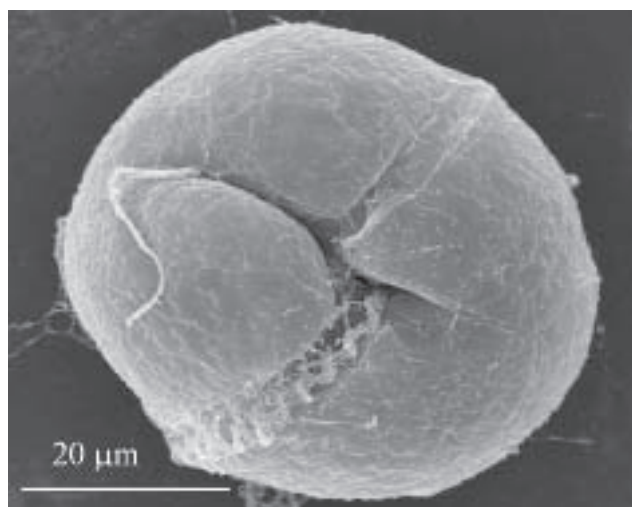


Fig. 1 - Fotografia al microscopio elettronico a scansione di *Glenodinium sanguineum*.

Fig. 1 - Scanning electronic microscope of *Glenodinium sanguineum*.

state eseguite esclusivamente sul DNA estratto da un'aliquota di acqua del lago filtrata ed utilizzando *primers* specifici per i tre tipi di geni (Fig. 2, corsie 1, 2, e 3). I prodotti così ottenuti presentano una dimensione di circa 1800 coppie di basi (bp), nel caso del gene per l'rRNA 18S, di circa 750 bp, nel caso

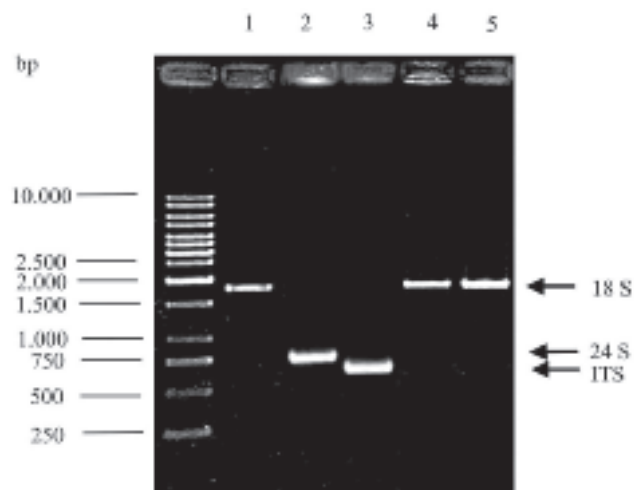


Fig. 2 - Elettroforesi su gel di agarosio di prodotti amplificati relativi al gene per l'rRNA 18S, al gene per l'rRNA 24S e alla regione ITS della comunità a dinoflagellati (corsie 1, 2 e 3), di *Gymnodinium* sp. (corsia 4) e di *Glenodinium* sp. (corsia 5) del Lago di Tovel.

Fig. 2 - Agarose gel electrophoresis of amplified products relative to the rRNA 18S, rRNA 24S and ITS region genes of the dinoflagellates's community (lanes 1, 2 and 3), *Gymnodinium* sp. (lane 4), and *Glenodinium* sp. (lane 5) from Lake Tovel.

del gene per l'rRNA 24S e di circa 650 bp nel caso della regione ITS. Nei tre anni di studio successivi (2002-2004), è stato amplificato solo il gene per l'rRNA 18S, sia su cellule isolate e ritenute, sulla base delle caratteristiche morfologiche, appartenenti al genere *Gymnodinium* (Fig. 2, corsia 4), che su quelle isolate e che corrispondevano alla descrizione morfologica fatta per *Glenodinium sanguineum* (Fig. 2, corsia 5). I prodotti amplificati così ottenuti sono stati successivamente sottoposti a sequenziamento. In particolare, i prodotti amplificati corrispondenti alla comunità a dinoflagellati del lago, trattandosi di una mescolanza di molecole di DNA provenienti da specie differenti, sono stati sottoposti a clonaggio, seguito dal sequenziamento dei cloni ricombinanti. Dal clonaggio dei prodotti amplificati relativi ai tre tipi di marcatori genetici (gene per l'rRNA 18S, gene per l'rRNA 24S e regione ITS) e dal successivo *screening* di cloni ricombinanti sono state ottenute 9, 3 e 2 sequenze, rispettivamente, e denominate "Cloni A - I" (18S), "Cloni L-N" (24S), "Cloni O e P" (regione ITS). Ciascuno dei prodotti amplificati, invece, corrispondenti alle cellule singolarmente isolate di *Gymnodinium* sp. e a quelle di *G. sanguineum*, trattandosi di molecole di DNA identiche tra di loro in quanto provenienti da un'unica specie, sono stati sottoposti al sequenziamento diretto.

3.3. Analisi delle sequenze

Le sequenze relative alle cellule singolarmente isolate della forma che più di ogni altra corrisponde alla descrizione morfologica fatta per *Glenodinium sanguineum*, ottenute mediante sequenziamento diretto e corrispondenti ai campionamenti fatti negli anni 2002-2004, sono risultate identiche in tutti e tre gli anni di studio, così come le sequenze relative alle cellule singolarmente isolate di *Gymnodinium* sp.

Le sequenze ottenute, sia quelle dei cloni che quelle derivate dal sequenziamento diretto dei prodotti amplificati, sono state comparate con quelle per gli stessi tipi di geni già disponibili per altri organismi. I risultati delle comparazioni hanno evidenziato elevati valori di identità di sequenza (94-96%) con vari membri della classe Dinophyceae. Le sequenze relative al gene per l'rRNA 18S, al gene per l'rRNA 24S e alla regione ITS presentano una lunghezza variabile tra 1731 e 1762, tra 691 e 704 coppie di basi (bp) e una dimensione di 572 nucleotidi (esclusi i *primers*), rispettivamente, e un contenuto in G + C compreso tra 43,16 e 47,63%, tra 45,31 e 50,72% e tra 46,68 e 51,22%, rispettivamente (Tab. 1). Le sequenze ottenute, inoltre, sono state depositate in "bancadati" (GenBank/EMBL) e i corrispondenti codici di accesso sono mostrati nella tabella 1.

Tab. 1 - Dimensioni in coppie di basi (bp), percentuali del contenuto in G + C e codici di accesso per la "bancadati" delle sequenze ottenute nel presente lavoro.

Tab. 1 - Dimensions in base pairs (bp), percentages of G + C content, and GeneBank accession numbers of the sequences obtained in the present study.

	Gene	bp	% G + C	N° di accesso
Clone A	18S	1.759	45,71	AY829524
Clone B	18S	1.752	46,92	AY827951
Clone C	18S	1.762	46,59	AY840208
Clone D	18S	1.752	46,18	AY827953
Clone E	18S	1.740	43,16	AY829525
Clone F	18S	1.731	43,62	AY829526
Clone G	18S	1.753	47,63	AY827952
Clone H	18S	1.759	45,76	AY827954
Clone I	18S	1.762	44,67	AY827955
Clone L	24S	704	45,31	AY827950
Clone M	24S	691	50,07	AY829529
Clone N	24S	698	50,72	AY829530
Clone O	ITS	572	46,68	AY829531
Clone P	ITS	572	51,22	AY829532
<i>Gymnodinium</i> sp.	18S	1.762	46,59	AY829527
<i>Glenodinium</i> sp.	18S	1.759	45,76	AY829528

3.4. Analisi filogenetica

Le sequenze ottenute per i tre tipi di marcatori genetici utilizzati sono state allineate con le corrispondenti sequenze già disponibili per altri organismi appartenenti alla classe Dinophyceae e i risultanti allineamenti sono stati utilizzati per la costruzione di alberi filogenetici con il metodo di distanza Neighbor Joining (NJ). Il *Hierarchical likelihood ratio test*, eseguito per selezionare l'appropriato modello di sostituzione da usare per le analisi condotte con il metodo NJ, indica che il modello *Kimura 2-parameter* (Kimura 1980) – che prende in considerazione, come tipi di sostituzioni, sia le transizioni che le transversioni, assumendo che le frequenze dei quattro nucleotidi siano le stesse e che le velocità di sostituzione non varino tra i siti – è quello più adatto.

L'albero filogenetico relativo alle sequenze del gene per l'rRNA 18S è mostrato in figura 3. La sequenza relativa alle cellule singolarmente isolate di *Gymnodinium* sp., ottenuta mediante sequenziamento diretto e corrispondente ai campionamenti fatti negli anni 2002 - 2004, si posiziona, con un valore di *bootstrap* ben supportato (99%), in un gruppo costituito prevalentemente da specie di *Gymnodinium*. La sequenza di uno dei nove cloni corrispondenti al campionamento fatto nel 2001 e relativi alla comunità

organismica del lago (Clone C) si posiziona anche in questo gruppo, strettamente associata (con un valore di *bootstrap* del 100%) alla sequenza di *Gymnodinium* sp., precedentemente ottenuta. Queste due sequenze (*Gymnodinium* sp. e Clone C), inoltre, presentano un'identità di sequenza pari al 99,4%, con 9 mutazioni di differenza. La sequenza relativa alle cellule singolarmente isolate della forma che più di ogni altra corrisponde alla descrizione morfologica fatta per *Glenodinium sanguineum*, ottenuta mediante sequenziamento diretto e corrispondente ai campionamenti fatti negli anni 2002-2004, si inserisce in una posizione nuova, insieme alle sequenze di quattro dei nove cloni corrispondenti al campionamento fatto nel 2001 e relative alla comunità organismica del lago (Cloni B, D, G e H). Tra le sequenze di questi quattro cloni, quella che risulta più strettamente associata alla sequenza di *Glenodinium* sp. (con un valore di *bootstrap* del 100%) è quella del Clone H, che con essa presenta un valore di identità di sequenza pari al 99,6% con 6 mutazioni di differenza. Le sequenze di due dei nove cloni corrispondenti al campionamento fatto nel 2001 e relative alla comunità organismica del lago (Cloni A e I) risultano strettamente associate e costituiscono, con un valore di *bootstrap* del 76%, il *sister group* di un *clade* genetico costituito dalle sequenze di *Kryptoperidinium foliaceum* e *Peridinium foliaceum*. Infine, le sequenze di due dei nove cloni corrispondenti al campionamento fatto nel 2001 e relative alla comunità organismica del lago (Cloni E e F) si posizionano, con un valore di *bootstrap* ben supportato (91%), vicino alle sequenze del genere *Amoebophrya*.

L'albero filogenetico relativo alle sequenze del gene per l'rRNA 24S è mostrato in figura 4. Le sequenze dei tre cloni corrispondenti al campionamento fatto nel 2001 e relative alla comunità organismica del lago (Cloni L - N) si posizionano in due gruppi distinti. In particolare, le sequenze dei cloni M e N risultano associate (con un valore di *bootstrap* del 84%) a una sequenza di *Gymnodinium* sp., mentre la sequenza del clone L forma un *clade*, supportato da un valore di *bootstrap* del 98%, con una sequenza depositata in "bancadati" come "Dinophyceae gen. sp."

L'albero filogenetico relativo alle sequenze della regione ITS è mostrato in figura 5. Le sequenze dei due cloni corrispondenti al campionamento fatto nel 2001 e relative alla comunità organismica del lago (Cloni O e P) costituiscono, con un valore di *bootstrap* del 54%, il *sister group* di un gruppo genetico costituito da due sequenze appartenenti al genere *Gymnodinium*.

3.5. Struttura secondaria dell'rRNA 18S

È stato ricostruito il modello di struttura secondaria relativa alla molecola dell'rRNA 18S di *Glenodinium* sp. (Fig. 6) e, per comparazione, anche dei cloni B, D, G e H (dati non mostrati), che, in base all'analisi

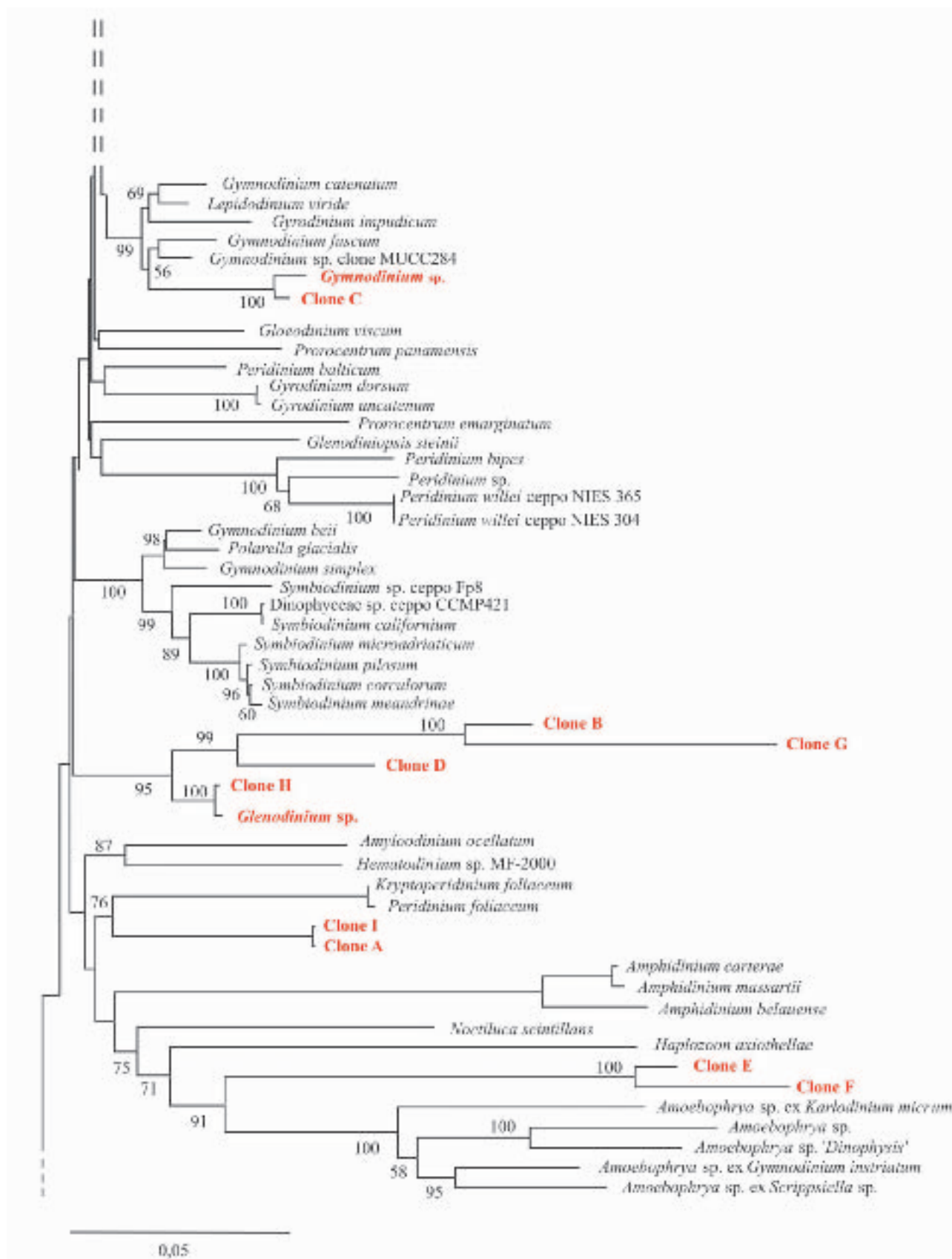


Fig. 3 - Albero filogenetico costruito con il metodo Neighbor-Joining e basato sulle sequenze del gene per l'rRNA 18S di dinoflagellati del Lago di Tovel.

Fig. 3 - Phylogenetic tree inferred from Neighbor-Joining analysis and based on rRNA 18S genic sequences of dinoflagellates from Lake Tovel.

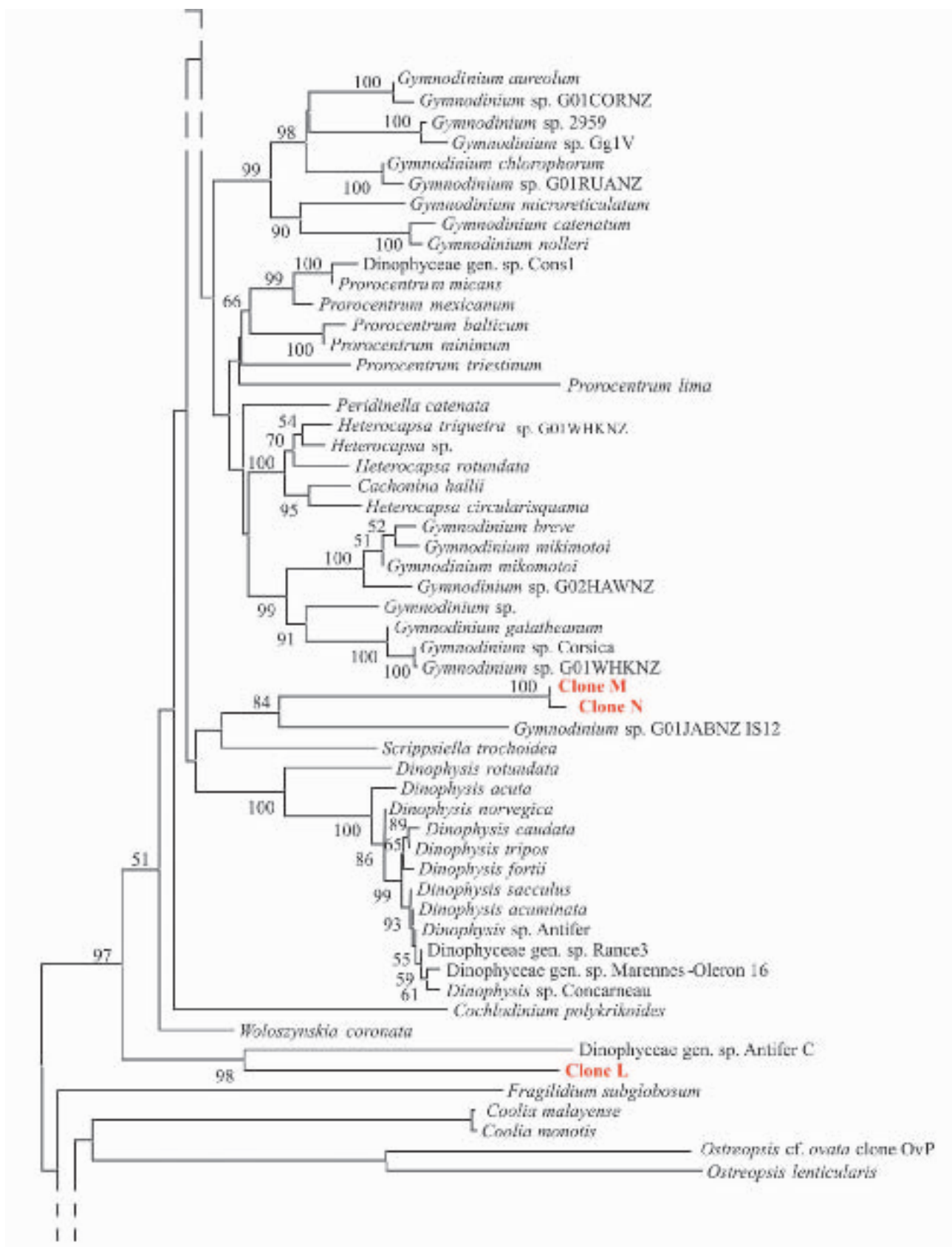


Fig. 4 - Albero filogenetico costruito con il metodo Neighbor-Joining e basato sulle sequenze del gene per l'rRNA 24S di dinoflagellati del Lago di Tovel.

Fig. 4 - Phylogenetic tree inferred from Neighbor-Joining analysis and based on rRNA 24S genic sequences of dinoflagellates from Lake Tovel.

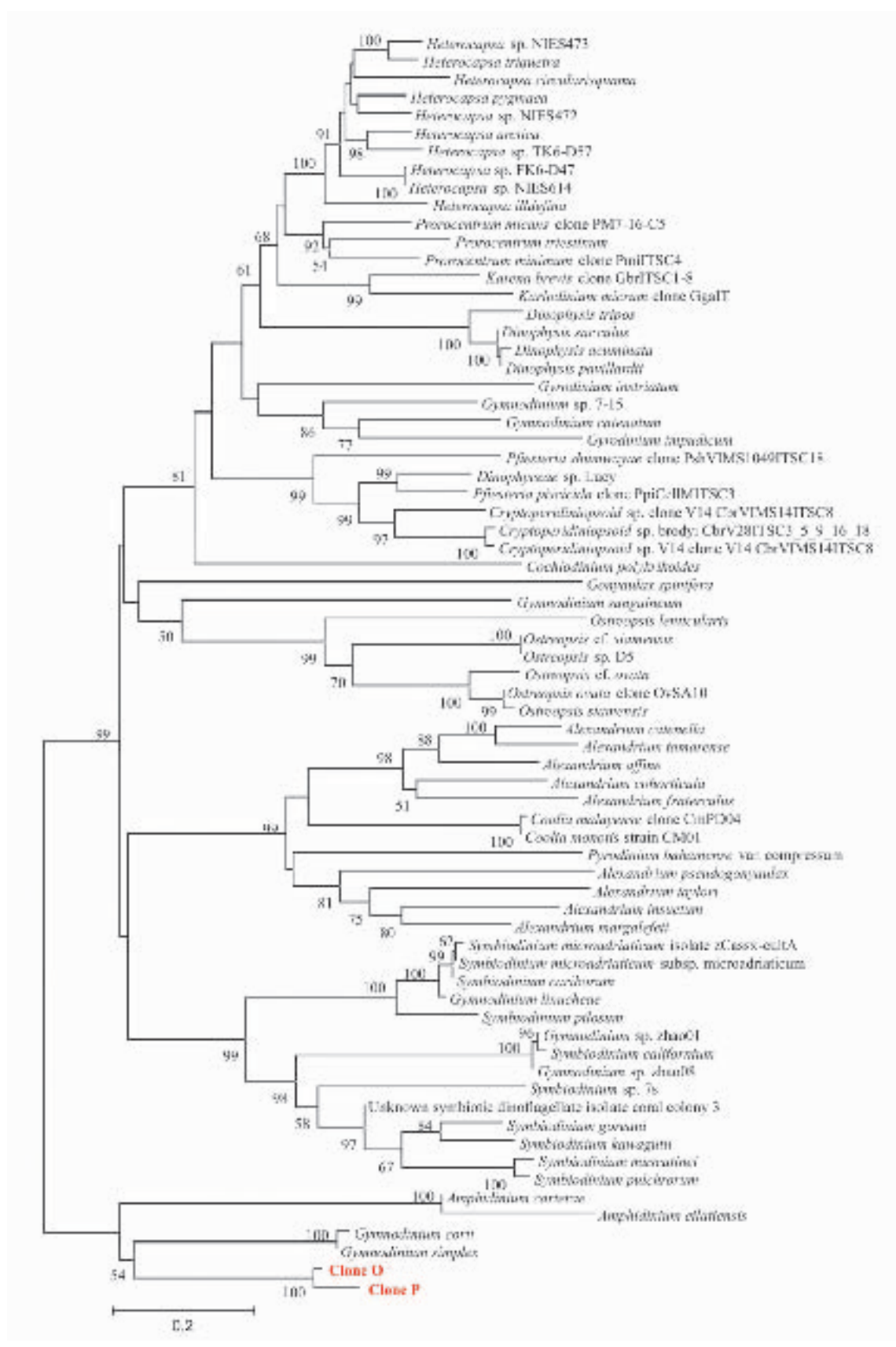


Fig. 5 - Albero filogenetico costruito con il metodo Neighbor-Joining e basato sulle sequenze della regione ITS di dinoflagellati del Lago di Tovel.
 Fig. 5 - Phylogenetic tree inferred from Neighbor-Joining analysis and based on ITS region genic sequences of dinoflagellates from Lake Tovel.

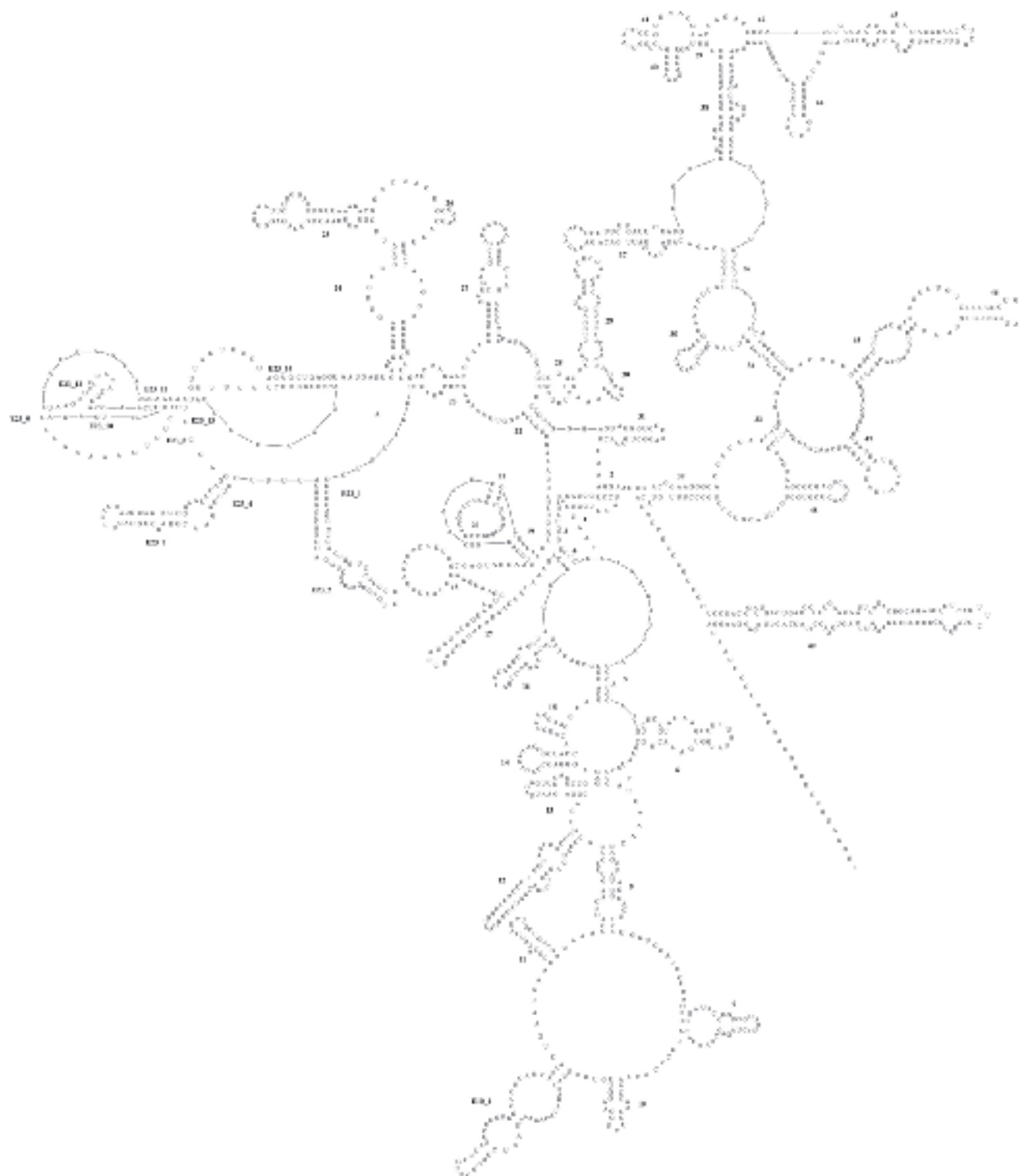


Fig. 6 - Modello di struttura secondaria del'rRNA 18S di *Glenodinium* sp. del Lago di Tovel.
Fig. 6 - Secondary structure model of rRNA 18S of *Glenodinium* sp. from Lake Tovel.

filogenetica, risultano a esso strettamente associati. L'analisi comparativa dei modelli ottenuti ha mostrato che, nonostante l'elevato numero di differenze a livello di sequenza nucleotidica (fino a circa 270), tuttavia non si hanno modifiche strutturali rilevanti (aggiunta o eliminazione di "steli" o "anse").

4. DISCUSSIONE

Nel presente lavoro, al fine di caratterizzare la specie coinvolta nel fenomeno di arrossamento delle acque caratteristico del Lago di Tovel, è stato condotto un approccio molecolare, prendendo in esame l'intera comunità a dinoflagellati del lago. Una prima osservazione dei campioni ha permesso di identificare, per mezzo di varie tecniche di microscopia ottica, diverse forme di dinoflagellati, tra cui *Gymnodinium* sp., *Peridinium* sp. e una forma che più di ogni altra corrisponde alla descrizione morfologica fatta per la specie ritenuta responsabile dell'arrossamento delle acque, il '*Glenodinium sanguineum*'. Il ritrovamento nelle acque del lago di tali specie è in accordo con quanto precedentemente riportato da altri autori (Marchesoni 1959); (Arrighetti & Siligardi 1979); (Paganelli *et al.* 1981).

L'approccio molecolare, eseguito utilizzando tre diversi geni nucleari facenti parte del cistrone per gli rRNA (18S, 24S e regione ITS), ha permesso di ottenere diverse sequenze nucleotidiche, la cui analisi (sia comparativa, con sequenze per gli stessi tipi di geni già disponibili per altri organismi, che filogenetica, mediante la costruzione di alberi filogenetici) ha consentito di confermare la presenza nelle acque del lago delle specie precedentemente identificate su base tassonomica. In particolare, la sequenza del gene per l'rRNA 18S e ottenuta da cellule singolarmente isolate di *Gymnodinium* sp. si posiziona, nell'albero filogenetico, in un gruppo costituito prevalentemente da specie di *Gymnodinium*, confermando l'esattezza dell'identificazione fatta. In tale gruppo si posiziona anche la sequenza di uno dei nove cloni relativi alla comunità organismica del lago (Clone C), indicando che anche questa sequenza corrisponde molto probabilmente ad una specie di *Gymnodinium*. La presenza nelle acque del lago di specie appartenenti a questo genere è ulteriormente confermata dall'analisi delle sequenze del gene per l'rRNA 24S (Cloni M e N) e della regione ITS (Cloni O e P), che si posizionano anch'esse, nei rispettivi alberi, in gruppi costituiti prevalentemente da specie di *Gymnodinium*. Inoltre, la sequenza del gene per l'rRNA 18S, ottenuta da cellule singolarmente isolate e che corrispondono alla descrizione morfologica fatta per la specie *G. sanguineum*, si posiziona, nell'albero filogenetico, in un gruppo nuovo. Dal momento che fino a oggi in "bancadati" non è stata depositata la sequenza del

gene per l'rRNA 18S di *G. sanguineum*, ciò indica che la sequenza ottenuta molto probabilmente corrisponde a quella dell'organismo responsabile dell'arrossamento del lago. In tale gruppo si posizionano anche le sequenze di quattro dei nove cloni relativi alla comunità organismica del lago (Cloni B, D, G e H), suggerendo che esse appartengano a taxa filogeneticamente affini a '*G. sanguineum*'. La stretta associazione esistente tra le sequenze di questo gruppo è anche confermata dall'analisi comparativa delle loro strutture secondarie, che, nonostante l'elevato numero di differenze nucleotidiche, tuttavia non ha evidenziato modifiche strutturali rilevanti. Infine, l'analisi delle altre sequenze del gene per l'rRNA 18S e relative alla comunità organismica del lago ha evidenziato la presenza di altre specie, quali *Peridinium* sp. (Cloni A e I) e *Amoebophrya* sp. (Cloni E e F).

5. CONCLUSIONI

L'approccio molecolare utilizzato nel presente studio sull'intera comunità a dinoflagellati del Lago di Tovel, al fine di caratterizzare la specie ritenuta responsabile dell'arrossamento delle acque del lago, ha permesso di evidenziare la presenza di diversi taxa a essa strettamente affini. Pertanto, l'ipotesi di lavoro che noi proponiamo è che il mancato arrossamento delle acque del Lago di Tovel sia dovuto all'instaurarsi di fenomeni di competizione tra organismi strettamente affini, che impediscono un sufficiente arrossamento delle acque del lago.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio fa parte della ricerca SALTO (Studio sul mancato Arrossamento del Lago di Tovel) finanziata dalla Provincia Autonoma di Trento. Gli Autori ringraziano il dott. Fabrizio Erra e il sig. Francesco Paolo Frontini, rispettivamente per la loro assistenza nell'elaborazione delle figure e nel trattamento delle colture dei protisti utilizzati nelle analisi. Un ringraziamento, inoltre, è rivolto al dott. Pietro Lupetti dell'Università di Siena per il suo contributo nell'acquisizione di immagini con microscopia a scansione.

BIBLIOGRAFIA

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W.E. & Lipman D.J., 1990 - Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- Arrighetti A. & Siligardi M., 1979 - Analisi idrobiologiche al lago di Tovel (TN). Campagna 1977-1978. *Quaderni Esp. ric.*, 5: 1-69.

- Baldi E., 1941 - Ricerche idrobiologiche sul Lago di Tovel. *Mem. Mus. St. Nat. Ven. Trid.*, 6: 1-297.
- De Rijk P. & De Wachter R., 1997 - RNAViz, a program for the visualisation of RNA secondary structure. *Nucl. Acids Res.*, 25: 4679-4684.
- Felsenstein J., 1988 - Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.*, 22: 521-565.
- Flaim G., Moestrup Ø., Hansen G. & D'Andrea M., 2006 - Da *Glenodinium* a *Tovellia*. *Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol.*, 81 (2004), Suppl. 2: 447-457.
- Guillou L., Nézan E., Cueff V., Erard-Le Denn E., Cambon-Bonavita M.A., Gentien P. & Barbier G., 2002 - Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis* and *Karenia*) from French coasts. *Protist*, 153: 223-238.
- Hall T.A., 1999 - BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Kimura M., 1980 - A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. & Nei M., 2001 - *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*. *Bioinformatics*, 17: 1244-1245.
- Marchesoni V., 1959 - La Val di Tovel e il "Lago Rosso". *Natura Alpina*, 10: 37-76.
- Matzura O. & Wennborg A., 1996 - RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows. *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)*, 12: 247-249.
- Medlin L., Elwood H.J., Stickel S. & Sogin M.L., 1988 - The characterization of enzymatically amplified 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71: 491-499.
- Miola R. & Trevisan R., 1982 - Un contributo allo studio su ciclo biologico e contenuto in clorofilla di *Glenodinium sanguineum* March. del Lago di Tovel (Trento). *Studi Trent. Sci. Nat.*, 59: 23-29.
- Paganelli A., Trevisan R., Cordella P., Miola A. & Cappelletti E.M., 1981 - Ricerche limnologiche sul Lago di Tovel (Trentino) ed ipotesi sul mancato arrossamento. *Studi Trent. Sci. Nat.*, 88: 393-424.
- Page R.D.M., 1996 - TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.*, 12: 357-358.
- Petroni G., Dini F., Verni F. & Rosati G., 2002 - A molecular approach to the tangled intrageneric relationships underlying phylogeny in *Euplotes* (Ciliophora, Spirotrichea). *Mol. Phyl. Evol.*, 22: 118-130.
- Posada D. & Crandall K.A., 1998 - Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T., 1989 - *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Vols. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmugin F. & Higgins D.G., 1997 - The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.*, 4: 4876-4882.
- Van de Peer Y., De Rijk P., Wuyts J., Winkelmans T. & De Wachter R., 2000 - The European small subunit ribosomal RNA database. *Nucl. Acids Res.*, 28: 175-176.
- Wuyts J., De Rijk P., Van de Peer Y., Pison G., Rousseeuw P. & De Wachter R., 2000 - Comparative analysis of more than 3000 sequences reveals the existence of two pseudoknots in area V4 of eukaryotic small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*, 28: 4698-4708.

