

La diversità dei dinoflagellati del Lago di Tovel rilevata con un approccio molecolare

Maura D'ANDREA* & Giovanna FLAIM

Dipartimento Risorse Naturali e Ambientali, Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Via E. Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige (TN), Italia

*E-mail dell'Autore per la corrispondenza: maudand@yahoo.it

RIASSUNTO - *La diversità dei dinoflagellati del Lago di Tovel rilevata con un approccio molecolare* - In questo lavoro è stata studiata la diversità della comunità di dinoflagellati del Lago di Tovel mediante l'utilizzo di tecniche molecolari. I metodi impiegati si basano sull'amplificazione via PCR e sul sequenziamento di una regione del DNA ottenuto da tre diversi materiali di partenza: campioni di acqua del lago, singole cellule e colture *in vitro*. Mediante un protocollo di analisi di restrizione (PCR-RFLP) sui campioni ambientali messo a punto nel nostro laboratorio, sono stati individuati 11 diversi ribotipi presenti in due punti del lago in tre stagioni dell'annata 2003-2004. Con la PCR da singole cellule, invece, si sono ottenute sequenze di DNA utili per l'identificazione delle specie difficili da coltivare *in vitro*. L'analisi filogenetica di tutte le sequenze ottenute da Tovel ha permesso di identificare alcuni dei ribotipi individuati nei campioni ambientali e alcuni dei dinoflagellati coltivati *in vitro*. Con questo approccio si è giunti quindi a una migliore conoscenza della comunità di dinoflagellati di questo lago: in particolare è stata rivelata una ricchezza di dinoflagellati maggiore rispetto a quanto osservato al microscopio ottico sulla base delle caratteristiche morfologiche.

SUMMARY - *Dinoflagellate biodiversity in Lake Tovel using a molecular approach* - Molecular tools have been used for the investigation of dinoflagellate biodiversity in Lake Tovel. Environmental samples, single cells and *in vitro* cultures were amplified by PCR and their DNA sequence was determined. A restriction analysis protocol on environmental samples, set up in our lab, permitted to distinguish 11 ribotypes in two stations of the lake in three different periods of the year 2003-2004. Moreover, single cell PCR enabled the identification of organisms difficult to establish *in vitro*. The phylogenetic analysis of DNA sequences led to the identification of some of the environmental ribotypes and *in vitro* cultures. The genetic approach hereby described, revealed an higher species richness than expected by microscopical observations: in fact more dinoflagellates were detected than by light microscopy, leading to a consistent improvement of Tovel's dinoflagellates.

Parole chiave: dinoflagellati, Lago di Tovel, diversità genetica, PCR, RFLP, filogenesi

Key words: dinoflagellates, Lake Tovel, genetic diversity, PCR, RFLP, phylogenesis

1. INTRODUZIONE

I dinoflagellati sono un gruppo importante anche a causa delle estese fioriture soprattutto in ambiente marino. Come gruppo tassonomico sono notoriamente difficili da identificare, in particolare le specie atecate, che portano spesso a confusione nell'identificazione di specie responsabili di fioriture (Flaim *et al.* 2004), a volte vengono proposti cicli vitali estremamente complicati (Popovsky & Pfiester 1990; Litaker *et al.* 2002). Queste difficoltà sono attribuibili a vari aspetti fra i quali una certa plasticità morfologica all'interno del ciclo vitale, una mancanza di solidi criteri tassonomici rilevabili anche in campioni fissati e una problematicità

nell'esaminare campioni vivi sia per la stenotermicità fredda di molte specie sia per la loro mobilità.

Non essendo generalmente una componente principale del plancton dei laghi, i dinoflagellati d'acqua dolce sono poco studiati e per questo le difficoltà sopra menzionate tendono ad accentuarsi. Un esempio è il Lago di Tovel, uno dei pochi ambienti d'acqua dolce con fioriture ricorrenti di un dinoflagellato, dove l'agente causale *Tovellia sanguinea* sp. inedit. (Moestrup *et al.* 2006), precedentemente *Glenodinium sanguineum* March. (Marchesoni 1941), era fonte di confusione tassonomica nonostante i numerosi studi a riguardo (Baldi 1941; Marchesoni 1941; Dodge *et al.* 1987).

Queste difficoltà intrinseche ci hanno portato a esplorare un nuovo approccio per lo studio della comunità dei dinoflagellati di acqua dolce e precisamente l'utilizzo di tecniche molecolari. Recentemente la biologia molecolare è stata impiegata con successo in molti studi di carattere ecologico sul fitoplancton (De Bruin *et al.* 2003). Per quanto riguarda i dinoflagellati questo approccio ha portato all'identificazione di nuove specie e a una migliore classificazione di alcuni organismi con tassonomia incerta (Daugbjerg *et al.* 2000; Hansen *et al.* 2000).

Le tecniche molecolari sono strumenti più specifici rispetto a quelle di microscopia ottica, in quanto sono basate su diversità a livello di DNA. Inoltre, si tratta di metodiche di semplice svolgimento e che si prestano a essere usate di routine, apportando notevoli vantaggi in termini di costi e tempi, rispetto ad altre tecniche avanzate come ad esempio la microscopia elettronica o la biochimica. Un altro importante vantaggio dell'analisi genetica sta nella possibilità di utilizzare piccole quantità di materiale di partenza anche senza disporre di colture *in vitro*, facilitando e velocizzando molto il lavoro. In particolare, due tecniche molecolari permettono di ovviare a questo problema: la PCR da singole cellule e l'analisi di restrizione (PCR-RFLP) su campioni ambientali. La PCR da singole cellule è stata applicata con successo a molti dinoflagellati (Edwardsen *et al.* 2003; Takano & Horiguchi 2004) per i quali non sono disponibili colture *in vitro*, consentendone la classificazione e la ricostruzione delle relazioni evolutive con gli altri dinoflagellati. L'analisi di restrizione su campioni ambientali è una tecnica sviluppata recentemente per lo studio delle comunità di picoplancton marino, che ha permesso di rivelare un'inattesa altissima biodiversità all'interno di questi ambienti tramite un rapido screening direttamente su campioni d'acqua (Romari & Vaultot 2004).

Entrambi questi approcci molecolari risultavano interessanti per il Lago di Tovel per la potenziale capacità di identificare i dinoflagellati senza la necessità di avere colture *in vitro*, obiettivo non pienamente raggiunto da precedenti lavori. L'amplificazione del DNA da singole cellule e l'analisi di restrizione su campioni ambientali sono quindi stati utilizzati in combinazione con le colture *in vitro* finora disponibili per identificare i dinoflagellati presenti nel Lago di Tovel.

2. AREA DI STUDIO

Il Lago di Tovel si trova all'interno del parco Adamello-Brenta, a un'altitudine di 1178 m. Questo lago montano è suddiviso in due bacini: uno a nord-ovest, più grande e profondo ($z_{\max} = 39$ m), e un altro più piccolo ($z_{\max} = 4$ m) situato nella zona sud orientale, chiamato Baia Rossa perché in questa zona si verificava l'arrossamento estivo delle acque, fenomeno

attribuito alla fioritura di un dinoflagellato, che ha reso famoso il lago. Descrizioni dettagliate delle caratteristiche chimiche e limnologiche di Tovel si possono reperire rispettivamente in Corradini *et al.* (2001) e Paganelli (1992).

3. METODI

3.1. Analisi di restrizione e sequenziamento su campioni ambientali

Campioni di acqua sono stati raccolti con apposita bottiglia di 3 l in superficie nel centro della Baia Rossa (punto B) e nel punto di massima profondità del bacino principale (punto A) come indicato in figura 1. Sono stati scelti questi due punti per la loro diversa profondità e posizione, diversità che si riflette sulla differenza di biocenosi fitoplanctonica.

L'acqua è stata filtrata e si è proceduto all'estrazione del DNA dal filtro con il metodo del CTAB (Doyle & Doyle 1987). La subunità maggiore del DNA ribosomiale (LSU rDNA) dei dinoflagellati è stata amplificata con il primer D3A-F e il primer specifico DINO (Hansen & Daugbjerg 2004), e clonati in appositi vettori, ottenendo una libreria per ogni campione ambientale (Sambrook *et al.* 2000). Cento cloni per ogni libreria sono stati digeriti con l'enzima di restrizione TaqI e i frammenti ottenuti dalla restrizione sono stati separati in un gel di agarosio (2%). Ogni clone che presentava un profilo unico è stato assegnato a un ribotipo diverso (da A a M) e sequenziato, come descritto in D'Andrea *et al.* (in prep.).

Vengono qui presentati i risultati dei campioni raccolti in tre periodi tra il 2003 e il 2004: 19 agosto 2003

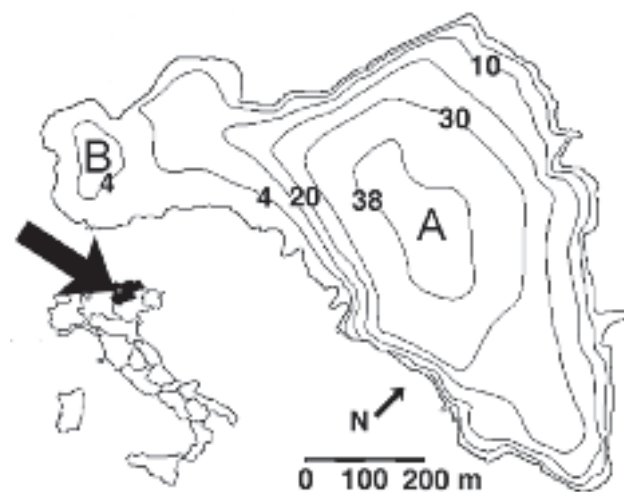


Fig. 1- Lago di Tovel: mappa batimetrica del lago con indicato le stazioni di campionamento A e B.

Fig 1 - Lake Tovel: location and bathymetric map with indication of sampling stations A and B.

(estate), 15 gennaio 2004 (inverno), 11 maggio 2004 (primavera). È stato analizzato un campione estivo, in quanto era proprio d'estate che a Tovel avvenivano le fioriture, e poi, considerando che il lago è coperto di ghiaccio da dicembre ad aprile, sono stati raccolti un campione invernale, sotto ghiaccio, e uno la primavera successiva dopo lo scioglimento del ghiaccio.

3.2. PCR e sequenziamento da singole cellule e da colture cellulari

Cellule vegetative e cisti da campioni di fitoplankton o sedimenti sono state isolate allo stereomicroscopio (50x) con una micropipetta. La reazione di amplificazione è stata effettuata direttamente nella provetta contenente le singole cellule, mentre per le cisti si è reso necessario rompere la parete cellulare al microscopio con l'aiuto di un ago. Sono stati utilizzati i primer D1R e 28-1483R (Daugbjerg *et al.* 2000) che amplificano circa 1400 bp della LSU rDNA (compresi i domini variabili D1-D6 come descritto in Lenaers *et al.* 1989); successivamente il prodotto di PCR è stato sequenziato in entrambe le direzioni utilizzando i primer interni D3A-F, D3B-R e D2C-R (Hansen *et al.* 2000) in aggiunta a quelli usati in amplificazione. Le condizioni di PCR e sequenziamento sono descritte in D'Andrea *et al.* (in prep.).

Dagli organismi di cui era disponibile la coltura *in vitro* si è estratto il DNA dalle cellule seguendo il protocollo di Hansen *et al.* (2000). Il LSU rDNA è stato amplificato e sequenziato con le stesse condizioni utilizzate per le singole cellule.

3.3. Analisi filogenetica

Le sequenze di DNA ottenute da singole cellule, colture *in vitro* e ribotipi ambientali, sono state analizzate come descritto in D'Andrea *et al.* (in prep.). Attraverso una ricerca in GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov>) si sono individuate le sequenze più simili a quelle ottenute nel presente studio: 11 sequenze di dinoflagellati, più una del ciliato *Toxoplasma gondii*, inserita come *outgroup* (Tab. 1), sono state incluse nell'analisi filogenetica.

Per la ricostruzione filogenetica è stato usato il programma PAUP 4.0 b 10 (Swofford 2003) con i metodi di *neighbour joining* (NJ), massima parsimonia (MP) e *maximum likelihood* (ML). Il modello evolutivo impostato per l'analisi NJ e ML è stato selezionato con Modeltest (Posada & Crandall 1998) ed è risultato il Tamura-Nei, con un valore di gamma pari a 0,287. Per i metodi NJ e MP è stata effettuata un'analisi di *bootstrap*, con 1000 ripetizioni, per determinare la robustezza della topologia degli alberi, mentre per il metodo ML l'analisi non è stata completata perché il numero di sequenze la rendeva troppo complessa. L'analisi filogenetica è stata condotta su circa 260 posizioni nucleotidiche corrispondenti alla

Tab. 1 - Elenco delle specie di dinoflagellati da GenBank con numeri di accesso (A.N.) incluse nell'analisi filogenetica.
Tab. 1 - List of GenBank dinoflagellate species and their accession numbers (A.N.) included in the phylogenetic analysis.

Specie	GenBank A.N.
<i>Gymnodinium nolleri</i> Ellegaard et Moestrup sp. inedit.	AF200673
<i>Gymnodinium chlorophorum</i> Elbrächter et Schnepf	AF200669
<i>Gymnodinium palustre</i> Schilling	AF260382
<i>Amphidinium</i> sp. Claparède et Lachmann	AY455680
<i>Amphidinium carterae</i> Hulbert	AY455669
<i>Peridinium cinctum</i> (O.F. Müller) Ehrenberg	AF260394
<i>Peridinium bipes</i> Stein	AF260385
<i>Peridinium willei</i> Huitfeldt-Kaas	AF260384
<i>Scrippsiella</i> sp. Balech ex Loeblich III	AF260392
<i>Woloszynskia pseudopalustris</i> (Woloszynska) Kiselev	AF260402
<i>Polarella glacialis</i> Montresor <i>et al.</i>	AY036081
<i>Toxoplasma gondii</i> Nicolle et Manceaux (<i>outgroup</i>)	AF076901

regione di sovrapposizione tra le sequenze della LSU rDNA ottenute dai campioni ambientali (domini 3-7) e quelle da GenBank (domini 1-6).

4. RISULTATI

4.1. Distribuzione dei ribotipi nei campioni ambientali

Nel nostro laboratorio è stato messo a punto un protocollo per il rapido screening della biodiversità dei dinoflagellati, basato sull'analisi di restrizione sul DNA amplificato direttamente dall'acqua di lago. Con questo approccio si è potuto risalire al numero di dinoflagellati maggiormente rappresentati nel lago dal numero di ribotipi individuati (D'Andrea *et al.* in prep). La tecnica è stata testata su campioni della Baia Rossa e ha permesso di rilevare una maggiore ricchezza di dinoflagellati rispetto a quanto ottenuto con osservazioni al microscopio ottico (D'Andrea *et al.* 2005). Sulla base di questi risultati preliminari, tale metodo è stato applicato allo studio della variazione spaziale e temporale della comunità di dinoflagellati di Tovel. Vengono qui presentati i risultati dei campioni raccolti in tre stagioni a cavallo del 2003-2004 (come indicato in Metodi) nel punto A e successivamente confrontati con quelli del punto B già descritti in D'Andrea *et al.*

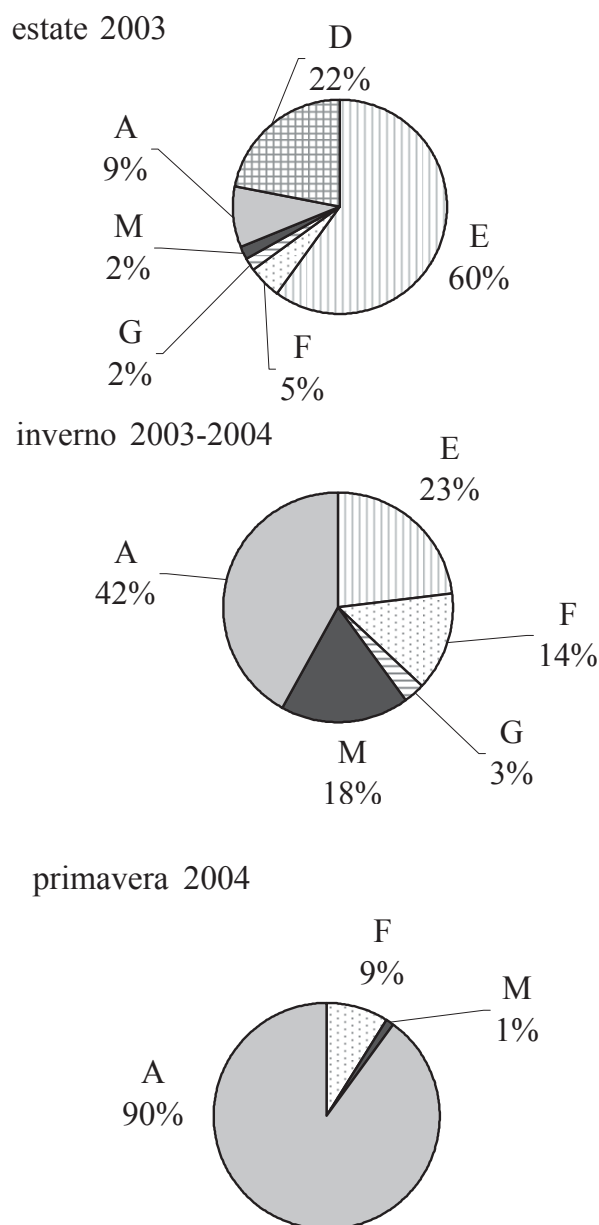


Fig. 2 - Abbondanza relativa dei ribotipi trovati nei campioni ambientali (vedi testo) della stazione A (estate 2003; inverno 2003-04 e primavera 2004).

Fig 2 - Relative abundance of ribotypes found in three environmental samples (see text) analysed from station A (summer 2003, winter 2003-04 and spring 2004).

2005. Nel punto A sono stati individuati sei ribotipi diversi nominati A, D, E, F, G, M. La figura 2 illustra la loro abbondanza, calcolata come percentuale delle colonie di ogni libreria che presentava quel ribotipo. La biodiversità, misurata come numero di ribotipi presenti in ogni campione, risulta maggiore in estate (sei ribotipi), mentre diminuisce passando alla stagione invernale e poi a quella primaverile con cinque e tre ribotipi rispettivamente. La composizione della comu-

nità risulta abbastanza stabile: infatti, i profili A, F e M sono sempre presenti in tutte e tre le stagioni, anche se in percentuale diversa. In generale, non si nota la dominanza di un unico ribotipo: solo in primavera ve n'è uno con abbondanza del 90%. Si può individuare in due delle tre stagioni un ribotipo peculiare che si trova solo in quel campione: D in estate e G in inverno.

Per ognuna delle tre librerie costruite, ciascun clone con un unico profilo è stato sequenziato: si sono così ottenute sequenze di 685 bp per tutti i ribotipi individuati. Le sequenze dei ribotipi sono state confrontate con quelle del database GenBank: data l'alta omologia (90-95%) con sequenze di organismi appartenenti al taxa Dinophyceae, possiamo confermare che si tratta di dinoflagellati; nessuna sequenza è però risultata identica a un'altra già presente in GenBank.

4.2. Sequenze parziali del LSU rDNA da singole cellule e colture *in vitro*

Nel nostro laboratorio è stato messo a punto un protocollo di PCR su singole cellule e cisti isolate da campioni di fitoplancton e da sedimenti (D'Andrea *et al.* in prep). Questa tecnica ha permesso di ottenere delle sequenze di circa 1400 bp della LSU rDNA (domini 1-6) da cellule vegetative delle specie denominate *Glenodinium sanguineum* forma rossa (Gs-red) *sensu* Baldi (Baldi 1941) ora *Tovellia sanguinea* sp. inedit. (Moestrup *et al.* in prep.), *Gymnodinium* cf. *palustre*, *Gymnodinium uberrimum*, Green 4, Green 13 (due dinoflagellati di colore verde isolati da campioni di fitoplancton, che crescono rispettivamente alle temperature di 4 e 13 °C); e da cisti di *Glenodinium sanguineum* forma verde (Gs-green) *sensu* Baldi (Baldi 1941) ora *Baldinia anauniensis* sp. inedit. (Hansen *et al.* in prep.) e di Gs-red. Le sequenze sono state confrontate con quelle ottenute dalle colture *in vitro* presenti nel nostro laboratorio, al fine di confermare l'attendibilità del metodo di PCR da singole cellule. Si sono ottenute sequenze di circa 1400 bp degli organismi denominati Gs-red, *Glenodinium sanguineum sensu* Dodge (Dodge *et al.* 1987) (Gs-DK), Gs-green e *Peridinium aciculiferum* dalle rispettive colture *in vitro*.

Le sequenze di Gs-red da cisti, cellule vegetative e coltura cellulare sono risultate uguali al 100%, confermando l'appartenenza di questi tre morfotipi, alla stessa specie.

4.3. Analisi filogenetica

Per identificare i ribotipi individuati nei campioni ambientali, le loro sequenze sono state confrontate con quelle di dinoflagellati del database GenBank, con quelle delle colture *in vitro* finora disponibili e con quelle ottenute da singole cellule. Le relazioni evolutive tra tutte le sequenze ottenute da Tovel e le

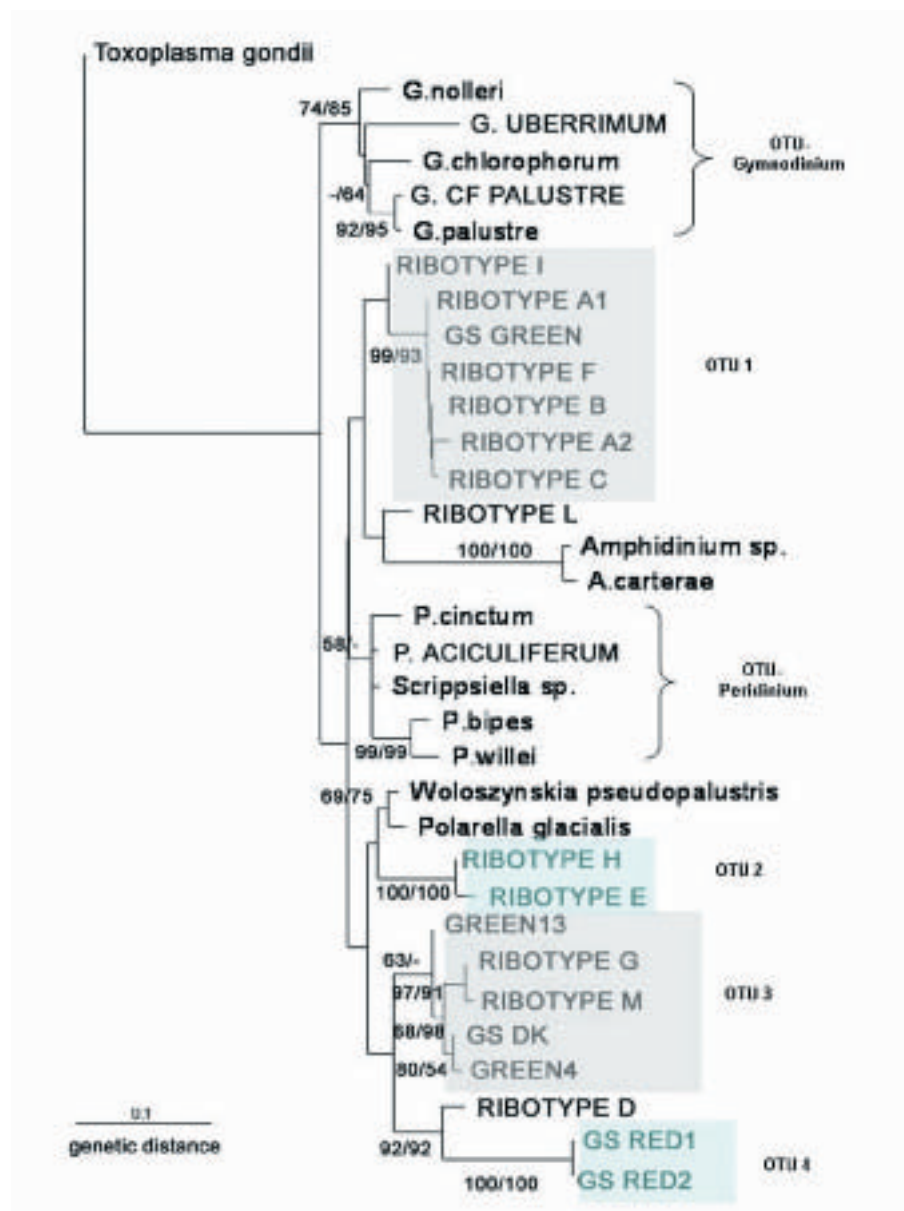


Fig. 3 - Albero filogenetico da analisi *neighbour joining* per le sequenze dei dinoflagellati di Tovel (in maiuscolo) e le sequenze da GenBank (in neretto). I valori di *bootstrap* vengono indicati vicino a ogni ramificazione solo se >50%; il primo numero è da analisi NJ, il secondo è da analisi MP. La linea orizzontale rappresenta una distanza genetica del 10%. I 4 OTU da campioni ambientali vengono indicati a destra.

Fig. 3 - Phylogenetic tree inferred by *neighbour joining* analysis for the sequences of Tovel's dinoflagellates (in capital letters) and GenBank sequences (in bold). Bootstrap values are indicated near each branch but only when higher than 50%; the first number is from NJ analysis, the second is from MP analysis. Scale bar represents a genetic distance of 10%. The 4 OTUs of environmental samples are indicated at the right side.

sequenze scaricate dal database GenBank vengono qui riassunte nell'albero filogenetico in figura 3. Si è scelto di presentare l'albero ottenuto con il metodo NJ, perché la sua topologia risulta pressoché identica a quella dell'albero ottenuto con il metodo MP. Tra l'albero presentato e quello della massima parsimonia ci sono solo due differenze: la prima consiste nel fatto che il ribotipo L viene separato dalle due sequenze

di *Amphidinium* e risulta essersi evoluto prima delle sequenze di questo gruppo, mentre la seconda differenza si trova all'interno della OTU3 (*operational taxonomic unit*) dove le sequenze di Green13, Green 4 e Gs-DK vengono raggruppate insieme e distinte dalle sequenze dei ribotipi M e G. Tuttavia, queste differenze non sono rilevanti nel complesso, perché non influenzano la topologia dell'albero.

L'albero presentato è simile, pur con alcune sostanziali differenze, a quello ottenuto con il metodo ML, che però non viene qui presentato poiché non è stata effettuata l'analisi di bootstrap.

Nell'albero in figura 3 si distinguono sei gruppi all'interno dei quali la distanza genetica tra le sequenze è minore del 6%: tali raggruppamenti sono nettamente separati l'uno dall'altro e sono supportati da un alto valore di bootstrap: essi vengono indicati come OTU. La OTU1 raggruppa le sequenze dei ribotipi A, F, B, C, I e di *Gs-green* (A1 e A2 sono le sequenze di due cloni con ribotipo A). Nella OTU2 abbiamo le sequenze dei ribotipi E e H. La OTU3 comprende i ribotipi G e M, la coltura *Gs-DK* e i due dinoflagellati da singole cellule Green 13 e 4. All'interno della OTU4, invece, troviamo le sequenze di *Gs-red* da coltura e da singole cellule: esse risultano simili al ribotipo D, ma la loro distanza genetica è di 10%, quindi non possono essere considerate della stessa OTU. Abbiamo poi la OTU che raggruppa le sequenze dei due dinoflagellati da Tovel classificati come *G. cf. palustre* e *G. uberrimum* insieme alle sequenze di alcune specie di *Gymnodinium* scaricate da GenBank. Infine, tutte le sequenze di *Peridinium* scaricate dal database sono raggruppate insieme alla sequenza di *Scrippsiella* sp. e quella del nostro dinoflagellato classificato come *P. aciculiferum*, individuando l'ultima OTU. L'unico ribotipo che non siamo riusciti a raggruppare è L, che risulta abbastanza vicino alle due specie di *Amphidinium* da GenBank, ma la cui distanza genetica è maggiore della soglia del 6% da noi individuata per l'appartenenza alla stessa OTU.

Il confronto tra tutte le sequenze ha permesso di identificare il ribotipo A, che risulta identico alla sequenza della coltura *Gs-green*. Per quanto riguarda le specie in coltura, siamo riusciti a identificare l'organismo da noi denominato *P. aciculiferum*, che ha una sequenza uguale al 99% rispetto a *Scrippsiella* sp. La sequenza di *G. cf. palustre* risulta invece simile a *G. palustre*, avendo una similarità genetica del 94% calcolata con i parametri di distanza.

La sequenza di Green 4 ha un'omologia del 98% circa rispetto a *Gs-DK*, confermando la similarità rilevata al microscopio tra questi due organismi. Invece Green 13 è risultato molto diverso da *Gs-green* (77% di similarità genetica), a cui sembrava simile morfologicamente.

5. DISCUSSIONE

I risultati dell'analisi di restrizione sui campioni ambientali del punto A confermano l'andamento stagionale della comunità dei dinoflagellati del punto B, descritta in D'Andrea *et al.* 2005. L'estate è il periodo con maggior ricchezza di specie, ma la biodiversità decresce sempre più andando verso l'inverno e la pri-

mavera a causa della bassa temperatura dell'acqua che provoca l'incistamento delle specie estive e la crescita delle poche specie invernali. Nel punto A non è però così evidente la dominanza di un ribotipo come invece riscontrato nel punto B dove in ogni stagione esiste un ribotipo con circa l'80% di abbondanza. Inoltre, nel centro lago (A) la composizione della comunità rimane più stabile rispetto a quanto avviene nella Baia Rossa (B) dove i dinoflagellati variano molto sia come abbondanza che come composizione: infatti si passa da nove ribotipi in estate a tre in primavera. Esistono poi dei ribotipi specifici di un solo punto come M, che è stato trovato solo nel bacino principale, e i ribotipi B, C, H, I, L, presenti solo nella Baia Rossa (punto B). Le differenze nella biodiversità e nella composizione della comunità tra i due punti analizzati confermano le osservazioni al microscopio ottico e dimostrano la diversità tra i due bacini, che ormai si considerano come due laghi separati: probabilmente in A la comunità è più stabile, perché questo punto risente in maniera minore delle fluttuazioni idrologiche che invece sono più rilevanti in B (Flaim *et al.* 2006).

Il sequenziamento dei ribotipi individuati ha permesso di costruire un albero filogenetico in cui le sequenze dei ribotipi ambientali sono raggruppate in gruppi di similarità che possono essere interpretate come il genere o la specie a cui corrisponde il ribotipo (D'Andrea *et al.* in prep.). Il confronto tra le sequenze ha permesso di identificare il ribotipo A, che è quello più frequente nel punto A e dominante in estate nel punto B: corrisponde anche alla coltura *Gs-green*. Le sequenze di due cloni con ribotipi A sono risultate diverse al 2%: quindi all'interno di questo ribotipo potrebbero essere presenti diverse specie. Questo dato suggerisce che la ricchezza di dinoflagellati sarebbe ancora maggiore, ma ulteriori studi sono necessari per comprendere a fondo la biodiversità di questa comunità.

L'analisi filogenetica ha anche permesso di confermare la distinzione tra le tre specie che in passato venivano classificate confusamente come *G. sanguineum* e che in questo lavoro sono state denominate *Gs-red*, *Gs-green* e *Gs-DK*. Le loro sequenze sono nettamente diverse e, vista l'elevata distanza genetica, possiamo ipotizzarne l'appartenenza a tre generi separati, confermando la re-interpretazione del fenomeno di arrossamento, come descritto in Flaim *et al.* 2004.

In alcuni casi la classificazione risultante dalla nostra analisi genetica non combaciava con quanto osservato al microscopio ottico: per esempio, la coltura denominata *P. aciculiferum* è risultata quasi identica alla specie *Scrippsiella*, che rientra però in un genere diverso. Ulteriori studi a livello ultrastrutturale sono necessari per confermare l'eventuale appartenenza dell'organismo a quel genere. Invece, per la coltura *G. cf. palustre* la classificazione al microscopio è stata confermata dall'analisi genetica: infatti la sua sequen-

za è molto simile a quella di *G. palustre* presente in GenBank.

Gli altri dinoflagellati di Tovel non hanno evidenziato grosse similarità con le altre sequenze di GenBank, probabilmente perché alcune specie sono peculiari di questo lago e appartengono quindi a generi nuovi come è stato dimostrato per il dinoflagellato responsabile dell'arrossamento (Moestrup *et al.* 2006).

6. CONCLUSIONI

La messa a punto di un protocollo di rapido screening della comunità di dinoflagellati dai campioni ambientali è risultata importante per comprendere la ricchezza di specie presenti a Tovel e per valutare in modo più fine la loro variazione stagionale. Per riuscire a identificare tutti i dinoflagellati presenti, si è rivelata fondamentale la combinazione di questo approccio con la PCR da singole cellule e le colture *in vitro*. Infatti, il confronto delle sequenze dei ribotipi con le altre sequenze da Tovel ci ha permesso di identificarne alcuni, mentre il confronto con sequenze di dinoflagellati del database GenBank ha permesso di individuarne le relazioni evolutive e tentare di classificare anche gli organismi incerti.

In conclusione, il progetto SALTO ha dato l'opportunità di introdurre metodiche innovative di genetica nell'ambito del settore limnologico, portando allo sviluppo di un protocollo per l'identificazione della comunità di dinoflagellati, che potrà essere applicato ad altri laghi del Trentino allo scopo di studiarne la biodiversità.

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 V. Pinamonti e G. Leonardi per i campionamenti, M. Komjanc per la parte di RFLP e la costruzione delle librerie, A. Gandolfi per l'aiuto nell'analisi filogenetica e Niels Daugbjerg per il supporto scientifico.

BIBLIOGRAFIA

Baldi E., 1941 - Ricerche idrobiologiche sul lago di Tovel. *Mem. Museo St. Nat. Venezia Trid.*, 6: 1-297.
 Corradini F., Flaim G. & Pinamonti V., 2001 - Five years of limnological observations on Lake Tovel (1995-1999): some considerations and comparison with past data. *Atti AIOL*, 14: 209-218.
 Daugbjerg N., Hansen G., Larsen J. & Moestrup Ø., 2000 - Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates

based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia*, 39: 302-317.
 D'Andrea M., Daugbjerg N. & Flaim G., 2005 - Investigation of the dinoflagellate community of Lake Tovel by genetic analysis of environmental samples. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 29: 478-481.
 De Bruin A., Ibelings B.W. & Van Donk E., 2003 - Molecular techniques in phytoplankton research: from allozyme electrophoresis to genomics. *Hydrobiologia*, 491: 47-63.
 Dodge J., Mariani P., Paganelli P. & Trevisan R., 1987 - Fine structure of the red-bloom dinoflagellate *Glenodinium sanguineum*, from Lake Tovel (N. Italy). *Arch. Hydrobiol.*, 78, Suppl.: 125-138.
 Doyle J.J. & Doyle J.L., 1987 - A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19: 11-15.
 Edvardsen B., Shalchian-Tabrizi K., Jacobsen K.S., Medlin L.K., Dahl E., Brubak S. & Paasche E., 2003 - Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *J. Phycol.*, 39: 395-408.
 Flaim G., Hansen G., Moestrup Ø., Corradini F. & Borghi B., 2004 - Reinterpretation of the dinoflagellate '*Glenodinium sanguineum*' in the reddening of Lake Tovel, Italian Alps. *Phycologia*, 43 (6): 737-743.
 Flaim G., Corradini F., Borsato A., Ferretti P., Eccel E., Obertegger U. & Borghi B. (2006) - The importance of hydraulic conditions in determining ecological equilibrium in an alpine lake: Lake Tovel (Trentino-Italy). *Verh. Int. Ver. Limnol.*, (in stampa).
 Hansen G. & Daugbjerg N., 2004 - Ultrastructure of *G. spirale*, the type species of *Gyrodinium* (Dinophyceae), including a phylogeny of *G. dominans*, *G. rubrum* and *G. spirale* based on partial LSU rDNA sequences. *Protist*, 155: 271-294.
 Hansen G., Daugbjerg N. & Henriksen P., 2000 - Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum*, comb. nov. (= *Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition and molecular data. *J. Phycol.*, 36: 394-410.
 Lenaers G., Maroteaux L., Michot B. & Herzog M., 1989 - Dinoflagellates in evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. *J. Mol. Evol.*, 29: 40-51.
 Litaker R.W., Vandersea M., Kibler S., Madden V., Noga E. & Tester P., 2002 - Life cycle of the heterotrophic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, 38: 442-463.
 Marchesoni V., 1941 - Sulla posizione sistematica del *Glenodinium* determinante l'arrossamento del Lago di Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat.*, 22: 1-8.
 Moestrup Ø., Hansen G., Daugbjerg N., Flaim G. & D'Andrea M., (2006) - On *Tovellia sanguinea* sp. nov., the dinoflagellate species responsible for reddening of Lago di Tovel, N. Italy. *Eur. J. Phycol.*, (in press).

- Paganelli A., 1992 - Lake Tovel (Trentino): limnological and hydrobiological aspects. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 50: 225-257.
- Popovský J. & Pfiester L.A., 1990 - Dinophyceae (Dinoflagellida). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 272.
- Posada D. & Crandall K.A., 1998 - MODEL TEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Romari K. & Vault D., 2004 - Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnol. Oceanogr.*, 49: 784-798.
- Sambrook J.P. Mac Callum & Russell D., 2000 - *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2nd edition, Michagan.
- Swofford D.L., 2003 - *PAUP**. *Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland (MA).
- Takano Y. & Horiguchi T., 2004 - Surface ultrastructure and molecular phylogenetics of four unarmoured heterotrophic dinoflagellates, including the type species of the genus *Gyrodinium*. *Phycol. Res.*, 52: 107-116.