

ECOLOGIA E MICROEVOLUZIONE DELLA FAUNA CAVERNICOLA NEI RAMI SOLFUREI DELLE GROTTA DI FRASASSI

(Studio genetico)

Responsabile Scientifico:

Dr. Gabriele Gentile,
Dip. Biologia Università di Roma Tor Vergata
Via della Ricerca Scientifica, snc.
00133 Roma, Italia
email: gabriele.gentile@uniroma2.it
tel: +39 06 72 59 59 77
fax: +39 06 72 59 59 65



FASE 1 (MICROEVOLUZIONE 1)

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Stato delle conoscenze	1
2. OBIETTIVI	6
3. ATTIVITA' SVOLTE	6
3.1 Campionamento: siti e tecniche	7
3.2 Attività di laboratorio	8
3.2.1 Estrazione del DNA	8
3.2.2 Preparazione di librerie genomiche	10
3.2.3 Isolamento di cloni con microsatellite	11
3.2.4 Disegno di primer	
3.2.5 Messa a punto di protocolli di amplificazione	21
3.2.6 Identificazione del polimorfismo	23
4. CONCLUSIONE	24

FASE 2 (MICROEVOLUZIONE 2)

1. OBIETTIVI	26
2. MATERIALI E METODI	27
2.1 Campionamento: siti e tecniche	27
2.2 Analisi genetiche	28
2.2.1 Isolamento e valutazione del polimorfismo di loci DNA microsatellite	28
2.2.2 Estrazione del DNA	29
2.3 Analisi dei dati	31
3. RISULTATI	33
4. DISCUSSIONE	36
5. CONCLUSIONI E RACCOMANDAZIONI	37
BIBLIOGRAFIA	39

PREMESSA

La presente relazione fa riferimento alle attività svolte nell'arco di due fasi del progetto, denominate Fase 1 (MICROEVOLUZIONE 1) e Fase 2 (MICROEVOLUZIONE 2). La prima fase ha avuto inizio nel 2008, anno di inizio del progetto, fino al Marzo 2012. La seconda fase ha avuto inizio nel 2013, a seguito della riformulazione degli obiettivi del progetto, resasi necessaria dopo la conclusione della Fase 1. La Fase 2 si è conclusa nel Luglio 2015. Nella Fase 1, l'attività si è concentrata sul solo anfipode *Niphargus*, visto che, per i motivi descritti nella relazione del Dr. Ciofi (Allegato 1), non è stato possibile proseguire lo studio sull'isopode *Androniscus*.

FASE 1 (MICROEVOLUZIONE 1)

Marco Ciambotta, Ilaria Ileanza e Gabriele Gentile

1. INTRODUZIONE

1.1 Stato delle conoscenze

A causa della loro struttura trofica e cicli di energia, gli habitat sotterranei quali le grotte sono di solito considerati ambienti molto semplici, che per lo più dipendono da *input* di energia dalla superficie. La predazione e la trasformazione di detriti organici rappresentano le principali vie attraverso le quali viene trasferita energia tra cavernicoli. Un'eccezione a questo paradigma è rappresentata da quelle grotte dove, a causa della presenza di particolari condizioni ambientali, possono svilupparsi comunità batteriche chemoautotrofiche, in grado di produrre materia organica attraverso processi chimico-sintetici. Nell'ultimo decennio, un certo numero di comunità, sostenute a vari livelli da una base energetica chemoautotrofica, sono state descritte. Comunità chemoautotrofiche sono state trovate in mare, acqua dolce, e, più di recente, in ambienti cavernicoli (Conway et al., 1994; Stevens e McKinley 1995; Sarbu et al., 1996). Per la prima volta, gli studi effettuati sul sistema rumeno della Grotta Mobile ha mostrato che, in particolari condizioni, i batteri chemoautotrofici possono produrre una grande quantità di materia organica, sufficiente a sostenere una comunità grotta tassonomicamente differenziata, e ben strutturata a livello trofico. In effetti, la Grotta Mobile può essere considerata un sistema quasi isolato, con *input* di energia dalla superficie trascurabili, se paragonati alla quantità di sostanza organica prodotta *in situ* (Sarbu et al., 1996). Così, sebbene lo studio del sistema sotterraneo della Grotta Mobile abbia risposto alla domanda se i processi di chemoautotrofici siano in grado di soddisfare il fabbisogno energetico di una intera comunità di grotta, esso ha anche sollevato nuove questioni riguardanti la stabilità degli ambienti, come la Grotta Mobile. In particolare, ci siamo chiesti se una comunità di grotta potrebbe sviluppare e mantenere un elevato grado di differenziazione quando la condizione di isolamento geografico non sia soddisfatta. La seconda questione nasce dal rapporto, ben noto a biospeleologi, tra il modello di distribuzione del cibo e della dispersione degli organismi cavernicoli che se ne alimentano. Infatti, spesso gli organismi di grotta presentano modelli di dispersione che si sovrappongono a quelli delle fonti di cibo. Sulla base di questa osservazione, ci siamo chiesti se e in

quale misura, l'abbondanza e la distribuzione di cibo può influenzare la struttura genetica di organismi cavernicoli e la loro dispersione. La Grotta del Fiume, situata nel Centro Italia (Fig. 1), si è rivelata un caso di studio molto adatto per affrontare tali questioni. La Grotta del Fiume, naturalmente accessibile all'uomo, è parte di un sistema sotterraneo più vasto e complesso (Grotta del Fiume-Grotta del Vento), che è collegata con la superficie in molti siti. Un *continuum* in habitat fa sì che la dispersione dei cavernicoli possa potenzialmente avvenire attraverso tutti gli ambienti della grotta. Questa grotta è abitata da un alto numero di specie che hanno accesso alle abbondanti risorse trofiche. Detrito organico o guano di pipistrello è disponibile in modo circoscritto, in diverse zone della grotta. Un importante fonte di cibo, disponibile solo in alcune aree della grotta è rappresentata da batteri chemoautotrofici. Questi batteri sono presenti nella sezione profonda della grotta dove, dopo una indagine preliminare di campionamento, abbiamo trovato anche 15 specie di invertebrati, sette delle quali sono endemiche al sistema carsico in cui la Grotta del Fiume si sviluppa. Cinque di queste specie sono risultate nuove per la scienza (Sarbu et al., 2000). Inoltre, l'analisi del rapporto degli isotopi stabili del carbonio e dell'azoto (Stable Isotope Ratio Analysis, SIRA), che si è già dimostrata molto efficace nello studio della struttura della rete alimentare nelle comunità grotta (Pohlman et al 1987; Sarbu et al 1996; Southward et al 1996), ha mostrato che le comunità di invertebrati di Grotta del Fiume si basano su diverse fonti di cibo autoctono (Sarbu et al., 2000).

Tra le varie specie che abitano la Grotta del Fiume vi è l'isopode terrestre *Androniscus dentiger*, che è la specie più abbondante in tutti i diversi habitat terrestri di questa grotta. La presenza di *A. dentiger* è molto importante perché le dinamiche evolutive ed il flusso genico che riguardano popolazioni di questa specie sono stati studiati su un'ampia scala geografica (Gentile e Sbordonì, 1998; Gentile, 1998; Gentile e Allegrucci, 1999), che include anche l'area in cui la Grotta del Fiume si trova. Pertanto, i dati sulla genetica di popolazione di *A. dentiger* costituiscono un valido contesto per uno studio su scala micro-geografico, mirato al problema che riguarda l'influenza della distribuzione delle risorse alimentari sulla struttura genetica degli organismi che abitano questa grotta.

I risultati di uno studio preliminare basato su allozimi (Gentile e Sarbu, 2005), sulla struttura genetica di *A. dentiger* di questa grotta, mostrano un notevole grado di struttura genetica e suggeriscono un possibile ruolo della distribuzione spaziale del cibo come uno dei fattori determinanti.

Questi risultati aprono la strada a nuove ipotesi. Per esempio, il quadro che sembra delinearsi attraverso lo studio allozimico meriterebbe un ulteriore approfondimento, sia attraverso l'uso di tecniche e marcatori molecolari più raffinati, sia aumentando, se possibile, il numero di aree

investigate. Inoltre, è lecito chiedersi se organismi acquatici, che si rinvencono in acque affioranti in diversi punti della grotta, ricche di batteri chemoautotrofici e messe potenzialmente in comunicazione tra loro attraverso la falda acquifera, possano presentare pattern microevolutivi simili.

Per questo, lo scopo del presente progetto in questa fase è stato quello di continuare lo studio dei fattori che regolano la microevoluzione degli organismi di questa grotta, utilizzando in particolare due specie guida di crostacei: l'isopode terrestre *A. dentiger* e l'anfipode *Niphargus ictus*. Esse infatti sono in parte rappresentative di due modelli ecologici diversi: terrestre ed acquatico. Inoltre sono anche le specie più diffuse e più abbondanti nella grotta. Lo studio prevedeva originariamente la realizzazione di una "libreria" genomica, per l'individuazione di loci microsatellite, marcatori genetici ad alto tasso di evoluzione molecolare, che permettono l'analisi della variazione genetica a livello del DNA. Una volta individuati i loci genici di interesse, lo studio prevedeva la genotipizzazione di alcune popolazioni di *A. dentiger* e *N. ictus*, con il fine di valutarne e compararne il grado di struttura genetica ed il livello di flusso genico.

2. OBIETTIVI

Obiettivi originali di questo studio genetico erano:

- 1) La caratterizzazione genetica, a mezzo di marcatori del DNA microsatellite appositamente individuati, di alcune popolazioni naturali di crostacei isopodi (*A. dentiger*) e anfipodi (*N. ictus*), provenienti dal sistema carsico sotterraneo Grotta del Fiume - Grotta del Vento.
- 2) La valutazione del grado di variabilità genetica delle popolazioni studiate, ed il livello di flusso genico intercorrente tra loro.

3. ATTIVITA' SVOLTE

Oltre allo scrivente, l'Unità Operativa in questa Fase 1 era formata da:

- Marco Ciambotta e Ilaria Leanza, che hanno realizzato parte delle analisi di laboratorio.
- Sandro Galdenzi, che ha selezionato i siti di studio e partecipato al prelievo dei campioni;
- Fabio Baldoni, che ha partecipato al prelievo dei campioni
- Il Gruppo Grotte Recanati, che ha contribuito con assistenza sul campo e alla raccolta dei campioni.

3.1 campionamenti: siti e tecniche

I siti di campionamento sono stati prescelti sulla base di sopralluoghi diretti e sui risultati di precedenti esperienze e conoscenze relative alle grotte dell'area di Frasassi. Si è anche tentato di estendere il campionamento a siti, prossimi geograficamente, ma non direttamente collegati (almeno apparentemente) tra loro. Complessivamente sono state visitati 17 siti, come illustrato in Figura 1. In alcuni di questi, la densità di *Androniscus* e *Niphargus* si è rivelata talmente bassa da non consentire la collezione di un campione statisticamente sufficientemente grande. La lista delle località ove sono stati effettuati i campionamenti è mostrata in Tabella 1.

Le campionature di *Androniscus* sono state effettuate utilizzando la tecnica della caccia libera, senza uso di trappole. La cattura diretta è avvenuta a mezzo di aspiratore o pennellino. Gli animali sono stati catturati vivi e tali mantenuti in scatole di gesso umido.

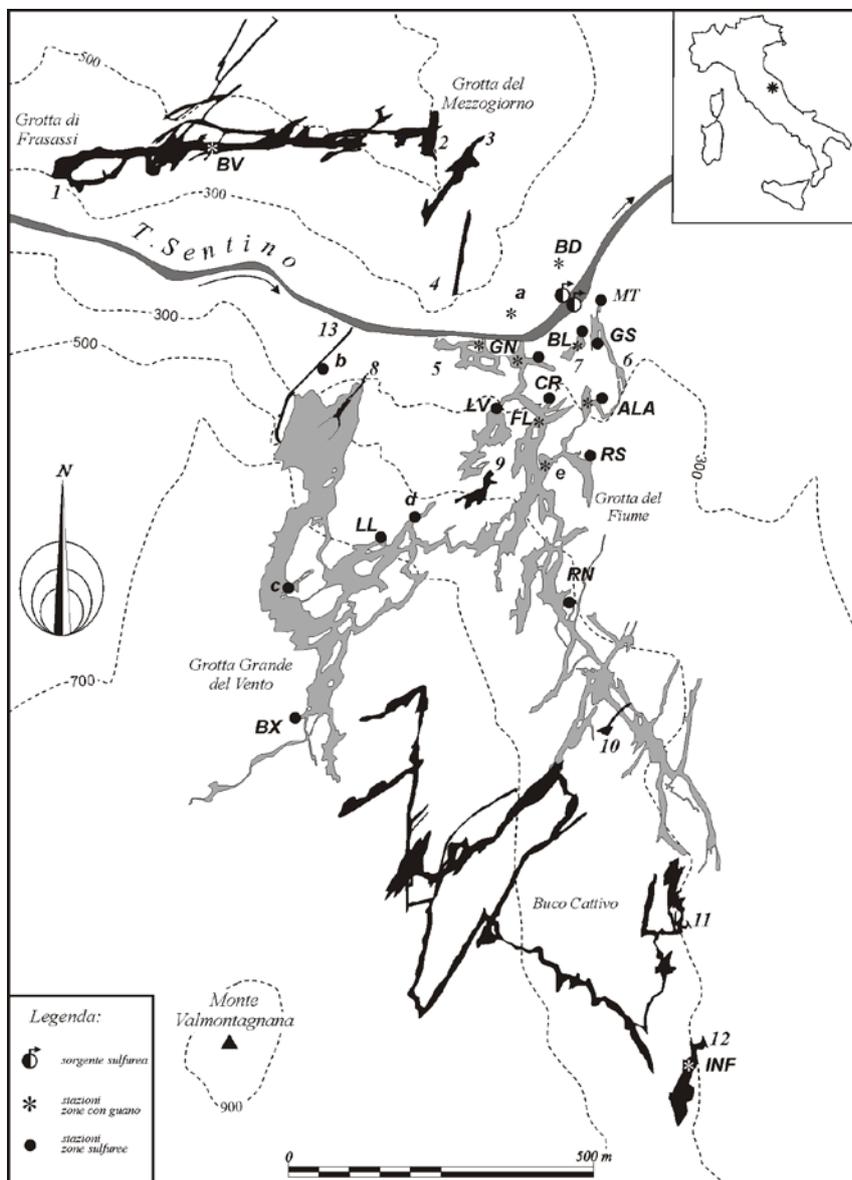


Figura 1. Siti esplorati.

Grotta Sulfurea: laghi sala centrale, GS; lago esterno, MT.

Grotta Bella: laghetto, BL.

Grotta del Fiume: lago del rinoceronte, RN; ramo sulfureo, RS; pozzo dei cristalli, CR; lago verde, LV; ramo dell'ala, ALA; sala della felicità, FL; sala della croce e cumulo guano vecchio ingresso, GN; laghi di Lucia, LL.

Grotta Grande del Vento: sala Claudia, BX.

Bugianardo: BD.

Grotta di Frasassi: BV.

Grotta dell'infinito: INF.

Non rappresentati in figura:

Antro dei baffoni e *Grotta del Vernino*.

Tabella 1. Siti da cui sono stati ottenuti campioni di *Androniscus* e *Niphargus*

Grotte e siti campionati	Specie	
	<i>Niphargus</i>	<i>Androniscus</i>
<i>Grotta Sulfurea:</i>		
laghi sala centrale, GS	x	x
lago esterno, MT	x	
<i>Grotta Bella:</i>		
laghetto, BL	x	x
<i>Grotta del Fiume:</i>		
lago del rinoceronte, RN	x	
ramo sulfureo, RS	x	
pozzo dei cristalli, CR	x	x
lago verde, LV	x	x
sala della croce e cumulo guano vecchio ingresso, GN		x
<i>Grotta Grande del Vento:</i>		
sala Claudia, BX	x	

I campioni di *Niphargus* sono stati invece ottenuti attraverso pescate con retini a maglia stretta e mantenuti vivi in contenitori di plastica con acqua della grotta di provenienza. Dopo il trasporto in laboratorio, avvenuto in contenitori a temperatura controllata, i singoli individui sono stati lavati in acqua distillata e successivamente fissati in etanolo 95%. Ogni singolo individuo è stato poi preservato in singoli tubi con etanolo posti in congelatore a -35°C , fino al momento dell'estrazione del DNA.

3.2 Attività di laboratorio

3.2.1 Estrazione del DNA

Il DNA è stato ottenuto da 30 individui per popolazione, con l'eccezione di quelle ove il numero di individui campionati fosse minore. Il primo passaggio che deve essere effettuato per l'analisi del DNA è costituito dal processo di estrazione, che consente di isolare e purificare gli acidi nucleici da proteine, lipidi, polisaccaridi, e da altre componenti cellulari, che impedirebbero successive analisi. La realizzazione dell'estrazione non prevede l'applicazione di un'unica metodica, ma le tecniche possono essere diverse e possono sfruttare reagenti e protocolli differenti, in modo tale da avere la massima resa per ciascun tipo di campione. Nel nostro caso, la resa e la qualità del DNA dipendeva molto dal sito di campionamento, pertanto l'estrazione del DNA dai campioni dei crostacei utilizzati in questo studio è stata effettuata seguendo più di un protocollo. Ogni individuo è stato

dissezionato, separando la testa dal corpo. Ogni singola estrazione è stata effettuata dalla testa dell'animale. I protocolli utilizzati sono i seguenti:

1) Estrazione con CTAB:

La testa di ogni individuo è stata posta su carta bibula, per eliminare l'eccesso di etanolo e successivamente posta in una provetta eppendorf da 1,5 ml. Poi sono stati aggiunti 300 microlitri di CTAB e 0,2% di betamercaptoetanololo. La testa è stata omogeneizzata in questa soluzione con un micro-pestello. Il tutto è stato incubato per 30' a 60°C. Il CTAB è un tampone il cui componente principale è il 2% Hexadeciltrimetilammonio, la sua funzione è quella di promuovere la lisi cellulare. Per separare il DNA dagli altri componenti cellulari, dopo l'incubazione sono state fatte due estrazioni con 300 microlitri di cloroformio. Dopo centrifugazione a 4°C per 5', il DNA è stato precipitato con etanolo al 70% e 25 microlitri di Acetato di sodio. Il tutto è stato mescolato per inversione e centrifugato a 15000 g per 10' a 4°C. Il DNA è stato poi lavato due volte con etanolo al 80% e successivamente risospeso in tampone 50 microlitri di TE (Tris/Edta). Le aliquote così ottenute sono state conservate a -40°C fino al momento dell'amplificazione.

2) Kit di purificazione per DNA genomico (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Minipreparation Kit) della Sigma-Aldrich.

La procedura eseguita è stata la seguente:

- per ciascun campione è stata preparata una provetta Eppendorf, e al suo interno sono stati trasferiti 50 µl di sangue. A questo sono stati aggiunti 150 µl di Resuspension Solution, 200 µl di Lysis Solution C e 20 µl di proteinasi-K, che determinano la rottura delle membrane, con conseguente liberazione in soluzione delle componenti cellulari e denaturazione delle proteine, in particolar modo delle DNA-asi, importanti enzimi responsabili della degradazione del DNA.
- le provette sono state immerse e lasciate overnight in un bagnetto a 55°C: questa, infatti, costituisce la temperatura ottimale per l'azione della proteinasi-k.

Nelle provette in cui, dopo questa procedura, il sangue rimaneva ancora indigerito, sono stati aggiunti ulteriori 70 µl di Lysis Solution C e 10 µl di proteinasi-K, e sono state poste nuovamente nel bagnetto fino a completa digestione.

- in ogni provetta contenente il lisato sono stati aggiunti 200 µl di etanolo 100%.

Per rendere più omogenea la soluzione, il contenuto è stato mescolato usando il vortex.

- all'interno di apposite colonnine fornite dal kit e contenenti un filtro siliceo che lega il DNA, sono stati immessi 500 µl di Column Preparation Solution, una soluzione che massimizza il legame del DNA alla membrana silicea.

Le colonnine sono state poi centrifugate a 12000 giri per 1 minuto, e successivamente svuotate.

- il lisato è stato trasferito nelle colonnine e centrifugato per 1 minuto a 6500 giri.
- i filtri, ai quali a questo punto è legato il DNA, vengono trasferiti in nuove colonnine e sottoposti ad un primo lavaggio con 500 µl di Wash Solution. Si centrifugano poi a 6500 giri per 1 minuto. I filtri vengono ora spostati nuovamente in altre colonnine e si effettua un secondo lavaggio utilizzando la stessa quantità di Wash Solution, ma centrifugando alla velocità massima (16000 giri) per 3 minuti.
- affinché l'etanolo sia eliminato completamente e possa quindi avvenire l'eluizione del DNA, si effettua un'ulteriore centrifuga a 16000 giri per 1 minuto. I filtri vengono ora posti in nuove colonnine.
- si aggiungono a questo punto 200 µl di Elution Solution (una soluzione a bassa concentrazione salina che determina il distacco del DNA dalla membrana silicea e quindi la sua precipitazione sul fondo della provetta), facendo particolare attenzione nel porla direttamente al centro della colonnina. Dopo aver lasciato le provette a temperatura ambiente per circa 10 minuti, in modo tale da aumentare l'efficienza dell'eluizione, si centrifuga per 1 minuto a 6500 giri. Per ottenere una quantità di DNA ottimale, il processo di eluizione è stato ripetuto per altre 2 volte.

Il DNA totale estratto attraverso questo protocollo, è pronto ora per l'amplificazione.

E' stato conservato ad una temperatura di -20°C, che garantisce la conservazione per un lungo periodo di tempo.

3) Kit di purificazione per DNA genomico (Qiagen DNA Stool mini-Kit) della Qiagen.

La procedura di questo protocollo è simile alla precedente e viene pertanto omessa per brevità. La principale differenza è nel fatto che questa procedura prevede anche l'uso di un buffer il cui scopo è quello di eliminare inibitori della reazione di amplificazione, presenti nel tessuto, a causa di un alto titolo batterico, come in questo caso.

3.2.2. Preparazione librerie genomiche

Vedi punto seguente.

3.2.3. Isolamento di cloni con microsatellite

Per la preparazione delle librerie genomiche (punto 2.2.2) e successivo isolamento di cloni con DNA microsatellite (punto 2.2.3) per *Androniscus* e *Niphargus*, ci siamo avvalsi della collaborazione, nella forma di servizio esterno a pagamento, del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica “Leo Pardi” dell’Università di Firenze per il quale il responsabile dell’attività svolta è il Dr. Claudio Ciofi. A questo riguardo, l’attività svolta dal gruppo diretto dal Dr. Ciofi è descritta nelle relazioni aggiunte come Allegati 1 (*Androniscus*) e 2 (*Niphargus*). Come già detto nella PREMESSA di questa relazione, nella Fase 1, nel periodo tra Marzo 2011 e Marzo 2012, l’attività si è concentrata sul solo anfipode *Niphargus*, visto che, per i motivi descritti nella relazione del Dr. Ciofi (Allegato 1), non è stato possibile proseguire lo studio sull’isopode *Androniscus*.

3.2.4. Disegno di primer

Allo scopo di disegnare dei primer adatti per l’amplificazione del tratto nucleare contenente il DNA micro satellite via *Polymerase Chain Reaction* (PCR), è stata fatta una analisi della sequenza dei 31 cloni forniti dall’università di Firenze (vedi Allegato 2). Lo scopo di questa analisi era mirata ad identificare regioni prossime al tratto microsatellite, che presentassero le migliori caratteristiche per il disegno di coppie di primer ad alta efficienza. In generale, tra queste caratteristiche vi sono la i) prossimità del primer alla regione microsatellite, al fine di non amplificare tratti non microsatellite che, se variabili, potrebbero generare confusione ed errore nella corretta determinazione della variante allelica (vedi successivamente), la ii) ricchezza in percentuale di citosina (C) e guanina (G), che in percentuale non devono essere in tutto inferiori al 50%; la iii) temperatura di annidamento (annealing), funzione della lunghezza del primer e della sua composizione in C e G; la iv) probabilità di effettuare autoannealing, che determina amplificati spuri noti come “primer dimer”; la iv) probabilità di osservare una conformazione sterica (spaziale) del primer (nota come hairpin), in grado di abbassare o annullare la sua efficienza.

A seguito di questa analisi, i cloni Niph066, Niph140 e Niph215 sono stati scartati in quanto per nessuno dei tre è stato possibile disegnare dei primer, sulla base dei requisiti sopra elencati. L’analisi è stata condotta attraverso il software Geneious ver. 4.8.5 (Biomatters, Ltd.) che implementa il programma Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000).

Sulla base di quanto sovraesposto, sono state disegnate 28 coppie di primer. Per alcuni loci non è stato disegnare primer che contenessero una percentuale di C-G superiore al 50%. Questa difficoltà è stata superata allungando la sequenza del primer, in modo di ottenere una temperatura di annealing sufficientemente alta. La lista e le caratteristiche dei primer disegnati è riportata qui di seguito:

FORWARD

Name: N371F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 318 -> 341
%GC: 50.0
Tm: 54.79
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 145.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 0.41
Sequence: AGGAACTACAGGTACAGGAGTGAG

Name: N329F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 19
Interval: 90 -> 108
%GC: 57.9
Tm: 55.66
Hairpin: 8.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 99.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.46
Sequence: TCAGCAGCGGTGCTCGATA

Name: N312F
Type: primer_bind (Created by primer3)
Length: 18
Interval: 187 -> 204
%GC: 66.67
Tm: 56.15
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 76.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 0.0
Pair Tm Diff: 0.35
Sequence: ACCACTGCGTGGGTCCAG

REVERSE

Name: N371R
Type: primer_bind_reverse (Created by primer3)
Length: 24
Interval: 462 -> 439
%GC: 41.67
Tm: 55.2
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 145.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 0.41
Sequence: ATCACATAGCGCATTTTGCATCAC

Name: N329R
Type: primer_bind_reverse (Created by primer3)
Length: 21
Interval: 188 -> 168
%GC: 57.14
Tm: 56.4
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 3.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 100.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 0.21
Sequence: GCCGTGGTTGTGCAGACATAC

Name: N312R
Type: primer_bind_reverse (Created by primer3)
Length: 23
Interval: 262 -> 240
%GC: 52.17
Tm: 55.8
Hairpin: 3.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 76.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 0.0
Pair Tm Diff: 0.35
Sequence: GGCGAGAGTAGCAGCATTTGTAG

Name: N306F
Type: primer_bind (Created by primer3)
Length: 23
Interval: 42 -> 64
%GC: 52.17
Tm: 56.36
Hairpin: 3.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 119.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 0.92
Sequence: CATCCATTGTGTGCTGTGTGAG

Name: N306R
Type: primer_bind_reverse (Created by primer3)
Length: 24
Interval: 147 -> 124
%GC: 50.0
Tm: 56.86
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 101.0
Pair Hairpin: 5.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 1.73
Sequence: TACGTCTACCGCGAACACACTTAC

Name: N282F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 21
Interval: 208 -> 228
%GC: 52.38
Tm: 55.21
Hairpin: 7.0
Primer-Dimer: 3.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 98.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 0.54
Sequence: CGTCAAAACAACCGCTGTTCC

Name: N282R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 22
Interval: 301 -> 280
%GC: 50.0
Tm: 54.6
Hairpin: 3.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 94.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 4.0
Pair Tm Diff: 0.61
Sequence: GTCAAGGTCACTGCTCAAGGAA

Name: N272F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 19
Interval: 181 -> 199
%GC: 57.9
Tm: 55.04
Hairpin: 1.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 81.0
Pair Hairpin: 5.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 0.96
Sequence: ACCCACCCACACAGACACA

Name: N272R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 24
Interval: 261 -> 238
%GC: 45.83
Tm: 54.08
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 81.0
Pair Hairpin: 5.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 0.96
Sequence: GACTAGTGAGTGTATTGCTTTGGC

Name: N270F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 26
Interval: 69 -> 94
%GC: 42.31
Tm: 55.04
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 137.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 4.0
Pair Tm Diff: 0.18
Sequence: TCTTCTAGAGTCATTATCGCTGTTGC

Name: N270R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 24
Interval: 205 -> 182
%GC: 45.83
Tm: 55.22
Hairpin: 2.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 137.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 4.0
Pair Tm Diff: 0.18
Sequence: CCATACAAGGCAGAATAGCACACA

Name: N259F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 18
Interval: 46 -> 63
%GC: 66.67
Tm: 55.61
Hairpin: 5.0
Primer-Dimer: 1.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 104.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 0.55
Sequence: CGGAGGCTGCTCCACTGA

Name: N259R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 21
Interval: 149 -> 129
%GC: 52.38
Tm: 55.57
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 104.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 1.06
Sequence: TACCGACAACCTCGAGGCACTT

Name: N251F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 162 -> 185
%GC: 37.5
Tm: 54.74
Hairpin: 2.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 91.0
Pair Hairpin: 7.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.48
Sequence: AACACGCAAATACACGCAAATACA

Name: N251R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 20
Interval: 252 -> 233
%GC: 55.0
Tm: 55.22
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 91.0
Pair Hairpin: 7.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.48
Sequence: CGATTTCCGTGGCGCTTTTC

Name: N247F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 129 -> 152
%GC: 41.67
Tm: 55.06
Hairpin: 8.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 152.0
Pair Hairpin: 6.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 1.2
Sequence: ATCTGAGTTGAAACTCTTGTGCGT

Name: N246F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 18
Interval: 46 -> 63
%GC: 66.67
Tm: 55.61
Hairpin: 5.0
Primer-Dimer: 1.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 99.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 1.49
Sequence: CGGAGGCTGCTCCACTGA

Name: N237F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 20
Interval: 133 -> 152
%GC: 60.0
Tm: 55.87
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 103.0
Pair Hairpin: 8.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 1.05
Sequence: CTATCGCCCTGCACCCTCAT

Name: N247R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 24
Interval: 285 -> 262
%GC: 41.67
Tm: 54.28
Hairpin: 5.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 186.0
Pair Hairpin: 6.0
Pair Primer-Dimer: 4.0
Pair Tm Diff: 0.6
Sequence: TAATAAAGTCGTACCCGTAACGCA

Name: N246R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 22
Interval: 143 -> 122
%GC: 50.0
Tm: 56.03
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 98.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 0.0
Pair Tm Diff: 0.6
Sequence: TACCGACAACCTCGAGGCACTTT

Name: N237R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 23
Interval: 236 -> 214
%GC: 56.52
Tm: 55.97
Hairpin: 2.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 103.0
Pair Hairpin: 8.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 1.14
Sequence: CAGAGCGATAGGTGGGTAGTGAG

Name: N236F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 22
Interval: 179 -> 200
%GC: 50.0
Tm: 55.97
Hairpin: 7.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 105.0
Pair Hairpin: 6.0
Pair Primer-Dimer: 4.0
Pair Tm Diff: 0.55
Sequence: TGTACGCAGCGTGGTATGGTAT

Name: N236R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 22
Interval: 282 -> 261
%GC: 50.0
Tm: 55.42
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 132.0
Pair Hairpin: 6.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 0.66
Sequence: ACTGCACACGCACACTACATAC

Name: N206F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 21 -> 44
%GC: 45.83
Tm: 55.91
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 164.0
Pair Hairpin: 7.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 2.45
Sequence: TATAACACGGCAGTGGTCAGACAT

Name: N206R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 28
Interval: 184 -> 157
%GC: 35.71
Tm: 53.46
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 164.0
Pair Hairpin: 7.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 2.45
Sequence: GTCTGTTATATACATGCGATATGTACG

Name: N174F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 25
Interval: 262 -> 286
%GC: 36.0
Tm: 52.08
Hairpin: 5.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 99.0
Pair Hairpin: 6.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 3.17
Sequence: CACAGTTTTGAACTTATGAACAGGA

Name: N174R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 23
Interval: 360 -> 338
%GC: 43.48
Tm: 55.25
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 100.0
Pair Hairpin: 6.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 2.07
Sequence: ACAAACACGTAAACACAACACTGCG

Name: N164F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 59 -> 82
%GC: 41.67
Tm: 55.02
Hairpin: 3.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 222.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 0.68
Sequence: ATTTCTGGTTTTATTGCCCTCGT

Name: N164R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 21
Interval: 280 -> 260
%GC: 57.14
Tm: 55.7
Hairpin: 7.0
Primer-Dimer: 3.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 222.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 3.0
Pair Tm Diff: 0.68
Sequence: CGCTGTAACAGTCACGGTACG

Name: N163F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 272 -> 295
%GC: 45.83
Tm: 55.88
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 99.0
Pair Hairpin: 5.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 1.04
Sequence: GTGACTCCAATTGCAAGGTGTGAT

Name: N163R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 23
Interval: 371 -> 349
%GC: 43.48
Tm: 55.11
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 99.0
Pair Hairpin: 5.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 0.11
Sequence: TGCAGCCAAGGTGTTGAAAATTG

Name: N155F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 27
Interval: 19 -> 45
%GC: 25.93
Tm: 51.64
Hairpin: 5.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 92.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 0.0
Pair Tm Diff: 1.84
Sequence: ACAACAATTTGAAACATAAAATCCACA

Name: N155R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 24
Interval: 110 -> 87
%GC: 41.67
Tm: 53.48
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 92.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 0.0
Pair Tm Diff: 1.84
Sequence: TGATGCACAGTTCTTTAGAGGAGA

Name: N86F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 21
Interval: 30 -> 50
%GC: 57.14
Tm: 55.39
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 139.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 0.0
Pair Tm Diff: 0.36
Sequence: TTAGCCGGTAGAGAAGGCTGG

Name: N86R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 20
Interval: 168 -> 149
%GC: 50.0
Tm: 55.03
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 4.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 133.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 0.27
Sequence: ACGTGTGTGTGCACTCGAAA

Name: N71F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 146 -> 169
%GC: 45.83
Tm: 54.48
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 1.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 101.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.5
Sequence: TCCTGTAAGGAGTGGGCTATGTAA

Name: N71R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 24
Interval: 246 -> 223
%GC: 45.83
Tm: 54.97
Hairpin: 6.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 101.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.5
Sequence: TTCCATTGATCTGACCAGAGTCCT

Name: N68F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 20
Interval: 48 -> 67
%GC: 55.0
Tm: 55.14
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 163.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.0
Sequence: CATCGCAACCTTGTTACACG

Name: N68R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 24
Interval: 202 -> 179
%GC: 41.67
Tm: 55.38
Hairpin: 2.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 155.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 0.0
Pair Tm Diff: 0.23
Sequence: ACACGCAAATACACGCAAATACAC

Name: N61F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 1 -> 24
%GC: 41.67
Tm: 52.88
Hairpin: 5.0
Primer-Dimer: 4.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 139.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 1.5
Sequence: GCACAACATACGACTCTATAAGCT

Name: N61R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 24
Interval: 138 -> 115
%GC: 41.67
Tm: 53.29
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 138.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 0.41
Sequence: GGCAAATTCGAGATAAGACATCCA

Name: N43F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 55 -> 78
%GC: 45.83
Tm: 54.76
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 4.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 109.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.41
Sequence: GTGTTACGTGTACGAGAGTTCACT

Name: N43R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 24
Interval: 163 -> 140
%GC: 45.83
Tm: 54.35
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 109.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.41
Sequence: TGCTGGGGAGTAAGATTAGTTGTG

Name: N36F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 23
Interval: 87 -> 109
%GC: 47.83
Tm: 55.08
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 91.0
Pair Hairpin: 6.0
Pair Primer-Dimer: 4.0
Pair Tm Diff: 0.05
Sequence: TACGATAGTGTGCTTGTGCCT

Name: N36R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 24
Interval: 177 -> 154
%GC: 41.67
Tm: 55.03
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 91.0
Pair Hairpin: 6.0
Pair Primer-Dimer: 4.0
Pair Tm Diff: 0.05
Sequence: AACGTACACACACACAAAGCTACT

Name: N32F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 367 -> 390
%GC: 41.67
Tm: 54.01
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 103.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 1.62
Sequence: ACCACTTATACCAACGTACACACA

Name: N32R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 22
Interval: 469 -> 448
%GC: 50.0
Tm: 55.64
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 1.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 103.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 1.62
Sequence: ACGATAGTGTGCTTGTGCCTG

Name: N27F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 19
Interval: 168 -> 186
%GC: 52.63
Tm: 50.82
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 123.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 1.0
Pair Tm Diff: 4.56
Sequence: CGGCGTTGGTGTACTTTAG

Name: N27R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 23
Interval: 294 -> 272
%GC: 47.83
Tm: 55.32
Hairpin: 2.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 127.0
Pair Hairpin: 3.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 4.5
Sequence: ATTGCGTTGTCTTGCTCTCCTAC

Name: N26F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 24
Interval: 223 -> 246
%GC: 45.83
Tm: 55.39
Hairpin: 3.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 114.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.22
Sequence: ACATTCCAGTTCACACAGTTCTCG

Name: N26R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 23
Interval: 335 -> 313
%GC: 43.48
Tm: 55.41
Hairpin: 4.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 100.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.16
Sequence: AAACGAGGGCAAAGAAATCGACA

Name: N4F
Type: primer_bind (Modified by User)
Length: 23
Interval: 65 -> 87
%GC: 43.48
Tm: 53.74
Hairpin: 3.0
Primer-Dimer: 0.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 89.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.46
Sequence: TTAGTGTAACCGCAACCTCTTCT

Name: N4R
Type: primer_bind_reverse (Modified by User)
Length: 19
Interval: 153 -> 135
%GC: 57.9
Tm: 53.28
Hairpin: 3.0
Primer-Dimer: 2.0
Monovalent Salt Concentration: 50.0
Divalent Salt Concentration: 0.0
DNTP Concentration: 0.0
Product Size: 90.0
Pair Hairpin: 4.0
Pair Primer-Dimer: 2.0
Pair Tm Diff: 0.96
Sequence: TCAGACGCCACTCCTCAAG

Come è possibile notare dalle caratteristiche dei primer disegnati, i punteggi relativi alla suscettibilità del primer a formare strutture secondarie (hairpin) e dimeri amplificati (prodotti PCR spuri) sono qui compresi tra 0 e 8. Si è cercato ovviamente di disegnare primer che minimizzassero tali valori. Inoltre, si è tentato anche di ottenere primer che avessero una temperatura di annealing simile, in modo da poter ottimizzare l'uso del termociclatore. Tuttavia, per la natura della sequenza fiancheggiante la regione ripetuta del DNA microsatellite, in diversi casi si è stato necessario rilassare i vincoli imposti, pena l'impossibilità di disegnare i primer.

3.2.5. Messa a punto di protocolli di amplificazione

Sulla base delle caratteristiche delle caratteristiche dei primer disegnati si è proceduto alla messa a punto delle reazioni di PCR, attraverso dei protocolli ottimizzati per ciascuna coppia di primer.

I protocolli sono rifiniti attraverso l'impiego di diverse condizioni di amplificazione (temperatura di annealing, concentrazioni di cloruro di magnesio, concentrazione dei primer, numero di cicli). Inoltre, sono state utilizzate e sperimentate Taq polimerasi (l'enzima preposto alla duplicazione della regione amplificata) con caratteristiche diverse, in particolare:

- l'Eurotaq (Euro Clone, S.p.A.), scelta per le sue caratteristiche che ne fanno una polimerasi termostabile altamente sensibile e robusta. Mostra notevole sensibilità su regioni difficili come quelle ricche in GC.

- Promega Master Mix (Promega), un mix precostituito in cui la polimerasi è sensibile anche a basse concentrazioni del DNA da amplificare.

- KAPA2GTM Robust HotStart ReadyMix (Kapabiosystems), un mix precostituito la cui polimerasi possiede le caratteristiche della precedente, ma è anche adatta per amplificazioni di regioni ricche in adenina e timina (AT).

AmpliTaq Gold®, (Life Technologies) una delle migliori e più costose polimerasi oggi in commercio, molto adatta per l'amplificazione PCR di tratti di DNA di difficile amplificazione.

I prodotti PCR così ottenuti vengono posti in un gel d'agarosio al 3%, all'interno di una vasca elettroforetica. Alla fine della corsa elettroforetica vengono poi fotografati all'ultravioletto.

La Figura 2 mostra le reazioni di PCR nelle quali era stato ottenuto (al Febbraio 2011) un prodotto amplificato (banda marcata da asterisco). Al Febbraio 2011 eravamo riusciti ad ottenere amplificazione consistente e ripetibile per 7 loci microsatelliti. Tuttavia, per aumentare il numero di loci amplificabili, sono continuati e sono ancora in corso esperimenti di amplificazione che prevedono l'ulteriore aggiustamento delle condizioni delle reazione PCR, ma anche il disegno di nuovi primer. Al Marzo 2011 eravamo riusciti ad ottenere amplificazione consistente e ripetibile per 8 loci microsatelliti. Mentre per altri 10 sono state ottenute amplificazioni non sempre ripetibili. Tra il Marzo 2011 e Marzo 2012 si è tentato senza successo di migliorare il protocollo di amplificazione.

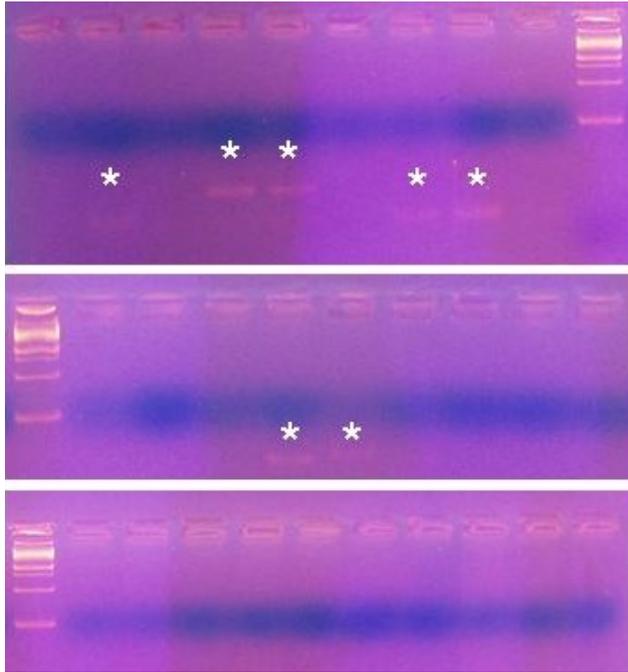


Figura 2. Ogni singolo pozzetto del gel corrisponde ad un locus microsatellite. La lunghezza della sequenza amplificata è stimabile rispetto alla posizione della banda più bassa (circa 200 basi) del ladder (mescola di frammenti di DNA di lunghezza nota), corso a fianco in ogni gel.

3.2.6. Identificazione del polimorfismo

L'aver identificato quindi dei loci amplificabili non assicurava che questi fossero i migliori candidati per le analisi successive. Era necessario verificare che essi esprimessero un livello di variabilità accettabile. Per questo motivo per gli 8 loci in oggetto è stato fatto uno screening più dettagliato, utilizzando un numero più elevato di individui, provenienti da 4 località di campionamento diverse.

Un locus microsatellite si intende polimorfico quando presenta più di un allele (variante) e la frequenza dell'allele meno frequente non è inferiore all'1 %. Per lo studio del livello di variabilità genetica delle popolazioni e del livello di flusso genico tra esse, è necessario che i marcatori utilizzati esprimano un certo livello di variabilità.

Il gel d'agarosio al 3% costituisce un supporto adeguato per la separazione di bande relative a frammenti amplificati di diversa lunghezza, corrispondenti a diverse varianti alleliche, come esemplificato in Figura 3. Esso tuttavia non consente l'assegnazione certa di ogni banda ad una precisa classe di lunghezza. Pertanto il gel d'agarosio non costituisce il supporto adeguato per la genotipizzazione dei singoli individui. Questa procedura richiede infatti che la corsa elettroforetica avvenga in un supporto che abbia un maggior potere di risoluzione.

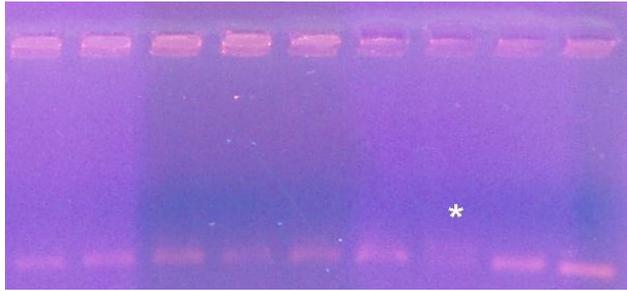


Figura 3. Locus N36. Dei 9 individui mostrati nel gel, l'asterisco marca quello eterozigote.

Per la valutazione del polimorfismo, ci eravamo proposti di utilizzare primer FORWARD, appositamente preparati, diversi nella struttura, ma non nella sequenza, rispetto agli analoghi primer utilizzati nelle fasi precedenti. La modifica apportata consiste nell'attacco di una molecola fluorescente ad una delle estremità del primer (estremità 5'). La combinazione di fluorescenze scelte era la seguente:

DS-30: 6-FAM, HEX, NED e ROX, dove ROX è il "ladder" standard (miscela di frammenti marcati di lunghezza nota).

La discriminazione tra i vari alleli sarebbe avvenuta attraverso corse elettroforetiche, utilizzando un sequenziatore automatico, che permette il rilevamento della fluorescenza attraverso l'uso di un laser.

Per la valutazione del polimorfismo ci saremmo avvalsi del Keck Biotechnology Resource Laboratory, Yale University (CT, USA), come servizio esterno.

Sono stati utilizzati 15 individui per 4 località campionate (Grotta Bella, pozzo dei Cristalli, Grotta Sulfurea, Lago del Rinoceronte). In questa fase, sono emersi nuovamente problemi di amplificazione PCR. Un possibile motivo che può spiegare l'inefficiente amplificazione è da ricercarsi nella contemporanea presenza di più taxa appartenenti al genere *Niphargus* nella Grotta del Fiume. Si tratta di unità tassonomiche non facilmente distinguibili (specie criptiche) che solo di recente sono state portate all'attenzione della scienza (Flot et al., 2010). Tali specie possono essere distinte tra loro attraverso l'uso di marcatori genetici quali, per esempio, sequenze di DNA mitocondriale. E' certamente possibile che i primer disegnati sulla base della sequenza dei cloni ricevuti dal Dr. Ciofi non siano sufficientemente adatti per l'amplificazione degli stessi loci microsatellite nelle diverse specie. Inoltre, visto che la libreria genomica è stata approntata prima che l'esistenza di più specie di *Niphargus* nella Grotta del Fiume venisse scoperta, è anche possibile che il campione originale da cui è stato ottenuto il DNA per la preparazione della libreria fosse eterogeneo, contenendo in realtà più di una specie di anfipode. Ciò potrebbe aver determinato che i cloni ottenuti non siano riferibili tutti alla stessa specie di *Niphargus*.

Un'assegnazione *a posteriori* dei singoli campioni alle diverse specie criptiche sarebbe stata possibile, ma avrebbe comportato l'applicazione di tecniche di sequenziamento che avrebbero ulteriormente inciso sul budget a disposizione. Inoltre, la sicura determinazione di ogni singolo campione non avrebbe garantito comunque la sua caratterizzazione genetica per tutti gli 8 loci microsatellite, producendo sicuramente un data set con molti dati mancanti e quindi molto incerto.

4. CONCLUSIONE

Sulla base delle evidenze raccolte, abbiamo ritenuto inopportuno condurre uno studio su più ampia scala, utilizzando marcatori di scarsa qualità e poco informativi, impegnando ulteriori risorse umane ed economiche. In accordo con gli altri partecipanti al progetto, abbiamo invece ritenuto opportuno riconsiderare gli scopi del progetto, sulla base delle risorse disponibili. Sulla base di quanto deciso sono stati riconfigurati nuovi obiettivi, perseguiti e raggiunti nella Fase 2 del progetto (MICROEVOLUZIONE 2).

FASE 2 (MICROEVOLUZIONE 2)

Livia Di Giambattista, Jessica Bonanni e Gabriele Gentile

Questa Fase è iniziata nel 2013, a seguito della riformulazione degli Obiettivi originari del progetto.

Viste le difficoltà insorte nella Fase 1 e le risorse a disposizione, si è deciso di ridisegnare lo studio genetico focalizzandolo sul solo modello terrestre: l'isopode *Androniscus dentiger*, per il quale esisteva già una letteratura di riferimento. Infatti, come detto nell'INTRODUZIONE, le dinamiche evolutive ed il flusso genico che riguardano popolazioni di questa specie sono stati studiate su un'ampia scala geografica (Gentile e Sbordonì, 1998; Gentile, 1998; Gentile e Allegrucci, 1999), che include anche l'area in cui la Grotta del Fiume si trova.

1. OBIETTIVI

Lo scopo del presente progetto è stato pertanto quello di continuare lo studio dei fattori che regolano la microevoluzione degli organismi di questa grotta, utilizzando in particolare l'isopode terrestre *A. dentiger* come organismo modello, per i motivi sopramenzionati. Lo studio è consistito nella genotipizzazione di alcune popolazioni di *A. dentiger*, attraverso la realizzazione di una "libreria" genomica, per l'individuazione di loci DNA microsatellite polimorfici, non ancora descritti e disponibili nella letteratura scientifica corrente. L'uso di questi marcatori genetici ad alto tasso di evoluzione molecolare ha reso possibile l'analisi della variazione genetica, della sua struttura, ed il livello di flusso genico.

Oltre allo scrivente, l'Unità Operativa è stata formata da:

- Livia Di Giambattista: ha partecipato alla raccolta del materiale, realizzato parte delle analisi di laboratorio, eseguito l'analisi dei dati e contribuito alla stesura della presente relazione.
- Jessica Bonanni: partecipato alla raccolta dei campioni ed eseguito parte delle analisi di laboratorio;

- Sandro Galdenzi, che ha selezionato i siti di studio e partecipato al prelievo dei campioni;
- Il Gruppo Grotte Recanati, che ha contribuito con assistenza sul campo e alla raccolta dei campioni.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento: siti e tecniche

Il campionamento è avvenuto attraverso cattura diretta a mezzo di un aspiratore.

In totale sono stati raccolti 482 campioni di *A. dentiger*, provenienti da 12 località differenti. Di questi, 383 sono stati campionati nella Grotta del Fiume e in ambienti ad essa direttamente collegati (G. Bella e G. Sulfurea), mentre i rimanenti 99 provengono da siti esterni al complesso, come Grotta del Vernino, Grotta della Beata Vergine di Frasassi, Grotta dell'Infinito.

In tabella 1 sono riportati i siti campionati, gli ID dei singoli siti, il numero di campioni raccolti in ciascun sito e il numero di individui di colore bianco e rosa che compongono il campione.

Sito	ID	N°		
		campioni	Bianchi	Rosa
Sala del Guano	GUA	54	37	17
Grotta Sulfurea	GS	66	66	0
Infinito	INF	31	16	15
Rinoceronte	RIN	29	14	15
Rinoc. Sulfureo	RIS	9	9	0
Vernino	VER	44	16	28
Ala	ALA	41	15	26
Lago Verde	LV	62	62	0
Pozzo dei Cristalli	PC	56	56	0
Grotta Bella	GB	47	47	0
Beata Vergine	BV	24	24	0
Felicità	FER	22	0	22
Totale		482	362	39

Tabella 1: Tabella riassuntiva dei campioni utilizzati nell'analisi. Viene riportato il numero totale di individui di *A. dentiger* campionati in ciascun sito all'interno della Grotta del Fiume e all'interno di altre grotte.

I campioni sono stati raccolti nel corso nella primavera 2014. La figura 1 la disposizione geografica dei siti di campionamento.

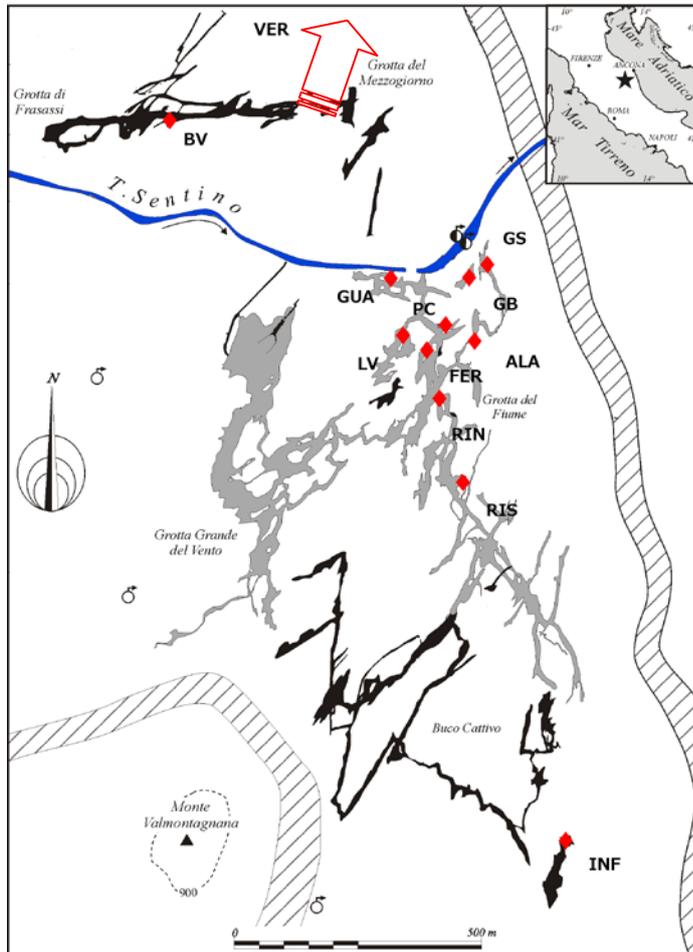


Figura 1. I rombi rossi indicano la localizzazione dei diversi siti campionati all'interno della Grotto del Fiume (vari siti), nella Grotto di Frasassi (BV) e nella Grotto dell'Infinito (INF). La posizione della Grotto del Vernino è approssimativamente indicata.

Gli individui raccolti all'interno della grotto sono stati suddivisi secondo il sito di provenienza e secondo la differente colorazione e conservati in etanolo al 99%. Successivamente sono stati suddivisi singolarmente ed è stato attribuito loro un codice univoco che permettesse di identificare ogni singolo individuo.

2.2 Analisi genetiche

2.2.1 Isolamento e valutazione del polimorfismo di 10 loci microsatellite

Per lo sviluppo di 10 set di *primer* per l'amplificazione di altrettanti tratti di DNA microsatellite ci si è avvalsi del servizio di Ecogenics GmbH (Svizzera). La procedura seguita da Ecogenics ha

previsto la realizzazione di una libreria genomica (cioè un pool di DNA genomico ottenuto da 10-20 individui, digerito da enzimi di restrizione al fine di ottenere frammenti di lunghezza pari ad alcune centinaia di paia di basi). La libreria è stata poi interamente utilizzata per l'amplificazione genica in alta resa (Sequenziamento 454/Roche) e successivo isolamento dei loci DNA microsatellite. E' stato valutato il grado di polimorfismo di 10 loci microsatellite (Allegato 3), per i quali sono stati forniti i protocolli di laboratorio da noi utilizzati. La verifica nel nostro laboratorio ha permesso di utilizzare 8 dei 10 set di *primer* forniti.

2.2.2 Estrazione del DNA

Da tutti gli individui campionati è stato estratto il DNA utilizzando il seguente protocollo di estrazione con CTAB:

Ogni individuo è stato posto su carta bibula, per eliminare l'eccesso di etanolo e successivamente posto in una provetta eppendorf da 1,5 ml. Poi sono stati aggiunti 300 microlitri di CTAB e 0,2% di betamercaptoetanololo. Il tutto è stato omogeneizzato in questa soluzione con un micro-pestello e successivamente incubato per 30' a 60°C. Il CTAB è un tampone il cui componente principale è il 2% Hexadeciltrimetilammonio, la sua funzione è quella di promuovere la lisi cellulare. Per separare il DNA dagli altri componenti cellulari, dopo l'incubazione sono state fatte due estrazioni con 300 microlitri di cloroformio. Dopo centrifugazione a 4°C per 5', il DNA è stato precipitato con etanolo al 70% e 25 microlitri di Acetato di sodio. Il tutto è stato mescolato per inversione e centrifugato a 15000 g per 10' a 4°C. Il DNA è stato poi lavato due volte con etanolo al 80% e successivamente risospeso in tampone 50 microlitri di TE (Tris/Edta). Le aliquote così ottenute sono state conservate a -40°C fino al momento dell' amplificazione.

L'integrità del materiale genetico e la buona riuscita del processo di estrazione sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% in 100 ml di TAE X50 contenente 0,25 mg/ml di bromuro di etidio. Alla fine dell'elettroforesi, il gel è stato osservato al transilluminatore (UV) e fotografato.

I 482 individui campionati sono stati genotipizzati per 8 marcatori microsatelliti (Ecogenics GmbH), riportati in tabella 2.

Locus	Primer		Label	Sequenze primers	Ripetizione	Range size	N° alleli	Ta °C
Andden_00143	AND1	F	[6-FAM]	ACACTACCCACTGTAAGGCG	(AAT) ₇ C(ATA) ₇	99-289	54	55°
		R		CTCACTGGTGGGAACATC				
Andden_00372	AND2	F	[HEX]	CGTGTATAATCTCACGTATGTAGCC	(AG) ₁₁	103-155	22	55°
		R		TGTATTGCCTCACGGAACG				
Andden_02946	AND4	F	[6-FAM]	GTTGCCTCCTACGATTACGC	(AGT) ₈	228-398	33	54°
		R		AGAGTGATTTAGCGTCAAGAGC				
Andden_05942	AND5	F	[HEX]	ACATTTGTGTGTGGGGTGAG	(CA) ₁₁	232-340	15	54°
		R		ACATAATGATTTCTGTGATTTATGCAG				
Andden_06710	AND7	F	[HEX]	GTCAATAACTGATCAACTACAGAATGC	(TTC) ₂₁	144-328	40	52°
		R		TTGGTTTCGATTGTCGTGCC				
Andden_08163	AND8	F	[6-FAM]	AACGTTACCCAGTTGTGAG	(TTG) ₁₁	213-318	31	51°
		R		ATTTTCAAGCCCCGCCTTC				
Andden_10127	AND9	F	[HEX]	TGCTTCCCTCAGAGCTAAC	(TG) ₁₂	176-202	13	52°
		R		CCGAATGGGTTGTCAAGCAG				
Andden_12907	AND10	F	[6-FAM]	CCGAATGGGTTGTCAAGCAG	(TG) ₁₄	178-226	24	51°
		R		ATCTTCATATGGCATCTTCTTACC				

Tabella 2. Sono riportati, per ciascun *locus* analizzato, il nome della coppia di *primers*, le sequenze del *primer forward* e *reverse*, il *label* del *primer forward*, il tipo di ripetizione, il *range* (intervallo) delle *size* (lunghezza in basi) il numero di alleli trovati e la temperatura di *annealing* (annidamento) utilizzata in PCR.

I protocolli di amplificazione e i reagenti utilizzati sono riassunti rispettivamente nelle tabelle 3 e 4. Per tutti i marcatori è stato utilizzato il protocollo basato sull'utilizzo della MasterMix2X (Promega), come suggerito dal produttore.

94°	5 min	
94°	30 sec	} X 27 cicli
Ta°	45 sec	
72°	45 sec	
94°	30 sec	} X 8 cicli
53°	45 sec	
72°	45 sec	
72°	30 min	
16°	Ad lib.	

Tabella 3. Protocolli di amplificazione utilizzati per genotipizzare ciascun campione. La Ta°C (temperatura di annealing) per ciascun locus è riportata in Tabella 2.

MMIX	6.25
F	0.5
R	0.4
L	0.1
H2O	3.75
DNA	1

Tabella 4. Quantità di reagenti, espressa in μL , utilizzata per ciascun individuo nella reazione di PCR.

I frammenti amplificati sono stati controllati facendo correre 3 μL di prodotto PCR con 1 μL di blu bromo fenolo su un gel di agarosio al 3%, in tampone TAE 50X. Finita la corsa elettroforetica il gel è stato visualizzato su un transilluminatore a raggi UV e fotografato.

I prodotti PCR così ottenuti sono stati analizzati presso la DNA Analysis Facility on Science Hill, Yale University (URL: <http://dna-analysis.research.yale.edu/>). I file di dati restituiti dalla DNA Analysis Facility on Science Hill sono stati successivamente letti con il software PeakScanner 1.0 (Applied Biosystem) per la assegnazione del corretto genotipo per ogni individuo ad ogni *locus*.

2.3 Analisi dei dati

È stata effettuata un'analisi con il software GenepopOnTheWeb V. 4.1 (Raymond and Rousset, 1995) per valutare il Linkage Disequilibrium (LD) tra i marcatori utilizzati ed eventuali deviazioni

dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Le deviazioni dall'equilibrio di H-W sono associate a un possibile difetto o eccesso di eterozigoti; per questo motivo è stato calcolato il coefficiente di inincrocio F_{IS} secondo la formula di Weir and Cockerham (1984), la cui significatività è stata testata tramite catene di Markov, usando 1000 permutazioni e 1000 batch per permutazione e riportando la percentuale di valori maggiori rispetto a quelli osservati.

È stato utilizzato il software STRUCTURE v. 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) per stimare il numero di gruppi geneticamente omogenei o *cluster* (K) rappresentati dal campione e il grado di rimescolamento genico individuale (Q).

Il numero di K *cluster* da tenere in considerazione nell'analisi condotta tramite STRUCTURE è stato calcolato applicando il metodo descritto da Evanno et al. (2005), utilizzando il software STRUCTURE HARVESTER (Earl and VonHoldt, 2012). Sono state effettuate 100000 ripetizioni di MCMC e 10000 di *burnin* con 5 repliche per ciascuno dei valori assegnati a K, compresi da 1 a 7.

Sulla base dei risultati ottenuti attraverso il protocollo di Evanno et al., sono state condotte le successive analisi di STRUCTURE per ognuna delle quali sono state effettuate 1000000 ripetizioni di MCMC e 100000 di *burnin* con 5 repliche. Tuttavia, tenuto conto che il metodo di Evanno et al. tende ad evidenziare solo le maggiori discontinuità nella struttura genetica di popolazioni (Kalinowski, 2011), abbiamo ritenuto di estendere le analisi anche al secondo miglior valore di K suggerito dal metodo. Inoltre, procedendo poi in modo gerarchico, per rilevare ulteriore sottostrutturazione all'interno dei *cluster* individuati con il metodo di Evanno et al., abbiamo utilizzato la migliore assegnazione degli individui ad ognuno dei *cluster* individuati per definire dei sottogruppi che sono poi stati analizzati con STRUCTURE applicando il metodo di Evanno et al. per rilevare il numero K di *cluster* per ognuno dei sottogruppi.

La probabilità (Q) di ciascun individuo di essere attribuito a ciascuno dei *cluster* considerati è stata calcolata utilizzando l'*admixture model*, che ammette la presenza di rimescolamento genico tra i diversi gruppi. Le frequenze alleliche sono state considerate come correlate, con un modello che prevede che eventuali somiglianze nelle frequenze alleliche dei diversi gruppi siano imputabili ad un'origine comune o alla presenza di flusso genico. Le analisi sono state condotte applicando la LOCPRIOR, utilizzando come *prior* il sito in cui ciascun individuo è stato campionato. La *prior* è stata utilizzata suddividendo gli individui prima sulla base del sito di campionamento e del colore e successivamente solo sulla base del sito di campionamento.

Come misura del differenziamento genetico tra popolazioni è stato calcolato l'indice F_{ST} a coppie (Wright, 1951; Weir and Cockerham, 1984). L'indice è stato prima stimato considerando ciascun sito come una popolazione a sé stante e, successivamente, considerando il *clustering* operato da

STRUCTURE. Come per l'indice F_{IS} , anche per l'indice F_{ST} la significatività statistica è stata valutata tramite catene di Markov, usando 1000 permutazioni e 1000 batch per permutazione, considerando la percentuale di valori maggiori rispetto a quelli osservati.

3. RISULTATI

L'analisi condotta per valutare la presenza di LD tra loci ha restituito risultati negativi, quindi nessuno dei marcatori è in link con gli altri.

Nessuno dei valori di F_{IS} è risultato essere significativamente $\neq 0$, pertanto non vi sono evidenze di deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg per nessuno dei marcatori utilizzati.

Il risultato dell'analisi condotta secondo il metodo di Evanno et al. è illustrato in Figura 2. Come si evince dal grafico, il numero ottimale di *cluster* (K) corrisponde a 2, valore per il quale è osservato il più alto DeltaK. Il secondo valore di DeltaK è stato osservato per $K=4$.

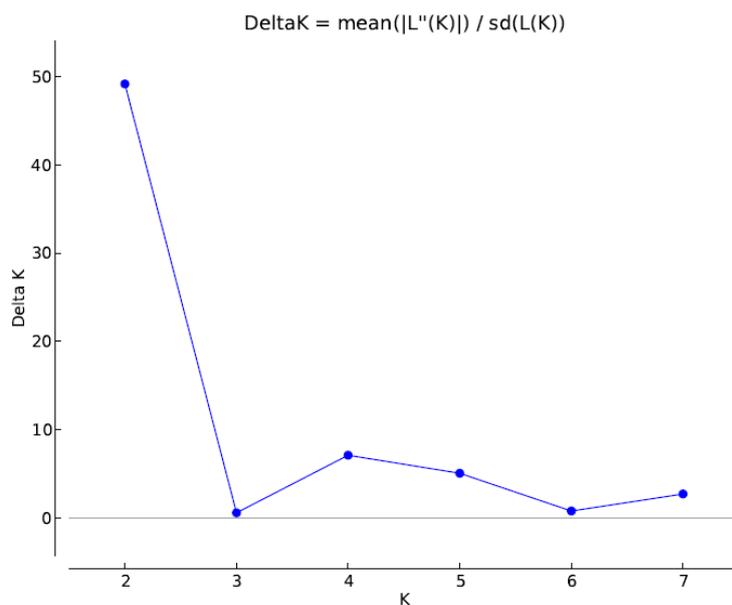


Figura 2. Grafico del DeltaK ottenuto tramite STRUCTURE HARVESTER. Il maggior valore di DeltaK è osservato per $K=2$.

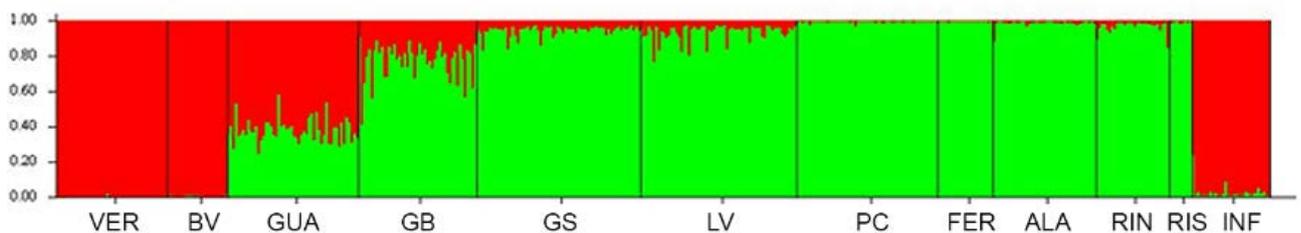


Figura 3: Analisi di STRUCTURE (K=2). In rosso sono riportati i valori di Q relativi al cluster 1, in verde quelli relativi al cluster 2.

Il risultato dell'analisi di STRUCTURE per K=2 è riportato in Figura 3. Tutti gli individui campionati nei 12 siti sono stati suddivisi in due *cluster*. Gli individui provenienti dai siti VER, BV e INF, non appartenenti alla Grotta del Fiume, (Figura 1) sono stati inseriti all'interno dello stesso *cluster*. Gli individui dei siti GS, LV, PC, FER, ALA, RIN e RIS sono stati invece inseriti nell'altro *cluster*. Gli individui del sito GUA presentano invece un elevato grado di *admixture* tra i due *cluster* considerati. *Admixture* è anche riscontrabile nel sito GB, anche se in misura molto minore.

Procedendo in modo gerarchico, per rilevare ulteriore sotto-strutturazione all'interno della Grotta del Fiume, il *cluster 2* (che, seguendo il criterio della migliore assegnazione degli individui ad ognuno dei *cluster* individuati, non include GUA) è poi stato analizzato con STRUCTURE applicando il metodo di Evanno et al. per rilevare il numero di K che è risultato pari a 2.

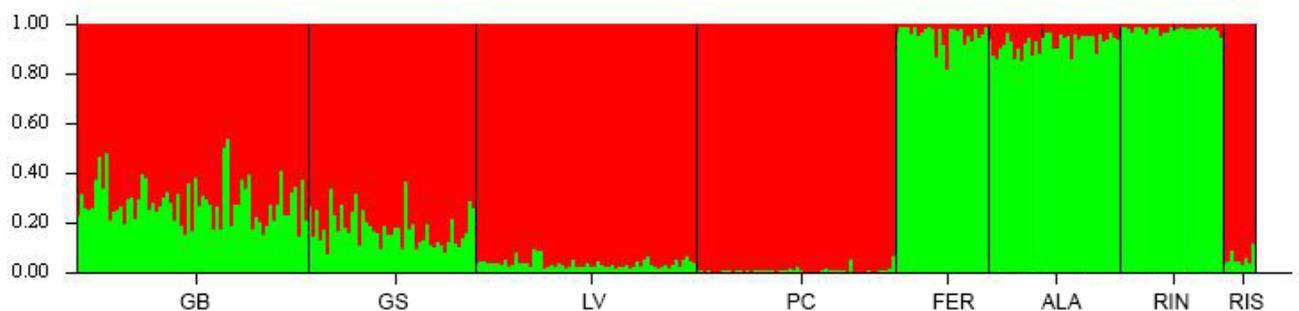


Figura 4: Analisi di STRUCTURE all'interno del *cluster 2*, che include le popolazioni all'interno della Grotta del Fiume, ad eccezione di GUA (Vedi Materiali e Metodi). K=2.

Da questa analisi (Figura 4) risulta una chiara distinzione tra siti sulfurei e non. Infatti gli individui provenienti dai siti GB, GS, LV, PC e RIS vengono inclusi nel primo *subcluster* (in rosso), mentre gli individui provenienti da FER, ALA, RIN vengono assegnati al secondo (verde). GB e GS presentano un certo grado di *admixture*.

L'analisi effettuata considerando tutti gli individui di tutti i siti campionati, utilizzando il secondo miglior valore di K, pari a 4, come risultante dall'applicazione del protocollo di Evanno et al., è riportata in Figura 5.

Questa seconda analisi che considera tutti gli individui e tutti i siti, mostra che VER (in rosso nel grafico), più lontana dalla Grotta del Fiume, costituisce un gruppo genetico differenziato da tutti gli altri siti analizzati. BV e INF formano un secondo *cluster* separato (in blu nel grafico) largamente rappresentato anche in GUA ed in misura minore in GB, GS e LV. Gli altri due *cluster* (in giallo e

verde nel grafico) raccolgono individui esclusivamente presenti nei siti interni alla Grotta del Fiume e marcano rispettivamente ambienti sulfurei (giallo) e non sulfurei (verde). I siti FER, ALA e RIN sono francamente ascrivibili al *cluster* non sulfureo, mentre LV e PC sono assegnabili al cluster sulfureo. GB e GS mostrano delle caratteristiche intermedie per cui entrambe le componenti (sulfureo e non) sono presenti.

Nessuna delle analisi eseguite ha fornito evidenza di una possibile differenziazione genetica correlata alla diversa colorazione tra individui di colore bianco e rosa.

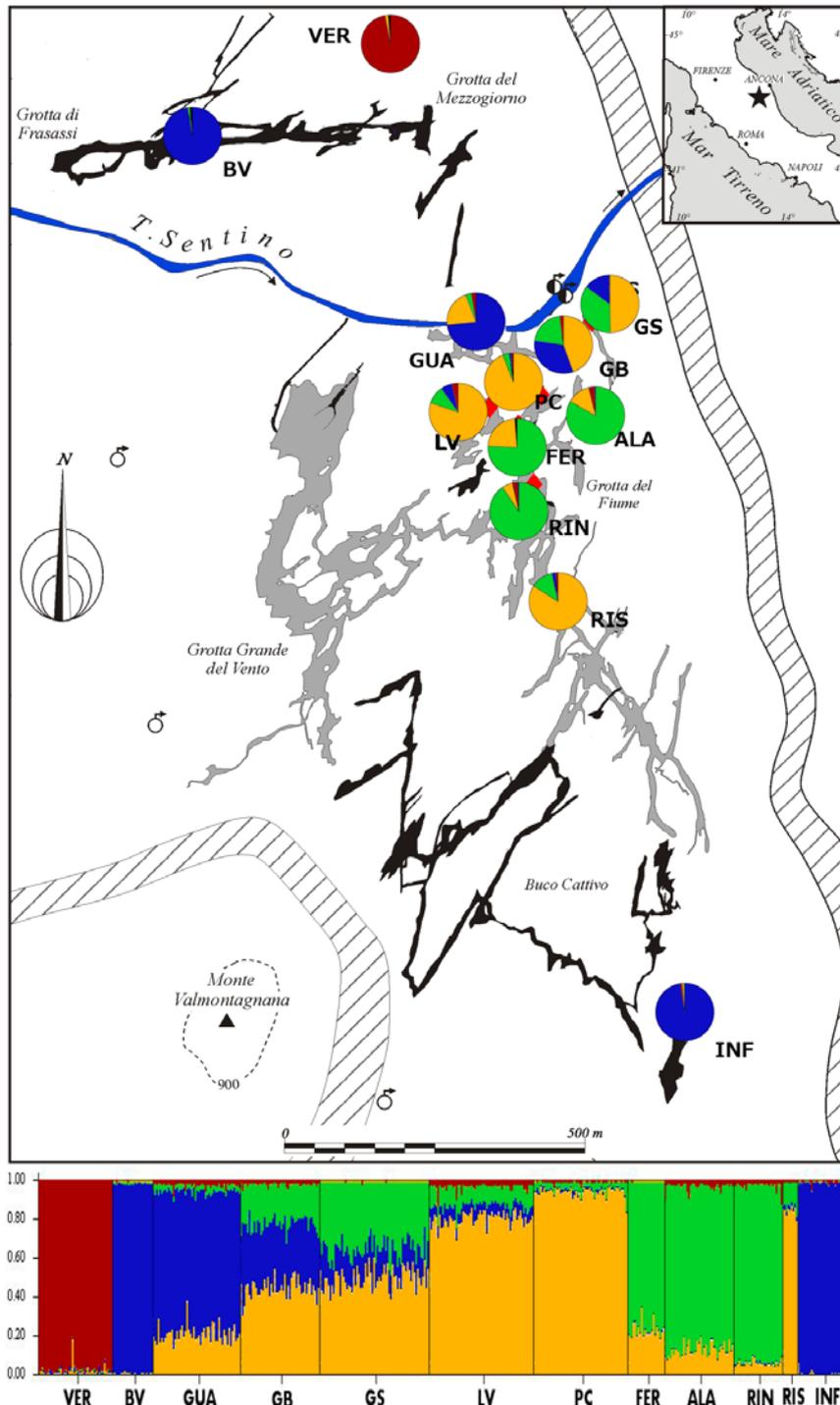


Figura 5: Nell'immagine in basso è riportato il grafico prodotto da STRUCTURE con i valori di Q relativi a ciascun individuo analizzato (K=4). Ciascun cluster è rappresentato con colori differenti. In alto, sono riportati i valori di Q relativi a ciascun sito analizzato, per i 4 cluster.

Come detto l'indice F_{ST} a coppie è stato calcolato prima considerando ciascun sito come una popolazione a sé stante e, successivamente, considerando il *clustering* operato da STRUCTURE. In tutti i confronti, l'indice è risultato altamente significativo ($p < 0.01$).

Nella prima analisi, la popolazione che risulta essere maggiormente differenziata da tutte le altre è VER, con il valore minimo pari a 0.134 rispetto a GUA e il valore massimo pari a 0.279 rispetto a RIS. Anche BV presenta la differenziazione minima rispetto a GUA (0.065) e la massima rispetto a RIS (0.220). la popolazione RIS risulta essere, tra i siti interni alla grotta, quella che maggiormente si differenzia dalle altre, presentando valori di F_{ST} più elevati di quelli riscontrabili tra le altre popolazioni considerate. I valori più bassi sono riferiti a GB e GS (0.133 e 0.138, rispettivamente), mentre i più elevati, oltre a VER e BV, sono riferiti a RIN (0.194) e INF (0.205).

Anche nella seconda analisi dell'indice F_{ST} , effettuata raggruppando le popolazioni secondo quanto emerso dal *clustering* di STRUCTURE con $K=4$, la popolazione che risulta essere maggiormente differenziata dalle altre è VER, con il valore più basso (0.134) riferito a GUA e il più alto (0.167) riferito al gruppo di LV-PC-FER. Il gruppo BV-INF presenta il valore massimo di F_{ST} (0.101) rispetto al gruppo PC-LV-RIS. Il gruppo più interno alla grotta (FER-ALA-RIN) risulta essere maggiormente differenziato dal gruppo BV-INF.

4. DISCUSSIONE

In generale, la struttura genetica di *Androniscus dentiger* all'interno delle Grotte di Frasassi risulta piuttosto complessa.

Le analisi condotte con STRUCTURE e i valori di F_{ST} mostrano chiaramente un forte differenziamento tra le popolazioni oggetto di studio, indicando in genere un flusso genico ridotto o in alcuni casi assente anche tra popolazioni interne della stessa Grotta del Fiume.

Le analisi effettuate sono congruenti nell'identificare VER come un *pool* genico separato dal resto delle popolazioni investigate.

Come già sottolineato da Sarbu et al. (2000) e Gentile e Sarbu (2004), sembra evidente che la struttura genetica di *Androniscus dentiger* all'interno della Grotta del Fiume rispecchi il contributo di diversi *pool* genici. Tuttavia, rispetto ai precedenti lavori, questo studio rivela un più alto grado di struttura, con un pattern di differenziamento in parte spiegabile in relazione alla distanza geografica tra siti (per esempio VER dal resto dei siti) ed in parte in relazione alle caratteristiche ecologiche degli stessi.

In particolare, BV ed INF, seppur geograficamente distanti, sono caratterizzate da caratteristiche trofiche simili, essendo entrambe grotte in cui l'apporto dei nutrienti è scarso e dipendente interamente da *input* esterni, spingendo *Androniscus* a massimizzare l'esplorazione dell'ambiente (Sarbu et al. 2000). E' possibile che queste due grotte, siano in maggiore connettività con l'ambiente MSS (*milieu souterrain superficiel* (Juberthie et al, 1980), popolato anche da *Androniscus*, le cui caratteristiche genetiche potrebbero essere riflesse nei *pool* genici di BV e INF. A supporto di questa ipotesi, GUA - sito non sulfureo e più prossimo all'esterno - e le due grotte GB e GS - entrambe molto superficiali seppur con ambienti sulfurei - mostrano un certo grado di *admixture* tra *pool* genici più interni alla Grotta del Fiume e il *pool* genico di BV ed INF. Tuttavia, sebbene INF venga inserito nel medesimo *cluster* di BV, con valori di Q superiori al valore di soglia pari al 95%, l'indice F_{ST} tra i due siti è piuttosto elevato (0.109) evidenziando un ridotto flusso genico. Al contrario, l'indice F_{ST} tra BV e GUA è più basso (0.065), rivelando la maggiore possibilità di flusso genico dovuto alla vicinanza geografica tra i siti, indipendentemente dalla possibile barriera geografica rappresentata dal fiume Sentino

Il gruppo di popolazioni situate nella zona centrale della grotta (RIN-FER-ALA) risulta distinto dalle popolazioni ad esso contigue (LV, PC e RIS), che sono inserite in un *cluster* differente. Inoltre, benché LV e PC possano essere inserite nello stesso *cluster* a causa della forte vicinanza geografica, la popolazione RIS è spazialmente distante dalle precedenti e non vi è continuità tra il blocco LV-PC e RIS. Anche i valori di F_{ST} riscontrati tra i singoli siti e tra i blocchi confermano che il gruppo RIN-FER-ALA, geograficamente frapposto tra LV-PC e RIS, si distingue chiaramente da questi ultimi, che risultano invece più simili tra di loro di quanto non siano rispetto ai siti geograficamente più vicini. La somiglianza tra siti non contigui e la loro differenziazione rispetto a siti geograficamente vicini, è correlabile con le caratteristiche ecologiche dei siti stessi. Il gruppo LV-PC-RIS è infatti caratterizzato da siti con acque sulfuree, mentre il gruppo RIN-FER-ALA è caratterizzato da siti con acque non sulfuree.

5. CONCLUSIONI E RACCOMANDAZIONI

In conclusione, la realizzazione di una libreria genomica e l'utilizzo di tecniche di sequenziamento ad alta resa si sono rivelati cruciali per l'isolamento di loci di DNA microsatellite dall'elevato grado di polimorfismo per *Androniscus dentiger*. Tali marcatori, non disponibili prima nella letteratura scientifica, potranno essere utilizzati in futuri studi. Il loro uso, nel presente progetto di ricerca, ha permesso di rivelare un elevato grado di struttura genetica in *Androniscus dentiger* all'interno del complesso della Grotta del Fiume. I risultati ottenuti, in corso di pubblicazione, rappresentano un

notevole avanzamento nelle conoscenze sull'ecologia e microevoluzione del sistema della Grotta del Fiume ed in generale dei sistemi sotterranei. Malgrado le caratteristiche di questa grotta ne facciano un sistema aperto, non geograficamente isolato dalla superficie, la ricchezza e disposizione delle risorse alimentari al suo interno sono in grado di determinare, attraverso l'azione combinata di fattori evolutivi stocastici (deriva genica) e deterministici (selezione), percorsi evolutivi indipendenti, leggibili nel *pool* genico degli organismi che la popolano (*Androniscus dentiger*). Per questo motivo, i rami profondi e sulfurei della Grotta del Fiume dovrebbero essere oggetto di particolare attenzione a fini della loro conservazione, con l'adozione di misure gestionali adeguate a garantire il mantenimento dei processi microevolutivi tuttora in corso.

BIBLIOGRAFIA

Anderson, E.C. and Thompson, E.A. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, 160: 1217--1229.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Conway, N.M., M.C.II Kennicutt, C.L. van Dover. 1994. Stable isotopes in the study of marine chemosynthetic-based ecosystems. Pp:158-186 in K. Lajtha, R.H. Michener, eds. Stable isotopes in ecology and environmental science. Oxford: Blackwell.

Earl, D.A., B.M vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361.

Evanno, G., S. Regnaut, J.Goudet . 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol.*,14: 2611-2620.

Flot J.F., Wörheide, G., Dattagupta, S. 2010. Unsuspected diversity of *Niphargus* amphipods in the chemoautotrophic cave ecosystem of Frasassi, central Italy. *BMC Evolutionary Biology*, 10:171.

Gentile, G. 1998. Gli eventi paleoclimatici del Quaternario in Italia Centrale: il modello biogeografico di *Androniscus dentiger* (Oniscidea, Trichoniscidae). *Biogeographia*, n.s. 19: 145-156.

Gentile, G. 1998. Gli eventi paleoclimatici del Quaternario in Italia Centrale: il modello biogeografico di *Androniscus dentiger* (Oniscidea, Trichoniscidae). *Biogeographia*, n.s. 19: 145-156.

Gentile, G. e S.M. Sarbu. 2004. Trophic sources partition and population genetic structure of the isopod *Androniscus dentiger* from a chemoautotrophy based underground ecosystem. *Subterranean Biology*, 2:7-14.

Gentile, G., G. Allegrucci. 1999. Geographic variation and genetic relationships in populations of the *Androniscus dentiger* complex from Central Italy (Isopoda, Oniscidea, Trichoniscidae). *International Journal of Speleology*, 26: 47-61.

Gentile, G., V. Sbordoni. 1998. Indirect methods to estimate gene flow in cave and surface populations of *Androniscus dentiger* (Isopoda, Oniscidea). *Evolution*, 52: 332-342.

Juberthie, C., Delay, B., M. Bouillon. 1980. Sur l'existence d'un milieu souterrain superficiel en zone non calcaire. *C R Acad Sci*, 290:49-52.

Kalinowski, S.T. 2011. The computer program STRUCTURE does not reliably identify the main genetic clusters within species: simulations and implications for human population structure. *Heredity*, 106: 625-632.

Pohlmann, J.W., T.M. Iliffe, L.A. Cifuentes. 1997. A stable isotope study of organic cycling and the ecology of an anchialine cave ecosystem. *Marine Ecology Progress Series*, 155: 17-27.

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 55:945-959.

Raymond, M., F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism *J Hered*, 86: 248-249.

Rozen, S. e Skaletsky, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386

Sarbu, S.M., S. Galdenzi, M. Menichetti, M., G. Gentile. 2000. Geology and Biology of Grotte di Frasassi (Frasassi Caves) in Central Italy: An ecological multi-disciplinary study of a hypogenic underground karst system. Pp. 345-378 in H. Wilkens, D.C. Culver, W.F. Humphreys, eds. *Ecosystems of the world*, vol 30. Subterranean ecosystems. Amsterdam: Elsevier.

Sarbu, S.M., T.C. Kane, B.K. Kinkle. 1996. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science*, 272: 1953-1955.

Southward, A.J., M.C.II. Kennicutt, J. Alcalà-Herrera, M. Abbiati, L. Airoidi, F. Cinelli, C.N. Bianchi, C. Morri, A.C. Southward. 1996. On the biology of submarine caves with sulfur springs: Appraisal of ^{13}C - ^{12}C ratios as a guide to trophic relations. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 76: 265-285.

Stewens, T.O., J.P. McKinley. 1995. Lithotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science*, 270: 450-454.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Derek PM, Wills DPM, Shipley P. 2004. MICROCHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes*, 4:535–538.

Weir, B.S., C. Cockerham. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

Il responsabile scientifico

Dr. Gabriele Gentile
Dipartimento di Biologia
Università di Roma Tor Vergata



Gabriele Gentile, Ph.D.
Department of Biology
Tor Vergata University
Via della Ricerca Scientifica
00133 Rome, Italy

phone: +39 06 72 59 59 77
fax: +39 06 72 59 59 65
email: gabriele.gentile@uniroma2.it