

Università della Calabria



Dipartimento di Ecologia



**Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale
XX Ciclo (2004-2007)**

**Stimolazione della crescita ed ottimizzazione
dell'attecchimento in talee di *Posidonia oceanica*:
sperimentazione in acquario e in mare.**

Coordinatore

Prof. Aldo Musacchio

Docente tutor

Prof.ssa Anna Maria Innocenti

Candidato

Dr.ssa Monica Cardilio

Settore scientifico disciplinare: BIO/01

PhD thesis, Doctorate Research Program in Plant Biology
Ecology Department – University of Calabria XX Cycle (2004-2007)
Coordinator Prof. Aldo Musacchio

SOMMARIO

PREMESSA	1
CAPITOLO 1	5
1.1 Considerazioni generali	5
1.1.1 Aspetti filogenetici di <i>Posidonia oceanica</i>	5
1.1.2 Distribuzione geografica.....	7
1.1.3 Ecosistema Marino	7
1.1.4 Zonazione verticale del Dominio Pelagico.....	9
1.1.5 Zonazione verticale del Dominio Bentonico	10
1.2 Aspetti caratteristici di <i>Posidonia oceanica</i>	13
1.2.2 Morfologia	14
1.2.3 Riproduzione.....	17
1.2.4 Serie evolutiva e substrato d’impianto	18
1.2.5 Matte	20
1.2.6 Prateria.....	21
CAPITOLO 2	25
2.1 Obiettivi della ricerca	25
2.2 Aspetti metabolici e ritmi di crescita in <i>P. oceanica</i>	27
2.2.1 Metabolismo dell’azoto	27
2.2.2 Metabolismo del Carbonio	29
2.2.3 Effetto del Nitroprussiato di Sodio (SNP).....	33
CAPITOLO 3	37
3.1 Piano sperimentale	37
3.1.1 Trattamenti di talee di <i>Posidonia oceanica</i> con SNP in acquario	37
3.1.2 Metodologie seguite.....	39
CAPITOLO 4	43
4.1 Risultati	43
4.1.2 Riforestazione delle praterie	49
CAPITOLO 5	56

5.1 Sperimentazione in mare	56
5.1.1 Identificazione siti	56
5.1.2 Piano sperimentale del primo reimpianto in mare	62
5.1.3 Piano sperimentale del secondo reimpianto in mare	65
5.2 Adattamento delle talee di P. oceanica a diversa batimetria	68
5.2.1 Analisi fenologiche	68
5.2.2 Analisi degli epifiti	71
CONCLUSIONI	76
BIBLIOGRAFIA	78

PREMESSA

Le problematiche legate alla qualità dell'ecosistema marino Mediterraneo sono, ormai, sotto gli occhi di tutti, ricercatori e non, nonostante ciò non esiste ancora una vera cultura del mare né una corretta gestione della fascia costiera che appare oggi in evidente stato di degrado.

Solo per citare alcune di tali problematiche si potrebbe ricordare l'aumento della temperatura che sta lentamente portando ad una tropicalizzazione del mar Mediterraneo, invasioni di organismi appartenenti a specie alloctone che competono con le specie autoctone, tecniche di pesca invasive che distruggono i fondali (a strascico, mediante esplosivi ecc.).

Un altro fenomeno, attribuibile in prevalenza ad interventi arbitrari e non razionali dell'uomo, che è oggetto di preoccupazioni crescenti non solo nell'ambito della comunità scientifica ma anche fra la gente comune, è la frequenza sempre maggiore di *fenomeni erosivi* che assumono la massima entità in occasione delle più violente mareggiate. Queste *erosioni*, laddove si verificano, possono danneggiare opere pubbliche quali strade e ferrovie come pure abitazioni, stabilimenti balneari ecc. C'è da sottolineare inoltre che con il continuo sviluppo delle attività turistiche e balneari, le spiagge sono da considerarsi fonti di notevole benessere e di ricchezza per le popolazioni rivierasche che vivono di tale attività. L'assottigliamento e/o la sparizione delle spiagge provocano inoltre danni incalcolabili all'intero ecosistema dell'ambiente costiero.

Per arginare tale situazione è necessario pianificare attentamente interventi di salvaguardia e ripristino degli ambienti marini costieri.

Fortunatamente, oggi giorno l'interesse politico sia nazionale che internazionale si è sensibilizzato su queste problematiche ed in questi ultimi anni sono state promulgate alcune leggi con lo scopo di tutelare l'ambiente.

D.P.R. 27 marzo 2001 n.178, che regola l'organizzazione del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, assegna alla Direzione per la Difesa del mare Dipartimento per le risorse idriche, le competenze in materia di tutela della Biodiversità marina e delle specie marine protette nonché dell'ambiente marino nel suo complesso.

Il D.P.R. è rivolto alla realizzazione di mirate azioni alla tutela e alla gestione delle specie segnalate da accordi internazionali, come prioritarie per il Mediterraneo, il cui stato di conservazione risulta particolarmente minacciato.

In particolare, fra le specie da tenere sotto controllo possiamo ricordare, tutti i cetacei presenti nelle acque italiane, le tartarughe marine, le praterie di *Posidonia oceanica* come pure specie alloctone invasive quali *Caulerpa taxifolia* e *Caulerpa racemosa* che destano maggior preoccupazione per la loro aggressività.

Caulerpa taxifolia segnalata per la prima volta in Italia ad Imperia nel 1991, abitualmente invade gli ambienti instabili e degradati, prediligendo sabbie grossolane prive di insediamenti; l'aumento del degrado favorisce pertanto l'avanzata di queste specie, che tendono ad occupare nicchie ecologiche vuote o semivuote (Meinesz e Hesse, 1991).

La sua rapida diffusione è dovuta all'efficace riproduzione sia vegetativa (tramite stoloni e frammenti distaccati) che sessuata (tramite zoospore trasportate dalle correnti); è quindi inutile l'eradicazione grossolana che favorisce invece la sua espansione, così come l'asportazione involontaria tramite reti od ancore. *Caulerpa racemosa* segnalata per la prima volta lungo le coste meridionali della Sicilia è una specie poco esigente; tende, infatti, a colonizzare ogni tipo di substrato: roccia, sabbia, fango, *mattes* morte di *Posidonia oceanica*, ed è stata rilevata sia in acque limpide sia in acque inquinate. Ciò che sicuramente preoccupa di più è la sua interferenza con le biocenosi marine della costa; da vari studi è stato evidenziato un cambiamento strutturale nella composizione della fauna bentonica nei siti di insediamento della *C. racemosa*. Quando si tratta di specie particolarmente aggressive è purtroppo presumibile una loro rapida proliferazione fino alla saturazione dell'habitat; comportando inevitabilmente una progressiva regressione delle specie autoctone fino ad una possibile estinzione (Verlaque et al., 2000; Verlaque et al 2003; Piazzì et al., 2005).

E' noto, infatti, che ai bordi delle praterie e in condizioni di indebolimento delle piante di *Posidonia*, la *Caulerpa* (in prevalenza la specie *C. racemosa*) invade le "mattes" sofferenti, e in situazioni in cui la fanerogama è in svantaggio di competizione; riesce a raggiungere dimensioni eccezionali, andando ad ombreggiare e quindi a danneggiare la sua antagonista (Villèle et Verlaque, 1995; Torchia et al., 2000).

La Convenzione internazionale sulla Biodiversità siglata a Rio de Janeiro nel 1992 nel corso del Vertice della Terra, costituisce il quadro principale di riferimento per quanto concerne la salvaguardia della Biodiversità.

Per Biodiversità, o diversità biologica, si intende la variabilità fra gli organismi viventi di tutte le specie comprese in un ecosistema ed anche la variabilità degli ecosistemi presenti in un'area, sia quelli terrestri che quelli acquatici, ed ovviamente le complessità di cui fanno parte.

All'interno della diversità biotica del nostro pianeta, si distinguono tre livelli principali: la diversità genetica (*intraspecifica*), la diversità specifica (*interspecifica*) e la diversità ecosistemica.

La diversità genetica sussiste tra organismi appartenenti alla stessa specie;

la diversità specifica riguarda organismi appartenenti a specie diverse;

la diversità ecosistemica si manifesta come varietà tra ecosistemi costituiti da una componente biotica e una componente abiotica: questa può considerarsi il livello di diversità che comprende i due precedenti livelli, genetico e specifico (*Primack and Carotenuto 2003*).

Numerose iniziative e strumenti legislativi sono stati adottati, a livello nazionale e internazionale, per la tutela delle specie e degli habitat naturali, con risultati positivi nella lotta all'estinzione di numerose specie e habitat naturali.

In seguito alle direttive dettate dalla [Convenzione sulla Biodiversità](#), definita nelle sue linee guida nel corso dell'incontro mondiale tenutosi nel 1992 a Rio de Janeiro, è stata riconosciuta la necessità di impegnarsi nella protezione di tutti quegli elementi che caratterizzano la diversità biologica marina.

L'Italia ha ratificato la Convenzione sulla Biodiversità con la L. n.124 del 14 febbraio 1994.

La [Direttiva Habitat 92/43/CEE](#) recepita con D.P.R. n. 357 dell'8 Settembre 1997, relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali, nonché della flora e della fauna selvatiche, prevede che gli stati membri dell'Unione individuino sul proprio territorio aree che ospitano specie animali, vegetali e habitat la cui conservazione è considerata una priorità di rilievo europeo. L'Italia ai sensi delle Direttive 92/43/CEE e 79/409/CEE, con la collaborazione delle Regioni, ha segnalato alla Commissione Europea, un elenco dei [Siti di Importanza Comunitaria \(SIC\) e Zone di Protezione Speciali](#), tra i quali figurano numerosi SIC a mare.

La [Convenzione di Barcellona](#) relativa alla protezione del Mar Mediterraneo dall'inquinamento (1978) ratificata con legge 21 Gennaio 1979 n. 30, in seguito all'emendamento dalla Conferenza dei Plenipotenziari delle Parti Contraenti, tenutasi a Barcellona nel 1995, cambia titolo diventando "*Convenzione per la protezione*

dell'ambiente marino e la regione costiera del Mediterraneo" e amplia il suo ambito di applicazione geografica comprendendo le acque marine interne del Mediterraneo e le aree costiere.

La Convenzione mantiene la sua natura di quadro programmatico di riferimento, la cui attuazione deve essere realizzata mediante l'adozione di specifici protocolli che concretizzano i principi in essa enunciati con riguardo alle varie forme di inquinamento.

Il protocollo relativo alle Aree Specialmente Protette e la Biodiversità in Mediterraneo ([Protocollo ASP](#)), prende in considerazione anche le specie protette e quelle sfruttate commercialmente; prevede inoltre l'istituzione di Aree Speciali Protette di Importanza Mediterranea (ASPIM), con criteri che prendono in considerazione il grado di biodiversità vero e proprio, la peculiarità dell'habitat e la presenza di specie rare, minacciate o endemiche.

CAPITOLO 1

1.1 CONSIDERAZIONI GENERALI

1.1.1 Aspetti filogenetici di *Posidonia oceanica*

La storia di questa pianta è molto singolare e ancora oggi, la sua evoluzione, ha aspetti irrisolti.

Verso la fine del periodo Cretaceo, alla fine dell'Era secondaria, circa 120 milioni di anni fa, *Posidonia cretacea*, una fanerogama terrestre ha ricolonizzato nell'ambiente marino, seguendo un percorso evolutivo inverso rispetto alla naturale tendenza di tutte le forme viventi tese alla conquista delle terre emerse (*Janssen and Bremer, 2004*).

Per cercare di spiegare come sia avvenuta la migrazione in mare di questa pianta sono state avanzate diverse ipotesi. La più attendibile, avanzata da Den Hartog (1970), e supportata da studi comparati sulla morfologia delle specie attuali e fossili, e sulla loro distribuzione. Secondo questo autore in un primo momento, da questa pianta distribuita lungo la zona di marea, al confine tra terra e mare si sono evolute specie in grado di sopportare immersioni sempre più prolungate. Quando in seguito l'impollinazione *idrofila*, cioè la dispersione del polline attraverso l'acqua, ha sostituito quella *anemofila*, la *Posidonia* è stata capace di vivere completamente sommersa in mare.

Oggi questa pianta presenta tutti i requisiti per vivere nei mari; infatti è capace di accrescersi in un mezzo salino, ha sviluppato mezzi di ancoraggio tali da ben contrapporsi all'azione delle onde ed è dotata di impollinazione idrofila.

Da questo punto di vista, questa fanerogama marina può essere paragonata ai cetacei: in entrambi i casi, infatti, si ha a che fare con membri di raggruppamenti evolutesi sulla terraferma (i mammiferi nel caso dei cetacei), ritornati successivamente al mare.

Posidonia oceanica, discendente da quell'antico progenitore, mistero biologico di un passato remoto, costituisce oggi il più importante endemismo del mar Mediterraneo.

I primi reperti fossili del genere *Posidonia*, che sembrano risalire al Cretaceo indicano, inoltre che questa pianta è stata una delle prime piante superiori a colonizzare il mare.



Fig. 1 Pianta di *Posidonia oceanica* con *Pinna nobilis*

Oltre a *Posidonia oceanica* si incontrano comunemente nel bacino del Mediterraneo altre fanerogame marine:

-*Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, che forma estesi prati di 1 m fino a circa 20 m di profondità ed è, dopo *P. oceanica*, la specie che ha maggiore diffusione .

-*Zostera noltii* Hornemann; è una specie molto frequente lungo le coste atlantiche europee. In Mediterraneo si trova in acque molto superficiali (comprese nei primi 5m di profondità) e spesso forma prati misti con *Cymodocea nodosa*.

-*Halophila stipulacea* (Forsk.) Ascherson; è una specie molto diffusa nel Mar Rosso ed è l'unica fanerogama tropicale che è riuscita ad insediarsi nel Mediterraneo, quanto meno nelle regioni del Sud-orientale, migrando attraverso il canale di Suez (*Boudouresque and Verlaque 2002, Verlaque, 1994*).

1.1.2 Distribuzione geografica

Il genere *Posidonia*, originatosi nel corso dell'Era secondaria, occupava l'antico mare della Tetide che ricopriva un' ampio areale corrispondente all'attuale posizione geografica del Brasile e dell'Australia.

La frammentazione del bacino avvenuta in tarda era terziaria, a causa delle variazioni climatiche e geologiche, ne determinò, nei periodi Miocenico e Pliocenico (da 10 ad 1,8 milioni di anni or sono), una lenta e graduale evoluzione ed una distribuzione delle diverse specie del genere presenti anche oggi lungo le coste australiane.

La specie *oceanica* si diffuse nel bacino sarmatico durante il periodo Miocenico e rappresenta quindi nel corso dell'evoluzione un tipico esempio di relitto paleomediterraneo.

Oggi la *Posidonia oceanica* svolge un'importante effetto trainante nei processi di speciazione di alcune specie di Briozoi ed Idrozoi, epizoiche sulle foglie di *Posidonia* e divenute nel tempo forme endemiche mediterranee, quale ad esempio l'idrozo *Sertularia perpusilla* ed il briozoo *Electra posidoniae*. (Fig.2)

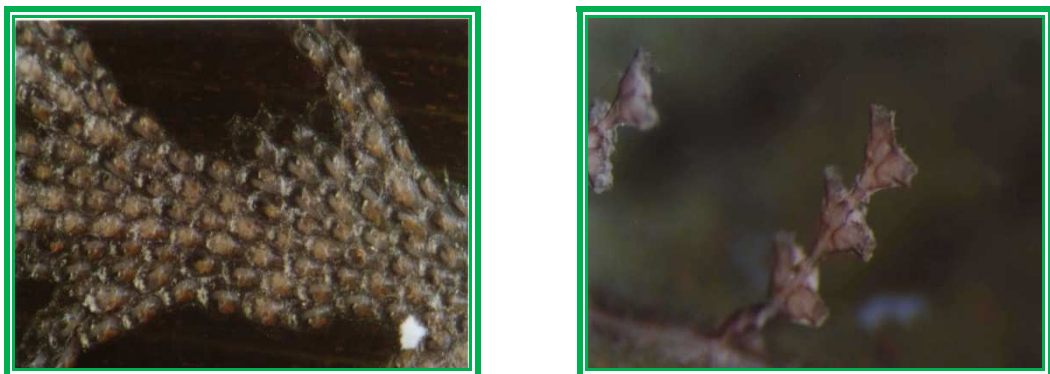


Fig. 2 Briozoo *Electra posidoniae* a sinistra e a destra Idrozo *Sertularia perpusilla*

L'attuale distribuzione geografica delle praterie di *Posidonia oceanica* dimostra l'ampia diffusione della specie presente lungo le coste dei bacini occidentale ed orientale del Mediterraneo ad eccezione dello Stretto di Gibilterra dove le condizioni chimico-fisiche del mare non ne consentono l'impianto (Conde Poyales, 1989)

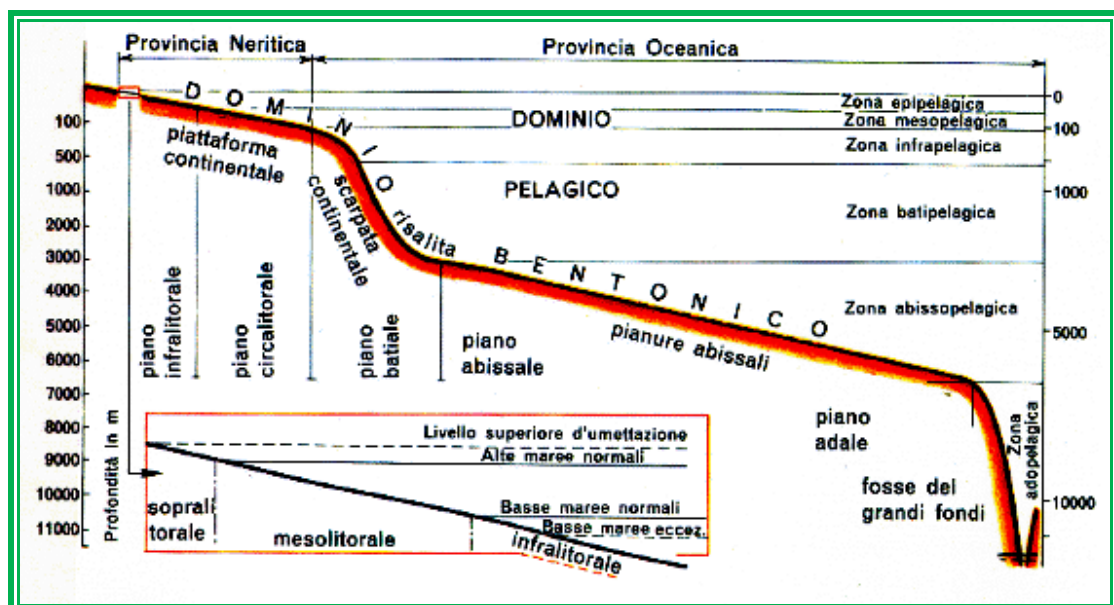
1.1.3 Ecosistema Marino

Prima di affrontare lo studio delle praterie di *Posidonia oceanica* è opportuno accennare brevemente, alle principali suddivisioni in cui è ripartito l'ambiente marino e gli organismi che si trovano in esso.

Procedendo dalla linea di riva verso profondità maggiori si osserva una successione di variazioni ambientali che, pur con caratteristiche locali e regionali, dovute alla topografia, al substrato, all'andamento delle correnti ecc., presenta aspetti ripetibili.

Inoltre lo studio dell'ambiente marino non può prescindere dalla conoscenza delle caratteristiche chimiche, fisiche e dinamiche dell'acqua. Questi parametri condizionano, infatti, tutti i processi di trasporto, di dispersione e accumulo dei sedimenti e di ogni sostanza sversata in mare, ma soprattutto determinano lo stazionamento degli organismi e delle loro associazioni che presentano un andamento in fasce o zone sub parallele alla superficie del mare.

Quindi un piano o zona può essere definito come quella parte di spazio in cui le condizioni ambientali sono più o meno omogenee ed i vari piani sono separati tra loro da discontinuità ambientali e da marcati rinnovamenti floro-faunistici. Fig .3. (Cinelli et al., 2003)



F

fig. 3 Suddivisione dell'ambiente marino

Da un punto di vista esclusivamente morfologico, il fondo del mare viene diviso in quattro unità:

- 1) la *piattaforma continentale*, che bordeggia i continenti con estensione variabile e che arriva in media ad una profondità di circa 200 m,
- 2) la *scarpata continentale*, che presenta una inclinazione media di circa 3° e si estende dal limite della piattaforma continentale fino a circa 3.000-3.500 m, dove si raccorda con la *piana abissale*

3) la *piana abissale* da 3.500 m a 6.500 m.

4) il *piano adale* che corrisponde alle fosse oceaniche oltre i 6.500 m. (S. Raffi e E. Serpagli, 1999)

Un'altra suddivisione dell'ambiente marino viene fatta in base ad una classificazione degli organismi marini a secondo se essi trascorrono la maggior parte della loro esistenza sul fondo marino (*benthos*), galleggiando nella colonna d'acqua (*plancton*), o nuotando attivamente (*necton*). Questa prima suddivisione corrisponde al *dominio pelagico* e al *dominio bentonico*.

Il dominio pelagico è costituito da tutta la massa d'acqua degli oceani ed è quindi tridimensionale, mentre il dominio bentonico si riferisce al substrato di sedimenti e/o di rocce che costituisce il fondo marino ed è quindi essenzialmente bidimensionale.

1.1.4 Zonazione verticale del Dominio Pelagico

Nel dominio pelagico vengono distinte le masse d'acqua al di sopra della piattaforma continentale (*provincia neritica*) da quelle esterne alla piattaforma (*provincia oceanica*).

Inoltre il dominio pelagico viene diviso in zone sovrapposte verticalmente in (Pèrès e Picard 1964):

1) *zona epipelagica*, che comprende lo strato d'acqua eufotico e si estende in media fino a 50 m di profondità; anche se in acque torbide può non superare 15-20 m, mentre in acque limpide può arrivare a 120m; (in questa zona, è bene ricordare, che si hanno le maggiori variazioni dei fattori chimico-fisici ed è anche la zona maggiormente esposta all'inquinamento).

2) *zona mesopelagica*, che corrisponde allo strato oligofotico e si estende in media fino a circa 200 m;

3) *zona infrapelagica*, che si estende dal limite inferiore della zona mesopelagica fino a 600-700 m,

4) *zona batipelagica*, il cui limite inferiore arriva ad una profondità di circa 3.000 m;

5) *zona abissopelagica*, il cui limite inferiore a circa 6.000-6.500 m corrisponde al limite superiore delle fosse oceaniche;

6) *zona adipelagica*, che corrisponde alle masse d'acqua delle fosse profonde. (S. Raffi e E. Serpagli, 1999)

1.1.5 Zonazione verticale del Dominio Bentonico

Per quanto riguarda la zonazione batimetria del dominio bentonico ricordiamo la classificazione fatta da Pérès e Picard (1964) che è la più seguita in Mediterraneo.

Secondo questa classificazione l'estensione dei piani è determinata principalmente da fattori *abiotici* di tipo *climatico* che regolano la distribuzione degli organismi e delle comunità nei piani. Questi fattori sono:

- *l'umettazione* (il grado di umidificazione dei substrati emersi o che emergono temporaneamente);
- *la luce* (penetrazione qualitativa delle radiazioni solari):
- *e la pressione idrostatica*. (S. Raffi e E. Serpagli, 1999)

Ricerche successive, hanno messo in evidenza la necessità di una revisione per quanto riguarda il sistema litorale, che può essere suddiviso in *mesolitorale* ed *infralitorale*. L'esiguità delle maree in Mediterraneo, fa sì che questo piano abbia un'estensione assai limitata, spesso non superiore ad un paio di cm.

Ciò rende cruciale individuare con precisione il livello "zero" definito da Boudoursque e Cinelli "zero biologico" (Cinelli et al., 2003) nel quale compaiono organismi considerati strettamente infralitorali, come le alghe dei generi *Cystoseira* e *Corallina*. Anche tra mesolitorale ed infralitorale è stata ravvisata la necessità di distinguere una situazione di transizione tra mesolitorale ed infralitorale denominata *frangia infralitorale*.

I principali fattori determinanti di zonazione sono l'*emersione* nel mesolitorale e la *luce* nell'infralitorale, mentre la presenza della frangia è legata alla *turbolenza* provocata dal frangersi delle onde, che origina una torbidità locale per inclusione di bolle d'aria che formano uno schermo opaco.

Ma al di sopra del livello del mare possiamo già incontrare i primi organismi marini che si sviluppano sia sulle coste rocciose sia su quelle completamente sabbiose. E' una zona prevalentemente continentale ed è rappresentato dal *piano alofilo*:

-il piano alofilo è un ambiente terrestre ma è fortemente influenzato dall'ambiente marino, quindi la quantità di sale che riceve dagli spruzzi e dall'aerosol comporta la necessità di particolari adattamenti per la vegetazione che vi si sviluppa. Qui troviamo vegetazione prevalentemente terrestre come *Crithmun maritimum* (Finocchio di mare).

Subito al di sotto di questo piano troviamo ancora un piano di transizione tra la terra ed il mare rappresentato dal

- *piano adlitorale*, che può sembrare a prima vista una zona priva di vita ma, soprattutto su substrato calcareo, può essere colonizzato da licheni e cianobatteri.

Il vero ambiente marino comincia dove finisce il piano adlitorale e inizia il piano sopralitorale;

- *piano sopralitorale*, battuto dai venti e dalle onde, è anche definito come piano degli spruzzi. E' una zona dove si hanno forti variazioni della temperatura, della salinità e della luce, essa è quindi, popolata da organismi che non sono mai immersi, ma che richiedono un certo grado di umettazione.

Il piano sottostante chiamato

- *piano mesolitorale*, è l'ambiente in cui la distribuzione degli organismi sessili e di quelli vagili è regolata essenzialmente dall'abbassarsi ed innalzarsi della marea e dall'impatto delle onde, qui gli organismi richiedono o tollerano una temporanea emersione ma non sopportano un'immersione permanente.

Il limite tra il piano mesolitorale e il sottostante:

- *piano infralitorale*, rappresenta lo "zero biologico". In questo piano ci sono organismi che non tollerano emersione, se non occasionalmente, infatti, se il tempo d'emersione è troppo lungo, può determinare anche la loro morte, A volte è capitato che situazioni di questo genere in alcune zone del Mediterraneo, sono state imputate erroneamente a fenomeni d'inquinamento.

La porzione più superficiale di questo piano detta "*frangia infralitorale*", presenta molto spesso una cintura di alghe brune del genere *Cystoseira*.

In questo piano si localizzano anche la maggior parte delle specie vegetali del Mediterraneo (alghe e fanerogame) ed è il luogo di elezione della specie vegetale forse più importante per la salute del mare: la *Posidonia oceanica*. I fondi sabbiosi alla base delle falesie o le ampie distese di sabbia che si allargano davanti alle baie riparate sono colonizzate dalle verdi praterie di *Posidonia*. Essa rappresenta un vero polmone verde per le acque costiere, riveste un ruolo fondamentale per la vita di moltissimi organismi e per la protezione che offre, smorzando il moto ondosso, alle spiagge antistanti. La *Posidonia* rappresenta inoltre un valido indicatore della qualità delle acque e la sua presenza ancora abbondante sui fondali è riprova dello stato abbastanza buono dei nostri mari.

Il limite inferiore di accrescimento dei posidoneti (tra i 35 ed i 45 m) indica anche la fine del piano infralitorale e il passaggio al

- *piano circalitorale*, o regno dei coralli, e' qui infatti che si concentra la maggior parte della vita sottomarina costituita da quegli organismi biocostruttori che hanno fatto definire questo piano anche come piano coralligeno. (Fig.4)

Coralligeno non tanto e non solo perché è l'habitat del Corallo rosso (*Corallium rubrum*) ma anche perché è uno degli ambienti a maggiore biodiversità che si possano incontrare in tutto il Mediterraneo. (Cinelli et al., 2003)

Con questo piano termina il così detto *sistema litorale o fitale* (chiamato così in quanto in esso è possibile vita fotoautotrofa).

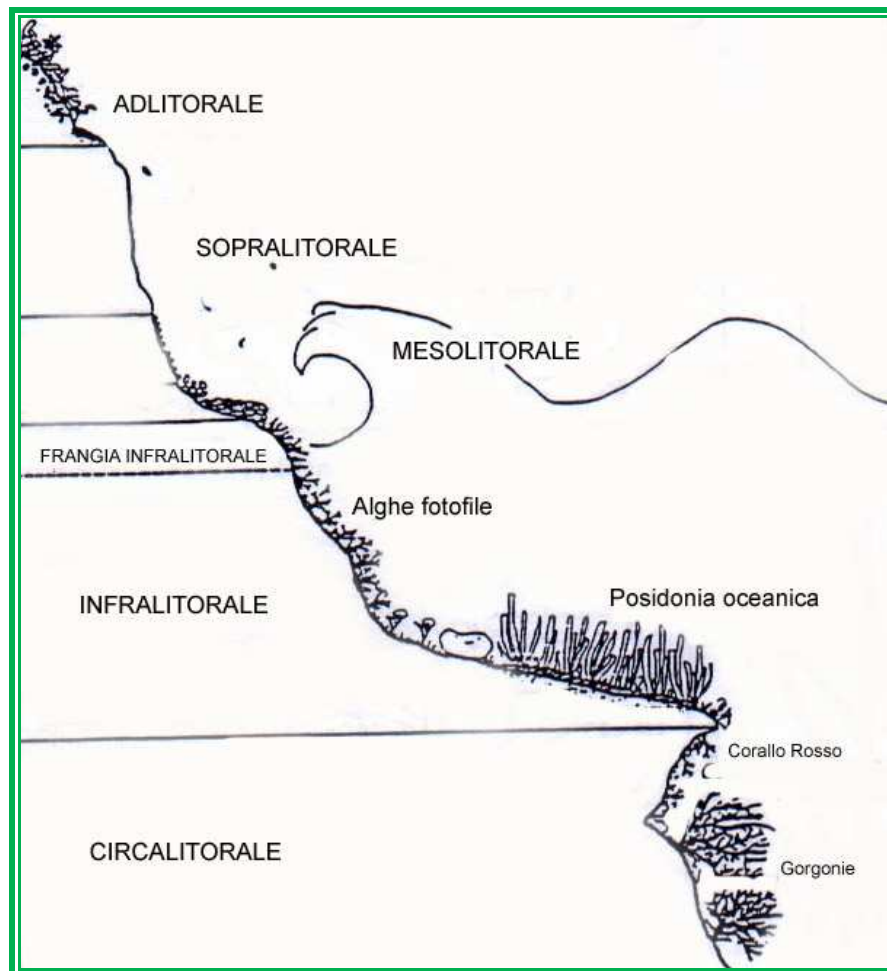


Fig. 4. Schema della zonazione verticale dei popolamenti bentonici del Mediterraneo

Mentre da questo punto in poi si passa al *sistema profondo o afitale*, questo sistema comprende piani caratterizzati dall'assenza di vita vegetale fotoautotrofa:

- *piano batiale*, si estende dal limite inferiore del cicalitorale fino alle prime importanti variazioni faunistiche che si osservano alla base della scarpata continentale (3.000-3.500 m).
- *piano abissale*, si estende da 3.000-5.000 m fino a 6.500-7.000 m, cioè al limite superiore delle fosse. La fauna è caratterizzata in generale da una diminuzione della biomassa e della diversità tassonomica.
- *piano adale*, comprende le fosse più profonde di 6.000-7.000 m. La fauna adale è impoverita e ben distinta rispetto a quella abissale; in particolare è caratterizzata dalla

drastica riduzione o dall'assenza dei predatori e da un aumento dei necrofagi rappresentati in gran parte da anfipodi (crostacei malacostraci). (*S. Raffi e E. Serpagli, 1999*).

1.2 ASPETTI CARATTERISTICI DI *POSIDONIA OCEANICA*

1.2.1 Classificazione Tassonomica

Regno	PIANTE	(<i>Plantae</i>)
Divisione	SPERMATOFITE	(<i>Spermatophyta</i>)
Sottodivisione	ANGIOSPERME	(<i>Angiosperemophytina</i>)
Classe	MONOCOTILEDONI	(<i>Monocotyledonopsida</i>)
Sottoclasse	ELOBIE	(<i>Elobidae</i>)
Ordine	POTAMOGETONALI	(<i>Potamogetonales</i>)
Famiglia	POSIDONIACEE	(<i>Posidoniaceae</i>)
Genere	<i>Posidonia</i>	
Specie	<i>oceanica</i>	

Il nome di *Posidonia oceanica* deriva da *Poseidone* divinità greca del mare.

Questa pianta è già descritta nel “Sistema naturae” di Linneo (scienziato svedese, padre della moderna classificazione delle specie viventi) nel suo “Systema naturae” apparso alla metà del 700.

Le fanerogame più comuni del Mediterraneo, *Posidonia oceanica* (allora chiamata *Zostera oceanica*), *Zostera noltii* (*Phucagrotis minor*) e *Cymodocea nodosa* (*Phucagrotis major*), furono descritte nel 1792 da un naturalista napoletano, Filippo Cavolini.

Il nome definitivo *Posidonia oceanica* (L.) Delile risale al 1813. La sigla tra parentesi si riferisce al primo autore che ha descritto la specie, Linneo appunto, mentre Delile è il nome dello studioso che le ha dato il nome attualmente valido.

Spesso in seguito alle mareggiate invernali è possibile, trovare lungo la costa foglie morte e rizomi. Questi ammassi, sono utilissimi in quanto attutiscono l'impatto delle onde con l'arenile, limitandone l'erosione.

Un altro curioso prodotto del detrito fogliare di *Posidonia* sono delle formazioni rotondeggianti chiamate "palle di mare", o più scientificamente "*aegagropile*", esse non sono altro che agglomerati di fibre che assumono questa forma durante il trasporto ad opera delle onde.

L'utilizzo di questo detrito, da parte dell'uomo, risale ad un periodo abbastanza lontano, infatti esso è stato usato per usi domestici, quali l'isolamento termico di tetti, la confezione di materassi, come imballaggio di materiale fragile, come lettiera per il bestiame, come pacciamatura del terreno, come integratore alimentare per animali da allevamento. In alcuni paesi del Nord Africa venivano anche consumati i frutti di *Posidonia oceanica* (le olive di mare).

Ma, oggi giorno, l'interesse dell'uomo per la *Posidonia* sta cambiando ed in primo piano c'è il ruolo fondamentale che questa pianta riveste nell'ambiente costiero.

1.2.2 Morfologia

La *Posidonia oceanica* (L.) Delile vive generalmente su fondali sabbiosi in presenza di fango e detrito grossolano e non di rado colonizza limitate superfici rocciose.

Essa, quale pianta superiore, è organizzata in radici, rizoma e foglie presenta una riproduzione sessuata mediante fecondazione e formazione di semi e frutti. Come pure una propagazione vegetativa da porzioni staccati dalle mareggiate.

Il rizoma di *P. oceanica* corrisponde ad un fusto modificato dal cui lato ventrale si formano le radici avventizie che, fissandosi al substrato, entrano a far parte del sistema di ancoraggio della pianta. Queste ultime svolgono anche nella loro fase giovanile l'importante funzione di assorbimento delle sostanze nutritive che dal sedimento vengono condotte alle foglie attraverso il tessuto vascolare situato nella parte più interna del rizoma. Successivamente le radici lignificano svolgendo solo funzione di ancoraggio. Le radici presentano uno sviluppo stagionale come le foglie ed hanno un diametro di 3-4 mm circa ed una lunghezza da 1 a 5 cm, con le più vecchie e lunghe arretrate rispetto alle altre (Caye e Rossignol, 1983).

La parte più esterna sia del rizoma sia delle radici va soggetta ad un graduale processo di lignificazione che ostacola i fenomeni di degradazione.

Il rizoma può accrescersi sia in senso orizzontale (*rizoma plagiotropo*), sia in senso verticale (*rizoma ortotropo*); in tal modo la pianta, in ogni momento del suo ciclo vitale, può adattarsi alle diverse condizioni ambientali adottando l'uno o l'altro dei due tipi di crescita.

Lo sviluppo del rizoma è piuttosto lento circa 4 cm per anno per quello plagiotropo e di 1 cm l'anno per quello ortotropo. (*Boudouresque et al., 1984*).

Nella parte superiore del rizoma è situato l'apice vegetativo da cui si originano le foglie organizzate in ciuffi. Ogni ciuffo è composto mediamente da 6-8 foglie, disposte a ventaglio nel quale, foglie più vecchie e più lunghe sono più esterne, mentre quelle più giovani e più corte sono più interne. Le foglie nastriformi di colore verde intenso, hanno l'estremità arrotondata, sono larghe mediamente 1 cm e possono anche superare 1 m di lunghezza. Lo spessore tende ad assottigliarsi dalla base verso l'apice. La funzione fondamentale, delle foglie, è quella della fotosintesi, processo mediante il quale sfruttando l'energia luminosa si convertono molecole inorganiche in carboidrati ed ossigeno. Tale processo avviene nei *cloroplasti*, concentrati negli strati più esterni della lamina fogliare. Altra funzione importantissima delle foglie è quella di regolare il ricambio idrico e ionico della pianta, attraverso scambi con l'ambiente circostante. Le foglie possono assorbire sostanze nutritive anche direttamente dall'acqua.

Ogni foglia risulta costituita da due parti: una *base*, presente nelle foglie che hanno raggiunto un certo grado di sviluppo, ed il *lembo*, che costituisce la parte fotosintetizzante. Il limite tra la base ed il lembo è segnato da una linea concava chiamata "*ligula*" in corrispondenza della quale le foglie di *Posidonia* si staccano, cadendo così dal ciuffo, soprattutto durante il periodo autunnale.

Le foglie hanno una crescita di tipo intercalare, cioè si allungano per formazione di nuovo tessuto prodotto da un meristema basale. In questo modo la loro estremità viene ad essere la parte più vecchia della lamina fogliare e quella che per prima va incontro a fenomeni necrotici e degenerativi, che si manifestano con la colorazione bruna e la rottura delle porzioni terminali. Quando il lembo si stacca per abscissione la base rimane fissata al rizoma, anche grazie al suo maggior contenuto in lignina che ne garantisce una più elevata resistenza meccanica.

Con il tempo le basi si riducono a sottili scaglie che persistono sul rizoma ricoprendolo come un manicotto. Analizzando le variazioni cicliche di spessore di queste scaglie è

possibile risalire all'età della pianta e, con una maggiore approssimazione, a quella della prateria. Tale studio prende il nome di *Lepidocronologia*.

Le foglie si possono suddividere in tre categorie:

- *giovani*, che si trovano al centro del ciuffo, di lunghezza inferiore a 5 cm, prive di base, incolori o verde pallido e traslucide;

- *intermedie*, che si accrescono rapidamente, sono sprovviste di base ed hanno una lunghezza minima di 5 cm;

- *adulte*, presentano una crescita rallentata, sono fornite di base ed hanno una lunghezza molto variabile. Queste foglie assicurano la fotosintesi ed il mantenimento della coesione del fascio. L'aspetto delle foglie presenta variazioni stagionali. D'estate infatti, esse sono molto lunghe e densamente ricoperte di "epifiti" (organismi che si fissano alla pianta usandola come supporto), che ne determinano la colorazione bruna o rosata. Alla fine di agosto, le foglie cominciano ad invecchiare partendo dalle estremità ed assumono una colorazione bruna che sta ad indicare la perdita della capacità

fotosintetica e l'inizio dei fenomeni degenerativi che termineranno con la caduta delle foglie più vecchie e più lunghe in autunno. Così, in questo modo, durante la stagione invernale, i ciuffi appaiono più corti e riacquistano il colore verde brillante per la quasi totale mancanza di epifiti sulla loro superficie fogliare.



Fig. 5 Foglie con epifiti

L'altezza della prateria va poi aumentando con l'avvicinarsi della stagione calda, fino a raggiungere il massimo nel periodo primaverile -estivo, che coincide con il massimo sviluppo degli epifiti. Fig. 5.

La produzione di foglie al centro del fascio è continua nell'arco dell'anno mentre il loro tasso di accrescimento è stagionale essendo minimo in estate e massimo in primavera.

Si deve comunque tenere presente che la formazione e l'accrescimento delle foglie, presenta uno sfasamento temporale tra le praterie superficiali e quelle profonde come del resto il fenomeno della fioritura.

1.2.3 Riproduzione

Un'intera pianta è in genere costituita da un rizoma tracciante plagiotropo da cui possono originarsi altri rizomi, sia plagiotropi sia ortotropi, portanti i ciuffi di foglie. Le varie piante possono in seguito intersecarsi fra loro dando origine ad una struttura in cui è difficile, distinguere le singole unità. Questo processo di sviluppo viene definito "stolonizzazione". Porzioni di stoloni staccati dall'idrodinamismo danno luogo alla riproduzione vegetativa che contribuisce alla sua propagazione.

Posidonia oceanica produce fiori ermafroditi, cioè formati da una parte maschile (stami), che circonda una parte femminile (carpello).

I fiori sono raggruppati in particolari infiorescenze di colore verde, che sono portate da uno stelo inserito nel centro del ciuffo e sono avvolte per tutta la loro lunghezza da due brattee floreali. (Fig. 6 e 7).



Fig. 6 Fiore di *P.oceanica*.



Fig. 7 Frutto di *P.oceanica*

Nelle praterie superficiali, fino ai 15 m di profondità, i fiori compaiono nei mesi di settembre-ottobre. Nel tardo autunno è già possibile osservare l'inizio dello sviluppo dei frutti, che maturano nei mesi di marzo-aprile. Nelle praterie profonde, oltre i 15 m di profondità, questo ciclo si presenta identico, ma ritardato nel tempo di circa due mesi (Mazzella et al., 1984).

Il frutto di *Posidonia* è chiamato "oliva di mare" poiché ricorda nella forma e nelle dimensioni il frutto dell'olivo. Giunto a maturazione completa il frutto si stacca dalla pianta madre e galleggia sulla superficie dell'acqua in quanto l'involucro esterno

(pericarpo) è poroso e ricco di sostanze oleose. In tal modo il frutto viene trasportato dal vento e dai movimenti dell'acqua anche in luoghi molto lontani dalla prateria di provenienza. In seguito all'apertura del pericarpo, il seme esce e, caduto sul fondo, se incontra le condizioni ambientali favorevoli, può iniziare il processo di germinazione. Questo tipo di dispersione del seme ha permesso alla pianta di colonizzare vasti spazi.

I frutti, tuttavia, possono spesso non giungere a maturazione e quindi degenerano, come le altre parti vegetative, assumendo una colorazione bruno-nerastra; in questo stato possono persistere nel ciuffo anche diversi mesi.

In passato si riteneva che i fenomeni della fioritura fossero abbastanza rari, data anche la scarsa attenzione prestata dagli studiosi a questo particolare aspetto della biologia della pianta.

Recentemente le osservazioni condotte nelle praterie sia superficiali che profonde, hanno dimostrato che la fioritura è un fenomeno più frequente di quanto si ritenesse, del quale tuttavia non si conoscono ancora in dettaglio la periodicità ed i fattori che ne regolano l'insorgenza.

1.2.4 Serie evolutiva e substrato d'impianto

Come le piante terrestri superiori anche la *Posidonia oceanica*, essendo provvista di radici, risulta condizionata nei processi di impianto iniziale e nel successivo accrescimento vegetativo, dalle caratteristiche chimico-fisiche e granulometriche del substrato.

I semi di *Posidonia*, infatti possono occasionalmente germinare su fondi duri ma in genere si sviluppano su substrati mobili costituiti da sabbie a granulometria grossolana preventivamente fertilizzata dall'opera colonizzatrice di organismi vegetali pionieri che arricchiscono il sedimento di sostanze organiche. Nel corso di questo lungo processo evolutivo si impianta inizialmente una prima associazione vegetale di alghe brune del genere *Cystoseira*; segue un secondo stadio intermedio costituito da praterie di *Cymodocea nodosa* (specie affine a *Posidonia oceanica*).

Su questo strato ben stabilizzato ed umificato dall'opera delle *Cymodocee* germinano i semi di *Posidonia* dai quali si sviluppano minute radici mentre i rizomi plagiotropi iniziano a crescere orizzontalmente ad un ritmo di circa 5-10 cm all'anno. Questo fitto intreccio tra radici e rizomi in graduale crescita costituisce una trappola per i sedimenti; infatti, sabbie, detriti organici ed alghe calcaree del genere *Melobesia* riempiono gli spazi tra i rizomi e fertilizzano ulteriormente il substrato, mentre inizia la crescita

verticale dei rizomi ortotropi per contrastare il fenomeno della sedimentazione che rischia di ricoprire le giovani plantule, si costituisce così la base della prateria.

Le caratteristiche biologiche e la dinamica evolutiva della biocenosi sono condizionate non solo dai fattori edafici legati alla natura del substrato, ma anche da alcuni parametri abiotici quali la luce e l'idrodinamismo.

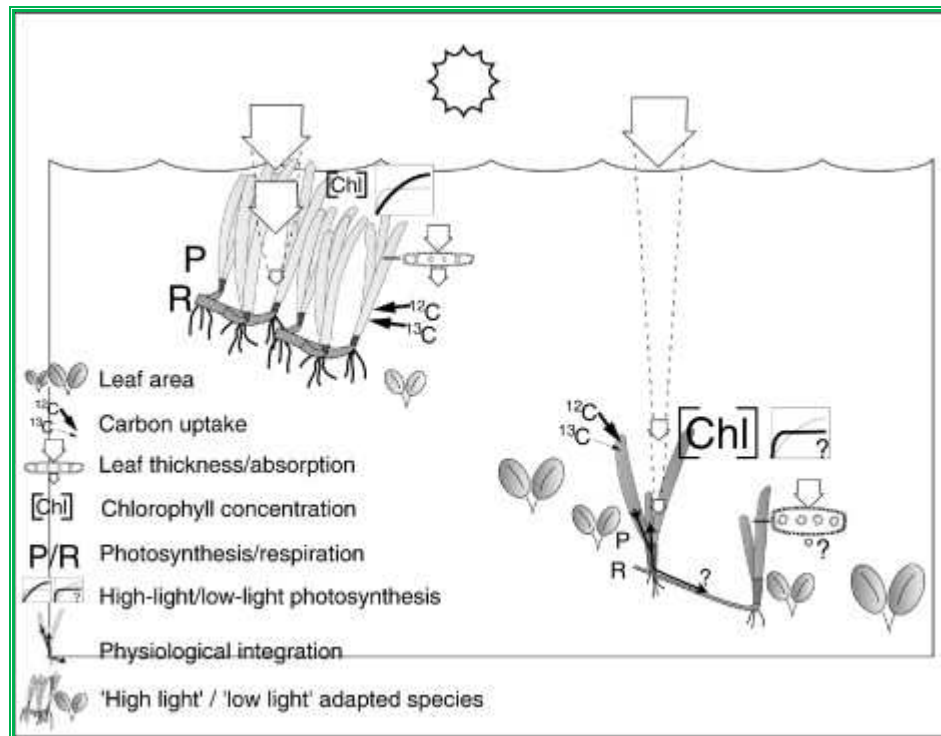


Fig 8 Modello concettuale che mostra gli adattamenti fisiologici e morfologici alle diverse condizioni luminose fra una prateria superficiale ed una profonda. La prateria superficiale mostra una elevata densità dei fasci fogliari e con una porzione ipogea molto sviluppata e tassi di fotosintesi e respirazione alti; nella prateria profonda le foglie sono più larghe e contengono una maggior quantità di pigmenti clorofilliani.

Il grado di penetrazione quantitativo e qualitativo della luce solare provoca modificazioni fisiologiche nelle foglie di *Posidonia* influenzando la concentrazione del pigmento “clorofilla a” contenuto nei cloroplasti. E’ stato, infatti dimostrato che in acque profonde, al di sotto dei 30 m di profondità, dove minore è l’intensità luminosa, la concentrazione del pigmento fotosintetico risulta essere tripla rispetto alle foglie delle piante che vivono in superficie, in modo da poter sfruttare al meglio le ridotte disponibilità luminose ambientali.

Anche il movimento delle acque provoca variazioni morfologiche nelle foglie di *Posidonia* che appaiono più corte e compatte a ridotte profondità dove maggiore risulta essere il grado di idrodinamismo, mentre sono più lunghe e rade in acque calme e profonde (Fresi et al., 1979; Ralph et al., 2007).

1.2.5 Matte

Una delle caratteristiche particolari del rizoma di *P. oceanica* è la capacità di accrescersi anche “in verticale”, sia per contrastare il progressivo insabbiamento dovuto alla continua sedimentazione, sia per sfruttare al massimo lo spazio e la luce disponibile. I due tipi di crescita del rizoma (orizzontale e verticale) permettono alla pianta di colonizzare aree contigue e determinare un innalzamento del fondo marino dando origine ad una tipica formazione a “terrazzo” chiamata con il termine francese di “matte”. (Fig.8)

La “matte” è costituita da un complicato intreccio formato da più strati di rizomi di vecchie piante e da sedimento intrappolato tra queste e fortemente compattato, la sua sommità è ricoperta dai fasci di foglie viventi. Il ritmo di innalzamento della “matte” dipende in primo luogo dal ritmo di accrescimento della *Posidonia*, tuttavia, tra i fattori ambientali che influiscono sulla sua edificazione, il più importante è l’esposizione della prateria alla forza dei movimenti dell’acqua e al regime delle correnti. In alcune zone particolarmente riparate, infatti, dove la deposizione del sedimento è maggiore, la prateria, per opporsi all’infangamento, può innalzarsi fino a provocare l’emersione delle foglie e formare con la “matte” una specie di barriera naturale. Al contrario, in zone particolarmente esposte, la “matte” ed il sedimento ivi presente possono venire scalzati ed erosi con conseguente regressione della prateria stessa.

L’innalzamento della “matte” è stato mediamente stimato di 1 metro al secolo. Se si considera che ci sono “mattes” alte 4-5 m ci si può fare una idea della longevità delle praterie.



Fig. 9 Struttura della “matte” di *Posidonia oceanica*.

In seguito ad un peggioramento delle condizioni ambientali, che possono provocare la morte delle piante, la “matte” persiste con l’intreccio dei soli rizomi e radici morte e la sua sommità può essere colonizzata da alghe o altre piccole fanerogame quali *Cymodocea nodosa* e *Zostera noltii*.

1.2.6 Prateria

L’estensione e la morfologia delle praterie di *P. oceanica*, sia in profondità e sia lungo la costa, è dovuta all’interazione di diversi fattori come la sedimentazione, la densità fogliare della prateria, l’esposizione dalla prateria al moto ondoso, alle correnti ed alla loro intensità, alla trasparenza delle acque e al clima.

Inoltre va ricordato che questa fanerogama ha la capacità di modificare, spesso in maniera notevole, il substrato originario di impianto, sia esso sabbioso o roccioso, questo fenomeno è dovuto all’azione frenante che lo strato fogliare di questa fanerogama esercita sui movimenti dell’acqua, riducendone l’intensità.

In questo modo le particelle in sospensione nella colonna d’acqua sedimentano con più facilità e quindi la *P. oceanica* può considerarsi una vera e propria “trappola” per i sedimenti fini si osserva infatti che il substrato dove sono presenti le praterie è sempre più fangoso rispetto a quello non colonizzato dalla pianta.

L’azione frenante delle foglie riduce anche l’impatto delle onde sul litorale, perciò le praterie di *Posidonia* costituiscono una importante cintura naturale di contenimento e di protezione delle coste dall’azione erosiva del moto ondoso.

E’ stato infatti stimato che la regressione di un solo metro di prateria può provocare la perdita di 15-18 m di litorale sabbioso.

Un parametro efficace per valutare lo stato di salute di una prateria di *P. oceanica* è la densità dei fasci fogliari, definita come numero dei ciuffi presenti in ogni metro quadrato di substrato.

In base a questo parametro si possono distinguere vari stadi della prateria definiti da *Giraud* (1977):

Generalmente la densità è elevata nelle praterie superficiali (fino a 15 m circa) e va progressivamente diminuendo in profondità.

In relazione anche alla densità si riconoscono praterie uniformi e continue, cioè con una distribuzione più o meno regolare e senza evidenti interruzioni lungo l’intervallo di profondità o il tratto di costa sui quali si estendono. Esistono però anche praterie molto irregolari, con numerose interruzioni ed una distribuzione non uniforme della densità.

Altre ancora sono costituiti da insiemi di raggruppamenti di piante distinti tra loro che, nel complesso, conferiscono alla prateria un tipico aspetto “a macchie”.

All’interno delle praterie, per comodità di descrizione del loro aspetto generale da parte degli studiosi, vengono individuate un *limite superiore* ed un *limite inferiore*.

Il limite superiore è il punto in cui la prateria inizia partendo dalla linea di costa, mentre il limite inferiore è il punto in cui la prateria termina in profondità.

Il limite superiore di una prateria è sempre molto netto, a qualunque profondità la prateria inizi, la densità piuttosto elevata molto spesso presenta la “matte”.

Il limite inferiore invece può avere conformazioni diverse, tra le quali distinguiamo:

a) *limite progressivo*: il ricoprimento della pianta sul fondo è inferiore al 50%; la densità dei ciuffi diminuisce progressivamente e questi tendono a disporsi parallelamente al senso di pendenza; la “matte” generalmente è assente ed i rizomi hanno una crescita plagiotropa. Questo tipo di limite indica che la luce è il fattore che principalmente regola la crescita e la colonizzazione della pianta a maggiore profondità.

b) *limite netto*: il ricoprimento della pianta sul fondo è superiore al 50%; la prateria ha un margine di interruzione ben definito e netto, la “matte” è generalmente assente. Questo tipo di limite indica che la crescita è impedita dal tipo di sedimento o dalla natura e morfologia del fondo.

c) *limite di erosione*: il ricoprimento della pianta sul fondo può essere anche molto elevato (100%); la prateria termina bruscamente, spesso evidenziando lo scalino formato dalla “matte” che appare profondamente incisa. Questo tipo di limite indica che la presenza di correnti di fondo impedisce alla prateria di avanzare ed anzi in alcuni casi la fa regredire provocandone l’erosione.(Fig.10)

I fenomeni di erosione dovuti al movimento delle acque possono provocare la formazione di altre strutture quali “canali” e “radure”.

I così detti canali “*intermatte*” sono solchi scavati all’interno della prateria in cui il substrato originario d’impianto viene messo a nudo.

Le radure hanno invece una forma più o meno circolare, dovute probabilmente a turbolenze locali della corrente in prossimità di corpi solidi (come formazioni rocciose) o di rilievi della “matte”.

L'estensione di queste strutture dipende dall'intensità e persistenza delle correnti marine.

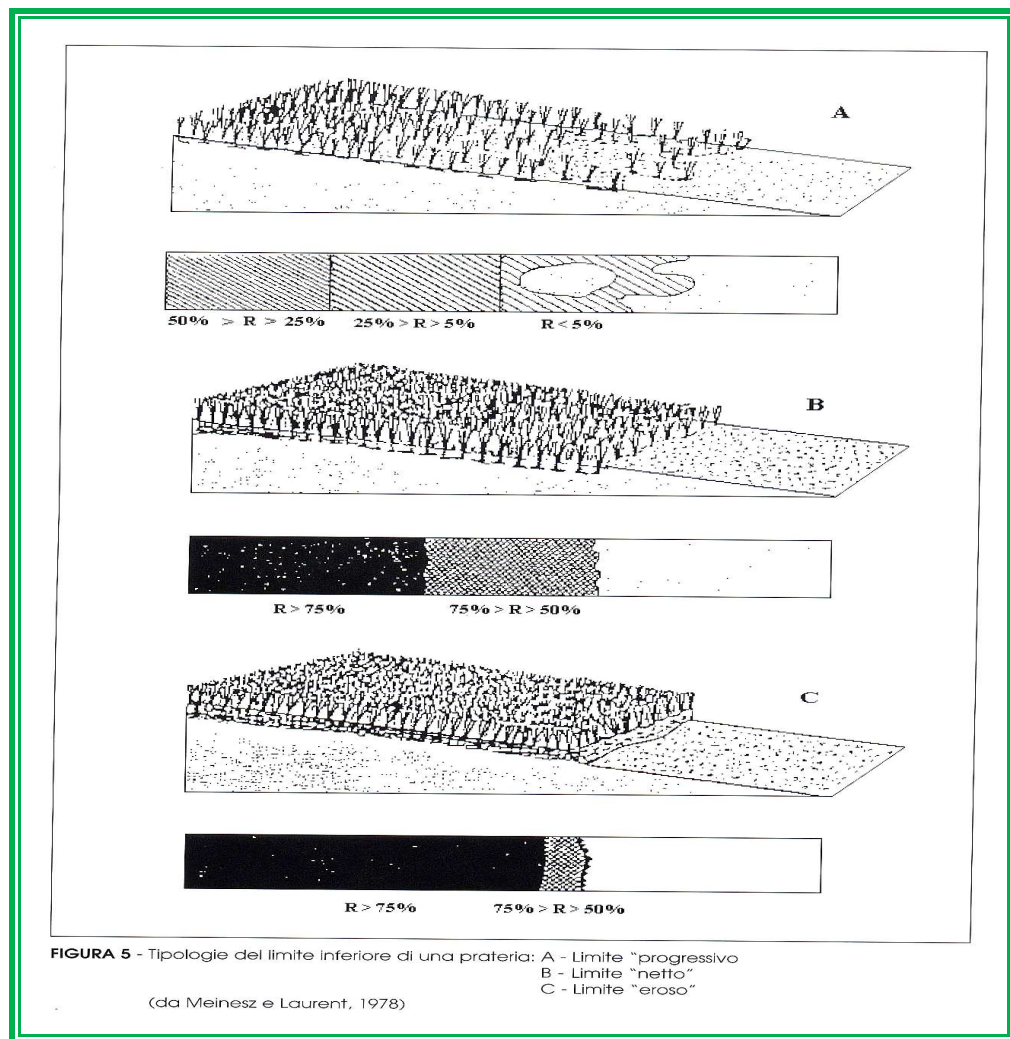


Fig.10 Tipologie di limite inferiore di una prateria

In queste radure e nei canali inter-"matte", in autunno, si accumulano grosse quantità di detrito fogliare bruno che, con le prime mareggiate, viene riversato sulle spiagge dove forma i caratteristici cumuli detti con il termine francese "*banchette*".



Fig. 11 Caratteristiche “*banquettes*”

Un altro tipo di formazione particolare sono gli “*atolli*”, queste formazioni si trovano solo in alcune praterie delle coste tunisine e siciliane. Tali atolli ricordano le formazioni coralline degli oceani Pacifico ed Indiano, infatti la *Posidonia* si dispone ad anello intorno ad una radura centrale, Probabilmente in relazione, ancora una volta, ai movimenti dell’acqua (Calvo e Fradà Orestano, 1984; Calvo et al., 1996).

CAPITOLO 2

2.1 OBIETTIVI DELLA RICERCA

Negli ultimi anni, gli sforzi dei ricercatori si sono concentrati anche verso un recupero degli ambienti marini in generale e dell'ecosistema costituito dalle praterie di *Posidonia oceanica* in particolare.

La presente tesi di dottorato s'inserisce nell'ambito del recupero dell'ambiente marino costiero mediante la riforestazione delle praterie di *Posidonia oceanica*, attraverso il taleggio di piante rigogliose.

Nella letteratura esistente in merito agli studi di reimpianto di talee di *Posidonia oceanica* si riscontrano difficoltà oggettive che possono essere così riassunte:

- Primo fra tutte l'elevata mortalità delle talee a causa di infezioni batteriche e fungine che si sviluppano al livello della porzione recisa del rizoma (Meinesz *et al.*, 1990).
- La difficoltà di attecchimento delle talee trapiantate imputabili all'incapacità di formare un apparato radicale sufficientemente sviluppato da resistere alle forze dell'idrodinamismo marino (Lepoint *et al.*, 2002).
- La necessità di effettuare un trattamento esogeno e locale delle talee evitando la dispersione delle sostanze nell'ambiente esterno sia in acquario che in ambiente marino. In lavori precedenti in letteratura per isolare le talee in mare da trattare queste erano ricoperte mediante buste di plastica in modo da creare un micro ambiente nel quale iniettare la sostanza per il trattamento (Lepoint *et al.*, 2002). Tale metodo oltre ad essere esteticamente deprecabile e a creare un impatto ambientale nell'ecosistema, non è di facile utilizzo. Oppure la sostanza per il trattamento è stata direttamente disciolta nell'acqua degli acquari nei quali erano contenuti le talee da trapiantare (Balestri, Lardicci, 2006).

Di conseguenza, date queste problematiche irrisolte l'obiettivo primario del mio dottorato di ricerca è quello di ideare un metodo per la risoluzione di tale problema dovute all'elevata mortalità delle talee reimpiantate. Puntando l'attenzione sulla possibilità di aumentare la rizogenesi e lo sviluppo delle talee di partenza per facilitarne l'attecchimento al substrato. Nelle fanerogame terrestri la rizogenesi avventizia è stimolata dal monossido di azoto (NO) (Pagnussat *et al.*, 2003), per cui tale effetto si potrebbe ipotizzare anche in cormofite riadattate all'ambiente marino.

Per perseguire questi obiettivi si sono programmati due tipi di ricerche:

- 1) la coltivazione in acquario di talee di *Posidonia oceanica* in condizioni controllate da sottoporre a trattamenti esogeni per stimolare la rizogenesi e la crescita delle talee;
- 2) il reimpianto in mare delle talee nelle quali sono stati ottimizzati le condizioni di sopravvivenza ed attecchimento.

Il conseguimento di queste due filoni ha richiesto come *conditio sine qua non* la risoluzione di alcune problematiche già riscontrate in letteratura.

Gli acquari essendo un ambiente delimitato e controllabile hanno permesso di effettuare le osservazioni con maggiore facilità e di sperimentare i trattamenti ottimali per stimolare la crescita delle talee da destinare successivamente al reimpianto in mare. La sperimentazione in mare permette inoltre la comprensione dei limiti che l'ambiente marino impone.

Poiché i due filoni di ricerca si sono dimostrati non indipendenti bensì complementari, la risoluzione delle problematiche necessariamente doveva essere unica e ha condotto all'ideazione del brevetto n° **CS 2007 A000018 del 19/04/07**.

Per la raggiunta degli obiettivi sopra elencati si è reso necessario il continuo e costante monitoraggio di tutte le talee sottoposte ai diversi esperimenti. Per ciò che riguarda gli esperimenti in acquario e il primo reimpianto in mare il monitoraggio si è effettuato mediante la misurazione dello spostamento del foro praticato alla base di ciascun fascio fogliare al momento iniziale della sperimentazione e mediante il conteggio delle foglie nuove prodotte.

Nel secondo reimpianto in mare il monitoraggio si è effettuato mediante analisi fenologiche e del ricoprimento percentuale degli epifiti fogliari e del rizoma.

2.2 ASPETTI METABOLICI E RITMI DI CRESCITA IN *POSIDONIA OCEANICA*

Prima di affrontare gli studi sulle talee di *Posidonia oceanica* in acquario è opportuno richiamare il pattern metabolico di elementi quali azoto e carbonio ampiamente studiati nelle fanerogame marine.

2.2.1 Metabolismo dell'azoto

Come le altre specie di fanerogame marine, *Posidonia oceanica*, risponde alla propria domanda di azoto sia mediante l'assorbimento per mezzo delle foglie che delle radici. La pianta è inoltre capace di accumulare riserve di azoto nelle foglie e nel rizoma, che possono essere successivamente riciclati. L'azoto è assorbito sia sotto forma di NO_3^- che di NH_4^+ , quest'ultimo è assorbito dalle radici sei volte più rapidamente rispetto al nitrato.

Al fine di valutare le variazioni nell'assorbimento dell'azoto in *Posidonia* sono stati condotti alcuni esperimenti utilizzando l'isotopo ^{15}N . Nella Baia Ravellata (Corsica) a 10 m di profondità i trattamenti sono stati effettuati utilizzando delle buste di plastica a tenuta nelle quali è stata iniettata con una siringa una soluzione di Solfato di Ammonio marcato con l'isotopo ^{15}N . La concentrazione dell' ^{15}N nelle piante è stata poi misurata mediante spettrometria di massa (Lepoint et al, 2002).

I risultati ottenuti da questo studio hanno permesso di stabilire che durante l'inverno e agli inizi della primavera, quando la concentrazione di azoto è più elevata nell'ecosistema la pianta assorbe mediante le foglie e le radici una quantità di azoto superiore alle proprie necessità, cosicché l'eccesso assorbito viene accumulato nelle foglie e nel rizoma. Nel periodo di tempo compreso fra Ottobre e Giugno invece è l'assorbimento di azoto esterno a sostenere la crescita fogliare, difatti nelle nuove foglie si nota una netta diminuzione della concentrazione di ^{15}N imputabile ad una sua diluizione con l' ^{14}N proveniente dall'ambiente esterno. Per quanto riguarda il periodo compreso da Giugno ad Ottobre la crescita fogliare è sostenuta dal riciclo dell'azoto immagazzinato all'interno della pianta, come dimostrato dal fatto che nelle foglie raccolte in questo periodo la concentrazione di ^{15}N è maggiore di quella che ci si sarebbe attesa senza un riciclo di azoto. Del resto in questo periodo la concentrazione di azoto è più bassa nell'ecosistema ed è stato stimato che il riciclo dell' ^{15}N interno copre circa il 40% del fabbisogno annuale.

	Ottobre- Giugno ¹	Giugno- Ottobre
Richiesta di azoto	Assorbimento di azoto, maggiore del fabbisogno della pianta.	Il riciclo dell'azoto accumulato, sostiene il fabbisogno della pianta.

Tab. 1: Stagionalità della richiesta di azoto in *Posidonia oceanica*

La concentrazione fogliare dell'azoto diminuisce con l'avanzare dell'età fogliare; questo fenomeno molto probabilmente è da imputare al fatto che l'azoto accumulato all'interno delle foglie vecchie, prima che queste cadano, viene riciclato per sostenere la produzione di nuove foglie e la crescita delle foglie giovani (Lepoint *et al.*, 2002).

Ulteriori esperimenti sono stati condotti anche su talee trapiantate ad una profondità di 17 m nella Baia Ravellata (Corsica) utilizzando sempre azoto marcato (N15) (Lepoint *et al.*, 2004).

In questo caso, nonostante si fosse ottenuta una percentuale di sopravvivenza delle talee piuttosto elevata (90%), queste non erano in grado di soddisfare la loro richiesta di azoto, avevano dimensioni ridotte e presentavano un minor contenuto di azoto rispetto alle piante di controllo.

In inverno, infatti, quando la concentrazione di azoto nell'ecosistema era elevata, le talee non erano in grado di accumulare azoto, così come accade normalmente nelle piante di *Posidonia* in natura. In queste talee l'azoto contenuto nelle foglie era principalmente mobilitato per lo sviluppo delle radici che assumeva una priorità assoluta anche a scapito del fabbisogno fogliare. Infatti il peso secco di queste foglie era sempre più basso rispetto a quelle prelevate in natura. Comunque l'incapacità di accumulare azoto non è da imputare ad una scarsità di nutrienti nell'ambiente, bensì all'inadeguatezza del sistema di assorbimento di N da parte dei germogli trapiantati, poiché in assenza delle radici, le foglie non erano in grado di fornire quantità di azoto sufficienti per rispondere alle necessità della pianta.

¹ Per l'esattezza il maggior assorbimento di azoto da parte di *Posidonia oceanica* si registra nell'inverno e nella prima metà della primavera

Questi risultati dimostrano chiaramente che l'uso di fertilizzanti per incrementare il successo delle riforestazioni delle praterie per mezzo di talee sia inutile (Lepoint et al., 2004).

2.2.2 Metabolismo del Carbonio

La crescita di *Posidonia oceanica* inizia nella stagione invernale e assume i valori massimi nel mese di Giugno, quando ancora l'irradianza non ha raggiunto i picchi più alti della stagione (Fig. 1, c) (Alcoverro et al., 2001).

La lunghezza massima delle foglie viene raggiunta nel periodo che intercorre fra Giugno- Luglio, mentre nel periodo compreso fra Agosto-Settembre compare

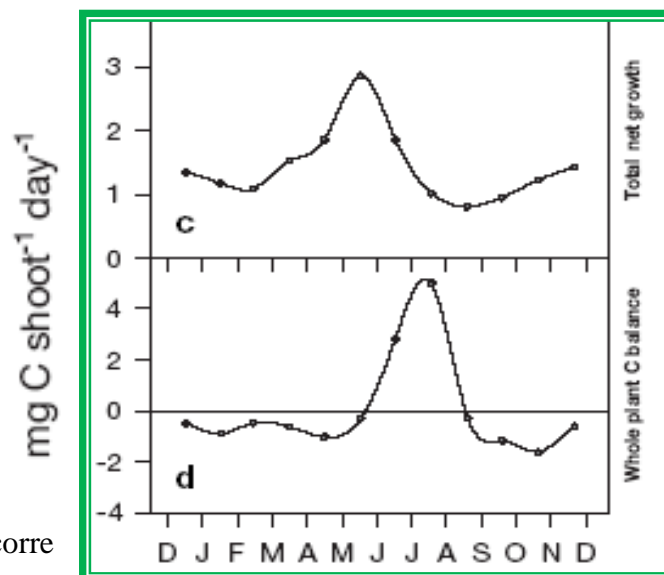


Figura 12: In alto, ciclo annuale di crescita di *Posidonia oceanica*. In basso bilancio del metabolismo del Carbonio.

tessuto necrotico nella parte apicale della foglia ed infine a Dicembre-Gennaio si registra un'elevata abscissione fogliare (Tab. 2). In linea con le osservazioni effettuate nella Baia Ravellata sull'andamento annuale della lunghezza fogliare (Gobert et al., 2002).

T a b e l l a	Dicembre- Gennaio	Giugno-Luglio	Agosto-Settembre
	Abscissione fogliare	Lunghezza fogliare massima	necrosi della porzione apicale della foglia

Tab. 2: Ciclo annuale nelle foglie di *Posidonia oceanica*

Le variazioni della lunghezza delle foglie assume in *Posidonia* un'importanza fondamentale, nel ciclo annuale della pianta. Infatti in estate, la maggiore lunghezza fogliare consente di trattenere una maggiore quantità di nutrienti quando l'ambiente circostante è tipicamente povero di nutrienti. Tale capacità fa sì che anche l'acqua tra le foglie assuma caratteristiche chimiche (concentrazione di nutrienti) e fisiche (temperatura) differenti dalla restante colonna d'acqua. Questi parametri durante

l'inverno sono variati a causa del maggior idrodinamismo, che rimette in sospensione il sedimento, e dalla minore lunghezza fogliare (Gobert et al., 2002).

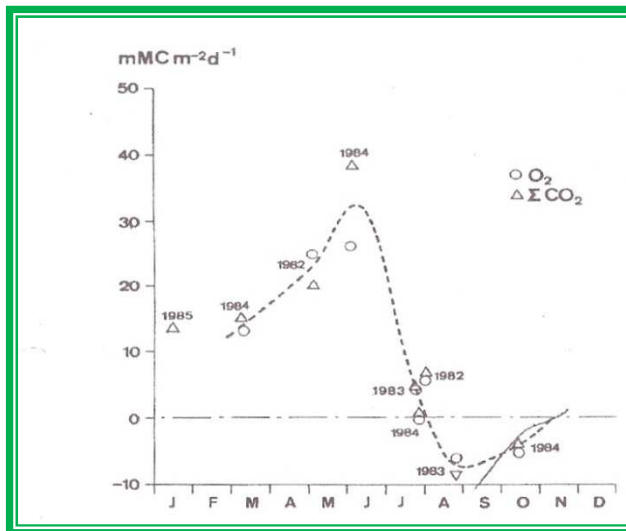


Figura 13: Curva rappresentante il ciclo annuale del Carbonio nel sistema Posidonia; i valori positivi rappresentano il carbonio fissato, quelli negativi il carbonio rilasciato.

Il ciclo di crescita annuale delle foglie rispecchia a grandi linee il ciclo domanda/produzione di Carbonio associata al sistema *Posidonia* compresi gli organismi annessi alla fanerogama quali epifiti, batteri, fauna bentonica ecc..

Uno studio condotto nella Baia di Calvi (Corsica) per quattro anni ha mostrato come il sistema *Posidonia* si comporti nei confronti del Carbonio da sito sink nel periodo compreso fra Dicembre-Giugno con valori massimi

registrati da Maggio a Giugno, che tendono a diminuire nel mese di luglio, e da sito source nel periodo compreso fra Agosto-Novembre (Fig. 13) (Frankignoulle e Bouquegneau, 1987).

Questa ciclicità può essere spiegata considerando che Giugno è il mese nel quale si registra il massimo assorbimento di carbonio e nel quale è maggiore la frazione di radiazione solare che arriva in profondità incrementando la capacità fotosintetica della prateria. Il fatto che il sistema *Posidonia* sia un sito fonte di carbonio nel periodo compreso fra Agosto-Novembre è il risultato di una combinazione di diversi fattori: abscissione delle foglie vecchie, maggiore attività batterica e temperature elevate (Frankignoulle e Bouquegneau, 1987).

Per ciò che riguarda il bilancio totale del carbonio in *Posidonia oceanica* (Fig. 12, d) questo è il risultato combinato del guadagno netto di carbonio (fotosintesi), della sua perdita (respirazione) e della crescita vegetativa. La domanda di carbonio negli organi non fotosintetici come (radici, rizoma e scaglie) raggiunge i valori più elevati nel periodo Maggio-Giugno, soprattutto in concomitanza con la maggiore respirazione delle radici il cui accrescimento è maggiore in questo periodo. Nel complesso il bilancio netto del C alterna periodi caratterizzati da valori negativi (autunno-inverno) e da valori

positivi (Estate); e valori positivi corrispondono ad un accumulo dei carboidrati prodotti in eccesso, sottoforma di saccarosio e di amido.

Dopo la massiccia perdita autunnale delle foglie, quando ancora l'irradianza non ha raggiunto i suoi valori massimi ed il bilancio del carbonio non è ancora positivo. Questa riserva interna di carboidrati sostiene la richiesta respiratoria e la crescita .

L'attività fotosintetica e l'organizzazione del Carbonio raggiungono i valori massimi nel periodo compreso fra Giugno e Settembre, quando le condizioni di luce sono ottimali, il bilancio del Carbonio è positivo e si registra un accumulo di carboidrati che sosterrà la crescita nella stagione successiva.

In *Posidonia*, si assiste perciò ad una curiosa asincronia fra disponibilità di nutrienti e condizioni ottimali di luce. Infatti, nel periodo di Luglio-Agosto quando finalmente il bilancio netto del Carbonio ha raggiunto valori positivi, la disponibilità di nutrienti è scarsa mentre in inverno la disponibilità di nutrienti è elevata, ma le scarse intensità luminose consentono un guadagno netto di Carbonio.

L'accumulo di riserve di carboidrati potrebbe non solo consente alla pianta di giungere al periodo di Luglio-Agosto con una biomassa, ma permette di realizzare una crescita maggiore della pianta durante l'inverno quando è disponibile la massima concentrazione dei nutrienti.

Le variazioni stagionali del contenuto di riserve di carboidrati quali saccarosio ed amido sono sostanziali nei diversi organi della pianta e nelle differenti classi d'età delle foglie. In particolare i valori più elevati sono stati rinvenuti nel rizoma, mentre quelli più bassi nelle foglie vecchie; e comunque i valori sono sempre più elevati nel periodo compreso fra Luglio e Settembre, e più bassi nel periodo compreso fra Febbraio e Maggio (*Alcoverro et al., 2001*)

Maggio-Giugno	Giugno-Settembre	Settembre-Gennaio	Febbraio-Maggio
Picco di crescita vegetativa	Accumulo di Carboidrati	Maggiore disponibilità di nutrienti	Utilizzo delle riserve di Carboidrati
Maggiore richiesta di carbonio	Maggiore capacità fotosintetica	Minor capacità fotosintetica	Inizio crescita vegetativa

Tab. 3 Stagionalità della crescita e del metabolismo del carbonio in *P. oceanica*.

In conclusione nel periodo dell'anno corrispondente ad inverno-primavera si realizza il maggior accumulo di nutrienti, mentre in quello corrispondente all'estate-autunno si verifica il minor tasso di assorbimento e *Posidonia* si sviluppa utilizzando le riserve accumulate.

Questo andamento è in linea con le variazioni naturali della concentrazione dei nutrienti nell'ambiente circostante che registra un massimo in inverno-primavera. Comunque, poiché in *Posidonia oceanica* l'organo deputato all'assorbimento dei nutrienti è principalmente la foglia e non la radice, come accade nelle piante terrestri, in autunno il minor assorbimento di nutrienti può anche essere strettamente correlato l'abscissione fogliare.

La comparsa delle nuove radici avviene alla fine della primavera (giugno), successivamente esse si ramificano durante il periodo estivo, e durante la stagione autunnale raggiungono il massimo di sviluppo.

L'accrescimento radicale si arresta durante l'inverno quando le radici subiscono un processo di suberificazione e sclerificazione, diventando organi deputati solo all'ancoraggio meccanico (*Caye e Rossignol, 1983*).

	Primavera	Estate	Autunno	Inverno
Ciclo di crescita delle radici	Comparsa di nuove radici	Ramificazione delle radici	Massimo sviluppo dell'apparato radicale	Arresto della crescita suberificazione e sclerificazione

Tabella 4. Ciclo di crescita delle radici in *Posidonia oceanica*.

Comunemente le radici in *Posidonia oceanica* vengono considerate come organi prevalentemente di ancoraggio, data la loro lignificazione a maturità, tuttavia esse svolgono un ruolo importante di assorbimento dei nutrienti nelle prime fasi del loro sviluppo.

Questo avviene durante l'autunno, quando lo sviluppo dell'apparato radicale è massimo e l'azoto viene assorbito in eccesso ed accumulato a livello del rizoma (*Lepoint et al., 2002; Pellegrini 1971 a,b*).

I rizomi ortotropi, che non hanno radici funzionali, presentano foglie più lunghe, ma il numero delle ramificazioni e la loro crescita sono inferiori rispetto ai rizomi plagiotropi. Queste osservazioni dimostrano che le radici avventizie sono capaci di partecipare alla nutrizione minerale almeno fino a quando il processo di lignificazione non si è realizzato (Caye e Rossignol, 1983).

In *Posidonia oceanica* la quantità di azoto assorbita per mezzo delle radici ammonta al 35% del fabbisogno annuale (Lepoint et al., 2004).

2.2.3 Effetto del Nitroprussiato di Sodio (SNP)

Il NitroPrussiato di Sodio (SNP) (Fig. 14) è un noto donatore di NO (monossido di Azoto) che è stato provato avere effetto stimolante sulla rizogenesi delle fanerogame terrestri (Pagnussat et al., 2002; 2003).

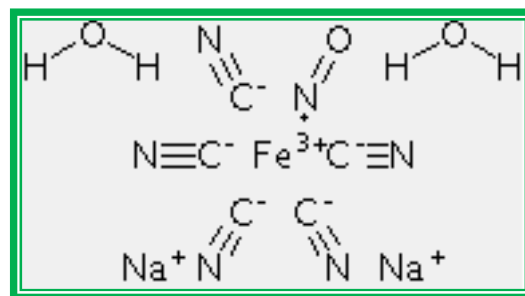


Figura 14: Sodio Nitroprussiato

L'NO è un gas diffusibile attraverso la membrana plasmatica coinvolto in numerosi

processi fisiologici di specie anche filogeneticamente molto lontane; i suoi effetti sono, per esempio, noti nei mammiferi (nei quali esso media la vasodilatazione, è coinvolto nella trasmissione nervosa e nella risposta immunitaria) molto meno noti, sono i suoi effetti nel mondo vegetale, pur essendo stata dimostrata la sua presenza nelle piante. Sicuro è il suo coinvolgimento nelle risposte agli stress ambientali e nei processi di crescita (Pagnussat et al., 2003).

Recenti studi, hanno dimostrato che l'NO stimola la radicazione avventizia, che è tipicamente innescato, da ormoni vegetali quali le auxine. Infatti, quando in una pianta vengono recise le radici primarie, l'auxina stimola le cellule del periciclo (cellule bloccate in fase G1) a dividersi e a formare nuovi abbozzi radicali.

Di particolare interesse a questo proposito i risultati ottenuti in un lavoro condotto su ipocotili di *Cucumis sativus* (Pagnussat et al., 2002).

Trattando per dieci giorni ipocotili di *Cucumis sativus* privati delle radici primarie con (SNP), è stata ottenuta l'induzione dell'organogenesi radicale mimando il comportamento dell'acido indolacetico (IAA). Le radici neoformate presentavano inoltre la stessa struttura anatomica di quelle indotte dal trattamento con IAA.

Allorquando nella soluzione veniva aggiunta, il cPTIO (2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxil-3-oxide) in grado di catturare l'NO l'emergenza delle

radici avventizie veniva drasticamente ridotta e, quelle che si formavano erano in numero minore e presentano una lunghezza ridotta.

Questo risultato dimostra chiaramente come l'NO endogeno abbia un ruolo chiave nella crescita della radice.

Per completare queste osservazioni è stata misurata mediante risonanza elettronica paramagnetica, la concentrazione endogena dell'NO in ipocotili trattati con sola acqua (controllo) ed in ipocotili trattati con IAA. Inizialmente sono stati rilevati alti livelli di NO in entrambi gli esperimenti, probabilmente come risposta immediatamente successiva alla rimozione delle radici primarie. Dopo 24 ore è stato invece registrato un notevole aumento di NO negli ipocotili trattati con IAA. Misure della concentrazione di NO con una sonda fluorescente (4,5-diamino-fluorescein di acetato) hanno evidenziato una fluorescenza quattro volte maggiore negli ipocotili trattati con IAA rispetto a quelli di controllo.

Questi risultati sembrano dimostrare un'influenza dell'IAA nella sintesi di NO che potrebbe agire come un secondo messaggero nella via di rizogenesi avventizia innescata dall'IAA (*Pagnussat et al., 2002*).

Per verificare se l'NO potesse sostituirsi all'IAA nel processo di induzione della rizogenesi e/o se la sua azione fosse successiva a quella dell'IAA è stato necessario studiare l'effetto dell'NO in assenza di una qualsiasi presenza di auxine. A tale scopo gli epicotili di *Cucumis sativus* sono stati privati del loro apice vegetativo, sede della sintesi di auxine, ed, inoltre, il trasporto basipeto di auxine è stato inibito mediante l'acido 1-naphthilphtalamico (NPA) (*Pagnussat et al., 2003*).

Pertanto ipocotili intatti e quelli privi di apice vegetativo sono stati trattati rispettivamente con acqua e con l'NPA per 48 ore prima della rimozione delle radici primarie.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che espianti intatti presentavano un numero di radici tre volte maggiore rispetto quelli privi di apice vegetativo.

Tuttavia il trattamento combinato con IAA ed SNP è stato in grado di invertire tale tendenza, infatti il trattamento di ipocotili privi di apice vegetativo con IAA ha determinato un notevole aumento dei livelli di NO endogeno, rispetto a quelli non trattati. Questo dimostra chiaramente che è l'ormone a determinare la produzione di NO nelle piante.

Rimane ancora da determinare in quale maniera l'NO intervenga nel processo della radicazione avventizia.

Negli animali l'NO attiva l'enzima solubile guanilato ciclasi (GC) legandosi al gruppo eme dell'enzima che catalizza la conversione del nucleotide trifosfato GTP nel nucleotide ciclico cGMP.

Anche nelle piante è stata dimostrata la presenza di una guanilato ciclasi inducibile dall'NO, del cGMP, come anche quella della fosfodiesterasi, enzima che catalizza la degradazione del nucleotide ciclico. È, quindi, plausibile che l'NO agisca nelle piante allo stesso modo che negli animali in quanto il trattamento di piante di tabacco con NO provoca un aumento della concentrazione di cGMP (Pagnussat et al., 2003).

Al fine di verificare il ruolo dell'cGMP nella rizogenesi sono stati fatti altri esperimenti, sempre in ipocotili del *Cucumis sativus*, in presenza di inibitori della guanilato ciclasi (LY83583) e/o di attivatori (8-Br-cGMP).

Espianti trattati con SNP in presenza dell'inibitore della GC mostrano una diminuzione sia nel numero che nella lunghezza delle radici, mentre l'aggiunta dell'attivatore è in grado di invertire tale risultato. Lo stesso accade se al posto dell'SNP si usa l'IAA.

Se le piantine intatte sono trattate con un inibitore della fosfodiesterasi si ha un aumento del numero e della lunghezza delle radici similmente alle piantine trattate con solo NO o solo IAA.

Nelle piantine prive di apice vegetativo trattate con l'inibitore della fosfodiesterasi si raggiunge solo il 60% del numero totale di radici delle piante trattate con l'attivatore della GC; questo è riconducibile al fatto che nelle piante privi di apice vegetativo, in assenza di IAA, manca anche l'attivazione della Guanilato ciclasi da parte dell'NO

In definitiva, dai risultati di tutti gli studi riportati si può ipotizzare la via di segnali molecolari che inducono la rizogenesi avventizia nella maniera seguente: l'IAA è prodotto a livello dell'apice vegetativo e trasportato in maniera basipeta attraverso il fascio conduttore, accumulandosi nella parte basale dell'ipocotile. Questo accumulo stimola la produzione di NO in una maniera che permane ancora

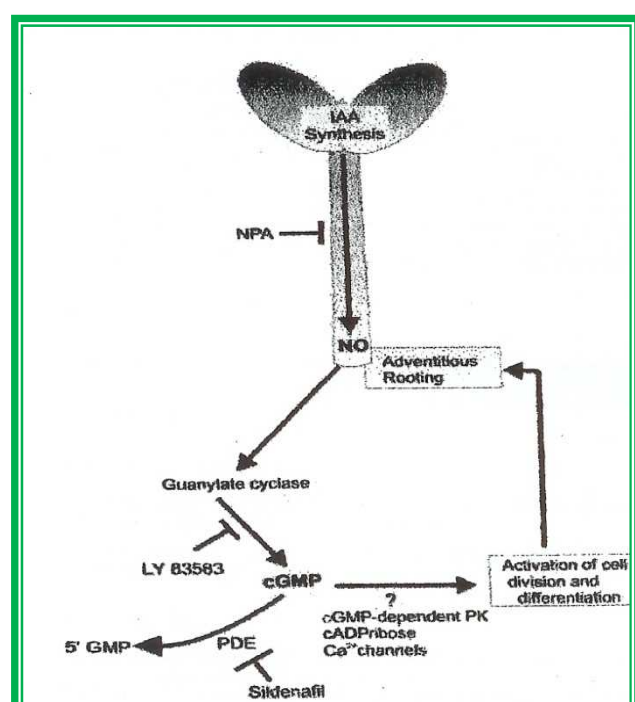


Fig. 15 Schema rappresentante il ruolo ipotetico³⁵ dell'NO nell'induzione della radicazione avventizia

sconosciuta (forse mediante una NO sintasi o una nitrato reductasi) e l'aumento della concentrazione di NO attiva la GC con conseguente aumento della concentrazione del cGMP. Il cGMP induce l'attivazione della divisione e della differenziazione delle cellule del periciclo e quindi la radicazione avventizia. Comunque il passaggio che dall'cGMP porta alla rizogenesi è ancora sconosciuto, si può ipotizzare che il cGMP attivi una proteina chinasi nonostante questa non sia stata mai isolata (Fig. 15) (Pagnussat *et al.*, 2003).

Le ricerche riportate riguardano comunque piante terrestri, mentre non esistono a tutt'oggi dati sull'effetto che questa sostanza potrebbe avere sulle fanerogame marine. Infatti nelle fanerogame marine l'azoto endogeno svolge un ruolo rilevante: poiché la capacità fotosintetica dipende dalle caratteristiche trofiche dell'ambiente circostante.

Sono stati, infatti, effettuati degli esperimenti su piante di *Posidonia oceanica* in due siti differenti: uno altamente eutrofico (costa nord-orientale della Spagna) ed uno altamente oligotrofico (Menarca) (Alcoverro *et al.*, 2001).

Nel sito eutrofico la capacità fotosintetica di *Posidonia* era due volte maggiore rispetto a quelle del sito oligotrofico, così come per la concentrazione di azoto e di clorofilla a+b. Tuttavia se nel sito eutrofico la capacità fotosintetica e il contenuto di clorofilla a+b aumentavano in maniera direttamente proporzionale con l'irradianza, il contrario accadeva nel sito oligotrofico, nel quale diminuiva anche il contenuto di azoto.

Questi dati sembrano dimostrare che nel sito oligotrofico, l'azoto assurga a fattore limitante per la fotosintesi clorofilliana, allo stesso modo in cui il fattore luce lo è nel sito eutrofico. Questo vuol dire che, mentre lungo la costa nord-orientale della Spagna ad alta concentrazione di nutrienti, la capacità fotosintetica di *Posidonia* dipende fortemente dalla luce solare, diminuendo man mano che questa diminuisce con la profondità, a Menarca, dove la concentrazione di nutrienti è bassa, è il fattore azoto ad influenzare maggiormente l'attività fotosintetica. Nelle zone eutrofiche l'azoto non sembra invece esercitare alcuna influenza sulla capacità fotosintetica della pianta.

Per spiegare questa differenza è stato ipotizzato che una concentrazione tissutale di nutrienti al di sotto di soglie critiche sia causa di una diminuzione della concentrazione di pigmenti fotosintetici, con conseguente diminuzione della capacità fotosintetica, essendo una buona parte dell'azoto contenuto nella pianta associata all'apparato fotosintetico. Questo spiegherebbe perché nelle zone altamente oligotrofiche la capacità fotosintetica dipenda maggiormente dalla concentrazione di azoto. L'assenza di tale dipendenza, nelle zone eutrofiche è probabilmente dovuta alla capacità della *Posidonia*

di assorbire i nutrienti in eccesso quando la disponibilità esterna è alta (*Alcoverro et al., 2001*).

CAPITOLO 3

3.1 PIANO SPERIMENTALE

3.1.1 Trattamenti di talee di *Posidonia oceanica* con SNP in acquario

Le caratteristiche chimiche-fisiche presenti in natura sono state ricostruite in acquario riferendoci ai dati presenti in letteratura (*Meinesz et al., 1991*). Gli acquari sono stati pertanto dotati di un refrigeratore per mantenere la temperatura costante a 18 °C, il pH dell'acqua è stato costantemente monitorato mantenendolo invariato intorno al valore di pH 8. Per quanto riguarda il fattore luce non è stata applicata alcuna fonte di luce artificiale, ma gli acquari sono stati posti al naturale ciclo giorno-notte.

La provenienza dell'acqua e della sabbia con le quali sono stati riempiti gli acquari è stata la medesima del sito di prelievo delle talee, in modo da effettuare i trattamenti in condizioni più possibili a quelli naturali.

Nel mese di dicembre a Diamante (CS) sono state prelevate 20 talee plagiotrope di



Fig. 16 Talea prelevata dalla porzione terminale di una prateria

Posidonia oceanica, ad una profondità tra 6 e 10 m, dalla porzione terminale in espansione della prateria, inoltre sono state selezionate talee con 4 fasci fogliari ciascuna a partire dall'apice vegetativo. Sono stati scelti rizomi plagiotropi perché riescono ad attecchire con più facilità di quelli ortotropi.

Infatti anche in natura le mareggiate strappano i ciuffi terminali che a volte, riescono a

svilupparsi adagiandosi sul substrato in posizione orizzontale, inoltre i rizomi plagiotropi possiedono un numero e una crescita maggiore di ramificazioni rispetto a quelli ortotropi (*H. Molenaar et al. 1993*).

La presenza di più ciuffi aumenta la sopravvivenza del rizoma, in quanto solitamente il ciuffo vicino al taglio muore perché è soggetto a necrosi mentre i rimanenti possono sopravvivere.



Fig 17 Taglio di una talea

Come sito di espianto è stato scelto Diamante perché sono stati osservati durante diverse perlustrazioni (2004-2005) fenomeni di fioritura e dati in letteratura, hanno riportato che piante dove si è verificata una recente fioritura, contengono una maggiore quantità di sostanze di riserva nei rizomi e di conseguenza le talee hanno più probabilità di sopravvivenza (*Caye et al., 1995*).

Le talee sono state poste in contenitori da 80 l e portate al Centro Studi ubicato presso il “Grand Hotel S. Michele” in località Cetraro (CS) per essere impiantate in acquario. Qui sono state preparate inserendo nella porzione recisa del rizoma tettarelle da pipette Pasteur riempite con soluzioni di SNP a diversa concentrazione precedentemente preparate in laboratorio e assicurate, mediante delle fascette di plastica (Fig. 18).



Fig. 18: Posizionamento della tettarella

In ciascuna tettarella sono state immessi 3 ml di soluzione di SNP a diversa concentrazione.

3.1.2 Metodologie seguite

Le talee sono state suddivise in quattro gruppi di cinque talee ciascuno.

Nel primo gruppo di controllo le tettarelle sono state riempite solo con acqua di mare filtrata e autoclavata; nel secondo con una soluzione di SNP 8 μM ; nel terzo gruppo con una soluzione di SNP 9 μM e, infine, nel quarto gruppo con una soluzione di SNP 10 μM . Tutte le soluzioni di SNP sono state preparate a partire da una soluzione madre di SNP 100 μM , ottenuta miscelando 3 mg in 100 ml di acqua di mare precedentemente filtrata e autoclavata.

Per ciascuna concentrazione sono stati preparati 60 ml di soluzione in acqua di mare autoclavata.

Per ogni soluzione così preparata, è stato misurato il pH mediante un piaccametro, per valutare eventuali variazioni.

Dopo l'applicazione delle tettarelle con i trattamenti, le talee sono state etichettate mediante etichette in plastica bianca legate ai rizomi mediante fil di ferro plastificato (Fig. 19). Il gruppo delle cinque talee di controllo è stato denominato A e di conseguenza le talee: A1, A2, A3, A4, A5; il gruppo con concentrazione di SNP 8 μM è stato denominato B e le talee: B1, B2, B3, B4, B5; il gruppo con concentrazione 9 μM è stato denominato C e le talee: C1, C2, C3, C4, C5; il gruppo con concentrazione di SNP 10 μM è stato denominato D e le talee: D1, D2, D3, D4, D5.



Fig. 19: Talea pronta per il posizionamento nell'acquario

Poiché l'accrescimento delle foglie di *Posidonia* è dovuto all'attività di un meristema basale è stato praticato un foro con una fustellatrice sulla parte basale di ciascun ciuffo di foglie delle talee in modo da poterne valutare l'accrescimento nei controlli successivi.



Fig. 20 Foratura dei fasci fogliari

Le piantine così preparate sono state fotografate singolarmente e successivamente poste in vasi rettangolari di ceramica cotta ed infine collocate in un acquario di dimensioni 80 cm di lunghezza, 30 cm di larghezza e capacità di 80 l, dotato di refrigeratore. Nell'acquario, allestito con sabbia di mare sul fondo e riempito con acqua di mare, il refrigeratore ha consentito di mantenere l'acqua ad una temperatura costante di 18°C mentre due motorini mantenevano l'acqua in movimento simulando la naturale dinamicità dell'ambiente marino.



Fig. 21 A destra, i vasi di ceramica cotta posti nell'acquario; a sinistra, particolare di un vaso.

Ad intervalli mensili sono stati effettuati controlli consistenti nella misurazione dell'allungamento fogliare di ogni ciuffo con un righello, allungamento rilevabile grazie allo spostamento del foro effettuato il giorno del posizionamento delle talee nell'acquario. Le talee prima di essere riposizionate nell'acquario dopo il controllo, sono state nuovamente fotografate singolarmente.



Fig. 22 Talea fotografata nel corso di un controllo e nella quale è visibile lo spostamento del i foro a livello delle foglie (freccia)



Fig. 23 Misurazione dello spostamento del foro

I dati raccolti sono stati organizzati in database preparati con il software Excel e successivamente elaborati.

L'esperimento sopra riportato è stato ripetuto nel Giugno 2006 al fine di valutare un'eventuale variazione stagionale dell'effetto del trattamento sulla crescita delle foglie. Per questo secondo esperimento sono state nuovamente prelevate 20 talee plagiotrope dalle praterie site in località Diamante (CS) e allestite in un secondo acquario dopo esser state preparate con le stesse modalità descritte per il primo esperimento.

I risultati ottenuti dalla misura dello spostamento del foro praticato per ogni singolo fascio fogliare al momento del trattamento prima che le talee venissero poste in acquario, hanno consentito di verificare, ad ogni controllo, un significativo allungamento fogliare.

Inoltre per ciascun fascio fogliare di ogni talea è stato conteggiato il numero di nuove foglie, riconoscibili per l'assenza del foro.

I dati così ricavati durante i singoli controlli sono stati organizzati in database creati con il programma Excel di Microsoft Windows. Per ogni talea è stata creata una tabella apposita indicando il numero ed il codice identificativo della talea stessa, lo spostamento del foro delle foglie di ciascuna talea suddivise per classi di età e per fascio di appartenenza (i fasci fogliari sono stati numerati in maniera progressiva a partire dall'apice vegetativo terminale), ed il numero di nuove foglie.

I dati ricavati da ciascuna talea sono stati elaborati calcolandone la media, la deviazione standard e l'errore standard con il software Excel.

I due esperimenti sono stati effettuati con modalità del tutto identiche in due diversi periodi dell'anno. Il primo ricade nel periodo Dicembre-Giugno, l'altro nel periodo Giugno-Settembre.

I risultati riguardanti l'allungamento fogliare medio delle foglie sono stati suddivisi nelle tre classi di età secondo la classificazione di Giraud (adulte, intermedie e giovani) (*Giraud, 1977*).

L'inserimento del rizoma nella tettarella contenente la soluzione ha consentito di effettuare un trattamento localizzato evitando una contaminazione dell'ambiente esterno e lo sviluppo di popolazioni batteriche e fungine sulla superficie di taglio.

Tale metodologia messa a punto in acquario si è rilevata perciò di una importanza rilevante tanto da essere brevettata con brevetto n° **CS 2007 A000018 del 19/04/07**.

CAPITOLO 4

4.1 RISULTATI

I risultati ottenuti sono stati presentati al 3° Symposium méditerranéen sur la végétation marine a Marseille, 27-29 marzo 2007.

Actes du 3^{ème} Symposium méditerranéen sur la végétation marine (Marseille, 27-29 mars 2007)

Monica CARDILIO, Silvia NICASTRO, Francesco RENDE, Anna Maria INNOCENTI
Department of Ecology University of Calabria Ponte P. Bucci cubo 6B 87036 Rende, ITALY
e-mail: innocenti@unical.it

NITRIC OXIDE EFFECT IN TRANSPLANTED CUTTINGS OF *POSIDONIA OCEANICA* (L.) DELILE

Abstract

*In the Mediterranean basin a serious, long lasting, seagrass decline occurred, mainly associated with the increasing of anthropogenic pressure along the coastline. The low capability of *Posidonia oceanica* to react to external disturbance, unable any possibility of natural recovery of the meadow. Thus transplantation of vegetative material was the primary strategy to remediate sea grass loss in coastal zones. As in transplanted rhizomes N dynamics, utilised either for the growth and in the storage, has been shown essential, the item of the present work was to investigate the effect of sodio-nitroprusside (SNP), which act as NO donor, in *P. oceanica* cutting. The feedings with SNP, which stimulate adventitious rooting in land phanerogams did not give this expected effect in *Posidonia* cuttings. In fact this treatment in the seagrass (performed in aquarium at 15 C° from December 2005 to June 2006 and from June to September 2006) stimulated in the first period a significant increase of leaf growth in respect to control cuttings. In the second period, when a large production of new leaves occurred related to leaves abscission, only the feeding 9 µM SNP appeared to be efficacious. Since during the seasonal cycle of *Posidonia oceanica* leaves lenght increased in summer and decreased in autumn the SNP treatment enhanced, but did not affect the natural plant growth.*

Key-words: *Posidonia oceanica* transplant; Sodianitroprusside, SNP; Leaf growth stimulation.

Introduction

In Mediterranean basin a serious, long lasting, seagrass decline (Krause-Jensen *et al.*, 2004) occurred, mainly associated to the increasing of anthropogenic pressure along the coastline, which enhanced turbidity, sedimentation and pollution (e.g., Neverauskas, 1988; Duarte *et al.*, 2004). As consequence *Posidonia oceanica* shoot density rapidly decreased, up to 50 percent over a few decades and numerous meadows dead (e.g., Orth and Moore, 1983; Giesen *et al.*, 1990). So the different forms of external impact, natural or human induced, started a process which ultimately will lead to the species extinction. Infact in small and isolated populations' homozygosis increases, determining inbreeding depression and loss of fitness and the populations became more fragile and less adaptable to changed conditions (Meffe and Carroll, 1997). The low capability (Raniello and Procaccini, 2002) of *Posidonia oceanica* to react to external disturbance is of large interest, since the meadows rank among the most productive ecosystems (Costanza *et al.*, 1997). In fact this endemic seagrass in the Mediterranean plays a multiple role for marine coastal ecosystems, due to its extension, high productivity and stability being a resource for herbivores (such as *Paracentrotus lividus* and *Sarpa salpa*) and indirectly for the high complexity, an habitat for a high diverse community (Duarte *et al.*, 1999; Guidetti, 2000). Its distribution is threatened by several human activities such as species introduction (De Villèle and Verlaque, 1995), aquaculture (Delgado *et al.*, 1997) and anchoring (Duarte *et al.*, 2004; Milazzo *et al.*, 2004). Since there is few possibility of a natural recovery of meadow, the reforestation of impacted sites through transplants has been considered. Hence, many efforts have been focused to study *P. oceanica* adaptability to make transplants very successful. Orthotropic rhizomes cutting were transplanted and their survival followed (Meinesz *et al.*, 1991) and thereafter, to optimize cutting growth, also rhizome length was

considered (Meinesz *et al.*, 1991) as well as the depth effect of collection site (Molenaar and Meinesz, 1992). Other studies carried out on other seagrasses considered the local adaptation of plants translocated within the same site rather than transplanted from different sites (Hammerli and Reusch, 2002). More recently researches on the transplants success of *P. oceanica* have been focused on the effect of genetic polymorphism (Procaccini and Piazzini, 2001), of the nutrient content in leaves of transplanted shoots (Vangeluwe *et al.*, 2004) and of the N dynamics of shoots transplanted with or without roots (Lepoint *et al.*, 2004). The item of the present work is to investigate the effect of sodio-nitroprusside (SNP), which act as NO donor, in *P. oceanica* cutting. Namely it is well known that feedings with SNP stimulate adventitious rooting in terrestrial phanerogams (Pagnussat *et al.*, 2003) whereas at present any expected effect in sea grass plants is unknown. To this aim, *P. oceanica* cuttings collected at the depth of 5m-6m, have been submitted to SNP treatment and the phenological parameters have been estimated for ten months at monthly intervals to evaluate the performance of transplanted rhizomes.

Material and methods

Posidonia oceanica cuttings (n= 20) of plagiotropic rhizomes, each bearing four leaf bundles starting from shoot apex, were collected in a meadow located at Diamante (Tyrrhenian coast of Calabria), which has been selected, both for the high phenological performance of plants and for the capability to undergo flower production, from a depth of 6m. The cutting were treated with SNP solution in autoclaved sea water (8, 9 and 10 μ M), using a new performed method allowing a local treatment on the cut surface using a Pasteur pipette (Fig.1). A set of five cutting was submitted with 3 ml of SNP solution at different concentration (8 μ M, 9 μ M and 10 μ M). Five cuttings were submitted with only sea water for control. For each solution pH measurements were undertaken, which did not register any variation. Every single rhizome was marked and recorded for the following phenological analysis. Thereafter in the basal portion of each leaves bundle a little hole has been done thus, as *Posidonia* leaves grow from their base, the hole displacement allowed to calculate both leaf lengthening and new leaves formation. Treated and control rhizomes were transplanted in aquarium with natural seawater at 15 C°. These experiments have been done in two different period of the year (from December 2005 to June 2006 and from June to September 2006) to verify eventual season influence in the treated cuttings. The length of each single leaf has been monthly estimated to evaluate its development and compare leaves growth of treated and control rhizomes. Among each leaf bundle the leaves have been classified as: young intermediate and adult leaf according to Giraud classification (1979).



Fig. 1: Cutting of *Posidonia oceanica* showing the cut surface treated with SNP solution.

Results

The results obtained evidenced that SNP treatment was not active in root production since no adventitious root was observed in the followed period. However our experiments clearly demonstrated a new, effect of SNP on sea grasses where it stimulated both an increasing of leaf growth and/or the production of new leaves in treated cuttings. The effect of this substance change during the year, in fact in the period from December 2005 to June 2006 cutting treated with SNP showed the increase of leaf length overall in juvenile leaves. The increase appeared particularly evident at the treatment concentration 9 μ M as shown in Fig.2. Furthermore in the figure can be

Actes du 3^{ème} Symposium méditerranéen sur la végétation marine (Marseille, 27-29 mars 2007)

easily observed that the effect of treatment is function of the concentration utilized. It is also to underline the insignificant effect of treatment in adult leaves, which are less sensible to stimulation.

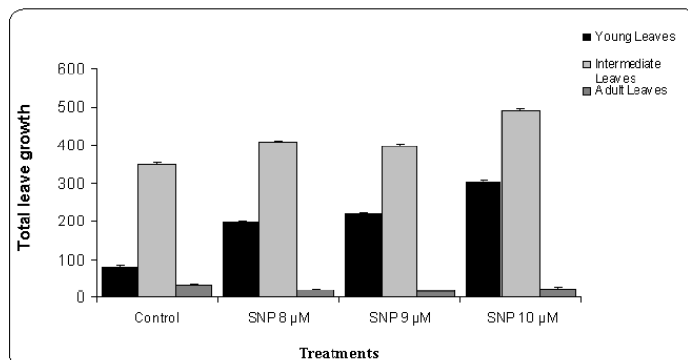


Fig. 2: The effect of SNP treatments at different concentration on the total leaf growth, performed in the period from December 2005 to June 2006, is shown in young, intermediate and adult leaves of *P. oceanica* cuttings. The more significant effect has been observed in intermediate leaves.

On the contrary in the experiment lasting from June to September 2006 no significant difference in leaf extension was observed at the different treatment concentration. In this case, the growth parameter were also lower than in control (Fig. 3).

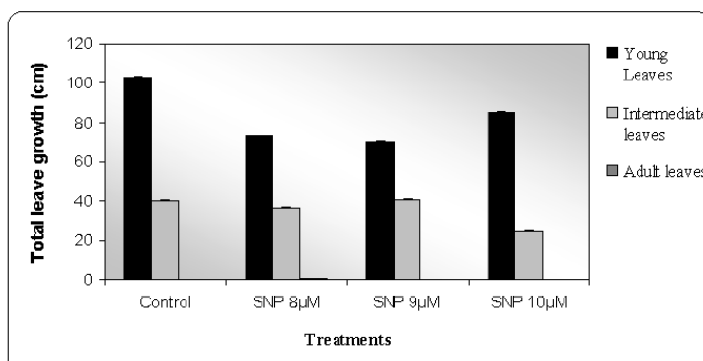


Fig. 3: The effect of SNP treatment at different concentration on total leaf growth, performed in the period from June to September 2006 is shown in young and intermediate leaves, whereas in adult leaves no leaf length increase was observed neither in control nor in treated cutting.

However by comparing the results of the experiment in the two year period, we can observe that in the period from June to September when the length stimulation of existing leaves was not effective a larger production of new leaves, with respect to what observed in cuttings treated in the period between December to June was detected (Fig. 4, 5)

Proceedings of the 3rd Mediterranean symposium on marine vegetation (Marseilles, 27-29 March 2007)

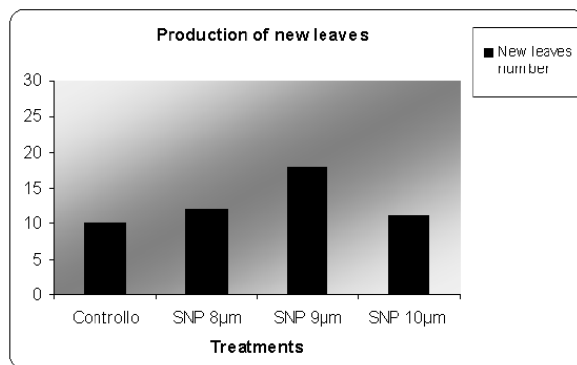


Fig. 4: Number of new leaves produced in the period from December to June 2006 in cutting treated with SNP solution in sea water at different concentration.

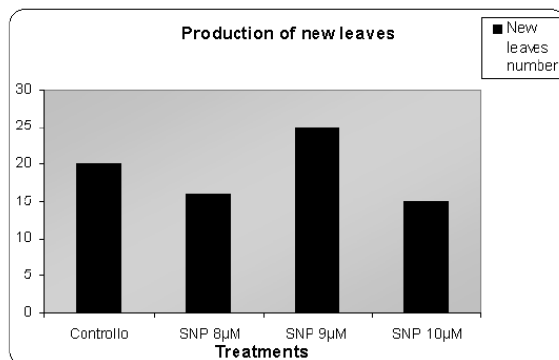


Fig. 5: Number of new leaves produced in the period from June to September 2006 in cutting treated with SNP solution in sea water. In this period plant effort was directed to the new leaves production.

Discussion

The obtained results on stimulation effect of SNP treatment in *Posidonia* cuttings evidenced for the first time clear difference of reaction between land plant and sea grass, which are phanerogams readapted to water conditions. In fact the treatment, which in land plants stimulated adventitious rooting (Pagnussat *et al.*, 2003), in *Posidonia oceanica* stimulated from December to June the leaf growth and, probably, at 9 µM SNP optimal concentration, also the new leaves production in both the period considered. Thus indicating a different role of SNP submission since, even if it was given on a rhizome section the solution and/or the produced NO was very probably transported and acted in the leaves. However this metabolic pathway localization is not surprising as in nature N absorption in sea grass is overall done at leaf level. Its uptake has been well studied in *Posidonia oceanica* and determined during the year by in situ uptake experiments (Lepoint *et al.*, 2002). In fact this nutrient is acquired and utilised, either for the growth process and stored for subsequent recycling depending on the plant need (Lepoint *et al.*, 2002a; 2002b) the variation within the year depending on light and temperature conditions (Enriquez *et al.*, 2004). Moreover it is known that the summer is the period when *Posidonia oceanica* show the maximum of photosynthetic capability

Actes du 3^{ème} Symposium méditerranéen sur la végétation marine (Marseille, 27-29 mars 2007)

allowing storage reserves to be utilized both in winter and in the following spring (Alcoverro *et al.*, 2001). In this contest is of large interest to follow during the year the reaction of plant to external stimulations, which could either increase plant performance, without alter the natural cycle of seasonal growth, or disturb long lasting its actual difficult equilibrium.

The first investigations on *Posidonia* transplants, cultivated under laboratory conditions, survival started many years ago (Ott, 1979) showing that cutting retain the same rhythm of leaf growth than in natural conditions. The presented work also unable to evaluate a seasonal effect of SNP treatment as, in line with the natural biological cycle of *Posidonia oceanica*, we found a major leaf growth stimulation in the period from December to June. The summer, in fact, is the period when this plant shows the maximum of photosynthetic capability allowing the storage of reserves that will be utilized in the period of winter and of the following spring.

Our observations also indicated that the capability of SNP to stimulate leaf elongation is function of the leaf age, namely the effect was maximum in young and intermediate leaves and scarce (Fig.1) or not present (Fig. 2) in adult leaf. The lack of treatment effect in adult leaves is however easy to explain, since adult leaves, from June to September, either have completed their development or are undergoing abscission process. In our opinion also the change of growth strategy of plant development registered in the second experiment clearly indicate the different resource destination of plant towards new leaves production, which would substitute the old leaves detached from rhizome (Fig.4 and 5). However, in conclusion, the treatment of cuttings with SNP solution performed in the present work show the advantage to be local and allow to submit stimulating substance to sea grasses without disturb the water environment. This characteristic has been recently tested also in *Posidonia* cutting transplanted in the sea and the first results are good, thus indicating the possible use of this procedure to help in same case *Posidonia* meadows reforestation and surviving.

Acknowledgements

This research received financial support from the "Assessorato all'Ambiente della Provincia di Cosenza (Italy).

References

- COSTANZA, R., D'ARGE R., DE GROOT R., FARBER S., GRASSO M., HANNON B., LIMBURG K., NAEEM S., O'NEILL R.V.O., PARUELO J., RASKIN R.G., SUTTON P., VANDEN BELT M. (1997) - The Value of the World's Ecosystem Services and Natural Capital, *Nature*, 387: 253-260.
- DELGADO O., GRAU A., POU S., RIERA F., MASSUTI C., ZABALA M., BALLESTREROS E. (1997) - Seagrass regression caused by fish cultures in Fornells Bay (Menorca, Western Mediterranean). *Oceanologica Acta*, 20: 557-563.
- DE VILLELE X., VERLAQUE M. (1995) - Changes and degradation in a *Posidonia oceanica* bed invaded by the introduced alga *Caulerpa taxifolia* in the north-western Mediterranean. *Botanica Marina*, 38: 79-87.
- DUARTE C.M., BENAVENT E., SANCHEZ M.C. (1999) - The microcosm of particles within seagrass *Posidonia oceanica* canopies. *Marine Ecology Progress Series*, 181: 289-295.
- DUARTE C.M., MARBÀ N., SANTOS R. (2004) - "What may cause loss of seagrasses?". In: Borum J., C.M. Duarte, D. Krause-Jensen and T.M. Greve. 2004. *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*. The M&MS project, Copenhagen: 24-32.
- ENRIQUEZ S., MARBÀ N., CEBRIAN J., DUARTE C.M. (2004) - Annual variation in leaf photosynthesis and leaf nutrient content of four Mediterranean seagrasses. *Botanica Marina*, 47 (7): 295-306.
- GIESEN W.B.J.T., VAN KATWIJK M.M., DEN HARTOG C. (1990) - Eelgrass condition and turbidity in the Dutch Wadden Sea. *Aquatic Botany*, 37: 71-85.

Proceedings of the 3rd Mediterranean symposium on marine vegetation (Marseilles, 27-29 March 2007)

- GUIDETTI P. (2000) – Differences among fish assemblages associated with nearshore *Posidonia oceanica* seagrass beds, rocky-algal reefs and unvegetated sand habitats sand habitats in the Adriatic sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 50: 515-529.
- HAMERLI A., REUSCH T.B.H. (2002) – Local adaptation and transplant dominance in genets of the marine clonal plant *Zostera marina*. *Marine Ecology Progress Series*, 242: 111-118.
- KRAUSE-JENSEN D., DIAZ ALMELA E., CUNHA H.(CCMAR), GREVE T. (2004) - Have seagrass distribution and abundance changed?, *In*: Borum J., C.M. Duarte, D. Krause-Jensen and T.M. Greve. 2004. *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*. The M&MS project, Copenhagen: 33-40.
- LEPOINT G., DEFAWE O., GOBERT S., DAUBY P., BOUQUEGNEAU J.M. (2002)a – Experimental evidence for N recycling in the leaves of the seagrass *Posidonia oceanica*. *Journal of Sea Research*, 48(3): 173-179.
- LEPOINT G., MILLET S., DAUBY P., GOBERT S., BOUQUEGNEAU J.M. (2002)b – Annual nitrogen budget of the seagrass *Posidonia oceanica* as determined by in situ uptake experiments. *Marine Ecology Progress series*, 237: 87-96.
- LEPOINT G., VANGELUWE D., EISINGER M., PASTER M., VAN TREECK P., BOUQUEGNEAU J.M., GOBERT S. (2004) – Nitrogen dynamics in *Posidonia oceanica* cuttings: implications for transplantation experiments. *Marine Pollution Bulletin*, 48(5-6): 465-470.
- MEFFE G.K., CARROLL C.R. (1997) - *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Ass., Inc Publisher, Sunderland, Mass., USA.
- MEINESZ A., MOLENAAR H., BELLONE E., LOQUES F. (1992) – Vegetative reproduction in *Posidonia oceanica* I Effects of Rhizome Length and Transplantation Season in Orthotropic Shoots. *Marine Ecology*, 13(2): 163-174.
- MOLENAAR H., MEINESZ A. (1992) – Vegetative reproduction in *Posidonia oceanica* II Effects of Depth Changes on Transplanted Orthotropic Shoots. *Marine Ecology*, 13(2): 175-185.
- MILAZZO M., BADALAMENTI F., CECCHERELLI G., CHEMELLO R. (2004) – Boat anchoring on *Posidonia oceanica* beds in a marine protected area (Italy, western Mediterranean): effect of anchor types in different anchoring stages. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 299: 51-62.
- NEVERAUSKAS V.P. (1988) – Response of a *Posidonia* community to prolonged reduction in light. *Aquatic Botany*, 31: 361-366.
- ORTH R.J., MOORE K.A. (1983) – Chesapeake Bay: an unprecedented decline in submerged aquatic vegetation. *Science*, 222: 51-53.
- OTT J.A. (1979) - Persistence of a seasonal growth rhythm in *Posidonia oceanica* (L.) Delile under constant conditions of temperature and illumination. *Marine Biology*, 1: 99-104.
- OTT J.A. (1980) – Growth and production in *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *PSZNI: Marine Ecology*, 1: 47-64.
- PAGNUSSAT G.C., LANTERI M.L., LAMATTINA L. (2003) - Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the Indole Acetic Acid-Induced adventitious rooting process, in *Plant Physiology*, 132: 1241-1248.
- PERGENT-MARTINI C., PERGENT G. (1996) - *Spatiotemporal dynamics of Posidonia oceanica beds near a sewage outfall (Mediterranean and France)*, *In*: "Seagrass Biology: proceedings of an international workshop". John Kuo, Ronald C. Phillips, Diana I. Walker, Hugh Kirkman Eds. Rottneest Island, Western Australia: 299-306.
- PROCACCINI G., PIAZZI L. (2001) - Genetic polymorphism and transplantation success in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Restoration Ecology*, 9(3): 332-338.
- RANIELLO R., PROCACCINI G. (2002) - Ancient DNA in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 227: 169-173.
- VANGELUWE D., LEPOINT G., BOUQUEGNEAU J.M., GOBERT S. (2004) – Effect of transplantation on *Posidonia oceanica* shoots. *Vie et Milieu-Life and Environment*, 54: 223-230.

4.1.2 Riforestazione delle praterie

L'obiettivo di molti ricercatori che si sono occupati dell'ecosistema mediterraneo, negli ultimi anni è stato quello di contrastare la continua regressione delle praterie di *Posidonia oceanica*.

Un tempo le praterie di *Posidonia oceanica* cingevano gran parte delle coste mediterranee come una sorta di barriera vegetale sommersa. Oggi si assiste invece alla graduale rarefazione delle praterie o nei casi più gravi alla loro definitiva scomparsa, come testimonia la presenza di “matte” morte spesso parzialmente ricolonizzate da alghe o altre piccole fanerogame quali *Cymodocea nodosa* e *Zostera noltii* (Pérès e Picard, 1964).

Negli ultimi decenni il fenomeno della regressione e scomparsa delle praterie si è aggravato lungo la fascia costiera mediterranea maggiormente esposta alla pressione antropica.

La rarefazione della prateria causa un progressivo arretramento del suo limite inferiore oppure una lenta discesa di quello superiore in cui si assiste ad un sensibile diradamento della densità dei fasci fogliari che porta alla scomparsa della biocenosi, ed è stato calcolato che la distruzione di un metro di “matte” ad una distanza di circa 100 m dalla riva può provocare, a causa dell'idrodinamismo, l'arretramento della costa di almeno 20 m (Jeudy de Grissac, 1984, Jeudy de Grissac e Boudouresque, 1985).

Le difficoltà d'interpretazione della regressione sono dovute alla molteplicità delle cause che la provocano ed alle loro interazioni. Tali cause sono sia di ordine naturale (parassitosi, basso livello adattativo della pianta, esplosioni demografiche dei predatori, variazioni climatiche, ecc.); sia soprattutto legate alle attività antropiche.

Il notevole e crescente inquinamento organico ed inorganico delle acque costiere dovuto allo scarico in mare di effluenti urbani, domestici e industriali, che riversano in mare elevate concentrazioni di nitrati, fosfati, metalli pesanti, ed altri inquinanti chimici, provocano infatti un rilevante aumento della torpidità delle acque costiere e riduce la profondità del piano infralitorale dove si realizza la fotosintesi clorofilliana.

Gli effetti deleteri dell'inquinamento si manifestano anche in una progressiva riduzione degli epifiti e della struttura verticale delle stratocenosi inferiore e superiore della prateria cui consegue una carenza di detrito organico alla base della “matte”.

In altre zone litorali la costruzione di moli, porti, frangiflutti ed altre opere artificiali di rinforzo della linea costiera provocano sensibili aumenti delle turbolenze idrodinamiche e profonde modificazioni del ritmo di sedimentazione cui consegue una discesa del

limite superiore della prateria e processi di interrimento del fondale che nel tempo tenderanno a ricoprire la biocenosi di una spessa coltre di fango. Infatti, una sedimentazione troppo rapida, può provocare il soffocamento della prateria; mentre, se la sedimentazione è scarsa e non compensa la crescita verticale dei rizomi, questi vengono scalzati, indebolendo la prateria, che risulta essere più esposta al moto ondoso e quindi all'erosione.

Anche la pesca a strascico causa infine un effetto meccanico devastante sulle praterie i cui fasci fogliari vengono scalzati in gran numero, mentre il raschiamento del fondale innesca modificazioni nei processi locali di sedimentazione.

Uno dei tentativi per contrastare il fenomeno di regressione delle praterie è stato quello di riforestarle usando la tecnica dei trapianti.

I primi tentativi di reimpianto di fanerogame marine nel Mediterraneo hanno riguardato le fanerogame *Cymodocea nodosa* e *Nanozostera noltii* (Meinesz, 1976, 1978 ; Meinesz et Verlaque, 1979 ; Jeudy de Grissac, 1984b).

Le tecniche messe a punto per il reimpianto delle fanerogame marine sono numerose (Phillips, 1980b ; Lewis, 1987 ; Meinesz *et al.*, 1990b ; Cinelli, 1991 ; Piazzi et Cinelli, 1995 ; Calumpong et Fonseca, 2001) e comportano diversi tipi di supporti di ancoraggio:

- Grate di cemento dotate di fori all'interno dei quali sono collocate le talee (Maggi, 1973).
- Quadri di cemento all'interno dei quali le talee possono essere fissate e mantenute per mezzo di una griglia (Cooper, 1976 ; Giaccone et Calvo, 1980 ; Cooper, 1982 ; Chessa et Fresi, 1994)

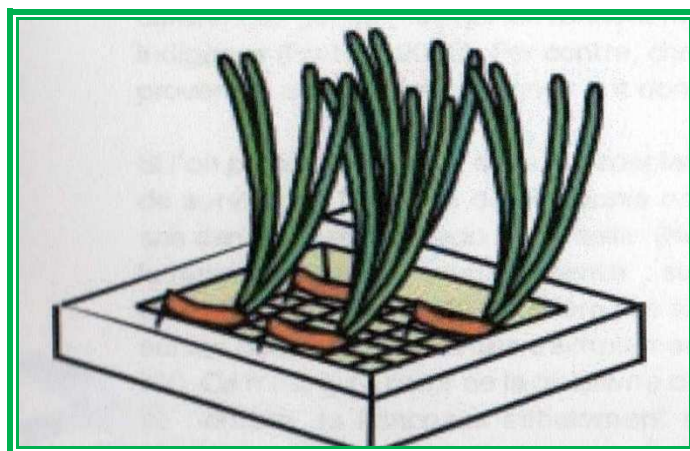


Fig. 24 Quadri di cemento

- Picchetti o uncini di ferro per ancorare le singole talee (Fonseca et al., 1982c ; Molenaar, 1992 ; Charbonnel et al., 1995f ; Rismondo et al., 1995 ; Davis et Short, 1997)

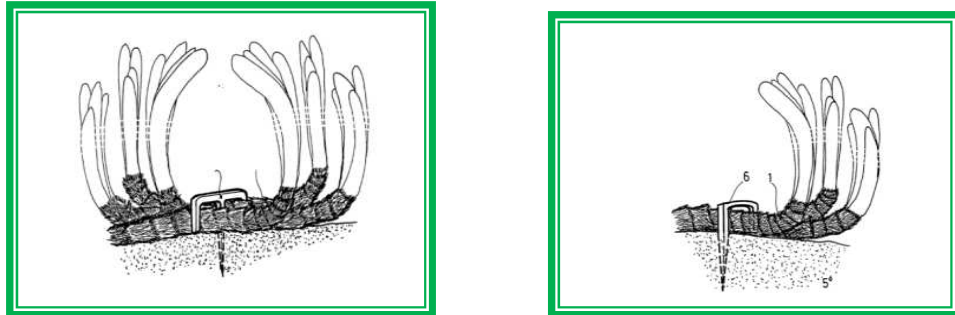


Fig. 25 Talee ancorate con picchetti

- Espianti di piccoli pezzi di mattes detti “mottes” per mezzo di un tubo in PVC (carotaggio) che a sua volta sarà inserito in un tubo di PVC più grande fissato all’interno del substrato del fondale di reimpianto al cui interno è stata creata una buca. (Addy, 1947a ; Phillips, 1980a ; Noten, 1983 ; Jeudy de Grissac, 1984b ; Dennison et Alberte, 1986 ; Chessa et Fresi, 1994 ; Rismondo et al., 1995 ; Faccioli, 1996)

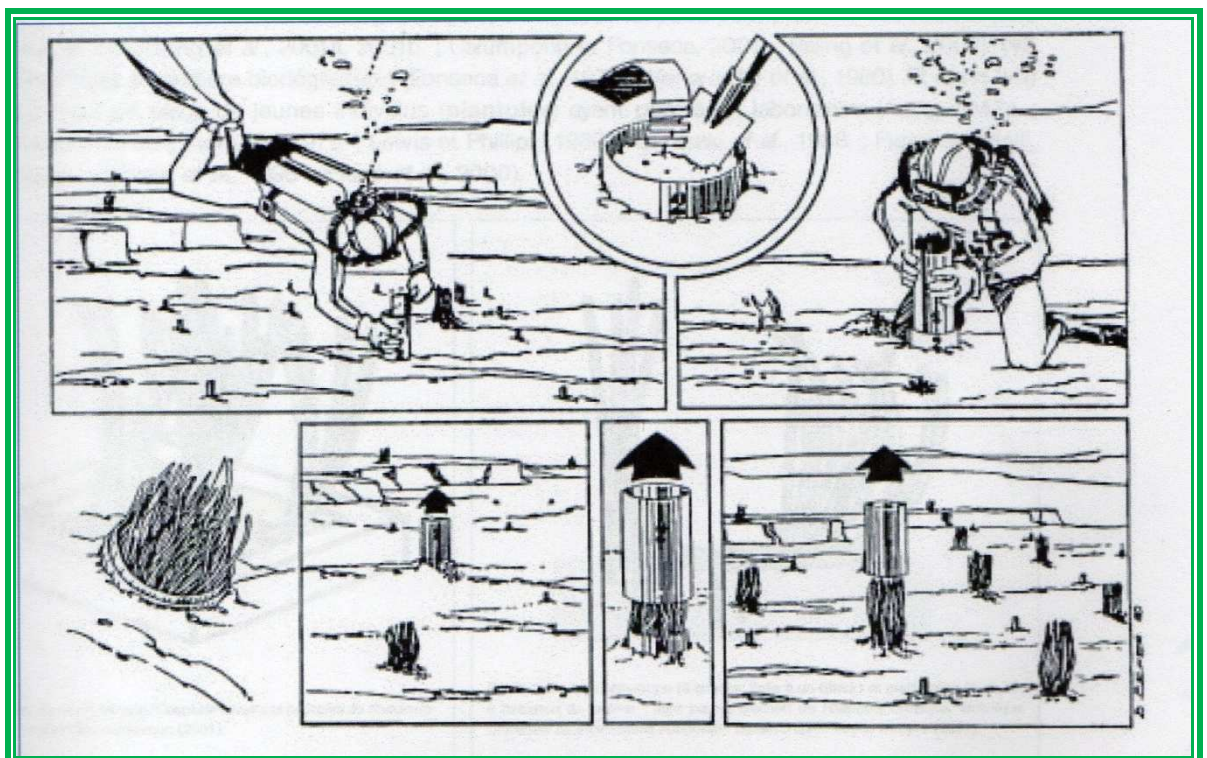


Fig. 26 Mottes

- Reti di materiale biodegradabile (Fonseca et al., 1979 ; Kenworthy et al., 1980).
- Reti metalliche fissate al substrato per mezzo di picchetti di ferro (Cinelli 1980, Cooper 1982, Meinesez et al. 1991).
- “Materassi non biodegradabili” che sono delle strutture formate da materiale non biodegradabile composte da 3 elementi di "Macmat R", costituiti da geostuoia tridimensionale e rete metallica a doppia torsione (1m x 1m) e da 3 materassi tipo "Reno", (1m x 1m x 0,23m), rivestiti al fondo e sui lati con geotessuto e muniti di coperchi di "Macmat R. Le talee sono fissate singolarmente con filo metallico plastificato (Cinelli et al., 2007).



Fig. 27 Materasso non biodegradabile

- “Materassi biodegradabili”, costituiti da 4 bioreti in fibra di agave a trama fitta (1m x 1m), di cui 2 rinforzate con rete metallica a doppia torsione. Le talee sono fissate singolarmente con filo metallico plastificato. (Cinelli et al., 2007)



Fig. 28 Materasso biodegradabile

Il reimpianto può essere eseguito utilizzando come materiale di partenza plantule fatte germinare in laboratorio da semi, talee o porzioni di matte come nel caso del carotaggio.

Le plantule, derivante dalle germinazione dei semi ha un indubbio vantaggio rispetto l'uso di talee derivante da piante preesistenti, in quanto assicura un elevato grado di variabilità genetica nella popolazione riforestata. Un problema che si pone, però, con l'uso delle plantule, è l'incapacità di queste di sviluppare in tempi brevi un apparato radicale sufficientemente resistente ai movimenti dell'acqua e all'instabilità del sedimento. Generalmente si assiste perciò, ad una notevole perdita di plantule già nel corso del primo mese successivo alla loro semina (Balestri e Bertini, 2003).

Per tale motivo le giovani plantule devono essere preventivamente ben ancorate al fondale generalmente mediante picchetti di ferro.

Sul trapianto delle giovani plantule si rilevano i principali indici fenologici quali:

- densità dei fasci fogliari;
 - indice di superficie fogliare (L.A.I.),
- nonché altri parametri macroscopici quali:
- il numero di nuovi rizomi in corso di attecchimento,
 - l'area di terreno conquistata dalle piante in fase di accrescimento,
 - i livelli di biomassa e di produttività primaria.

I risultati ottenuti da questo tipo di reimpianto hanno permesso di stabilire che la crescita ed il successivo sviluppo delle praterie di *P. oceanica* dipendono sia dalle condizioni dell'idrodinamismo, sia dalla stabilità del sedimento offerta dalla presenza di una preesistente vegetazione algale.

Dati in letteratura riportano un accrescimento in lunghezza dei rizomi (circa 5 cm) e delle foglie (17 cm) e un numero medio di 4-6 foglie per ciuffo fogliare all'anno.

Nei tre anni successivi al trapianto, è stato osservato che in condizioni ideali di crescita, il 70% circa delle plantule sopravvive, ed il 13% - 15% produce nuovi rizomi (Balestri et al., 1998).

Sebbene la *P. oceanica* sia la fanerogama marina più diffusa del Mediterraneo la conoscenza del suo sviluppo vegetativo è poco nota. Comunque, appare chiaro che il suo principale mezzo di propagazione è la riproduzione vegetativa, infatti i rizomi staccati dalla pianta durante le mareggiate spesso si propagano come trapianti naturali. Uno studio svolto da Meinesz sui trapianti naturali ha messo in evidenza che essi possono raggiungere, su un substrato favorevole, il 3 % di attecchimento. I trapianti rappresentano quindi uno strumento efficace sia per investigare sui meccanismi della riproduzione vegetativa della *P. oceanica*, sia per la messa a punto di tecniche per la riforestazione delle praterie in stato di regressione.

Esperimenti in tal senso sono stati effettuati utilizzando talee di *Posidonia*. (H. Molenaar 1993). Un totale di 216 talee sono state raccolte in una prateria con una densità compresa tra 500-700 ciuffi fogliari al metro quadrato (classificata come prateria densa da Giraud), ad una profondità di 14 m.

Sopravvivenza e sviluppo sono stati esaminati su tre tipi morfologici di talee trapiantate:

- talee ortotrope con un ciuffo fogliare,
- talee ortotrope con due ciuffi fogliari,
- talee plagiotrope con tre ciuffi fogliari (una terminale e 2 laterali).

Le talee sono state fissate orizzontalmente a 2-3 cm di distanza, attraverso una griglia di plastica (lunga 60 cm e larga 17 cm); ogni maglia della griglia era di 1 cm.

Prima del trapianto, tutti i rizomi sono stati tagliati trasversalmente per portarli alla stessa lunghezza di 12 cm.

Sei mesi dopo il trapianto per ogni talea sono stati esaminati in situ i seguenti parametri: sopravvivenza, ramificazione e formazione delle radici.

Gli stessi parametri sono stati controllati undici mesi dopo il trapianto. I risultati ottenuti hanno dimostrato che le talee

- ortotrope con un ciuffo fogliare hanno il 31 % di sopravvivenza, il 9 % di nuove ramificazioni ed il 14 % di nuove radici;
- le talee ortotrope con due ciuffi fogliari hanno il 94 % di sopravvivenza, l'8 % di nuove ramificazioni e il 62 % di nuove radici;
- le talee plagiotrope hanno una sopravvivenza del 100%, il 49 % ha formato una ramificazione e il 47 % ha formato nuove radici (Molenaar et al., 1993).

Questi risultati ottenuti da Molenaar (1993), mettono in evidenza che le talee plagiotrope presentano una sopravvivenza maggiore di quelle ortotrope. C'è da sottolineare in proposito la propagazione di talee plagiotrope corrisponde in genere a quella che si verifica nella propagazione in natura perché sono quelle che si distaccano più facilmente per l'idrodinamismo. Un altro fattore considerato per ottimizzare la riproduzione vegetativa naturale della *Posidonia oceanica* è il cambiamento di profondità della talea prelevata e reimpiantata. Infatti talee prelevate a 3 m di profondità e trapiantate in acque profonde (36 m circa) hanno mostrato tassi di sopravvivenza bassi o nulli (14 %), mentre talee prelevate a 30 m e trapiantate a profondità minori (3 m, 14m, 20 m) hanno mostrato una percentuale di sopravvivenza dal 96 al 100 %. Inoltre per quanto riguarda la ramificazione, nessuna talea prelevata a 3 m di profondità si ramificava, mentre quelle

provenienti da 30 m dopo il trapianto nelle acque più basse si ramificavano e sviluppavano radici avventizie. (Molenaar et Meinesz, 1992).

Questi dati fanno ipotizzare la possibilità di programmare piani di riforestazione delle praterie a *P. oceanica* sui fondali litorali del Mediterraneo utilizzando talee provenienti da zone profonde, sebbene i prelievi siano più difficoltosi.

Naturalmente questi interventi devono essere preceduti da approfonditi studi riguardanti le caratteristiche edafiche e abiotiche degli ambienti costieri e/o il recupero deve avvenire a monte di interventi di disinquinamento e rimozione delle cause di disturbo.

Il tasso di sopravvivenza infatti, dipende anche dal tipo di substrato sul quale le talee saranno trapiantate. La matre morta rappresenta il substrato migliore (Balestri *et al.*, 1998). Non poca importanza ha poi la distanza alla quale le talee sono poste sul substrato l'una dall'altra, la distanza migliore sembra infatti quella compresa fra i 5-10 cm (Molenaar e Meinesz, 1993, 1995).

L'uso di talee di *Posidonia oceanica* per la ricolonizzazione in esperimenti di trapianti per il recupero di praterie degradate, tuttavia si è rivelato problematico per la bassa sopravvivenza degli stessi una volta trapiantati; questo problema non è da imputare alle riserve di carboidrati o al contenuto di clorofilla delle talee, ma piuttosto all'incapacità di rispondere adeguatamente alle proprie esigenze nutritive, in particolare per ciò che riguarda la richiesta di N₂ (Lepoint *et al.*, 2003). Un'altra causa di elevata mortalità delle talee sono i processi di necrosi causate da infezioni batteriche a livello della porzione recisa del rizoma (Meinesz *et al.* 1991).

Il ripopolamento però porta annesse difficoltà che non sono sempre semplici da superare, come, ad esempio, far aderire bene al substrato le talee di *Posidonia* e limitare i processi di necrosi sulla superficie di taglio.

CAPITOLO 5

5.1 SPERIMENTAZIONE IN MARE

5.1.1 Identificazione siti

Nel corso del dottorato di ricerca sono stati effettuati due reimpianti in mare nel sito di San Nicola Arcella a nord del Tirreno cosentino che differiscono:

- a) per il sito di prelievo delle talee,
- b) per il supporto da ancorare al fondale di reimpianto.

Il sito destinato al reimpianto è stato selezionato perché oggetto di uno studio precedente riguardante non solo aspetti ecologici come macrostruttura, lepidocronologia, fenologia ed epifiti, ma anche studi ultrastrutturali e sulla variabilità genetica e proteomica.

A livello macrostrutturale è stata osservata nel sito di San Nicola Arcella una densità maggiore delle praterie rispetto ai siti limitrofi come l'Isola di Dino in quanto è soggetto a maggiori pressioni antropiche, e precisamente pari a $415 \pm 58,1$ fasci/m² tipica della prateria densa appartenente al II stadio di Giraud (Rende et al., 2004).

I risultati ottenuti dallo studio lepidocronologico hanno dimostrato inoltre che nell'arco di tempo 1991-1999 sia il tasso di crescita che la produzione primaria annua dei rizomi nel sito di San Nicola Arcella è sempre stato maggiore rispetto a zone limitrofe (Isola di Dino).

Tale andamento è stato riscontrato anche per quanto riguarda la morfometria delle foglie adulte ed intermedie poiché la prateria di San Nicola Arcella cresce, invece, lungo un tratto di costa non molto antropizzato ed impattato e quindi con acque limpide

Ciò si è evidenziato dallo studio dell'intensità di luce incidente confrontata per circa due anni consecutivi nella prateria di San Nicola Arcella con le praterie limitrofe e si è visto che la radiazione incidente sulle praterie ha rilevato valori medi nel periodo del campionamento doppi nel sito di San Nicola Arcella rispetto a quelli registrati nei siti limitrofi, come si può ben notare dalla fig 29.

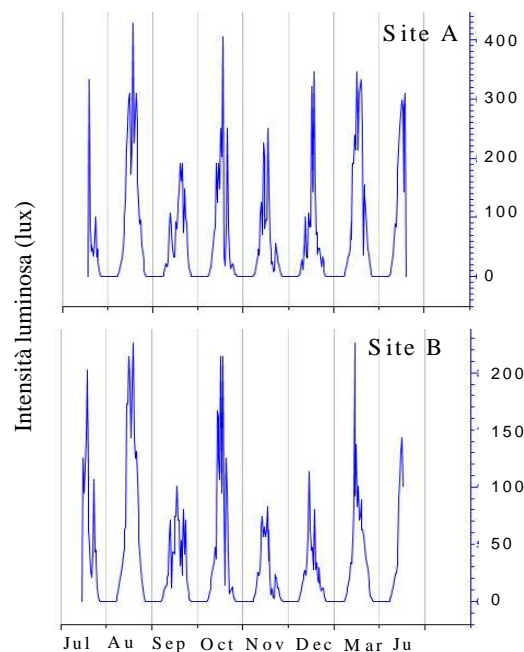


Fig 29 Intensità luminosa (lumen/m^2) registrata per circa un anno (Luglio 2005 - Giugno 2006) nei siti di campionamento (sito A - sito B) utilizzando la sonda HOBO® Pendant™ temperature/light.

Come noto la torbidità delle acque per una fanerogama marina è un fattore fortemente limitante per i processi fotosintetici e quindi per la crescita (Tunesi et al., 2001; Ruiz-Fernández, 2000; Ruiz et Romero, 2001, 2003).

Per quanto riguarda la dinamica del ricoprimento degli epifiti delle foglie i risultati ottenuti dalle analisi da noi effettuate (2004-2005) mostrano nel sito impattato un fenomeno di eutrofizzazione delle alghe che aumentano in maniera anormale limitando anch'esse la luce disponibile per *Posidonia*, ed ostacolando la sua capacità fotosintetica al livello delle foglie.

Inoltre nella prateria di San Nicola Arcella, è stato rinvenuto il briozoo *Electra posidoniae*, che è un epifita animale estremamente sensibile alle condizioni di disturbo, quindi la sua presenza garantisce buone condizioni per effettuare in questa zona un trapianto in mare.

Un dato significativo ottenuto attraverso l'analisi proteica comparando un sito impattato con il sito di San Nicola Arcella dimostra che il disturbo induce nella foglia una riduzione di circa il 30% sulla resa proteica, qualunque sia lo stato fisiologico della foglia. Inoltre, l'analisi SDS-PAGE delle proteine totali ha evidenziato un diverso pattern del contenuto proteico nelle foglie adulte delle piante campionate nel sito di San Nicola Arcella rispetto al sito disturbato. La banda (spot) prominente è rappresentata dalla subunità maggiore della Rubisco, la cui identità e livelli di espressione sono stati

confermati tramite analisi western blot mono e bidimensionale. La Rubisco è l'enzima che catalizza la fissazione della CO₂ nel ciclo di Calvin (Mazzuca et al., 2006).

In piante soggette a stress luminoso è notato in letteratura che l'attività della Rubisco diminuisce, e ciò può contribuire a una generale inibizione della capacità fotosintetica della pianta stessa influenzando negativamente sulla sua crescita (Cunasekera and Berkowitz, 1993). Si potrebbe quindi ipotizzare un legame tra la diminuzione dei livelli di Rubisco, riscontrati, e la regressione della prateria in atto nel sito disturbato preso in esame.

Il migliore stato di conservazione nel sito di San Nicola Arcella è inoltre confermato da ricerche citologiche ed immunocitochimiche sul contenuto di fenoli e di citochinine che caratterizzano condizioni di migliore performance delle praterie in questo sito (Cozza et al., 2004).

Il sito di San Nicola Arcella è stato anche scelto sulla base delle caratteristiche del fondale che presenta estesi banchi di *Posidonia oceanica* con la tipica ecomorfosi a chiazze, i prati sono impiantati in parte su sabbia ed in parte su matte. Lo stato di salute delle praterie si presenta buono, come confermato dagli studi fenologici condotti (Rende et al., 2005).

San Nicola Arcella presenta zone di *matte* morta che garantisce un maggior tasso di sopravvivenza delle talee (Balestri et al., 1998); ed è per questo che si è scelto come sito per il reimpianto delle talee.

Inoltre il sito è caratterizzato da un basso idrodinamismo trovandosi all'interno di una piccola insenatura e il punto in cui si sono effettuati i reimpianti si trova all'interno di una zona di mare delimitata dal lido "Le terrazze" dove non è consentito né la navigazione e né l'ormeggio delle imbarcazioni.



Fig. 30 San Nicola Arcella sito di reimpianto

35th SIBM - Genoa, 19-20 July 2004

F. Rende, M. Cardilio, R. Cozza, A.M. Innocenti

Department of Ecology, University of Calabria – 87030 Arcavacata di Rende (CS)

E-mail: sante.rende@unical.it

POSIDONIA OCEANICA MEADOWS MONITORING IN THE DINO ISLAND (Praja a Mare-CS, Italy) SIC SITE

The seagrass *Posidonia oceanica* is endemic in the Mediterranean where forms extensive infra-littoral beds that play a key role in the maintaining the equilibrium of coastal ecosystems, with a fundamental role in the primary production of both in tropical and temperate seas. *Posidonia oceanica* meadows constitute an important, and often critical, habitats for a broad diversity of invertebrate and fish species, many of which are economically important. In addition, the meadows form a natural protection for adjacent coast against erosive wave action, allow sediment accumulation and enhances recycling of nutrients. All the same, the *Posidonia* meadows are subject to a progressive damaging and decline, mostly due to an excessive anthropogenic activities.

To protect and conserve *Posidonia oceanica* meadows, at first is necessary to analyze the meadows features in order to evaluate the most effective monitoring strategy. In particular, an extensive and continuative *Posidonia* meadows monitoring is necessary overall in the S.I.C. sites, where the collected data should enable to plane an optimal conservation management. In the present work we evaluate the meadows features and the plant performances in Dino island S.I.C. site (Tyrrenum Sea, Calabria) along a transect from the disturbed towards the undisturbed area. Sampling and *in situ* measurements were performed in order to analyse both meadows macrostructure as well as phenological and lepidochronological features. The obtained results are consistent with a clear decline in the disturbed site vs the preserved one. The phenological analyses show a greater length both in adult and intermediate leaves, in the control sites respect to the disturbed ones. Finally, the lepidochronological results show that both the annual rhizomes growth rate and rhizome primary production, was higher in the control vs disturbed sites. The reported results suggest that in the area considered, the disturb is long lasting and that during this time, not only has no recovery taken place, but the decline is still occurring. These considerations give evidences both of *P. oceanica* meadows as a suitable system to evaluating the coastal marine environments, as well as the necessity to plane a protection programme to recover Dino island SIC site.



Fig. 31 Matte morta colonizzata da diversi organismi vegetali

Per quanto riguarda i siti di prelievo delle talee per i due reimpianti sono stati selezionati come segue: Diamante per la presenza di recenti fioriture e Cirella per la profondità della prateria (batimetria 35-40 m), seguendo i parametri di migliore adattabilità delle talee indicate in letteratura.(Caye et al., 1995; Genot et al., 1994).

Il come sito di Diamante è stato selezionato perché nell'ottobre del 2004, durante un'immersione a scopo perlustrativo per valutare lo stato di salute della prateria, è stata rilevata la presenza di una abbondante fioritura. Tale evento, raro in *Posidonia oceanica*, probabilmente è dovuto al fatto che l'estate di quell'anno era stata molto calda. Infatti, nello stesso periodo una fioritura era stata osservata anche nelle praterie intorno all'isola d'Elba (che ho potuto osservare di persona durante il corso I.S.S.D., International School for Scientific Diving tenuto dal prof. Cinelli).

E' noto infatti che talee prelevate da praterie in cui si sia verificato un evento di fioritura recente, sono caratterizzate da una migliore capacità di attecchimento e sopravvivenza (Caye et al., 1995).

Per tale motivo le talee utilizzate nel primo reimpianto a mare nel 2006 sono state prelevate dalla prateria sita a Diamante.

Successivamente per effettuare un secondo trapianto in mare è stato selezionato il sito di Cirella perché presentava una prateria di *Posidonia oceanica* in ottimo stato di salute che si estende da una batimetria che va da 5 a 35/40 m. Tale prateria presenta *mattes* di diversi metri di altezza che dimostrano la sua longevità.

Le piante di *Posidonia oceanica* che vegetano in profondità accumulano nei rizomi una maggior quantità di carboidrati che favorisce la rizogenesi ed il conseguente

attecchimento delle talee. Ricerche effettuate su trapianti di talee prelevate a diverse batimetrie hanno infatti dimostrato che i risultati migliori per l'attecchimento e l'adattabilità si ottengono utilizzando talee prelevate in profondità e reimpiantate in zone più superficiali (Genot et al 1994). Per questo motivo sono state utilizzate le talee prelevate in profondità a Cirella destinate al secondo reimpianto a San Nicola Arcella.

Entrambi i siti di espanto sono localizzati nelle coste del mar Tirreno cosentino e studi genetici condotti su queste praterie di *Posidonia oceanica*, hanno dimostrato che le praterie localizzate nel mar Tirreno presentano una elevata variabilità genetica e quindi sono più adattabili ai cambiamenti ambientali (Serra et al., 2007).

5.1.2 Piano sperimentale del primo reimpianto in mare

Nell'ottobre del 2006 è stato effettuato un trapianto in mare di talee di *P. oceanica* trattate con SNP a diverse concentrazioni e di talee di controllo nel fondale di San Nicola Arcella.

Dalle praterie site in località Diamante (CS), sono state prelevate un totale di 60 talee, ciascuna recante tre ciuffi di foglie a partire dall'apice vegetativo terminale. Le talee sono state preparate inserendo in tettarelle di pipette Pasteur la parte recisa del rizoma, in modo da poter effettuare un trattamento locale delle talee senza dispersione di sostanze nell'ambiente esterno. Questo metodo già brevettato (*CS 2007 A000018 del 19/04/07*) previene le infezioni batteriche sulla porzione recisa del rizoma che sono stati causa di mortalità elevata in molti lavori di reimpianti (*Meinesz et al., 1991*) poiché sia l'acqua di mare autoclavata sia le soluzioni dei trattamenti sono stati eseguiti in condizioni sterili. In questo esperimento sono stati ripetuti i trattamenti che hanno stimolato l'accrescimento fogliare in acquario.

Le talee sono state suddivise in quattro gruppi di dodici talee ciascuno. Nel primo gruppo, di controllo, denominato "A" (comprendente le talee: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12) le tettarelle contenevano solo acqua di mare filtrata ed autoclavata; nel secondo denominato "B" (comprendente le talee: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12) le tettarelle contenevano una soluzione di SNP 8 µM; nel secondo denominato "C" (comprendente le talee: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12) le tettarelle contenevano una soluzione di SNP 9 µm; infine, nel terzo gruppo, denominato "D" (comprendente le talee: D1 D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12) le tettarelle contenevano una soluzione di SNP 10 µm. Il codice alfanumerico identificativo di ogni talea è stato riportato su fascette di plastica legate a

ciascuna talea per mezzo di fil di ferro, come era stato fatto per le talee allevate in acquario.

Le talee dopo la foratura dei fasci fogliari sono state fotografate singolarmente e fissate su quadrati di rete in PVC tramite filo metallico plastificato. I quadrati prima del posizionamento in mare sono stati fotografati e in seguito posti in mare ad una profondità di 8 m saldamente fissati al substrato mediante picchetti di ferro, in una porzione di mare ben delimitata e protetta da ancoraggi, in modo da non rischiare la perdita delle reti.



Fig. 32 Talee pronte per il reimpianto a mare

A scadenze mensili sono stati effettuati controlli per verificare l'attecchimento e la crescita delle talee trapiantate. Preliminari osservazioni hanno confermato i risultati ottenuti in acquario facendo intravedere la possibilità di adoperare talee trattate per ottimizzare gli interventi di riforestazione negli ambienti degradati con praterie in regressione.

In fig. 33 è visibile in una talea l'accrescimento fogliare valutabile dallo spostamento del foro (freccia rossa) osservato



Fig. 33 Particolare di talea reimpiantata

nel primo controllo effettuato dopo 1 mese. In fig. 25 sono riportati gli istogrammi riguardanti l'allungamento fogliare nelle talee di controllo ed in quelli trattati con SNP (8,9,10 μm) come si evince dalla figura le foglie intermedie e soprattutto le giovanili hanno evidenziato un significativo accrescimento soprattutto nelle talee trattate con SNP.

In fig. 34 sono riportati gli istogrammi riguardanti l'allungamento fogliare nelle talee di controllo ed in quelli trattati con SNP (8,9,10 μm) come si evince dalla figura le foglie intermedie e soprattutto le giovanili hanno evidenziato un significativo accrescimento soprattutto nelle talee trattate con SNP.

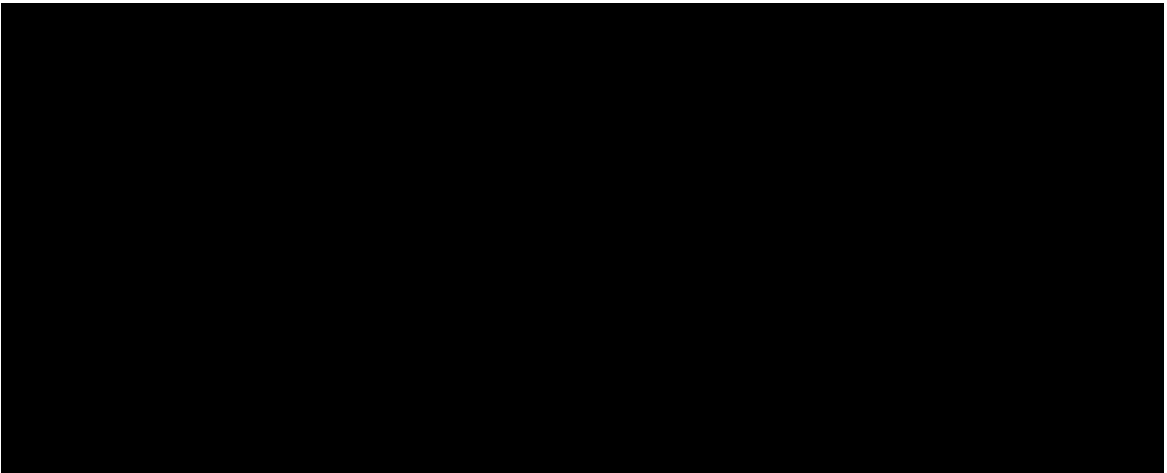


Fig. 34: Allungamento fogliare medio nelle foglie intermedie (verde chiaro) e giovanili (verde scuro) in talee trattate con SNP e di controllo trapiantate in mare .

Sebbene l'effetto dei trattamenti si sia diluito nel tempo dobbiamo sottolineare che dal controllo delle talee in mare effettuato dopo un anno è stata riscontrata una sopravvivenza delle talee del 91,7% che fa intravedere la possibile applicabilità della metodologia messa a punto.

Gli esperimenti condotti hanno dato risultati positivi per l'attecchimento e la sopravvivenza delle talee sia applicando solamente acqua di mare autoclavata (controllo), che trattando con SNP a varie concentrazioni (8,9,10 μM) che ha stimolato l'accrescimento fogliare.

Le nostre osservazioni hanno inoltre permesso di stabilire che la stimolazione della crescita fogliare è anche funzione dell'età fogliare: le foglie adulte mostrano infatti un accrescimento limitato o nullo, mentre le foglie giovani ed le intermedie sono quelle in cui i diversi trattamenti hanno stimolato maggiormente la crescita.

Se si confrontano gli esperimenti fatti in acquario e quelli in mare si osserva chiaramente che sull'esperimento in mare è stata riscontrata una maggiore velocità delle talee a ristabilire un equilibrio dinamico nel loro ambiente naturale. Il trattamento delle

superfici di taglio dei rizomi con (SNP) ha comunque facilitato la ripresa vegetativa delle talee nei primi mesi dopo il reimpianto.

5.1.3 Piano sperimentale del secondo reimpianto in mare

Dalla prateria di Cirella sita ad una batimetria compresa tra 35/40 m nel mese di giugno del 2007 sono state prelevate 30 talee e trapiantate nel sito di San Nicola Arcella con modalità differenti tenendo conto dei risultati ottenuti nel il primo trapianto eseguito.

Recenti lavori riportano esperimenti di trapianto di talee di *Posidonia oceanica* utilizzando supporti di natura biodegradabile adoperando sia fibre naturali che supporti costituiti da una griglia di canne di bambù alla quale le talee venivano fissate tramite fibre di agave (Lepoint et al., 2004).

I materiali di supporto biodegradabili hanno il vantaggio di non lasciare nel tempo traccia del trapianto eseguito. Come questo spirito nel secondo esperimento di trapianto abbiamo scelto di utilizzare come supporto di ancoraggi per le talee sacchi di juta al posto delle reti in PVC. La juta, essendo una fibra naturale e quindi biodegradabile, limita l'impatto ambientale rispetto alle reti metalliche che sono state abitualmente utilizzate nella maggior parte dei lavori di reimpianto precedenti (Cinelli F., 1980, Cooper G., 1982, Meinesez et al. 1991a, Cardilio in preparazione).

Inoltre i sacchi di juta si prestano ad essere facilmente modellati alla morfologia del fondale e quindi favoriscono l'adesione delle talee al substrato.

Per il reimpianto sono state prelevate 30 talee, ognuna delle quali possedeva 4 ciuffetti fogliari dalla prateria di Cirella a 35/40 metri di profondità. Alla base di ciascun ciuffetto fogliare è stato praticato un foro per controllarne la crescita nei successivi controlli inoltre sono state rimosse tutte le radici presenti al fine di stimolare la radicazione ex novo.

Nella porzione terminale recisa del rizoma, è stata inserita una tettarella contenente acqua di mare filtrata e autoclavata senza utilizzare sostanze stimolanti, perché il loro effetto si è rilevato limitato ai primi mesi dopo il trattamento.

Le talee sono state fissate al sacco di juta con delle fascette di plastica, e ciascun fascio fogliare è stato fatto passare con estrema cura attraverso dei buchi praticati precedentemente nel sacco, in modo che i ciuffetti non avessero impedimenti nella loro crescita e contemporaneamente il rizoma fosse ben ancorato al supporto.

Infine il sacco è stato ancorato alla matre morta mediante dei picchetti di ferro.



Fig. 35 Preparazione delle talee sul sacco di juta

Dopo un mese è stato effettuato il primo controllo, tutte le talee sono risultate viventi e in ottimo stato di salute, inoltre il sacco di juta era completamente mimetizzato con l'ambiente circostante, tanto da sembrare una piccola "chiazza" naturale di prateria.



Fig. 36 Reimpianto dopo 1 mese

Il secondo controllo è stato effettuato dopo quattro mesi: le talee erano vive al 100 %. I ciuffetti di foglie avevano subito una notevole abscissione fogliare, simili peraltro come entità a quella della prateria preesistente in natura. Le foglie presenti erano in buon stato di salute e non presentavano il foro fatto al momento del reimpianto, dimostrando che si era verificato un rinnovo fogliare. Numerose foglie presentavano segni evidenti di pascolamento, probabilmente perchè il reimpianto da noi effettuato aveva attirato organismi visitatori delle praterie (ricci, salpe ecc.).



Fig. 37 Reimpianto dopo 4 mesi

Cinque talee a suo tempo reimpiantate sono state prelevate al fine di condurre l'analisi del ricoprimento degli epifiti in laboratorio da confrontare con quelli del sito di provenienza a maggiore batimetria. In tale occasione è stato possibile anche constatare la presenza di radici ben sviluppate come si può notare nelle fig. 38, indice di un buon attecchimento delle talee trapiantate.



Fig. 38 Formazione di nuove radici

5.2 ADATTAMENTO DELLE TALEE DI *P. OCEANICA* A DIVERSA BATIMETRIA

5.2.1 Analisi fenologiche

Al fine di poter verificare eventuali variazioni correlabili al cambiamento di batimetria ed a fenomeni di riadattamento sono state prelevate in immersione con autorespiratore ad aria (ARA) cinque talee con quattro fasci fogliari ciascuna

- a) dalla prateria in profondità (Cirella 35/40m),
- b) dalla prateria naturale esistente a San Nicola a batimetria 5 m
- c) dal reimpianto eseguito nello stesso sito di San Nicola Arcella;

Su questi tre gruppi di talee sono stati eseguite analisi fenologiche e degli epifiti

In laboratorio per ogni talea sono stati analizzati i singoli fasci e; ciascun fascio è stato scomposto e le foglie sono state separate e classificate in *giovani* (le più interne, lunghe meno di 5 cm), *intermedie* (lunghe più di 5 cm e senza ligula) ed *adulte* (le più esterne, provviste di ligula) secondo la classificazione di Giraud (*Giraud, 1977*).

Per ciascuna foglia giovanile è stata misurata la larghezza, misurata al punto medio della foglia e la lunghezza, misurata dal punto d'inserzione della base sul rizoma all'apice del lembo.

Per ciascuna foglia intermedia sono stati misurati altri parametri aggiuntivi: lunghezza del tessuto verde, misurata dalla base della concavità della ligula fino alla fine del tessuto verde e la lunghezza del tessuto bruno, quando era presente.

Per ciascuna foglia adulta sono state misurate le stesse grandezze analizzate nelle foglie intermedie, aggiungendo la lunghezza della base, misura che va dal punto d'inserzione sul rizoma al centro della concavità della ligula.

Dalla lunghezza e larghezza media fogliare si è calcolata la superficie fogliare. I risultati ottenuti, riportati negli istogrammi di Fig. 39-40, mostrano chiaramente una maggior lunghezza e superficie fogliare nelle talee prelevate in profondità rispetto a quelli registrati sia nelle foglie della prateria superficiale che delle talee reimpiantate.

I parametri fenologici delle talee utilizzate nel reimpianto evidenziano che le foglie nel fondale di San Nicola Arcella a - 5 m prodotte ex novo, riconoscibili per la mancanza di perforazione, nei quattro mesi del trapianto hanno manifestato caratteristiche simili a quelle delle foglie prodotte naturalmente da *Posidonia* alla batimetria di - 5 m.

Questo risultato indica chiaramente che le foglie delle talee prelevate dalla prateria in profondità hanno modificato il loro progetto morfogenetico per adattarsi al cambiamento di batimetria riducendo le loro dimensioni fogliari.

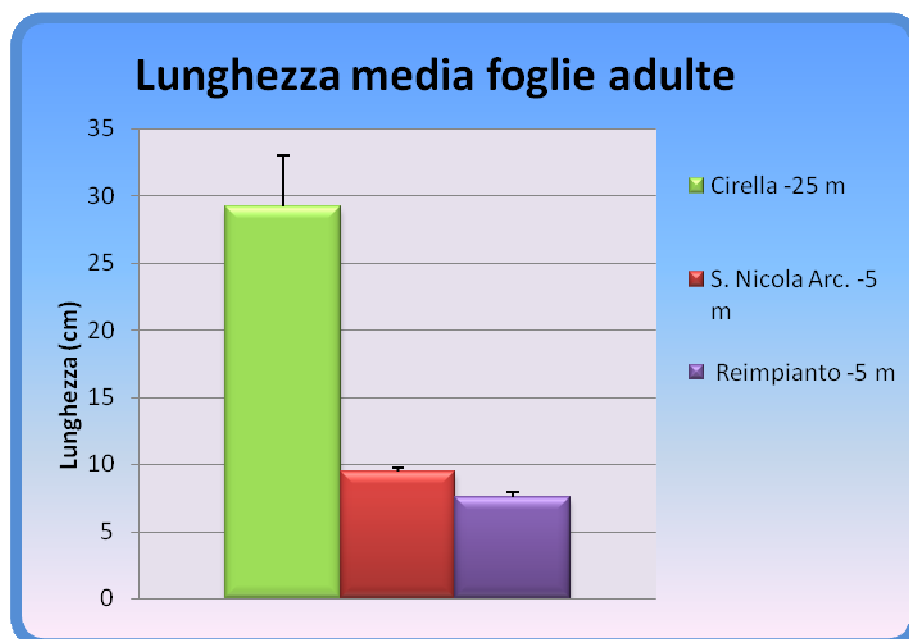


Fig. 39 Grafico della lunghezza media delle foglie adulte

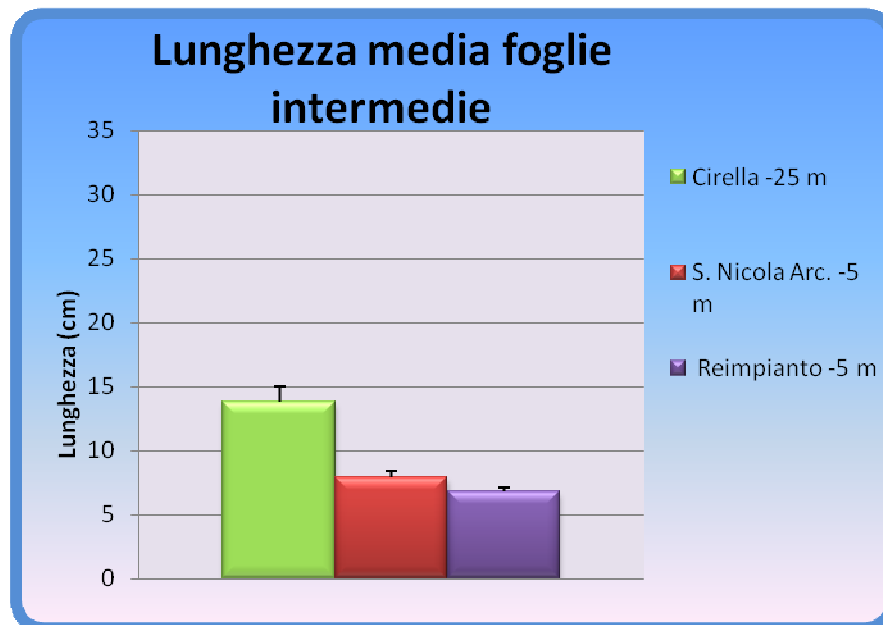


Fig. 40 Grafico della lunghezza media foglie adulte ed intermedie

Per ogni gruppo di talee provenienti dalle diverse zone è stato anche calcolato il coefficiente A fig. , che rappresenta la percentuale di foglie adulte ed intermedie che presentano gli apici rotti; si determina dividendo il numero di foglie con apice rotto per il numero di foglie totali osservato e moltiplicato per cento. Il coefficiente A riassume in sé diversi fattori sia di natura biologica come la presenza di erbivori o l'età della foglia stessa, che di natura meccanica come l'idrodinamismo.

Dal grafico in fig. si può notare che la percentuale di apici rotti è pressoché nullo nella prateria in profondità, molto basso in quella superficiale mentre è elevata nelle talee del reimpianto. Questo dato è imputabile al maggior idrodinamismo presente in superficie a cui le talee prelevate in profondità sono state sottoposte, ma anche ad un elevato grazing nella zona i cui segni sono molto evidenti.

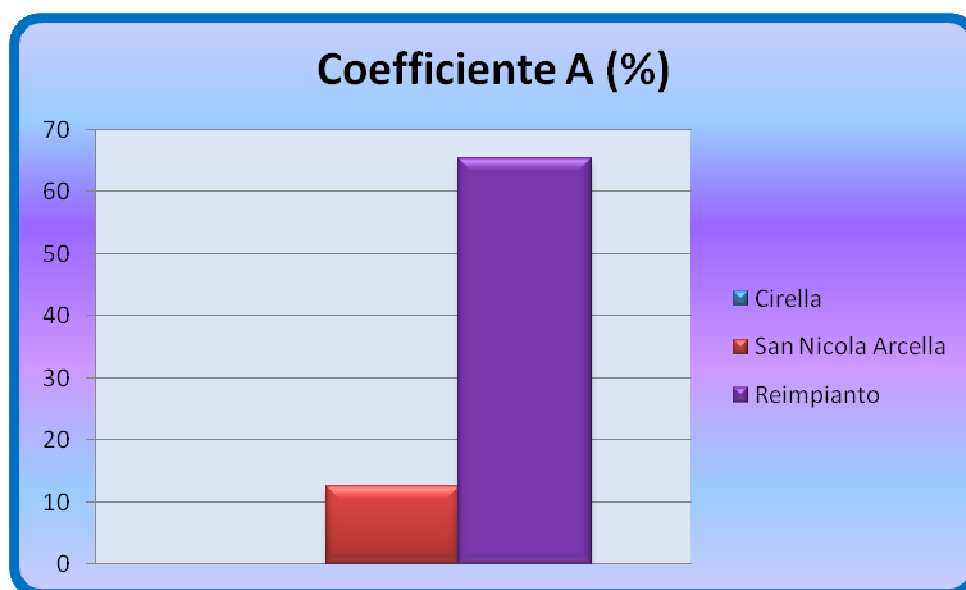


Fig. 41 Grafico del coefficiente A



Fig. 42 Particolare del grazing sulle foglie di *P. oceanica*

5.2.2 Analisi degli epifiti

Sulle stesse foglie utilizzate per le analisi fenologiche sono state analizzate le comunità degli epifiti.

L'analisi quantitativa degli epifiti fogliari è stata condotta sulle foglie più vecchie di ciascuno dei fasci prelevati in ciascuna area di campionamento. Ogni foglia è stata osservata allo stereoscopio, con oculare fornito di reticolo micrometrico suddiviso in 100 unità, all'ingrandimento di 16X. Sono state effettuate cinque osservazioni nei primi 10

cm della porzione terminale, ad una distanza di 2,5 cm l'una dall'altra, in direzione apice-base, partendo dal punto in cui la foglia presentava una larghezza costante.

In ogni osservazione è stato annotato il ricoprimento espresso in percentuale delle specie epifite animali e vegetali oppure, laddove il riconoscimento della specie non risultava immediata, dei taxa di livello superiore o dei gruppi morfologici di appartenenza.

L'analisi quantitativa degli epifiti dei rizomi è stata effettuata utilizzando la stessa metodica impiegata per le foglie considerando una porzione di rizoma di circa 3 cm e quindi distanziando le cinque osservazioni di 0.7 cm l'una dall'altra.

I dati ottenuti mostrano un ricoprimento percentuale sia nelle foglie che nel rizoma nettamente maggiore nella prateria in profondità di Cirella rispetto quella superficiale di San Nicola Arcella, nonostante sia noto in letteratura che in profondità sia presente un minor ricoprimento di epifiti (Lepoint et al., 1999).

Questa discordanza probabilmente è dovuta ad un idrodinamismo comunque maggiore nei fondali di San Nicola Arcella ad una batimetria tra 5-8 m rispetto alla prateria di Cirella sita ad una batimetria tra 35/40 m che potrebbe ostacolare l'ancoraggio degli epifiti.

Per ciò che riguarda il ricoprimento fogliare da parte degli epifiti nelle talee trapiantate questo è molto limitato in quanto si è verificato una elevata abscissione fogliare rilevabile dall'assenza nelle foglie del foro praticato al momento del reimpianto.

I risultati ottenuti rilevano che la percentuale di ricoprimento degli epifiti fogliari è la seguente:

1. Foglie della prateria stanziale alla batimetria di 5/8 m da considerare come controllo: 15 %.
2. Foglie prodotte dalle talee prelevate a Cirella in profondità (25-30) e reimpiantate alla batimetria di 5 m: 2 %.
3. Foglie della prateria di prelievo delle talee sita in Cirella a profondità di 35/40 m: 18 %.

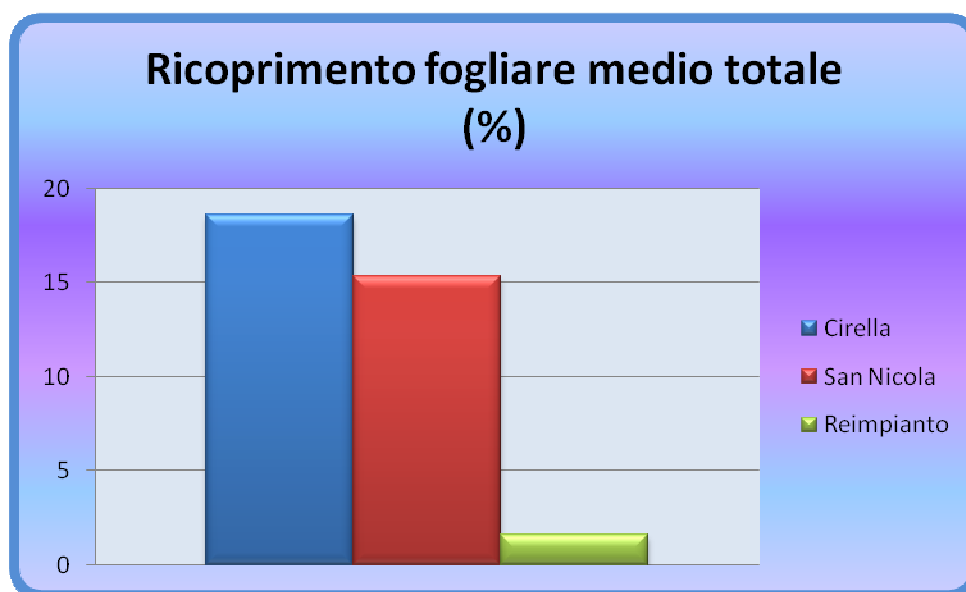


Fig. 43 Grafico del ricoprimento fogliare medio totale

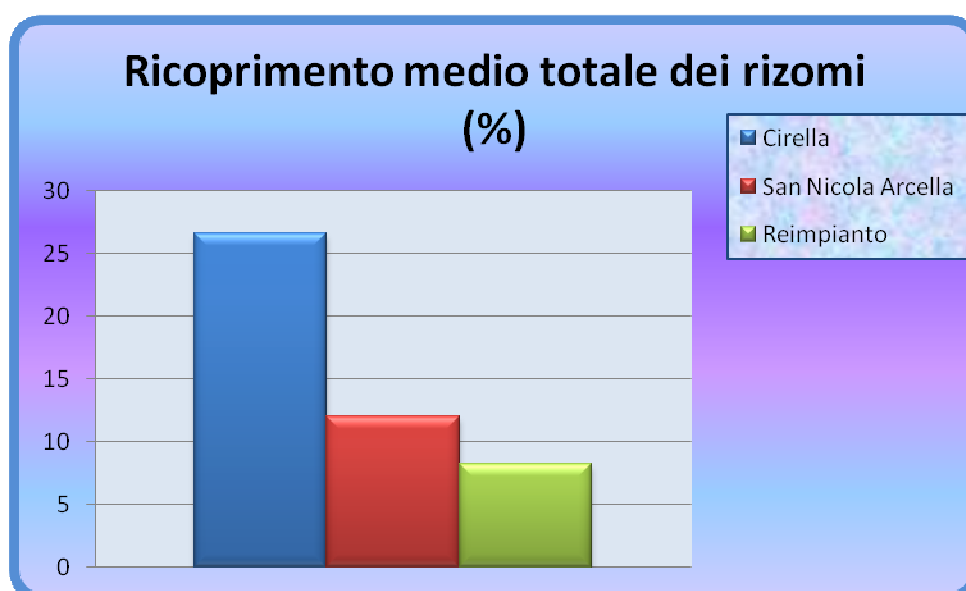


Fig. 44 Grafico del ricoprimento medio totale dei rizomi

La bassa percentuale di colonizzazione delle foglie del reimpianto da parte degli epifiti probabilmente è dovuta a due fattori, uno riconducibile al riadattamento delle talee al cambiamento di batimetria e alle nuove condizioni ambientali, e l'altro è riconducibile al poco tempo trascorso dal momento del reimpianto, solo 4 mesi.

Le specie di epifiti fogliari rinvenuti appartengono a quattro gruppi principali: Corallinacee incrostanti, Filamentose, Corticate cilindriche e Fogliose, come possiamo notare nel grafico in fig. 49.



Fig 45 *Hydrolithon farinosum*



Fig 46 *Fosiella* sp.

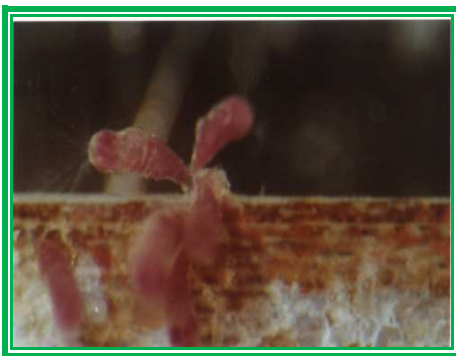


Fig 47 *Chilocladia verticillata*



Fig 48 *Ceramium flaccidum*

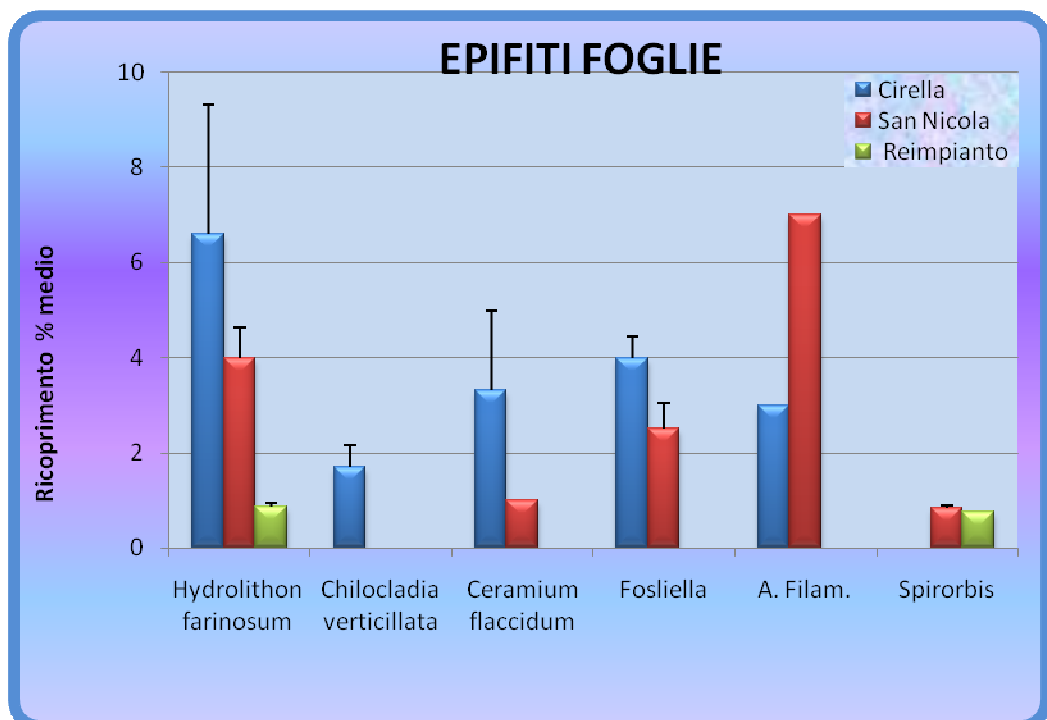


Fig. 49 Ricoprimento fogliare degli epifiti

Per quanto riguarda i rizomi è stato rinvenuto oltre alle alghe filamentose ed incrostanti anche il foraminifero *Miniacina miniacea*, il briozoo *Scrupocellaria reptans* e l'alga verde *Codium bursa*, come possiamo notare nel grafico in fig. 52.



Fig.50 *Scrupocellaria reptans*



Fig. 51 *Miancina miniacea*

Per quanto riguarda la percentuale di ricoprimento in profondità è stata riscontrata una percentuale maggiore di alghe filamentose, del briozoo *Scrupocellaria reptans* e del foraminifero *Miniacina miniacea*. In superficie invece la percentuale di ricoprimento di questi organismi risulta equivalente nella prateria stanziale e nelle talee trapiantate.

La percentuale di ricoprimento della specie *Fosliella* e dell'alga verde *Codium* è maggiore in superficie mentre presenta valori paragonabili in profondità e nel reimpianto, probabilmente questo è dovuto al breve periodo trascorso dal momento del reimpianto.

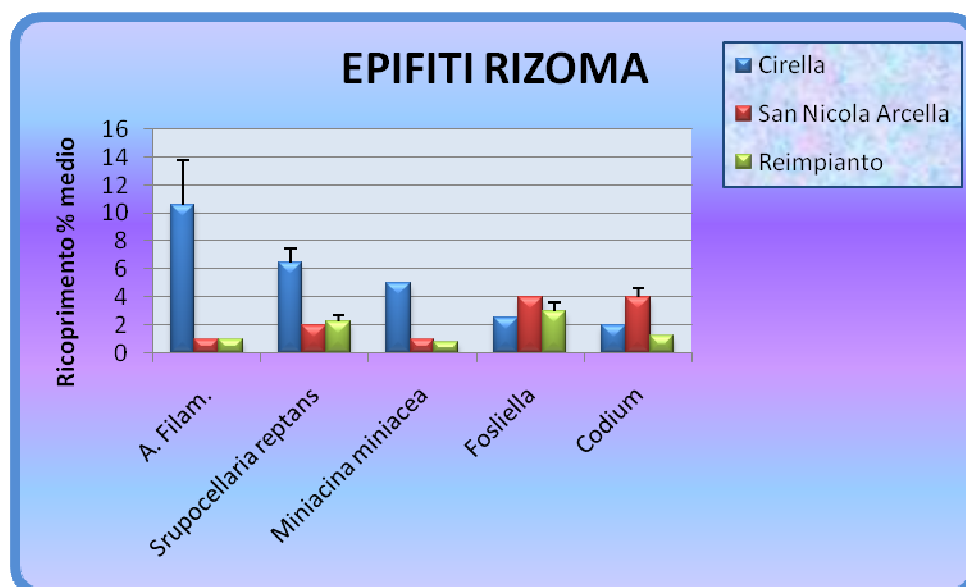


Fig. 52 Distribuzione degli epifiti dei rizomi

CONCLUSIONI

Le ricerche portate avanti nell'ambito del dottorato di ricerca in biologia vegetale hanno riguardato lo studio del sistema *Posidonia oceanica*, mediante sperimentazioni sia in acquario che in mare. Digni di nota sono i risultati positivi ottenuti nella messa a punto di una metodologia in grado di garantire una percentuale elevata di attecchimento delle talee trapiantate prevenendo lo sviluppo di infezioni batteriche e/o funginee sulla superficie di taglio del rizoma. Contemporaneamente tale metodologia ha consentito di trattare localmente le talee con sostanze stimolanti della crescita senza dispersione nell'ambiente esterno circostante. Il risultati ottenuti hanno dimostrato una elevata sopravvivenza delle talee trapiantate in acquario ed in mare che ha permesso di ottenere la registrazione del brevetto n° **CS 20007 A000018 del 19/04/07**.

I trattamenti effettuati con sodionitroprusside (SNP) a diverse concentrazioni ed in diversi periodi dell'anno hanno permesso inoltre di ottenere una stimolazione della crescita fogliare. Questi risultati dimostrano chiaramente che le fanerogame riadattate all'ambiente acquatico marino rispondono in maniera diversa rispetto alle fanerogame terrestri. In queste infatti l'SNP stimola la radicazione. Esperimenti condotti sulle talee di *Posidonia oceanica* in diversi periodi stagionali hanno inoltre dimostrato che l'NO rilasciato nei trattamenti è attivo nella stimolazione soltanto nel periodo invernale in linea con la richiesta stagionale di azoto della pianta in natura.

Per quanto riguarda la sperimentazione in mare è stato ottimizzato l'ancoraggio delle talee attraverso la messa a punto di un supporto per il trapianto consistente in teli di juta, fibra naturale e biodegradabile. Dopo quattro mesi dal momento del trapianto tale supporto è risultato ben mimetizzato con l'ambiente circostante e risulta letteralmente ricoperto da alghe che non hanno invece colonizzato i supporti costituiti da reti in PVC adoperati per il primo reimpianto.

I risultati ottenuti rappresentano una buona base di partenza sulla quale fondare future ricerche mirate al recupero dell'ecosistema delle praterie di *Posidonia oceanica* che costituiscono il più importante sistema produttivo e di difesa degli ambienti marini costieri. In futuro per proseguire nell'obiettivo del recupero di tale ecosistema occorrerà individuare le zone dove le praterie presentano la massima performance e variabilità genetica per selezionare praterie donatrici prediligendo quelle estese a diverse batimetrie o con recenti fioriture. Dovranno altresì essere selezionati siti da recuperare dove siano

ripristinate condizioni di naturalità ed effettuati adeguati studi sulle caratteristiche abiotiche ed edafiche.

I dati ottenuti nella presente tesi indicano infine l'opportunità di effettuare trapianti nel giusto periodo dell'anno e la possibilità di stimolare la crescita delle talee nel primo periodo di impianto per facilitarne l'attecchimento e l'adattamento.

La metodologia messa a punto e brevettata potrebbe inoltre consentire di utilizzare trattamenti esogeni, finalizzati sia a chiarire la fisiologia delle fanerogame marine che ad individuare applicazioni strategiche per la salvaguardia dell'ecosistema *Posidonia*.

BIBLIOGRAFIA

- Addy C.E., 1947a. Eelgrass planting guide. Maryland Conservationist, USA, 24: 16-17.
- Balestri E., Piazzzi L., Cinelli F., 1998 Survival and growth of transplanted and natural seedlings of *Posidonia oceanica* in a damaged coastal area. J Exp Mar Biol Ecol 228: 209–225.
- Balestri E., Cinelli F., Piazzzi L., 1998. Survival and growth of transplanted and natural seedlings of *Posidonia oceanica* (L.) Delile in a damaged coastal area. J. exp. mar. Biol. Ecol., 228: 209-225.
- Balestri E., Bertini S., 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration, in “Aquatic botany” Vol. 76: 291-297.
- Balestri E., Bertini S., 2003. Growth and development of *Posidonia oceanica* seedlings treated with plant growth regulators: possible implications for meadow restoration. Aquatic Botany, Vol. 76 (4): 291-297.
- Boudouresque C.F., Jeudy De Grissac A., Meinesz A., 1984. Relations entre la sédimentation et l’allongement des rhizomes orthotropes de *Posidonia oceanica* dans la baie d’Elbu (Corse). In: Boudouresque C.F., Jeudy de Grissac A., Olivier J. edits. International Workshop on *Posidonia oceanica* beds, GIS Posidonie publ., Fr., 1: 185-191.
- Boudouresque C. F. and Verlaque M., 2002. Biological pollution in the Mediterranean Sea: invasive versus introduced macrophytes. Marine Pollution Bulletin, Vol. 44 (1): 32-38.
- Calumpang H., Fonseca M., 2001. Seagrass transplantation and other seagrass restoration methods. In: Short F.T., Coles R.G. edits. Global seagrass research methods. Elsevier publ., Amsterdam: 425-443.
- Calvo S., Fradà Orestano C., 1984. L’herbier à *Posidonia oceanica* des cotes Siciliennes: les formations récifales du Stagnone. In : Boudouresque C. F., Jeudy de Grissac A., Olivier J. (eds). 1st International Workshop *Posidonia oceanica* Beds, GIS Posidonie Publ. , F.R. 1: 29-37.
- Calvo S., Ciruolo G., La Loggia G., Malthus T. J., Savona E., Tomasello A. 1996. Monitoring *Posidonia oceanica* meadows in Mediterranean Sea by means of airborne and satellite remote sensing. Second International Airborne Remote Sensing Conference and Exhibition, San Francisco, California, 24-27 June 1996, 3: 659-668.
- Cardilio M., Nicastro S., Rende S. F., Innocenti A. M. 2007. Nitric oxide effect in transplanted cuttings of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Actes du 3^{ème} Symposium méditerranéen sur la végétation marine. Marseille, 27-29 mars 2007: 28-33.

- Caye G. et Rossignol M.- 1983: *La croissance saisonnière de Posidonia oceanica*, in Marine Biology Vol. 75 : 79-88.
- Caye G., Rossignol M., 1983. Etude des variations saisonnières de la croissance des feuilles et des racines de *Posidonia oceanica*. Marine Biology, 75 : 79-88.
- Caye G., Blachier J. & Meinesz A, 1995. Observations sur la floraison de boutures de *Posidonia oceanica* cultivées en Aquarium depuis sept ans. Comm Int. Exp. Sc. Med. Rapp. Comm. int. Mer Medit.: 34 - 23.
- Charbonnel E., Vaugelas J. de, Chiaverini D., Cottalorda J.M., Gravez V., Francour P., Abellard O., RemonnaY L., Menager V., Boudouresque C.F., 1995 f. Cartographie de l'herbier de Posidonie et autres types de fonds dans le secteur des îles d'Hyères (Var, France) pour le passage d'un câble Télécom à fibres optiques. Notice d'impact. France Télécom & GIS Posidonie, GIS Posidonie publ., Fr.: 1-124.
- Chessa L.A., Fresi E., 1994. Conservazione e gestione delle praterie di *Posidonia*. In: Monbailliu X., Torre A. edits. La gestione degli ambienti costieri e insulari del Mediterraneo. Edizione del Sole publ., Ital.: 103-127.
- Cinelli F., 1980. *Le Fanerogame marine: problemi di trapianto e di riforestazione*. In "Mem. Biol. Mar. Oceanogr", Ital., suppl. 10: 17-25.
- Cinelli F., 1980. Le Fanerogame marine: problemi di trapianto e di riforestazione. Mem. Biol. Mar. Oceanogr., Ital., suppl. 10: 17-25.
- Cinelli F., 1991. La riforestazione quale mezzo di ripristino e di controllo per le praterie di Fanerogame marine. In: Parchi marini del Mediterraneo. Problemi e perspective. Atti del 2ème convegno internazionale, San Teodoro. Icimar publ. , Sardegna, Ital.: 78-82.
- Cinelli F., Abbiati M., Alvisi M., Bianchi N. C., Colantoni P., de Strobel F., 2003. Corso formativo per Ricercatore Scientifico Subacqueo, 139, 121-125.
- Cinelli Francesco Luigi, Boccalaro Federico, Cinelli Francesca, Burgassi Marina, Piazza Luigi, Rende Francesco, Zanella Matteo, 2007. Technique de fixation des boutures de *Posidonia oceanica* (L.) Delile en Méditerranée: adaptation en milieu marin d'un système déjà utilisé sur terre. Proceedings of 3rd Mediterranean symposium on marine vegetation (Marseille, 27-29 March 2007).
- Conde Poyales F., 1989. Ficogeografía del mar de Alborán en el context del Mediterráneo occidental. An. Jard. Bot. Madrid 46 (1): 21-26.
- Cooper G., 1976. Jardinier de la Mer. Association-Fondation G. Cooper pour la reconquête des milieux naturels détruits. Cahier 1: 1-57.

- Cooper G., 1982. Réimplantation de *Posidonia oceanica*. Protection des implants. Bull. Ecol. 13(1): 65-73.
- Cozza R. , Chiappetta A. A. C. , Petrarulo M. , Salimonti A. , Rende S. F. , Bitonti M. B. A. , Innocenti A. M., 2004. " Cytophysiological features of *Posidonia oceanica* as putative markers of environmental conditions". Chemistry and Ecology, Vol. 20, n. 3, 215-223.
- Davis R.C., Short F.T., 1997. Restoring seagrass, *Zostera marina* L., habitat using a new transplanting technique: the horizontal rhizome method. Aquat. Bot. 59: 1-15.
- Dennison W.C., Alberte R.S., 1986. Photoadaptation and growth of *Zostera marina* L. (eelgrass) transplants along a depth gradient. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 98: 265-282.
- Durand C., Manuel M., Boudouresque C.F., Meinesz A., Verlaque M., Le Parco Y., 2002. Molecular data suggest a hybrid.
- Faccioli F., 1996. The morphological restoration of the Venice Lagoon. Quaderni trimestriali, Consorzio Venezia Nuova, Italie, suppl. 3-4: 1-24.
- Fonseca M.S., Kenworthy W.J., Homziak J., Thayer G.W., 1979. Transplanting of eelgrass and shoalgrass as a potential means of economically mitigating a recent loss of habitat. In: Cole D.P. edit. Proc. 7th ann. Conf. Wetlands Restor. Creation publ., USA: 279-326.
- Fonseca M.S., Kenworthy W.J., Thayer G.W., 1982c. A low-cost planting technique for eelgrass (*Zostera marina* L.). National marine Fisheries Service, Southeast Fisheries Center, Beaufort Laboratory publ., USA: 1-15.
- Frankignoulle M., Bouquegneau E. M., 1987. *Seasonal variation of the diel carbon budget of a marine macrophyte ecosystem*, in "Marine ecology progress series" Vol. 38: 197-199.
- Fresi E., Cinelli F., e coll. 1979. Documenti sull'ecologia dell'ecosistema *Posidonia oceanica* (L.) nelle acque dell'isola di Ischia. Atti Convegno Sc. Naz. Progetto finalizzato oceanografia e fondi marini. C.N.R. Roma, (1): 145-146.
- Genot J., Caye G., Meinesz A., Orlandini M., 1994. *Role of chlorophyll and carbohydrate contents in survival of Posidonia oceanica cuttings transplanted to different depths*, in "Marine Biology", Vol. 119, pag. 23-29.
- Giaccone G., Calvo S., 1980. Restaurazione del manto vegetale mediante trapianto di *Posidonia oceanica* (Linneo) Delile. Risultati preliminari. Mem. Biol. Mar. Oceanogr., Ital., suppl. 10: 207-211.
- Giraud G., 1977. Contribution à la description et à la phénologie quantitative des herbiers à *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Thèse Doctorat 3^{ème} cycle, univ. Aix-Marseille II, 1-150.
- Gobert S., Laumont N., Bouquegneau J. M., 2002. *Posidonia oceanica* meadow: a low nutrient high chlorophyll (LNHC) system?. In "BMC Ecology" Vol. 2 (1): 2-9.

- Gunasekera D. and Berkowitz G. A., 2003. Use of Transgenic Plants with Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Antisense DNA to Evaluate the Rate Limitation of Photosynthesis under Water Stress. *Plant Physiol.* 1993 October; 103(2): 629–635.
- Innocenti A. M., Cardilio M., Nicastro S. and Rende S. F.- Patent CS2007A000018 of 19/04/07.
- Janssen and Bremer, 2004 T. Janssen and K. Bremer, The age of major monocot groups inferred from 800+rbcL sequences, *Bot. J. Linn. Soc.* 146 (2004), 385–398.
- Jeudy de Grissac A. and Boudouresque C. F., 1985. Rôle des herbiers de Phanérogames marines dans les mouvements de sédiments côtiers : les herbiers à *Posidonia oceanica*. Colloque franco-japonais d’Océanographie, Marseille, Fr., 1. 143-151.
- Jeudy De Grissac A., 1984. Effets des herbiers à *Posidonia oceanica* sur la dynamique marine et la sédimentologie littorale. In: Boudouresque C.F., Jeudy de Grissac A., Olivier J. edits. *International Workshop on Posidonia oceanica beds, GIS Posidonie publ., Fr., 1: 437-443.*
- Jeudy De Grissac A., 1984. Essais d’implantations d’espèces végétales marines: les espèces pionnières, les Posidonies. In: Boudouresque C.F., Jeudy de Grissac A., Olivier J. edits. *International Workshop on Posidonia oceanica beds, GIS Posidonie publ., Fr., 1: 431-436.*
- Kenworthy W.J., Fonseca M.S., Homziak J., Thayer G.W., 1980. Development of a transplanted seagrass (*Zostera marina* L.) meadow in Back Sound, Carteret County, North Carolina. In: Cole D.P. edit. *Proc. 7th ann. Conf. Wetlands Restor. Creation publ., USA: 175-193.*
- Lepoint G., Havelange S., Gobert S., Bouquegneau J.M., 1999. Fauna vs flora contribution to the leaf epiphytes biomass in a *Posidonia oceanica* seagrass bed (Revellata Bay, Corsica). *Hydrobiologia: 63-67.*
- Lepoint G., Millet S., Dauby P., Gobert S., Bouquegneau J. M., 2002. Annual nitrogen budget of the seagrass *Posidonia oceanica* as determined by in situ uptake experiments, in “*Marine ecology progress series*” Vol. 237: pp. 87-96.
- Lepoint G., O. Defawe O., S. Gobert S., P. Dauby P., Bouquegneau J. M., 2002. *Experimental evidence for N recycling in the leaves of the seagrass Posidonia oceanica*, in “*Journal of sea research*” Vol. 48: pp. 173-179.
- Lepoint G., Vangeluwe D., Eisinger M., Paster M., van Treeck P., Bouquegneau J. M., Gobert S., 2004. *Nitrogen dynamics in Posidonia oceanica cuttings: implications for transplantation experiments*, in “*Marine Pollution Bulletin*” Vol. 48: pp. 465-470.

- Lewis R.R., 1987. The restoration and creation of seagrass meadows in the Southeast United States. Florida Mar. Res. Publ. 4: 153-173.
- Maggi P., 1973. Le problème de la disparition des herbiers à Posidonies dans le golfe de Giens (Var). Sci. Pêche, Fr., 221: 7-20.
- Mazzella L., Gambi M. C., Russo G.F., Buia M. C., 1984. Deep flowering and fruiting of *Posidonia oceanica* beds around the Island of Ischia (Gulf of Naples, Italy). C.F. Bouderesque, A. Jeudy de Grissac & J. Oliver edits. Publ. G.I.S. Posidonie, Fr., 1: 2003-2009.
- Mazzuca S., Cozza R., Filadoro, Pangaro T., Innocenti A. M. 2006b. Leaf proteome analysis and ultrastructural features in *Posidonia oceanica* beds in different environmental conditions. Marine seagrasses Workshop, Malta 29th May to 3th June.
- Meinesz A., Lefèvre J.R., 1976a. Inventaire des restructurations et impacts sur la vie “sous-marine” littorale. Alpes-Maritimes et Principauté de Monaco. DDE-CIPALM & Université de Nice publ.: 1-67 + 17 pl. h. t.
- Meinesz A., Lefèvre J.R., 1976b. L’aménagement de la côte entre Menton et Théoule (Alpes Maritimes et Monaco). Inventaire des restructurations du rivage et impacts sur la vie sous marine littorale. SOS Vie Nature Environnement 1 (num. spéc.): 1-35.
- Meinesz A., 1978. Etude expérimentale de bouturage de certains végétaux sous-marins dans les ports et les plages artificielles. 15^{ème} Journées de l’Hydraulique, Rev. Soc. Hydrotechnique Fr. 5(9-1): 4.
- Meinesz A., Verlaque M., 1979. Note préliminaire concernant quelques expériences de repiquage de *Caulerpa prolifera* et de *Zostera noltii* dans la zone de rejet de l’effluent thermique de la centrale électrique de Martigues-Ponteau (golfe de Fos, France). Rapp. P.V. Réunion. Commiss. internat. Explor. sci. Médit. 25-26: 209-212.
- Meinesz A., Caye G., Loques F., Macaux S., 1990b. Analyse bibliographique sur la culture des Phanérogames marines. Posidonia Newsletter, Fr., (1): 1-67.
- Meinesz A. & Hesse B., 1991. Introduction et invasion de l’algue tropicale *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée Nord occidentale. Oceanologica Acta, 14 (4): 415-426.
- Meinesz A., Caye G., Loques F., Molenaar H., 1991a. Restoration of damaged areas with transplantation of seaweeds and seagrasses in the Mediterranean : review and perspectives. Oebalia 17(1 suppl.): 131-142.
- Meinesz, A Caye, F. Loques, F. and Molenaar, H., 1991: Growth and development in culture of orthotropic rhizomes of *Posidonia oceanica*. Da “Aquatic Botany”, Vol. 39: 367-377.

- Meinesz A., Molenaar H., Bellone E. & Loques F., 1992. Vegetative Reproduction in *Posidonia oceanica*. 1. Effects of Rhizome Length and Transplantation Season in Orthotropic Shoots. *Marine Ecology*, 13(2): 163-174.
- Molenaar H., Meinesz A., 1991. Transplantations de la Phanérogame marine *Posidonia oceanica* à Cannes et analyse architectural des rhizomes plagiotropes. *Laboratoire Environnement Marin Littoral, Univ. Nice-Sophia Antipolis, Fr.:* 1-37.
- Molenaar H., 1992. Etude de la transplantation de boutures de la Phanérogame marine *Posidonia oceanica* (L.) Delile. Modélisation de l'architecture et du mode de croissance. Thèse Doct. Sci. Vie, Univ. Nice Sophia Antipolis, Fr.: 1-221.
- Molenaar H., Meinesz A., 1993. (1) Suivi de 2000 boutures de *Posidonia oceanica* transplantées à l'Est de la baie de Cannes. (2) Transplantations de *Posidonia oceanica* au centre de la baie de Cannes: effets de la disposition des boutures et incidence du substrat. Modélisation de l'architecture et du mode de croissance. *Méditerranée 2000 & Laboratoire Environnement Marin Littoral, Univ. Nice-Sophia Antipolis, Fr.:* 1-270.
- Molenaar H., Meinesz A., Caye G., 1993. Vegetative reproduction in *Posidonia oceanica*. Survival and development in different morphological types of transplanted cuttings. *Bot. mar.* 36: 481-488.
- Molenaar H., Meinesz A., 1995. Vegetative reproduction in *Posidonia oceanica* : survival and development of transplanted cuttings according to different spacings, arrangements and substrates. *Bot. mar.* 38: 313-322.
- Noten T.M.P.A., 1983. Detached shoots of *Zostera noltii* Hornem. as a means of dispersal: a transplantation experiment. In: *Proceedings internat. Symp. aquat. Macrophytes*. Nijmegen, Netherlands: 161-164.
- Pagnussat G. C., Simontacchi M., Puntarlo S., Lamattina L.- 2002: Nitric oxide is required for root organogenesis, in "Plant Physiology" Vol. 129: 954-956.
- Pagnussat G. C., Lanteri M. L., Lamattina L., 2003: Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the Indole Acetic Acid-Induced adventitious rooting process, in "Plant Physiology" Vol. 132: 1241-1248.
- Pérès J.M., Picard J., 1964. Nouveau manuel de bionomie benthique de la mer Méditerranée. *Rec. Trav. Stat. mar.* Endoume 31(47): 3-137.

- Phillips R.C., 1980a. Responses of transplanted and indigenous *Thalassia testudinum* Banks ex Königs and *Halodule wrightii* Aschers. to sediment loading and cold stress. *Contrib. Mar. Sci.* 23: 79-87.
- Phillips R.C., 1980b. Transplanting methods. In: Phillips R.C., McRoy K.P. edits. *Handbook of seagrass biology: an ecosystem perspective*. Garland STMP press publ., New York, 4: 41-56.
- Piazzi L., Cinelli F., 1995. Restoration of the littoral sea bottom by means of transplantation of cuttings and sprouts. In: Cinelli F., Fresi E., Lorenzi C., Mucedola A. edits. *Posidonia oceanica, a contribution to the preservation of a major Mediterranean marine ecosystem*. *Revista marittima publ., Italy*: 69-71.
- Piazzi L., Ceccherelli G., Meinesz A., Verlaque V., Akçali B., Argyrou M., Balata D., Ballesteros E., Cinelli F., D'archino R., Javel J., Mifsud C., Pala D., Panayotidis P., Peirano A., Pergent G., Petrocelli A., Ruitton S., Zuljevic A., 2005. Invasion of *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea: the balance of thirteen years of spread. *Cryptogamie, Algologie* 26: 189-202.
- Primack B., Carotenuto L., 2003. *Conservazione della natura*: 167-168. Zanichelli, Bologna 2003
- Raffi S., Serpagli E., 1999. *Introduzione alla paleontologia*: 286-287, 289.
- Ralph P.J., Durako M.J., Enríquez S., Collier C.J. and Doblin M.A., 2007. Impact of light limitation on seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* Volume 350, Issues 1-2, 9 November 2007: 176-193.
- Rende F., M. Cardilio, R. Cozza, A.M. Innocenti, 2004. *Posidonia oceanica meadows monitoring in the Dino Island (Praja a Mare-CS, Italy) SIC SITE*.
- Rismondo A., Curiel D., Solazzi A., Marzocchi M., Chiozzotto E., Scattolin M., 1995. Sperimentazione di trapianto di Fanerogame marine in Laguna di Venezia: 1992-1994. In: *SITE Atti, Ital.*, 16: 699-701.
- Ruiz-Fernandez J.M., 2000. *Respuesta de la Fanerógama marina Posidonia oceanica (L.) Delile a perturbaciones antrópicas*. *Mem. Doct. Biol., Univ. Murcia, Spain*: 1-212.
- Ruiz J.M., Romero J., 2001. Effects of in situ experimental shading on the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 215: 107-120.
- Ruiz J.M., Romero J., 2003. Effects of disturbances caused by coastal constructions on spatial structure, growth dynamics and photosynthesis of the seagrass *Posidonia oceanica*. *Mar. Poll. Bull.* 46: 1523-1533.

- Serra, I., Procaccini, G., Intrieri, M.C., Migliaccio, M., Mazzuca, S., Innocenti, A.M., 2007. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in *Posidonia oceanica* (L) Delile. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 338: 71-79.
- Torchia G., Palandrini G., Cima C., Relini M., Relini G., 2000. La cartografia nello studio dell'invasione dell'alga *Caulerpa taxifolia*. *Biol. mar. Medit.* 7(1): 517-527.
- Tunesi L., Diviacco G., Mo G., 2001. Observations by submersible on the biocoenosis of the deep-sea corals off Portofino Promontory (Northwestern Mediterranean Sea). In: Martin Willison J. H. *et al.* edits. *Proc. of First international Symposium on deep-sea corals*. Ecology Action Centre and Nova Scotia Museum, Halifax, Nova Scotia: 76-87.
- Verlaque, M., 1994. Inventaire des plantes introduites en Méditerranée: origine et répercussions sur l'environnement et les activités humaines. *Oceanologica Acta* 17 1: 1-23.
- Verlaque M., Boudouresque C.F., Meinesz A., Gravez V., 2000. The *Caulerpa racemosa* complex (Caulerpales, Ulvophyceae) in the Mediterranean Sea. *Botanica marina* 43: 49-68.
- Verlaque M., Durand C., Huisman J.M., Boudouresque C.F., Le Parco Y., 2003. On the identity and origin of the Mediterranean invasive *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). *Eur. J. of Phycol.* 38: 4, 325-339.
- Villele X. de, Verlaque M., 1995. Changes and degradation in a *Posidonia oceanica* bed invaded by the introduced tropical alga *Caulerpa taxifolia* in the Northwestern Mediterranean. *Botanica marina* 38: 79-87.