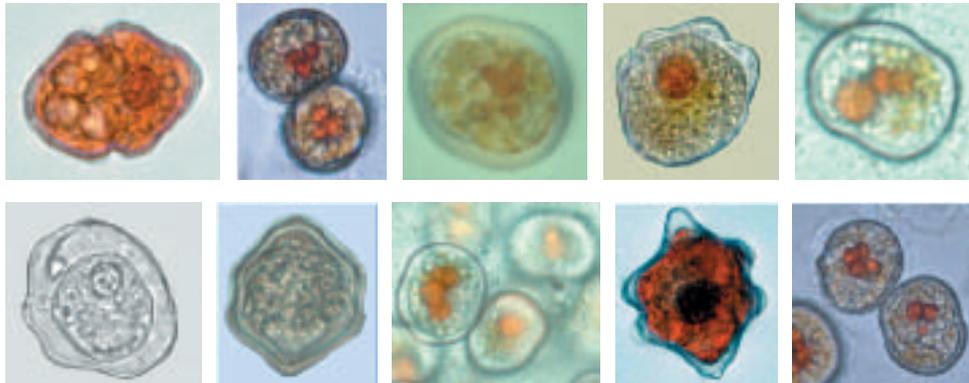


Capitolo 6

Studi *in vitro* sul ‘*Glenodinium sanguineum*’



*Questo capitolo traccia il percorso che ha portato al chiarimento nell'identificazione del dinoflagellato conosciuto come 'Glenodinium sanguineum'. Quella che si pensava fosse un'unica alga con plasticità morfologica e cromatica risulta essere, in realtà, un insieme di alghe costituito da tre specie distinte di dinoflagellati, tutte presenti nella Baia Rossa, ma con esigenze ambientali diverse. Solo *Tovellia sanguinea*, nuovo nome di una delle tre specie, è responsabile degli arrossamenti che hanno reso famoso il Lago di Tovel.*

Viene descritta, inoltre, un'applicazione innovativa di tecniche molecolari in campo ambientale, che ha permesso di evidenziare la notevole biodiversità dei dinoflagellati presenti nel Lago di Tovel e ha contribuito a confermare la presenza delle tre diverse specie nel contesto del 'Glenodinium sanguineum'.

*Infine, la possibilità di utilizzare strumentazioni specifiche per lo studio *in vitro* dei dinoflagellati ha contribuito a comprendere meglio le loro esigenze ecologiche.*

QUESTO LAVORO È DEDICATO ALLE COLLEGHE

M. ELISABETTA VINDIMIAN (1955-2004) E ANNARELLA FACCHINI (1956-2004)

Da *Glenodinium a Tovellia*

Giovanna FLAIM^{1*}, Øjvind MOESTRUP², Gert HANSEN² & Maura D'ANDREA¹

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

²Institute of Biology, University of Copenhagen, Øster Farimagsgade 2D, DK-1353 Copenhagen K, Denmark (DK)

*E-mail dell'Autore per la corrispondenza: giovanna.flaim@iasma.it

RIASSUNTO - *Da Glenodinium a Tovellia* - Il presente lavoro riassume i risultati relativi all'alga '*Glenodinium sanguineum*' ottenuti nell'ambito del progetto SALTO. Come si può dedurre dalla bibliografia pertinente, l'alga responsabile dei passati arrossamenti del lago è stata spesso confusa con altri dinoflagellati. Questa incertezza è dovuta sostanzialmente alla plasticità morfologica dei dinoflagellati e all'esame di campioni conservati, che facilmente perdono caratteri morfologici importanti. Lavorando con cisti isolate provenienti dalla Baia Rossa, invece che con cellule vegetative, è stato possibile chiarire che nel '*Glenodinium sanguineum*' come descritto prima da Baldi e più tardi da Dodge si trovano in realtà tre distinte specie di dinoflagellati con esigenze ambientali diverse. Approfondite analisi tassonomiche hanno stabilito l'appartenenza delle tre alghe a specie nuove. L'alga responsabile dei passati arrossamenti (*Tovellia sanguinea* sp. inedit.) è sempre presente nel plancton della Baia Rossa anche se attualmente non trova le condizioni per sviluppare una fioritura. Indizi indiretti suggeriscono che le passate fioriture erano legate alla pioggia estiva e alla trofia della Baia Rossa.

SUMMARY - *From Glenodinium to Tovellia* - This paper summarises the results obtained in the SALTO research project regarding '*Glenodinium sanguineum*'. Two main objectives were clarifying the taxonomic position of '*G. sanguineum*' and studying its autecology. Progression from Baldi's (1941) theory of two interchangeable "red and green series" of '*G. sanguineum*' started with an accurate bibliographic research which showed that within the dinoflagellate community of Tovel '*G. sanguineum*' has frequently been confused with other dinoflagellates and vice versa. Part of the problem has been caused by working with fixed Lugol stained samples which render athecate dinoflagellates all very similar with size differences frequently attributed to species plasticity. The isolation of a dinoflagellate from sediment samples taken in 2001 was very promising since it was similar to *Glenodinium sanguineum sensu* Dodge *et al* (1987). Autecology studies however excluded that it was capable of forming summer red blooms. In senescent cultures this dinoflagellate formed cysts with pigmented accumulation bodies producing a brick orange coloration and in dense cultures appears brownish. Most probably this alga was responsible for the "off colour and out of season" blooms in Lake Tovel. Cysts such as described by Baldi as over-wintering cysts of '*G. sanguineum*' (Baldi 1941, Pl. XXX-5) were isolated and germinated, but did not produce red cells or stable cultures. Many attempts were made to grow "green series" dinoflagellate cells isolated from summer plankton samples in the laboratory. None of these efforts produced a stable culture but after a few divisions some isolates produced cysts of the plate XXX-5 type. Examination of live plankton samples in 2003 revealed the presence of red dinoflagellate cells in summer samples and of red dinoflagellate cysts in autumn samples. These cysts, identified as '*Glenodinium sanguineum*' cysts (Baldi 1941, Pl. XXX-2 type), germinated into red cells. The above observations suggest that the so called '*G. sanguineum*' comprises three different species of dinoflagellates, and precisely i) *sensu* Dodge, ii) green series *sensu* Baldi and iii) red series *sensu* Baldi. Present day cysts correspond to those found in original Baldi samples taken in 1938 and kept in the Plankton Museum in Pallanza and pictured in Plate XXX 2 and 5. Molecular analysis has also confirmed that the dinoflagellates are three distinct species. These species of dinoflagellates, all present in the Red Bay, exhibit different ecological requirements such as temperature and seasonality; their taxonomic position is under investigation. The red series *sensu* Baldi dinoflagellate will take the name *Tovellia sanguinea* sp. inedit (Moestrup *et al.* 2006). Clarifying the existence of the three species did not explain why red blooms have not occurred since 1964. However, the present lack of dominance of the red species, indicates that a change in lake ecology has taken place around 1964. Indirect evidence links bloom formation to summer rainfall and the nutrient state of the lake.

Parole chiave: Lago di Tovel, *Glenodinium sanguineum*, *Tovellia sanguinea* sp. inedit.

Key words: Lake Tovel, *Glenodinium sanguineum*, *Tovellia sanguinea* sp. inedit.

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi 130 anni il Lago di Tovel è stato oggetto di oltre 300 pubblicazioni sia scientifiche sia divulgative (Fig. 1), tantissime per un piccolo lago. Tutto questo interesse è frutto di diversi fattori: la bellezza del luogo, le interessanti formazioni geomorfologiche della zona, la fauna ittica pregiata, ma l'arrossamento della Baia Rossa è senz'altro l'aspetto che ha suscitato più attenzione.

La prima documentazione scritta sull'arrossamento è dell'inglese Freshfield (1875) riferita a un suo viaggio nell'estate del 1864. Egli descrisse il fenomeno nei termini romantici tipici del periodo: "In the centre the water is dark blue as an Egyptian night; round the rim fallen pine-trunks are strewn in disorder along the bottom and dye the border of the lake the deepest red" (Nel centro del lago l'acqua è di un blu profondo come la notte egiziana; attorno al bordo tronchi di pino sono buttati con disordine sul fondo e colorano la riva del lago di un rosso profondo).

Ben presto il lago diventò meta di studiosi e fu visitato da molti scienziati fra i quali i naturalisti trentini Giovanni Canestrini e Giuseppe Loss (Tomasi 1989), che alla fine dell'800 attribuirono correttamente la colorazione rossa delle acque del lago a dei microrganismi acquatici. Ma è solo con il naturalista Vittorio Largaiolli che il fenomeno venne ricondotto alla fioritura di un dinoflagellato, classificato dallo stesso Largaiolli (1907) come *Glenodinium pulvisculus* Stein var. *oculatum* Largaiolli.

Il fenomeno del lago rosso era così eccezionale che verso la fine degli anni '30 il Museo Tridentino di Scienze Naturali incaricò il più illustre idrobiologo italiano dell'epoca di indagare sul fenomeno. Il pro-

fessor Edgardo Baldi, direttore dell'Istituto Italiano d'Idrobiologia di Pallanza, condusse diversi studi a Tovel durante il periodo 1937-1941. Va ricordato come Baldi in quegli anni abbia lavorato in condizioni molto disagiate, non solo per l'epoca storica, dove tutto era più difficile, ma anche per problemi logistici: campionare a Tovel in quegli anni richiedeva una vera e propria spedizione. Per la loro completezza, i lavori di Baldi hanno fatto scuola e sono stati considerati un punto fermo per lo studio del Lago di Tovel.

A parte il lavoro di Largaiolli (1907), che per primo identificò un dinoflagellato come l'alga responsabile del fenomeno, in sostanza tutto quello che si sapeva sull'arrossamento del Lago di Tovel proveniva direttamente dagli studi condotti da Baldi (1938, 1941) o da lui richiesti (Marchesoni 1941).

In sintesi, gli studi di Baldi sull'arrossamento del Lago di Tovel possono essere riassunti come segue:

- l'alga responsabile del fenomeno presenta una notevole polimorfismo;
- tuttavia, essa oscilla fra due stati fondamentali caratterizzati dalla presenza di un pigmento rosso diffuso nel corpo dell'alga (serie rossa) o dalla sua assenza, che smaschera il clorocroma clorofilliano (serie verde); le due "serie", rossa e verde, sono intercambiabili a seconda delle condizioni di temperatura e luce (Fig. 2);
- il glenodinio produce cisti invernali (Fig. 3);
- l'arrossamento avviene nelle giornate tranquille e serene

Consapevole delle difficoltà nell'identificazione dei dinoflagellati, lo stesso Baldi affidò la revisione tassonomica di *Glenodinium* (allora *Glenodinium pulvisculus* varietà *oculatum* Largaiolli) al botanico prof. Vittorio Marchesoni dell'Università di Padova. Egli

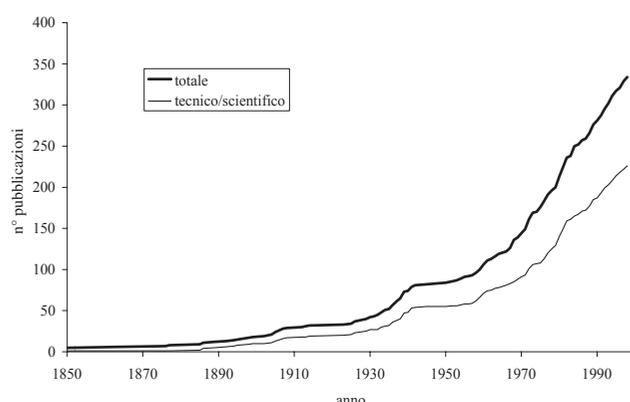


Fig. 1 - Numero totale delle pubblicazioni riguardanti il Lago di Tovel e la sua valle e di quelle tecnico/scientifiche (fonte Pallaveri 1999).

Fig. 1 - Total number of publications on Lake Tovel and its surroundings and scientific/technical literature (from Pallaveri 1999).

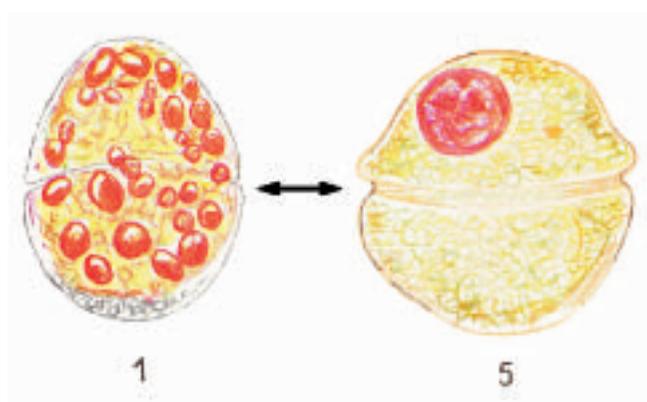


Fig. 2 - La serie rossa (a sinistra) e la serie verde (a destra) di *Glenodinium sanguineum* come disegnate da Baldi (disegni tratti da Baldi 1941 - Tavola XXIX 1 e 5).

Fig. 2 - The red series (left) and the green series (right) of *Glenodinium sanguineum* as drawn by Baldi (drawings from Baldi 1941 - Plate XXIX 1 and 5).



Fig. 3 - '*Glenodinium sanguineum*' - ciste immatura (sinistra) e matura (destra) secondo Baldi 1941 (Tavola XXX 2 e 5).

Fig. 3 - '*Glenodinium sanguineum*' - immature (left) and mature (right) cyst according to Baldi 1941 (Plate XXX 2 and 5).

riclassificò l'alga come '*Glenodinium sanguineum*' Marchesoni (Marchesoni 1941).

Offrendo sostanzialmente un'esauriente spiegazione del fenomeno, fra l'epoca di questi lavori (1937-1941) e la fine dell'arrossamento nel 1964, pochi altri studiosi si interessarono dell'argomento in questione. Tra questi si possono ricordare Marchesoni (1959), che scrisse un esteso articolo divulgativo, anche se con rigore scientifico, sul Lago e la Val di Tovel, e il chimico Gerosa (1959), che trattò la natura chimica dei composti responsabili della colorazione dell'alga.

Dopo la cessazione del fenomeno, numerosi studi, nonché ricerche limnologiche di base condotte con mezzi moderni, hanno cercato di capire il perché del mancato arrossamento. Questi studi sono stati oggetti di "review" in almeno tre occasioni (Tomasi 1989; Paganelli 1992; Cavalca *et al.* 2001).

Per quanto riguarda la tassonomia dell'alga rossa, l'algologo John Dodge e colleghi (1987) misero in discussione la collocazione della specie nel genere *Glenodinium* e ipotizzarono un suo più corretto riposizionamento nel genere *Woloszynskia*, suggerimento accettato da Popovský & Pfeister (1990) nel loro trattato sui dinoflagellati.

2. STATO DELL'ARTE – RICERCA BIBLIOGRAFICA

Il primo passo per affrontare l'argomento '*Glenodinium sanguineum*' è stato quello di esaminare tutta la bibliografia pertinente. A questo scopo è risultata di grande utilità la raccolta bibliografica eseguita dal Museo Tridentino di Scienze Naturali (Pallaveri 1999) e messa a disposizione del progetto.

Gli "eventi" più significativi riguardanti l'alga '*Glenodinium sanguineum*' e la sua fioritura sono riassunti in ordine cronologico in tabella 1. Si può notare che passano cent'anni dal primo accenno al fenomeno nel 1864 all'ultima fioritura nel 1964 e che a partire da questa data si assiste a un moltiplicarsi di lavori per la maggior parte improntati a trovare qualche spiegazione al mancato arrossamento del lago.

Esaminando attentamente tutti gli studi, e specialmente quelli posteriori al 1964, emergono due aspetti, se non proprio insoliti, per lo meno meritevoli di attenzione. Il primo riguarda i dinoflagellati presenti nel Lago di Tovel. Nella letteratura pubblicata fino al 1964, a parte il '*Glenodinium*', non vengono nominati altri dinoflagellati, con l'unica eccezione

Tab. 1 - Cronologia di '*Glenodinium sanguineum*' nel Lago di Tovel.

Tab. 1 - Chronology of '*Glenodinium sanguineum*' at Lake Tovel.

Anno	Evento	Referenza
1864	Primo scritto che menzioni la fioritura nella Baia Rossa	Freshfield 1875
1907	Fioritura attribuita al dinoflagellate <i>Glenodinium pulviscus</i> var. <i>oculatum</i>	Largaiolli 1907
1937-40	Dettagliati studi limnologici sul Lago di Tovel	Baldi 1938 1941
1941	Riclassificazione come ' <i>Glenodinium sanguineum</i> '	Marchesoni 1941
1964	L'ultima fioritura importante	Tomasi 1989
1970	Cambiamenti nel uso del territorio proposte come possibile causa della mancata fioritura	Dodge 1970
1977-85	Varie investigazioni limnologiche	Arrighetti & Siligardi 1979; Paganelli <i>et al.</i> 1980; Miola & Trevisan 1982
1987	Proposto cambiamento da ' <i>G. sanguineum</i> ' a <i>Woloszynskia</i>	Dodge <i>et al.</i> 1987
1990	<i>G. sanguineum</i> riclassificata come <i>Woloszynskia coronata</i>	Popovsky & Pfeister 1990
2001	Inizio progetto SALTO	-

Tab. 2 - Elenco delle specie di dinoflagellati nel Lago di Tovel pubblicati (1907-2000) con i riferimenti bibliografici.
 Tab. 2 - Species list of Tovel dinoflagellates in the literature (1907-2000) with bibliographic references.

Taxa	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	Referenze	Note
Anno													
<i>Glenodinium sanguineum</i> March.												1-10	Sempre presente
<i>Ceratium hirundinella</i>												1,2,3,4,6	<> densità, ~ assente dal 1995
<i>Gymnodinium simplex?</i>												5	dinoflagellate piccole atecate
<i>Gymnodinium ordinatum</i> Skuja												7	
<i>Gymnodinium</i> sp. piccoli												9,10	
<i>Peridinium aciculiferum</i>												10	
<i>Peridinium cinctum</i>												5	
<i>Gonyaulax</i> sp.												5	
<i>Gymnodinium helveticum</i>												9,10	
<i>Gymnodinium uberrimum</i>												9,10	

Referenze: 1) Largaiolli 1907; 2) Baldi 1941; 3) Marchesoni 1941; 4) Marchesoni 1959; 5) Dodge 1970; 6) Arrighetti & Siligardi 1979; 7) Paganelli *et al.* 1980; 8) Miola & Trevisan 1982; 9) Candioli & Tamanini 1998; 10) Archivi IASMA.

del *Ceratium*, dalla forma inconfondibile (Largaiolli 1907; Baldi 1938; 1941; Marchesoni 1959). Dopo il 1964, anno dell'ultima fioritura, si trova menzione di altri dinoflagellati, ma in modo sporadico e poco consistente (Dodge 1970; Arrighetti & Siligardi 1979; Paganelli *et al.* 1981; Miola & Trevisan 1982; Dodge *et al.* 1978; Candioli & Tamanini 1998) (Tab. 2).

In secondo luogo se si confrontano le dimensioni originariamente riportate da Largaiolli (1907) per *G. sanguineum* con le dimensioni utilizzate da vari autori per l'identificazione di quest'alga e altri dinoflagellati (Tab. 3), si nota una notevole sovrapposizione fra *G. sanguineum* ed i "piccoli" e "grandi" dinoflagellati atecati. Infatti, uno dei problemi principali nello studio di questo gruppo è legato alla loro forma plastica, che rispecchia vari stadi del ciclo vitale da cellule vegetative, gameti, cisti ecc. In modo particolare per i dinoflagellati atecati, queste difficoltà aumentano nei campioni fissati.

Considerando complessivamente i dati bibliografici riportati nelle tabelle 2 e 3 si può dedurre che *G. sanguineum* è stato probabilmente confuso con altri dinoflagellati e vice versa altri dinoflagellati sono stati confusi con '*G. sanguineum*' (Flaim *et al.* 2003).

Per quanto riguarda la coltivazione di '*G. sanguineum*', l'unico tentativo riuscito è quello riportato nella tesi di laurea di Arrighetti (1989) che ha ottenuto una coltura dell'alga a 4-6 °C.

3. APPROCCI METODOLOGICI

Per identificare '*Glenodinium sanguineum*' si è cercato di affrontare il problema in modi diversi:

1. ottenere colture unialgali di '*G. sanguineum*', partendo sia da sedimenti che da plancton;
2. approfondire la tassonomia di '*G. sanguineum*';
3. utilizzare le nuove tecniche molecolari come strumenti di supporto alla tassonomia e all'identificazione di quei dinoflagellati che non si riescono a coltivare.

Generalmente, per quanto riguarda il primo punto, i metodi usati per isolamento e coltivazione sono quelle riportate in Stein (1973), il terreno di coltura è il DY IV (Anderson *et al.* 1976) e l'isolamento delle cisti è quello riportato da Bolch (1997).

3.1. '*Glenodinium sanguineum*' sensu Dodge

Partendo dall'idea che è più facile stabilire una coltura algale da cisti, un campione integrato di sedimenti lacustri raccolti in vari punti del lago nel tardo autunno 2000 è stato portato all'Università di Copenhagen, dove i sedimenti sono stati incubati in camera climatica fredda. Dopo poche settimane è stato possibile isolare e portare in coltura clonale un dinoflagellato che morfologicamente assomigliava a *G. sanguineum* come descritto da Dodge *et al.* (1987); a

Tab. 3 - Intervalli di lunghezza (μm) riportati in letteratura per i taxa di dinoflagellati atecati nel Lago di Tovel.
 Taxon: A) *Glenodinium sanguineum* March.; B) *Woloszyskia coronata*; C) *Gymnodinium uberrimum*; D) *Gymnodinium* cf. *simplex*; E) *Gymnodinium ordinatum* Skuja; F) piccoli dinoflagellati; GsDk) *G. Sanguineum sensu* Dodge.
 Tab. 3 - Various ranges in cell length (μm) for Lake Tovel atecate dinoflagellate taxa as reported in the literature.

Taxon	Ref.	0	μm lunghezza cellula	50	Commenti
A	1		→		Intervallo lunghezza serie rossa media= 22 μm
A	2		→		Più grande della media come riportato in (1)
A	3		→		Lunghezza media come in (1)
A	4		→		
A	5		→		80% della popolazione nell'intervallo
A	6		→		19 $\mu\text{m} \pm 1,75$
A	8		→		Popolazione divisa in 2 gruppi con lunghezze medie di 17 e 26 μm
A	9		→		
C	7		→		Fino a 90 μm
C	8		→		Media di 20 individui
C	9		→		
D	7		→		
E	7		→		
F	9		→		
GsDK			→		

Referenze: 1) Largaiolli 1907; 2) Baldi 1941; 3) Marchesoni 1959; 4) Arrighetti & Siligardi 1979; 5) Miola & Trevisan 1982; 6) Dodge *et al.* 1987; 7) Popovsky & Pfister 1990; 8) Candioli & Tamanini 1998; 9) archivi IASMA.

questo dinoflagellato è stato dato il nome temporaneo di Gs-DK.

3.1.1. Obiettivi

Supportate da questo primo risultato positivo, le ricerche hanno preso due strade:

1. Uno studio approfondito di tassonomia basato su un'analisi morfologica tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e microscopia elettronica a scansione (SEM) nonché con microscopia ottica (LM), condotto all'Istituto di Botanica (Università di Copenhagen).
2. Sottoposizione della coltura a prove di temperatu-

ra, luce e nutrienti, nelle camere climatiche fredde all'Istituto Agrario. L'obiettivo si prefiggeva di stabilire quali condizioni ecologiche favorivano la crescita di quest'alga e soprattutto quali condizioni favorivano la comparsa della colorazione rossa.

3.1.2. Risultati

La microscopia, specialmente TEM, ha confermato che il Gs-DK era lo stesso dinoflagellato descritto da Dodge *et al.* (1987) come '*G. sanguineum*' (Moestrup dati in prep.). Le prove di autecologia (Flaim *et al.* in prep), però, hanno rivelato un di-



Fig. 4 - *Glenodinium sanguineum* sensu Dodge attualmente in revisione (Moestrup) e nominato temporaneamente Gs-DK: a) cellula vegetativa e b) ciste da coltura.

Fig. 4 - *Glenodinium sanguineum* sensu Dodge presently under revision (Moestrup) and temporarily named Gs-DK: a) vegetative cell and b) cysts from culture.

noflagellato a crescita lenta e con una stenotermia fredda molto marcata (5-7 °C) e poco compatibile con una fioritura estiva. Inoltre, vari tentativi di indurre la colorazione rossa sono falliti anche se colture dense hanno un colore marroncino; solamente la produzione di cisti in colture senescenti ha dato un colore arancione-mattone, attribuito alla presenza di *accumulation bodies* nelle stesse (Fig. 4), confermato dalle analisi pigmentali (Guella com. pers). Con ogni probabilità quest'alga corrisponde a quella che Arrighetti (1989) riuscì a coltivare e che prolifera a Tovel durante il periodo primaverile. Tale alga, a fine ciclo, con l'alzarsi della temperatura, tende a formare cisti rotonde con stigma rosso e ad ammassarsi a riva, creando delle piccole "fioriture" rosso mattone non molto intense e spesso scambiate per una "brutta" fioritura di '*Glenodinium*'.

3.2. '*Glenodinium sanguineum*' serie verde sensu Baldi

Visto che il Gs-DK con ogni probabilità non corrispondeva all'alga responsabile delle fioriture estive, si continuava la ricerca del "vero" '*Glenodinium sanguineum*' concentrandosi soprattutto sulle cisti.

3.2.1. Obiettivo

L'obiettivo che ci si proponeva di raggiungere era quello di stabilire una coltura di '*Glenodinium sanguineum*' partendo da cisti permanenti come descritte in Baldi (1941, Tav. XXX-5) (Fig. 3) e, in mancanza di '*Glenodinium sanguineum*' serie rossa, da singole cellule serie verdi (Baldi 1941, Tav. XXIX-5) isolate da plancton campionato nella Baia Rossa.

3.2.2. Risultati

Le cisti erano rare nei sedimenti profondi del lago, ma abbastanza numerose nei sedimenti della Baia Rossa

(Flaim *et al.* 2004). La germinazione di queste cisti in condizioni di laboratorio si è rivelata discreta, ma la loro crescita si è limitata al massimo a qualche divisione e non è stato possibile arrivare a una coltura stabile.

Le cellule isolate dal plancton non hanno dato vita ad una coltura stabile nel tempo, anche se in alcuni casi avevano formato delle cisti del tipo descritto da Baldi nella tavola XXX-5, confermando la loro appartenenza alla serie verde. Accurati esami microscopici sulle cellule hanno inoltre rilevato la presenza di diatomee al loro interno: probabilmente proprio la mixotrofia è la causa primaria della difficoltà nel coltivarle.

3.3. '*Glenodinium sanguineum*' serie rosso sensu Baldi

Nel 2003 l'esame di campioni di plancton vivi e non fissati ha evidenziato la presenza di qualche cellula di dinoflagellato rosso nel periodo estivo e di cisti rosse nei campioni autunnali. Inoltre, nei sedimenti prelevati nell'inverno 2003-2004 è stato trovato un discreto numero di cisti rosse mai notate nei campioni degli anni precedenti.

3.3.1. Obiettivo

L'obiettivo in questo caso si proponeva di stabilire una coltura di '*Glenodinium sanguineum*' partendo da cisti permanenti come descritte in Baldi (1941, Tav. XXX-2) e nella figura 3, e da singole cellule serie rossa (Baldi 1941, Tav. XXIX-1) isolate dal plancton campionato nella Baia Rossa.

3.3.2. Risultati

Non è stato possibile arrivare a una coltura stabile partendo da singole cellule isolate dal plancton. Invece, le cisti isolati e fatte germinare come descritto in Flaim *et al.* (2004) hanno dato cellule vegetative di un rosso brillante in tutto simili a quelle descritte da Baldi (1941) come *Glenodinium sanguineum* serie rossa. Inoltre, queste colture hanno formato cisti rosse (Fig. 5). Solo questo dinoflagellato della serie rossa, per il colore rosso acceso in tutte le fasi del suo ciclo vitale, può essere considerato responsabile delle passate fioriture estive della Baia Rossa.

4. CHE COS' È IL '*GLENODINIUM SANGUINEUM*'?

Il dinoflagellato '*Glenodinium sanguineum*' come descritto prima da Baldi (1941) e poi da Dodge *et al.* (1987) è in realtà quello che si chiama una *species complex* composta da tre distinti taxa di dinoflagellati: la specie rossa, la specie verde e la specie Gs-DK (Flaim *et al.* 2004). Cellule e cisti delle serie verdi e rosse e colture di Gs-DK sono state sottoposte ad ana-

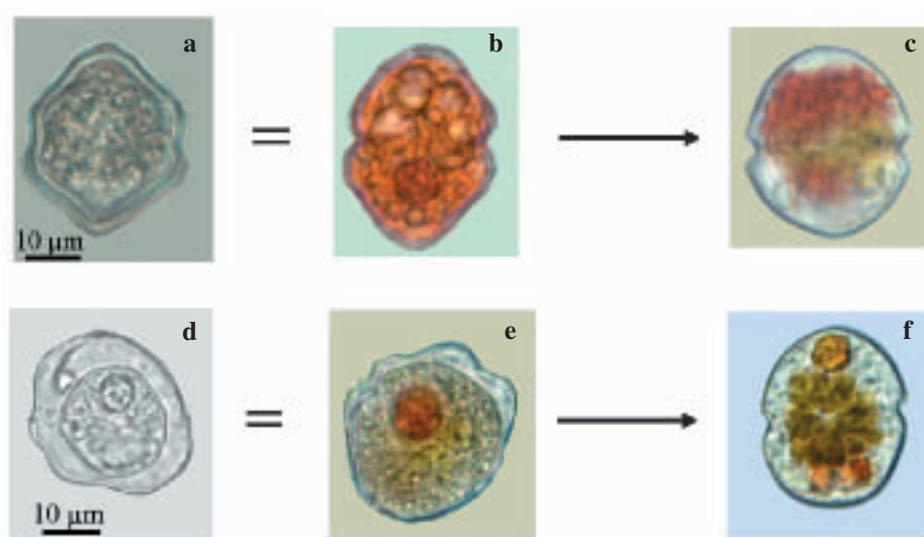


Fig. 5 - *Tovellia sanguinea* sp. inedit.: a) ciste invernale da campioni di Baldi; b) ciste invernale da campioni di sedimento Baia Rossa inverno 2003-2004; c) cellule germinate da cisti b. *Baldinia anauniensis* sp. inedit.: d) ciste invernale da campioni di Baldi; e) ciste invernale da campioni di sedimento Baia Rossa inverno 2002-2004; f) cellule germinate da cisti e.
 Fig. 5 - *Tovellia sanguinea* sp. inedit. a) overwintering cyst from original Baldi samples; b) overwintering cyst from sediment samples taken from the Red Bay during winter 2003-2004; c) germinated cells from (b) type cysts. *Baldinia anauniensis* sp. inedit. d) overwintering cyst from original Baldi samples; e) overwintering cyst from sediment samples taken from the Red Bay during winter 2003-2004; f) germinated cells from (e) type cysts.

lisi molecolare, che hanno fornito l'ultima conferma: il *Glenodinium sanguineum* March. è composto da due distinti taxa di dinoflagellati, serie rossa e verde, diversi dal terzo *Glenodinium sanguineum sensu* Dodge (D'Andrea *et al.* 2005). Questi tre taxa non fanno parte di generi già noti e la loro classificazione è in fase di revisione. In ogni caso il nome '*Glenodinium sanguineum*' non può essere ritenuto valido, in quanto già utilizzato in passato per descrivere un altro dinoflagellato (Diesing 1866). Il dinoflagellato *Glenodinium sanguineum* serie rosso *sensu* Baldi, vero responsabile delle famose fioriture estive del lago di Tovel prenderà il nome di *Tovellia sanguinea* sp. inedit. (Moestrup *et al.* 2006). Il dinoflagellato *Glenodinium sanguineum* serie verde *sensu* Baldi diventerà *Baldinia anauniensis*

gen. inedit sp. inedit. (Hansen *et al.* in prep). Anche la specie Gs-DK, in base alle sue caratteristiche morfologiche e genetiche, appartiene a un nuovo genere (Moestrup in prep). Questi tre dinoflagellati si trovano tutti nella Baia Rossa causando confusione fra gli addetti ai lavori. Nella tabella 4 si è cercato di riassumere alcune caratteristiche che distinguono le tre specie.

5. ACCENNI ECOLOGICI RELATIVI ALL'ALGA RESPONSABILE DEGLI ARROSSAMENTI

Finora è stato chiarito che l'arrossamento delle acque del Lago di Tovel era riconducibile alla fioritura

Tab. 4 - Alcune caratteristiche delle tre specie di '*Glenodinium sanguineum*'.
 Tab. 4 - Some characteristics of the three species of '*Glenodinium sanguineum*'.

' <i>Glenodinium sanguineum</i> '	characteristics			
	peak season ^a	temperature preference	highest density in Red Bay	red bloom
red <i>sensu</i> Baldi	late summer	> 10° ^b	0-2 m ^b	bright red ^d
green <i>sensu</i> Baldi	summer	> 10° ^b	0-2 m ^b	No
<i>sensu</i> Dodge	late spring - early summer	< 7° ^d	> 2.5 m ^c	brick red/brown ^d

^a from Calliari *et al.* 2006; ^b from Baldi 1941 and Flaim *et al.* 2003; ^c SALTO archives; ^d from culture trials.

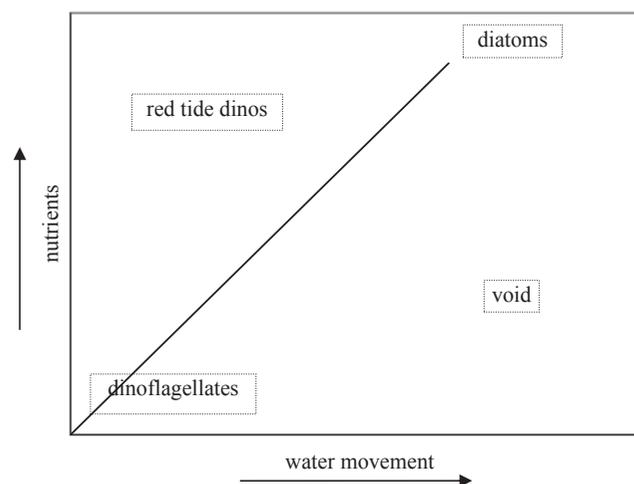


Fig. 6 - Diagramma del rapporto fra movimento d'acqua e nutrienti nel determinare la biocenosi algale. Modificato da Margalef 1978.

Fig. 6 - Diagram illustration relationship between water movement and nutrients in determining algal biocenosis. Modified from Margalef 1978.

di *Tovellia sanguinea*, ma non è stata ancora data una risposta al perché il fenomeno sia venuto a mancare. Per rispondere a questa domanda, occorre spostare l'attenzione sui fattori che governano le fioriture algali. Qualche aiuto o indicazione può arrivare anche dall'ambiente marino, dove le maree rosse dovute a dinoflagellati sono abbastanza frequenti. Studiando

queste maree, il biologo Margalef (1978) ha ipotizzato che possano formarsi a causa di una combinazione di bassa turbolenza delle acque e di un'alta trofia (Fig. 6). Sembra che anche nel Lago di Tovel esistano indizi che lo sviluppo dell'alga rossa sia legata a simili fattori.

Anche prima del 1964 le fioriture rosse nella Baia Rossa si ripetevano con irregolarità e intensità variabile ed erano addirittura assenti negli anni freddi e piovosi (Tomasi 1989). Questo fatto ha suggerito di verificare se esisteva un nesso fra pioggia e fioritura (Flaim *et al.* 2005), sapendo che l'idrologia di Tovel è molto dinamica e fortemente influenzata dalla pioggia (Ferretti & Borsato 2004) a causa dell'elevato rapporto fra bacino imbrifero e volume della Baia Rossa che riceve quasi tutte le acque che entrano nel lago. Per il Lago di Tovel, e in particolare per la Baia Rossa, la turbolenza cui si riferisce Margalef (1978) può quindi essere paragonata ai diversi tempi di residenza dell'acqua legati alle precipitazioni. Purtroppo, dati relativi alla pioggia in Val di Tovel sono disponibili solamente a partire dal 1975, cioè un decennio dopo la scomparsa del fenomeno; per questo motivo si è scelto di utilizzare i dati della vicina stazione meteorologica di Cles, disponibili dal 1920 (Eccel & Toller 2006). Anche se la ricerca bibliografica ha evidenziato ben poche annate con fioriture documentate o assenti (Fig. 7), i dati suggeriscono che le fioriture erano legate al bel tempo (= poca pioggia estiva), interpretato come fattore primario che determina una più lunga permanenza della massa d'acqua, e quindi a un minor flusso nella Baia Rossa. Questa situazione di scarsa piovosità si è verificata anche nell'estate 2003 e

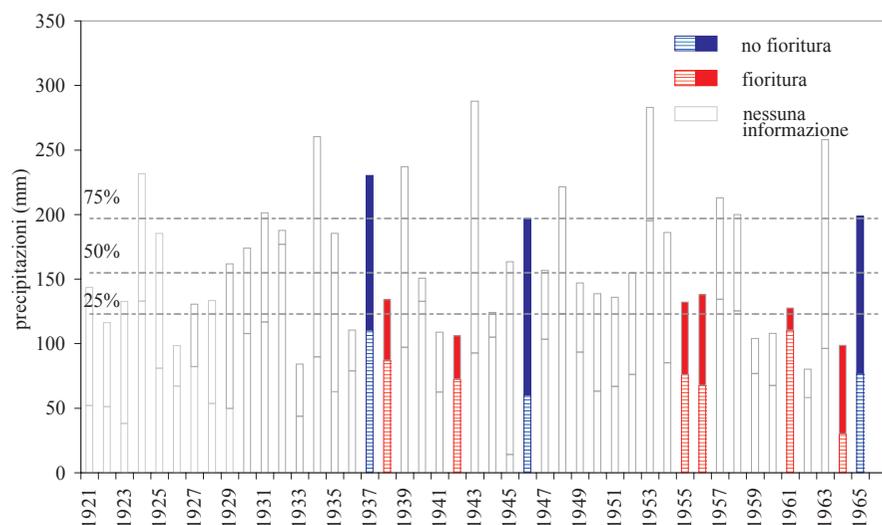


Fig. 7 - Precipitazione estiva in mm (luglio e agosto) per gli anni 1921-1965 con indicati i 25-50-75 percentili. Vengono evidenziati in rosso gli anni con fioritura documentata (*bloom*) e in blu gli anni con mancata fioritura documentata (*no bloom*); per la maggior parte degli anni non si sono trovate informazioni certe.

Fig. 7 - Summer (July and August) rainfall in mm for the period 1920-1965 with 25-50-75 percentiles. Documented bloom years are highlighted in red and documented non bloom years are shown in blue; for most years no documentation was found.

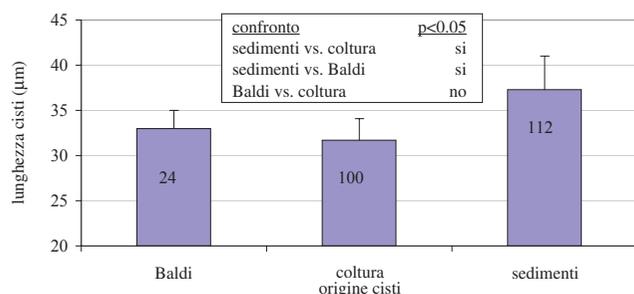


Fig. 8 - Variazione nella lunghezza delle cisti di *Tovellia*. La lunghezza media (µm) viene data per cisti prelevate da campioni originali di Baldi, dalle colture e da sedimenti di Tovel (2003-2004); le barre di errore indicano +1 SD. Il numero di cisti misurate viene indicato in ogni barra; nell'insero viene indicato la significatività statistica fra i gruppi.

Fig. 8 - Variation in length of *Tovellia* cysts. Average length (µm) is given for cysts from original Baldi samples, algal cultures and wild type (Lake Tovel 2003/2004 sediments); error bars indicate +1 SD. Number of cysts measured is given in each bar and insert gives statistical significance of comparison.

ha permesso di osservare una discreta presenza di alghe rosse. L'anno precedente invece, molto piovoso, non ha evidenziato la presenza dell'alga rossa. Riassumendo, la prima condizione per favorire l'alga rossa sembra essere il minor flusso d'acqua verso la Baia Rossa, condizione che soddisferebbe il primo criterio di Margalef.

Il secondo criterio di Margalef richiede un aumento di trofia per sostenere le fioriture rosse. Si possono cercare indizi che suggeriscono cambiamenti di trofia

nel lago. Per quanto concerne l'uso del territorio circostante il bacino lacustre, la gestione del bestiame nelle malghe sovrastanti Tovel, illustrato in questo volume (Borghi *et al.* 2006), suggerisce indirettamente che nel passato arrivava un maggiore carico di nutrienti nella Baia Rossa rispetto ad oggi. Invece, per quanto riguarda lo stato trofico della Baia Rossa mancano analisi sui nutrienti per il periodo anteriore al 1964. Per casi come questo dove non è possibile un confronto diretto tra il presente e il passato sono state sviluppate le cosiddette *transfer functions*. Queste ci lasciano dedurre informazioni sull'ambiente dal modo in cui una specie risponde a un determinato fattore ambientale in mancanza di misure dirette sul fattore in questione. Si è visto che la lunghezza media delle cisti di *Tovellia sanguinea* misurata da campioni originali di Baldi è minore rispetto alla lunghezza media delle cisti attualmente presenti nel lago, ma simile alla lunghezza delle cisti prodotte *in vitro* (Fig. 8). Un legame simile tra morfologia e variabile ambientale è stato trovato da Ellegaard *et al.* (2002) che ha mostrato come la lunghezze delle spine presenti sulle cisti di un dinoflagellato marino rispecchino la salinità dell'ambiente. Nel nostro caso, si potrebbe pensare che la lunghezza delle cisti rifletta il livello di nutrienti, dato che in coltura viene fornita un'abbondanza di nutrienti. Ovviamente, questa ipotesi sarà oggetto di prossimi studi.

Da quanto esposto, possiamo ragionevolmente supporre che le fioriture di *Tovellia sanguinea* hanno bisogno, come indicato da Margalef (1978), innanzitutto di minor afflusso d'acqua e poi di un maggior carico di nutrienti (Fig. 9). In mancanza di questi fattori dominano altre alghe, meglio adatte ad un'idrologia più dinamica ed ad una trofia più bassa (Smayda & Reynolds 2003).

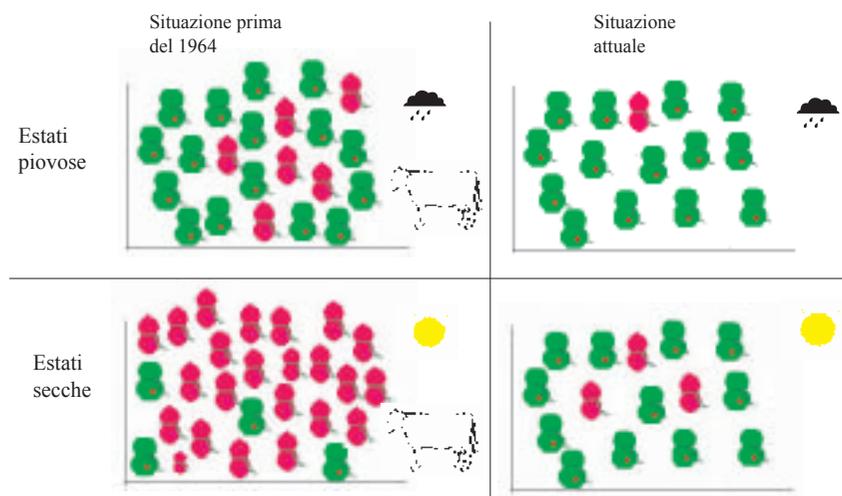


Fig. 9 - Schema proposto per spiegare l'effetto turbolenza/nutrienti sull'equilibrio fra l'alga verde e rossa nella Baia Rossa. Fig. 9 - Proposed diagram for explaining the effects of turbulence/nutrients on the equilibrium between the red and green dinoflagellates in the Red Bay.

6. CONSIDERAZIONI FINALI

Il lavoro ha permesso le seguenti osservazioni.

- a. Le due serie, rossa e verde, di '*Glenodinium sanguineum*' come descritte da Baldi (1941) sono di fatto due specie diverse.
- b. Le cellule vegetative delle due specie (*Tovellia* sp. inedit. e *Baldinia* gen. inedit.), sono molto simili per forma e dimensioni, mentre si distinguono bene per il colore, caratteristica che si perde in campioni fissati in Lugol. Le rispettive cisti invece sono morfologicamente e cromaticamente molto diverse. La possibilità di esaminare campioni originali di Baldi, ancora conservati a Pallanza, ha confermato la presenza di entrambe le cisti.
- c. Il *Glenodinium sanguineum sensu* Dodge *et al.* non è né *Tovellia* sp. inedit. né *Baldinia* gen. inedit., ma il terzo componente di questo complesso di specie. Questa specie può formare fioriture di colore rosso mattone/marrone che potrebbero far pensare a una fioritura anticipata di *Tovellia*.
- d. Per quanto riguarda la presenza delle tre specie nella Baia Rossa, vengono presentate alcune caratteristiche che permettono di differenziare la loro collocazione all'interno della stessa.

Chiarita l'identità dell'alga rossa, rimane la questione del perché siano cessate le fioriture. L'alga responsabile del fenomeno, la *Tovellia sanguinea*, è sempre presente nel lago, ma non in densità sufficiente per formare fioriture. Dalle indicazioni già esposte, sembra che una sua fioritura necessiti di due fattori sequenziali: un ambiente idrologicamente calmo, condizione che si verifica nella Baia Rossa nelle estati poco piovose, e un arricchimento in nutrienti.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio fa parte della ricerca SALTO (Studio sul mancato Arrossamento del Lago di TOvel) finanziata dalla Provincia Autonoma di Trento. Gli Autori ringraziano Pierisa Panzani dell'ISE-CNR Pallanza per il suo aiuto nel fornire i campioni originali di E. Baldi, e Emanuele Eccel per il grafico sulle precipitazioni 1920-1965; GF ringrazia Luigi Naselli Flores per la revisione critica del manoscritto e i colleghi, in particolare Vigilio Pinamonti, Gino Leonardi e Lorena Ressa, per la loro disponibilità e il costante aiuto, e Flavio Corradini e Ulrike Obertegger per le stimolanti discussioni.

BIBLIOGRAFIA

Andersen R.A., Morton S.L. & Sexton J.P., 1967 - Provasoli-Guillard National Center for Culture of

- Marine Phytoplankton 1997 list of strains. *J. Phycol.*, 33, Suppl.: 1-75.
- Arrighetti G.M., 1989 - *Coltura in vitro* di *Glenodinium sanguineum* March.: influenza dei fattori ambientali. Tesi di Laurea in Scienze Biologiche, Università degli Studi di Urbino.
- Arrighetti A. & Siligardi M., 1979 - Analisi idrobiologiche al lago di Tovel (TN). *Quaderni Esper. ric.*, 5: 1-69.
- Baldi E., 1938 - Relazione preliminare sulle ricerche al lago di Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat.*, 19: 247-339.
- Baldi E., 1941 - Ricerche idrobiologiche sul lago di Tovel. *Mem. Museo St. Nat. Venezia Trid.*, 6: 1-297.
- Bolch C.J.S., 1997 - The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. *Phycologia*, 36: 472-478.
- Borghi B., Corradini F., De Ros G. & Ventura W., (2006) - Gestione del bestiame in alpeggio nella Val di Tovel, dinamica del flusso dei nutrienti verso il lago e arrossamento delle acque. *Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol.*, 81 Suppl. 2: 27-38.
- Calliari D., Corradini F. & Flaim G., 2006 - Dinoflagellate diversity in Lake Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol.*, 81, Suppl. 2: 351-357.
- Cavalca L., Ferrari P. & Andreoni V., 2001 - *Glenodinium sanguineum* March. and the reddening phenomenon of Lake Tovel: biological and environmental aspects. *Ann. Microbiol.*, 51: 159-177.
- Candioli E. & Tamanini S., 1998 - Phytoplankton species composition and biomass in Lake Tovel and four enclosures. In: Rott E. *et al.* (eds), *Limnology of a subalpine lake: Lago di Tovel Workshop*. University of Innsbruck, Innsbruck.
- D'Andrea M., Daugbjerg N. & Flaim G., 2005 - Investigation of the dinoflagellate community of lake Tovel by genetic analysis of environmental samples. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 29 (1): 478-481.
- Diesing K.M., 1866 - Revision der Prothelminthen. Abtheilung: Mastigophoren. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe*, 52 (8): 287-401.
- Dodge J.D., 1970 - Report of limnological investigation of Lake Tovel (Trentino - N. Italy). *Studi Trent. Sci. Nat.*, 47 (1): 91-94.
- Dodge J.D., Mariani P., Paganelli A., & Trevisan R., 1987 - Fine structure of the red bloom dinoflagellate *Glenodinium sanguineum* from lake Tovel (N. Italy). *Archiv Hydrobiol.*, 78, Suppl.: 125-138.
- Eccel E. & Toller G.B. - 2006. Inquadramento climatico del Lago di Tovel e del suo bacino. *Studi Trent. Sci. Natur. Acta Biologica* 81 (2004), Suppl 2: 247-258.
- Ellegaard M., Lewis J. & Harding I., 2002 - Cyst-theca relationship, life cycle and effects of temperature and salinity on the cyst morphology of *Gonyaulax baltica* sp. nov. (Dinophyceae) from the Baltic Sea area. *J. Phycol.*, 38: 775-789.
- Ferretti P. & Borsato A., 2004 - Monitoraggio idrologico del bacino e del Lago di Tovel (Trentino occ.). Atti

- XXIX Convegno di Idraulica e Costruzioni Idrauliche. Trento, 7-10 settembre 2004.
- Flaim G., Rott E., Corradini F., Toller G. & Borghi B., 2003 - Long-term trends in species composition and diurnal migration of Dinoflagellates in Lake Tovel (Trentino, Italy). *Hydrobiologia*, 502: 357-366.
- Flaim G., Hansen G., Moestrup Ø., Corradini F. & Borghi B., 2004 - Re-interpretation of the dinoflagellate '*Glenodinium sanguineum*' in the reddening of Lake Tovel, Italian Alps. *Phycologia*, 43: 737-743.
- Flaim G., Corradini F., Borsato A., Ferretti P.E., Obertegger U. & Borghi B., (2006) - The importance of hydraulic conditions in determining ecological equilibrium in an alpine lake: Lake Tovel (Trentino-Italy). *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 29 (in press).
- Freshfield D.W., 1875 - *Italian Alps: Sketches in the mountains of Ticino, Lombardy, the Trentino and Venetia*. Longmans, Green and Co., London: 385 pp.
- Gerosa V., 1959 - I carotenoidi e l'arrossamento del lago di Tovel. *Natura Alpina*, 3: 86-91.
- IASMA, 1995-2000 - *Caratteristiche limnologiche dei laghi nel Trentino*. Rapporti annuali. Istituto Agrario di S. Michele all'Adige TN.
- Largaiolli V., 1907 - La varietà oculata del *Glenodinium pulvisculus* (Ehr.) Stein. *Nuova Notarisia*, 18: 1-5.
- Marchesoni V., 1941 - Sulla posizione sistematica del *Glenodinium* determinante l'arrossamento del lago di Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat.*, 22 (1): 11-18.
- Marchesoni V., 1959 - La val di Tovel e il "Lago Rosso". *Natura Alpina*, 10: 37-76.
- Margalef, R., 1978 - Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta*, 1: 493-509.
- Miola A. & Trevisan R., 1982 - Un contributo allo studio su ciclo biologico e contenuto in clorofilla di *Glenodinium sanguineum* March. del Lago di Tovel (Trento). *Studi Trent. Sci. Nat.*, 59: 23-29.
- Moestrup Ø., Hansen G., Daugbjerg N., Flaim G. & D'Andrea M., (2006) - On *Tovellia sanguinea* sp. nov., the dinoflagellate species responsible for the reddening of Lake Tovel, N. Italy. *Eur. J. Phycol* (in press).
- Paganelli A., 1992 - Lake Tovel (Trentino): limnological and hydrobiological aspects. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 50: 225-257.
- Paganelli A., Trevisan R., Cordella P., Miola A. & Cappelletti M., 1981 - Ricerche limnologiche sul Lago di Tovel (Trentino) ed ipotesi sul mancato arrossamento. *Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol.*, 58: 393-424.
- Pallaveri A., 1999 - *Raccolta bibliografica sulla Val di Tovel*. Museo Tridentino di Scienze Naturali, Trento.
- Popovskỳ J. & Pfiester L.A., 1990 - *Dinophyceae (Dinoflagellida)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 272 pp.
- Smayda S.J. & Reynolds C.S., 2003 - Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *J. Sea Res.*, 49: 95-106.
- Stein J., 1973 - *Handbook of phycological methods*. Cambridge University Press: 448 pp.
- Tomasi G. 1989 - Lago di Tovel: dall'immaginario al plausibile. *Natura Alpina*, 40:1-72.

