



La biodiversità degli invertebrati marini è sottostimata? Il caso di *Ophelia bicornis* e *Ophelia barquii* (Annelida, Polychaeta)

Tiziana Lai^a, Marco Casu^a, Daniela Iraci Sareri^b, Ferruccio Maltagliati^{c*}, Daniela Casu^{a,c}, Piero Cossu^a, Marco Curini Galletti^a, Grazia Cantone^b, Alberto Castelli^c

^aDipartimento di Zoologia e Antropologia Biologica, Università di Sassari, Via R. Muroli 25, 07100 Sassari, Italia

^bDipartimento di Biologia Animale "M. La Greca", Università di Catania, Via Androne 81, 95124 Catania, Italia

^cDipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, Università di Pisa, Via A. Volta 6, 56126 Pisa, Italia

Riassunto

Negli ultimi anni gli studi molecolari condotti su invertebrati marini hanno contribuito alla valutazione della biodiversità locale mediante la risoluzione di complessi casi di tassonomia. *Ophelia bicornis* s.l. è un polichete che vive in habitat intertidali sabbiosi delle coste mediterranee ed europee atlantiche, la cui sistematica è ancora in fase di definizione. Un nostro precedente studio effettuato tramite alloenzimi ha suggerito che *O. bicornis* s.l. è costituita da due specie: *O. bicornis* s.s. e *O. barquii*, rispettivamente riconducibili a morfotipi con 6 e 5 paia di nefridiopori. Nel presente lavoro è stata abbinata l'analisi morfologica (conteggio dei nefridiopori) con quella genetica (genotipizzazione tramite ISSR). Sono stati analizzati 6 campioni (n=30) di *O. bicornis* s.l. provenienti da 3 località sarde e 3 siciliane. I dati morfologici indicano una diversa distribuzione dei due morfotipi, che sono stati rilevati in simpatria, sia in località sarde che siciliane. L'analisi genetica effettuata tramite gli ISSR ripropone la distinzione tra individui con 6 e 5 paia di nefridiopori, confermando la precedente separazione di *O. bicornis* s.l. in due specie distinte. Il presente lavoro *i*) rappresenta un'ulteriore conferma del fatto che i livelli di biodiversità negli invertebrati marini sono attualmente sottostimati e *ii*) pone le basi per uno studio più accurato delle caratteristiche dell'habitat di queste specie. © 2004 SItE. All rights reserved

Parole chiave: *Ophelia bicornis*, *Ophelia barquii*, morphological analysis, genetic variability, ISSR, taxonomy.

1. Introduzione

Gli studi molecolari sugli invertebrati marini hanno recentemente dato un grande contributo alla conoscenza della biodiversità locale mediante la risoluzione di casi tassonomici complessi. Ciò ha addirittura indotto alcuni autori a proporre la deposizione dei dati molecolari, come ad esempio il

bandeggio diagnostico del DNA di un sintipo, per finalità tassonomiche e nomenclaturali formali (Westheide & Schmidt, 2003). Va rilevato comunque che un approccio tassonomico più potente richiede l'integrazione del dato molecolare con almeno un altro tipo di informazione, come ad esempio quella morfologica, comportamentale, o fisiologica (Lee, 2004).

Per quanto riguarda l'ambiente marino, c'è un crescente sospetto che l'attuale percezione della

* Autore per la corrispondenza. Tel: +39-050-2219006; Fax: +39-050-49694; e-mail: maltagli@discat.unipi.it.

biodiversità sia basata su dati non rappresentativi (Gray, 1997; Sala, 2002). Il problema è sentito in particolare modo per importanti gruppi tassonomici della macrofauna, il cui numero di specie descritte è spesso sottostimato (Knowlton, 1993; Bouchet et al., 2002; Hutchings & Ponder, 2003).

Ophelia bicornis sensu lato è un polichete che vive in habitat intertidali sabbiosi delle coste mediterranee ed europee atlantiche, il cui status tassonomico è particolarmente controverso e dibattuto, a causa della variabilità dei caratteri morfologici. Uno studio precedente, effettuato tramite marcatori alloenzimatici e morfologici su quindici popolazioni del Mediterraneo occidentale, ha rilevato che *O. bicornis s.l.* è costituita da due specie valide: *O. bicornis sensu stricto* e *O. barquii*, rispettivamente riconducibili a morfotipi con sei e cinque paia di nefridiopori (Maltagliati et al., 2004).

Poiché l'efficacia degli alloenzimi nel distinguere specie affini è stata spesso criticata da vari autori, a causa dell'assenza di neutralità selettiva e del loro limitato potere di risoluzione, lo scopo del presente studio è stato quello di verificare la correttezza della separazione tassonomica tra *O. bicornis* e *O. barquii* nel Mediterraneo, utilizzando marcatori molecolari non proteici. Sono stati usati pertanto gli ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietckiewicz et al., 1994). La tecnica degli ISSR è basata sull'amplificazione di regioni del DNA situate tra sequenze microsatellite ravvicinate e inversamente orientate, mediante un singolo primer costituito da una breve sequenza microsatellite con uno-quattro nucleotidi degenerati ancorati all'estremità 5' o a quella 3'.

2. Materiali e metodi

Cinque individui di *Ophelia bicornis s.l.* sono stati campionati in ciascuna delle seguenti località: 1) Platamona (PL: 40°51'N - 08°35'E); 2) Porto Ferro (PF: 40°41'N - 08°12'E); 3) Mugoni (MG: 40°37'N - 08°13'E) in Sardegna e 4) Cefalù (CF: 38°02'N - 13°59'E); 5) Catania (CT: 37°30'N - 15°05'E); 6) Calabernardo (CB: 36°52'N - 15°08'E) in Sicilia (Fig. 1).

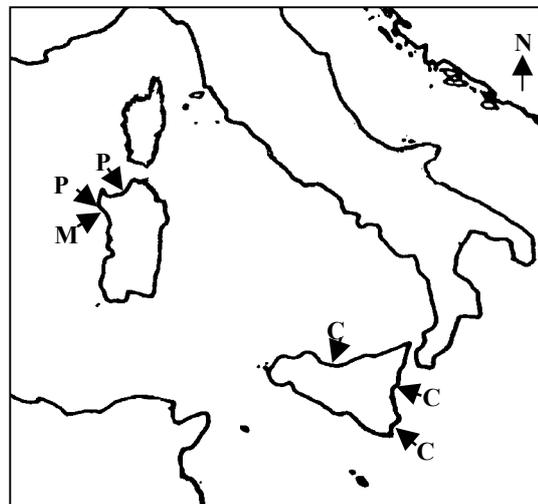


Figura 1. Localizzazione dei siti di campionamento. PL: Platamona, PF: Porto Ferro, MG: Mugoni, CF: Cefalù, CT: Catania, CB, Calabernardo.

Con l'ausilio di uno stereomicroscopio da dissezione è stato effettuato il conteggio dei nefridiopori su entrambi i lati degli individui.

Il DNA genomico è stato successivamente estratto utilizzando il *QIAGEN[®] DNeasy Tissue kit* (QIAGEN Inc., Valencia, California). Il DNA è stato sottoposto ad amplificazione mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR), utilizzando quattro primer ISSR (Tab. 1), da noi precedentemente individuati su campioni di *Ophelia* raccolti a Platamona.

Tabella 1. Sigle e sequenze dei primer, numero di bande polimorfiche per primer e intervallo del peso molecolare approssimato espresso in paia di basi (pb).

Sigle dei primer	Sequenze 5'-3'	N° totale bande	Peso molecolare (pb)
IT2	(CA) ₈ AC	12	580-1560
IT3	(GTG) ₄ AG	12	600-1500
SAS3	(GAG) ₄ GC	11	600-1600
PT1	(GT) ₈ C	9	350-1700

Per ciascuna reazione di amplificazione sono stati utilizzati 30 ng di DNA genomico, tampone di reazione 1x, 2.5 µl di MgCl₂, 200 µl di dNTP, 1 µl di primer e 0.1 µl di Taq DNA polimerasi, per un volume finale della soluzione di 25 µl. Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando il seguente profilo di amplificazione: 94°C per 3 minuti; 45 cicli di 94°C per 40 secondi, 55°C per 45 secondi, 72°C per 100 secondi e 72°C per 5 minuti. I prodotti dell'amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio (2%) per 150 minuti a 80 volt (4 V/cm). Successivamente il gel è stato immerso in una soluzione di bromuro di etidio (1 µl/10 ml) ed i frammenti di DNA visualizzati tramite un transilluminatore a ultravioletti, connesso ad un sistema per l'acquisizione digitalizzata di immagini. Assieme ai campioni sono stati fatti migrare anche alcuni controlli negativi per escludere la possibilità di contaminazioni e artefatti.

Analogamente ai dati RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), i dati ISSR vengono trattati statisticamente come marcatori dominanti diallelici, il cui allele dominante *A* determina la presenza della banda. Pertanto gli individui con genotipo *AA* e *Aa* producono bande (fenotipo 1), mentre quelli con genotipo *aa* non lo fanno (fenotipo 0).

Mediante analisi della varianza molecolare (AMOVA, Excoffier et al., 1992), la variabilità genetica totale è stata ripartita nelle seguenti componenti: 1) tra i morfotipi, 2) tra siti all'interno dei morfotipi e 3) all'interno dei siti. È stata calcolata inoltre la Φ -statistica, la cui significatività è stata valutata mediante un test di permutazione con 10000 repliche. Per l'AMOVA sono stati utilizzati i programmi AMOVAPREP (Miller, 1998) e WINAMOVA (Excoffier et al., 1992).

Con il programma TFPGA (Miller, 1997) è stata effettuata l'analisi dei cluster UPGMA, applicata alla matrice delle distanze genetiche di Nei (1978) tra i campioni. La robustezza dei nodi del dendrogramma è stata valutata mediante "bootstrapping" con 10000 repliche. È stata inoltre ottenuta una matrice delle distanze genetiche tra gli individui. A tale scopo è stato usato il complementare a 1 dell'indice di similarità di Nei & Li (1985), calcolato usando RAPDLOT 3.0 (Black, 1997). A questa matrice è stato applicato il multidimensional scaling non-metrico (nMDS),

usando il programma STATISTICA 5.1 (StatSoft, 1997).

3. Risultati e discussione

L'indagine morfologica ha confermato l'esistenza di due morfotipi principali distinguibili in base al numero di paia di nefridiopori (5+5 e 6+6), riconducibili, secondo Maltagliati et al. (2004), rispettivamente a *Ophelia barquii* e *O. bicornis* s.s. Gli individui di Porto Ferro, Platamona e Cefalù si sono rivelati del tipo 6+6 (*O. bicornis*), mentre quelli di Catania, Calabernardo e Mugoni del tipo 5+5 (*O. barquii*).

L'amplificazione dei quattro primer ISSR ha portato all'individuazione di un totale di 44 loci polimorfici. Per ciascun primer il numero di bande è risultato compreso fra 9 e 12, con dimensioni dei frammenti che variavano approssimativamente tra 580 e 1700 paia di basi. Sono state individuate complessivamente 7 bande esclusive di località, di cui 1 nei campioni di Platamona, Porto Ferro, Mugoni, Catania e Calabernardo, 2 in quello di Cefalù. Mentre 17 e 13 bande sono risultate rispettivamente esclusive del morfotipo 6+6 (*O. bicornis*) e di quello 5+5 (*O. barquii*).

L'AMOVA (Tab. 2) ha rilevato come la maggior parte della varianza molecolare (45.3 %) sia presente tra i due morfotipi. La rimanente varianza è stata ripartita tra i siti all'interno dei morfotipi (21.5 %) e all'interno dei siti (33.2 %) (Tab. 2).

La Φ -statistica ha evidenziato una marcata differenziazione tra i morfotipi ($\Phi_{CT} = 0.453$) che è risultata altamente significativa al test di permutazione ($P < 0.001$) (Tab. 2). Comunque anche Φ_{SC} e Φ_{ST} sono risultati significativamente maggiori di zero, indicando rispettivamente 1) strutturazione in popolazioni all'interno delle due specie e 2) un elevato grado di eterogeneità genetica all'interno delle popolazioni. Da rilevare che elevati valori degli indici di variabilità genetica all'interno dei singoli campioni sembrano essere determinati dalle caratteristiche intrinseche dei marcatori ISSR che sono caratterizzati da ipervariabilità. Questo effetto è stato rilevato anche in uno studio sulla genetica di popolazione del bivalve nord-americano atlantico *Gemma gemma*, in cui l'eterogeneità

Tabella 2. Risultati dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA) tra popolazioni di *Ophelia* con cinque e sei paia di nefridiopori.

Sorgente di variazione	g.l.	MS	Componente della varianza	Percentuale di varianza	Φ -statistica	P
Tra morfotipi	1	79.833	4.4111	45.3%	$\Phi_{CT} = 0.453$	<0.001
Tra siti all'interno dei morfotipi	4	13.667	2.0866	21.5%	$\Phi_{SC} = 0.392$	<0.001
All'interno dei siti	24	3.233	3.2333	33.2%	$\Phi_{ST} = 0.668$	<0.001

genetica all'interno delle patch campionate era di gran lunga superiore a quella tra località distanti centinaia di chilometri (Casu et al., 2005).

L'analisi UPGMA delle distanze genetiche di Nei (1978) ha raggruppato i campioni in due cluster distinti, ciascuno comprendente campioni di una sola specie (Fig. 2). Tutti i nodi hanno mostrato un elevato sostegno bootstrap (>70), eccetto quello che lega Porto Ferro e Platamona, che presenta un valore bootstrap moderato (= 51) (Fig. 2).

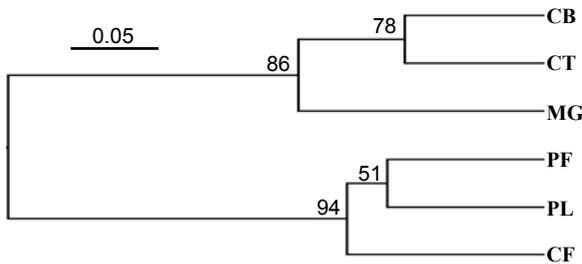


Figura 2. Dendrogramma di consenso UPGMA delle distanze genetiche di Nei (1978) tra i campioni di *Ophelia* analizzati. I valori bootstrap sono stati ottenuti con 10000 repliche. Le abbreviazioni delle località sono come in Fig. 1.

L'analisi nMDS ha separato in maniera molto evidente gli individui appartenenti alle due specie lungo la prima dimensione del grafico (Fig. 3). Inoltre nella nube di punti distribuita nella parte sinistra del grafico, corrispondente agli individui di *O. barquii*, sono distinguibili due ulteriori sottogruppi. Il primo corrisponde ai due campioni siciliani di Catania e Calabernardo, i cui individui appaiono mischiati nella parte sinistra superiore del grafico; il secondo corrisponde agli individui di Mugoni che sono disposti nella parte sinistra inferiore del grafico (Fig. 3). Ciò suggerisce la presenza di sottostrutturazione filogeografica in *O.*

barquii, dato che il campione di Mugoni (Sardegna) e i due siciliani di Catania e Calabernardo appartengono rispettivamente al bacino occidentale e a quello orientale del Mediterraneo.

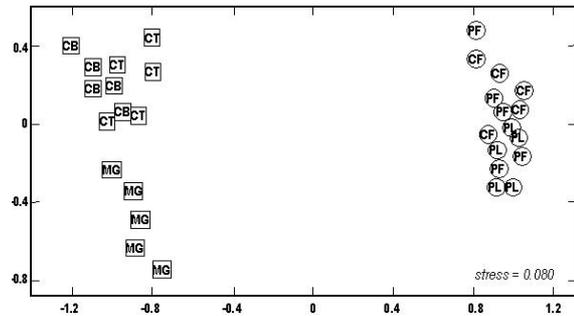


Figura 3. Ordinamento bidimensionale degli individui di *Ophelia* effettuato mediante multidimensional scaling non-metrico basato sulla matrice dei valori di similarità di Nei & Li (1985) complementari a 1. I quadrati corrispondono ad individui 5+5, mentre i cerchi a quelli 6+6. Il basso valore dell'indice di stress indica elevata attendibilità della rappresentazione grafica. Le abbreviazioni delle località sono come in Fig. 1.

4. Conclusioni

Il numero di nefridiopori e i profili ISSR hanno fornito risultati perfettamente congruenti nel distinguere nella regione da noi analizzata *Ophelia barquii* (Fauvel, 1927), con cinque paia di nefridiopori e *O. bicornis* Savigny, 1818, con sei paia di nefridiopori. Questo studio rappresenta pertanto una conferma a livello di DNA di quanto rilevato da Maltagliati et al. (2004) con tecniche di di genetica biochimica.

La presente ricerca ha evidenziato la necessità dell'utilizzo di tecniche combinate di analisi molecolare e morfologica per risolvere casi riguardanti lo stato tassonomico di invertebrati marini. Tale approccio si è rivelato possedere un elevato potere per la risoluzione di problemi tassonomici molto fini. Viene sottolineata perciò l'importanza dell'uso di classi differenti di informazione per una corretta tassonomia. I risultati del presente lavoro rappresentano un contributo alla conoscenza della diversità specifica degli invertebrati marini, una componente sottostimata e importante dal punto di vista quali/quantitativo della biodiversità globale.

5. Bibliografia

- Black, W.C. (1997) RAPDPLOT 3.0. Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA.
- Bouchet, P., Lozouet, P., Maestrati, P. & Heros, V. (2002) Assessing the magnitude of species richness in tropical marine environments: exceptionally high numbers of molluscs at a New Caledonia site. *Biological Journal of the Linnean Society*, **75**, 421-436.
- Casu, M., Maltagliati, F., Cossu, P., Lai, T., Curini Galletti, M., Castelli, A. & Commito, J.A. (2005) Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (U.S.A.), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, in corso di stampa.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Gray, J.S. (1997) Marine biodiversity: Patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation*, **6**, 153-175.
- Hutchings, P. & Ponder, W. (2003) Marine invertebrates and their conservation. *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 153-154.
- Knowlton, N. (1993) Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 189-206.
- Lee, M.S.Y. (2004) The molecularisation of taxonomy. *Invertebrate Systematics*, **18**, 1-6.
- Maltagliati, F., Casu, M. & Castelli, A. (2004) Morphological and genetic evidence supports the existence of two species in the genus *Ophelia* (Annelida, Polychaeta) from the Western Mediterranean. *Biological Journal of the Linnean Society*, **83**, 101-113.
- Miller, M.P. (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA 1.3): A windows program for the analysis allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author at <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>.
- Miller (1998) AMOVA-PREP 1.01: a program for the preparation of the AMOVA input files from dominant-marker raw data. Computer software distributed by the author at <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Nei, M. & Li W.H. (1985) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 5269-5273.
- Sala, E. (2002) Marine biology in the 21st century: do we need to look at the past? *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 59-60.
- StatSoft, Inc. (1997) *STATISTICA for Windows* (Computer program manual). Tulsa, OK. Web site <http://www.statsoft.com>.
- Westheide, W. & Schmidt, H. (2003) Cosmopolitan versus cryptic meiofaunal polychaete species: an approach to a molecular taxonomy. *Helgoland Marine Research*, **57**, 1-6.
- Zietkiewicz, E., Rafalsky, A. & Labda, D. (1994) Genome fingerprinting by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**, 176-183.