

# Analisi della struttura genetica di *Ophelia bicornis* Savigny, 1818 (Annelida, Polychaeta) nel Mediterraneo occidentale

M. Casu<sup>a,1</sup>, F. Maltagliati<sup>b</sup> e A. Castelli<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Zoologia e Antropologia Biologica, Via F. Muroli 25-07100 Sassari (Italy)

<sup>b</sup> Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, Via A. Volta 6-56126 Pisa (Italy)

**Abstract:** La struttura genetica del polichete di ambiente sabbioso intertidale *Ophelia bicornis* è stata studiata mediante elettroforesi degli alloenzimi. Sono stati raccolti 690 individui di *O. bicornis* in quattro località corse, otto sarde e una toscana. È stata rilevata strutturazione genetica significativa [ $F_{ST} = 0.080 \pm 0.018$ ,  $P < 0.001$ ], che suggerisce che la dispersione delle larve planctotrofiche può non essere così efficace a grande distanza, oppure che la selezione locale gioca un ruolo importante nella differenziazione in popolazioni. I confronti comprendenti la popolazione più distante (Tirrenia, Toscana) presentano le distanze genetiche ed i valori di  $F_{ST}$  più elevati, suggerendo che anche la distanza geografica ha un ruolo nel determinare la strutturazione genetica delle popolazioni. Non è presente però "isolamento da distanza", come evidenziato dal test di Mantel applicato alle matrici dei valori log-trasformati delle distanze geografiche e di flusso genico ( $P = 0.169$ ). La struttura genetica di *O. bicornis* è la risultante di due principali forze: 1) il flusso genico legato alla dispersione larvale, che tende all'omogeneizzazione genetica e 2) le esigenze di habitat, che favoriscono la frammentazione in popolazioni grazie alla selezione locale.

**Keywords:** Variabilità genetica; Alloenzimi; Dispersione; Flusso genico; Larve; Mediterraneo occidentale

## 1. INTRODUZIONE

Le modalità riproduttive degli invertebrati marini bentonici sono cruciali nel determinare il potenziale per la dispersione di molte specie, il livello di strutturazione genetica ed il flusso genico tra le popolazioni. Non sorprende il fatto che le specie marine sono spesso caratterizzate da scarsi livelli di strutturazione genetica in quanto possiedono caratteristiche del ciclo vitale, quali la presenza di larve a lunga vita planctonica, che permettono elevata dispersione e quindi flusso genico anche a distanze geografiche considerevoli. È stato dimostrato che un singolo individuo scambiato tra popolazioni per generazione è sufficiente a prevenire la fissazione di alleli differenti e che più di quattro individui scambiati per generazione possono efficacemente omogeneizzare le frequenze alleliche tra due (sotto)-popolazioni [Slatkin, 1987]. Tuttavia, recenti studi su specie marine hanno evidenziato che non sempre le larve con lunga vita pelagica assicurano una dispersione efficiente [Jones *et al.*, 1999; Swearer *et al.*, 1999].

Il polichete *Ophelia bicornis* Savigny, 1818 è distribuito lungo le coste del Mediterraneo, dell'Atlantico nord-orientale e del Mare del Nord. *Ophelia bicornis* vive infossata in ambienti intertidali costituiti da sabbia relativamente fine, spesso rimescolata dal mare, che rimane a lungo emersa mantenendo comunque una parte di acqua interstiziale durante l'emersione, caratterizzata dal contenere piccole quantità di detrito organico e popolazioni batteriche e di organismi della meiofauna [Bellan, 1962; Harris, 1991]. Le specie comprese nel genere *Ophelia* hanno fecondazione esterna e le larve sono capaci di scegliere il substrato giusto dopo un periodo di vita pelagica che può durare molte settimane [Wilson, 1948]. Le larve sono perciò potenzialmente capaci di una dispersione a larga scala.

Gli scopi del presente lavoro sono stati *i)* analizzare la struttura genetica di *O. bicornis* nel Mediterraneo occidentale e *ii)* valutare i livelli di flusso genico tra le sue popolazioni.

---

<sup>1</sup> E-mail: marcasu@uniss.it

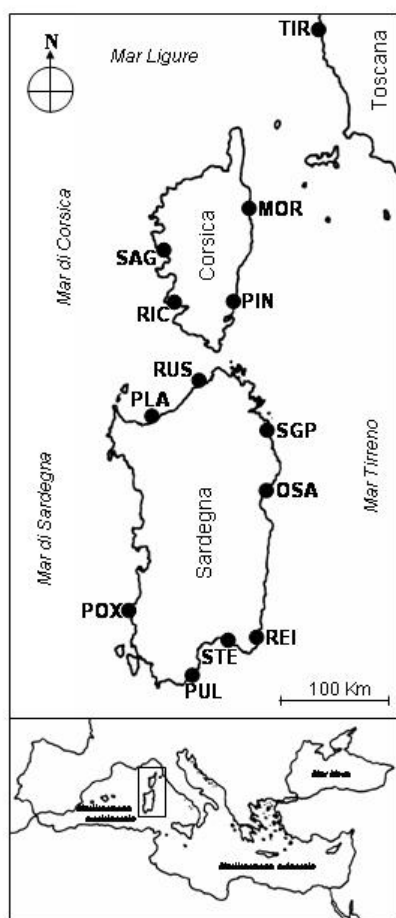
## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Campionamento

Per il nostro studio sono stati raccolti complessivamente 690 individui di *Ophelia bicornis* in quattro spiagge sabbiose della Corsica, otto della Sardegna e una della Toscana (Tabella 1 e Figura 1), nell'estate 2001.

**Tabella 1.** Siti di campionamento di *Ophelia bicornis* nel Mediterraneo occidentale.

Siti di campionamento	Abbrev.	Latitudine; Longitudine	N° ind.
Moriani	MOR	42° 23' N; 9° 31' E	53
Pinarello	PIN	41° 38' N; 9° 18' E	29
Sagone	SAG	42° 07' N; 8° 41' E	56
Riccantu	RIC	41° 55' N; 8° 47' E	60
San Giovanni di Posada	SGP	40° 37' N; 9° 44' E	57
Osalla	OSA	40° 20' N; 9° 40' E	59
Costa Rei	REI	39° 12' N; 9° 34' E	57
Torre delle Stelle	STE	39° 08' N; 9° 23' E	42
Santa Margherita di Pula	PUL	38° 57' N; 8° 58' E	59
Portixeddu	POX	39° 26' N; 8° 24' E	57
Platamona	PLA	40° 53' N; 8° 38' E	57
Monti Russu	RUS	41° 08' N; 9° 06' E	60
Tirrenia	TIR	43° 37' N; 10° 17' E	42



**Figura 1.** Località di campionamento. Per le abbreviazioni delle popolazioni vedi Tabella 1.

Gli individui sono stati prelevati scavando la sabbia per circa 20 cm nella fascia superiore del piano intertidale. I campioni sono stati trasferiti in laboratorio in contenitori di plastica termoisolati contenenti sabbia del sito di campionamento e acqua di mare areata.

### 2.2. Elettroforesi degli alloenzimi

Una porzione di ciascun esemplare (approssimativamente equivalente a 30 mg di peso umido) è stata posta in 200 µl of tampone estraente [Tris (0.05M), EDTA (0.01M), Mercaptoetanolo (0.2%), Triton X100 (0.1%), corretto a pH 8 con HCl] e successivamente omogeneizzata direttamente in provette Eppendorf da 1.5 ml mediante un pestello in vetro smerigliato ruotante. L'omogenato risultante è stato centrifugato a 13000 r.p.m. per 10 min a 4°C. Una frazione di supernatante di circa 1µl è stata applicata a fogli di acetato di cellulosa per l'elettroforesi (25 min a 300V). È stata effettuata un'indagine preliminare su alcuni individui della popolazione di riferimento (Platamona, PLA) per ottimizzare le condizioni analitiche. È stato quindi saggiato un totale di 14 sistemi enzimatici usando il tampone elettrodi TEM [Tris (0.1M), EDTA (0.01M), MgCl<sub>2</sub> (0.001M), corretto a pH 7.8 con acido maleico]. La colorazione degli enzimi è stata effettuata seguendo i protocolli elaborati da Pasteur *et al.* [1987] apportando lievi modifiche. Gli enzimi che hanno presentato scarsa attività e risoluzione e quelli che non hanno mostrato polimorfismo sono stati scartati. Questa selezione ha consentito la messa a punto dei protocolli sperimentali di sette enzimi: arginina chinasi, APK (E.C. 2.7.3.3); glucosio-6-fosfato isomerasi, GPI (E.C. 5.3.1.9); isocitrato deidrogenasi (NADP<sup>+</sup>), IDH (E.C. 1.1.1.42); L-lattato deidrogenasi, LDH (E.C. 1.1.1.27); malato deidrogenasi, MDH (E.C. 1.1.1.37); fosfogluconato deidrogenasi, PGDH (E.C. 1.1.1.44) e fosfoglucomutasi, PGM (E.C. 5.4.2.2).

### 2.3. Analisi statistiche

Le frequenze alleliche, il numero medio di alleli e le eterozigotità osservate e attese sono state determinate separatamente per ciascun morfotipo in ciascun sito. Le frequenze alleliche sono disponibili su richiesta agli autori.

I livelli di eterogeneità genetica all'interno e tra i campioni sono stati quantificati rispettivamente attraverso gli estimatori jackknifed di Weir e Cockerham [1984]  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ , usando il software FSTAT 2.9.1 [Goudet, 1995].

Tutti i campioni di *O. bicornis* sono stati ordinati in uno spazio bidimensionale attraverso il multidimensional scaling (MDS) [Guiller *et al.*, 1998], al fine di esaminare le relazioni nella matrice originale delle distanze genetiche di Nei [1978]. Con il programma IBD [Bohonak, 2002] è stata inoltre determinata la relazione tra la divergenza genetica e la distanza geografica. È stato applicato il test di Mantel alle matrici log-trasformate dei valori a coppia delle distanze geografiche e quelli di flusso genico. I valori a coppia di flusso genico sono stati calcolati utilizzando la seguente relazione:

$$\hat{M} = 0.25 [(1/F_{ST}) - 1] \quad [\text{Slatkin, 1993}].$$

### 3. RISULTATI

L'analisi genetica ha fornito otto loci polimorfici in almeno una popolazione. IDH è stato l'unico enzima che ha evidenziato due loci chiaramente interpretabili, gli altri sei ne hanno mostrato uno ciascuno. Sono stati rilevati cinque alleli privati per località: *APK\*100* e *IDH-1\*96* in Pinarello, *GPI\*101* in Monti Russu, *MDH\*98* in Santa Margherita di Pula e *PGDH\*106* in Portixeddu.

I campioni di entrambi i morfotipi hanno presentato un polimorfismo

$$26.0 \pm 3.2 \leq P_{99} \leq 58.8 \pm 1.0,$$

un numero medio di alleli per locus

$$1.5 \pm 0.2 \leq \text{MAL} \leq 2.6 \pm 0.5,$$

eterozigosità osservate

$$0.030 \pm 0.017 \leq H_o \leq 0.163 \pm 0.073 \text{ e}$$

eterozigosità attese

$$0.041 \pm 0.017 \leq H_e \leq 0.226 \pm 0.081 \text{ (Tabella 2)}.$$

**Tabella 2.** Stime ( $\pm$  errore standard) della variabilità genetica all'interno delle popolazioni.  $P_{99}$ , percentuale di loci polimorfici; MAL, numero medio di alleli per locus;  $H_o$ , eterozigosità osservata;  $H_e$ , eterozigosità attesa. Per le abbreviazioni delle popolazioni si veda la Tabella 1.

Sample	$P_{99}$	MAL	$H_o$	$H_e$
MOR	46.3 $\pm$ 3.1	2.0 $\pm$ 0.3	0.120 $\pm$ 0.046	0.178 $\pm$ 0.065
PIN	28.6 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.3	0.156 $\pm$ 0.049	0.226 $\pm$ 0.081
SAG	54.3 $\pm$ 0.9	1.6 $\pm$ 0.3	0.087 $\pm$ 0.039	0.129 $\pm$ 0.063
RIC	58.8 $\pm$ 1.0	2.0 $\pm$ 0.4	0.108 $\pm$ 0.050	0.140 $\pm$ 0.065
SGP	53.4 $\pm$ 1.2	2.3 $\pm$ 0.4	0.135 $\pm$ 0.051	0.185 $\pm$ 0.075
OSA	48.0 $\pm$ 3.6	2.4 $\pm$ 0.4	0.125 $\pm$ 0.057	0.176 $\pm$ 0.075
REI	54.1 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 0.4	0.135 $\pm$ 0.067	0.185 $\pm$ 0.070
STE	39.1 $\pm$ 1.1	2.3 $\pm$ 0.3	0.121 $\pm$ 0.052	0.190 $\pm$ 0.073
PUL	52.4 $\pm$ 3.7	2.5 $\pm$ 0.5	0.125 $\pm$ 0.054	0.206 $\pm$ 0.083
POX	48.5 $\pm$ 2.9	2.6 $\pm$ 0.5	0.108 $\pm$ 0.048	0.191 $\pm$ 0.075
PLA	52.8 $\pm$ 1.6	2.1 $\pm$ 0.5	0.163 $\pm$ 0.073	0.198 $\pm$ 0.087
RUS	45.1 $\pm$ 3.1	2.1 $\pm$ 0.5	0.092 $\pm$ 0.045	0.188 $\pm$ 0.087
TIR	26.0 $\pm$ 3.2	1.5 $\pm$ 0.2	0.030 $\pm$ 0.017	0.041 $\pm$ 0.017

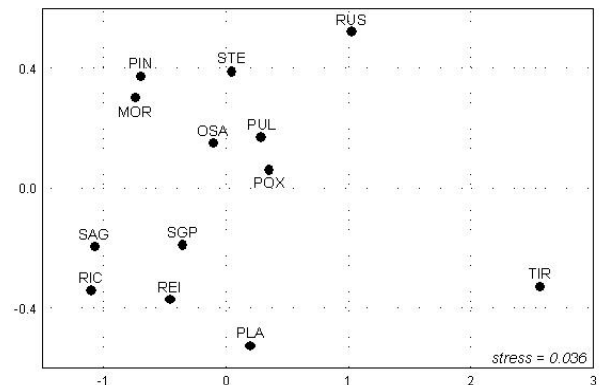
La  $F$ -statistica, basata sugli otto loci polimorfici ha fornito un valore di  $F_{IS}$  per l'intero set di dati pari a  $0.317 \pm 0.051$  (Tabella 3). Tale valore indica un generale deficit di individui eterozigoti nelle popolazioni analizzate.

**Tabella 3.**  $F$ -statistica di Weir e Cockerham [1984].

	Tutti i campioni	Tutte i campioni escluso TIR
$F_{IS}$	0.317 $\pm$ 0.051	-
95% C.I.	0.243-0.396	-
$F_{ST}$	0.080 $\pm$ 0.018	0.055 $\pm$ 0.011
95% C.I.	0.021-0.095	0.020-0.066

L'elevato valore di  $F_{ST}$  ( $= 0.080 \pm 0.018$ ,  $P < 0.001$ ) indica un livello significativo di strutturazione genetica tra le popolazioni (Tabella 3). Tuttavia, tale valore si riduce a  $F_{ST} = 0.055 \pm 0.011$  quando viene omessa dall'analisi la popolazione di Tirrenia, che è quella geograficamente più distante dalle altre. Tutti i suddetti valori di  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$  sono risultati significativamente maggiori di zero al test di probabilità ( $P < 0.001$ ).

L'intervallo delle distanze genetiche di Nei [1978] è compreso tra  $D = 0.001$  e  $D = 0.156$ . Anche in questo caso è interessante notare che l'estremo superiore dell'intervallo delle distanze genetiche si riduce notevolmente ( $D = 0.000 - 0.055$ ) quando la popolazione di Tirrenia viene omessa dall'analisi. La distribuzione delle popolazioni nel grafico ottenuto con il multidimensional scaling delle distanze genetiche di Nei [1978], mostra *i*) una chiara separazione della popolazione di Tirrenia dalle altre lungo l'asse orizzontale e *ii*) due gruppi di popolazioni separati lungo l'asse verticale, senza un chiaro pattern geografico (Figura 2). Il basso valore dell'indice di stress indica l'affidabilità della rappresentazione grafica.



**Figura 2.** Multidimensional scaling. Per le abbreviazioni delle popolazioni si veda la Tabella 1.

Il test di Mantel effettuato per verificare la presenza di isolamento da distanza non ha evidenziato una relazione significativa tra separazione geografica e flusso genico ( $P = 0.169$ ).

#### 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le differenze tra le stime della diversità genetica all'interno delle popolazioni non hanno evidenziato alcun chiaro trend geografico. La popolazione di *O. bicornis* proveniente da Tirrenia ha presentato il valore più basso di variabilità genetica intrapopolazionale. Questo fatto può essere dovuto *i*) a eventi legati alla selezione, quali l'adattamento alle condizioni locali, che si manifestano con la perdita di alleli a bassa fitness, o a *ii*) eventi stocastici demografici, quali una drastica riduzione della dimensione della popolazione (collo di bottiglia), che potrebbe aver provocato la perdita di alleli a bassa frequenza.

La  $F$ -statistica ha evidenziato un generale deficit di individui eterozigoti. Normalmente le spiegazioni di questo fenomeno prendono in considerazione l'effetto Wahlund o l'inincrocio, ma queste ipotesi sono da scartare poiché dovrebbero essere interessati tutti i loci. Le deviazioni dalle proporzioni di Hardy-Weinberg potrebbero essere determinate invece dalla presenza della selezione naturale; non sono nemmeno da escludere fattori quali l'errore di campionamento o la presenza di alleli nulli.

L'analisi delle distanze genetiche tra le popolazioni ha prodotto valori tipici di popolazioni conspecifiche, con l'eccezione di pochi valori che ricadono nella cosiddetta 'zona grigia' di transizione tra 'popolazioni' e 'specie' di invertebrati (valori di distanza genetica di Nei [1978] compresi tra  $D = 0.11$  e  $D = 0.22$ , Thorpe e Solé-Cava, 1994). È interessante sottolineare che, per *O. bicornis*, il valore massimo di distanza genetica passa da  $D = 0.156$  a  $D = 0.055$  quando viene esclusa dall'analisi la popolazione di Tirrenia; ciò indica che la distanza geografica gioca un ruolo importante nella strutturazione genetica della specie. Questo aspetto è ulteriormente sottolineato dal multidimensional scaling che, però, non evidenzia alcun altro chiaro pattern geografico di variazione genetica. L'assenza di isolamento da distanza è un fatto comune in specie con alto potenziale dispersivo, mentre è più comunemente rilevato in specie con larga distribuzione in relazione alle loro capacità dispersive [vedi per es. Palumbi *et al.*, 1997; Maltagliati, 1998]. Tuttavia, non si può neppure escludere che *O. bicornis* segua il modello di

isolamento da distanza, poiché è virtualmente impossibile identificare la distanza geografica 'realizzata' tra le popolazioni, vale a dire la distanza che si otterrebbe considerando fattori quali le correnti superficiali, le barriere non evidenti alla migrazione, il comportamento delle larve, ecc. Un segnale dell'importanza della distanza geografica nel determinare la struttura genetica della specie è fornito dall'effetto della rimozione della popolazione geograficamente più distante sui valori della  $F$ -statistica e su quelli di distanza genetica. Infatti il valore di  $F_{ST}$  relativo alle popolazioni di *O. bicornis* si riduce di circa un terzo e le distanze genetiche sono più basse di meno della metà quando la popolazione di Tirrenia viene omessa dalle analisi.

Le più recenti analisi molecolari su varie specie marine con larva pelagica hanno mostrato che, contrariamente alle attese, la strutturazione genetica non è un evento raro. Le possibili spiegazioni prendono usualmente in considerazione fattori quali la selezione contro i genotipi sfavorevoli o la ritenzione e la filopatria larvale. Le esigenze ecologiche e le caratteristiche comportamentali possono pure giocare un ruolo importante nel far sì che le larve tendano a svilupparsi ed a reclutare in prossimità della popolazione da cui provengono, piuttosto che disperdere [Riginos e Victor, 2001]. Pertanto, almeno per alcuni taxa, l'assunzione che una lunga fase larvale pelagica corrisponde ad elevato tasso di dispersione è un'aspettativa che può rivelarsi errata [Luttikhuisen *et al.*, 2003; Taylor e Hellberg, 2003]. Variabilità genetica tra larve insediate è stata osservata in numerose specie di invertebrati marini [Johnson e Black, 1982; Parsons, 1996]. Questi studi hanno rivelato una struttura genetica complessa che è il risultato di un reclutamento altamente localizzato di coorti geneticamente variabili all'interno di una località ogni anno o tra siti limitrofi all'interno dello stesso anno. Tuttavia, come suggerito da Hedgecock [1986], le analisi esclusivamente genetiche non sono di solito sufficienti a determinare se la differenziazione della popolazione deriva principalmente dall'inefficienza della dispersione larvale o dall'adattamento alle condizioni locali e/o dalla selezione naturale agente sulle forme giovanili e sugli adulti. La divergenza genetica osservata tra le popolazioni di *O. bicornis* è perciò il risultato *i*) della dispersione larvale, che agisce contro l'omogenizzazione genetica della popolazione e *ii*) dalle esigenze di habitat degli adulti, che determinano una distribuzione frammentata. In particolare, la granulometria e l'assenza della frazione pelitica nella sabbia sono stimoli importanti per la metamorfosi delle larve di *Ophelia bicornis* [Gray, 1974].

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Bellan, G., Contribution à l'étude de l'Annélide Polychaète *Ophelia bicornis* Savigny 1820. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions CIESMM* 16: 533-550, 1962.
- Bohonak, A.J., IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity* 93: 153-154, 2002.
- Goudet, J., FSTAT version 1.2, a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486, 1995.
- Gray, J.S., Animal-sediment relationships. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 12: 223-261, 1974.
- Guiller, A., A. Bellido, e L. Madec, Genetic distances and ordination: the land snail *Helix aspersa* in North Africa as a test case. *Systematic Biology* 47: 208-227, 1998.
- Harris, T., Some aspects of the specific habitat requirements of *Ophelia bicornis* (Polychaeta). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 71: 771-786, 1991.
- Hedgecock, D., Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bulletin of Marine Science* 39: 550-564, 1986.
- Johnson, M.S., e R. Black, Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp. *Marine Biology* 70: 157-164, 1982.
- Jones, G.P., M.J. Milicich, M.J. Emslie, e C. Lunow, Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature* 402: 802-804, 1999.
- Luttikhuisen, P.C., J. Drent, W. Van Delden, e W. Piersma, Spatially structured genetic variation in a broadcast spawning bivalve: quantitative vs. molecular traits. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 260-272, 2003.
- Maltagliati, F., Does the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* Nardo (Teleostei: Cyprinodontidae) fit the one-dimensional stepping-stone model of gene flow? *Environmental Biology of Fishes* 53: 385-392, 1998.
- Nei, M., Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590, 1978.
- Palumbi, S.R., G. Grabowsky, T. Duda, L. Geyer, e N. Tachino, Speciation and population genetic structure in tropical Pacific sea urchins. *Evolution* 51: 1506-1517, 1997.
- Parsons, K.E., The genetic effects of larval dispersal depend on spatial scale and habitat characteristics. *Marine Biology* 126: 403-414, 1996.
- Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, F. Catalan, e J. Britton-Davidian, *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Paris: Lavoisier, 1987.
- Riginos, C., e B.C. Victor, Larval spatial distributions and other early life-history characteristics predict genetic differentiation in eastern Pacific blennioid fishes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 268: 1931-1936, 2001.
- Slatkin, M., Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792, 1987.
- Slatkin, M., Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279, 1993.
- Swearer, S.E., J.E. Caselle, D.W. Lea, e R.R. Warner, Larval retention and recruitment in an island population of a coral-reef fish. *Nature* 402: 799-802, 1999.
- Taylor, M.S., e M.E. Hellberg, Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science* 299: 107-109, 2003.
- Thorpe, G.P., e A.M. Solé-Cava, The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta* 23: 3-18, 1994.