

A. PENNA, S. FRAGA¹, M. MASÒ², M.G. GIACOBBE³, I. BRAVO¹, E. BERTOZZINI,
F. ANDREONI⁴, M. VILA², E. GARCES², A. LUGLIÈ⁵, C. VERNESI⁶

Centro di Biologia Ambientale, Università degli Studi di Urbino
Viale Trieste, 296 - 61100 Pesaro, Italia.
antonella.penna@uniurb.it

¹IEO, Vigo, Spagna.

²ICM-CSIC, Barcelona, Spagna.

³IAMC-CNR, Messina, Italia.

⁴Centro Biotecnologie, Fano, Italia.

⁵Dip. Botanica ed Ecologia Vegetale, Sassari, Italia.

⁶Fondazione Edmund Mach, Trento, Italia.

ANALISI DELLA BIODIVERSITÀ GENETICA DI ALCUNE SPECIE MICROALGALI RESPONSABILI DI FIORITURE TOSSICHE NEL MAR MEDITERRANEO

GENETIC BIODIVERSITY OF THE MEDITERRANEAN HARMFUL ALGAL BLOOM DINOFLAGELLATES

Abstract – In this study a genetic diversity of the main Mediterranean dinoflagellate HAB species has been analysed using the phylogeographic based approach. Different microalgal species isolates were characterized by phylogenetic, phylogeographic and population genetic aspects using different molecular markers and genetic analyses.

Key-words: dinoflagellates, Harmful Algal Bloom, Mediterranean Sea, phylogeny, ribosomal genes.

Introduzione – Diversi generi e specie appartenenti alle dinoflagellate sono comunemente presenti lungo le aree costiere del Mar Mediterraneo. Le specie possono essere potenzialmente produttrici di biotossine e causare fioriture ad alta biomassa (Congestri *et al.*, 2006; Giacobbe *et al.*, 2007). Questo studio ha lo scopo di caratterizzare alcune specie microalgali appartenenti alle dinoflagellate dal punto di vista filogenetico e filogeografico analizzando differenti isolati algali del Mar Mediterraneo. L'analisi filogenetica e di popolazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di diversi marcatori molecolari nelle regioni dei geni ribosomali e delle regioni non codificanti ITS, rivelando che questi marcatori sono soddisfacenti per la separazione inter e intra specifica.

Materiali e metodi – Oltre 250 isolati algali di differenti specie appartenenti alle dinoflagellate sono stati isolati e mantenuti in coltura in terreno F/2. Il DNA genomico di tutti gli isolati algali è stato estratto utilizzando il kit DNeasy Plant Kit (Qiagen, USA). Le condizioni di amplificazione per PCR e di sequenziamento delle regioni ribosomali 5.8S rDNA e ITS di tutti gli isolati algali sono descritte in Penna *et al.* (2005a). Le analisi di allineamento sono state condotte con il programma SAM (Karplus *et al.*, 1998). Le analisi filogenetiche, basate sulle regioni ITS-5.8S rDNA, sono state ottenute utilizzando vari metodi, quali Neighbour-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) e Bayesian Inference (BI) (Penna *et al.*, 2008). Gli indici di diversità molecolare sono stati calcolati con il programma Arlequin ver 3.0 software. Le relazioni filogenetiche tra le sequenze delle regioni 5.8S rDNA-ITS di differenti specie appartenenti ai generi *Alexandrium* e *Ostreopsis* sono state elaborate attraverso l'analisi statistica di parsimonia (Templeton *et al.*, 1992).

Risultati – **Genere *Alexandrium***. In Mediterraneo sono state identificate 11 specie appartenenti al genere *Alexandrium*, le cui sequenze nucleotidiche sono state comparate con quelle di altre aree geografiche. L'analisi filogenetica basata

sui geni 5.8S rDNA e ITS ha mostrato che all'interno del genere *Alexandrium* si distinguono due gruppi: uno che include *A. minutum*, *A. tamutum*, *A. taylori* e altre specie; l'altro gruppo comprende il complesso "*A. tamarense* species complex", *A. affine* e *A. tamiyavanichi*. Tutti gli isolati di *A. minutum* sono PSP-tossici e formano un clade omogeneo essendo le sequenze ribosomiali identiche. *A. minutum* è filogeneticamente vicino a quello rappresentato dagli isolati algali di *A. tamutum*, *A. peruvianum* e *A. insuetum*. Gli isolati di *A. taylori* formano un clade omogeneo che raggruppa con il clade di *A. pseudogoniaulax*. L'altro grande gruppo all'interno del genere *Alexandrium* è meglio risolto filogeneticamente e le analisi filogenetiche all'interno del complesso "*A. tamarense* species complex" hanno mostrato che in Mediterraneo sono presenti tre differenti cladi: il clade Mediterraneo (ME) non tossico, il clade Ovest Europeo (WE) non tossico/tossico e il clade Asiatico (TA) PSP-tossico. Il raggruppamento filogeografico degli isolati algali è consistente con i ribotipi geografici, ma non con i morfotipi che costituiscono il complesso. Il clade Nord Americano (NA), che non è presente in Mediterraneo, segrega per primo ed è separato dagli altri cladi del complesso "*A. tamarense* species complex" da alti valori di bootstrap (100% e 90% per NJ e ML) e di inferenza bayesiana (0.96). Gli altri tre cladi ME, TA, WE raggruppano insieme; tutti gli isolati algali di *A. catenella* hanno sequenze identiche e raggruppano assieme agli isolati algali di *A. catenella* dell'area asiatica giapponese (Fig. 1).

Genere *Ostreopsis*. Isolati algali di dinoflagellate epifitiche appartenenti al genere *Ostreopsis* Schmidt provenienti da differenti aree costiere del Mar Mediterraneo e di altre aree extra-mediterranee sono stati esaminati attraverso l'analisi filogenetica, basata sulle sequenze del gene ribosomale 5.8S e le regioni non codificanti ITS, accoppiata all'analisi al microscopio ottico (LM) e a scansione elettronica (SEM). Le analisi genetiche hanno mostrato la presenza di differenti cladi: *O. cf. siamensis* in Mar Mediterraneo, *O. ovata* in Mar Mediterraneo, Isole Canarie, Brasile e Asia, *Ostreopsis* sp. in Indonesia e Isole Canarie. All'interno della specie *O. ovata* è presente un differenziamento genetico tra gli isolati algali mediterranei e asiatici.

Tab. 1 - Indici di diversità molecolare nelle regioni ribosomiali ITS e nel gene 5.8S tra i gruppi e all'interno di ciascun gruppo di *Ostreopsis* spp. (Penna, 2007).

Molecular diversity index in the ITS-5.8S rDNA among and within isolates of Ostreopsis spp.

Specie	<i>O. cf. siamensis</i> (Mediterraneo)	<i>Ostreopsis</i> spp. (Indonesia/ Canarie)	<i>O. ovata</i> Europa / Brasile	<i>O. ovata</i> Asia	<i>O. lenticularis</i> / <i>O. labens</i>
<i>O. cf. siamensis</i> (Mediterraneo) (n = 9)	0				
<i>Ostreopsis</i> spp. (Indonesia/Canarie) (n = 2)	81.1 ± 3.4	168.1 ± 16.0			
<i>O. ovata</i> Europa/ Brasile (n = 24)	154.8 ± 14.7	91.8 ± 8.7	0.4 ± 0.03		
<i>O. ovata</i> Asia (n = 12)	144.6 ± 13.7	75.9 ± 7.2	42.3 ± 4.0	19.2 ± 1.8	
<i>O. lenticularis</i> <i>O. labens</i>	197.3 ± 18.7	105.2 ± 10.1	193.2 ± 18.4	182.9 ± 17.4	10.1 ± 0.9

I dati sono espressi come percentuale della media ± SD delle differenze nucleotidiche fra le sequenze all'interno dei singoli gruppi (sulla diagonale), e come percentuale del numero netto delle differenze nucleotidiche tra i gruppi (al di sotto della diagonale). I valori di SD sono calcolati su 10.000 repliche di bootstraps. Data are expressed as percentage of the mean ± SD pair-wise nucleotide sequence differences within isolates (on the diagonal), and percentage of the net number of differences between isolates (below the diagonal). SD calculated on 10,000 bootstrap replicates.

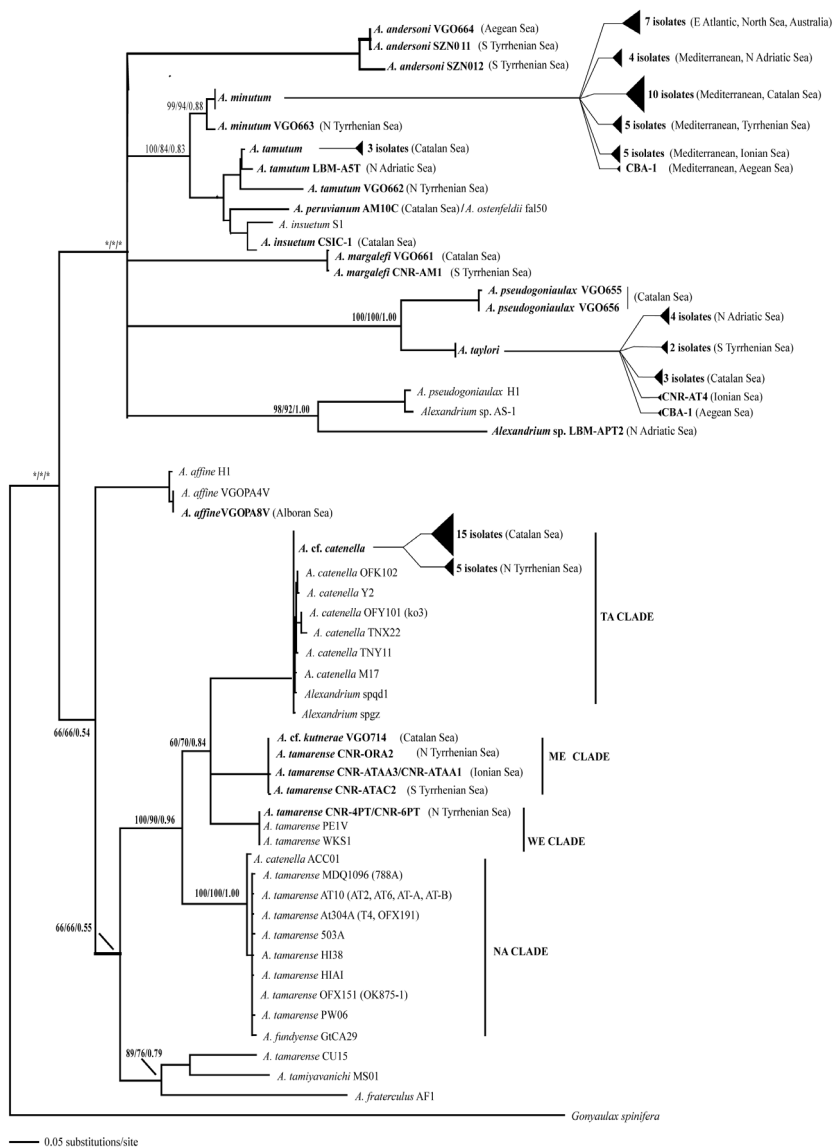


Fig. 1 - Analisi filogenetica di maximum likelihood del genere *Alexandrium* basato sulle sequenze del gene 5.8S-ITS. I numeri ai nodi maggiori rappresentano da sinistra a destra, i valori di bootstraps di NJ (10,000 repliche), di ML (1,000 repliche) e di Bayesian Inference. Sono mostrati solo i valori di bootstraps >50% e di probabilità a posteriori >0.5. L'albero ha come outgroup la sequenza di *Gonyaulax spinifera* AF051832. Le sequenze del gene 5.8S rDNA-ITS delle specie mediterranee di *Alexandrium* sono mostrate in grassetto.

Maximum likelihood phylogenetic tree of the genus Alexandrium based on the ITS region and 5.8S rDNA sequences. Numbers on the major nodes represent from the left to the right, NJ (10,000 replicates), ML (1,000 replicates) bootstrap values and BP values. Only bootstrap and posterior probability values >50% and 0.5 are shown, respectively and asterisk symbols at the major nodes represent bootstrap and posterior probability values >50% and 0.5, respectively. The tree is rooted using Gonyaulax spinifera AF051832 as outgroup. The ITS-5.8S rDNA sequences of the Mediterranean Alexandrium species are in bold.

Conclusioni – Il nostro studio fornisce nuovi dati sulle relazioni filogenetiche esistenti fra la maggior parte delle specie del genere *Alexandrium* e di isolati algali del genere *Ostreopsis* nel Mar Mediterraneo e in altre aree al di fuori del bacino del Mediterraneo basate sulle sequenze del gene 5.8S e delle regioni ITS1-ITS2. I marcatori genetici e le analisi morfologiche si sono rivelati validi metodi per comprendere la tassonomia e la posizione filogenetica del genere tossico *Ostreopsis*. Appare anche evidente che solamente l'attuale classificazione morfologica basata sull'analisi della forma, delle dimensioni e delle placche tecali di *Ostreopsis* non è sufficiente a chiarire la distinzione dei vari morfotipi e specie all'interno del genere. Le acque costiere del Mediterraneo sono di importanza strategica per le specie del genere *Alexandrium* e recentemente del genere *Ostreopsis* dal punto di vista ecologico, sanitario e di impatto economico a causa delle fioriture tossiche che possono originare questi taxa algali. Questo studio filogenetico sui generi *Alexandrium* e *Ostreopsis* ha significativamente migliorato le conoscenze derivate da pochi studi precedenti nelle stesse aree geografiche (Lilly *et al.*, 2002; Penna *et al.*, 2005a,b).

Bibliografia

- CONGESTRI R., PENNA A., ZINGONE A. (2006) - Bentox-net: a research and management initiative on *ostreopsis* spp. and other benthic microalgal blooms along the Italian coast. *Harmful Algal News*, **32**: 11-12.
- GIACOBBE M.G., PENNA A., GANGEMI E., MASÒ M., GARCÉS E., FRAGA S., BRAVO I., AZZARO F., N. PENNA. (2007) - Recurrent high-biomass blooms of *Alexandrium taylorii* (Dinophyceae), a HAB species expanding in the Mediterranean. *Hydrobiologia*, **580**: 125-133.
- KARPLUS K.B.C., HUGHEY R. (1998) - Hidden Markov Models for Detecting remote Protein Homologies. *Bioinformatics*, **14**: 846-856.
- LILLY E.L., KULIS D.M., GENTIEN P., ANDERSON D.M. (2002) - Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research*, **24**: 443-452.
- PENNA A., VILA M., FRAGA S., GIACOBBE M.G., ANDREONI F., RIOBÒ P., VERNESI C. (2005a) - Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and ITS - 5.8S rDNA sequences. *Journal of Phycology*, **41**: 212-225.
- PENNA A., GARCÉS E., VILA M., GIACOBBE M. G., FRAGA S., LUGLIÉ A., BRAVO I., BERTOZZINI E., VERNESI C. (2005b) - *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Marine Biology*, **148**: 13-23.
- PENNA A. (2007) - *Internal Algal Symposium on Algal Toxins*. SITOX Conference, May 27-29, Trieste.
- PENNA A., FRAGA S., MASÒ M., GIACOBBE M.G., BRAVO I., VILA M., GARCÉS E., BERTOZZINI E., ANDREONI F., A. LUGLIÉ, C. VERNESI. (2008) - Phylogenetic relationships among the Mediterranean *Alexandrium* (Dinophyceae) species based on sequences of 5.8S gene and internal transcribed spacers of the rRNA operon. *European Journal of Phycology*, **43**: 163-178.
- TEMPLETON A.R., CRANDALL K.A., SING C.F. (1992) - A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**: 619-633.