



Studio preliminare sulla struttura genetica di *Patella ferruginea* Gmelin, 1791 (Mollusca, Gastropoda), nell'Area Marina Protetta (AMP) dell'Isola dell'Asinara mediante ISSR

Marco Casu^a, Daniela Casu^{*a,b}, Tiziana Lai^a, David Pala^c, Vittorio Gazale^d, Aldo Zanello^b, Alberto Castelli^b, Marco Curini Galletti^a

^a Dipartimento di Zoologia e Antropologia Biologica, Via Muroli 25-07100 Sassari, Italia.

^b Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, Via Volta 6-56126 Pisa, Italia.

^c Dipartimento di Botanica ed Ecologia vegetale, Università di Sassari, Via Muroli 25-07100 Sassari, Italia.

^d Parco Nazionale dell'Asinara, Via Iosto 7-07046 Porto Torres (SS), Italia.

Abstract

L'istituzione delle Aree Marine Protette (AMP) consente adeguate misure di conservazione dell'ambiente marino. Tuttavia l'efficacia di tale protezione dovrebbe essere verificata attraverso programmi di monitoraggio, utilizzando specie che siano facili da identificare e analizzare in maniera non distruttiva. In tale contesto è stata individuata *Patella ferruginea*, che risulta essere l'invertebrato marino più minacciato del Mediterraneo occidentale. L'obiettivo dello studio è quello di stimare i livelli di diversità genetica e flusso genico di alcune popolazioni di *P. ferruginea* dell'AMP dell'Isola dell'Asinara. È stato prelevato il materiale biologico di 10 esemplari da 3 diversi siti, tramite escissione di piccole quantità di tessuto muscolare, seguendo un protocollo da noi sperimentato sulla specie *P. ulyssiponensis*. Tale protocollo assicura la sopravvivenza degli esemplari campionati. L'analisi genetica è stata condotta effettuando la genotipizzazione di un subcampione di individui per ciascun sito utilizzando la tecnica ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). I risultati ottenuti indicano una notevole uniformità genetica tra gli individui appartenenti a ciascun sito, contrapposta ad una moderata eterogeneità genetica tra gli individui appartenenti ai tre siti. Questi fatti suggeriscono inoltre che *P. ferruginea* possa aver subito erosione genetica negli anni passati in relazione alla sua raccolta, e che i livelli di flusso genico non siano elevati anche su piccola scala geografica.

Keywords: AMP; *Patella ferruginea*, Variabilità genetica; ISSR.

* Autore per la corrispondenza. Tel: +39-079-228922; Fax: +39-079-228925; e-mail: danicasu@uniss.it.

1. Introduzione

Uno dei principali problemi che le Aree Marine Protette (AMP) si trovano ad affrontare è il turismo ambientale e le attività ricreative ad esso correlate, che stanno crescendo in maniera esponenziale. L'uomo può agire sulle comunità attraverso il calpestio o la raccolta d'organismi marini per scopi ricreativi e/o commerciali, e il danno o la rimozione di una data specie o di un gruppo di organismi possono influenzare negativamente non solo un singolo popolamento, con riduzione del numero d'individui e conseguente erosione genetica, ma anche attraverso effetti diretti ed indiretti, l'intera struttura di comunità o il paesaggio (Brosnan & Crumrine, 1994).

L'istituzione e la gestione delle AMP consentono adeguate misure di conservazione dell'ambiente marino. Poiché l'efficacia di tale protezione dovrebbe essere verificata attraverso programmi di monitoraggio, è necessario individuare organismi che siano facili da identificare ed analizzare in maniera non distruttiva. Per questo studio è stata scelta la specie *Patella ferruginea* Gmelin 1791, mollusco endemico del Mediterraneo che sulla lista dell'European Council Directive 92/43/EEC del Conservation of Natural Habitats of Wild Fauna and Flora (1992) risulta essere l'invertebrato marino più minacciato del Mediterraneo occidentale. Infatti, negli ultimi decenni, la sua distribuzione si è progressivamente ristretta a poche aree (Nord Africa, Spagna, Corsica, Sardegna e Arcipelago Toscano), principalmente a causa dell'impatto antropico (Cretella *et al.* 1994). A tutt'oggi popolazioni numericamente significative sono pressoché esclusive del complesso sardo-corso.

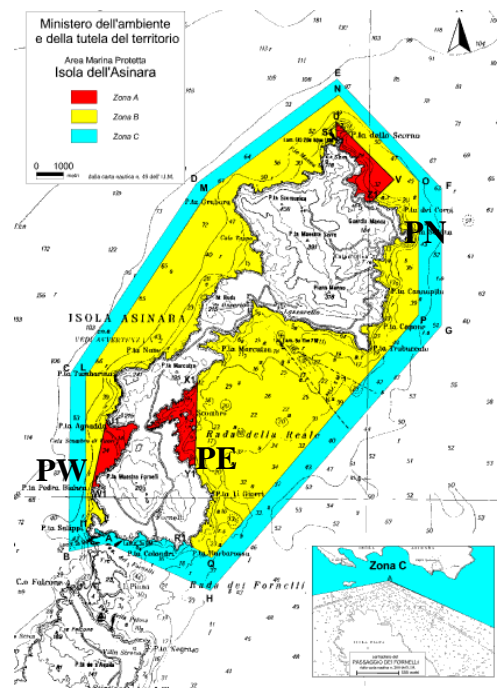
L'habitat di questa specie è confinato alla parte inferiore del mediolitorale in substrati rocciosi di tipo granitico e riolitico, una zona facilmente accessibile da parte dell'uomo (Laborel-Deguen & Laborel 1991a). L'obiettivo di questo studio preliminare è stato quello di stimare i livelli di diversità genetica di alcune popolazioni di *P. ferruginea* dell'AMP dell'Isola dell'Asinara.

1. Materiale e metodi

Gli individui sono stati campionati in tre siti: Punta Sabina (PN) (entry, no-take zone), Cala Sant'Andrea (PE) (no-entry, no-take zone) e Pedra Bianca (PW) (no-entry, no-take zone) (Fig. 1). È stato prelevato il materiale biologico di 10 esemplari tramite escissione di piccole quantità di tessuto muscolare, seguendo un protocollo da noi sperimentato sulla specie *P. ulyssiponensis* Gmelin, 1791. Tale protocollo assicura la sopravvivenza degli esemplari campionati (dati non pubblicati).

L'analisi genetica è stata condotta effettuando la genotipizzazione di un subcampione di quattro individui per ciascun sito utilizzando la tecnica ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il QIAGEN® DNeasy Tissue kit (QIAGEN Inc., Valencia, California).

Figura 1. Zonizzazione della AMP dell'Isola dell'Asinara e localizzazione dei tre siti di campionamento. PW: Pedra Bianca; PE: Cala Sant'Andrea; PN: Punta Sabina (Cartina tratta dal sito web www.minambiente.it, modificata).





Per la messa a punto delle tecniche analitiche e per la definizione dei marcatori genetici, è stato utilizzato un set di 18 primer sintetizzati dalla Proligo Primers & Probes[®] (Proligo France SAS). Il DNA è stato sottoposto ad amplificazione mediante PCR. L'analisi è stata condotta utilizzando i sei primer ISSR che hanno fornito i risultati migliori (Tab. 1). Le amplificazioni sono state condotte utilizzando il seguente protocollo: per ciascuna reazione sono stati utilizzati circa 30 ng di DNA genomico, tampone di reazione 1x, MgCl₂ 3 mM, dNTP 200 µM ciascuno, primer 0,2 µM, 0,5 unità di Taq DNA polimerasi, per un volume finale della soluzione pari a 25 µl. Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando il seguente profilo di amplificazione: 94°C per 3 minuti; 45 cicli da 94°C per 40 secondi, 55°C per 45 secondi, 72°C per 100 secondi; 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), immerso in tampone TAE 1X. I gel sono stati colorati tramite immersione per 15 minuti in una soluzione di Bromuro di Etidio (1µl/10ml di H₂O). I profili elettroforetici sono stati visualizzati tramite un transilluminatore a ultravioletti, connesso ad un sistema per l'acquisizione di immagini. Assieme ai campioni sono stati fatti correre dei controlli negativi per escludere la possibilità di contaminazioni.

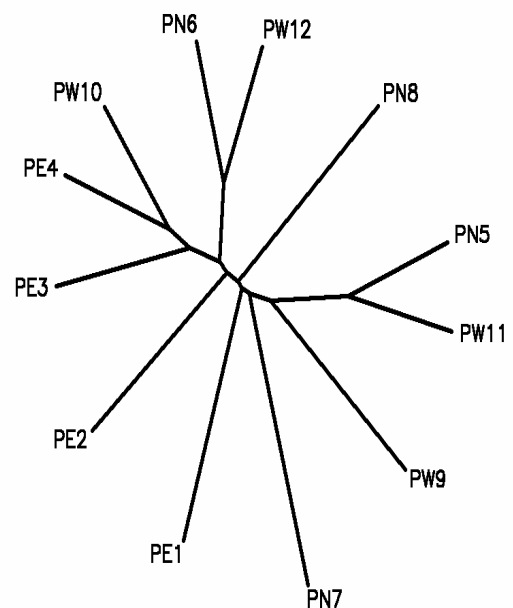
Tabella 1. Sigle dei primer e sequenze, numero di bande polimorfiche per primer e intervallo del peso molecolare espresso in paia di basi (*pb*).

Sigle dei primer	Sequenze 5'-3'	N° totale bande	Peso molecolare (pb)
IT1	(CA) ₈ GT	8	630-1500
SAS1	(GTG) ₄ GC	9	530-1800
SAS3	(GAG) ₄ C	11	580-1500
UBC 809	(AG) ₈ G	10	300-1000
UBC 811	(GA) ₈ C	8	480-1200
UBC 827	(AC) ₈ G	9	480-1600

2. Risultati e discussione

L'amplificazione dei sei primer ISSR in 12 individui ha portato all'individuazione di un totale di 55 bande. Per ciascun primer il numero di bande risolte è compreso fra 8 (primer IT1) e 11 (primer SAS 3), con dimensioni dei frammenti che variano tra 630 e 1600 paia di basi. Sono state individuate complessivamente nove bande private, di cui quattro nel campione di Punta Sabina, due nel campione di Cala Sant'Andrea e quattro in quello di Pedra Bianca. I valori dell'eterozigosità, calcolati assumendo equilibrio di Hardy-Weinberg, sono pari a: $H = 0.329 \pm 0.024$ nel campione proveniente da Punta Sabina (PN); $H = 0.282 \pm 0.020$, nel campione di Cala Sant'Andrea (PE); $H = 0.280 \pm 0.025$ nel campione di Pedra Bianca (PW). Il valore della variabilità standardizzata delle frequenze alleliche (Weir & Cockerham, 1984) ($F_{ST} < 0.001$) è risultato non significativamente minore di 0 ($P > 0.1$). In Fig. 2 è riportato il dendrogramma costruito sulla matrice interindividuale delle distanze genetiche di Nei (1978), in cui non è possibile individuare cluster di individui separati in base alla provenienza geografica.

Figura 2. Dendrogramma delle distanze genetiche interindividuali di Nei (1978).



I risultati ottenuti da questa indagine preliminare indicano dunque una notevole uniformità genetica tra gli individui appartenenti ai tre siti e, di fatto, suggeriscono che la dispersione larvale di *P. ferruginea* sia sufficiente a prevenire la divergenza genetica almeno su piccola scala geografica, sebbene le sue caratteristiche biologiche ed ecologiche possano non favorire la dispersione tra le diverse aree di distribuzione (vedi Laborel–Deguen & Laborel 1991b).

Bibliografia

- Brosnan, D.M. & Crumrine L.L. (1994) Effects of human trampling on marine rocky shore communities. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, **177**, 79-97.
- Cretella, M., Scillitani, G., Toscano, F., Tirella, P., Picariello, O. & Cataudo, A. (1994) Relationship between *Patella ferruginea*, Gmelin, 1791 and the other Tyrrhenian species of *Patella* (Gastropoda: Patellidae). *Journal of Molluscan Studies*, **60**, 9-17.
- Laborel–Deguen, F. & Laborel, J. (1991a) Une tentative de reintroduction de *Patella ferruginea* Gmel. (Gasteropoda) dans le Parc National de Port-Cros (Var, France). “Les species Marines a Protéger en Méditerranée” Boudouresque C.F., Avon M. & Gravez V. edit, pp 129-132. GIS Posidonie publ., Fr.
- Laborel–Deguen, F. & Laborel, J. (1991b) Nouvelles observations sur la population de *Patella ferruginea* Gmel. de Corse. “Les species Marines a Protéger en Méditerranée” Boudouresque C.F., Avon M. & Gravez V. edit, pp 105-117. GIS Posidonie publ., Fr.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Weir, B.S. & Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.