

Analisi della diversità genetica in *Gemma gemma* (Eulamellibranchia: Veneridae) del Maine e della Virginia (U.S.A.) mediante marcatori ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

P. Cossu^a, M. Casu^a, T. Lai^a, F. Maltagliati^b, A. Castelli^b e J.A. Commito^c

^a Dipartimento di Zoologia e Antropologia Biologica, Via F. Muroli 25-07100 Sassari (Italy)

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

^c Department of Environmental Studies, Gettysburg College, 17325 Gettysburg, PA (U.S.A.)

Abstract: *Gemma gemma* è un bivalve ovoviviparo privo di stadi larvali pelagici, i giovani si sviluppano dall'uovo fecondato tra le valve della madre e vengono da essa rilasciati quando raggiungono una determinata dimensione. Essi rimangono vicino alla madre per un breve periodo, poi sono in grado di disperdersi soltanto passivamente con il sedimento sospeso dall'azione idrodinamica. Con il presente lavoro sono stati confrontati i bandeggi ISSR tra individui entro patch di 10 metri di diametro, tra patch entro ciascuna delle località e tra le due località (Maine e Virginia, USA) per studiare la struttura genetica e per valutare l'efficacia della dispersione passiva. Sono stati analizzati 30 individui per patch e 3 patch per località, per un totale di 180 individui. Sono stati utilizzati 5 primer che hanno prodotto un totale di 67 bande dopo amplificazione PCR. Mediante l'analisi della varianza molecolare (AMOVA) è stata rilevata una piccola porzione di varianza genetica tra Maine e Virginia (2.3%, $P > 0.05$), mentre proporzioni più elevate sono state rilevate sia tra patch entro località (36.7%, $P < 0.0001$) che all'interno delle singole patch (61.0%, $P < 0.0001$). La specie risulta geneticamente strutturata come un mosaico di gruppi di individui generati dalla stessa madre. La presenza di alcuni genotipi diversi all'interno di questi gruppi denota, comunque, che la dispersione passiva può giocare un ruolo importante nel mantenere la diversità genetica a piccola scala.

Keywords: Dispersione; Diversità genetica; DNA; Marcatori genetici, Ovoviviparità; Scala spaziale; Struttura genetica

1. INTRODUZIONE

Gemma gemma (Totten, 1834) è un mollusco bivalve di piccole dimensioni, i cui adulti raramente raggiungono i 5 mm di diametro. È comune nei bassi fondali sabbiosi lungo la costa occidentale dell'America settentrionale, dalla Nova Scotia al Texas (Bradley e Cooke, 1959; Schneider e Mann, 1994) e alle Bahamas. Sono state inoltre segnalate introduzioni nella Baia di San Francisco in California (MacDonald, 1969). *G. gemma*, specie dominante dell'infrafauna, è ovovivipara: l'uovo viene fecondato all'interno della femmina, alcuni stadi giovanili vengono raggiunti all'interno delle valve materne. I giovani vengono rilasciati quando raggiungono determinate dimensioni e trascorrono il resto della loro vita come organismi bentonici (Sellmer, 1967). Sebbene la distribuzione spaziale degli

adulti sia spesso casuale, i giovani generati dalla stessa madre appaiono raggruppati, poiché, una volta rilasciati, tendono a restare nei pressi del genitore (Jackson, 1968, Botton, 1984). L'assenza di stadi larvali pelagici abbassa il potenziale per la dispersione di *G. gemma*, rendendo la specie un modello utile per lo studio degli effetti della dispersione postlarvale sulla struttura genetica. È stato osservato inoltre che la dispersione postlarvale è la risultante di due componenti: 1) movimento attivo di giovani ed adulti, e 2) fenomeni di trasporto passivo (Commito et al., 1995). La dispersione passiva in *G. gemma* è dovuta alle correnti d'acqua oppure al trasporto passivo operato da altri componenti della meiofauna (Commito et al., 1995; Fegley, 1988; Palmer, 1988; De Patra e Levin, 1989). Pur essendo possibile che gli individui di minori dimensioni possano essere trasportati nel

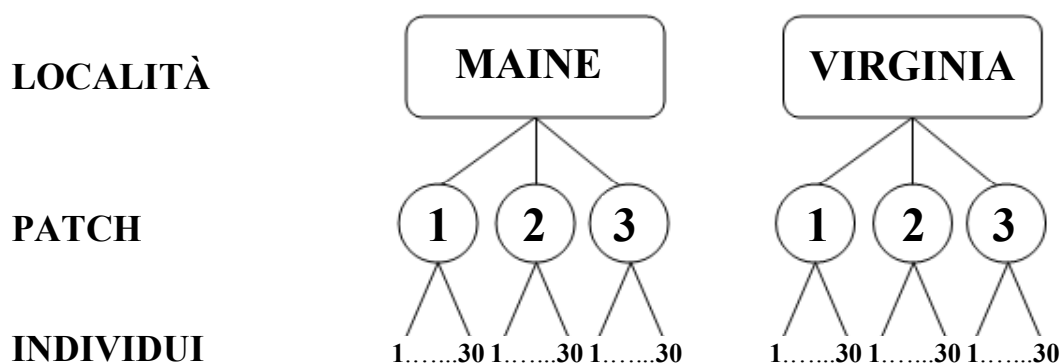


Figura 1. Schema del campionamento effettuato.

sedimento, esistono prove che evidenziano il fatto che il movimento possa dipendere dall'età e dalle dimensioni (Commito et al., 1995). Lo scopo del presente lavoro è l'analisi della struttura genetica a diverse scale spaziali in *G. gemma*, al fine di valutare l'efficacia dei meccanismi di dispersione passiva in questa specie. Come marcatori genetici sono stati utilizzati gli ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Questa tecnica sfrutta la presenza nel genoma di sequenze di DNA microsatellite ripetute e invertite per amplificare le regioni comprese tra di esse (Zietkiewicz et al., 1994). Gli ISSR sono tipici marcatori dominanti multilocus caratterizzati da una maggiore affidabilità e riproducibilità di risultati rispetto ad altre tecniche simili, come la RAPD. Il polimorfismo rilevato dipende 1) dall'assenza o dalla mutazione delle sequenze complementari per l'appaiamento dei primer, 2) dalle variazioni in lunghezza, e 3) dai riarrangiamenti strutturali nella regione bersaglio (Wolfe e Liston, 1998; Wolfe et al., 1998). Tali marcatori sono stati, ad oggi, usati soprattutto in specie vegetali (Wolfe e Liston, 1998) e solo recentemente sono stati applicati a specie animali (Kostia et al., 2000; Abbot 2001; Hassan et al., 2003). Il presente lavoro descrive la prima applicazione di questi marcatori per lo studio della struttura genetica di una specie di invertebrati marini.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Campionamento

Sono stati raccolti 180 individui di *G. gemma*, provenienti da due località degli Stati Uniti: Tom's Cove, isola di Assateague, Virginia (37° 53' 23''N; 75° 20' 12''O) e da North Carrying Place Cove, Lubec, Maine (44° 51' 30''N; 66° 59' 12''O). È stato adottato un disegno di

campionamento simmetrico: per ciascuna località sono stati raccolti individui in tre aree di dieci metri di diametro scelte casualmente e distanti tra loro almeno cento metri (Fig 1). I campioni sono stati fissati e conservati in etanolo assoluto.

2.2. Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto impiegando l'intera parte molle degli individui. È stato utilizzato il QIAGEN[®] DNeasy Tissue kit (QIAGEN Inc., Valencia, California), seguendo le istruzioni del manuale. Il DNA è stato conservato a 4°C nella soluzione tampone AE della QIAGEN[®].

2.3. Analisi del DNA

Per la messa a punto delle tecniche analitiche e per la definizione dei marcatori genetici, è stato utilizzato un set di 18 primer, in parte disegnati dagli autori, in parte scelti dalla letteratura esistente, sintetizzati dalla Proligo Primers & Probes (Proligo France SAS). Il DNA è stato sottoposto ad amplificazione mediante PCR. L'analisi è stata condotta utilizzando i 5 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 (Pharmacia[®]), MgCl₂ 3 mM, dNTP 200 μM (ciascuno) (Roche[®]), primer 0,2 μM, 0,5 unità di Taq DNA polimerasi (Pharmacia[®]), per un volume finale della soluzione pari a 25 μl. Le amplificazioni sono state eseguite mediante un termociclatore MJ PTC-100 (MJ Research) secondo il seguente profilo di amplificazione: 94°C per 3 minuti; 45 cicli da 94°C per 40 secondi, 55°C (per i primer UBC 809, UBC 811, UBC 827) o 50°C (SAS1 e SAS3) per 45 secondi, 72°C per 100 secondi; 72°C per 5 minuti. Per ciascun primer l'amplificazione è stata

eseguita in doppio, al fine di verificare la riproducibilità dei risultati.

Tabella 1. Sequenza dei primer, numero di bande polimorfiche, peso molecolare

Primer	Sequenza 5'-3'	N° di bande polimorfiche	Intervallo di peso molecolare (bp)
UBC 809	(AG) ₈ G	14	100-3000
UBC 811	(GA) ₈ C	15	100-2700
UBC 827	(AC) ₈ G	13	200-2600
SAS 1	(GTG) ₄ GC	11	200-2600
SAS 3	(GAG) ₄ GC	14	100-3000

2.4. Elettroforesi del DNA

I prodotti dell'amplificazione sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio (1.5%) per due ore a 60 volt (4 V/cm), immerso in tampone TAE 1X (TRIS-Acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). 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.

2.5. Analisi statistiche

Gli ISSR sono ereditati con modalità mendeliana e vengono interpretati come marcatori diallelici dominanti (Gupta et al., 1994). La presenza di banda è indicato con 1 e rappresenta il genotipo con l'allele dominante (omozigote dominante o eterozigote), viceversa l'assenza di banda (0) rappresenta il genotipo omozigote dell'allele recessivo. L'eterozigosità (H) e il coefficiente di divergenza genetica (θ) di Weir e Cockerham (1984) sono stati calcolati mediante il software TFGA (Miller, 1997). La matrice di dissimilarità genetica, ottenuta calcolando il valore complementare a 1 dell'indice di similarità genetica di Rogers e Tanimoto (1960), è stata

utilizzata per costruire un albero con il metodo UPGMA. A tale scopo è stato impiegato il software PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1995). I software AMOVA-PREP 1.01 (Miller, 1998) e WINAMOVA 1.55 (Excoffier, 1992) sono stati utilizzati per l'analisi della varianza molecolare (AMOVA). Le analisi statistiche sono state eseguite assumendo equilibrio di Hardy-Weinberg nelle popolazioni e utilizzando il metodo di Lynch e Milligan (1994) per i marcatori dominanti.

3. RISULTATI

Nel presente studio sono stati utilizzati i cinque primer che hanno dato i migliori risultati in termini di risoluzione e riproducibilità delle bande. Sono state individuate in totale 67 bande, di cui 53 comuni ai campioni del Maine e della Virginia. Limitatamente ai campioni della Virginia, sono state rilevate 62 bande, di cui 9 presenti esclusivamente negli individui di questa località; mentre per i campioni del Maine il numero totale di bande era di 58, di cui 5 esclusive. Per ciascun primer il numero di bande risolte è compreso fra 11 e 15, con dimensioni dei frammenti che variano tra le 100 e le 3000 paia di basi. Da rilevare che nessun individuo condivide lo stesso genotipo.

I valori di eterozigosità attesa, calcolati assumendo equilibrio di Hardy-Weinberg nelle popolazioni, sono i seguenti: $H=0,80 \pm 0,019$ per il campione proveniente da Tom's Cove (isola di Assateague, Virginia) e $H=0,166 \pm 0,180$ per North Carrying Place Cove (Maine). All'interno delle patch l'eterozigosità varia leggermente, essendo compresa fra $H=0,161 \pm 0,012$ e $H=0,141 \pm 0,022$ nei campioni della Virginia e fra $H=0,153 \pm 0,021$ e $H=0,139 \pm 0,022$ in quelli del Maine. L'analisi della varianza molecolare (AMOVA), metodo statistico che consente di ripartire la varianza genetica su più livelli gerarchici, ha indicato che la maggior parte della varianza (61,0%) è dovuta a differenze all'interno delle patch e una porzione consistente (36,7%) è da attribuirsi alle differenze fra le patch. Le differenze tra le località sono responsabili di una proporzione più piccola (2,3%), sebbene significativa ($P=0,196$), della varianza totale (Tab. 2).

Tabella 2. Analisi della varianza molecolare (AMOVA). I valori di probabilità, calcolati con un test di permutazione (10000 repliche), rappresentano la probabilità di ottenere per caso una varianza più estrema rispetto ai valori osservati (Excoffier et al., 1992).

Sorgente di variazione	<i>g.l.</i>	<i>MS</i>	Componente della varianza	Percentuale di varianza	Φ -statistica	<i>P</i>
Tra località	1	132,217	0,2209877	2,29	$\Phi_{CT} = 0,023$	0,1958
Tra patch entro località	4	112,328	3,5477395	36,71	$\Phi_{SC} = 0,376$	<0,0001
Entro patch	174	5,896	5,8955939	61,00	$\Phi_{ST} = 0,390$	<0,0001

All'interno di ciascuna località è stata rilevata elevata eterogeneità genetica (Tab. 3), mentre non risulta significativa la divergenza genetica rilevata tra le due località (Tab. 3).

Tabella 3. divergenza genetica nei campioni di *G. gemma*. Il coefficiente θ di Weir e Cockerham (1984) è stato calcolato tra patch entro località e tra le località. I valori di probabilità sono stati ottenuti mediante test di permutazione con 10000 repliche.

	Divergenza genetica $\pm ES$	P
Virginia	$\theta=0,302 \pm 0,016$	$P<0,001$
Maine	$\theta=0,238 \pm 0,051$	$P<0,001$
Tra località	$\theta=0,087 \pm 0,016$	$P<0,001$

In accordo ai risultati dell'AMOVA, l'analisi UPGMA evidenzia una buona separazione tra le patch, mentre non risulta evidente un differenziamento tra le popolazioni della Virginia e del Maine (Fig. 2).

4. DISCUSSIONE

L'estrema variabilità dei marcatori ISSR in *G. gemma*, ha permesso di rilevare stime di variabilità genetica (eterozigosità) che non differiscono sostanzialmente tra i campioni analizzati alle diverse scale spaziali. È da rilevare che i valori assoluti delle eterozigosità, calcolati assumendo equilibrio di Hardy-Weinberg, hanno scarsa attendibilità, in quanto nei bivalvi tale condizione non è quasi mai soddisfatta, a causa del deficit di individui eterozigoti (Zouros e Foltz, 1984); le eterozigosità rivestono comunque notevole importanza in termini comparativi.

Il risultato più importante che emerge dal presente lavoro riguarda il differenziamento genetico rilevato a piccola scala spaziale. Notevole diversità genetica è stata, infatti, rilevata sia tra i singoli individui sia tra patch all'interno delle località. Si ritiene che la scarsa e non significativa diversità genetica rilevata tra le località sia legata all'ipervariabilità del marcatore utilizzato. La variabilità osservata ai livelli inferiori potrebbe, infatti, nascondere la divergenza ai livelli superiori. L'uso di un marcatore genetico meno sensibile alle piccole scale spaziali potrà chiarire quest'aspetto.

I risultati del presente lavoro confermano le ipotesi sulle ridotte capacità dispersive della specie. Le differenze tra le patch possono essere interpretate,

infatti, in termini di strutturazione di *G. gemma* in mosaici di gruppi familiari. Un ruolo importante viene però giocato dalla dispersione passiva, che consente lo spostamento di individui con genotipi diversi tra patch di gruppi familiari, incrementando l'eterogeneità genetica a piccola scala. Altri fattori responsabili dell'eterogeneità genetica possono essere le variazioni nel tempo dell'abbondanza di individui. A questo proposito è interessante notare che gli individui di *G. gemma* tendono a migrare, per dispersione passiva, da aree ad alta densità ad aree a bassa densità (Commito et al. 1995). Non abbiamo dati riguardanti campioni temporali, ma, molto verosimilmente, i modelli di eterogeneità così determinati sono effimeri. Ogni patch genetica verrà a scomparire o a modificarsi sostanzialmente con la morte delle coorti più vecchie, mentre quelle più giovani andranno a costituire nuove patch di genotipi. Questo tipo di scenario è stato definito "patchiness genetica caotica" (Johnson e Black, 1982). Inoltre vari altri fattori possono entrare in gioco nel determinare eterogeneità dei genotipi a piccola scala. Per esempio, Weinberg (1985) ha dimostrato che in condizioni di sovraffollamento le popolazioni di *G. gemma* sono soggette a frequenti crolli, dovuti a ridotti tassi di sviluppo e fecondità. Altri processi che non sono esclusivi l'un l'altro e che possono determinare differenze genetiche a piccola scala sono 1) l'azione differenziale della selezione naturale a livello di microhabitat; 2) cambiamenti nella "sorgente di genotipi", cioè cambiamenti nei gruppi di individui che forniscono genotipi ad una determinata patch; infine, 3) non è da escludere neppure la presenza di mortalità selettiva.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro riporta la prima applicazione dei marcatori ISSR su un invertebrato marino. L'ipervariabilità di questi marcatori ha permesso di distinguere differenze a livello individuale in *G. gemma*, la cui strutturazione genetica a piccola scala consiste principalmente in un mosaico di gruppi familiari con l'ingresso di alcuni individui che si spostano passivamente nel sedimento sospeso dall'azione idrodinamica. Il presente lavoro mostra l'importanza dell'uso di marcatori genetici appropriati per la scala spaziale considerata.

Per verificare le nuove ipotesi emerse con i risultati del presente lavoro, si rendono tuttavia necessarie ulteriori indagini che includano un maggior numero di popolazioni e che integrino i dati ottenuti mediante l'uso di diverse classi di marcatori genetici.

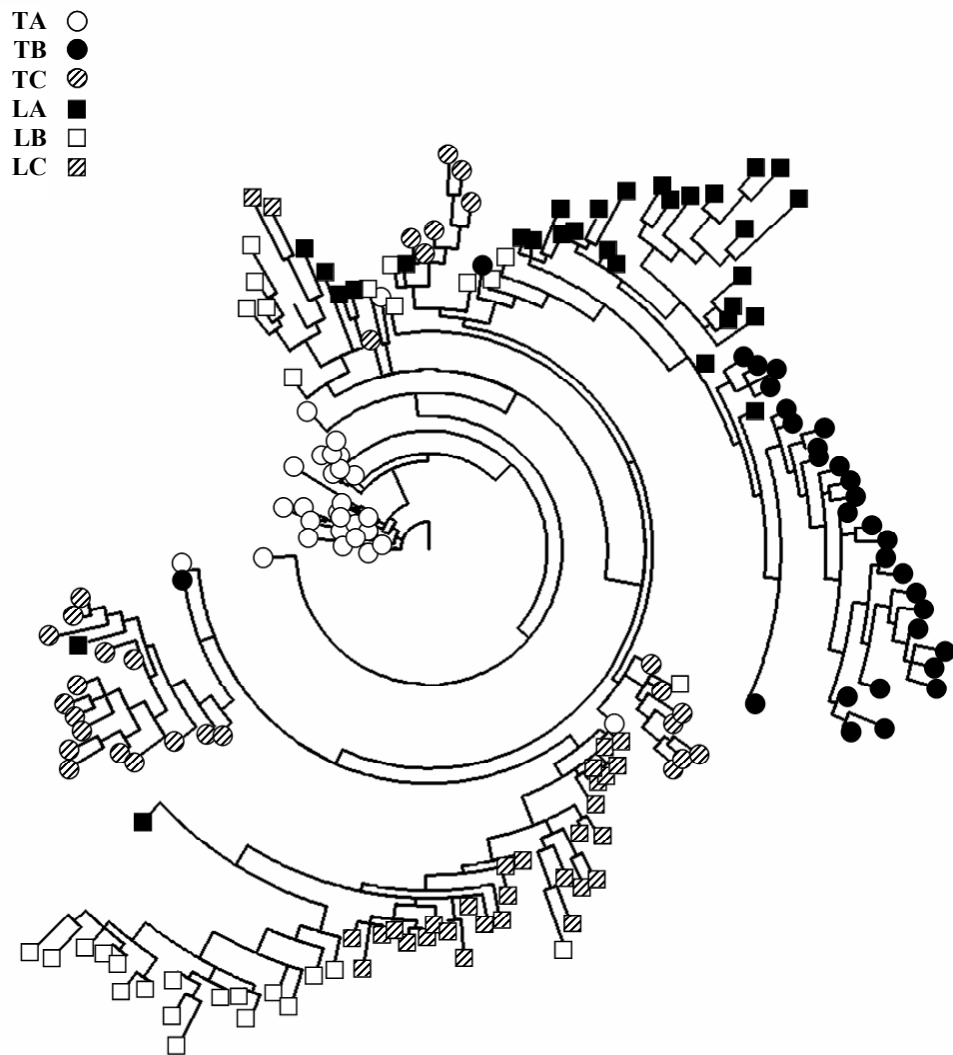


Figura 2. Dendrogramma UPGMA basato sulla matrice dei valori 1-similarità di Rogers e Tanimoto (1960). TA, TB e TC: Tom's Cove (Virginia), rispettivamente patch A, B e C; LA, LB e LC: North Carrying Place Cove (Maine), rispettivamente patch A, B e C.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbot, P., Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*, 1.8. Available online at <http://www.insectscience.org/1.8>, 2001.
- Botton, M.L., Spatial distribution of three species of bivalves on an intertidal flat: the integration of life history strategy with predation and disturbance. *Veliger* 26: 282-287, 1984.
- Bradley, W.H., e P. Cooke, Living and ancient populations of the clam *Gemma gemma* in a Maine coast tidal flat. *Fishery Bulletin* 137: 305-334, 1959.
- Commuto, J.A., C.A. Currier, L.R. Kane, K.A. Reinsel, e I.M. Ulm, Dispersal dynamics of the bivalve *Gemma gemma* in a patchy environment. *Ecological Monographs* 65: 1-20, 1995.
- De Patra, K.D., e L.A. Levin, Evidence of the passive deposition of meiofauna into fiddler crab burrows. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 125: 173-192, 1989.
- Excoffier, L., AMOVA 1.55. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1992.
- Excoffier, L., P.E. Smouse, e J.M. Quattro, Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA

- haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics* 131: 479-491, 1992.
- Fegley, S.R., A comparison of meiofaunal settlement onto the sediment surface and recolonization of defaunated sandy sediment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 123: 97-113, 1988.
- Felsenstein, J., PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1995.
- Gupta, M., Y.S. Chyi, J. Romero-Severson, e J.L. Owen, Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998-1006, 1994.
- Hassan, M., M. Harmelin-Vivien, e F. Bonhomme, Lessepsian invasion without bottleneck: example of two rabbitfish species (*Siganus rivulatus* and *Siganus luridus*) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 291: 219-232, 2003.
- Jackson, J.B.C., Bivalves: spatial and size-frequency distributions of two intertidal species. *Science* 161: 479-480, 1968.
- Johnson, M.S., e R. Black, Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp. *Marine Biology* 70: 157-164, 1982.
- Kostia, S.M. Ruohoen-Letho, R. Vainola, e S.L. Vario, Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the Arctiodactyla and evolution of the Bov-tA SINE. *Heredity* 84: 37-45, 2000.
- Lynch, M., e B.G. Milligan, Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99, 1994.
- MacDonald, K.B., Quantitative studies of salt marsh mollusc faunas from the North American Pacific coast. *Ecological Monographs* 39: 33-60, 1969.
- Miller, M.P., Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and population genetic data. Computer software distributed by the author at <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>, 1997.
- Miller, M.P., 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>, 1998.
- Palmer, M.A., Dispersal of marine meiofauna: a review and conceptual model explaining passive transport and active emergence with implications for recruitment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 48: 81-91, 1988.
- Rogers, D.J., e T.T. Tanimoto, A computer program for classifying plants. *Science* 132: 1115-1118, 1960.
- Schneider, F.I., e K.H. Mann, Rapid recovery of fauna following simulated ice rafting in Nova Scotian seagrass bed. *Marine Ecology Progress Series* 78: 57-70, 1994.
- Sellmer, G.P., Functional morphology and ecological life history of the gem clam, *Gemma gemma*, (Eulamellibranchia: Veneridae). *Malacologia* 5: 137-233, 1967.
- Weinberg, J.R., Factors regulating population dynamics of the marine bivalve *Gemma gemma*: intraspecific competition and salinity. *Marine Biology* 86: 173-182, 1985.
- Weir, B.S., e C.C. Cockerham, Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370, 1984.
- Wolfe, A.D., e A. Liston, Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis D.E., Soltis P.S., Doyle J.J., eds. *Plant molecular systematics II*. New York, Chapman and Hall; 43-86, 1998.
- Wolfe, A.D., Q-Y. Xiang, e S.R. Kephart, Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence markers. *Molecular Ecology* 7: 1107-1125, 1998.
- Zietckiewicz, E., A. Rafalsky, e D. Lauda, Genome fingerprinting by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-83, 1994.
- Zouros E., D.W. Foltz, Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia* 25: 583-591, 1984.