



Standardizzazione di un protocollo sperimentale per la caratterizzazione genetica di campioni di *Corallium rubrum* provenienti dalla AMP di Capo Caccia-Isola Piana mediante marcatori molecolari ISSR

Marco Casu,^{a*} Daniela Casu,^{a,b} Tiziana Lai,^a Piero Cossu,^a Marco Curini-Galletti,^a Gianfranco Russino^c

^a Dipartimento di Zoologia e Genetica Evoluzionistica, Università di Sassari, Via Muroni 25-07100 Sassari, Italia.

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

^c Area Marina Protetta Capo Caccia-Isola Piana, Località. Tramariglio – 07041 Alghero (SS), Italia.

Abstract

Corallium rubrum L 1758 è una specie endemica dei fondali rocciosi del Mediterraneo e delle aree limitrofe dell'Atlantico, dove vive tra i 20 e i 200 m di profondità. Questa specie viene intensivamente pescata nella parte occidentale del Mediterraneo, dove sono presenti gli stock di consistenza maggiore. Lo scopo di questo studio è stato quello di mettere a punto i protocolli sperimentali per la caratterizzazione genetica tramite ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats) di campioni di corallo rosso raccolti nell'AMP di Capo Caccia-Isola Piana (Sardegna Occidentale). Sono stati analizzati campioni appartenenti a 12 colonie provenienti da tre siti, due profondi (entrambi locati a circa 115 m di profondità) e uno superficiale (raccolto intorno ai 24 m). I risultati ottenuti indicano che non vi sono differenze significative tra i genotipi di acque profonde e quelli di acque superficiali ubicate in un raggio di pochi chilometri; si può pertanto ipotizzare che il flusso genico in *C. rubrum* sia efficiente su piccola scala geografica. I risultati devono essere tuttavia suffragati da un più ampio schema di campionamento, per permettere di chiarire con certezza i livelli e la direzionalità del flusso genico, sia tra popolamenti posti a profondità paragonabili, sia tra popolamenti insediati a diverse profondità, soprattutto estendendo le analisi a popolamenti maggiormente distanziati.

Keywords: *Corallium rubrum*; AMP; variabilità genetica; ISSRs.

1. Introduzione

Il corallo rosso, *Corallium rubrum* L 1758, è una specie endemica dei fondali rocciosi del

Mediterraneo e delle aree limitrofe dell'Atlantico, dove vive tra i 20 e i 200 m di profondità (Zibrowius 1984), abitualmente al di sotto del termocline estivo. Questo celenterato viene particolarmente pescato nella parte occidentale del Mediterraneo, dove sono presenti i maggiori stock. La drastica riduzione del

* Marco Casu. Tel.: +39-079-228924; fax: +39-079-228665; e-mail: marcasu@uniss.it.

pescato, con i suoi riflessi negativi sull'artigianato, ha dato nuova spinta agli studi su questa specie, la cui biologia ed ecologia è ancora scarsamente conosciuta, favorendo in questi ultimi anni la ripresa delle attività di ricerca su più fronti (Russo & Cicogna 1996).

Lo scopo principale del presente lavoro è stato quello di mettere a punto i protocolli sperimentali per la caratterizzazione genetica tramite marcatori molecolari ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) (Zietckiewicz *et al.* 1994) di campioni di corallo rosso raccolti nell'Area Marina Protetta Capo Caccia-Isola Piana. La scelta di utilizzare i marcatori della classe degli ISSR è stata indotta dal fatto che essi hanno dimostrato la loro efficacia per il monitoraggio genetico a livello di individui e popolazioni, sia a grande che a piccola scala spaziale, in vari invertebrati marini (Casu *et al.* 2005, 2006; Maltagliati *et al.* 2005), e che rappresentano il compromesso ideale tra facilità, economicità d'uso e capacità di mettere in evidenza polimorfismi (Bornet & Branchard 2001).

2. Materiali e metodi

Sono stati complessivamente analizzati 24 campioni appartenenti a 12 colonie provenienti da tre siti, due profondi (siti A e B) (entrambi locati a circa 115 m di profondità) e uno superficiale (sito C) (raccolto intorno ai 24 m). I siti si trovano nel raggio di circa 30 Km. Il prelievo del materiale biologico (tra 1 e 5 mg) è stato effettuato in laboratorio dai due tipi di tessuto (cenosarco e polipo) prelevato da colonie di corallo naturali raccolte in loco e tenute in vita in acquario. Il cenosarco è stato asportato dalle porzioni apicali di ciascun ramo di diverse colonie utilizzando una lama da bisturi e microscopio da dissezione. Il prelievo dei polipi è stato effettuato tramite un ago da siringa. Una volta escissi, i campioni dei due tessuti sono stati immediatamente fissati in alcol assoluto.

Il DNA genomico è stato estratto impiegando sia porzioni di cenosarco sia alcuni polipi appartenenti ad ogni ramo di ciascuna colonia. È stato utilizzato il QIAGEN DNeasy Tissue kit (QIAGEN Inc., Valencia, California). Il DNA estratto dai due tessuti è stato conservato a 4°C.

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 (Polymerase Chain Reaction). L'analisi è stata condotta utilizzando i nove primer ISSR che hanno fornito i risultati migliori (Tab. 1). Le amplificazioni sono state condotte utilizzando, per ciascuna reazione, 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%) immerso in tampone TAE 1X per 150 minuti a 80 volt (4 V/cm). 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.

Le analisi statistiche (eterozigosità attesa, F-statistica, dendrogramma UPGMA basato sulle distanze genetiche interindividuali) sono state effettuate applicando il metodo bayesiano (Zhivotovsky 1999).

3. Risultati

Il primo risultato evidenziato da questa analisi preliminare è che il cenosarco e i polipi di ciascun individuo non sempre hanno fornito lo stesso numero di bande; tuttavia, le espressioni differenziali rilevate nei gel (bande "accessorie") sono dovute a comuni artefatti dell'amplificazione, e per le analisi statistiche sono state prese in considerazione solo le bande comuni ad entrambe i tessuti. Un altro risultato interessante messo in luce grazie all'ipervariabilità dei marcatori ISSR è l'assenza di individui con lo

stesso genotipo; questo fatto indica che gli individui analizzati provengono con sicurezza da colonie diverse.

Nel presente studio pilota sono state individuate complessivamente 54 bande. Per ciascun primer il numero di bande risolte è compreso fra quattro e nove, con dimensioni dei frammenti che variano tra le 350 e le 2500 paia di basi.

I valori eterozigiosità attesa, calcolati assumendo equilibrio di Hardy-Weinberg nelle popolazioni, sono i seguenti: $H = 0,371 \pm 0,018$ per il campione proveniente dal sito A, $H = 0,374 \pm 0,019$ per il campione del sito B, e $H = 0,317 \pm 0,024$ per il campione proveniente dal sito C. Tali stime indicano un livello di variabilità genetica dei campioni di *C. rubrum* da basso a moderato. Il valore basso e non significativo dell'indice di divergenza genetica, risultato pari a $F_{ST} = 0,008$ suggerisce uno scarso differenziamento genetico tra i campioni analizzati. Anche le distanze genetiche tra coppie di campioni risultano essere particolarmente basse (Tab. 2). L'uniformità dei campioni è ulteriormente confermata dal dendrogramma in Fig. 1 dove non è

Tabella 1

Sequenza dei primer, numero di bande polimorfiche e intervalli di peso molecolare delle bande di ciascun primer (*bp*: base pairs).

Primer	Sequenza (5'-3')	N° di bande polimorfiche	Intervallo di peso molecolare (bp)
SAS1	(GTG) ₄ GC	7	550-1700
SAS3	(GAG) ₄ G	8	350-1700
UBC809	(AG) ₈ G	8	550-1700
UBC811	(GA) ₈ C	7	700-1700
UBC827	(AC) ₈ G	4	750-1800
IT1	(CA) ₈ GT	6	500-1400
IT2	(CA) ₈ AC	5	700-1600
IT3	(GAG) ₄ AG	5	650-2500
PT1	(GT) ₈ C	9	550-2400

possibile individuare raggruppamenti di individui corrispondenti ai tre siti di campionamento.

Tabella 2

Distanze genetiche di Nei (1978) calcolate tra coppie di campioni.

	Sito A	Sito B	Sito C
Sito A	***		
Sito B	< 0,001	***	
Sito C	= 0,023	< 0,001	***

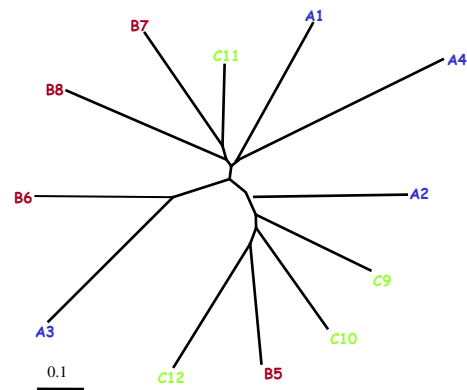


Fig. 1. Dendrogramma UPGMA delle distanze genetiche interindividuali.

4. Conclusioni

L'analisi genetica delle popolazioni di *C. rubrum* effettuata tramite i marcatori molecolari ISSR ha evidenziato che non vi sono differenze significative tra i genotipi di acque profonde e quelli di acque superficiali ubicate in un raggio di decine di chilometri; si può pertanto ipotizzare che il flusso genico nel *C. rubrum* sia efficiente almeno su piccola scala geografica. Tale risultato è in relazione al fatto che, le larve del *C. rubrum* (planule), relativamente grandi e pesanti, tendono ad insediarsi preferibilmente in prossimità o al limite a pochi chilometri di distanza dalle colonie adulte che le hanno prodotte (Weinberg 1978).

È evidente che per valutare i livelli di scambio genico a un raggio più ampio è necessario analizzare più campioni separati da distanze superiori a 50 Km. Di fatto, studi di genetica di popolazione basati sull'analisi degli alloenzimi hanno permesso di identificare differenze significative nelle frequenze alleliche tra popolamenti che vivono a distanze di un centinaio di chilometri tra loro, sia sulle coste italiane del Mar Tirreno che su quelle francesi del Mar Ligure (Abbiati *et al.* 1993, 1999); tali popolazioni sono dunque risultate geneticamente differenziate.

I risultati da noi ottenuti devono essere tuttavia suffragati da un più ampio schema di

campionamento, per permettere di chiarire con certezza i livelli e l'eventuale direzionalità del flusso genico sia tra popolamenti posti a profondità paragonabili, sia tra popolamenti insediati a diverse profondità, soprattutto estendendo le analisi a popolamenti maggiormente distanziati, tra i quali i livelli di flusso genico potrebbero non essere più sufficienti a garantire l'uniformità genetica delle popolazioni.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare lo staff tecnico dell'AMP di Capo Caccia-Isola Piana per la preziosa collaborazione.

Bibliografia

- Bornet, B. & Branchard, M. (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular Biology Reporter*, **19**, 209-215.
- Abbiati, M., Santangelo, G. & Novelli, S. (1993) Genetic variation within and between two Tyrrhenian populations of the Mediterranean alcyonarian *Corallium rubrum*. *Marine Ecology Progress Series*, **95**, 245-250.
- Abbiati, M., Novelli, S., Harmelin, J.G. & Santangelo, G. (1999) Red Coral and other Mediterranean octocorals, biology and protection. (eds F. Cicogna and R. Cattaneo-Vietti). Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali, Roma.
- Casu, M., Maltagliati, F., Cossu, P., Lai, T., Curini-Galletti, M., Castelli, A. & Comito, J.A. (2005) Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, **325**, 46-54.
- Casu, M., Casu, D., Lai, T., Cossu, P. & Curini-Galletti, M. (2006) Inter Simple Sequence Repeat markers revealed strong genetic differentiation among populations of the endangered mollusc *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae) from two Sardinian Marine Protected Areas. *Marine Biology*, **149**, 1163-1174.
- Maltagliati, F., Casu, M., Lai, T., Iraci Sareri, D., Casu, D., Curini-Galletti, M., Cantone, G. & Castelli, A. (2005) Evidence for the taxonomic distinction of *Ophelia barquii* and *O. bicornis* (Annelida, Polychaeta) in the Mediterranean as revealed by ISSR markers and the number of nephridiopores. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **85**, 835-841.
- Russo, G.F. & Cicogna, F. (1996) Il corallo rosso. *Le Scienze*, **335**, 66-73.
- Weinberg, S. (1978) Mediterranean octocorallian communities and the abiotic environment. *Marine Biology* **49**, 41-57.
- Zhivotovsky, L.A. (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, **8**, 907-913.
- Zibrowius, H., Montero, M. & Grashoff, M. (1984). La repartition du *Corallium rubrum* dans l'Atlantique. *Thetis*, **11**, 163-170.
- Zietckiewicz, E., Rafalsky, A. & Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**, 176-183.