



XIV Congresso della Società Italiana di Ecologia (4-6 Ottobre 2004, Siena)

14<sup>th</sup> Meeting of the Italian Society of Ecology

## Analisi della struttura genetica di *Hediste diversicolor* (Polychaeta, Nereididae) nel Mediterraneo occidentale mediante marcatori ISSR

Piero Cossu<sup>a</sup>, Marco Casu<sup>a</sup>, Marco Curini Galletti<sup>a</sup>, Tiziana Lai<sup>a</sup>, Ferruccio  
Maltagliati<sup>b\*</sup>, Alberto Castelli<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Zoologia e Antropologia Biologica, Università di Sassari Via R. Muroli 25- 07100 Sassari, Italia

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

### Riassunto

La struttura genetica del polichete *Hediste diversicolor* del Mediterraneo occidentale è stata studiata utilizzando come marcatori genetici gli ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Sono stati raccolti 30 individui in ciascuna delle seguenti località: Stagno di Calich (Sardegna N-O), Baia di Figari (Corsica S-O), Migliacciaru (Corsica E), Fiume Morto (Toscana N-O) e Coltano (Toscana N-O). L'MDS applicato alla matrice delle distanze genetiche individuali ha mostrato elevata diversità tra gli individui, ma non ha messo in evidenza alcuna sottostrutturazione genetica. Il primo segnale della divergenza genetica tra le popolazioni è dato dal fatto che il 37% del numero totale di bande rilevato è costituito da bande private, cioè esclusive di una popolazione. La varianza genetica, analizzata mediante AMOVA, è risultata equamente ripartita nelle componenti intra- e inter-popolazione (rispettivamente 46.9% e 53.1%). La  $\Phi$ -statistica ha evidenziato la divergenza genetica tra le popolazioni ( $\Phi_{ST} = 0.469$ ,  $p < 0.001$ ). La notevole divergenza genetica tra le popolazioni di *H. diversicolor* è determinata in primo luogo dalla frammentazione naturale dell'habitat che produce isolamento con virtuale assenza di flusso genico tra le popolazioni, avendo la specie un limitato potenziale per la dispersione. © 2004 SItE. All rights reserved

*Parole chiave:* *Hediste diversicolor*, variabilità genetica, DNA, ISSR, AMOVA, potenziale dispersivo, differenziazione tra popolazioni

### 1. Introduzione

Gli ambienti salmastri sono sistemi discontinui, separati sia da barriere fisiche che da confini ecofisiologici (Cognetti e Maltagliati, 2000). La frammentazione e l'isolamento di questi habitat determinano la strutturazione genetica delle specie, aumentando gli effetti di processi microevolutivi

quali flusso genico, deriva genetica e selezione naturale (Cognetti e Maltagliati, 2000; Bilton, 2002).

Nel presente lavoro è stata analizzata la struttura genetica del polichete *Hediste diversicolor* (O. F. Müller, 1776), (Nereididae), specie che presenta un'ampia distribuzione geografica, essendo diffusa lungo le coste atlantiche del Nord America e dell'Europa, del Mare del Nord, del Mar Baltico, del Mediterraneo e del Mar Nero (Chambers & Garwood, 1992). La specie, che è tipica degli habitat salmastri, è gonocorica, semelpara con un ciclo biologico che

\* Autore per la corrispondenza. Tel: +39-050-2219006; Fax: +39-050-49694; e-mail: [maltagli@discat.unipi.it](mailto:maltagli@discat.unipi.it).

può durare da uno a tre anni; è caratterizzata da un'ampia tolleranza ecologica, può infatti sopportare variazioni estreme di salinità, di temperatura e di concentrazione dell'ossigeno disciolto (Scaps, 2002). Le capacità dispersive della specie sono limitate dalla scarsa mobilità degli adulti e dall'assenza di stadi larvali pelagici. Le uova sono fecondate all'interno della galleria materna; inoltre uova, larve e postlarve sono incubate all'interno di questa fino alla morte della femmina (Scaps, 2002). Le postlarve ad habitus bentonico, appena emerse dalla galleria materna, iniziano la ricerca del territorio dove scavare la propria galleria (Marty e Retiere, 1999). Dato il suo ridotto potenziale per la dispersione che favorisce la diversità genetica, *H. diversicolor* rappresenta un utile modello per lo studio della variabilità genetica intra- e inter-popolazione e dei fattori che possono agire su di essa.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare la diversità genetica della specie nel Mediterraneo occidentale valutando la differenziazione genetica tra le popolazioni investigate. È stata valutata inoltre la presenza di sottostrutturazione genetica all'interno delle singole popolazioni. Per analizzare la variabilità genetica sono stati utilizzati i marcatori molecolari ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats). La tecnica consiste nell'amplificazione di regioni genomiche comprese tra sequenze di DNA microsatellite ripetute e invertite (Zietckiewicz et al., 1994).

## 2. Materiali e metodi

I campioni di *H. diversicolor* utilizzati nel presente lavoro sono stati raccolti nei seguenti biotopi salmastri mediterranei nell'estate del 2002: 1) Fiume Morto (FMO, Toscana nord-occidentale: 43°44'N, 10°16'E), 2) Coltano (COL, Toscana nord-occidentale: 43°40'N, 10°22'E), 3) Migliacciaru (MIG, Corsica orientale: 42°0'N, 9°22'E), 4) baia di Figari (FIG, Corsica sud-occidentale: 41°29'N, 9°04'E), e 5) stagno di Calich (CAL, Sardegna nord-occidentale: 40°35'N, 8°17'E) (Fig 1).



Figura 1. Localizzazione dei siti di campionamento.

Il DNA genomico è stato estratto dai parapodi degli individui conservati in etanolo assoluto a 4 °C utilizzando il *QIAGEN<sup>®</sup> DNeasy Tissue kit* (*QIAGEN Inc.*, Valencia, California). Le amplificazioni sono state condotte seguendo questo protocollo: per ciascuna reazione sono stati utilizzati circa 3 µl di DNA genomico, 2.5 µl tampone di reazione 1x, MgCl<sub>2</sub> 2.5 µl, dNTP 2 µl, primer 1 µl e 0.1 µl 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 profili elettroforetici ottenuti su gel di agarosio al 2% sono stati analizzati in termini di presenza/assenza di bande; i primer ISSR che hanno determinato tali profili sono elencati nella Tabella 1.

Tabella 1. Sigle e sequenze dei primer, 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)
UBC 809	(Ag) <sub>8</sub> g	16	600 - 1050
UBC 811	(gA) <sub>8</sub> C	16	<800 -2642
UBC 827	(AC) <sub>8</sub> g	22	500 ->2642
SAS 1	(gTg) <sub>4</sub> gC	6	>200 - 800
SAS 3	(gAg) <sub>4</sub> gC	8	700 - 1500

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando i programmi AMOVAPREP (Miller, 1998) e WINAMOVA 1.55 (Excoffier et al., 1992).

Le relazioni gerarchiche sono state stimate per mezzo dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA). Sono state prese in considerazione le seguenti componenti della variabilità genetica totale: 1) fra popolazioni e 3) all'interno delle popolazioni. Per tale analisi sono stati utilizzati i programmi. I livelli di significatività sono stati calcolati utilizzando un test di permutazione; una distribuzione nulla è stata ottenuta assegnando ciascun individuo a popolazioni scelte a caso e la varianza delle componenti è stata stimata attraverso 10000 permutazioni. In tal modo è eliminata l'assunzione normalmente necessaria per l'analisi della varianza, ma che è inappropriata per i dati molecolari (Excoffier et al., 1992).

L'ipotesi di sottostrutturazione genetica delle popolazioni è stata valutata mediante multi-

dimensional scaling non-metrico (MDS) usando il programma STATISTICA 5.1 (StatSoft, 1997). I coefficienti di relazione (*relatedness*) tra ciascuna coppia di individui sono stati calcolati applicando il metodo descritto da Lynch e Milligan (1994). Il complementare a 1 del coefficiente di relazione è stato utilizzato nell'analisi MDS.

### 3. Risultati e discussione

I risultati del presente lavoro condotto con marcatori genetici ipervariabili come gli ISSR sono in accordo con quelli ottenuti da Grant et al. (1989), Hateley et al. (1992), Abbiati e Maltagliati (1996), Breton et al. (2003) e Virgilio e Abbiati (2004) che hanno messo in evidenza un differenziamento genetico significativo fra le popolazioni, a fronte di una bassa variabilità genetica all'interno di esse.

Nel presente lavoro il primo segnale che indica la presenza di differenziamento genetico tra le popolazioni è stato dato dall'elevata percentuale di bande private, cioè esclusive di una popolazione, rispetto a quelle totali (37%). L'analisi della varianza molecolare (AMOVA) ha evidenziato che la variabilità osservata è equamente ripartita nelle componenti intra-popolazione e inter-popolazione (rispettivamente 53% e 47%) (Tab. 2). Inoltre, La marcata divergenza genetica tra le popolazioni è stata evidenziata dal valore dell'indice di divergenza molecolare  $\Phi_{ST}$ , che è risultato altamente significativo al test di permutazione con 10000 repliche (Tab. 2).

Tabella 2. Risultati dell'analisi della varianza molecolare (AMOVA). La significatività dell'indice di differenziamento molecolare ( $\Phi_{ST}$ ) è stata calcolata mediante test di permutazione con 10000 repliche.

Sorgente di variazione	g.l.	MS	Componente della varianza	Percentuale di varianza	$\Phi$ -statistica	P
Tra le popolazioni	4	120.75	3.9031814	46.92	$\Phi_{ST} = 0.469$	<0.0001
All'interno delle popolazioni	144	4.416	4.4158126	53.08		

Una simile strutturazione genetica di *H. diversicolor*, riscontrata in altri studi su questa specie ed in altri nereididi quali *Neanthes succinea* (Abbiati e Maltagliati, 1992) e *Hediste japonica* (Sato e Masuda, 1997) è generalmente spiegata con il

limitato potenziale per la dispersione di queste specie. Inoltre, la marcata strutturazione genetica in popolazioni di *H. diversicolor* è stata messa in relazione ai differenti regimi di selezione in regimi ambientali differenti (Abbiati e Maltagliati, 1996).

Infatti è stato ipotizzato che in habitat discontinui forze microevolutive quali la deriva genetica o pressioni selettive locali possono favorire il differenziamento genetico fra le popolazioni su diverse scale spaziali (Cognetti e Maltagliati 2000; Bilton et al., 2002; Mariani et al., 2002).

Per alcune specie salmastre è stata riscontrata elevata strutturazione genetica nelle popolazioni all'interno dello stesso biotopo e tra biotopi adiacenti; questa può essere la conseguenza della deriva genetica, dell'inincrocio, o della selezione (Bilton et al., 2002). In *H. diversicolor* alcuni autori hanno riportato l'esistenza di tipi genetici presenti in parapatria o simpatria (Röhner et al., 1997), oppure la strutturazione genetica in sottopopolazioni dovuta alla selezione di determinati genotipi a causa dalla presenza di un forte gradiente di inquinamento, (Virgilio et al., 2003). Nel presente lavoro l'MDS (multidimensional scaling), condotto sulla base delle matrici delle distanze genetiche individuali (calcolate utilizzando il valore complementare a 1 del coefficiente di relazione genetica), non ha evidenziato la presenza di sottostrutturazione genetica nelle popolazioni (Fig. 2). Da rilevare che i relativamente elevati valori degli indici di stress

rendono questa analisi puramente indicativa. Questo risultato è in accordo con l'ipotesi che *H. diversicolor* è in grado di disperdersi all'interno dei singoli biotopi (Hateley et al., 1992).

#### 4. Conclusioni

I marcatori ISSR, utilizzati per la prima volta in *H. diversicolor* si sono rivelati uno strumento veloce, pratico e affidabile per l'analisi della diversità genetica in questa specie.

L'elevato differenziamento genetico riscontrato tra le popolazioni di *H. diversicolor* utilizzate in questo studio può essere la conseguenza dell'azione di due fattori principali: 1) la frammentazione naturale dell'habitat e 2) il ridotto potenziale dispersivo della specie. Entrambi contribuiscono a limitare fortemente o, addirittura, ad annullare il flusso genico tra le popolazioni, favorendo così differenziazione per deriva genetica. Le popolazioni analizzate nel presente studio non appaiono geneticamente strutturate al loro interno, probabilmente per l'assenza di forti gradienti di stress ambientale.

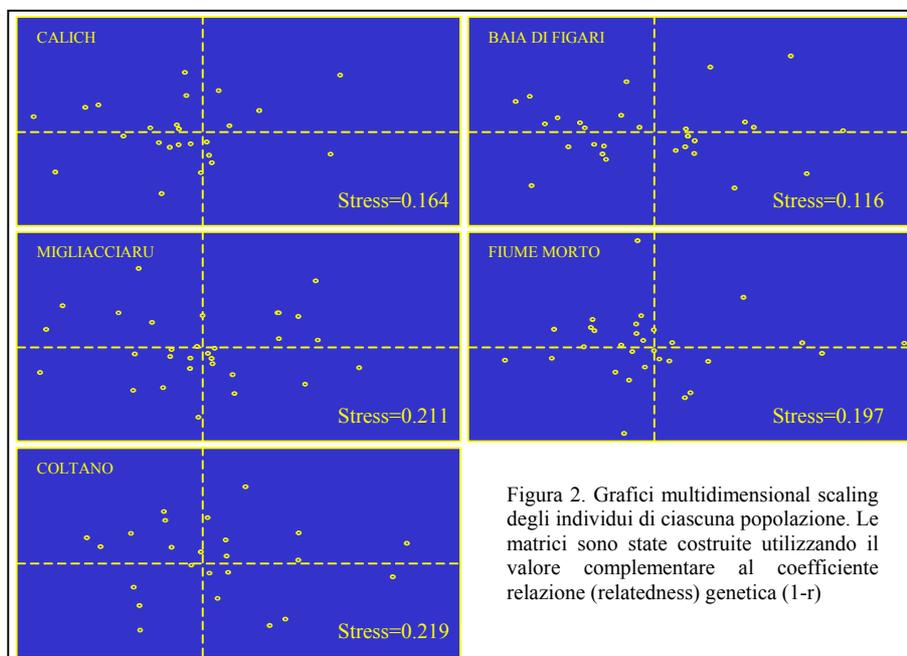


Figura 2. Grafici multidimensional scaling degli individui di ciascuna popolazione. Le matrici sono state costruite utilizzando il valore complementare al coefficiente relazione (relatedness) genetica (1-r)

## 5. Bibliografia.

- Abbiati, M. & Maltagliati, F. (1992). Genetic population structure of *Neanthes succinea* (Polychaeta: Nereididae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **72**, 511–517.
- Abbiati, M. & Maltagliati, F. (1996). Allozyme evidence of genetic differentiation between populations of *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) from the Western Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **76**, 637–647.
- Bilton, D.T., Paula, J. & Bishop, J.D.D. (2002) Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **55**, 937–952.
- Breton, S., Dufresne, F., Desrosiers, G. & Blier, P.U. (2003). Population structure of two northern hemisphere polychaetes, *Neanthes virens* and *Hediste diversicolor* (Nereididae), with different life-history traits. *Marine Biology*, **142**, 707–715.
- Chambers, S.J. & Garwood, P.R. (1992) *Polychaetes from Scottish waters. A guide to identification. Part 3. Family Nereididae*. National Museum of Scotland: Edinburgh.
- Cognetti, G. & Maltagliati, F. (2000) Biodiversity and adaptive mechanisms in brackish water fauna. *Marine Pollution Bulletin*, **40**, 7–14.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Grant, A., Hateley, J.G. & Jones, N.V. (1989) Mapping the ecological impact of heavy metals on the estuarine polychete *Nereis diversicolor* using inherited metal tolerance. *Marine Pollution Bulletin*, **20**, 235–236.
- Hateley, J.G., Grant, A., Taylor, S.M. & Jones, N.V. (1992) Morphological and other evidence on the degree of genetic differentiation between population of *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **72**, 365–381.
- Lynch, M. & Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**, 91–99.
- Mariani, S., Ketmaier, V. & De Matthaeis, E. (2002). Genetic structuring and gene flow in *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae): evidence from allozyme variation at different geographic scales. *Marine Biology*, **140**, 687–697.
- Marty, R. & Retière, C. (1999). Larval-to-juvenile mobility activities of a holobenthic species *Nereis diversicolor* (O.F. Muller) (Polychaeta: Nereidae) – their involvement in recruitment. *Bulletin of Marine Science*, **65**, 761–773.
- Miller, M.P. (1998). 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>.
- Röhner, M., Bastrop, R. & Jürss, K. (1997) Genetic differentiation in *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) for the North Sea and the Baltic Sea. *Marine Biology*, **130**, 171–180.
- Sato, M. & Masuda, Y. (1997) Genetic differentiation in two sibling species of the brackish-water polychaete *Hediste japonica* complex (Nereididae). *Marine Biology*, **130**, 163–170.
- Scaps, P. (2002). A review of the biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor* (O.F. Muller) (Annelida: Polychaeta). *Hydrobiologia* **470**, 203–218.
- StatSoft, Inc. (1997) *STATISTICA for Windows* (Computer program manual). Tulsa, OK. Web site <http://www.statsoft.com>.
- Virgilio, M. & Abbiati, M. (2004) Habitat discontinuity and genetic structure in populations of the estuarine species *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **61**, 361–367.
- Virgilio, M., Barboncini, N., Trombini, C. & Abbiati, M. (2003) Relationships between sediments and tissue contamination and allozymic patterns in *Hediste diversicolor* (Polychaeta Nereididae) in the Pialassa lagoons (north Adriatic Sea). *Oceanologica Acta*, **26**, 85–92.
- Zietckiewicz, E., Rafalsky, A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**, 176–83.