

USO DI MARCATORI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLA VARIAZIONE GENETICA DI *MELICERTUS KERATHURUS* (CRUSTACEA, DECAPODA)

Marco Arculeo¹, Rosalia Pellerito¹, Sabrina Lo Brutto¹, Francois Bonhomme²

¹ Dipartimento di Biologia Animale "G. Reverberi", Università di Palermo, Via Archirafi, 18, 90123 Palermo, Italy

² Institut des Sciences de l'Evolution, CNRS UMR5554, Université de Montpellier II, Station méditerranéenne de l'Environnement littoral, 1 quai de la Daurade, Sète 34200, France

Key-words *Melicertus Kerathurus*, variazione genetica, mtDNA, microsatellite, Mar Mediterraneo, Oceano Atlantico

Riassunto

La diversità genetica di *Melicertus kerathurus* è stata studiata attraverso il polimorfismo stimato in 494 paia di basi del gene mitocondriale citocromo ossidasi I (COI) e in quattro loci microsatelliti. Sono state analizzate 11 popolazioni campionate da nove siti mediterranei e due dall'Oceano Atlantico. Una chiara differenziazione tra i campioni è stata evidenziata con entrambi i marcatori indicando che questi rappresentano un valido strumento per lo studio della variazione genetica di questa specie. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che in Mediterraneo sia avvenuta una recente espansione a seguito di una ricolonizzazione post glaciale da rifugio Atlantico.

Summary

The genetic variation of *Melicertus kerathurus* was studied using the polymorphism detected in a 494 bp DNA segment of the mitochondrial COI gene and in 4 microsatellites loci. We analysed 11 sample sites, nine from the Mediterranean Sea and two from the Atlantic Ocean. A clear differentiation among sample sites was found indicating that both molecular markers are useful for the study of the genetic variation of this important fishery resources. Moreover, after a recent expansion, a postglacial recolonisation of the Mediterranean from an Atlantic refuge could be hypothesised.

Introduzione

Melicertus kerathurus è una delle più importanti risorse di pesca per le marinerie mediterranee che si dedicano alla cattura di crostacei. È una specie bentonica a distribuzione Atlanto-Mediterranea, vive principalmente su substrati sabbio-fangosi da pochi metri di profondità fino ad un massimo di 90. Il ciclo vitale di questa specie è caratterizzato da una fase larvale che si effettua lontano dalle coste ed una fase post larvale e giovanile che si svolge in prossimità delle coste o di estuari con bassa salinità ed elevata produttività. Dato l'elevato valore economico, durante gli anni settanta, *M. kerathurus* è stato oggetto di numerose ricerche nel campo dell'acquacoltura (Lumare 1976). Purtroppo la scarsa resistenza alle condizioni di allevamento e la presenza di specie esotiche molto più resistenti e con migliori performance di crescita come i generi *Marsupenaeus* e *Metapenaeus* hanno ridotto l'interesse per questa specie.

Negli ultimi anni alcuni studi sono stati condotti per approfondire aspetti riguardanti la biologia, l'ecologia e il grado di sfruttamento in alcune aree della Sicilia e del Salento (Vitale *et al.* 2010). Recentemente, sono stati effettuati studi genetici al fine di valutare se questa specie, all'interno del suo areale, sia rappresentata da una o più unità gestionali (Pellerito *et al.*, 2009; Arculeo *et al.* 2009). In un primo momento, studi condotti con allozimi e su un numero limitato di campioni avevano evidenziato una bassa variazione genica e una mancanza di strutturazione (Mattoccia *et al.* 1987). Successivamente Zitari-Chatti *et al.* (2008; 2009) utilizzando due geni mitocondriali (COI e 16S) hanno evidenziato un ridotto flusso genico attraverso lo Stretto Siculo-Tunisino ipotizzando la presenza di almeno due stock geneticamente isolati nei due bacini, occidentale e orientale, del Mar Mediterraneo. Da questi risultati è emersa la necessità di studiare un campione più ampio per meglio comprendere il livello di strutturazione genetica di questa specie all'interno e all'esterno del Mediterraneo.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di raccogliere dati sulla variazione genica di *M. kerathurus* al fine di verificare se questa specie all'interno del suo areale sia rappresentata da più unità popolazionali e se tale strutturazione possa avere implicazioni di tipo gestionale nel campo della pesca e dell'acquacoltura.

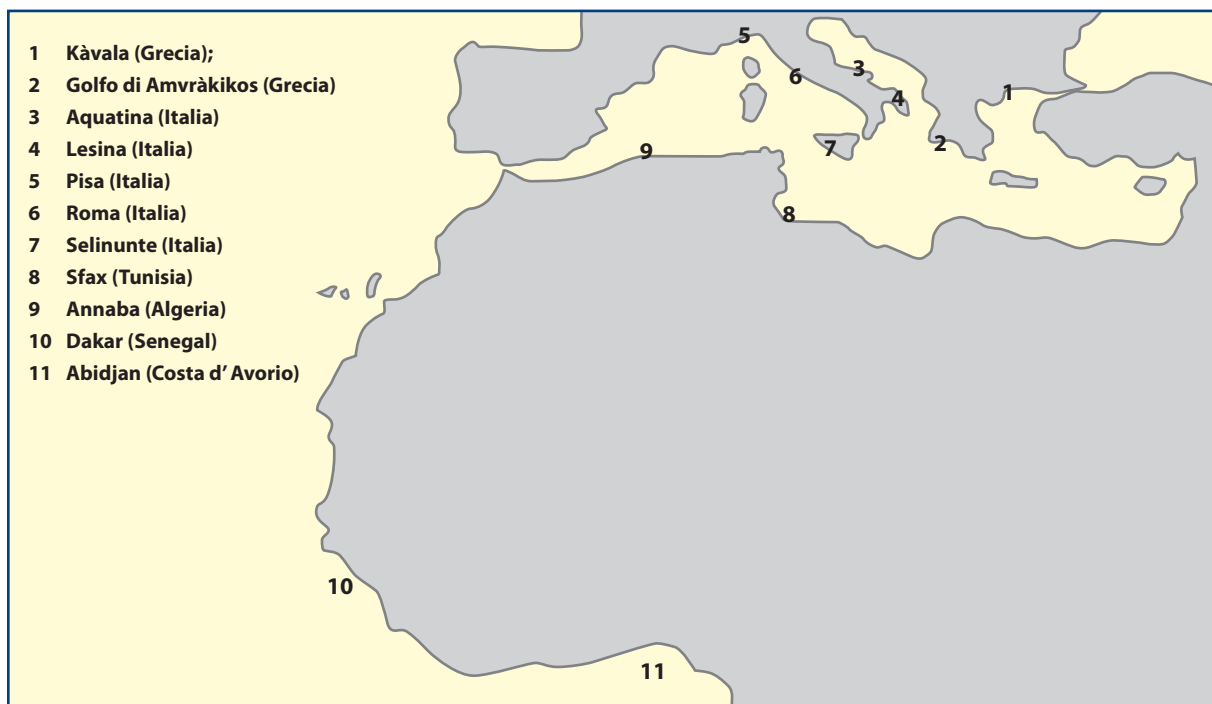
Materiali e Metodi

mtDNA

Sono stati analizzati 173 individui provenienti da 11 siti di campionamento, nove dal Mediterraneo e due dall'Oceano Atlantico (Fig. 1). Il DNA è stato estratto dai pleopodi utilizzando il kit Qiagen QIAamp Tissue kit. Per le analisi genetiche è stato utilizzato un amplificato di 494 paia di basi del gene COI (Citocromo Ossidasi subunità I). I primer utilizzati e le condizioni di amplificazione sono quelli riportati in Pellerito *et al.* (2009).

La diversità aplotipica e nucleotidica è stata calcolata utilizzando il software DNAsp 4.0. Il Minimum Spanning Network delle relazioni tra gli aplotipi è stato realizzato con l'algoritmo MINSNPNET contenuto nel programma Arlequin 2.0. Sempre con lo stesso programma sono stati calcolati gli indici *F statistics*, la distanza genetica di Reynold e la varianza molecolare (AMOVA).

Figura 1. Siti di campionamento: 1-Kàvala (Grecia); 2- Golfo di Amvràkikos (Grecia); 3-Aquatina (Italia); 4- Lesina (Italia) 5- Pisa (Italia); 6- Roma (Italia); 7- Selinunte (Italia); 8 -Sfax (Tunisia); 9- Annaba (Algeria); 10- Dakar (Senegal); 11- Abidjan (Costa d' Avorio).



Microsatellite

Il DNA totale è stato estratto da 373 individui catturati in 10 località, nove dal Mediterraneo e uno dall'Oceano Atlantico. L'isolamento dei sette loci di cui solo quattro polimorfici e le successive condizioni di amplificazione sono riportate in Arculeo *et al.* (2009).

Il numero medio di alleli per locus, l'equilibrio di Hardy-Weinberg (HW) e la differenziazione genetica (*F-statistics*) tra i campioni è stata calcolata utilizzando il programma GENETIX 4.02 (Belkhir *et al.* 2001) e GENEPOP version 3.4 (Raymond e Rousset 2004). Il programma Micro-checker è stato utilizzato per identificare la presenza di alleli nulli (Oosterhout *et al.* 2004).

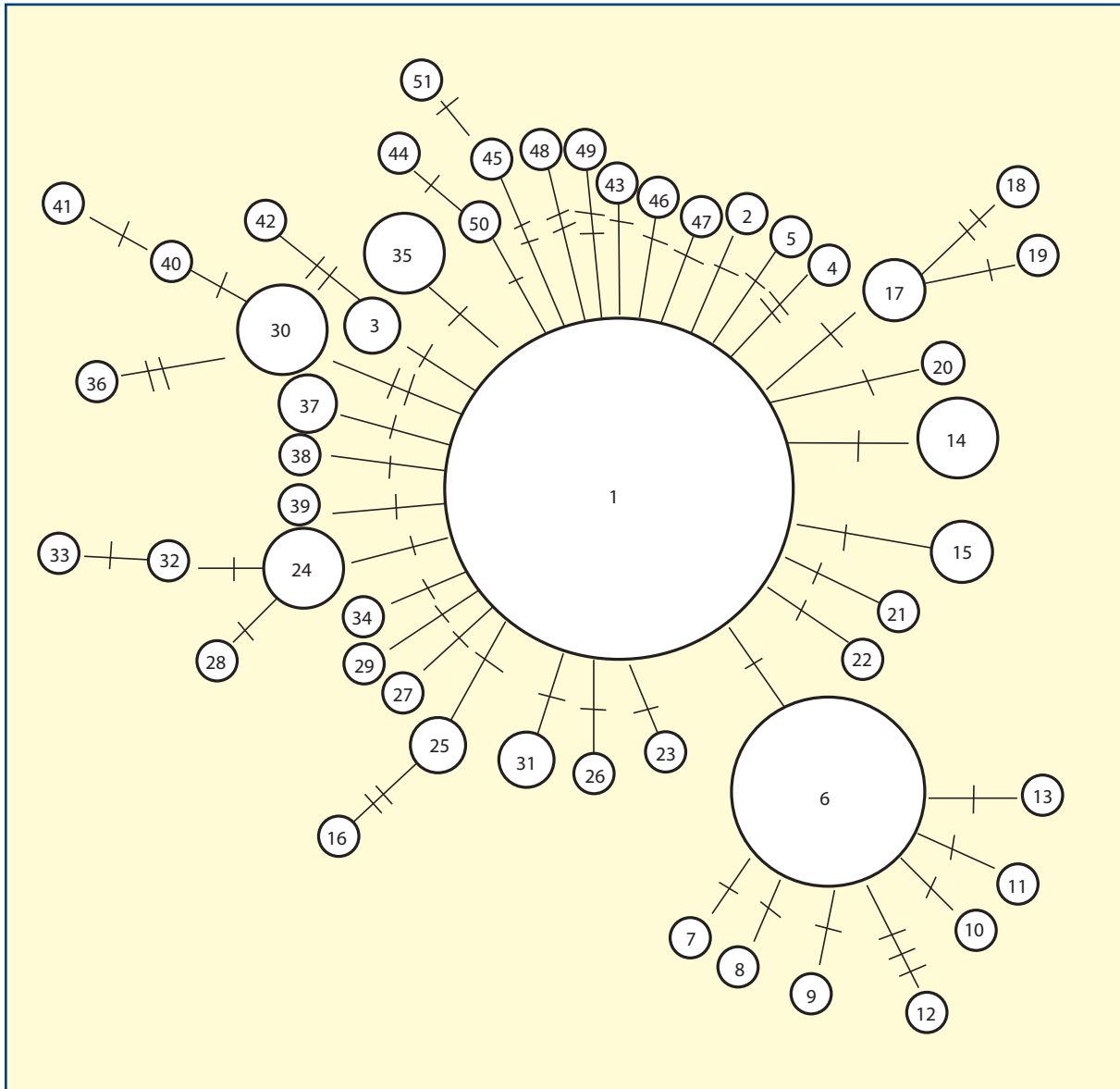
Risultati

mtDNA

L'analisi del gene COI (494 bp) ha permesso di identificare 51 aplotipi; l'aplotipo più comune è condiviso tra tutti i campioni tranne per il Golfo di Amvrakikos. Il numero di aplotipi per ogni sito di campionamento variava da un minimo di 2 (Lesina) ad un massimo di 15 (Abidjan). Il Minimum Spanning Network (Fig. 2) mostrava una configurazione "star-like shape" con la maggior parte degli aplotipi connessi con quello più comune principalmente attraverso una singola mutazione: 26 aplotipi con una o poche 'mutational step'. I valori medi della

diversità nucleotidica ed aplotipica sono risultati maggiori nei campioni Africani, mentre quelli più bassi in quelli del Mar Adriatico (Lesina e Aquatina) indicando che i campioni Atlantici e del Mediterraneo Occidentale risultavano più variabili.

Figura 2. Minimum Spanning Network La figura mostra le relazioni tra le mutazioni dei 51 haplotypes di *Melicertus kerathurus* individuati. Ogni barra rappresenta una singola mutazione. Gli aplotipi sono numerati e rappresentati da un cerchio di dimensione differente in base alla loro frequenza.



La costruzione del dendrogramma basato sulla distanza di Reynold tra i campioni ha evidenziato la presenza di due cluster, uno rappresentato dai campioni Atlantici e del Mediterraneo Occidentale, l'altro dai campioni Adriatici e del Mediterraneo Centrale con l'unica eccezione del campione del Golfo di Amvrakikos che si isola da tutti (Figura 3).

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA) ha evidenziato differenze significative tra i campioni ($F_{st} = 0.194$, $p < 0.001$) dovuto principalmente al sito di Amvrakikos e, comunque, anche se questo veniva escluso dalla analisi il valore di differenziazione genica risultava sempre significativo ($F_{st} = 0.044$, $p < 0.001$).

Per valutare la storia demografica di questa specie è stata presa in esame la "mismatch distribution" che ha evidenziato un andamento descritto da una curva unimodale (Figura 4), pattern associato da attribuirsi ad una recente espansione della popolazione.

Figura 3. Distanza Neighbor-joining (NJ) di Reynolds tra i campioni.

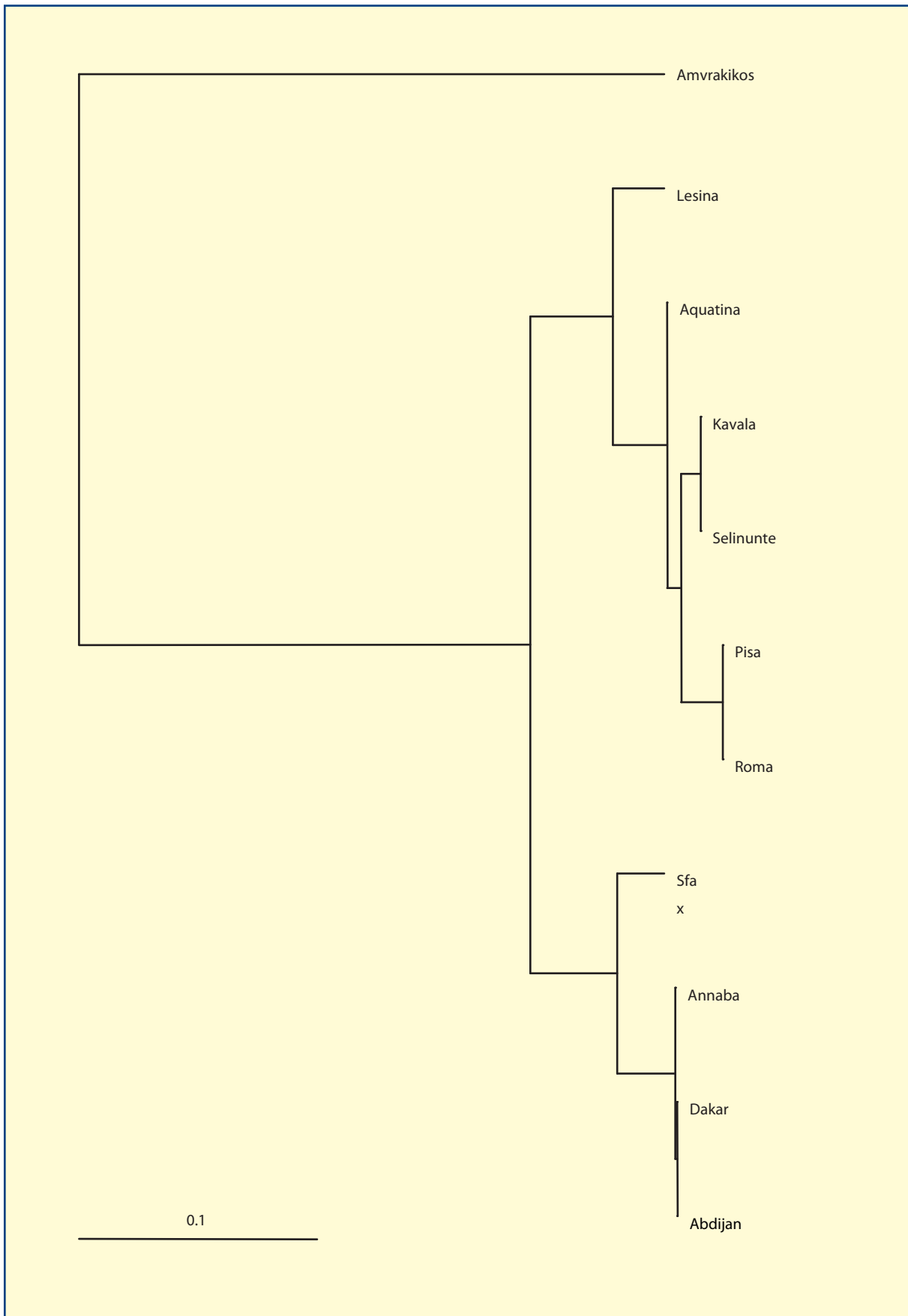
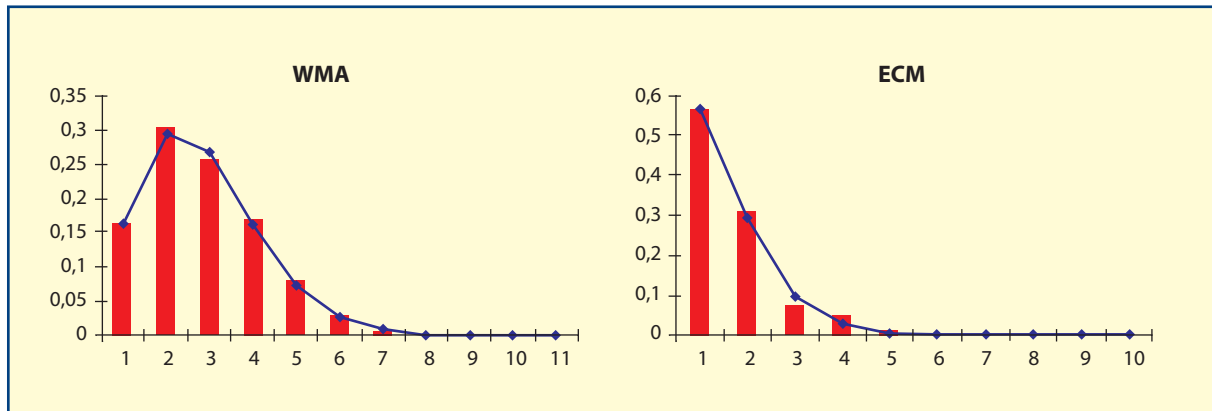


Figura 4. Pairwise mismatch distributions established for ECM and WMA groups of sample sites. Black bars represent the observed frequency of the pairwise differences, while the solid line shows the expectation based on a model of sudden demographic expansion.



Microsatelliti

Il numero di alleli per locus identificati dall'analisi dei quattro loci polimorfici è risultato compreso tra 2 e 14. Il numero di alleli per locus è risultato molto simile a quello ottenuto da Valles-Jimenez *et al.* (2005) in *Litopenaeus vannamei*, ma inferiore a quello osservato in altri peneidi (Benzie 2000; Xu *et al.* 2001). Il calcolo dell'eterozigosità media osservata ed attesa mostrava un deficit di eterozigoti con deviazione significativa dall'equilibrio di Hardy-Weinberg in tre dei quattro loci esaminati anche dopo correzione di Bonferroni ($F_{is} = 0.21$, $p < 0.05$). Tale deviazione può essere attribuita a diversi fattori come l'inbreeding, presenza di alleli nulli, effetto Wahlund o a forze selettive che agiscono contro gli eterozigoti. Nel nostro caso si potrebbe ipotizzare all'influenza di questi due ultimi fattori.

L'eterogeneità genetica tra i campioni valutata attraverso l'indice F_{st} medio ha evidenziato una significativa strutturazione ($F_{st} = 0.18$, $p < 0.05$); tale strutturazione si mantiene anche con l'esclusione del campione del Golfo di Amvrakikos.

Discussioni

La variazione genetica di *M. kerathurus*, analizzata con marcatori mitocondriali e nucleari, è risultata molto bassa e in parte simile a quella riportata in altre specie di crostacei (Benzie 2000) ed ha evidenziato che questa specie all'interno della sua area di distribuzione presenta un moderato grado di strutturazione. Tale risultato conferma l'efficacia dei marcatori utilizzati anche se questi, per le loro peculiarità, avrebbero potuto dare risultati contrastanti; infatti, il marcatore mitocondriale differisce principalmente dal nucleare per la dimensione (minore nel mtDNA) e la modalità di trasmissione. Inoltre, eventi storici come riduzione della dimensione di popolazione (collo di bottiglia) o l'effetto fondatore influenzano maggiormente la diversità del mtDNA piuttosto che dei loci nucleari.

I nostri risultati sulla eterogeneità trovano affinità con quelli riportati da Zitari-Chatti *et al.* (2008; 2009) lungo le coste della Tunisia dove il ridotto flusso genico tra i campioni esaminati sembra essere attribuito al regime idrografico (spostamenti di masse d'acqua) e dal ciclo biologico di questa specie che è strettamente dipendente dalla salinità. Entrambi i fattori influenzano la dispersione geografica evidenziando una tipica distribuzione a "patch".

Il basso grado di variazione genetica riscontrato in questa specie e la moderata eterogeneità genetica impone estrema cautela nell'uso di questa importante risorsa sia dal punto di vista della pesca sia dell'acquacoltura. Infatti, un eccessivo sfruttamento ed un uso inappropriato ai fini dell'allevamento contribuirebbe ulteriormente alla riduzione della variazione genetica e delle dimensioni delle popolazioni. Piani di intervento adeguati che usano un approccio ecosistemico nel rispetto del codice di condotta della FAO per una pesca responsabile, potrebbero garantire, nel tempo, il mantenimento di catture adeguate a soddisfare gli attuali livelli economici degli operatori del settore (principalmente pescatori che esercitano la pesca con attrezzi fissi) ipotizzando attività integrative come quelle di ripopolamento e/o di allevamento.

Bibliografia

- Arculeo M., Pellerito R., Bonhomme F. (2010) Isolation and use of microsatellite loci in *Melicertus kerathurus* (Crustacea, Penaeidae). *Aquatic Living Resources*, 23: 103-107.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (2001) GENETIX 4.02, Logiciel sous windows TM pour la Genetique des Populations. Laboratoire Gènome, Populations, Interactions. CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Benzie J.A.H. (2000) Population genetic structure in penaeid prawns. *Aquaculture Research* 31, 95-119.
- Lumare F. (1976) Research on the reproduction and culture of shrimp *Penaeus kerathurus* in Italy. General Fisheries Council for the Mediterranean. *Studies and Reviews* 55, 35-48.
- Mattoccia M., La Rosa G., De Mattheis E., Coboldi-Sbordoni M., Sbordoni V. (1987) Patterns of genetic variability in Mediterranean populations of *Penaeus kerathurus* (Crustacea Decapoda). In: Tiews K (ed) Selection, hybridization and genetic engineering in aquaculture. Heenemann-Verlag, Berlin, pp 131-142.
- Oosterhout C.V., Hutchinson W.F., Wills D.P. & Shiply P. (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535-538.
- Pellerito R., Bonhomme F., Arculeo M. (2009) Recent expansion of Northeast Atlantic and Mediterranean populations of *Melicertus (Penaeus) kerathurus* (Crustacea: Decapoda). *Fisheries Sciences*. 75:1089-1095.
- Raymond M. & Rousset F. (2004) GENEPOP version 3.4: population genetics software for exact test and ecumeneism, Available at: <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/html>.
- Valles-Jimenez R., Cruz P., Perez-Enriquez R. (2005) Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama : Microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology* 6, 475-484.
- Vitale S., Cannizzaro L., Lumare L., Mazzola S. (2010) Population parameters of *Melicertus kerathurus* (Decapoda, Penaeidae) in southwest sicilian shallow waters (Mediterranean sea) using length-frequency analysis. *Crustaceana*, 83: 997-1007.
- Xu Z., Primavera J.H., de la Pena L.D., Pettit P., Belak J. & Alcivar-Warren A. (2001) Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199, 13-40.
- Zitari-Chatti R., Chatti N., Elouaer A. & Said K. (2008) Genetic variation and population structure of the camarote prawn *Penaeus kerathurus* (Forsk.) from the eastern and western Mediterranean coasts in Tunisia. *Aquaculture Research* 39, 70-76.
- Zitari-Chatti R., Chatti N., Fulgione D., Chiazza I., Aprea G., Elouaer A., Said K. & Capriglione T. (2009) Mitochondrial DNA variation in the camarote prawn *Penaeus (Melicertus) kerathurus* across a transition zone in the Mediterranean Sea. *Genetica* DOI 10.1007/s10709-008-9344-9.