
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ADRIANO BIASIOLO, PAOLO MARIA BISOL, BRUNO
BATTAGLIA

**Indagini sui polimorfismi proteici in Anfipodi del
genere Orchestia. I. Orchestia mediterranea A.
Costa della laguna di Venezia**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 83 (1989), n.1, p. 299–305.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1989_8_83_1_299_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Genetica. — *Indagini sui polimorfismi proteici in Anfipodi del genere Orchestia. I. Orchestia mediterranea A. Costa della laguna di Venezia.* Nota di ADRIANO BIASIOLO (*), PAOLO MARIA BISOL (**), e BRUNO BATTAGLIA (**), presentata (***) dal Corrisp. B. BATTAGLIA.

ABSTRACT. — *Proteic polymorphism in the Amphipod Orchestia mediterranea A. Costa from the Lagoon of Venice.* The electrophoretic patterns of 11 enzymes in the semi-terrestrial Amphipod *Orchestia mediterranea* were studied. All the samples, collected in the lagoon of Venice on several occasion from January 1986 to March 1987, show low levels of genetic variability. Moreover, the genotypes distributions on the polymorphic loci Pgm-1 and Mpi-1 exhibit a trend towards stable levels of their observed heterozygosity.

KEY WORDS: Proteic polymorphism; Littoral habitat; *Orchestia mediterranea*.

RIASSUNTO. — Con l'applicazione di tecniche di elettroforesi sono state effettuate stime di variabilità genetica nell'Anfipode semi-terrestre *Orchestia mediterranea*. I campioni, raccolti nella laguna di Venezia per un periodo di oltre un anno, mostrano un basso livello medio di polimorfismo, determinato dalla fissazione, per gran parte dei loci, di un unico allele. Per i due soli loci variabili, Pgm-1 e Mpi-1, è stata messa in luce una costanza della eterozigosi media complessiva.

INTRODUZIONE

I Talitridi rappresentano una famiglia di Crostacei Anfipodi in cui si sono sviluppati, nel corso dell'evoluzione, adattamenti alla vita semiterrestre o addirittura terrestre. Rispetto alle specie acquatiche filogeneticamente vicine essi sono andati incontro a notevoli diversificazioni di molte delle loro caratteristiche (Wildish, 1979).

Il graduale cambiamento di habitat sembra aver determinato l'insorgere di processi neoteni che, interessando gli equilibri ormonali e gli assetti fisiologici, hanno avuto riflessi anche sulla morfologia di questi animali (Matsuda 1981).

Le condizioni di vita subaeree sono state accompagnate da un aumento della superficie branchiale e da modificazioni dell'apparato ambulacrale, adattato al movimento terrestre e soprattutto al salto come forma di difesa verso i predatori come ad esempio gli uccelli.

Per quanto riguarda il genere sopralittorale *Orchestia*, Wildish (1971, 1972) ha indicato come significativi nel processo evolutivo la comparsa, da specie originariamente solo marine, di popolazioni in grado di tollerare in buona misura l'acqua dolce; la riduzione delle dimensioni corporee, che consente di minimizzare l'essiccamento, accompagnata dal raggiungimento precoce della maturità sessuale; l'instaurarsi di un rapporto sessi squilibrato a favore delle femmine che ha permesso di massimizzare il potenziale riproduttivo annuo.

Al fine di valutare gli aspetti genetici dell'adattamento, si è iniziata una serie di ricerche sulla distribuzione dei polimorfismi proteici in popolazioni del genere *Orchestia*. L'utilizzo di caratteri biochimici, evidenziati tramite l'applicazione di

(*) Istituto di Difesa delle Piante dell'Università di Udine.

(**) Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova.

(***) Nella seduta del 19 giugno 1987.

tecniche elettroforetiche, permette di ottenere buone stime della variabilità genetica delle popolazioni e, mediante campionamenti ripetuti, indicazioni sull'andamento delle frequenze geniche. Dati di questa natura possono assumere rilevante importanza per l'individuazione di eventi selettivi e di particolari strategie adattative (Nevo *et al.*, 1984).

In questa nota vengono illustrati i risultati ottenuti dalle indagini condotte su campioni di popolazioni della specie *Orchestia mediterranea* A. Costa raccolti nella laguna di Venezia. Si tratta di campioni di un habitat marino marginale quale è quello delle zone di barena. Le barene infatti sono aree paludose ricoperte da una fitta vegetazione alofila che possono venire sommerse in particolari condizioni di marea. Ne risulta un insieme di condizioni ambientali particolarmente severe che richiedono una notevole specializzazione, come è provato dal ridotto numero di specie di artropodi terrestri che riescono a insediarsi. Inoltre, l'opportunità di tali indagini è suggerita dalla presenza negli stessi areali di altre specie di *Orchestia*.

Accanto al problema dei meccanismi di adattamento genetico, possono essere così affrontati i problemi riguardanti le relazioni filogenetiche. Attraverso l'individuazione di opportuni marcatori biochimici sotto controllo genetico si potrebbe valutare il grado di diversificazione delle popolazioni e fornire un contributo alla sistematica classica (per una ampia analisi si veda il volume edito da Oxford e Rollinson, 1983).

MATERIALE E METODI

I campioni di *Orchestia mediterranea* sono stati raccolti in due aree della laguna di Venezia, site nei pressi delle Casse di Colmata e distanti tra loro circa 5 km. Complessivamente sono stati prelevati 697 individui mediante sette campionamenti in una (A) e due nell'altra (B), in un arco di tempo di oltre un anno (gennaio 1986, marzo 1987).

Nel gennaio 1986, marzo 1986 e gennaio 1987 nella zona A e marzo 1986 nella zona B le analisi elettroforetiche sono state condotte per tutti i sistemi enzimatici messi a punto. Negli altri mesi si sono presi in considerazione solo alcuni loci con particolare riguardo a quelli polimorfi. In questo modo oltre alla determinazione della variabilità genetica s'è cercato di valutare eventuali sue variazioni sia nel tempo che nello spazio.

Gli animali sono stati raccolti a mano dopo aver rimosso i depositi vegetali che usualmente fungono loro da rifugio. Successivamente, portati in laboratorio, venivano mantenuti vivi alcuni giorni fino all'esecuzione delle analisi elettroforetiche. Da notare che in questa fase la mortalità, e quindi possibili effetti selettivi dovuti alle condizioni di laboratorio, era praticamente nulla.

Si è reso necessario evitare l'usuale pratica del congelamento dei campioni in quanto ciò portava o all'abbassamento dell'attività di alcuni enzimi (fumaratoidratasi, fosfoglucomutasi) o all'attivazione di frazioni non allozimiche che impedivano la corretta interpretazione dei patterns elettroforetici.

L'analisi elettroforetica ha previsto l'impiego, quali supporti per la separazione delle frazioni proteiche, di gel di acrilamide e di acetato di cellulosa (sistema Sartophor).

In gel di acrilamide sono stati saggiati i sistemi amilasi (Amy), esterasi (Est), leucinoaminopeptidasi (Lap), glucosiofosfatisomerasi (Gpi), applicando le metodiche già di uso corrente (Harris e Hopkinson, 1976/77; Bisol, 1976; 1980) con alcune modifiche relative al pH dei tamponi.

In acetato di cellulosa sono stati evidenziati: fosfatasi alcalina (Acp), fosfoargininasi (Ak), fumaratoidratasi (Fh), gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi (G-3-pdh), glicerolo fosfatodeidrogenasi (Gdp), esochinasi (Hk), mannosiofosfatisomerasi (Mpi), fosfoglucomutasi (Pgm). In questo caso le metodiche sono quelle descritte da Biasolo (1986).

Per quanto riguarda le colorazioni sono stati allestiti dei gel di agar con i coloranti sui quali stendere le strisce di acetato seguendo la tecnica di Grundbaum (1984). Questi gel, data la loro relativa stabilità e visti i tempi ridotti delle migrazioni in acetato, potevano essere riutilizzati più volte nello stesso giorno con evidente risparmio in termini di tempo e di materiale.

RISULTATI

La stima della variabilità genetica di *Orchestia mediterranea* si basa sui dati ottenuti dallo studio di sedici loci in campioni di due aree distinte. Complessivamente sono stati effettuati quattro campionamenti.

I valori dei parametri indicativi del livello di polimorfismo sono riportati in Tabella I.

In generale, si tratta di dati che riflettono un basso grado di variabilità genetica qualunque sia il parametro considerato. Minime risultano le differenze fra un campionamento e l'altro, essendo la zona B quella nella quale sono stati messi in luce i valori minori relativamente al numero medio di alleli per locus e alla frequenza degli eterozigoti osservati.

Poco diverso nei vari campionamenti è anche il contributo dei singoli loci alla definizione dei valori medi.

I loci ad elevato polimorfismo sono sempre quelli della Mpi-1 con tre alleli, dei

TABELLA I. - Numero di geni studiato e parametri della variabilità genetica nelle popolazioni di *Orchestia mediterranea*.

Popolazione	Numero di loci	Numero medio di geni per locus	Numero medio di alleli per locus	Percentuale di loci polimorfi p 0,05 (*)	Frequenza media degli eterozigoti	
					Osservati	Attesi
<i>O. mediterranea</i>						
zona A						
1/1986	16	104,750 ± 1,740	1,500 ± 0,258	12,500	0,064 ± 0,039	0,069 ± 0,043
3/1986	16	143,857 ± 0,125	1,438 ± 0,258	12,580	0,057 ± 0,039	0,060 ± 0,041
1/1987	16	158,000 ± 0,000	1,375 ± 0,202	12,500	0,054 ± 0,038	0,056 ± 0,040
<i>O. mediterranea</i>						
zona B						
3/1986	16	157,375 ± 0,625	1,375 ± 0,202	12,500	0,049 ± 0,035	0,059 ± 0,041

(*) Secondo questo criterio un locus viene considerato come polimorfo quando l'allele più comune ha una frequenza non superiore al 95%.

quali due comuni, e della Pgm-1 con cinque alleli, dei quali due comuni. Gli altri loci sono risultati monomorfi. Anche il locus della Gpi-1 è infatti da considerarsi monomorfo in quanto, nonostante nei campionamenti di ottobre e novembre 1986 siano stati osservati rispettivamente tre e quattro nuovi alleli, l'allele più diffuso superava la frequenza di 0,95.

L'andamento delle frequenze geniche di questi loci è stato seguito attraverso campionamenti ripetuti soprattutto nella zona A. Dai dati nella Tabella II risulta che le frequenze alleliche presentano fluttuazioni non statisticamente significative. Ciò, nonostante sia stata riscontrata la presenza, nei vari campionamenti, di un diverso numero di alleli. Per quanto riguarda le distribuzioni genotipiche, l'analisi combinata per i loci variabili evidenzia una marcata tendenza alla stabilità della eterozigosi media.

TABELLA II. - *Frequenze alleliche e eterozigosi media osservata (H oss.) dei loci Pgm-1, Mpi-1 e Gpi-1 nei campioni di popolazione di Orchestia mediterranea della zona A. I valori di chi-quadro si riferiscono a test di contingenza. (Gli alleli sono indicati con lettere che riflettono la loro diversa mobilità in campo elettrico: A corrisponde all'allele più veloce; (N) indica il numero di individui studiati).*

Date dei campionamenti

Locus	1/1986	3/1986	6/1986	10/1986	11/1986	1/1987	3/1987	chi-quadro (g.l.) ^(c)
PGM-1								
(N)	55	71	69	n.s. ^(a)	96	79	86	
A	0,055	0,028	0,000		0,021	0,013	0,023	
B	0,373	0,366	0,348		0,260	0,329	0,343	25,40
C	0,445	0,507	0,572		0,620	0,589	0,512	(20)
D	0,118	0,092	0,080		0,099	0,070	0,116	$p > 0,18$
E	0,009	0,007	0,000		0,000	0,000	0,006	
MPI-1								
(N)	53	72	71	97	95	79	86	
A	0,802	0,799	0,739	0,835	0,821	0,791	0,860	16,28
B	0,198	0,201	0,261	0,160	0,168	0,209	0,140	(12)
C	0,000	0,000	0,000	0,005	0,011	0,000	0,000	$p > 0,17$
GP1-1								
(N)	52	72	52	97	97	79	86	
A	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	
B	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	33,57
C	1,000	1,000	1,000	0,954	0,954	0,994	1,000	(24)
D	0,000	0,000	0,000	0,031	0,031	0,000	0,000	$p > 0,09$
E	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,006	0,000	
H oss	0,295	0,290	0,281	n.c. ^(b)	0,292	0,283	0,236	3,68 (5) $p > 0,50$

(a) n.s. = non saggiato

(b) n.c. = non calcolato

(c) g.l. = gradi di libertà

DISCUSSIONE

Nell'area mediterranea l'Anfipode *Orchestia mediterranea* mostra un ciclo riproduttivo pressoché continuo per tutto l'anno, con periodi di riposo nella fase invernale. Con il diminuire della temperatura infatti la maggior parte dell'energia viene spesa per la sopravvivenza.

La multivultinità, con picchi di attività riproduttiva nelle stagioni primaverile e tardo estiva, e la elevata mortalità nelle stagioni fredde determinano un andamento ciclico delle dimensioni di popolazione (Louis, 1977a; 1977b; Elkaim *et al.*, 1985).

Simile dinamica dei popolamenti, abbinata alla relativa suddivisione delle popolazioni, potrebbe spiegare le variazioni del numero di alleli osservati, in particolare quelle per gli alleli rari dei loci, Mpi-1, Gpi-1. Infatti il più alto numero di alleli è stato osservato in uno dei periodi di massima espansione del popolamento (ottobre e novembre) nel quale si ritrovano in fase adulta le discendenze del picco riproduttivo di agosto. Il numero più basso corrisponde ai campioni di periodi nei quali non si ha riproduzione e le dimensioni di popolazione sono ridotte.

Con tutta probabilità la scomparsa degli alleli rari dipende dai colli di bottiglia che la popolazione subisce (Maruyama e Fuerst, 1985).

Minore appare l'efficacia di eventi casuali sugli alleli più comuni, o sui loci monomorfi. Da questo punto di vista la struttura genetica di *O. mediterranea* appare piuttosto stabile con una ripartizione dei livelli di polimorfismo fra i loci che corrisponde a quella descritta per altri Anfipodi di ambiente lagunare; la gran parte dei loci ha fissato un allele, mentre pochi loci mantengono elevati e costanti livelli di eterozigosi (Bisol *et al.*, 1986).

Per quanto i dati richiedano un'ulteriore verifica su un arco di tempo più ampio, tale costanza potrebbe essere giustificata da ipotesi secondo le quali la fitness individuale dipende dal numero di combinazioni eterozigoti per più loci, indipendentemente dal tipo di alleli implicati (Turelli e Ginzburg, 1983).

Né si può escludere che le variazioni osservate per i loci Mpi-1 e Pgm-1 siano da attribuire proprio al ruolo metabolico svolto dai due enzimi da loro codificati. Entrambi presiedono a reazioni che portano alla formazione di glucosioseifosfato nell'importante ciclo della glicolisi.

Le diverse combinazioni osservate rappresenterebbero un indizio di differenti risposte a condizioni ambientali che variano per il tipo o per la quantità di substrati da utilizzare.

A favore di un'interpretazione che prevede un ruolo attivo nell'adattamento di questi sistemi gene-enzima può essere il fatto che essi sono caratterizzati da valori di polimorfismo simili a quelli di organismi filogeneticamente vicini che vivono in habitat dello stesso tipo. Infatti per *Talitrus saltator* e *Talorchestia deshayesii* del Nord Europa, Bulnheim e School (1986) hanno segnalato elevati livelli di polimorfismo per i sistemi della glucosiofosfatisomerasi e della fosfoglucomutasi. Altamente variabili sono risultati essere mannosiofosfatisomerasi e glucosiofosfatisomerasi di *Megalorchestia californiana* (McDonald, 1985); più recentemente in *Platorchestia platensis* delle coste atlantiche (McDonald, 1987) sono state descritte distribuzioni a carico degli stessi loci, non casuali, bensì indicative di fenomeni selettivi.

Se i livelli di polimorfismo dipendessero solo da fattori casuali sarebbe logico attendere un contributo al grado di variabilità genetica da parte dei singoli loci sempre diverso.

In definitiva, questi dati suggeriscono l'esistenza di un'interazione fra fattori casuali e fattori direzionali nella distribuzione e nel mantenimento del polimorfismo proteico di *Orchestia mediterranea*.

La continuazione delle indagini e la loro estensione alle specie congeneri *Orchestia gammarella* e *Orchestia montagui* che occupano le stesse zone di barena della laguna di Venezia, potranno favorire il chiarimento del tipo di interazioni esistenti, in rapporto anche ai processi di diversificazione fra le specie.

RINGRAZIAMENTI

Siamo profondamente grati al Prof. Sandro Ruffo per la classificazione degli animali e per i preziosi consigli forniti.

BIBLIOGRAFIA

- BIASIOLO A., 1986. *Variabilità alloenzimatica in Orchestia mediterranea della laguna di Venezia*. Tesi di laurea, Università di Padova.
- BISOL P. M., 1976. *Polimorfismi enzimatici ed affinità tassonomiche in Tisbe* (Copepoda, Harpacticoida). «Atti Accad. Naz. Lincei, Rend. Cl. Sci., MM.FF.NN.», 60: 864-870.
- BISOL P. M., 1980. *Analisi elettroforetica delle amilasi in due gruppi di specie gemelle di Copepodi del genere Tisbe*. «Atti Ist. Veneto SS.LL.AA.», 138: 113-119.
- BISOL P. M., PATARNELLO T. e BATTAGLIA B., 1986. *Variabilità genetica in Anfipodi del genere Gammarus di ambienti salmastri*. «Atti Accad. Naz. Lincei, Rend. Cl. Sci., MM.FF.NN.», in stampa.
- BULNHEIM H. P. e SCHOLL A., 1986. *Genetic differentiation between populations of Talitrus saltator and Talorchestia deshayesii (Crustacea: Amphipoda) from coastal areas of the north-western European continent*. «Mar. Biol.», 92: 525-536.
- ELKAIM B., IRLINGER J. P. e PICHARD S., 1985. *Dynamique de la population d'Orchestia mediterranea (Crustacée, Amphipode) dans l'estuaire du Bou Regreg (Maroc)*. Can J. Zool., 63: 2800-2809.
- GRUNBAUM B. W. (ed.), 1981. *Handbook for forensic individualization of human blood and bloodstain*. Library of Congress catalog card n. 80 - 68346.
- HARRIS H. e HOPKINSON D. A., 1946/77. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- LOUIS M., 1977a. *Étude des populations de Talitridae des étangs littoraux méditerranéens I. Variations numériques des effectifs au sein différent phases et interprétation*. «Bull. Ecol.», 8 (1): 63-74.
- LOUIS M., 1944b. *Étude des populations de Talitridae des étangs littoraux méditerranéens. II. Identification des cohortes, cycles et fécondité*. «Bull. Ecol.», 8 (1): 75-76.
- MARUYAMA T. e FUERST P. A., 1985. *Population bottlenecks and non equilibrium models in populations genetics. IV. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck*. «Genetics», 111: 691-689.
- MCDONALD J. H., 1985. *Size-related and geographic variation at two enzyme loci in Megalorchestia californiana (Amphipoda: Talitridae)*. «Heredity», 54: 359-366.
- MCDONALD J. H., 1987. *Repeated geographic variation at three enzyme loci in the Amphipod Platorchestia platensis*. «Evolution», 41 (2): 438-441.
- MATSUDA R., 1982. *The evolutionary process in Talitrid Amphipods and Salamanders in changing environments, with a discussion of «genetic assimilation» and some other evolutionary concepts*. «Can J. Zool.», 60: 733-749.

- NEVO E., BEILES A. e BEN-SHLOMO R., 1984. *The evolutionary significance of genetic diversity: ecological demographic and life history correlates*. In «Evolutionary dynamics of genetic diversity», G. S. Man ed., Lecture Notes in «Biomathematic», 53: 13-213.
- OXFORD G. S. e ROLLINSON D. (ed.), 1983. *Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance*. Systematic Association special volume n. 24. Academic Press, London.
- TURELLI M. e GINZBURG L. R., 1983. *Should individual fitness increase with heterozygosity?* «Genetics», 104: 191-209.
- WILDISH D. J., 1971. *Adaptative significance of biased sex ratio in Orchestia*. «Nature», 233: 54-55.
- WILDISH D. J., 1972. *Post-embryonic growth and age in some littoral Orchestia (Amphipoda, Talitridae)*. «Crustaceana Suppl.», 3: 567-274.
- WILDISH D. J., 1979. *Reproductive consequences of terrestrial habitat in Orchestia (Crustacea: Amphipoda)*. «Int. J. Invertebr. Reprod.», 1: 9-50.