
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

PAOLO M. BISOL, VITTORIO VAROTTO, BRUNO
BATTAGLIA

**Controllo genetico della fosfoesosoisomerasi (Phi) in
Tisbe clodiensis (Copepoda, Harpacticoida)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 60 (1976), n.4, p. 499–504.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_60_4_499_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Genetica. — *Controllo genetico della fosfoesosoisomerasi* (Phi) in *Tisbe clodiensis* (Copepoda, Harpacticoida) (*). Nota di PAOLO M. BISOL, VITTORIO VAROTTO e BRUNO BATTAGLIA, presentata (**) dal Corrisp. B. BATTAGLIA.

SUMMARY. — A method is described which permits the application of electrophoretic techniques for the study of enzyme polymorphisms to single individuals of the Copepod *Tisbe*. The method has been tested with F_1 and, occasionally, F_2 individuals obtained by crossings between two geographic populations of *T. clodiensis*. The electrophoretic analysis carried out for the *Phi*, shows that this enzyme is under the control of three codominant alleles at the same locus. Gene frequencies in the two populations have been calculated. Both method and material prove very favourable for approaching a variety of ecological-genetic and evolutionary problems in the marine environment.

La genetica evoluzionistica e di popolazioni ha avuto negli ultimi anni un nuovo impulso grazie alla sempre più frequente utilizzazione dell'analisi elettroforetica (Hubby e Lewontin [13]). Questo metodo consente, con l'ausilio di colorazioni specifiche, di mettere in evidenza proteine che rappresentano il prodotto di singoli loci. Sulla base della diversa mobilità elettroforetica delle frazioni enzimatiche, dipendente in ultima analisi dalle diverse sequenze di aminoacidi, è possibile rivelare nelle popolazioni numerose varianti fenotipiche; nell'ipotesi che a queste corrispondano altrettante varianti genotipiche, diviene agevole l'analisi di buona parte del genoma come pure la verifica di eventuali variazioni di frequenze geniche nel tempo e nello spazio.

L'impiego di tecniche elettroforetiche si è dimostrato particolarmente utile nell'indagine condotta su organismi marini, per i quali, specialmente a causa delle difficoltà di allevamento e di incrocio in condizioni di laboratorio, il determinismo genetico era stato dimostrato a livello di pochissimi caratteri per lo più relativi a fenomeni di policromatismo (Gooch [10]).

Col metodo dell'elettroforesi è stato possibile valutare il grado di differenziazione genetica tra specie affini, allo scopo di stabilirne le relazioni filogenetiche (Gooch e Schopf [11]; Schopf e Murphy [15]); si sono approfondite le conoscenze sui rapporti tra variabilità genetica e variabilità ambientale (Ayala e Valentine [2]; Ayala *et al.* [1; 3]); si sono tentate correlazioni tra variazioni di frequenze geniche e variazioni di parametri ecologici (Doyle [9]; Gooch *et al.* [12]). D'altra parte tutte queste ricerche danno troppo spesso per scontato il controllo genetico dei polimorfismi evidenziati,

(*) Lavoro eseguito con mezzi messi a disposizione dall'Istituto di Biologia del Mare, C.N.R., Venezia.

(**) Nella seduta del 13 marzo 1976.

mentre non è sempre possibile escludere l'eventuale interferenza di artefatti metodologici (Markert e Whitt [14]); dagli errori di interpretazione che ne derivano potrebbero, per esempio, dipendere le frequenti discordanze tra le distribuzioni osservate e quelle attese. È quindi in ogni caso opportuno verificare mediante incroci l'effettivo controllo genetico dei polimorfismi enzimatici riscontrati. Purtroppo sono ancora pochi gli organismi marini per i quali siano state messe a punto adeguate tecniche di allevamento e riproduzione in laboratorio. Particolarmente favorevoli sotto questo profilo si sono dimostrati i Copepodi appartenenti al genere *Tisbe*, dal cui studio sono emersi numerosi e complessi problemi di speciazione e di genetica ecologica nell'ambiente marino (Battaglia [4; 5]).

L'impiego del metodo dell'elettroforesi ha permesso di affrontare in modo più idoneo alcuni di questi problemi, anche se le dimensioni troppo esigue delle varie specie di *Tisbe* non consentivano finora di applicare l'analisi elettroforetica a livello individuale. Per esempio, dai risultati di un recente tentativo eseguito utilizzando campioni costituiti da circa 200 esemplari, è stato possibile ottenere nuove utili informazioni sul grado di differenziamento intra- e interspecifico (Battaglia e Bisol [6]; Bisol [7]).

L'impossibilità di applicare la tecnica su singoli individui di *Tisbe* costituiva comunque una grave limitazione, in quanto i 'patterns' elettroforetici ottenuti da gruppi di esemplari non davano modo di ricavare adeguate stime delle frequenze geniche.

Nella presente Nota viene illustrato un nuovo metodo di analisi elettroforetica su piastra verticale di gel di acrilamide, che ha permesso di superare la difficoltà sopra accennata. La validità del metodo è stata saggiata mediante una serie di incroci eseguiti, in *Tisbe clodiensis*, per accertare il controllo genetico della fosfoesosoisomerasi (*Phi*). Per gli incroci sono stati utilizzati individui appartenenti a due popolazioni di diversa origine geografica: Ponza, mar Tirreno, e Beaufort, N.C., costa atlantica degli Stati Uniti. Queste ed altre popolazioni di *T. clodiensis* erano già oggetto di ricerche sul processo di speciazione (Volkman, Battaglia e Varotto [16]). I ferogrammi relativi alla *Phi*, ottenuti con campioni di 200 individui, avevano mostrato 3 bande sia per la popolazione di Ponza che per quella di Beaufort. Ciò faceva sospettare l'esistenza di un polimorfismo, pur non riscontrandosi differenze tra le due popolazioni. La situazione è radicalmente cambiata quando si è riusciti ad applicare la tecnica su singoli individui, sfruttando i vari tipi di incrocio effettuati per gli altri scopi sopra ricordati. Si trattava di incroci reciproci 'Ponza' × 'Beaufort' eseguiti isolando coppie di copepoditi di sesso diverso appartenenti alle due popolazioni, così da essere certi che le femmine utilizzate fossero vergini.

La F_1 e, in qualche caso, la F_2 di questi incroci sono state analizzate individualmente per la *Phi*. La principale differenza rispetto al metodo impiegato su campioni multipli (Bisol [7]) consiste nel fatto che sono state ridotte sia le dimensioni dei pozzetti di deposizione (da 0,5 cm a 0,3 cm

di lunghezza) sia lo spessore della piastra (da 0,2 cm a 0,1 cm). L'omogeneizzazione veniva operata con appositi micropestelli in pozzetti ricavati su una lastra di vetro previa deposizione, mediante microsiringa Hamilton, di 0,02 ml di tampone estraente. La fase liquida veniva recuperata con la microsiringa e utilizzata per l'analisi elettroforetica (circa 0,015 ml per campione). Essendosi notata una migliore risoluzione quando la penetrazione nel gel di acrilamide avveniva a bassi voltaggi, per i primi 20' di corsa la d.d.p. era limitata a 50 V.

I fenotipi evidenziati sono schematizzati nella fig. 1, e i dati relativi alla segregazione riportati nella Tabella I. Dai fenotipi e dai rapporti di segregazione si può stabilire che nelle due popolazioni di *T. clodiensis*, considerate assieme, la *Phi* è sotto il controllo di un unico locus con tre alleli (A, B, C) fra loro codominanti. Ciascuna delle popolazioni presenta tuttavia due soli alleli. Gli individui in cui si manifestano tutte e tre le bande sono eterozigoti: si tratta pertanto di una molecola dimera (Brewer [8]). Le frequenze dei tre alleli nelle due popolazioni usate per gli incroci sono riportate nella Tabella II. Le risoluzioni appaiono buone sia per i maschi che per le femmine (Tav. I, A).

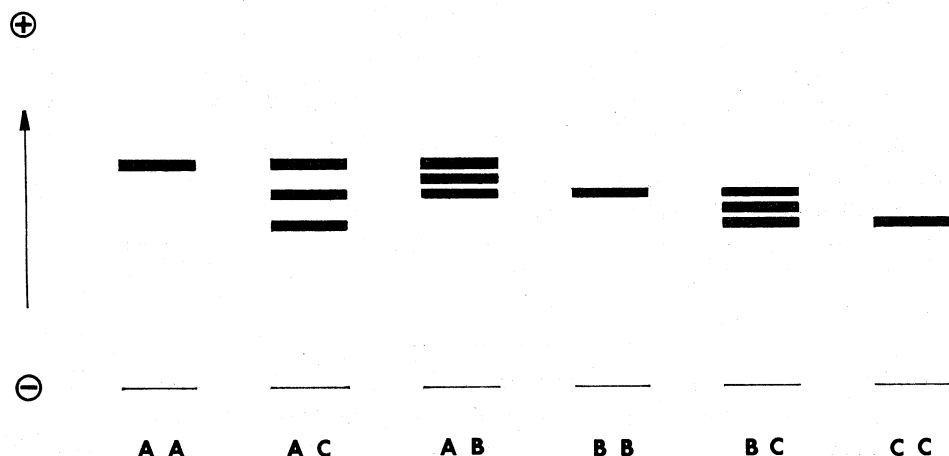


Fig. 1. - Ferogrammi schematici delle *Phi* in *Tisbe clodiensis*.

Questi primi risultati dimostrano che il metodo messo a punto per l'analisi elettroforetica individuale consente di affrontare da un punto di vista biochimico vari problemi emersi nel corso delle nostre indagini su *Tisbe*. Da segnalare, in particolare, il vantaggio offerto dalla possibilità di verificare il controllo genetico dei polimorfismi enzimatici evidenziati e di affrontare sperimentalmente il problema del loro eventuale significato adattivo. Mediante l'allestimento di popolazioni di laboratorio aventi una determinata composizione genotipica, diviene relativamente facile riferire eventuali variazioni di frequenze geniche all'azione selettiva di un'ampia gamma di fattori ambientali. Una dimostrazione che i limiti imposti dal metodo

TABELLA I.

Rapporti di segregazione nei diversi tipi di incrocio. Non si riportano i sessi né l'origine della popolazione, non essendosi riscontrate differenze nelle segregazioni.

Tipo di incrocio	Numero incroci	Numero discendenti esaminati	GENOTIPI						χ^2	P
			AA	AB	BB	BC	CC	AC		
AA×BB	7	196		196						
AA×CC	1	8						8		
BB×CC	1	9				9				
BB×BB	2	22			22					
AA×BC	8	236		116				120	0,067	>0,7
BB×BC	1	13			5	8			0,386	>0,5
AB×BC	11	212		64	54	40		54	5,509	>0,1
BB×AB	6	136		67	69				0,029	>0,8
* AB×AB	2	86	16	50	20				2,651	>0,3
* AC×AC	1	43	13				10	20	0,628	>0,7
* BC×BC	1	43			14	20	9		1,372	>0,5

* Individui F_1 dei primi tre incroci.

TABELLA II.

Distribuzioni genotipiche e frequenze geniche per il locus Phi-I nelle due popolazioni di Tisbe clodiensis utilizzate per gli incroci.

Popolazione	GENOTIPI			N.	χ^2	P	Frequenze geniche
	AA	AB	BB				
Beaufort . .	oss. 64	43	18	125	5,214	<0,05	$p(A) = 0,684$ $q(B) = 0,316$
	att. 58,482	54,036	12,482				
	BB	BC	CC				
Ponza . . .	oss. 40	60	22	122	0,003	>0,95	$q(B) = 0,574$ $r(C) = 0,426$
	att. 40,164	59,672	22,164				

adottato precedentemente sono stati largamente superati, è data dal fatto che mentre dall'analisi condotta su 200 individui le popolazioni di Ponza e Beaufort apparivano omogenee, l'analisi individuale ha permesso di stabilire che tra le due popolazioni c'è un solo allele in comune, con frequenze nettamente diverse. Con esperimenti successivi è stato possibile rivelare la presenza di un quarto allele nella popolazione di Venezia (Tav. I, A).

Senza entrare nel merito di questi primi dati, che saranno oggetto di ulteriori ricerche – si consideri, tra l'altro, il problema delle differenti condizioni di equilibrio nelle due popolazioni prese in esame (Tabella II) – appare evidente il salto qualitativo che il metodo qui proposto consente.

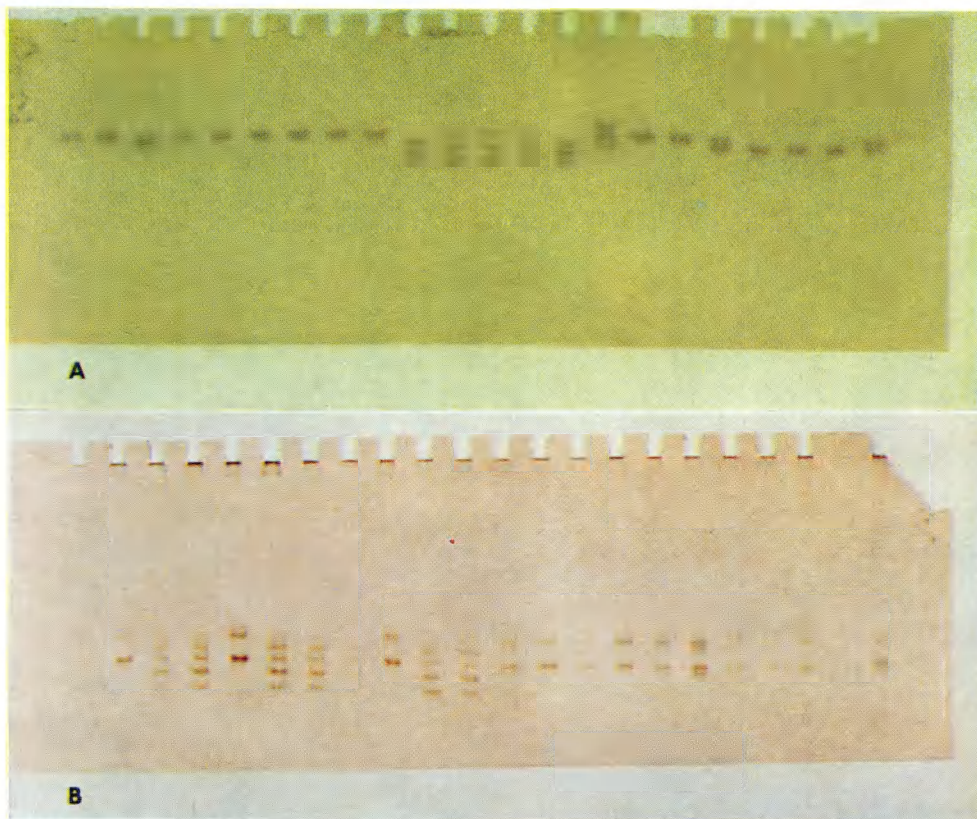
Prove preliminari effettuate per altri sistemi enzimatici (esterasi, malico deidrogenasi, fosfoglucomutasi, isocitric deidrogenasi, fosfatasi acida, fosfatasi alcalina) (Tav. I, B) indicano che questo metodo si può estendere a tutti gli enzimi saggiabili elettroforeticamente, anche se si è notata una certa difficoltà nel mettere in evidenza quegli enzimi che richiedono come colorante sali di diazonio (esterasi e fosfatasi) rispetto ad altri che si colorano con sali di tetrazolio.

La possibilità che il nuovo metodo offre di analizzare in misura più adeguata la struttura genetica delle popolazioni di *Tisbe*, permetterà di affrontare con maggiore validità e rigore il problema, molto attuale, dei rapporti intercorrenti tra variabilità genetica e diversificazione temporale e spaziale dei fattori ecologici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AYALA F. J., HEDGECK D., ZUMWALT G. e VALENTINE J. W. (1973) – *Genetic variation in Tridacna maxima, an ecological analog of some unsuccessful evolutionary lineages*, « Evolution », 27, 177-191.
- [2] AYALA F. J. e VALENTINE J. W. (1974) – *Genetic variability in the cosmopolitan deep-water ophiuran Ophiomusium lymani*, « Mar. biol. », 27, 51-57.
- [3] AYALA F. J., VALENTINE J. W., BARR L. G. e ZUMWALT G. S. (1974) – *Genetic variability in a temperate intertidal phoronid, Phoronopsis viridis*, « Biochem. genet. », 11, 413-427.
- [4] BATTAGLIA B. (1963) – *Advances and problems of ecological genetics in marine animals*. Proc. XI Intern. Congr. of Genetics, The Hague, The Netherlands, September; 1964 – Genetics Today, 451-463.
- [5] BATTAGLIA B. (1970) – *Cultivation of marine copepods for genetic and evolutionary research*, « Helgoländer wiss. Meeresunters », 20, 385-392.
- [6] BATTAGLIA B. e BISOL P.M. (1975) – *Biochemical polymorphisms in marine crustaceans in relation to their ecology*, « Proc. 9th Europ. mar. biol. Symp. », 573-585, Harold Barnes, Editor, Aberdeen Univ. Press.
- [7] BISOL P.M. (1976) – *Polimorfismi enzimatici in Tisbe (Copepoda, Harpacticoida)*, « Atti Acc. Naz. Lincei », in stampa.
- [8] BREWER G. J. (1970) – *An introduction to isozyme techniques*, pp. 186, Acad. Press, London.
- [9] DOYLE R. W. (1972) – *Genetic variation in Ophiomusium lymani (Echinodermata) populations in the deep-sea*, « Deep-sea Research », 19, 661-664.

- [10] GOOCH J. L. - *Mechanisms of evolution and population genetics*, in «Marine Ecology», 349-409, O. Kinne Editor, J. Wiley and Sons, London.
- [11] GOOCH J. L. e SCHOPF T. J. M. (1970) - *Population genetics of marine species of the phylum Ectoprocta*, «Biol. Bull.», 138, 138-156.
- [12] GOOCH J. L., SMITH B. S. e KNUPP D. (1972) - *Regional survey of gene frequencies in the mud snail Nassarius obsoletus*, «Biol. Bull.», 142, 36-48.
- [13] HUBBY J. L. e LEWONTIN R. C. (1966) - *A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in Drosophila pseudoobscura*, «Genetics», 54, 577-594.
- [14] MARKERT C. L. e WHITT G. S. (1968) - *Molecular varieties of isozymes*, «Experientia», 24, 977-1088.
- [15] SCHOPF T. J. M. e MURPHY L. S. (1974) - *Protein polymorphism of the hybridizing seastars Asterias forbesi and Asterias vulgaris and implications from their evolution*, «Biol. Bull.», 145, 589-597.
- [16] VOLKMANN B., BATTAGLIA B. e VAROTTO V. (1976) - *A study of reproductive isolation within the superspecies Tisbe clodiensis* (sottoposto a «Evolution»).



Polimorfismi enzimatici in *Tisbe clodiensis*: A, locus *Phi-1*; B, loci *Aph-1* e *Aph-2*.