

M. ROBERTI, C. YANNOPOULOS*, G. DE METRIO**, A. LUDOVICO***, F. MILELLA, A. CARONE, P. MEGALOFONOU**, F. BINGEL****, U. UNLUATA****, P. CANTATORE, M.N. GADALETA.

Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Bari, via Amendola 165/A 70126 Bari, ITALIA.

*Department of Zoology, University of Athens, Grecia.

**Dipartimento di Produzione Animale, Università di Bari, Italia.

***Istituto Sperimentale Talassografico "A. Cerruti", CNR Taranto, Italia.

****Institute of Marine Science, M.E.T.U. Erdemli, Turkey.

POLIMORFISMO DEL DNA MITOCONDRIALE IN STOCK DI PALAMITA, *SARDA SARDA* (BLOCH 1793), DEL MAR MEDITERRANEO.

Mitochondrial DNA polymorphism in *Sarda sarda* stocks.

Abstract

Mitochondrial DNA polymorphism in Sarda sarda stocks is described. We determined the DNA sequence of a 300 nucleotides portion of the cytochrome b gene in individuals coming from the Jonian Sea, from the Aegean Sea and from the Marmara Sea. Seven different genotypes were identified; they have different proportions in the three stocks. We observed a much greater differentiation between the Jonian or Aegean stock with respect to that from the Marmara Sea than between the Jonian and Aegean stocks. More information on the stock identity were obtained by multivariate statistical analysis of some morphometric and meristic characters.

Key-words: mtDNA, Polymorphism, Fish stock, *Sarda sarda*, Sequencing.

Introduzione

La palamita, (*Sarda sarda*) è un pesce epipelagico, appartenente alla famiglia Scombridae, largamente diffuso nel Mediterraneo dove la sua pesca è molto praticata con una produzione annuale che supera le 20000 tonnellate. Il maggior numero di catture viene effettuato nel Mar Nero in Turchia, ma anche in Italia e Grecia si pescano grandi quantità di palamita.

La letteratura, finora, non fornisce molte informazioni sui caratteri biologici degli stock sfruttati dalle flotte dei diversi paesi, fatta eccezione dello stock turco (Demir, 1963) e le informazioni sulla possibile esistenza di diverse popolazioni in differenti zone del Mediterraneo sono contraddittorie.

Il nostro studio riguarda tre stock provenienti rispettivamente dallo Ionio, dall'Egeo e dal Mar di Marmara.

Come marker genetico abbiamo utilizzato il DNA mitocondriale (mtDNA) in quanto esso presenta caratteristiche che lo rendono particolarmente valido nelle analisi intra-specifiche, compresa la definizione di stock ittici (Gyllensten & Wilson, 1987; Carr & Marshall, 1991). Esso è infatti una molecola ubiquitaria, che presenta una struttura genetica semplice, un'evoluzione rapida, ed una ereditarietà materna diretta senza ricombinazione; infine è relativamente facile da isolare e analizzare.

Sono qui riportati i risultati ottenuti dall'analisi della sequenza di un tratto del gene per il citocromo b. Inoltre vengono riportati i risultati preliminari di una analisi multivariata fatta su alcuni caratteri morfometrici e meristici degli stessi campioni.

Materiali e metodi

Nel biennio 1990-91 sono stati collezionati 94 esemplari di palamita catturati in diversi distretti del Mediterraneo: 37 nello Ionio (Golfo di Taranto), 26 nell'Egeo (Golfo di Eubea) e 31 nel Mar di Marmara. Per ogni esemplare sono stati registrati: la data ed il luogo di cattura, il peso, il sesso e le misure di 5 caratteri morfometrici (lunghezze dalla estremità del muso sino alla inserzione della 1^a pinna dorsale P₁, della pinna pelvica P₂ e della pinna anale P₃, diametro dell'occhio P₄, lunghezza del capo P₅) e di 5 meristici (numero di raggi della 1^a pinna dorsale Y₁, della 2^a pinna dorsale Y₂, della pinna anale Y₃, numero di pinnule dorsali Y₄ ed anali Y₅).

Le misure morfometriche sono state rilevate con la precisione di 0,1 cm, il peso con la precisione di 1 g. Il conteggio delle pinnule e dei raggi spiniformi delle pinne è stato effettuato ad occhio nudo. Da ciascun individuo è stato prelevato il fegato, congelato a -80°C per l'estrazione del mtDNA.

Per verificare l'eventuale esistenza di differenze tra i gruppi di animali provenienti da aree diverse, le 5 variabili morfometriche, trasformate in percentuale rispetto alla lunghezza alla forca (P₁', P₂', P₃', P₄', P₅'), e le 5 meristiche sono state sottoposte ad analisi fattoriale e ad analisi discriminante.

Il mtDNA è stato estratto da 10-15 grammi di tessuto come descritto da Lansman *et al.* (1981). Per le amplificazioni e le reazioni di sequenza sono stati utilizzati un primer universale: cit b-Rev (H-15149: 5' A-AACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTGTCC TCA3'; Kocher *et al.*, 1989); ed un primer specifico: Int-For 5' AACGACGCACTAGTTGACC3' costruito sulla sequenza di *S. sarda*. I numeri si riferiscono all'estremità 3' del primer nella sequenza del mtDNA umano riportata da Anderson *et al.* (1981).

Le amplificazioni a doppia strand sono state effettuate come descritto da Kocher *et al.* (1989). Il prodotto di amplificazione, purificato su un gel SEA PLAQUE (FMC) è stato sottoposto a sequenziamento tramite amplificazione lineare in presenza di un primer marcato in 5' (Murray, 1989).

Risultati

La Tabella 1 mostra i dati statistici riguardanti la lunghezza ed il peso degli animali.

Tabella 1 - Lunghezza e pesi degli animali esaminati.

	LUNGHEZZA (cm)				PESO(kg)			
	min	max	med	st.dev	min	max	med	st.dev
ION	44,0	68,0	52,9	5,3	1,05	3,73	1,89	0,50
EGE	40,4	60,9	43,4	3,9	0,82	3,27	1,12	0,46
MAR	32,0	36,5	34,6	1,2	0,45	0,79	0,62	0,08

Dall'analisi delle componenti principali dei caratteri morfometrici e meristici si nota che le prime due componenti, che complessivamente rappresentano il 48,1% della varianza totale, sono maggiormente influenzate dai caratteri morfometrici. Infatti la prima componente riassume il 25% della variabilità e risulta positivamente associata con le variabili P₁', P₂', P₄' e negativamente con la Y₂, mentre la seconda riassume il 23,1% della variabilità e risulta positivamente associata con le variabili P₃', P₅' e negativamente con la Y₁. La terza componente che riassume solo il 15,2% della variabilità risulta associata con le variabili meristiche Y₃, Y₄, Y₅.

La distribuzione degli animali in funzione delle prime due componenti (fattori 1, 2), riportata nella figura 1, indica una distinzione tra i tre gruppi. Il test "Wilk's Lambda" ha evidenziato che le differenze tra i tre gruppi sono statisticamente molto significative ($\alpha = 0,01$).

Dall'analisi canonica discriminante sono state rilevate due funzioni lineari, entrambe significative. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 2. I quadrati delle distanze tra i tre gruppi sono risultati i seguenti: Ionio-Egeo = 28,99; Ionio-Marmara = 120,75; Egeo-Marmara = 127,48.

L'analisi genetica è stata condotta sul mtDNA sequenziando un tratto di 300 nucleotidi del gene per il citocromo b corrispondente alle posizioni 14840 - 15140 del genoma mitocondriale umano (Anderson *et al.*, 1981), utilizzando i primer Int-For e cit b-Rev.

Dal confronto di queste sequenze tra tutti i 94 individui analizzati è possibile individuare 13 posizioni nucleotidiche che variano (mutazioni puntiformi). Come mostrato nella Tabella 3 i siti variabili definiscono 7 genotipi diversi che sono stati individuati con le lettere da A a G.

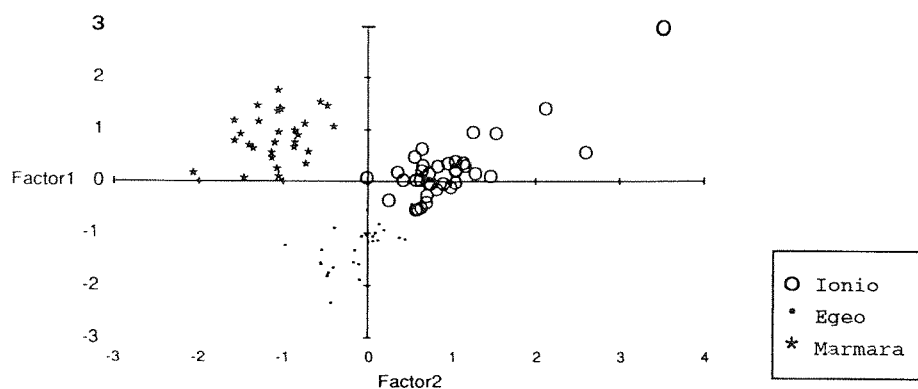


Figura 1. Distribuzione degli animali in funzione dei fattori 1 e 2.

Tabella 2 - Risultati dell'analisi discriminante.

	FUNZIONI	
	1	2
Correlazione canonica	0,98	0,91
Autovalori	26,16	4,97
% della varianza totale	84,03	15,97
PR > F	0,0001	0,0001
Coefficienti		
P ₁ '	0,6920	-1,1341
P ₂ '	0,3499	-0,4590
P ₃ '	0,0737	0,0925
P ₄ '	4,5253	2,7139
P ₅ '	-1,4270	0,2934
Y ₁	-0,0008	0,6819
Y ₂	-0,3140	-0,0240
Y ₃	-0,1836	0,7028
Y ₄	0,2353	-0,0224
Y ₅	-0,0536	0,6966

Le proporzioni dei 7 genotipi nei campioni analizzati sono riportate nella figura 2. È evidente che, tranne E ed F, comunque poco rappresentati, non esistono genotipi caratteristici di una sola zona, mentre quello che varia ampiamente tra le zone sono le frequenze relative dei diversi genotipi. Il campione ionico è caratterizzato dal genotipo B che ha una frequenza del 56,7%, mentre quello dell'Egeo mostra un aumento del genotipo C che arriva al 30,8%. Ancora più differenziata è la situazione del campione del Mar di Marmara dove prevale il genotipo A (41,9%) mentre il genotipo B scende al 25,8% e il genotipo G (praticamente assente nello Ionio e nell'Egeo) raggiunge pure il 25,8%.

Tabella 3. Distribuzione delle variazioni del mtDNA tra gli stock di *S.sarda*. Le sequenze sono identiche a quelle del genotipo A a meno che non sia indicato diversamente.

Genotipo	SITI DI MUTAZIONE													DISTRIBUZIONE		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Ion.	Ege.	Mar.
A	C	C	T	G	G	G	C	T	C	C	C	G	T	6	4	13
B	T	-	C	-	A	C	T	C	T	T	-	-	C	21	11	8
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	6	8	2
D	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	/
E	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	2	/	/
F	T	-	C	-	A	C	T	C	T	T	-	A	C	1	/	/
G	-	T	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	/	2	8
														37	26	31

Le frequenze genotipiche italiane e greche non sono differenziabili da un punto di vista statistico in quanto il test per l'ipotesi nulla che i due campioni siano omogenei produce un valore $0,1 < p < 0,5$ per $X^2=5,53$ e $GL=3$. Appaiono invece statisticamente significative le differenze nelle frequenze genotipiche tra i campioni greci e turchi ($p=0,01$ per $X^2=11,16$ e $GL=3$) e quelle tra i campioni italiani e turchi ($p=0,025$ per $X^2=9,1$ e $GL=3$). Questi risultati sono in accordo con gli indici di Identità Genetica calcolati con la formula di Nei (1972). I valori infatti risultano essere: $I_{\text{Ionio-Egeo}} = 0,921$, $I_{\text{Ionio-Marmara}} = 0,653$, $I_{\text{Egeo-Marmara}} = 0,691$.

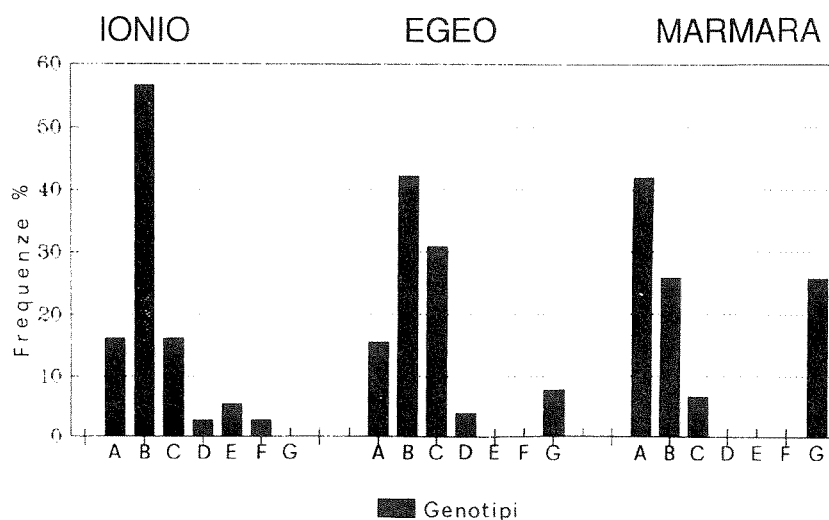


Figura 2. Istogramma rappresentante le frequenze dei sette genotipi identificati.

Discussione

Per definire l'eventuale esistenza di diverse popolazioni di *S. sarda* nel Mediterraneo, è stato analizzato il polimorfismo del mtDNA, le cui mutazioni sono per la maggior parte neutrali (Avise *et al.*, 1987).

La distribuzione dei 7 genotipi identificati mostra come i tre campioni di *S. sarda* analizzati, mentre non rappresentano tre stock discreti o puri, probabilmente non provengono da una popolazione panmittica indifferenziata. Un campione di individui può quindi, con buona probabilità, essere assegnato alla sua zona di provenienza, in base alle sue frequenze genotipiche. Come indicato dagli Indici di Identità di Nei, la dif-

ferenziazione tra il campione dell'Egeo e quello dello Ionio è sicuramente molto bassa, anche se può raggiungere una significatività statistica aumentando il numero di individui analizzati. Al contrario, molto maggiore è la differenziazione tra i campioni dello Ionio e dell'Egeo rispetto a quello del Mar di Marmara. L'analisi dei dati morfometrici e meristici, anche se preliminare a causa del ristretto numero di campioni, permette di giungere alle stesse considerazioni dell'analisi genetica. I risultati ottenuti, quindi, fanno pensare da un lato all'esistenza di un notevole scambio tra Ionio ed Egeo, tra i quali la penisola greca costituisce una barriera facilmente superabile dalle palamite, dall'altro ad una situazione di maggiore segregazione della popolazione del Mar di Marmara.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato finanziato con fondi del Ministero della Marina Mercantile, della Comunità delle Università del Mediterraneo, del M.U.R.S.T 60% ed infine dal Contributo C.N.R Comitato nazionale per le Scienze Agrarie.

Bibliografia

- ANDERSON S., BANKIER A.T., BARRELL B.G., de BRUIJN M.H.L., COULSON A.R., DROUIN J., EPERON I.C., NIERLICH D.P., ROE B.A., SANGER F., SCHREIER P.H., SMITH A.J.H., STADEN R., YOUNG I.G. (1981) - *Nature*, **290**: 457-474.
- AVISE Y.C., ARNOLD J., BALL R.M., BERMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J.E., REEB C.A., SAUNDERS N.C. (1987) - *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **18**: 489-522.
- CARR S.M., and MARSHALL H.D. (1991) - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **48**: 48-52.
- DEMIR M. (1963) - *FAO Fish. Rep.*, **2**: 101.
- GYLLENSTEN U., and WILSON C. (1987) - In Ryman N. and Utter F. [ed.] *Population genetics and fishery management*. University of Washington Press, Seattle, WA 301-317.
- KOCHER T.D., THOMAS W.K., MEYER A., EDWARDS S.V., PÄÄBO S., VILLABLANCA F.X., and WILSON A.C. (1989) - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6196-6200.
- LANSMAN R.A., SHADE R.O., SHAPIRA Y.F., and AVISE J.C. (1981) - *J. Mol. Evol.* **17**: 214-226.
- MURRAY V. (1989) - *Nucl. Acids. Res.* **17**: 8889
- NEI M. (1972) - *Ann. Nat.*, **106**: 283-292.