

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.

Laurea di primo livello in Biologia Molecolare

ELABORATO DI LAUREA

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLO  
STORIONE COBICE (*Acipenser naccarii*)  
A SCOPO CONSERVAZIONISTICO

Tutor: Dott. Leonardo Congiu (Dipartimento di Biologia)

Laureanda: Erika Maruzzo

Anno accademico 2005/2006



# INDICE

|                                     | Pag.      |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>ABSTRACT .....</b>               | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUZIONE .....</b>           | <b>3</b>  |
| <b>MATERIALI E METODI.....</b>      | <b>7</b>  |
| <b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b> | <b>13</b> |
| <b>RINGRAZIAMENTI.....</b>          | <b>21</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>            | <b>22</b> |



## ABSTRACT

In questo elaborato è stata presa come specie in esame lo storione cobice (*Acipenser naccarii*), a rischio di estinzione nel Nord Adriatico. Questo lavoro è parte di un progetto che mira alla salvaguardia della specie e al ripopolamento degli ambienti naturali. Durante il tirocinio si è effettuata la caratterizzazione genotipica di 100 individui mantenuti in cattività, F1 di animali di origine selvatica, potenzialmente utilizzabili come riproduttori per la generazione di stock destinati al reinserimento negli ambienti naturali. Sono stati utilizzati 4 marcatori microsatellite già isolati in precedenza. Lo scopo di questa analisi è stato di analizzare la variabilità genetica residua disponibile, al fine di fornire indicazioni utili alla programmazione di un piano ottimale di incroci, che preservi al meglio la diversità genetica presente.

Il corredo tetraploide della specie in oggetto ha indotto ad utilizzare l'informazione di presenza/assenza, nei singoli genotipi, degli alleli osservati negli stock, attraverso la stima del *band sharing*.

Gli animali studiati sono risultati appartenere a gruppi geneticamente ben distinti nonostante il numero ridotto di loci analizzati. I raggruppamenti osservati, inoltre, sono strettamente associabili a quelli precedentemente identificati sulla base della variabilità mitocondriale.



## INTRODUZIONE

Lo storione cobice, *Acipenser naccarii*, è una specie endemica dell'area Adriatica che, fino agli inizi del 20° secolo, era considerata relativamente comune nel Nord Adriatico e in tutti i suoi principali emissari, in cui migra per riprodursi (Ludwig et al., 2003).

L'inquadramento sistematico della specie e dei generi affini è schematizzato nel modo seguente:

|                      |                 |               |  |
|----------------------|-----------------|---------------|--|
| <b>Phylum</b>        | Cordati         |               |  |
| <b>Subphylum</b>     | Vertebrati      |               |  |
| <b>Classe</b>        | Osteitti        |               |  |
| <b>Sottoclasse</b>   | Attinopterigi   |               |  |
| <b>Superordine</b>   | Condrostei      |               |  |
| <b>Ordine</b>        | Acipenseriformi |               |  |
| <b>Famiglia</b>      | Acipenseridi    |               |  |
| <b>Sottofamiglie</b> | Acipenserini    | <b>Generi</b> | <i>Acipenser</i><br><i>Huso</i>                      |
|                      | Scafirinchini   | <b>Generi</b> | <i>Schaphirynchus</i><br><i>Pseudoschaphirynchus</i> |

Dal corpo affusolato a sezione pentagonale, *A. naccarii* presenta una colorazione grigia con tonalità bluastre sul dorso, mentre il ventre è bianco. La bocca, che si apre nella parte inferiore del muso allungato, è totalmente priva di denti ed è sormontata da quattro barbigli, organi sensoriali molto sensibili usati per cercare il nutrimento sul fondale (Figura 1).



**Figura 1.** Esemplare adulto di *Acipenser naccarii*.

È importante far notare, per il proseguo dell'elaborato, che attualmente tutte le specie di storione possono essere classificate in due gruppi, sulla base del numero di cromosomi: il primo gruppo è costituito da specie con 100-120 cromosomi, che sono considerate dagli studiosi come diploidi, mentre il secondo comprende specie con 240-270 cromosomi, considerate tetraploidi (Fontana, 1994). Lo storione cobice appartiene a quest'ultimo gruppo ( $2n = 239 \pm 7$ , Fontana e Colombo, 1974). Questa sua caratteristica influenzerà molto le analisi genetiche presentate successivamente in quanto in ogni individuo è possibile osservare fino a 4 varianti alleliche per locus.

Negli ultimi decenni, la presenza di *A. naccarii* in natura, stimata sulla base di dati di cattura, ha subito una drastica riduzione. All'inizio degli anni '70 le catture superavano infatti i 2000 Kg/anno, per declinare a circa 200 Kg/anno nel 1990 e 1991; nel 1993, infine, furono pescati solo 19 esemplari (Ludwig et al., 2003).

A partire dagli anni '70 sono stati avviati programmi di allevamento dello storione cobice in condizioni di acquacoltura, finalizzati al ripopolamento degli ambienti naturali. In particolare, nel 1977, circa 50 individui sono stati catturati nelle acque italiane e trasferiti all'Azienda Agricola VIP, ad Orzinuovi, Brescia, dove, negli anni successivi, è stato possibile riprodurre questi esemplari in cattività. Nel 1991 sono iniziati i primi tentativi di reintroduzione degli avannotti in diversi fiumi.

Alcuni individui, ottenuti dalle prime riproduzioni effettuate, sono stati mantenuti in diversi impianti di acquacoltura e attualmente, avendo raggiunto l'età riproduttiva, sono a loro volta dei potenziali riproduttori per la generazione di stock destinati al ripopolamento.

Lo studio della variabilità genetica presente in questi gruppi di potenziali riproduttori rientra negli obiettivi del progetto LIFE COBICE (COnservation and Breeding of Italian Cobice Endemic sturgeon), finanziato dalla comunità europea nel 2004 e, nello specifico, nella sezione di "Identificazione genetica degli stock di riproduttori" (azione A4), finalizzata alla caratterizzazione genotipica degli esemplari, mediante l'utilizzo di marcatori mitocondriali e microsatelliti. Lo scopo di questa parte del progetto è di analizzare la variabilità genetica residua disponibile negli stock utilizzabili come riproduttori, stabilire un piano ottimale di incroci che preservi al meglio la diversità genetica presente nella specie e mettere a punto un metodo di *genetic tagging* che permetta di riallocare gli individui rilasciati ai rispettivi parentali al fine di monitorare la situazione in natura a seguito dei ripopolamenti.

All'interno di questo contesto, il mio lavoro si riferisce unicamente a 2 stock di potenziali individui riproduttori, ciascuno dei quali è costituito da 50 esemplari, stabulati rispettivamente in impianti di acquacoltura a Piacenza e a Treviso. Gli individui saranno identificati in seguito come "Piacenza 1-50" e "Treviso 1-50". Essi sono, con molta probabilità, figli di incroci all'interno dello stock sopra citato di esemplari di origine selvatica.

La caratterizzazione genotipica degli individui selvatici, mediante l'utilizzo di marcatori sia mitocondriali che microsatelliti, era già stata completata in

precedenza presso il laboratorio dove ho lavorato. Per quanto riguarda gli individui di Piacenza e di Treviso, era stata ultimata solo l'analisi a livello mitocondriale. Io ho quindi esclusivamente lavorato alla genotipizzazione di questi ultimi esemplari utilizzando 4 marcatori microsattelliti.

I microsattelliti sono marcatori molecolari codominanti con ereditarietà di tipo mendeliano chiamati anche "Single Sequence Repeats" (SSRs) o "Short Tandem Repeats" (STRs). Essi sono costituiti da unità di 1-4 bp ripetute in tandem per un numero variabile di volte, in blocchi spesso più piccoli di 200 bp (Strachan e Read, 2004). Sono ubiquitari, cioè possono trovarsi sia in regioni codificanti sia in regioni non codificanti, sebbene siano molto più frequenti in queste ultime perché non soggetti a selezione.

I microsattelliti più frequenti sono di tre tipi (Jarne e Lagoda, 1996):

- *dinucleotidici*: sono i più frequenti; negli animali quello che si riscontra più spesso è il repeat  $(CA)_n$ , mentre le piante sono ricche di  $(TA)_n$  o  $(GA)_n$ ;
- *trinucleotidici*: si trovano sia negli animali che nelle piante, spesso anche all'interno di esoni, qualora non ne inattivino la funzione;
- *tetranucleotidici*: i principali sono i repeat GATA/GACA che si trovano con densità variabile in molti organismi superiori.

In base al tipo di repeat, inoltre, i microsattelliti vengono suddivisi in tre famiglie: si dicono *perfetti* quando è presente una singola unità ripetuta (es. CACACACACA); *composti* quando le unità ripetute sono più di una (es. CACACAGAGAGA); *interrotti* quando all'interno del microsattellite l'unità ripetuta è inframmezzata da basi o gruppi di basi (es. CATCACACATTCA).

I microsattelliti sono caratterizzati da un elevato tasso di mutazione, che li ha resi, grazie anche all'utilizzo di sequenziatori automatici per la loro analisi e all'impiego di software per l'interpretazione dei dati, i marcatori più utilizzati negli studi di tipizzazione del DNA, in genetica delle popolazioni e nella costruzione di mappe genetiche. La mutazione più frequente e caratterizzante in questi loci è la variazione della loro lunghezza, dovuta ad un cambiamento nel numero delle ripetizioni in tandem contenute in essi, che si evidenzia nella presenza di alleli dalle diverse dimensioni. Si suppone che questo tipo di mutazione sia dovuto principalmente allo *slippage* (slittamento) della polimerasi durante la replicazione del DNA e ad una successiva mancata riparazione dell'errore (Levinson e Gutman, 1987), anche se altri studi indicano un crossing-over ineguale come ulteriore possibile spiegazione (Schlotterer e Tautz, 1992).

Vi sono però anche dei limiti all'utilizzo di questi marcatori. Uno di questi è rappresentato dall'*omoplasia*, cioè la condizione per cui due alleli risultano uguali nella sequenza e nel numero di repeat nonostante abbiano una diversa discendenza: essa si verifica a causa di mutazioni ricorrenti avvenute durante l'evoluzione, con conseguente sottostima del livello di variabilità genetica (Estoup

et al., 2002). La sottostima può inoltre essere causata dalla presenza di *alleli nulli*, cioè alleli nelle cui sequenze fiancheggianti sono incorse mutazioni che impediscono il corretto appaiamento dei primer disegnati per l'amplificazione. Di conseguenza gli eterozigoti mostreranno un profilo omozigote, mentre gli omozigoti per l'allele mutato non produrranno alcun amplificato. Un ulteriore limite, probabilmente quello che causa le maggiori complicazioni, è legato al fatto che i marcatori microsatelliti sono fortemente *specie-specifici* e possono essere trasferiti solo tra specie molto vicine tra loro dal punto di vista evolutivo (Chambers e MacAvoy, 2000). Ogni volta quindi che si intende lavorare su una specie per cui non siano già disponibili marcatori STRs è necessario procedere all'isolamento *ex novo*.

Nel caso specifico di questo lavoro, come già accennato, sono stati utilizzati 4 marcatori microsatelliti specifici per la famiglia degli Acipenseridi, già isolati in precedenza (Welsh et al., 2003; Zane et al., 2002; McQuown et al., 2000).

## MATERIALI E METODI

### Campioni analizzati

I campioni di *A. naccarii* utilizzati in questo lavoro provengono da 2 stock diversi di individui potenzialmente utilizzabili come riproduttori (stabulati rispettivamente negli impianti di acquacoltura di Piacenza e Treviso), ciascuno costituito da 50 esemplari, per un totale di 100 campioni analizzati.

I campioni dello stock Piacenza sono identificati dalla sigla PC, seguita da una numerazione progressiva da 1 a 50. Allo stesso modo, per i campioni dello stock Treviso è stata utilizzata la sigla TV seguita dal numero di identificazione individuale.

Per ogni animale è stato prelevato un frammento di pinna caudale delle dimensioni approssimative di 1 cm<sup>2</sup> mediante l'utilizzo di una forcicina sterilizzata di volta in volta. Gli animali appena sottoposti al prelievo sono stati disinfettati e rilasciati nelle rispettive vasche. I campioni di tessuto prelevato sono stati conservati in etanolo 80% fino alle successive analisi.

### Amplificazione dei microsatelliti

Da ogni campione biologico (frammento di pinna) è stato estratto il DNA genomico mediante protocollo di purificazione con fenolo-cloroformio (Maniatis et al., 1982). L'estrazione del DNA è stata eseguita precedentemente al mio lavoro. I campioni di DNA sono stati poi mantenuti a -20°C.

Come già accennato nell'introduzione, il lavoro esposto in questo elaborato consiste nella genotipizzazione dei 100 individui in esame (Piacenza e Treviso), con l'impiego di 4 loci microsatellite già isolati nella specie o in specie affini. Questi loci, assieme ad altri 7, erano già stati utilizzati nella caratterizzazione degli individui di origine selvatica di Orzinuovi, e, essendosi dimostrati i più polimorfici, sono stati scelti anche per questo lavoro di analisi.

In tabella 1 sono elencati i nomi dei loci utilizzati, il tipo di modulo ripetuto, le coppie di primer relative e il *range* di dimensioni dei frammenti amplificati attesi.

| <b>Nome locus<br/>microsatellite</b> | <b>Tipo di<br/>modulo<br/>ripetuto</b> | <b>Coppia di primer</b><br>Forward (sopra) e reverse (sotto)<br>[da 5' a 3'] | <b>Dimensioni<br/>amplificati<br/>(bp)</b> |
|--------------------------------------|--|--|--|
|--------------------------------------|--|--|--|

|               |  |   |         |
|---------------|--|---|---------|
| <i>AfuG56</i> | (AAAC) <sub>9</sub>                    | ACTAAACCCAGCACAGAAAATCAG<br>(marcato con TAMRA al 5')<br>GAAGCCCATCCCACAGGTT    | 230/320 |
| <i>An16</i>   | (ATCT) <sub>24</sub>                   | TTAACCACTGGACCACACAGCA<br>(marcato con HEX al 5')<br>TCCCACCATGCACCACACTAGA     | 130/240 |
| <i>An20</i>   | (ATCT) <sub>10</sub> (TG) <sub>5</sub> | AATAACAATCATTACATGAGGCT<br>(marcato con TAMRA al 5')<br>TGGTCAGTTGTTTTTTTATTGAT | 135/230 |
| <i>Spl120</i> | (TATC) <sub>15</sub>                   | ATTCCATGAGCAACACCACA<br>(marcato con FAM al 5')<br>TGATGGTCTGATGAGATCGG         | 230/370 |

**Tabella 1.** Elenco dei loci microsatellite utilizzati, tipo di modulo ripetuto, coppie di primer relative usate per l'amplificazione e *range* di dimensioni dei frammenti amplificati attesi.

Nello specifico, i 4 loci microsatelliti sono stati isolati in precedenza:

- **AfuG56** dal genoma della specie *Acipenser fulvescens* (Storione di Lago), affine ad *A. naccarii* (Welsh et al., 2003)
- **An16** e **An20** direttamente dal genoma di *A. naccarii* (Zane et al., 2002)
- **Spl120** dal genoma della specie *Scaphirhynchus platyrhynchus*, della stessa famiglia di *A. naccarii* (Acipenseridi), (McQuown et al., 2000).

L'amplificazione dei marcatori microsatelliti analizzati in questo studio è stata ottenuta mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*, reazione a catena della polimerasi), che permette la sintesi in vitro di numerosissime copie di un frammento di DNA di interesse.

Il protocollo PCR prevede la preparazione di una soluzione, definita *mix* di reazione, contenente tutti i reagenti necessari per ogni campione da amplificare, alla quale viene poi addizionato il DNA stampo.

Per le analisi di tutti e quattro i marcatori microsatelliti descritte in questo lavoro, le concentrazioni finali dei reagenti utilizzate per ogni campione amplificato in 25 µl totali sono state le seguenti:

|  |                         |
|--|-------------------------|
| ▪ Buffer 10X (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9, 15mM MgCl <sub>2</sub> ) | 2,5 µl                  |
| ▪ dNTPs (2 mM)   | 2,5 µl                  |
| ▪ primer (10 µM)   | 1 µl (for) + 1 µl (rev) |
| ▪ Taq Amersham (5U/µl)   | 0,1 µl                  |
| ▪ BSA (10X)  | 2,5 µl                  |
| ▪ H <sub>2</sub> O   | 14,4 µl                 |
| ▪ DNA (50ng/µl)  | 1 µl                    |

È stato necessario dedicare parecchio tempo all'ottimizzazione dei profili termici da utilizzare per l'amplificazione di ciascun locus. I profili definitivi, utilizzati quindi per la genotipizzazione dei 100 campioni di DNA, sono stati i seguenti:

***locus AfuG56***

- 95 °C per 3'
  - 95 °C per 30''
  - 63 °C per 30'' (-0,8)
  - 72 °C per 30''
  - 95 °C per 30''
  - 53 °C per 30''
  - 72 °C per 30''
  - 72 °C per 5'
- } 12 cicli
- } 35 cicli

***locus An16***

- 95 °C per 3'
  - 95 °C per 30''
  - 56 °C per 30''
  - 72 °C per 30''
  - 72 °C per 5'
- } 35 cicli

***locus An20***

- 95 °C per 3'
  - 95 °C per 30''
  - 57 °C per 30''
  - 72 °C per 25''
  - 72 °C per 5'
- } 30 cicli

***locus Spl120***

- 95 °C per 3'
  - 95 °C per 30''
  - 57 °C per 30''
- } 35 cicli

- 72 °C per 25''
- 72 °C per 5'

Nel caso del locus AfuG56, è stato necessario utilizzare un profilo *Touch-down*. Questa tecnica, in cui la temperatura di annealing dei primer è maggiore nei primi cicli e si riduce gradualmente nei cicli successivi, consente un iniziale appaiamento dei primer solo con sequenze perfettamente complementari del DNA stampo. In una fase successiva l'abbassamento di temperatura permette invece di massimizzare il numero di copie del frammento di interesse. Nel caso particolare del locus AfuG56 i primi 12 cicli prevedono un abbassamento successivo di 0,8°C della temperatura di *annealing*.

La valutazione dei prodotti di amplificazione è stata effettuata mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% (peso/volume) in TAE 0,5X (tampone di corsa) con aggiunta di 0,5 µg/ml di bromuro di etidio per la successiva rilevazione agli UV e di 2 µl (per ogni campione) di colorante blu di bromofenolo per seguire il fronte di corsa durante l'elettroforesi.

### Analisi dei frammenti amplificati

Per consentire l'analisi al sequenziatore dei prodotti di PCR ottenuti per ogni locus microsatellite, in ogni reazione sono stati impiegati primer forward marcati con un fluoroforo all'estremità 5'. Dopo la reazione di amplificazione enzimatica il profilo genetico viene determinato automaticamente mediante l'impiego di un sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente.

In questo lavoro, sono stati utilizzati tre tipi di fluorofori diversi: HEX (verde), FAM (blu) e TAMRA (giallo). Grazie all'utilizzo di tre molecole diverse, e sfruttando la differenziazione dei quattro loci per le dimensioni degli amplificati attesi, si è riusciti ad analizzare tutti i loci simultaneamente (Tabella 1).

L'analisi dei frammenti è stata effettuata presso il CRIBI (Centro di Ricerca Interdipartimentale per le Biotecnologie Innovative) di Padova, che ha messo a disposizione un servizio di *genotyping* su sequenziatore automatico (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer o ABI PRISM 3100 DNA Analyzer). Il prodotto amplificato è stato fatto correre mediante elettroforesi su capillare e, con l'aggiunta di uno standard di peso molecolare (GS 400 Hd Rox) marcato con fluoroforo Rox, si è ottenuto il dimensionamento dei singoli alleli. I risultati, forniti in formato elettronico, sono stati importati nel programma *Genotyper*® 3.7 (Applied Biosystems) che permette di visualizzare, per ogni amplificato, un grafico che rappresenta in ascissa il tempo di migrazione e in ordinata l'intensità del prodotto amplificato: è quindi risultata un'operazione immediata la visualizzazione del profilo microsatellite di ogni individuo ad un dato locus (Figura 2).

### Analisi dei dati

La condizione di tetraploidia non consente di stimare correttamente le frequenze alleliche presenti all'interno delle popolazioni studiate. Se, ad esempio, un individuo ad uno dato locus presenta due alleli differenti A e B, il genotipo tetraploide potrebbe essere AAAB, AABB o ABBB. Allo stesso modo, con tre alleli diversi A, B e C, il genotipo tetraploide potrebbe essere AABC, ABBC o ABCC. In ciascuno dei due casi, non è possibile risalire con certezza al numero esatto delle copie di alleli (Markwith et al., 2006).

Per tali ragioni nell'analisi dei dati è stata utilizzata solo l'informazione di presenza/assenza dei diversi alleli in ciascun individuo. La stima della similarità genetica sarà quindi esclusivamente basata sul numero di alleli condivisi (*band sharing*). Il *band sharing* tra 2 genotipi è stimato come segue:  $2a/(2a + b + c)$ , dove *a* sono le bande comuni ad entrambi i genotipi, *b* le bande presenti nel primo ma non nel secondo e viceversa *c* quelle presenti nel secondo ma non nel primo.

Il valore di *band sharing* varia da 0 a 1: il valore massimo indica la totale condivisione degli alleli.

La significatività delle differenze tra *band sharing* medi entro e tra gruppi di animali, considerando assieme tutti i loci, è stata valutata mediante confronto del valore osservato con una distribuzione stimata sulla base di 1000 cicli di permutazione delle stringhe di 1 e 0 corrispondenti ai genotipi osservati. La stima dei *band sharing* a coppie e le procedure di permutazione sono state effettuate col software *Poptool*, aggiuntivo del pacchetto *Excel*.

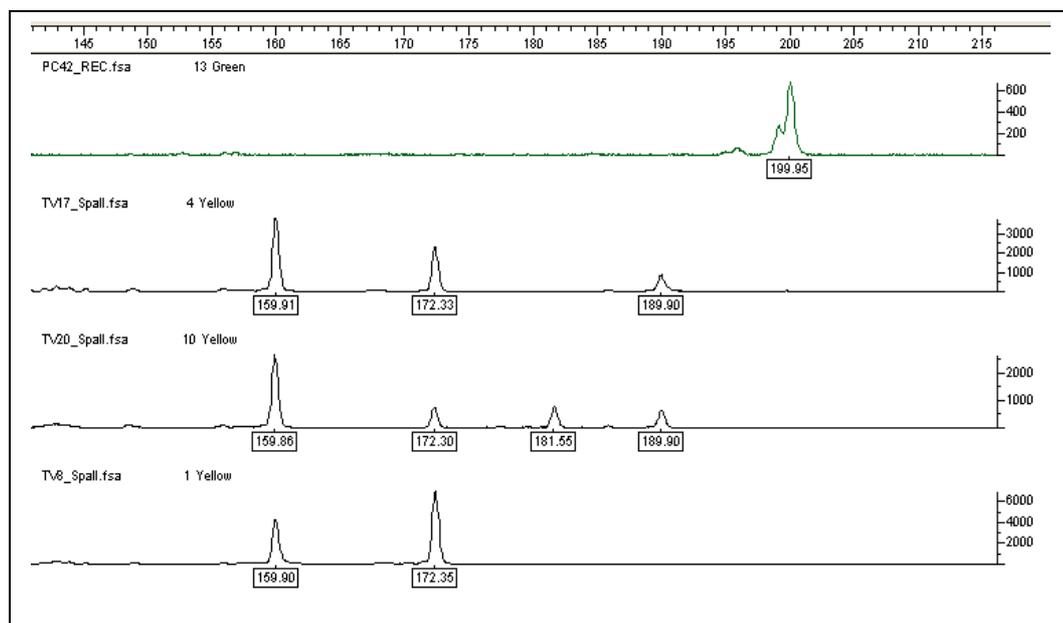
Il valore (1- *band sharing*) è stato utilizzato nella rappresentazione grafica mediante *Multi Dimensional Scaling* (MDS) delle distanze tra individui analizzati.



## RISULTATI E DISCUSSIONE

La specie in analisi, come già anticipato, è tetraploide: ogni esemplare può quindi presentare fino a 4 alleli diversi per ogni locus (Figura 2).

Solo in un caso uno degli individui (TV49) ha mostrato 5 alleli allo stesso locus (An16), anche dopo la replica dell'analisi. Questo fatto potrebbe essere attribuito ad una errata segregazione in fase meiotica in uno dei genitori di questo animale; l'elevato numero di cromosomi che caratterizza il genoma di *A. naccarii* e la grande percentuale di microcromosomi (Fontana, 1994) rende verosimile questa possibilità.



**Figura 2.** Esempi di grafici elaborati dal programma *Genotyper*® 3.7. In ascissa è riportata la dimensione dei frammenti in paia di basi, indicata anche sotto ogni allele osservato, e in ordinata l'intensità della fluorescenza; [i campioni migrano sempre con uno standard di peso molecolare, non riportato in questa immagine].

Nelle tabelle seguenti (2, 3, 4 e 5) è riportata la caratterizzazione genotipica ottenuta negli individui in esame per ciascun locus microsatellite.

E' importante sottolineare che analisi precedenti questo studio, in particolar modo sul DNA mitocondriale, avevano già evidenziato la non appartenenza di alcuni esemplari (gli individui PC10, PC12 e PC49) alla specie *A. naccarii*. Questi storioni infatti hanno mostrato un aplotipo mitocondriale tipico della specie *Acipenser transmontanus* (Storione Bianco), difficilmente distinguibile fenotipicamente da *A. naccarii* ed in grado inoltre di ibridare con essa (Bemis et al., 1997).

Non è ancora stato verificato se essi appartengano effettivamente a questa specie o se siano ibridi derivanti da un incrocio con *A. naccarii*. Nelle tabelle sottostanti questi individui sono evidenziati da colorazione grigia e, nell'analisi dei dati successiva, non saranno presi in considerazione.

| <i>AfuG56</i> | 256 | 264 | 272 | 276 |      | 256 | 264 | 272 | 276 |      | 256 | 264 | 272 | 276 |      | 256 | 264 | 272 | 276 |
|---------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| PC1           |     | x   | x   |     | PC14 |     | x   |     |     | PC27 |     | x   | x   |     | PC39 |     | x   | x   |     |
| PC2           |     | x   | x   |     | PC15 |     |     | x   |     | PC28 |     |     | x   |     | PC40 |     | x   | x   |     |
| PC3           |     | x   | x   |     | PC16 |     | x   | x   |     | PC29 |     |     | x   |     | PC41 |     | x   | x   |     |
| PC4           |     |     | x   |     | PC17 |     | x   | x   |     | PC30 |     | x   | x   |     | PC42 | x   |     |     |     |
| PC5           |     | x   | x   |     | PC18 |     | x   |     |     | PC31 |     | x   | x   |     | PC43 |     |     | x   |     |
| PC6           |     | x   | x   |     | PC19 |     | x   | x   |     | PC32 |     |     | x   |     | PC44 |     |     | x   |     |
| PC7           |     |     | x   | x   | PC20 |     | x   | x   |     | PC33 |     | x   | x   |     | PC45 |     | x   | x   |     |
| PC8           |     |     | x   |     | PC21 |     | x   |     |     | PC34 |     | x   |     |     | PC46 |     | x   | x   |     |
| PC9           |     | x   |     |     | PC22 |     | x   |     |     | PC35 |     |     | x   |     | PC47 |     |     | x   |     |
| PC10          |     |     |     |     | PC23 |     | x   | x   |     | PC36 |     | x   | x   |     | PC48 |     | x   | x   |     |
| PC11          |     |     | x   | x   | PC24 |     | x   | x   |     | PC37 |     | x   | x   |     | PC49 |     |     |     |     |
| PC12          |     |     |     |     | PC25 |     | x   |     |     | PC38 |     | x   | x   |     | PC50 |     | x   | x   |     |
| PC13          |     |     | x   |     | PC26 |     | x   | x   |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |
| <i>AfuG56</i> | 256 | 264 | 272 | 276 |      | 256 | 264 | 272 | 276 |      | 256 | 264 | 272 | 276 |      | 256 | 264 | 272 | 276 |
| TV1           |     | x   |     |     | TV14 |     | x   |     |     | TV27 |     | x   |     |     | TV39 |     | x   |     |     |
| TV2           |     |     | x   | x   | TV15 | x   | x   |     |     | TV28 |     | x   | x   |     | TV40 | x   |     |     |     |
| TV3           |     | x   | x   |     | TV16 |     | x   |     |     | TV29 | x   | x   |     |     | TV41 | x   | x   |     |     |
| TV4           |     | x   |     |     | TV17 |     | x   |     |     | TV30 | x   | x   |     |     | TV42 |     | x   |     |     |
| TV5           |     |     | x   | x   | TV18 |     | x   | x   |     | TV31 |     | x   |     |     | TV43 | x   |     |     |     |
| TV6           |     |     | x   | x   | TV19 |     | x   |     |     | TV32 | x   | x   |     |     | TV44 |     | x   | x   |     |
| TV7           |     | x   |     |     | TV20 |     | x   |     |     | TV33 |     | x   |     |     | TV45 | x   | x   |     |     |
| TV8           |     | x   | x   |     | TV21 |     | x   |     |     | TV34 |     |     | x   |     | TV46 | x   | x   |     |     |
| TV9           |     |     | x   |     | TV22 | x   | x   |     |     | TV35 | x   | x   |     |     | TV47 |     |     | x   | x   |
| TV10          |     |     | x   |     | TV23 | x   |     |     |     | TV36 |     |     | x   | x   | TV48 | x   | x   |     |     |
| TV11          |     | x   |     |     | TV24 |     | x   |     |     | TV37 |     | x   |     |     | TV49 | x   | x   |     |     |
| TV12          | x   |     |     |     | TV25 |     | x   | x   |     | TV38 |     | x   |     |     | TV50 | x   |     |     |     |
| TV13          |     | x   |     |     | TV26 | x   | x   |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |

**Tabella 2.** Caratterizzazione genotipica degli individui al locus microsatellite *AfuG56*. Gli individui evidenziati in grigio non appartengono alla specie *A. naccarii* (vedi testo).

| <i>An16</i> | 173 | 175 | 177 | 179 | 183 | 185 | 189 | 191 | 195 | 199 | 205 | 209 |      | 173 | 175 | 177 | 179 | 183 | 185 | 191 | 195 | 199 | 201 | 205 | 209 |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| PC1         | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     | PC26 | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |
| PC2         | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     | PC27 | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |
| PC3         | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | PC28 |     |     |     |     | x   |     |     |     |     |     |     |     |
| PC4         |     |     |     | x   | x   |     |     |     |     | x   |     |     | PC29 |     |     |     | x   | x   |     |     |     | x   |     |     |     |
| PC5         | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | PC30 | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |
| PC6         | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | PC31 | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |
| PC7         |     |     |     | x   |     |     |     |     |     |     |     |     | PC32 |     |     |     | x   | x   |     | x   |     |     |     |     |     |
| PC8         |     |     |     | x   | x   |     |     | x   |     |     |     |     | PC33 | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |
| PC9         | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   | PC34 | x   |     |     |     |     |     |     |     |     |     | x   |     |
| PC10        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | PC35 |     |     |     | x   | x   |     | x   |     | x   |     |     |     |



|          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| PC5      |     |     |     | x   |     |     |     |     | x   | PC30 |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   |
| PC6      |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     | PC31 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     | x   |
| PC7      |     | x   | x   | x   | x   |     |     |     |     | PC32 |     |     |     | x   |     |     | x   |     |     |
| PC8      |     |     | x   | x   |     |     |     | x   |     | PC33 |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   |
| PC9      |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     | PC34 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| PC10     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | PC35 |     | x   | x   | x   |     |     |     |     |     |
| PC11     |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     | PC36 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| PC12     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | PC37 |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     |
| PC13     |     |     |     | x   |     |     |     | x   | x   | PC38 |     |     |     | x   |     |     | x   |     | x   |
| PC14     |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   | PC39 |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   |
| PC15     |     |     | x   | x   |     |     |     | x   | x   | PC40 |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   |
| PC16     |     | x   |     | x   |     |     |     | x   | x   | PC41 |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     |
| PC17     |     | x   |     | x   |     |     |     | x   | x   | PC42 |     | x   |     |     | x   |     | x   |     |     |
| PC18     |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     | PC43 |     |     |     | x   | x   |     |     | x   |     |
| PC19     |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   | PC44 |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     |
| PC20     |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   | PC45 |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     |
| PC21     |     | x   |     | x   | x   |     |     | x   |     | PC46 |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   |
| PC22     |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     | PC47 |     |     |     | x   |     |     | x   |     | x   |
| PC23     |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     | PC48 |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   |
| PC24     |     | x   |     | x   |     |     |     | x   | x   | PC49 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| PC25     |     | x   |     | x   | x   |     |     | x   |     | PC50 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| An2<br>0 | 153 | 160 | 164 | 172 | 182 | 186 | 190 | 194 | 198 |      | 153 | 160 | 164 | 172 | 182 | 186 | 190 | 194 | 198 |
| TV1      |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     | TV26 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| TV2      |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     | TV27 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV3      |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     | TV28 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| TV4      |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     | TV29 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| TV5      |     | x   | x   | x   |     |     |     |     |     | TV30 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| TV6      |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     | TV31 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV7      |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     | TV32 |     | x   |     |     | x   |     | x   |     |     |
| TV8      |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     | TV33 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV9      | x   | x   |     | x   |     |     | x   |     |     | TV34 |     | x   | x   | x   | x   |     |     |     |     |
| TV10     |     | x   | x   |     | x   |     |     |     |     | TV35 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| TV11     |     | x   |     | x   | x   |     |     | x   |     | TV36 |     |     | x   | x   | x   |     |     |     |     |
| TV12     |     | x   |     | x   | x   |     |     | x   |     | TV37 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| TV13     |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     | TV38 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV14     |     | x   |     |     | x   |     |     | x   |     | TV39 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV15     |     | x   |     | x   |     |     |     |     |     | TV40 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV16     |     | x   |     | x   | x   |     |     | x   |     | TV41 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV17     |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     | TV42 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV18     |     | x   |     | x   |     |     |     | x   | x   | TV43 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV19     |     | x   |     |     |     |     |     | x   |     | TV44 |     | x   |     | x   |     | x   |     |     |     |
| TV20     |     | x   |     | x   | x   |     |     | x   |     | TV45 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV21     |     | x   |     | x   |     |     |     |     | x   | TV46 |     | x   |     | x   | x   |     | x   |     |     |
| TV22     |     | x   |     | x   | x   |     |     | x   |     | TV47 |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     |
| TV23     |     | x   |     | x   | x   |     |     |     |     | TV48 |     | x   |     | x   |     |     | x   |     |     |
| TV24     |     | x   |     | x   | x   |     |     |     |     | TV49 |     | x   |     | x   | x   |     |     |     |     |
| TV25     |     | x   |     | x   |     |     |     | x   |     | TV50 |     | x   |     |     | x   |     | x   |     |     |

Tabella 4. Caratterizzazione genotipica degli individui al locus microsatellite An20. Gli individui evidenziati in grigio non appartengono alla specie *A. naccarii* (vedi testo).

| <i>Spl120</i> | 263 | 275 | 279 | 283 | 287 | 291 | 295 | 299 | 303 |      | 263 | 275 | 279 | 283 | 287 | 291 | 295 | 299 | 303 |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| PC1           | x   | x   |     |     |     |     | x   |     |     | PC26 |     |     | x   |     |     |     | x   |     |     |
| PC2           |     | x   |     |     |     |     | x   |     |     | PC27 | x   |     | x   |     |     |     | x   |     |     |
| PC3           |     | x   |     |     |     |     | x   |     |     | PC28 | x   | x   |     |     |     |     |     |     | x   |



numero degli eterozigoti e la relativa eterozigosità. Da notare che per le specie tetraploidi, come quella in esame, il concetto di eterozigosità assume una valenza leggermente diversa rispetto alle specie diploidi. Infatti, se per queste ultime l'eterozigosità rappresenta il numero degli individui che presentano esclusivamente due alleli differenti, sul totale degli individui analizzati, nel caso particolare di specie tetraploidi, è possibile avere eterozigoti con due, tre o anche quattro alleli diversi. La categoria di individui eterozigoti (o meglio “*non omozigoti*”) è quindi costituita da un insieme di genotipi eterogenei per quanto riguarda il numero di alleli.

|                     | N° alleli | N° di individui eterozigoti | Eterozigosità                |
|---------------------|-----------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>Locus AfuG56</i> | 4         | PC = 28<br>TV = 23          | 28/47 = 0.60<br>23/50 = 0.46 |
| <i>Locus An16</i>   | 12        | PC = 40<br>TV = 47          | 40/47 = 0.85<br>47/50 = 0.94 |
| <i>Locus An20</i>   | 9         | PC = 47<br>TV = 50          | 47/47 = 1<br>50/50 = 1       |
| <i>Locus Spl120</i> | 9         | PC = 46<br>TV = 46          | 46/47 = 0.98<br>46/50 = 0.92 |

**Tabella 6.** Numero totale di alleli presenti, numero degli individui eterozigoti e la loro proporzione sul totale degli individui analizzati di ogni stock (eterozigosità) negli stock analizzati [tre individui dello stock PC non appartengono alla specie in esame].

Il contenuto delle tabelle 2, 3, 4 e 5 è stato riassunto per ogni animale da una stringa di 1 e 0 indicanti rispettivamente la presenza e l'assenza di ogni allele osservato negli stock analizzati. Su queste stringhe, di cui un esempio è riportato in figura 3, sono state condotte le analisi di variabilità genetica.

|      | <i>AfuG56</i> | <i>An16</i>             | <i>An20</i>       | <i>Spl120</i>     |
|------|---------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| PC01 | 0 1 1 0       | 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 | 0 1 0 1 0 0 1 0 0 | 1 1 0 0 0 0 1 0 0 |
| PC02 | 0 1 1 0       | 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 | 0 0 0 1 0 0 0 0 1 | 0 1 0 0 0 0 1 0 0 |
| PC03 | 0 1 1 0       | 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 | 0 0 0 1 0 0 0 0 1 | 0 1 0 0 0 0 1 0 0 |
| PC04 | 0 0 1 0       | 0 0 0 1 1 0 0 0 0 1 0 0 | 0 0 0 1 0 0 1 0 0 | 1 0 0 1 0 0 1 0 0 |

**Figura 3.** La caratterizzazione genetica di ogni singolo individuo è riassunta da una stringa di 1 e 0 indicanti rispettivamente la presenza e l'assenza di ogni allele osservato negli stock analizzati.

In tabella 7 sono riportati i valori di *band sharing* medio stimato sia globalmente sia considerando separatamente i diversi loci e i due stock di animali analizzati.

Allo scopo di verificare se l'analisi complessiva del *data set* potesse risentire di un contributo diverso dato dai singoli loci, il valore complessivo di *band sharing* è stato stimato sia mediando il contributo dei singoli loci analizzati separatamente sia analizzando tutti i loci simultaneamente. I valori di queste due analisi risultano essere molto simili, giustificando l'analisi simultanea di tutti i loci tipizzati.

Il *band sharing* medio *entro* stock risulta significativamente più elevato del *band sharing tra* stock: nessuno dei valori ottenuti sulla base di 1000 permutazioni è risultato maggiore o uguale alla differenza osservata tra *band sharing* medio ENTRO e TRA stock. Ciò è indice di una netta struttura genetica tra i due gruppi analizzati.

|  | <b>Locus<br/>AfuG56</b> | <b>Locus<br/>An16</b> | <b>Locus<br/>An20</b> | <b>Locus<br/>Spl120</b> | <b>Media<br/>loci</b> | <b>Totale<br/>loci</b> |
|--|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>Tutti gli<br/>Individui</i>             | 0.54                    | 0.33                  | 0.67                  | 0.33                    | 0.47                  | 0.48                   |
| <i>Solo PC</i>                             | 0.70                    | 0.43                  | 0.66                  | 0.52                    | 0.57                  | 0.58                   |
| <i>Solo TV</i>                             | 0.51                    | 0.40                  | 0.74                  | 0.38                    | 0.50                  | 0.53                   |
| <i>Media entro<br/>stock (PC e<br/>TV)</i> | 0.61                    | 0.42                  | 0.70                  | 0.45                    | 0.54                  | 0.56                   |
| <i>Tra PC e<br/>TV</i>                     | 0.48                    | 0.26                  | 0.64                  | 0.21                    | 0.40                  | 0.41                   |

**Tabella 7.** *Band sharing* medi calcolati rispettivamente su tutti gli individui in esame, solo all'interno dello stock di Piacenza, solo all'interno dello stock di Treviso, come media entro stock e tra i due stock. Le stime sono state effettuate per ciascuno dei loci microsatelliti considerato singolarmente. La stima complessiva inoltre è stata ottenuta sia mediando i valori ottenuti per singoli loci, sia analizzando i loci simultaneamente.

Per visualizzare più nel dettaglio la distribuzione della diversità genetica nei due stock, in figura 4 sono rappresentate graficamente su due dimensioni le distanze tra genotipi stimate ai 4 loci microsatellite. Si noti come gli individui, sulla base dell'informazione nucleare si dispongano in gruppi ben distinti e come vi sia una buona corrispondenza tra la distribuzione dell'informazione ottenuta con i

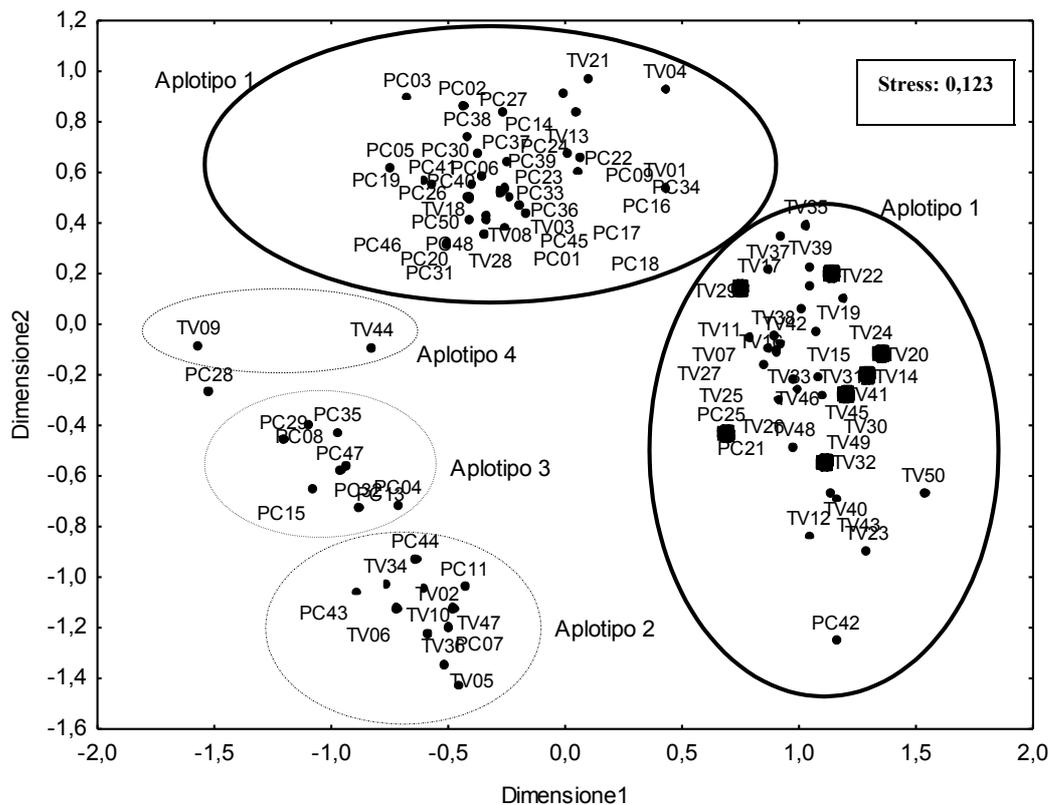
microsatelliti e i diversi aplotipi mitocondriali osservati precedentemente al mio tirocino.

Si noti inoltre come l'aplotipo mitocondriale di tipo 1 sia condiviso da due gruppi di animali nettamente distinti dall'informazione nucleare ottenuta mediante i microsatelliti.

Dei due principali gruppi di animali, uno è prevalentemente costituito da animali stabulati a Piacenza mentre l'altro da animali stabulati a Treviso.

Non essendoci alcuna informazione su quali siano i riproduttori utilizzati per la costituzione di questi stock, la presente analisi, se pur preliminare ed effettuata su un numero ridotto di loci, permette di affermare che i due stock sono costituiti prevalentemente da animali provenienti da incroci diversi, nonostante siano tutti identici per quanto riguarda l'informazione mitocondriale. L'aplotipo mitocondriale 1 è presente frequentemente negli individui di origine selvatica e non sorprende che venga osservato nella maggioranza di individui di entrambi gli stock che, presumibilmente, sono originati da un numero ridotto di incroci.

La presenza di altri gruppi minori di genotipi sembra indicare tuttavia che sia lo stock di Piacenza sia quello di Treviso abbiano al loro interno una certa diversità genetica, confortando sulla possibilità di utilizzarne almeno una parte come futuri riproduttori per la generazione di avannotti destinati al ripopolamento.



**Figura 4.** Multi Dimensional Scaling effettuato sulle distanze di Sorenson sui profili di presenza/assenza delle bande ai quattro loci analizzati. I cerchi racchiudono gli individui che condividono lo stesso aplotipo mitocondriale, analizzato in precedenza presso il laboratorio dove ho lavorato.

Le presenti analisi sono relative a soli 4 loci microsatelliti e non possono pertanto essere considerate definitive. L'analisi di altri 12 loci è in corso e se i risultati confermeranno quanto qui evidenziato in via preliminare, ciò permetterà di fornire importanti indicazioni su quali siano gli animali da incrociare per mantenere al meglio la variabilità genetica residua di questa specie endemica.

## RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale alla dott. Anna Forlani per l'aiuto, la disponibilità, il sostegno e le critiche. Ringrazio, inoltre, il dott. Lorenzo Zane per i preziosi consigli.

## BIBLIOGRAFIA

- Bemis W.E., Findeis E.K., Grande L. (1997). An overview of Acipenseriformes. *Environmental Biology of Fishes*. Vol. 48: 25-71.
- Chambers G.K., MacAvoy E.S. (2000). Microsatellite: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. Vol. 126: 455-476.
- Estoup A., Jarne P., Cornuet J.M. (2002). Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*. Vol. 11: 1591-1604.
- Fontana F. (1994). Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces). *Genome*. Vol. 37: 888-892.
- Fontana F., Colombo G. (1974). The chromosomes of Italian sturgeons. *Experientia*. Vol. 30: 739-742.
- Jarne P., Lagoda P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to population and back. *Trends in Ecology and Evolution*. Vol. 11: 424-429.
- Levinson G., Gutman G.A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 4: 203-221.
- Ludwig A., Congiu L., Pitra C., Fickel J., Gessner J., Fontana F., Patarnello T., Zane L. (2003). Nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in Adriatic sturgeon. *Molecular Ecology*. Vol.12: 3253-3264.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Markwith S.H., Stewart D.J., Dyer J.L. (2006). TETRASAT: a program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. Vol. 6: 586-589.
- McQuown E.C., Sloss B.L., Sheehan R.J., Rodzen J., Tranah G.J., May B. (2000). Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon: new primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser*. *Transactions of the American Fisheries Society*. Vol. 129: 1380-1388.
- Schlotterer C., Tautz D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. Vol. 20: 211-215.
- Strachan T., Read A.P. (2004). *Human molecular genetics*. Terza edizione. Garland Science, London and New York.

Welsh A.B., Blumberg M., May B. (2003). Identification of microsatellite loci in lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, and their variability in green sturgeon, *A. medirostris*. *Molecular Ecology Notes*. Vol. 3: 47-55.

Zane L., Patarnello T., Ludwig A., Fontana F., Congiu L. (2002). Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Molecular Ecology Notes*. Vol. 2: 586-588.