

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Scuola di Scienze

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**ANALISI DI PATERNITA' SULLA SPECIE *Anguilla*  
*anguilla* CON L'UTILIZZO DI MARCATORI LOCI  
MICROSATELLITI**

Tesi di laurea in Zoologia

Relatore

**Dott.ssa Ilaria Guarniero**

Presentata da

**Jacopo Grana**

Correlatore

**Dott. Oliviero Mordenti**

III Sessione

Anno Accademico 2014/2015



# Sommario

<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Introduzione</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Biologia ed ecologia di <i>Anguilla anguilla</i></b> .....	<b>7</b>
1.1.1 Ciclo biologico .....	9
<b>1.2 Distribuzione e stato dello stock</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3 Sfruttamento di <i>Anguilla anguilla</i></b> .....	<b>12</b>
<b>1.4 Studi di genetica molecolare</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 Genetica molecolare applicata a studi di popolazione .....	14
1.4.2 Genetica molecolare applicata a studi di parentela .....	15
<b>1.5 Riproduzione artificiale di <i>Anguilla anguilla</i></b> .....	<b>17</b>
<b>2 Obiettivi della tesi</b> .....	<b>20</b>
<b>3 Materiali e Metodi</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Disegno di campionamento</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 Campionamento dei tessuti</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3 Estrazione del DNA</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4 Scelta dei marcatori microsatelliti</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5 Genotipizzazione</b> .....	<b>25</b>
3.5.1 Sizing e Binning .....	27
<b>3.6 Analisi dati dei microsatelliti</b> .....	<b>27</b>
<b>3.7 Assegnamento di paternità</b> .....	<b>29</b>
<b>4 Risultati</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 Estrazione del DNA</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2 Genotipizzazione e analisi dei principali parametri di variabilità genetica</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3 Assegnamenti di paternità</b> .....	<b>34</b>
4.3.1 Assegnamenti di paternità nelle singole famiglie .....	36

<b>5</b>	<b>Discussioni e conclusioni .....</b>	<b>39</b>
5.1	Analisi genetiche .....	39
5.2	Assegnamenti di paternità .....	40
	<b>Bibliografia .....</b>	<b>43</b>

# Abstract

L'anguilla europea, *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1798), è una specie gravemente minacciata, sia da impatti diretti legati al sovrasfruttamento della specie a tutti gli stadi del ciclo vitale, che indiretti come l'urbanizzazione costiera e la perdita di habitat lagunari. Essendo questa specie caratterizzata da un ciclo biologico complesso e di lunga durata, le conseguenze della pesca e dell'antropizzazione risultano particolarmente evidenti. Negli ultimi 45 anni è stata documentata una riduzione del tasso di reclutamento di anguilla europea del 90%. Sulla base di questi dati l'UE ha stanziato dei fondi per stabilire programmi di ripopolamento, gestione e conservazione della specie. Lo scopo di questo studio è stato approfondire le modalità riproduttive di *A. anguilla*, per via indiretta attraverso un'analisi di paternità. Il Centro di ricerca universitario di Cesenatico (Laboratori di Acquacoltura ed Igiene delle Produzioni Ittiche – Università di Bologna) ha avviato le prime sperimentazioni su *A. anguilla*, al fine di mettere a punto un protocollo di riproduzione artificiale. Nell'estate 2015 i ricercatori hanno ottenuto sette riproduzioni spontanee in ambiente controllato, da queste sono state campionate casualmente e genotipizzate circa 40 larve per ogni mandata riproduttiva e i relativi riproduttori per condurre l'analisi di paternità. Dal momento che per ogni riproduzione è stata utilizzata sempre e soltanto una femmina e tre o quattro maschi, le analisi genetiche, condotte utilizzando nove loci microsatelliti, si sono focalizzate sull'individuazione dei padri e l'assegnamento di paternità è avvenuto con un livello di confidenza medio dell'89%. Dalle analisi effettuate è emerso che: 1) i maschi di questa specie, precedentemente sottoposti a stimolazioni ormonali per indurne la riproduzione e la fertilità, sono in grado di partecipare con successo a più di una riproduzione; 2) più esemplari riescono a fecondare gli ovociti di una sola femmina e sembrano stabilirsi modelli gerarchici di dominanza in quanto si è osservato generalmente che un maschio prevale sugli altri, generando da solo più del 50% della prole.

Questo studio pilota rappresenta, quindi, un punto di partenza per approfondimenti futuri sulle modalità riproduttive dell'anguilla europea.

# 1 Introduzione

## 1.1 Biologia ed ecologia di *Anguilla anguilla*

L'anguilla europea (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1798) è un pesce teleosteo appartenente all'ordine degli anguilliformi, caratterizzato da un corpo serpentiforme, eccezion fatta per la parte terminale del corpo che è compressa lateralmente (Figura 1).

L'ordine degli anguilliformi comprende circa 600 specie divise in 26 famiglie. Tra queste le più note sono gli Anguillidi, i Congridi e i Murenidi. Una delle caratteristiche peculiari di quest'ordine è quella di avere lo stadio larvale di leptocéfalo, di aspetto simile a una foglia di salice, il cui corpo è fortemente compresso lateralmente e completamente trasparente. Dal punto di vista morfologico *A. anguilla* presenta alcune caratteristiche distintive: una bocca terminale con mandibola prognata, dotata di piccolissimi denti conici e pinne pettorali ben sviluppate, di forma rotondeggiante. Il muso è allungato e depresso e la zona olfattiva comprende quattro narici di cui due inalanti localizzate all'apice della mascella e due esalanti situate vicino all'occhio. Tra le aperture è presente la rosetta olfattoria, formata da un gran numero di lamelle che costituiscono un'ampia superficie molto sensibile agli stimoli. La cavità olfattoria è ricoperta da ciglia, il cui movimento permette il continuo flusso d'acqua sulle lamelle. Questi adattamenti indicano che l'olfatto è il senso principale dell'anguilla, la vista al contrario non è molto sviluppata (Tesch, 2003).

L'anguilla europea è presente in un'ampia gamma di habitat acquatici (fiumi, canali, estuari, laghi, stagni e lagune), in relazione alla sua grande adattabilità alle diverse condizioni ambientali. Si tratta infatti di una specie eurialina, che ben sopporta anche variazioni di temperatura e ridotte concentrazioni di ossigeno. È inoltre in grado di resistere a lungo fuori dall'acqua grazie alla respirazione cutanea e all'ampia vascolarizzazione della pelle (Tesch, 2003). Allo stadio larvale l'anguilla è un pesce di profondità; in seguito si comporta come un pesce pelagico avvicinandosi alla superficie per compiere la lunga migrazione verso le

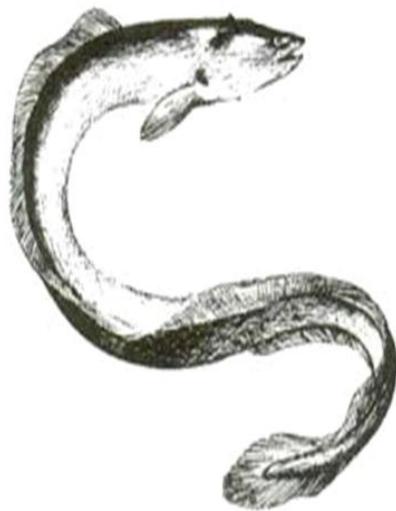
coste mediterranee. In mare aperto è un pesce di fondo e predilige i fondali mobili nei quali si infossa nei periodi invernali. Nella zona costiera la si può trovare nelle praterie di *Posidonia oceanica* e presso i porti, dove trova riparo durante le mareggiate.

Nella fase trofica, cioè nel periodo di maggior accrescimento, la si trova sia in acque dolci che salmastre ed è in grado di risalire i fiumi.

L'anguilla è una specie notturna, durante le ore più calde del giorno rimane infossata nel fango e ve ne esce al calar del sole per andare alla ricerca di cibo.

E' un animale onnivoro la cui dieta varia in relazione alle dimensioni e allo stadio di sviluppo in cui si trova. Le ceche e i ragani (stadi giovanili) si alimentano di piccoli organismi bentonici come crostacei, gasteropodi, gamberi, larve e insetti. Crescendo, sviluppano tendenze ittiofaghe (pesci, avanotti, uova) anche se conservano preferenze bentofaghe (anellidi, molluschi, crostacei; Tesch, 2003).

La densità di popolazione nei diversi habitat continentali è dovuta essenzialmente alle modalità di invasione e colonizzazione da parte delle ceche. In Italia, le densità più elevate si osservano in prossimità delle lagune e delle aree estuarine dei maggiori fiumi.



Phylum : Chordata  
Subphylum: Vertebrata  
Superclasse : Osteichthyes  
Classe Actinoptergii  
Sottoclasse: Neoptergii  
Infraclasse: Teleostei  
Superordine : Elopomorpha  
Ordine: Anguilliformes  
Sottordine: Anguilloidei  
Famiglia: Anguillidae  
Genere: Anguilla  
Specie: Anguilla

**Figura 1 - *Anguilla anguilla* (foto: [www.biologiamarina.eu](http://www.biologiamarina.eu)).**

### 1.1.1 Ciclo biologico

L'Anguilla Europea è una specie ittica catadroma il cui ciclo biologico è unico ed è stato indagato per la prima volta dallo studioso danese Johannes Schmidt (1922) (Figura 2). In seguito è stato approfondito con maggior chiarezza attraverso campagne oceanografiche condotte da McCleave e Tesch negli anni '80 e successivamente nel 2006 e 2007 (ICES, 2008).

Il ciclo biologico di *A. anguilla* inizia con la deposizione delle uova tra Marzo e Luglio, nell'areale di riproduzione (mar dei Sargassi). Da queste si originano i leptocefali che vengono trasportati dalla Corrente del Golfo attraverso l'Atlantico, raggiungendo le coste europee e nord africane. Questa migrazione passiva ha una durata presunta di circa due anni anche se studi più recenti compiuti sugli otoliti delle ceche suggeriscono che la migrazione possa avvenire in meno di un anno (Lecomte-Finiger, 1992; Desaunay e Guérault, 1997; Arai et al., 2000; ICES, 2008). Una volta giunti al limite della piattaforma continentale europea, i leptocefali compiono una metamorfosi diventando ceche trasparenti. In questo stadio la ceca è in grado di muoversi attivamente. Il corpo assume la classica forma serpentiforme, gli occhi sono pigmentati e funzionali, le pinne sono ben definite e compaiono le prime scaglie lungo la coda. Inizia così la risalita verso le acque interne: fiumi, valli salmastre e laghi. Una volta entrate negli estuari e nelle valli costiere vi permangono per un periodo variabile di 6-10 anni. E' in questa fase, detta anche trofica, che le anguille subiscono una nuova metamorfosi verso lo stadio di "anguille gialle". La maturazione sessuale viene raggiunta in un lasso di tempo che può variare tra i 4 e 20 anni (Tesch, 2003). Durante questo periodo vanno incontro a nuova metamorfosi nel processo definito argentinizzazione, che determina la fine della fase di crescita (anguilla gialla) e l'inizio della fase migratoria (anguilla argentina; Durif et al., 2009).

Una volta avviato il processo di argentinizzazione, le anguille argentine iniziano una lunga migrazione verso il mar dei Sargassi in cui si osserva il completamento del processo di maturazione (Palstra et al., 2007). Le gonadi si sviluppano completamente, le narici si dilatano, gli occhi aumentano di diametro, la testa assume una forma più ristretta, scaglie e linea laterale diventano più marcate ed evidenti.

Seguendo le correnti equatoriali, arrivano al mar dei Sargassi 6-7 mesi più tardi per riprodursi e poi morire (Van Ginneken et al., 2005; Figura 3).

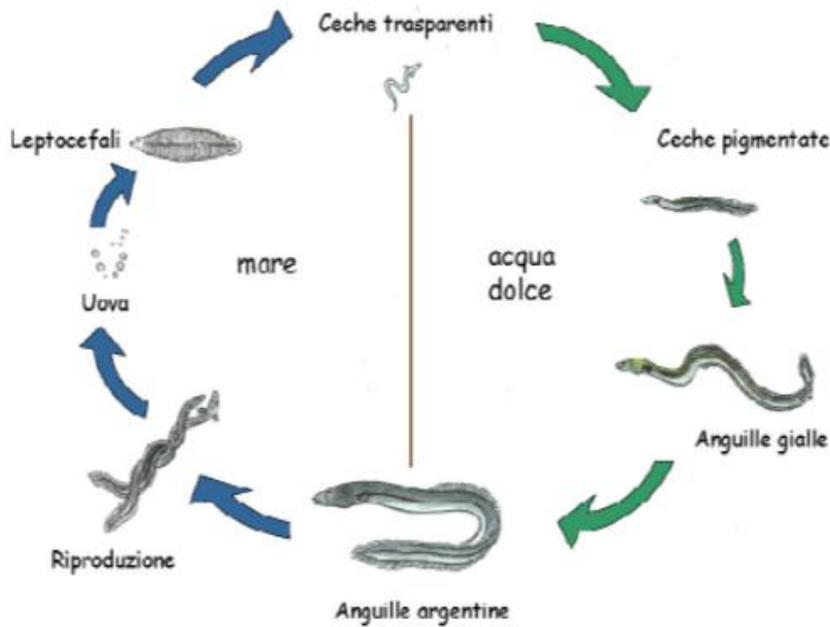


Figura 2 - Ciclo biologico di *Anguilla anguilla* (Ciccotti 2005).

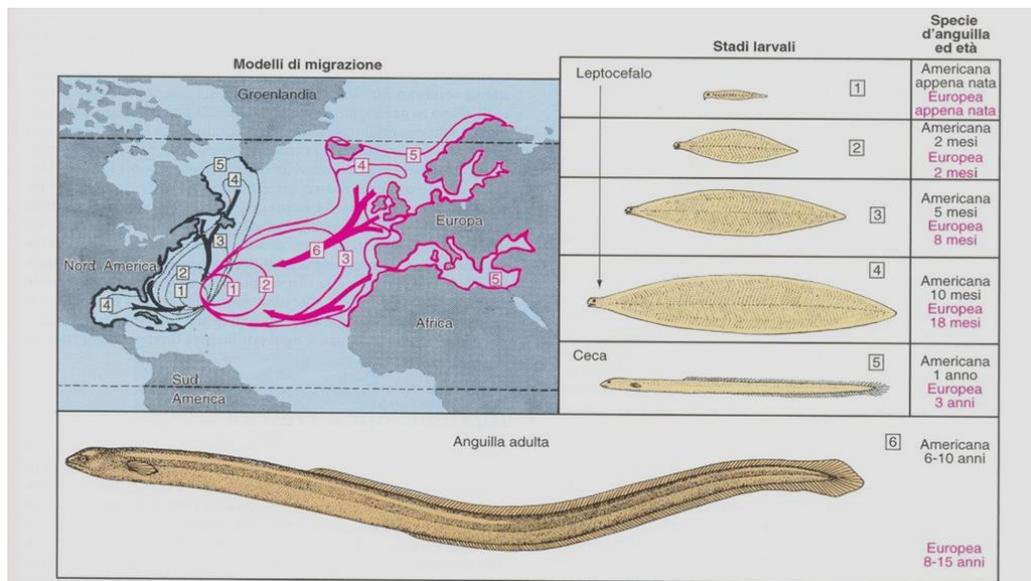


Figura 3. Rotta migratoria dell'anguilla europea (*Anguilla anguilla*) e dell'anguilla americana (*Anguilla rostrata*), stadi larvali (Diversità Animale, Cleveland P., 2012).

## 1.2 Distribuzione e stato dello stock

*Anguilla anguilla* è diffusa in tutto il continente europeo e nei paesi del bacino mediterraneo, dai paesi scandinavi fino alle coste mediterranee del nord Africa e del Medio Oriente. La sua distribuzione è la diretta conseguenza del gioco delle correnti, responsabili del trasporto delle larve (leptocefali) attraverso l'Oceano Atlantico (Tesch, 2003). In Italia è presente in tutte le acque dolci e salmastre della penisola.

La regione intorno al mar Nero costituisce l'estremo limite orientale di distribuzione della specie (ICES, 2008) e la presenza dell'anguilla nei sistemi fluviali connessi al mar Nero, nel bacino del Danubio e nei laghi della Russia centrale, è da considerarsi sporadica e probabilmente è dovuta alle pratiche di ripopolamento che vengono effettuate sin dalla fine del 1800 (Tesch, 2003).

Per quanto riguarda lo stato dello stock, negli anni si è osservato una costante diminuzione del reclutamento a livello europeo (Moriarty e Dekker, 1997; Dekker 1999; ICES, 2001; Feunteun, 2002; ICES 2006). Questa diminuzione è stata documentata attraverso serie storiche di dati ottenuti tramite monitoraggi in tutto il continente, a partire dagli anni '80 (Moriarty e Dekker, 1997). Inoltre, i dati relativi al pescato hanno evidenziato una notevole riduzione nella cattura di esemplari adulti (Dekker, 1999; ICES, 2002). Stime risalenti alla fine degli anni '90 hanno quantificato a livello europeo in 22-30.000 t le catture totali, di cui circa 920 t di ceche (Moriarty, 1996), ossia circa il 2% in termini di peso, che si traduce in 2 miliardi di reclute in termini numerici (Feunteun, 2002). Il declino del reclutamento osservato in Europa trova conferma anche per l'Italia, come dimostrano dati relativi al monitoraggio effettuato alla foce del Tevere (Ciccotti et al., 2000; Ciccotti, 2005). Gli effetti del ridotto reclutamento si riflettono sullo stock di anguille adulte anche se non sono facilmente dimostrabili. Essi infatti necessitano di indagini a lungo termine nei singoli bacini idrografici, in molti dei quali vengono praticati ripopolamenti proprio per sostenere la pesca a livello locale.

Il Comitato Internazionale per l'Esplorazione del Mare si è espresso confermando lo stato critico in cui verte lo stock di *Anguilla anguilla*, sottolineando la necessità di adottare al più presto adeguate misure di tutela (ICES, 2013). Il comitato ha

inoltre evidenziato che il leggero aumento nel reclutamento annuale di ceche (2,5% nel mare del Nord e nel Mediterraneo), non incide sulla migrazione delle anguille adulte nel breve periodo. Vista la lunga durata del ciclo biologico di questa specie, la percezione dello stato dello stock rimane dunque critica.

L'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN) nel 2014 ha inserito *Anguilla anguilla* tra le specie a grave rischio di estinzione. Sulla base dei dati relativi alle dimensioni della popolazione l'IUCN ha verificato una notevole riduzione del tasso di reclutamento della specie durante gli ultimi 45 anni (90-95%).

### **1.3 Sfruttamento di *Anguilla anguilla***

La pesca dell'anguilla viene esercitata in tutto l'areale di distribuzione della specie e riguarda gli stadi giovanili e pre-adulti (ceca, anguilla gialla in accrescimento, anguilla argentina non ancora matura sessualmente). Essa viene esercitata in una grande varietà di ambienti (laghi, fiumi, estuari, lagune costiere) con molteplici tecniche, anche in relazione a tradizioni locali. Le attività di pesca nei singoli paesi sono correlate alla disponibilità di anguille nei vari stadi di maturazione e dalle tradizioni di consumo. Laddove vi è un'intensa rimonta di ceche, come nei grandi estuari francesi del Golfo di Biscaglia, in Spagna e Portogallo, la pesca delle ceche viene eseguita in modo professionale per soddisfare sia la richiesta come alimento che per fornire novellame agli allevamenti. Le anguille gialle sono target di pesca in tutta l'Europa e Nord Africa. Nelle regioni scandinave e nelle lagune mediterranee la cattura della specie allo stadio di argentina avviene lungo il corso dei fiumi durante la migrazione verso il mare. In generale la pesca professionale costituisce solo una piccola frazione delle catture totali, meno del 5% (Dekker, 2002).

Per quanto riguarda più specificamente l'Italia, la pesca nelle acque interne è presente nei principali fiumi e laghi della penisola (Ciccotti et al., 2000). La maggior parte delle catture, per lo più anguille gialle, viene effettuata nei grandi laghi alpini del Nord Italia, nei laghi vulcanici dell'Italia centrale e in alcuni fiumi. La pesca delle ceche viene praticata sulle coste Tirreniche dell'Italia

centrale (Toscana, Lazio, Campania) e nelle valli adiacenti al fiume Po (Comacchio e Lesina) presso fiumi, foci e canali. I pescatori sono generalmente equipaggiati con barche e strutture in grado di mantenere vivo il pescato. In Italia e nel Mediterraneo, la pesca viene effettuata principalmente in ambiente lagunare, dove tradizionalmente si sfruttano le specie catadrome, come appunto *Anguilla anguilla*. In particolare, per quanto riguarda i giovanili le catture avvengono durante la “montata” (arrivo dal mare) mentre per quanto riguarda gli adulti, durante la migrazione inversa, verso il mare.

La cattura di anguille argentine si effettua utilizzando il lavoriero: uno sbarramento a forma di “V” situato nel canale di comunicazione tra mare e laguna (Figura 4). La sua struttura (forma, numero di camere), dimensione e materiale (canne, cemento, metallo) si sono evoluti nei secoli e differiscono tuttora da regione a regione e tra paesi, in relazione alle tradizioni locali e al livello tecnologico raggiunto. Tuttavia, il principio su cui si basa il suo funzionamento è sempre il medesimo: si tratta di una barriera che intercetta il pesce quando tenta di tornare verso il mare. La maggior parte delle catture ha luogo in inverno, in coincidenza con la “smontata”, ossia col ritorno degli adulti verso il mare.

La quantità di anguille presenti in ambiente lagunare dipende in primo luogo dalla qualità ambientale e secondariamente dal grado di reclutamento (Ciccotti et al., 2000).



**Figura 4 - Lavoriero per la cattura di *Anguilla anguilla***  
(foto: [www.parcodeltadelpo.it](http://www.parcodeltadelpo.it)).

## **1.4 Studi di genetica molecolare**

La genetica molecolare ha profondamente modificato il modo di fare ricerca. La rivoluzione molecolare è iniziata durante gli anni '80, grazie all'utilizzo degli enzimi di restrizione e della Reazione a Catena della DNA Polimerasi, che permettono di studiare in modo rapido e relativamente poco costoso la variabilità genetica direttamente a livello del DNA. I dati molecolari vengono utilizzati per numerose applicazioni, che possono essere raggruppate in due categorie principali. La prima si occupa di studiare le popolazioni e comprende il vasto settore della caratterizzazione genetica finalizzata per esempio alla risoluzione di incertezze tassonomiche, alla tutela della biodiversità, ecc. La seconda si riferisce agli individui e indaga le relazioni parentali come la paternità e la kinship (Lo Presti et al., 2009).

### **1.4.1 Genetica molecolare applicata a studi di popolazione**

La genetica di popolazione permette di descrivere lo stato di una popolazione mediante lo studio delle sue frequenze alleliche. Negli ultimi decenni i marcatori molecolari sono stati ampiamente utilizzati per definire le strutture genetiche in acquacoltura. Ad esempio, Hansen et al. (1997), hanno utilizzato il mtDNA per rilevare le differenze tra le popolazioni di trote allevate e selvatiche, dimostrando una riduzione della variabilità genetica nelle popolazioni allevate dovuta al ridotto numero di femmine in allevamento. Anche studi successivi basati sull'analisi del DNA microsatellite hanno mostrato come gli stock di trote allevate sono geneticamente poco variabili e decisamente differenti da quelli selvatici (Gross et al., 2007). I marcatori molecolari sono ampiamente utilizzati nella genetica di conservazione allo scopo di fornire gli strumenti atti a preservare la variabilità genetica, fondamentale per la sopravvivenza delle specie.

Indagini effettuate sulla struttura genetica della popolazione di *A. anguilla* (Wirth e Bernatchez, 2001; Maes et al., 2006) parevano fornire risultati discordanti, che non comprovavano in modo definitivo l'ipotesi di panmissia. Tuttavia studi più recenti, basati su piani di campionamento più robusti, danno invece supporto all'ipotesi di panmissia. Palm et al. (2009) hanno comparato anguille argentine di

età nota del sud e del nord Europa (Italia e mar Baltico) e nonostante la notevole dimensione del campione (1200 anguille), non hanno osservato segni di differenziamento genetico. Un secondo lavoro condotto da Pujolar et al. (2009) ha evidenziato che le differenze tra campioni di ceche provenienti da diverse regioni (Mediterraneo e Atlantico) non sono significative. L'omogeneità nella composizione genetica che si riscontra tra regioni diverse è secondo gli autori da attribuirsi alla presenza di un unico sito riproduttivo. Allo scopo di confermare l'ipotesi di panmissia Als et al. (2011) hanno genotipizzato con gli stessi marcatori microsatelliti le ceche campionate in diversi siti, dall'Islanda al Marocco. In questo studio non è stato riscontrato differenziamento genetico significativo.

#### **1.4.2 Genetica molecolare applicata a studi di parentela**

Le analisi di parentela possono essere effettuate sulla base di marcatori molecolari trasmessi dai genitori alla prole in maniera mendeliana. Lo svantaggio dei marcatori molecolari è il costo relativamente alto, che può essere contenuto limitando il numero di marcatori, compatibilmente con il massimo livello di accuratezza (O'really et al., 1996; Fishback et al., 1999; Porta et al., 2006). Tuttavia, alcuni tipi di marcatori sono più idonei di altri e in particolare i marcatori migliori per le analisi di parentela appartengono alla classe del DNA microsatellite (Pemberton, 2009). Si tratta di marcatori altamente polimorfici e codominanti. I microsatelliti utilizzati per analisi di parentela possono essere dinucleotidici, trinucleotidii o tetranucleotidici, ossia il *repeat motif* può essere costituito da due, tre o quattro coppie di basi ripetute in tandem.

Per quanto i microsatelliti siano riconosciuti come i marcatori più adatti per questo tipo di analisi (Pemberton, 2009) è possibile utilizzarne anche altri due: SNPs e AFLPs. Mentre per i microsatelliti è sufficiente genotipizzare un numero relativamente basso di loci; AFLPs e SNPs necessitano di un elevato numero di loci caratterizzati da bassi livelli di polimorfismo (2 alleli per locus). Nel caso di AFLPs e SNPs il basso grado polimorfismo associato all'utilizzo di un numero non congruo di marcatori, potrebbe portare a un'assegnazione sbagliata nelle

analisi di parentela. Ad esempio, nel caso vi sia un candidato genitore eterozigote per tutti i loci, questo sarebbe compatibile con tutta la prole (Jones et al., 2010).

Indagini sulla trota iridea *Onchorhynchus mykiss* e sul rombo *Scophthalmus maximus* hanno evidenziato che l'utilizzo di otto loci microsatelliti può consentire un grado di affidabilità del 95% (Arnaud et al., 1998).

Studi sul salmone atlantico, *Salmo salar* hanno dimostrato come la precisione di assegnazione di una larva a una coppia parentale dipende non solo dal numero e dal grado di polimorfismo dei marcatori microsatelliti, ma anche dal numero di potenziali coppie tra cui scegliere (numero di candidati padri e numero di candidate madri): maggiore è il numero delle possibili coppie presenti nel programma di selezione e maggiore sarà il numero di marcatori microsatelliti necessari per effettuare correttamente gli assegnamenti (Norris et al., 2000).

In uno studio sulla cozza *Perna canaliculus*, sono stati vagliati 49 microsatelliti, per poi selezionarne 10 caratterizzati da alti valori di polimorfismo al fine di attribuire la paternità in maniera corretta (MacAvoy et al., 2008).

Studi sul gambero *Penaeus japonicus* hanno dimostrato che è necessario l'utilizzo di almeno cinque loci per assegnare la progenie in maniera corretta (95% grado di confidenza) con un disegno di campionamento formato da almeno 30 offsprings, dove tutti i possibili padri sono stati campionati e la madre è nota (Jerry et al., 2004). Alcuni studi di analisi di paternità mettono in evidenza gli aspetti della competizione riproduttiva. Ad esempio un'analisi di paternità condotta su 1340 larve di merluzzo divise in sei batch, ovvero sei diverse deposizioni, mediante l'utilizzo di quattro loci microsatelliti, ha portato nuove informazioni sui fattori coadiuvanti il successo riproduttivo dei maschi di questa specie. Si è evidenziato come più di un maschio partecipasse a una singola riproduzione fecondando le uova e come i maschi di taglie maggiori avessero un successo di fecondazione più alto rispetto ai maschi di taglia inferiore (Bekkevold et al., 2002).

Infine, un recente studio condotto sul mollusco *Crassostrea virginica* ha dimostrato come lo sviluppo di sistemi multiplex permetta l'assegnazione di parentela in maniera rapida ed altamente efficace. Sono stati selezionati 16 microsatelliti sulla base di polimorfismo e range allelico, questi hanno permesso di assegnare 160 offsprings alle relative famiglie (Wang et al., 2010).

## 1.5 Riproduzione artificiale di *Anguilla anguilla*

Nel 2010, il Centro di ricerca universitario di Cesenatico (Laboratori di Acquacoltura ed Igiene delle Produzioni Ittiche – Università di Bologna) ha avviato le prime sperimentazioni su *Anguilla anguilla*, al fine di mettere a punto un progetto che potrebbe assicurare la conservazione della specie: un protocollo di riproduzione artificiale per l'anguilla europea. Il primo obiettivo raggiunto dai ricercatori è stato riuscire a indurre l'ovulazione in 8 esemplari di femmine argentine utilizzando un protocollo in parte simile a quello adottato da altri ricercatori per la specie *Anguilla japonica*. Il procedimento prevede l'iniezione di estratto di carpa pituitaria nei riproduttori per 16-20 settimane, con dosi crescenti (10, 20, 30, 40 mg CPE/kg peso corporeo).

Una parte dei riproduttori è stata tenuta alla luce naturale, un'altra al buio e in entrambi i gruppi, la maturazione finale degli ovociti è avvenuta in seguito ad un'iniezione di DHP alle dosi di 2 mg/g peso corporeo. Nel gruppo mantenuto al buio, una femmina (Figura 5) ha ovulato entro 12 h dall'iniezione di DHP e le altre 3 tra le 12 e le 36 h. Nel gruppo mantenuto alla luce solo 2 anguille su 4 hanno ovulato (Mordenti et al., 2012). L'anno seguente (2011), i ricercatori hanno praticato la riproduzione artificiale a secco che consiste nella raccolta separata delle uova dalle femmine e del liquido seminale dei maschi. Prima di ogni riproduzione, un campione di uova e di liquido seminale viene prelevato (*stripping*) e osservato al microscopio, per valutare il grado di maturazione (uova) e di motilità (spermatozoi) ed individuare il momento migliore per la fecondazione. A questo punto le uova e il liquido seminale vengono miscelati in ambiente privo di acqua. Con questa procedura gli studiosi hanno per la prima volta ottenuto uova feconde e larve vitali.

Il secondo traguardo di questa ricerca è stato ottenere una riproduzione spontanea in cattività di *A. anguilla*, utilizzando un nuovo tipo di vasca, su progetto degli stessi ricercatori. Questa vasca è dotata di un ambiente per l'incubazione e di un sistema di raccolta automatico delle uova. Durante le sperimentazioni, sono state scelte 12 femmine di *A. anguilla* allo stadio di argentina e indotte all'ovulazione

in seguito alle iniezioni di CPE e DHP. Ogni femmina è stata introdotta nelle nuove vasche dotate di sistema di ricircolo chiuso per sedici ore con quattro maschi in fase riproduttiva, così da ottenere una emissione spontanea dei gameti.

La riproduzione è stata testata con sei femmine in condizioni di basso flusso idrico e con sei femmine ad alto flusso. Nell'80% dei casi è avvenuta una riproduzione spontanea e le uova sono state trasferite automaticamente all'incubatoio. Il sistema ad alto flusso si è rivelato inadatto allo sviluppo embrionale delle uova, che non sono riuscite a svilupparsi (Mordenti et al., 2013).

Tra il 2014 ed il 2015 il team di ricercatori ha condotto uno studio per confrontare la riproduzione artificiale a secco e quella spontanea. Per la sperimentazione sono state utilizzate 18 femmine argentine. Tutti gli individui sono stati sottoposti al trattamento ormonale, con iniezioni di CPE e con un'iniezione finale di DHP per indurre la riproduzione. In seguito, 9 femmine sono state destinate alla riproduzione a secco (STR-group) e altre 9 alla riproduzione spontanea (SPT-group).

Quest'ultima è stata ottimizzata modificando il sistema di vasche, in modo da permettere lo sviluppo embrionale e favorire la produzione di larve. La *sex ratio* è stata mantenuta 1F/4M. Il numero di uova per femmina nel SPT-group è risultato significativamente maggiore rispetto a quello osservato nel STR-group. Il tasso di fecondazione nel SPT-group era del 51% per quanto riguarda il peso di uova fertili sul peso totale, e del 78% per quanto riguarda il tasso di ovociti completamente trasparenti. Dati notevolmente superiori ai corrispondenti valori di 8% e 18% nel STR-group. Si evince, quindi, che la riproduzione spontanea è decisamente più efficace in termini di qualità e quantità di ovociti prodotti (Di Biase e Mordenti, 2015).

I campioni di larve (Figura 5) utilizzati per questo studio derivano dalla riproduzione spontanea ottimizzata in questa ricerca.



**Figura 5 - Riproduzione artificiale: ovociti maturi, femmina in fase di deposizione e leptocefalo (foto: Oliviero Mordenti).**

## 2 Obiettivi della tesi

Lo scopo di questa tesi è approfondire le conoscenze circa le modalità riproduttive di *Anguilla anguilla* in condizioni seminaturali, per via indiretta tramite assegnamento di paternità. I campioni utilizzati per questo studio sono stati forniti dal Laboratorio di Acquacoltura di Cesenatico. In primo luogo, attraverso la genotipizzazione sulla base di un set di marcatori microsatelliti specie-specifici, ci si è dati il compito di individuare gli individui maschi responsabili della fecondazione degli ovociti ottenuti per induzione ormonale.

Successivamente si è approfondita per via indiretta la dinamica dell'accoppiamento, allo scopo di osservare se un solo esemplare maschio oppure più individui avessero avuto successo nella fecondazione degli ovociti. Si è indagata, infine, la possibilità per un maschio di riprodursi più volte, dal momento che sette dei 20 maschi riproduttori sono stati utilizzati in via sperimentale per due mandate riproduttive.

## 3 Materiali e Metodi

### 3.1 Disegno di campionamento

Gli accoppiamenti sperimentali qui analizzati sono avvenuti presso i Laboratori di Acquacoltura di Cesenatico (Università di Bologna). Tra il 9 Aprile 2015 e il 9 Giugno 2015 sono state effettuate sette riproduzioni in ambiente controllato. Per ogni riproduzione è stata mantenuta una sex ratio 4M/1F, tranne in un caso in cui la sex ratio utilizzata è stata 3M/1F (Tabella 1). Ad ogni riproduzione sono state campionate 40 larve di 1-2 giorni di vita (Figura 6). In totale sono stati genotipizzati 20 maschi (intero pool di candidati padri), sette femmine e 280 larve.

**Tabella 1 - Elenco delle riproduzioni.**

<b>Data</b>	<b>F</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>N°Larve</b>
09-apr-15	NOG-44	126J	147J	128J	139J	40
20-mag-15	BON-43	141J	126J	133J	147J	40
28-mag-15	BON-38	134J	135J	142J	148J	40
28-mag-15	BON-40	19J	20J	28J	29J	40
02-giu-15	NOG-37	20J	21J	23J	27J	40
09-giu-15	NOG-30	23J	27J	22J		40
09-giu-15	BON-32	28J	25J	24J	29J	40

**F: femmina utilizzata per la riproduzione.**

**M(1-2-3-4): maschi utilizzati per la riproduzione.**



**Figura 6 - Larva ad un giorno di vita.**

### **3.2 Campionamento dei tessuti**

Per evitare contaminazioni dei campioni con altro DNA è importante indossare guanti, utilizzare materiale sterilizzato, pulire l'attrezzatura utilizzata per il campionamento da eventuali residui di tessuto fra un campione e l'altro e depositare i singoli campioni in contenitori etichettati. Per evitare la degradazione dei campioni, si deve procedere quanto prima allo stoccaggio in EtOH al 90% a -20°C. Per ognuno dei 27 riproduttori è stata prelevata in condizioni di sterilità una frazione di pinna pettorale di circa 1 cm<sup>3</sup>, questa è stata trasferita in un tubo da 1,5 ml e ricoperta di EtOH al 90%. I campioni sono stati conservati in congelatore a -20°C per la fase successiva: l'estrazione del DNA. Per ogni evento riproduttivo le larve sono state raccolte manualmente mediante un retino a maglie fini (500 µm). Una volta raccolte, le larve sono state sopresse in EtOH al 20% e successivamente trasferite e conservate in EtOH al 90% (Figura 7).



**Figura 7 - Prelievo larvale.**

### 3.3 Estrazione del DNA

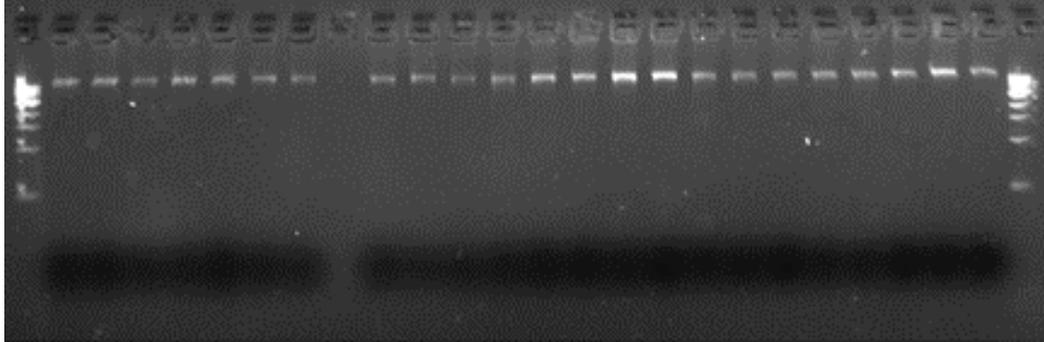
Per quanto riguarda gli adulti, il DNA genomico è stato estratto a partire da 20 mg di tessuto mentre nel caso delle larve, dalla totalità dell'individuo (peso variabile tra i 10 ai 20 mg).

Il DNA è stato estratto con il kit SV Wizard Genomic DNA Purification System (PROMEGA) seguendo il protocollo del produttore. Questo kit si basa sull'utilizzo di una resina altamente affine alle molecole di DNA che verranno eluite successivamente.

Protocollo di estrazione:

- 1. LISI.** I tessuti campionati vengono messi a reagire con 275  $\mu$ l di soluzione di digestione *Master Mix*. I campioni sono lasciati per 16-18 ore a bagnomaria a 55°C.
- 2. BINDING E WASHING del DNA.** Ad ogni campione vengono aggiunti 250  $\mu$ l di Wizard® SV Lysis Buffer e trasferiti nella binding plate, dotata di filtri a resina. A questo punto si aziona la pompa a vuoto per forzare il passaggio del lisato attraverso la resina stessa e si effettuano 3 lavaggi con una Washing Solution a base di EtOH per garantire la perfetta pulizia dei campioni da residui di varia natura. Infine si lascia evaporare completamente l'etanolo della Washing Solution, che potrebbe inibire la successiva fase di amplificazione, lasciando agire la pompa a vuoto per sei minuti.
- 3. ELUIZIONE.** Questa fase avviene in due tempi con l'ausilio di un supporto idoneo. La prima eluizione viene fatta in 120  $\mu$ l di Elution Buffer, una soluzione in grado di eluire le molecole di DNA sottraendole dalla resina, per 2 minuti a temperatura ambiente. Passati 2 minuti, la pompa viene azionata per trasferire l'eluito contenente il DNA nella collecting plate. Questo viene successivamente trasferito in una provetta da 0,5 ml, liberando così la collecting plate per la seconda eluizione che viene fatta in 100  $\mu$ l di Elution Buffer, secondo un protocollo identico a quello seguito per la prima eluizione. Il DNA così ottenuto viene conservato a -20°C per la successiva genotipizzazione.

Per verificare il successo dell'estrazione del DNA è stata utilizzata l'elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio all'1,5% (Figura 8).



**Figura 8 - Corsa elettroforetica del DNA su gel d'agarosio al 1,5%**

### **3.4 Scelta dei marcatori microsatelliti**

Per questo studio sono stati utilizzati 12 loci micro satelliti, specie-specifici per *Anguilla anguilla*. In particolare nove loci sono stati selezionati da uno studio precedente di Pujolar et al. (2009) e tre loci da quello di Daemen et al. (2001) (Tabella 2).

**Tabella 2 - Elenco loci microsatelliti utilizzati per le analisi** Per ogni locus è indicato il codice di accesso di Gen Bank (N°G.BANK), il numero di alleli per locus (Na), il range allelico (R), la temperatura di annealing espressa in gradi centigradi (T(A)°C) e il tipo di marcatura. (\*: Daemen et al., 2001; §: Pujolar et al., 2009).

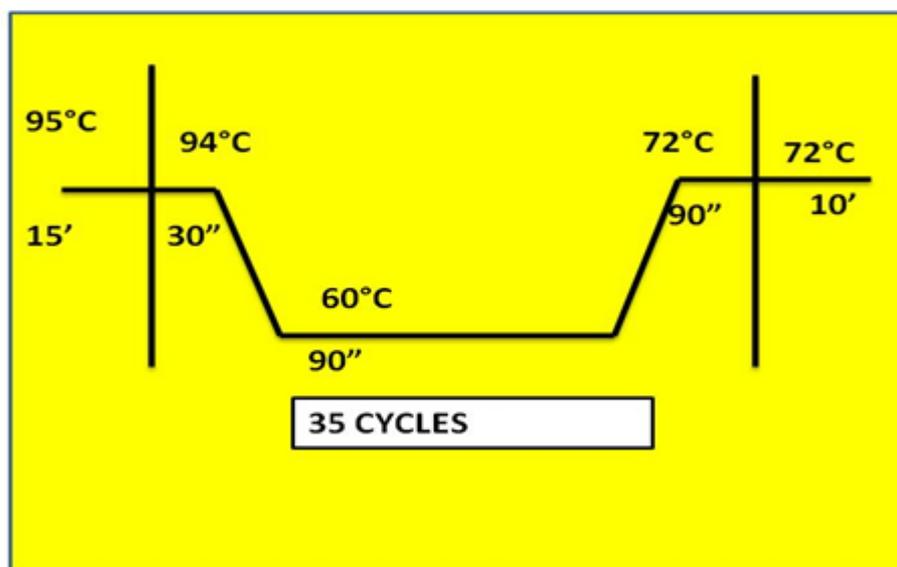
		LOCUS		N°G.BANK	Na	R	T(A)°C	MARCATURA
<b>set-01</b>	1	Aro054	§	42137	18	141-177	60	PET
	2	AAN22B09	§	42138	12	255-283	60	VIC
	3	AAN06E24	§	42137	11	86-110	60	6FAM
	4	AAN24A09	§	42137	14	169-223	60	NED
<b>set-02</b>	5	AAN26N13	§	42137	11	92-108	60	PET
	6	AAN41E24	§	42137	9	166-190	60	VIC
	7	AAN42O08	§	42138	9	213-235	60	6FAM
	8	AAN44B22	§	42138	9	87-107	60	NED
<b>set-03</b>	9	Ang151	§	42151	19	161-213	60	PET
	10	Aan01	*	42151	10	214-250	60	VIC
	11	Aan02	*	42158	25	168-182	60	6FAM
	12	Aan04	*	42171	11	127-255	60	NED

### 3.5 Genotipizzazione

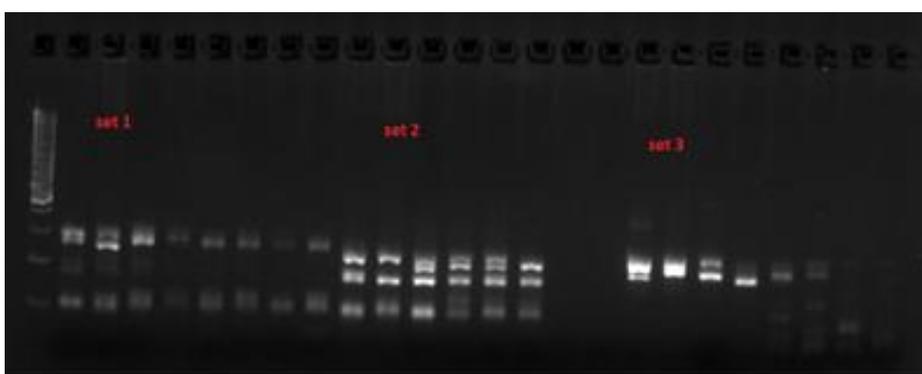
Le amplificazioni geniche dei 12 loci scelti precedentemente ottimizzati sono state effettuate tramite il kit QIAGEN MULTIPLEX. Il kit, specifico per l'amplificazione dei loci microsatelliti, permette di ridurre al minimo gli errori di stuttering. L'utilizzo del sistema multiplex riduce i tempi di lavoro, migliora la gestione della reazione e aumenta la riproducibilità dell'esperimento. Inoltre, nessuna attività polimerasica avviene a temperatura ambiente dal momento che l'enzima DNA-polimerasi viene attivato solo dopo uno step di 15 minuti a 95°C, impedendo così la formazione di primer-dimers e limitando quella di aspecifici.

Le reazioni di PCR sono state eseguite in un termociclatore Biometra, in un volume finale di 10 µl di cui 2 µl di DNA, 5 µl di Master Mix Qiagen (contenente una concentrazione pre-ottimizzata di HotStarTaq DNA polimerasi, MgCl, dNTPs e buffer polimerasi), 2 µl di acqua distillata sterile e 1 µl di primer mix (costituita da una miscela 0.10 µM di primers forward e reverse per ogni locus). Il ciclo termico prevede uno step iniziale di denaturazione prolungata a 95 °C per 15

minuti, seguito da 35 cicli di denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 60°C per 90 secondi e un'estensione a 72 °C per 90 secondi, seguiti da un'estensione finale a 72°C di 10 minuti (Figura 9). Prima di procedere alla la fase finale di genotipizzazione, la qualità degli ampliconi ottenuti è stata verificata su gel d'agarosio al 2% (Figura 10). Gli ampliconi sono stati infine spediti alla Macrogen Inc (Korea) per la genotipizzazione tramite elettroforesi capillare.



**Figura 9 - Ciclo termico ottimizzato.**



**Figura 10 - Elettroforesi del DNA marcato su gel d'agarosio al 2%.**

### 3.5.1 Sizing e Binning

Il sizing allelico è possibile grazie all'utilizzo di primer marcati. Ad uno dei due primer di ogni coppia (in genere il forward) viene legato un fluoro cromo (6-FAM, PET, NED, VIC) all'estremità 5', in questo modo ciascun amplicone possiede una marcatura fluorescente all'estremità 5' e può essere risolto per elettroforesi capillare. I risultati vengono quindi letti mediante il software PEAK SCANNER 1.0 (Applied Biosystems). In tal modo si ottiene un elettroferogramma in cui i picchi si posizionano lungo l'asse X a seconda della dimensione del frammento per cui frammenti più grandi migrano più lentamente e si trovano più distanti dall'origine, mentre l'ampiezza del picco indica la quantità del prodotto PCR relativo ad uno specifico frammento. E' possibile che nell'elettroferogramma risultino più bande rispetto a quelle attese. Queste bande sono chiamate stutter, sono tipiche del DNA microsatellite e sono il risultato di un errore di appaiamento della DNA-Polimerasi durante la reazione di PCR (De Woody et al., 2006). Si tratta di piccoli picchi che variano per una (o più) ripetizioni in più o in meno rispetto al picco allelico. Il passo successivo al *sizing* consiste nell'assegnare un numero discreto agli alleli osservati in base alle loro dimensioni in paia di basi (bp). PEAK SCANNER fornisce infatti dimensioni alleliche calcolate sulla base di uno standard interno e generalmente consistono in un numero decimale. Tuttavia, dal momento che i programmi di elaborazione dati necessitano di un input file con alleli discreti, nasce l'esigenza di arrotondare i dati di *scoring allelico* attraverso un processo noto come *binning*. Le dimensioni alleliche osservate vengono attribuite a intervalli detti bins, la cui ampiezza varia in funzione del tipo di microsatellite utilizzato (di-nucleotidico, tri-nucleotidico o tetra-nucleotidico) e di conseguenza dell'intervallo tra le bande di *stuttering*. Questa correzione è stata effettuata manualmente con Excel.

## 3.6 Analisi dati dei microsatelliti

I principali parametri di variabilità genetica, come il numero di alleli per locus ( $N_a$ ), l'eterozigotà attesa e osservata ( $H_E$  e  $H_o$ ) e il grado di polimorfismo dei

singoli loci (PIC), sono stati calcolati utilizzando il programma CERVUS 3.0.7. (Marshall et al., 1998), così come le probabilità di equilibrio di Hardy-Weinberg per ogni locus sull'intera popolazione (test di probabilità esatti e test del  $\chi^2$ ) e il controllo per l'eventuale presenza di alleli nulli.

Il Polymorphic Information Content (PIC) è la misura del grado di "informatività" di un locus. E' legata all'eterozigosità attesa ( $H_e$ ) ed è calcolata a partire dalle frequenze alleliche. Varia fra 0 e 1: valori vicini a 0 indicano scarsa informatività dei loci, mentre valori vicini a 1 indicano un'alta informatività.

Gli alleli nulli o alleli fantasma sono alleli realmente esistenti che però non possono essere individuati poiché è mutato il sito di appaiamento di uno o più raramente di entrambi i primer. Su campioni di almeno 10 individui, CERVUS è in grado di calcolare la frequenza stimata degli alleli nulli.

L'allelic richness ( $A_R$ ) è una misura di diversità genetica legata al numero di alleli diversi presenti in un campione e indica il numero di alleli presenti nelle popolazioni indipendentemente dalla dimensione dei campioni.  $A_R$  fornisce una misura del numero di alleli standardizzata rispetto al campione più piccolo, permettendo così il confronto tra campioni di diverse dimensioni (Leberg, 2002).

Il linkage disequilibrium è l'associazione non casuale tra gli alleli di un locus e gli alleli di un altro locus ed esprime la tendenza di due alleli ad essere ereditati assieme (e non in maniera indipendente) con una frequenza più alta di quanto ci si sarebbe aspettati dalle frequenze di ricombinazione di quegli stessi alleli (Hartl e Clark, 1997). Per calcolare la ricchezza allelica ( $A_R$ ), il linkage disequilibrium e gli indici di fissazione  $F$ , è stato utilizzato il software FSTAT ver. 2.9.3.2. (Goudet, 2002).

Per questo studio di variabilità e paternità sono stati utilizzati due indici di Fissazione definiti da Wright che offrono una rappresentazione della struttura di una popolazione e della sua eventuale suddivisione in sottopopolazioni:  $F_{is}$  e  $F_{it}$ .  $F_{is}$  indica una riduzione media dell'eterozigosità di un individuo ( $i$ ) a causa dell'accoppiamento non casuale all'interno della sua sottopopolazione ( $s$ ). È quindi una misura indiretta del tasso di inincrocio. Viene chiamato coefficiente di inbreeding e varia tra -1 e +1, dove valori vicini a 1 indicano presenza di inbreeding, valori negativi ne indicano assenza.

Fst indaga la riduzione media dell'eterozigosità di una sottopopolazione (s) a causa della frammentazione della popolazione totale (t) in tante piccole sottopopolazioni e quindi dell'aumento della deriva genetica casuale. Varia tra 0 e 1. Qualora la popolazione totale non abbia una reale suddivisione in sottopopolazioni, allora  $F_{st}=0$  indica panmissia, viceversa  $F_{st}=1$  indica una separazione in sottopopolazioni e conseguente isolamento riproduttivo.

### **3.7 Assegnamento di paternità**

Le analisi di paternità sono state effettuate utilizzando CERVUS 3.0 (Marshall et al., 1998), software che tiene conto dei possibili errori di genotipizzazione, individua la presenza di alleli nulli ed eventuali deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Nelle analisi di parentela viene solitamente adottato il metodo di esclusione (Slate et al., 2000) con il quale vengono esclusi in successione i candidati genitori meno probabili sulla base della non condivisione di alleli con la prole fino ad arrivare ad assegnare il genitore più probabile. Questa procedura ha tuttavia dei limiti. Raramente infatti rimane un solo individuo alla fine del processo di esclusione anche perché è possibile che, a causa della presenza di alleli nulli o di mutazioni casuali, il vero genitore mostri alleli diversi rispetto ai figli per uno o più loci. E' possibile aggirare questo problema grazie al metodo della likelihood (Marshall et al., 1998), utilizzato in questo studio. Questo approccio consente di confrontare per ogni genitore da testare le due ipotesi: 1) attribuzione (è il vero genitore); e 2) esclusione (non è il vero genitore). A partire dai dati genotipici si calcola quindi il rapporto di verosimiglianza (o likelihood ratio, LOD) che esprime per ciascun candidato la probabilità di essere il vero genitore. CERVUS prima di assegnare ai reali candidati genitori la prole, fa uso di una simulazione per stimare l'efficacia dei loci, in modo da poter determinare quali loci utilizzare negli assegnamenti reali. Con questo programma possiamo effettuare quattro diversi tipi di simulazioni:

- 1) analisi di maternità
- 2) analisi di paternità
- 3) analisi "parent pair", quando i sessi dei genitori sono conosciuti

4) analisi “parent parent pair”, quando i sessi dei genitori sono sconosciuti.

In CERVUS la paternità/maternità è assegnata al genitore con il più alto valore di LOD, ossia con il più alto rapporto tra likelihood di paternità/maternità di un candidato genitore ed il likelihood degli altri candidati. Un altro parametro importante è quello che viene chiamato DELTA e che è dato dalla differenza tra il LOD score del più probabile candidato genitore e il LOD del secondo candidato più probabile. Per stimare la confidenza nell’assegnazione al più probabile candidato genitore il programma effettua una simulazione di analisi di parentela. Nella simulazione vengono usate le frequenze alleliche osservate per generare una coppia di potenziali genotipi parentali ed una serie di genotipi random che rappresentano i candidati genitori non imparentati. Viene così generata una prole virtuale per riassortimento degli alleli dei possibili genitori. Lo scopo è quello di calcolare la likelihood della parentela per i veri genitori e per ciascun altro individuo non imparentato confrontandoli con un elevato numero di figli simulati. A questo punto per i candidati genitori vengono confrontati i due valori di DELTA in modo da ottenere un valore soglia di LOD o DELTA abbastanza grande da distinguere i veri genitori con un predeterminato livello di confidenza (80%: relaxed, 95%: stricted). Sulla base di tale livello verranno quindi assegnate le reali paternità. Come precedentemente detto, le madri delle larve di ogni batch erano conosciute, per cui CERVUS è stato utilizzato per identificare le paternità. La chiave per ottenere dei buoni risultati è campionare il numero massimo di candidati padri (se non tutti). Questo fattore è forse il più importante poiché se non vengono campionati tutti i possibili candidati, si può rischiare di escludere il vero padre (Marshall et al., 1998).

## 4 Risultati

### 4.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA con il kit di estrazione qui utilizzato si è rivelata affidabile ed efficace per il DNA genomico di questa specie. L'amplificazione dell'estratto è riuscita per tutti i campioni, fornendo per ognuno una quantità di DNA stampo sufficiente per la successiva amplificazione genica.

### 4.2 Genotipizzazione e analisi dei principali parametri di variabilità genetica

L'ottimizzazione dei loci scelti è stata fatta su otto individui. Sulla base di questo screening iniziale, tre dei 12 loci scelti sono stati scartati perché scarsamente polimorfi o comunque non adatti all'assegnamento di paternità (Aro054, Ang151 e Aan04). Tutti gli adulti per un totale di 27 individui (sette femmine e 20 maschi) sono stati genotipizzati correttamente, mentre 7 larve sono state escluse dalle analisi per problemi di amplificazione. In particolare sono state escluse due larve dalle famiglie Bon-32 e Bon-37 e una dalle famiglie Bon-40, Bon-43 e Nog-30. Sette loci su nove (AAN06E24, AAN26N13, AAN41E24, AAN42O08, AAN44B22, Aan01, Aan02) hanno mostrato una deviazione significativa dall'equilibrio di HW, anche in seguito a correzione di Bonferroni (soglia di significatività  $\alpha = 0.05$ ; Tabella 3). Il numero di alleli per locus ( $N_a$ ) varia da 18 (AAN22B09) a 11 (AAN06E24). L'eterozigosità media osservata ( $H_o=0.73$ ) e il valore di polimorfismo medio ( $PIC=0.77$ ) sono risultati elevati. CERVUS ha calcolato una frequenza di alleli nulli media inferiore al 3.5%. Tutti i loci sono stati confrontati tra loro nelle due popolazioni chiamate *wild* (adulti) e *farmed* (larve) e sono risultati in linkage equilibrium ( $\alpha = 0.05$ ). L'allelic richness  $A(r)$  varia tra un valore minimo di 6.62 (locus AAN06E24) e un valore massimo di 12.01 (locus AAN22B09). Il tasso di inbreeding  $F_{is}$ , stimato per la popolazione

totale è risultato 0.072. Il valore di  $F_{st}$  è risultato 0.0004. I valori relativi ai singoli loci per adulti, larve e totalità degli individui sono riportati nella tabella 3.

**Tabella 3 - Diversità genetica nei loci microsatelliti di *A. anguilla* (AAN22B09; AAN6E24; AAN24A09; AAN26N13; AAN41E24; AAN42O08; AAN44B22; Aan01; Aan02).** Numero di alleli ( $N_a$ ), eterozigosità attesa ( $H_e$ ), eterozigosità osservata ( $H_o$ ), ricchezza allelica ( $A(r)$ ), indice di consanguineità ( $F_{is}$ ), frequenza stimata di alleli nulli ( $F(A.null)$ ), tasso di polimorfismo ( $P_{ic}$ ). La significatività della deviazione dall'equilibrio di H-W, in seguito alla correzione di Bonferroni, è evidenziata come segue: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

Locus	Campioni		
	Adulti (27)	Larve(273)	TOTALE(300)
<b>AAN22B09</b>			
<i>Allele size</i>	250-294	250-290	250-294
<i>Na</i>	17	17	17
<i>He</i>	0.93	0.89	0.90
<i>Ho</i>	0.77	0.75	0.92
<i>A(r)</i>	14.51	11.84	12.01
<i>Fis</i>	0.173	-0.042	-0.02
<i>F(A.null)</i>	0.08	-0.02	-0.01
<i>Pic</i>	0.91	0.88	0.89
<b>AAN06E24</b>			
<i>Allele size</i>	87-109	87-109	87-109
<i>Na</i>	10	9	10
<i>He</i>	0.77	0.75	0.75
<i>Ho</i>	0.59	0.80***	0.78**
<i>A(r)</i>	8.35	6.71	6.82
<i>Fis</i>	0.242	-0.05	-0.03
<i>F(A.null)</i>	0.012	-0.03	-0.02
<i>Pic</i>	0.74	0.72	0.72
<b>AAN24A09</b>			
<i>Allele size</i>	158-210	158-208	158-210
<i>Na</i>	16	15	16
<i>He</i>	0.92	0.83	0.84
<i>Ho</i>	0.76	0.67	0.68
<i>A(r)</i>	16.00	9.49	10.06
<i>Fis</i>	0.175	0.018	0.18
<i>F(A.null)</i>	0.08	0.09	0.09
<i>Pic</i>	0.88	0.81	0.82

<b>SEGUE TAB. 3</b>			
<b>AAN26N13</b>			
<i>Allele size</i>	91-131	93-131	91-131
<i>Na</i>	12	11	12
<i>He</i>	0.81	0.69	0.70
<i>Ho</i>	0.70	0.64**	0.65***
<i>A(r)</i>	10.15	7.32	11.5
<i>Fis</i>	0.134	0.067	0.077
<i>F(A.null)</i>	0.07	0.04	0.04
<i>Pic</i>	0.77	0.66	0.68
<b>AAN41E24</b>			
<i>Allele size</i>	169-191	169-191	169-191
<i>Na</i>	11	11	11
<i>He</i>	0.76	0.74	0.74
<i>Ho</i>	0.59	0.69***	0.68***
<i>A(r)</i>	8.75	7.30	7.37
<i>Fis</i>	0.232	0.063	0.07
<i>F(A.null)</i>	0.11	0.04	0.05
<i>Pic</i>	0.72	0.71	0.71
<b>AAN42O08</b>			
<i>Allele size</i>	198-238	198-238	198-238
<i>Na</i>	11	11	11
<i>He</i>	0.76	0.75	0.75
<i>Ho</i>	0.70	0.81***	0.80***
<i>A(r)</i>	8.63	6.41	6.62
<i>Fis</i>	0.076	-0.077	-0.063
<i>F(A.null)</i>	0.04	0.01	-0.04
<i>Pic</i>	0.72	0.71	0.72
<b>AAN44B22</b>			
<i>Allele size</i>	87-119	87-119	87-119
<i>Na</i>	11	11	11
<i>He</i>	0.85	0.84	0.84
<i>Ho</i>	0.59	0.79***	0.77***
<i>A(r)</i>	9.57	8.74	8.77
<i>Fis</i>	0.307	0.066	0.08
<i>F(A.null)</i>	0.16	0.03	0.04
<i>Pic</i>	0.82	0.82	0.82

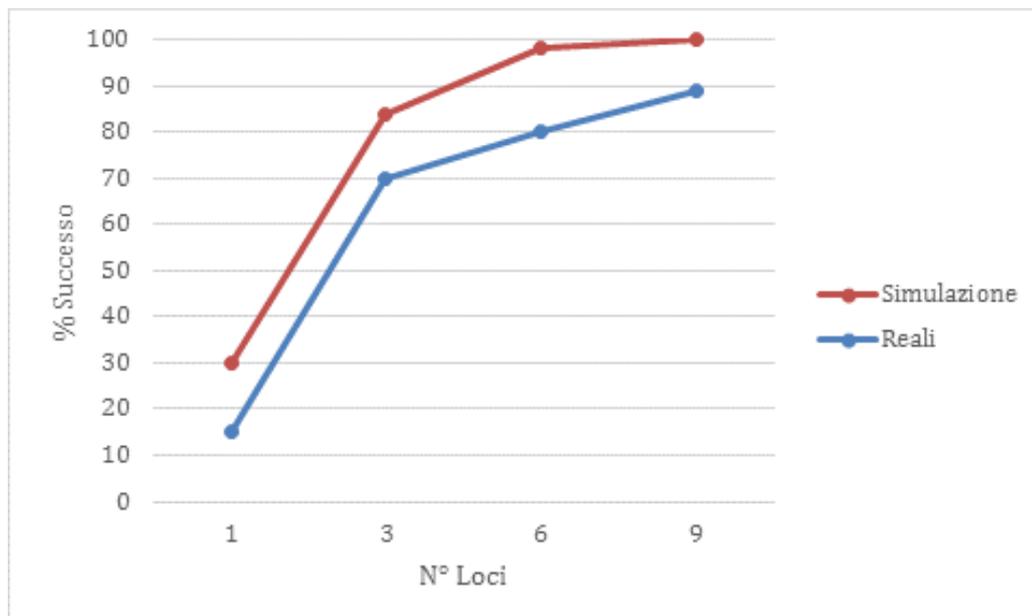
<i>SEGUE TAB. 3</i>			
<i>Aan01</i>			
<i>Allele size</i>	215-247	215-247	215-247
<i>Na</i>	11	11	11
<i>He</i>	0.75	0.69	0.70
<i>Ho</i>	0.51	0.69**	0.67*
<i>A(r)</i>	9.23	7.78	7.98
<i>Fis</i>	0.319	0.004	0.033
<i>F(A.null)</i>	0.18	-0.0003	0.01
<i>Pic</i>	0.72	0.67	0.68
<i>Aan02</i>			
<i>Allele size</i>	173-221	173-221	173-221
<i>Na</i>	18	18	18
<i>He</i>	0.94	0.87	0.88
<i>Ho</i>	0.48	0.65***	0.63***
<i>A(r)</i>	15.34	10.47	10.99
<i>Fis</i>	0.4	0.025	0.027
<i>F(A.null)</i>	0.14	0.03	0.015
<i>Pic</i>	0.92	0.86	0.87

### 4.3 Assegnamenti di paternità

Dal momento che è stata utilizzata una sola femmina per ogni accoppiamento, l'analisi di paternità è stata effettuata con l'opzione analisi di paternità con genitore noto. La simulazione ha restituito un valore di DELTA=10.07, un tasso di assegnamento pari a 99,9% (99643 larve su 100000 sono state assegnate correttamente) nell'intervallo di confidenza pari al 95%. Rispetto ai dati reali, la simulazione ha sovrastimato il tasso di successo (Figura 10). Infatti, 168 larve sono state assegnate al vero padre con un livello di confidenza del 95% (strict) e 105 con un livello di confidenza dell'80% (relaxed; Tabella 4). Il tasso di "mismatching", ovvero di non corrispondenza tra gli alleli delle larve e quelli del genitore, è risultato pari a 0.51%, con 25 su 273 larve con alleli diversi da quelli dei candidati genitori. Questo potrebbe essere dovuto alla presenza di alleli nulli o a mutazioni.

**Tabella 4 - Livello di confidenza negli assegnamenti di paternità.**

Riproduzione	Larve assegnate (95%) strict	Larve assegnate (80%) relaxed
<b>Nog-44</b>	21	19
<b>Bon-43</b>	34	5
<b>Bon-38</b>	28	12
<b>Bon-40</b>	18	21
<b>Nog-37</b>	23	15
<b>Nog-30</b>	24	15
<b>Bon-32</b>	20	18

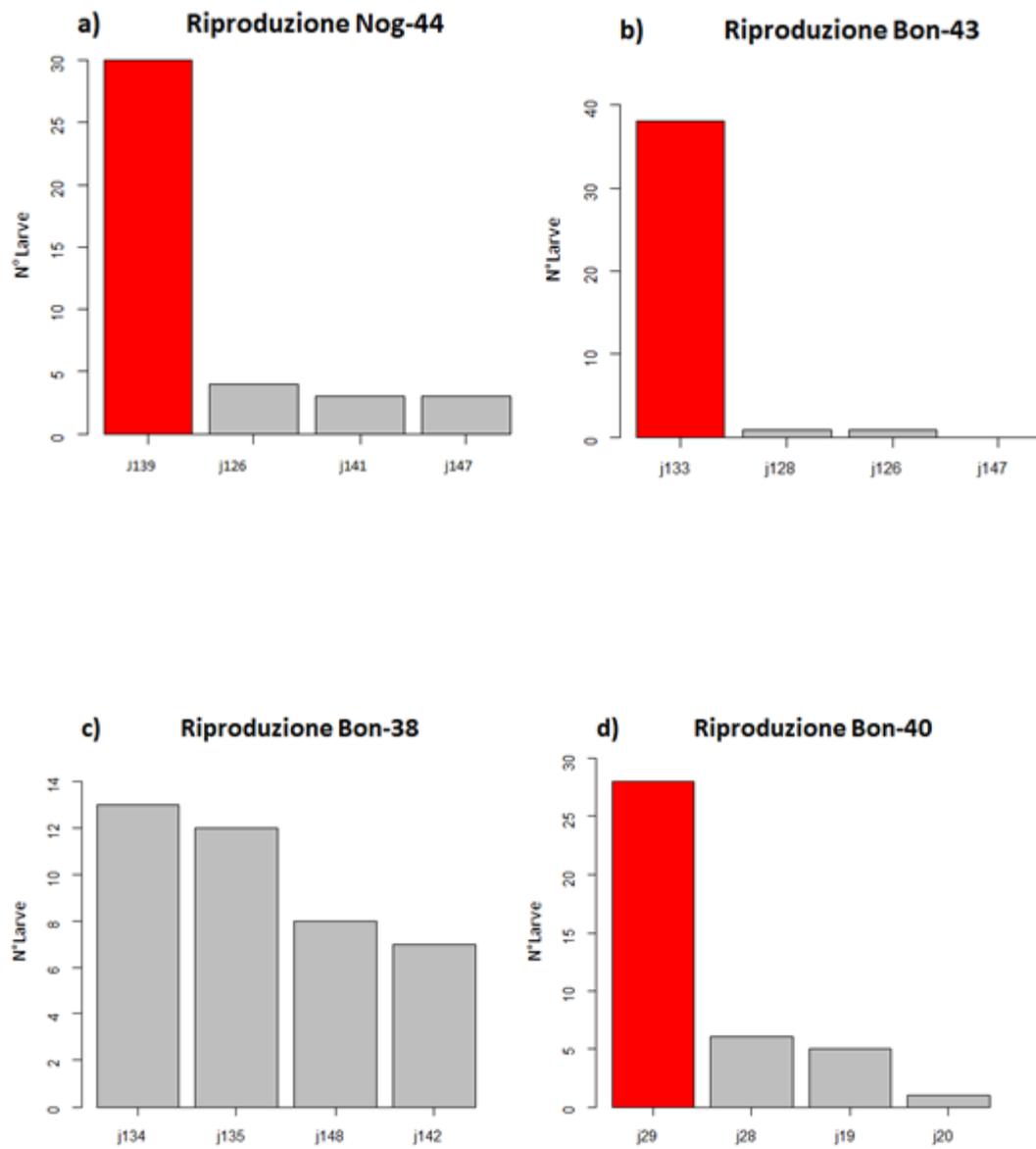


**Figura 11 - Assegnamento di paternità simulato (N= 100.000) e relae (N=273) in *A. Anguilla*.**

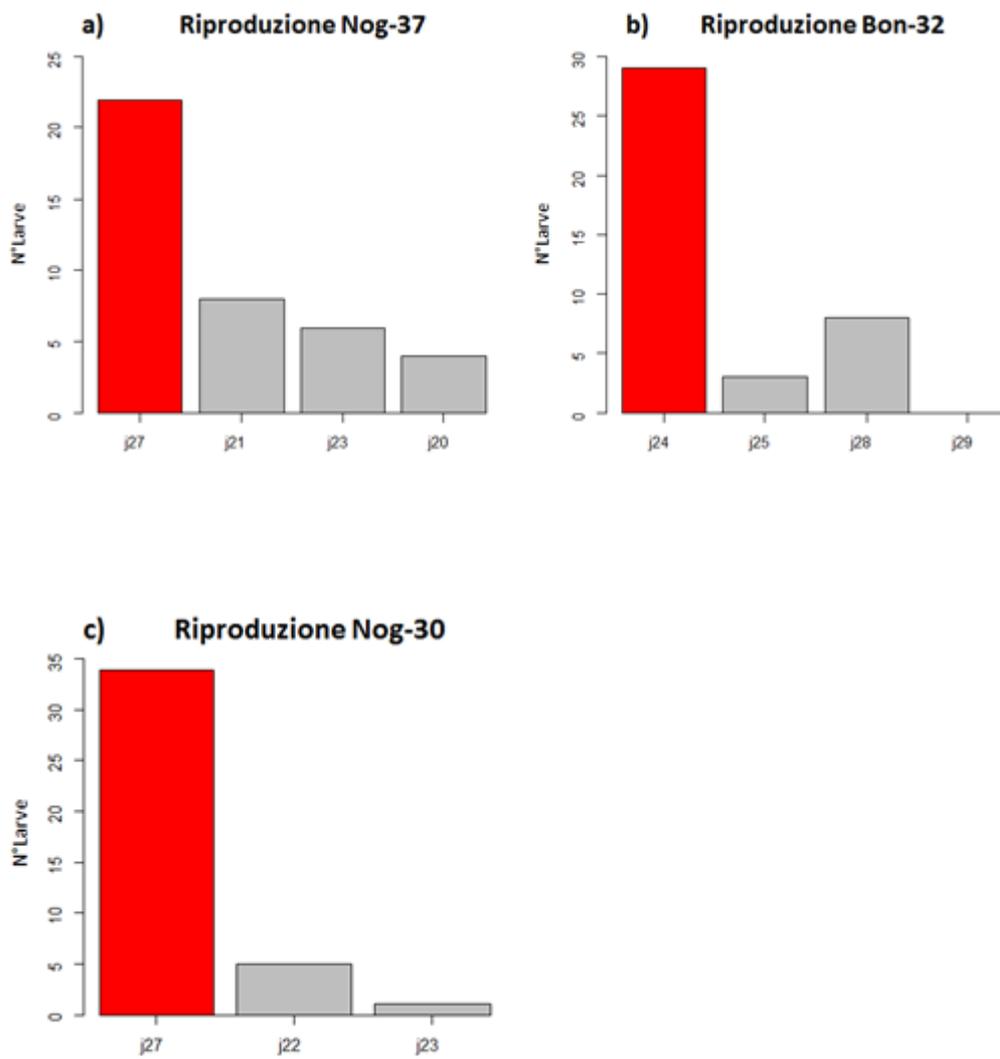
#### **4.3.1 Assegnamenti di paternità nelle singole famiglie**

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti famiglia per famiglia

- Nella riproduzione Nog-44: 30 larve sono state assegnate a J139, 4 a J126, 3 a J147 e 3 a J141 (Figura 11a).
- Nella riproduzione Bon-43: 38 larve sono state assegnate a J133, una a J128, una a J126 e nessuna a J147 (Figura 11b).
- Nella riproduzione Bon-38: 13 larve sono state assegnate a J134, 12 a J135, 8 a J148 e 7 a J142 (Figura 11c).
- Nella riproduzione Bon 40: 27 larve sono state assegnate a 29J, 6 a 28J, 5 a 19J e una a 20J (Figura 11d).
- Nella riproduzione Nog-37: 20 larve sono state assegnate a 27J, 8 a 21J, 6 a 23J e 4 a 20J (Figura 12a).
- Nella riproduzione Bon-32: 27 larve sono state assegnate a 24J, 8 a 28J, 3 a 25J e nessuna a 29J (Figura 12b).
- Nella riproduzione Nog-30: 33 larve sono state assegnate a 27J, 5 a 22J e una a 23J (Figura 12c).



**Figura 12 – Istogrammi degli assegnamenti di paternità in a) Nog-44, b) Bon-43, c) Bon-38 e d) Bon-40.**



**Figura 13 – Istogrammi di assegnamenti di paternità in a) Nog-37, b) Bon-32 e c) Nog-30.**

## 5 Discussioni e conclusioni

### 5.1 Analisi genetiche

In questo studio è stata svolta un'analisi di paternità in sette famiglie di *Anguilla anguilla* allo scopo di approfondire le conoscenze sulle modalità riproduttive della specie. Inizialmente, sono stati selezionati 12 loci microsatelliti, di cui tre sono stati esclusi dalle analisi (Aro054, Ang151 e Aan04) perché scarsamente polimorfi e quindi non affidabili per effettuare analisi di paternità. Gli indici di variabilità genetica hanno evidenziato un elevato grado di polimorfismo nei nove loci rimanenti. L'abilità di assegnare la prole al vero genitore dipende dal numero di loci disponibili e dall'elevato grado di diversità allelica di questi (Marshall et al., 1998; Bernatchez e Duchesne, 2000). Secondo diversi studi, un esiguo numero di loci altamente polimorfici è sufficiente per il successo delle analisi di paternità (Norris et al., 2000). Loci con una frequenza di alleli nulli inferiore al 5% solitamente non compromettono gli assegnamenti di paternità (Marshall et al., 1998; Dakin e Avise, 2004). La frequenza di alleli nulla media calcolata per i nove loci è risultata inferiore al 3,5%. La maggior parte dei *mismatching* tra genitori e figli è stata attribuita alla presenza di alleli nulli, ma si sono verificati in uno o due loci per individuo non impedendo l'assegnamento assegnazione di parentela. Sette loci su nove hanno mostrato una deviazione dall'equilibrio di HW sulla popolazione totale, queste sono risultate significative in seguito a correzione di Bonferroni. Il disequilibrio di HW può verificarsi a causa di errori nella fase di scoring dei microsatelliti (De Woody et al., 2006) o per effetto dell'esistenza di fenomeni biologici e/o evolutivi quali l'"effetto collo di bottiglia" ed "effetto del fondatore". Nel primo vi è un evento casuale (malattie, carestie) che porta a una notevole riduzione del numero degli individui della popolazione, così la frequenza allelica delle future generazioni sarà determinata dal patrimonio dei pochi individui rimasti. Analogamente è il meccanismo detto "effetto del fondatore": se pochi individui colonizzano una nuova zona e rimangono isolati, da quei pochi pionieri deriverà una nuova popolazione con frequenze alleliche diverse da quella

originaria (Massari et al., 2006). Nel caso di questo studio il disegno di campionamento è stato sviluppato su sette eventi riproduttivi programmati, per cui è stata studiata una popolazione formata per il 90% da larve e per il 10% da riproduttori. Questa deviazione è quindi verosimilmente attribuibile al numero di estremamente limitato di riproduttori utilizzati e dal relativo effetto del fondatore nella popolazione di larve da essi generata.

## **5.2 Assegnamenti di paternità**

Il grado di confidenza medio negli assegnamenti reali (89%) ha mostrato una discrepanza del 10% rispetto a quanto previsto da CERVUS tramite simulazione (99,9%). Il software ha quindi sovrastimato il successo di assegnamento, ciò potrebbe essere dovuto alla differenza tra il basso numero di larve reali (273) rispetto a quelle virtuali (100.000) oppure alla presenza, seppur limitata, di alleli nulli e/o mutazioni casuali nei loci utilizzati.

Le analisi di questo studio sono caratterizzate da due fattori che ne aumentano l'attendibilità.

- 1- La presenza di un genitore noto, ossia la madre in ogni famiglia. Grazie alle osservazioni svolte nelle vasche dei Laboratori di Cesenatico le larve sono state assegnate correttamente a ciascuna madre; poiché terminato il ciclo di accoppiamento con i maschi, gli ovociti fecondati venivano confinati in una vasca di incubazione separata da altri individui.
- 2- Tutti i candidati padri sono stati campionati e genotipizzati. Questo ci permette di esser certi di non aver escluso il vero padre.

Dai risultati ottenuti è emerso che in ogni riproduzione ha partecipato più di un maschio e alcuni maschi hanno avuto successo in più di una riproduzione. Inoltre, in sei casi su sette c'è stato un maschio "dominante" a cui sono state assegnate più del 50% delle larve (Figure 11-12).

Le anguille utilizzate per questo studio sono state sottoposte a trattamenti ormonali per favorire l'emissione di gameti, l'interpretazione dei risultati ottenuti va dunque valutata tenendo conto di questo fattore.

Il successo riproduttivo dei maschi è stato elevato: 19 maschi su 20 (95%) sono riusciti produrre prole; di questi 12 su 13 (94%) hanno avuto successo una volta su una possibilità e 5 su 7 (70%) due volte su due possibilità (maschi 27J, 28J, 23J, 20J, 126 J).

Quest'ultimo dato sembra contrastare quanto noto fino ad ora: si ritiene infatti che in ambiente naturale e in assenza di stimolazione ormonale, questi animali cessino di vivere in seguito alla riproduzione. In particolare, si evidenzia il caso del maschio 27J che è riuscito ad ottenere il numero massimo di larve in entrambe le riproduzioni. Rispettivamente, 20 larve corrispondenti a più del 50% del totale, e 33 larve corrispondenti a più del 70% del totale. Per quanto riguarda infine la distribuzione delle larve tra i candidati padri, solo in un caso si è osservata un'equipartizione dei giovanili nei 4 padri, nelle restanti 6 riproduzioni vi è sempre un maschio "dominante" a cui vengono attribuite almeno il 50 % di larve. Le informazioni circa le modalità di riproduzione dell'anguilla europea in ambiente naturale sono incomplete e non del tutto chiare, tuttavia è probabile che il maschio coinvolto nell'accoppiamento si avvicini fisicamente alla femmina così da permettere una migliore riuscita nella fecondazione delle uova. Sulla base dei risultati ottenuti è stata possibile ipotizzare una dinamica secondo la quale più maschi sarebbero in grado di fecondare una singola femmina.

Tuttavia, la competizione gerarchica tra i maschi potrebbe essere influenzata dalla condizione di cattività che aumenta il livello di stress degli individui determinando scale gerarchiche più evidenti tra i maschi e creando modelli di paternità nelle riproduzioni dove partecipano più maschi (Tuytens e McDonald, 2000). In questo studio le riproduzioni sono avvenute in un ambiente chiuso e controllato, forzando la co-presenza di una femmina sessualmente matura con tre o quattro maschi sotto condizionamento ormonale, mentre in natura le dinamiche reali potrebbero essere estremamente diverse per via dell'assenza delle condizioni sperimentali qui utilizzate per produrre i sette batch di larve.

I risultati ottenuti indicano che nel 70% dei casi i maschi coinvolti in due riproduzioni hanno avuto successo in entrambe. Queste osservazioni non possono tuttavia essere utilizzate come spunto per fare ipotesi su ciò che avviene in natura durante la riproduzione dell'anguilla. Studi condotti su *Salmo salar* (Fleming et

al., 1997) infatti hanno mostrato come nelle riproduzioni in vasca i salmoni riuscivano a partecipare a un numero più elevato di riproduzioni rispetto agli individui in condizioni naturali.

In conclusione, questo studio riporta i risultati delle prime analisi di paternità condotte sulla specie *Anguilla anguilla* in condizioni di cattività e potrebbe costituire un presupposto per ricerche future volte ad approfondire le modalità riproduttive di questa specie.

# Bibliografia

**Als, T., Hansen, M., Maes, G., Castonguay, M., Rienman, L., Bernatchez, L. (2011).** All roads lead to home: panmixia of European eel in the Sargasso Sea. *Molecular ecology*. 20, 1333-1346.

**Arai, T., Otake, T., Tsukamoto, K. (2000).** Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otoliths microstructure and microchemistry. *Marine Biology*. 137, 39-45.

**Arnaud, E., San Cristobal, M., Chevalet, C., Haffray, P., Guyomard, R. (1998).** Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 55, 715-725.

**Bekkevold, D., Hansen, M., Loeschke, M. (2002).** Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua*). *Molecular Ecology*. 11, 91-102.

**Bernatchez, L., Duchesne, P. (2000).** Individual based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 57, 1-12.

**Ciccotti, E., Busilacchi, S., Cataudella, S. (2000).** Eel, *Anguilla anguilla*, in Italy: recruitment, fisheries and aquaculture. *Dana*. 12, 7-15.

**Ciccotti, E. (2005).** Interactions between capture Fisheries and Aquaculture: the case of the eel (*Anguilla anguilla*). *Interactions Between Capture Fisheries and Aquaculture: A Methodological Perspective*. Studies and Reviews, General Fisheries Commission for the Mediterranean. 78, 190-203.

**Daemen, E., Cross, T., Ollevier, F., Volckaert, F.A.M. (2001).** Analysis of the genetic structure of European eel (*Anguilla Anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers. *Marine Biology*. 139, 755-764.

**Dakin, E., Avise, J.C. (2004).** Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*. 93, 504-509.

**De Woody, J. (2006).** Mitigating scoring errors microsatellite data from wild population. *Molecular ecology*. 6, 951-957.

**Dekker, W. (1999).** A Procrustean assessment of the European eel stock. *Journal of Marine Sciences*. 57, 938-947.

**Dekker, W. (2002).** Status of the European eel stock and Fisheries. *Proceedings of the International Symposium 'Advances in Eel Biology'*. 237-254.

**Desaunay, Y., Guerault, D. (1997).** Seasonal and long term changes in biometrics of eel larvae: a possible relationship between recruitment variation and North-Atlantic ecosystem productivity. *Journal of Fish Biology*. 51, 317-339.

**Di Biase, A., Casalini, A., Emmanuele, P., Mandelli, M., Lokman, P., Mordenti, O. (2015).** Controlled reproduction in *Anguilla anguilla*: comparison between spontaneous spawning and stripping insemination approaches. *Aquaculture Research*. 1, 1-9.

**Durif, C., Guibert, A., Elie, P. (2009).** Morphological discrimination of the silvering stages of European eel. *American Fisheries Society Symposium*. 58, 103-111.

**Feunteun, E. (2002).** Management and restoration of European Eel population (*Anguilla anguilla*): An Impossible Bargain. *Ecological engineering*. 18, 575-591.

**Fishback, A.G., Danzmann, R.G., Sakamoto, T., Ferguson, M.M. (1999).** Optimization of semi-automated microsatellite multiplex polymerase chain reaction systems for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 172, 247-254.

**Fleming, A., Lamberg, A., Jonsson, B. (1997).** Effects of early experience on the reproductive performance of Atlantic salmon. *Behavioral Ecology*. 8, 470-480.

**Goudet, J. (2002).** FSTAT (version 2.9.3.2): a computer program to calculate F-statistics. *Heredity*. 86, 485-486.

**Gross, R., Lulla, P., Paaver, T. (2007).** Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in northern and Eastern Europe. *Aquaculture*. 2, 139-146.

**Hansen, M., Menserberg, K.D., Rasmussen, G., Simonsen, V. (1997).** Genetic variation within and among Danish brown trout (*Salmo trutta*) hatchery strains, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Acquaculture*. 153, 15-29.

**Hartl, D.L., Clark, A.G. (1997).** Principles of population genetics. Ed.: Sianuer Associates.

**ICES. (2001).** Report of the ICES-EIFAK Working Group on Ells. ICES C.M.2002-ACFM:03.

—(2002). Report of the ICES-EIFAK Working Group on Ells. 2002. ICES C.M.2003-ACFM:06.

—(2006). Report of the ICES-EIFAK Working Group on Ells. 2006. ICES C.M. 2006-ACFM:16.

—(2008). Report of the Joint EIFAC-ICES Working Group on Eels (*WGEEL*). Leuven, Belgio: s.n., 2008.

— (2013). Report of the Joint EIFAAC-ICES Working Group on Eels (*WGEEL*). Copenhagen, Denmark : s.n., 2013.

**Jerry, D.R., Preston, N.P., Crocosb, P.J., Keysb, S., Meadowsc, J., Lic, Y. (2004).** Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture*. 235, 237-247.

**Jones, A.D., Small, C.M., Paczolt, K., Ratterman, G. (2010).** A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular ecology*. 10, 6-30.

**Leberg, P.L. (2002).** Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. *Molecular ecology*. 11, 2445-2449.

**Lecomte-Finiger, R. (1992).** Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Marine Biology*. 114, 205-210.

**Lo Presti, R., Lisa, C., Di Stasio, L. (2009).** La genetica molecolare in acquacultura. *Associazione per la scienza e le produzioni animali*. 8, 299-313

**MacAvoy, E.S., Wood, A.R., Gardner, J. (2008).** Development and evaluation of microsatellite markers for identification of individual green shell mussels (*Perna canaliculus*) in a selective breeding program. *Aquaculture*. 274, 41-48.

**Maes, G.E., Pujolar, J.M., Hellemans, F., Volckaert, F.A.M. (2006).** Evidence for isolation by-time in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Molecular ecology*. 15, 2095-2107.

**Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, E.B., Pemberton, M. (1998).** Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 7, 639-655.

**Massari, A., Piaser, A., Clegg, C.J. (2006).** La continuità genetica e l'evoluzione. Edizioni Il Capitello. 138-139

**Mordenti, O., Di Biase, A., Sirri, R., Modugno, S., Tasselli, A. (2012).** Induction of Sexual Maturation in Wild Female European Eels (*Anguilla anguilla*) in Darkness and Light. Israeli Journal of Aquaculture. 64, 2-9.

**Mordenti, O., Di Biase, A., Bastone, G., Sirri, R., Zaccaroni A., Parmeggiani, A. (2013).** Controlled reproduction in the wild European eel (*Anguilla anguilla*): two populations compared. Aquaculture. 21, 1045-1063.

**Moriarty, C. (1996).** The European eel fishery in 1993 and 1994. First report of a working group funded by the European Union Concerted Action AIR A94-1939. Fisheries Bulletin. 14, 52-54.

**Moriarty, C., Dekker, W. (1997).** Management of European Eel. Fisheries Bulletin. 15, 77-90.

**Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P. (2000).** Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. Aquaculture 182, 73-83.

**O'Reilly, P.T., Hamilton, L.C., McConnell, S.K., Wright, J.M. (1996).** Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science. 53, 2292-2298.

**Palm, S., Dannewitz, J., Prestegard, T., Wickstrom L. (2009).** Panmixia in European eel: no genetic difference between maturing adults from southern and northern Europe. Heredity. 103, 82-89.

**Palstra, A., Curiel, D., Fekkes, M., De Bakker, M., Szekely, C., Van Ginneken, V., Van den Thillart, G. (2007).** Swimming stimulates oocyte development in European eel. *Aquaculture*. 270, 321-332.

**Pemberton, J.M. (2009).** Wild pedigrees: the way for ward. *Proceeding of Royal Society of London B*. 92, 243-247.

**Porta, J., Porta, J.M., Martinez-Rodriguez, G., Alvarez, M.C. (2006).** Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture*. 256, 159-166.

**Pujolar, J.M., De Leo, G.A., Ciccotti, E., Zane L. (2009).** Genetic composition of Atlantic and Mediterranean recruits of European eel *Anguilla anguilla* based on Est-linked microsatellite loci. *Journal of Fish Biology*. 74, 2034-2046.

**Schmidt, J. (1922).** The breeding places of the eel. *Philosophical Transactions. Royal Society*. 211, 179-208.

**Slate, J., Marshall, T., Pemberton, J. (2000).** A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology*. 9, 801-808.

**Tesch, F.W. (2003).** The eel. Ed.: Blackwell, Oxford (UK).

**Tuytens, F., Macdonald, D.W. (2000).** Consequences of social perturbation for wildlife management and conservation. *Behaviour and Conservation*. 1, 315-329.

**Van Ginneken, J.T., Maes, G. (2005).** The European eel (*Anguilla anguilla*) its lifecycle, evolution and re production: a literature review *Biology Fisheries*. 15, 367-398.

**Wang, Y., Wang, X., Wang, A., Guo, X. (2010).** A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Aquaculture. 308, 28-33.

**Wirth, T., Bernatchez, L. (2001).** Genetic evidence against panmixia in the European eel. Nature. 409, 1037-1040.