

Connectiviteit van *Amphiprion akallopisos* (Skunk Anemoonvis) in de Indische Oceaan

Huyghe Filip and M. Kochzius

Mariene Biologie, Faculteit Wetenschappen en Bio-Ingenieurswetenschappen, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050 Brussel
E-mail: fhuyghe@vub.ac.be

Inleiding

De skunk anemoonvis (*Amphiprion akallopisos*) behoort tot de familie van de koraaljuffertjes (Pomacentridae), een typische familie van koraalvissen. De skunk anemoonvis leeft in obligate symbiose met twee soorten zeeanemonen tegen wiens netelcellen hij immuniteit ontwikkeld heeft. Net als alle andere anemoonvissen (genus *Amphiprion*), is hij voor zijn voortbestaan afhankelijk van de bescherming tegen predatoren die de zeeanemonen hem bieden (Fautin, 1991). De zeeanemonen, die het habitat van de anemoonvissen vormen, komen enkel voor in tropische (watertemperatuur hoger dan 20°C), ondiepe zoutwatergebieden, op koraalriffen of met koraalriffen geassocieerde ondiepe zandvlaktes.

Deze koraalriffen vormen een gefragmenteerde omgeving, waar gebieden met geschikt habitat voor verschillende organismen afgewisseld worden met soms grote zones van open oceaan waar deze koraalbewoners zich niet blijvend kunnen vestigen. Volwassen dieren zijn niet in staat om zich van het ene koraalrif naar het andere te bewegen. Migratie en de kolonisatie van nieuwe koraalriffen kan daarom enkel gebeuren via de verspreiding van pelagische larven of eitjes (Cowen *et al.*, 2007). Zoals de meeste koraalbewoners, doorloopt de skunk anemoonvis ook een pelagische larvale fase die in het geval van de skunk anemoonvis 8 tot 12 dagen bedraagt (Buston, 2003).

Omdat tijdens de pelagische fase de larven door zeestromingen over relatief lange afstanden verspreid kunnen worden, werd oorspronkelijk aangenomen dat migratie tussen de verschillende koraalriffen op deze manier gebeurde en dat daardoor een hoge connectiviteit (uitwisseling van genen of gene flow) tussen deze riffen onderhouden werd. Daardoor werd aangenomen dat populaties van koraalriforganismen open waren, dat er weinig genetische differentiatie tussen de verschillende populaties was (Leis, 1991). Omdat de reële verspreiding van larven in de open zee technisch bijna onmogelijk op te volgen is, kon deze open populatie hypothese tot voor enkele jaren niet getest worden. Door de ontwikkeling van een aantal genetische technieken waardoor het mogelijk werd om met behulp van genetische markers en aan de hand van populatiegenetica de connectiviteit tussen populaties onrechtstreeks te meten, veranderde deze situatie (Jones *et al.*, 2009; Botsford *et al.*, 2009).

Connectiviteitsstudies die op deze manier van genetische markers gebruikmaakten, toonden aan dat populaties van mariene organismen niet onveranderlijk open zijn, maar dat integendeel zich verschillende situaties kunnen voordoen, gaande van volledig open tot volledig gesloten (niet door gene flow verbonden) populaties (Mora & Sale, 2002). Ook voor koraalrifvissen valt geen eenduidige conclusie uit de verschillende connectiviteitsstudies te trekken (Jones *et al.*, 2009). Nochtans is een goede kennis van de connectiviteit tussen populaties koraalriforganismen van groot belang voor het efficiënt instellen van beschermde zones (Marine Protected Areas of MPA's) en het beheer en de bescherming van koraalriffen (Botsford *et al.*, 2009; Cowen *et al.*, 2007; Hedgecock *et al.*, 2007).

Materiaal en methoden

Amphiprion akallopisos werd voor deze connectiviteitsstudie gekozen vanwege zijn disjuncte distributie, bestaande uit een populatie aan de kusten van Indonesië en Thailand aan de oostelijke zijde van de Indische Oceaan (EIO) en een populatie aan de kusten van Madagaskar en Oost-Afrika aan de westelijke zijde van de Indische Oceaan (WIO). Deze subpopulaties worden van elkaar gescheiden door meer dan 4.500km open oceaan. Daardoor is het een interessante soort om de connectiviteit in de gehele Indische Oceaan te bestuderen alsook connectiviteit op een kleinere geografische schaal aan beide zijden van de Indische Oceaan, tussen koraalriffen binnen de WIO- en EIO-populaties.

In totaal werden tijdens SCUBA-duiken 273 skunk anemoonvissen op 17 verschillende locaties (Fig. 5 thesis) gevangen. Van deze vissen werd een klein stukje caudale vin verwijderd, waarna de vis ongedeerd terug in zijn gastzeeanemoon werd losgelaten. Hierna werden de stukjes vin onmiddellijk in een 96% ethanol oplossing bewaard om aantasting van het DNA te voorkomen. Op

deze stalen is een DNA extractie en een Polymerase Chain Reaction (PCR) uitgevoerd. Voor de PCR werden de primers CR-E en CR-A gebruikt (Lee *et al.*, 1995), waardoor een fragment van de Control Region (CR) van het mitochondriaal DNA (mtDNA) met een maximumlengte van 431 baseparen (bp) geamplificeerd werd. Deze fragmenten werden gesequeneerd en gebruikmakend van gespecialiseerde software (Hall, 1999) in een dataset gealigneerd. Deze bewerking resulteerde in een dataset van 263 sequenties, elk met een lengte van 337bp. Op deze dataset werd met behulp van de software ARLEQUIN (Excoffier & Lischer, 2010) een populatiegenetische analyse uitgevoerd, met inbegrip van een haplotype netwerk, verscheidene genetische structuur testen (F-statistiek, AMOVA) en selectieve neutraliteitstesten.

Resultaten

Voor wat betreft de gehele Indische Oceaan, tonen onze resultaten een significante populatiestructuur aan ($\phi_{st} = 0.28$; $P < 0.001$). Een AMOVA waarbij de EIO- en WIO-populaties apart gegroepeerd werden, wijst bovendien op een heel sterke differentiatie tussen beide populaties ($\phi_{ct} = 0.61$; $P < 0.001$). Het haplotype netwerk, waarin 76 haplotypes geïdentificeerd werden, versterkt deze resultaten nog. Geen enkel van deze haplotypes komt gelijktijdig in de WIO en de EIO voor.

Binnen de WIO wezen onze resultaten een licht significante populatiestructuur aan ($\phi_{st} = 0.016$; $P < 0.01$). Verscheidene AMOVA's, met telkens een andere groepering van de verschillende locaties binnen de WIO, leverden echter in geen enkel geval een significant resultaat op, waardoor geen duidelijke differentiatie of geografische barrière aan het licht gebracht werd. Nog binnen de WIO wezen onze resultaten op een lage genetische diversiteit. Bovendien bekwamen wij, voor wat selectieve neutraliteit betreft, voor deze populatie voor zowel F_u 's F_s als Tajima's D-test significante negatieve resultaten ($D = -2.58$; $P < 0.001$; $F_s = -34.10^{37}$; $P < 0.001$). Deze resultaten kunnen wijzen op een plotse populatie-uitbreiding in het verleden. Om dit te testen, werden op deze populatie een Sum of Squared deviation test (SSD-test) en een Harpending's Raggedness index (HRI-test) uitgevoerd. In beide gevallen verschilde de geteste populatie niet significant van het hypothetische model van plotse populatie-uitbreiding ($SSD = 0.0000043$; $P = 1$; $HRI = 0.068$; $P = 0.82$).

Binnen de EIO tenslotte, wezen onze resultaten op een afwezigheid van populatiestructuur en dus een hoge connectiviteit en een open populatie ($\phi_{st} = -0.0065$; $P = 0.51$). Deze populatie vertoonde ook een significant hogere genetische diversiteit dan de WIO (t-test; $P < 0.001$).

Bespreking

Onze resultaten wijzen op een lage connectiviteit tussen de WIO- en EIO-populaties. Hiermee worden de resultaten bevestigd van vorige studies die lage connectiviteit vonden tussen populaties gescheiden door meer dan 1.000km in anemoonvissen (Drew *et al.* 2007; Timm & Kochzius, 2008; Timm *et al.*, 2012; Saenz-Agudelo *et al.*, 2009) en in andere koraalvissen (Jones *et al.*, 2010). Bovendien bevestigen deze resultaten het bestaan van een barrière voor gene flow tussen de WIO en de EIO die reeds in andere mariene organismen was aangetoond (Ridgway & Sampayo, 2005). De exacte aard van deze barrière blijft echter onopgelost. De WIO en de EIO zijn via het Noordelijk gedeelte van de CIO, waar in Sri Lanka en de Maldiven geschikt habitat voor koraalriforganismen beschikbaar is, fysiek met elkaar verbonden (Vogler *et al.*, 2012). Bovendien zorgen de Moessonwinden er in dit gedeelte van de CIO voor dat de dominante zeestromingen tweemaal per jaar van richting veranderen (Schott & McCreary, 2001) waardoor uitwisseling van larven en gene flow in beide richtingen mogelijk wordt.

Op basis van de hogere genetische diversiteit lijkt de EIO populatie in aanmerking te komen als bronpopulatie van *A. akallopisos*. Dit stemt overeen met fylogenetische analyses die de origine van het genus *Amphiprion* in de Indo-Maleisische archipel leggen (Santini & Polacco 2006) en die het ontstaan van de soort *A. akallopisos* situeren in de EIO. Ten gevolge van een daling van het wereldwijde zeeniveau tijdens het late Pleistoceen (1.1 tot 4.8 miljoen jaar geleden) met verschillende tientallen meters, waardoor de Indische Oceaan van de Stille Oceaan afgesloten werd, divergeerde *A. akallopisos* van twee andere soorten anemoonvissen die momenteel enkel in de Stille Oceaan voorkomen (Timm *et al.*, 2008).

Er zijn twee scenario's die vanuit dit standpunt het ontstaan van de disjuncte distributie van *A. akallopisos* kunnen verklaren. Een eerste mogelijkheid is die van een directe verspreiding vanuit de EIO naar de WIO over het zuidelijke gedeelte van de Indische Oceaan. Ten zuiden van de evenaar worden de EIO en de WIO van elkaar gescheiden door een aaneengesloten oppervlakte van diepzee waar geen geschikt habitat voorhanden is. De South Equatorial Current (SEC) zorgt er voor een permanente stroming van oost naar west (Schott & McCreary, 2001). De enorme afstand van meer dan 4.500km die beide gebieden scheidt, maakt het echter weinig waarschijnlijk dat larven in een tijdspanne van maximum 2 weken langs deze weg de WIO vanuit de EIO bereiken. Daarvoor voert de SEC de larven niet snel genoeg westwaarts (Vogler *et al.*, 2012).

Een tweede mogelijkheid is een verspreiding vanuit de EIO richting WIO via het Noordelijke gedeelte van de Indische Oceaan. Zoals reeds aangehaald, zijn de zeestromingen in deze regio variabel in functie van het seizoen zodat verspreiding in beide richtingen plausibel is. Bovendien komen in de CIO potentiële gastzeeanemonen voor *A. akallopisos* voor. Een stapsgewijze migratie, telkens over afstanden van enkele honderden kilometers, zou op deze manier mogelijk zijn. Op Sri Lanka en de Maldiven, het gebied in de CIO waar gastzeeanemonen voorkomen, worden deze echter ingenomen door *Amphiprion nigripes*, de Maldiven anemoonvis (Fautin, 1991).

Gastzeeanemonen, het habitat van anemoonvissen, zijn voor deze laatste beperkend, hetgeen een sterke competitie voor anemoonhabitat veroorzaakt, zowel tussen soorten als tussen individuen van dezelfde soort (Ollerton *et al.*, 2007). Hierdoor blijft een beschikbare zeeanemoon nooit lang onbezet (Hattori, 2002) en treedt er bij veel anemoonvissen in een bepaalde regio specialisatie in een specifieke soort zeeanemoon op, waarbij kolonisatie van die soort zeeanemoon door andere soorten anemoonvis verhinderd wordt (Ricciardi *et al.*, 2011). Dit zou kunnen verklaren waarom *A. akallopisos* niet in de CIO voorkomt, met name omdat *A. nigripes*, die gespecialiseerd is in dezelfde zeeanemoon, *Heteractis magnifica*, kolonisatie door *A. akallopisos* in deze regio verhindert. Op dezelfde manier verhindert *A. akallopisos* dan de verspreiding van *A. nigripes* in de WIO.

Binnen dit tweede scenario zijn er opnieuw twee mogelijke verklaringen voor de huidige situatie. Een eerste verklaring zou kunnen zijn dat *A. akallopisos* oorspronkelijk zowel in de EIO, de CIO als de WIO aanwezig was maar ten gevolge van competitie voor anemoonhabitat met *A. nigripes* in de CIO verdwenen is. In de WIO spelen dan vermoedelijk andere ecologische factoren waardoor *A. akallopisos* daar de bovenhand haalt en *A. nigripes* uit deze regio verdringt. Een tweede verklaring zou kunnen zijn dat beide soorten een gemeenschappelijke voorouder hebben die oorspronkelijk in de gehele Indische Oceaan voorkwam. Om een nog ongekende reden, werd de populatie in de CIO echter fysiek van die in de WIO en de EIO gescheiden, waardoor *A. nigripes* en *A. akallopisos* tot twee aparte soorten evolueerden. Het antwoord op de vraag welke van deze twee verklaringen de juiste is, kan momenteel nog niet gegeven worden. Uit de fylogenie van het genus *Amphiprion* kan niet worden opgemaakt of beide soorten nauw verwant zijn of niet omdat de onderlinge verwantschap van een groep waartoe beiden behoren niet opgelost is, al worden ze wel als aparte soorten bevestigd (Santini & Polacco, 2006).

Zowel binnen de EIO- als binnen de WIO-populatie werd geen duidelijke populatiestructuur gevonden. Voor de EIO populatie kan hieruit besloten worden dat er panmixie en bijgevolg hoge gene flow tussen de verschillende onderzochte locaties is. Deze populatie kan als open beschouwd worden. Voor de WIO-populatie is dit enigszins anders omdat de selectieve neutraliteitstesten een significante afwijking van Hardy-Weinberg evenwicht aantoonde. De negatieve waarden in beide testen wijzen ofwel op selectiedruk op de gebruikte merker of een plotse populatie-uitbreiding in het verleden. De resultaten van de SSD-test en de HRI-test gaven aan dat dit laatste het geval was. Hierdoor is het voor deze populatie niet mogelijk om duidelijke conclusies te trekken op basis van deze gegevens.

Besluit

Ons onderzoek toont aan dat verspreiding via pelagische larven over de gehele Indische Oceaan in *A. akallopisos* heel onwaarschijnlijk is en dat de EIO- en WIO-populaties niet verbonden zijn door gene flow en genetisch gedifferentieerd zijn. Voor managementdoeleinden moeten ze dan ook als twee afzonderlijke populaties beschouwd worden. Binnen beide populaties werd geen significante populatiestructuur waargenomen. Voor de WIO-populatie toonden testen bovendien aan dat deze in het verleden een plotse populatie-uitbreiding heeft ondergaan en zich voor de onderzochte merker daardoor niet in Hardy-Weinberg evenwicht bevindt.

Referenties

- Botsford L.W., J.W. White, M.A. Coffroth, C.B. Paris, S. Planes, T.L. Shearer, S.R. Thorrold and G.P. Jones. 2009. Connectivity and resilience of coral reef metapopulations in marine protected areas: matching empirical efforts to predictive needs. *Coral Reefs* 28:327-337.
- Buston P. 2003. Size and growth modification in clownfish. *Nature* 424:145-146.
- Cowen R.K., G. Gawarkiewicz, J. Pineda, S.R. Thorrold and F.E. Werner. 2007. Population connectivity in marine systems An overview. *Oceanography* 20(3):14-21.
- Drew J., G.R. Allen, L. Kaufman and P.H. Barber. 2008, Endemism and regional color and genetic differences in five putatively cosmopolitan reef fishes. *Conservation Biology* 22(4):965-975.

- Excoffier L. and H.E.L. Fischer. 2010, Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567.
- Fautin D.G. 1991, The Anemonefish symbiosis: what is known and what is not. *Symbiosis* 10:23-46.
- Hall T.A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41:95-98.
- Hattori A. 2002. Small and large anemonefishes can coexist using the same patchy resources on a coral reef, before habitat destruction. *Journal of Animal Ecology* 71:824-831.
- Hedgecock D., P.H. Barber and S. Edmands. 2007. Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography* 20(3):70-79.
- Jones G.P., G.R. Almany, G.R. Russ, P.F. Sale, R.S. Steneck, M.J.H. van Oppen and B.L. Willis B.L. 2009. Larval retention and connectivity among populations of corals and reef fishes: history, advances and challenges. *Coral Reefs* 28:307-325.
- Jones D.B., D.R. Jerry, M.I. McCormick and L.K. Bay. 2010. The population genetic structure of a common tropical damselfish on the Great Barrier Reef and eastern Papua New Guinea. *Coral Reefs* 29:455-467.
- Lee W.J., J. Conroy, W. Huntting-Howell and T.D. Kocher. 1995, Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* 41:54-66.
- Leis J.M. 1991. The pelagic stage of reef fishes: the larval biology of coral reef fishes. p.183-230. *In*: Sale P.F. The ecology of fishes on coral reefs. Academic press, San Diego, California, USA.
- Mora C. and P.F. Sale P.F. 2002, Are populations of coral reef fish open or closed? *Trends in Ecology and Evolution* 17:422-428.
- Ollerton J., D. McCollin, D.G. Fautin and G.R. Allen. 2007. Finding Nemo: nestedness engendered by mutualistic organization in anemonefish and their hosts, *Proceedings of the Royal Society Biology* 274:591-598.
- Ricciardi F., M. Boyer and J. Ollerton. 2010. Assemblage and interaction structure of the anemonefish-anemone mutualism across the Manado region of Sulawesi, Indonesia, *Envir Biol Fish* 87: 333-347.
- Ridgway T. and E.M. Sampayo. 2005, Population genetic status of the Western Indian Ocean: What do we know? *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* 4:1-9.
- Saenz-Agudelo P., G.P. Jones, S.R. Thorrold and S. Planes. 2011, Detrimental effects of host anemone bleaching on anemonefish populations. *Coral Reefs* 30:497-506.
- Santini S. and G. Polacco. 2006, Finding Nemo: Molecular phylogeny and evolution of the unusual life style of anemonefish. *Gene* 385:19-27.
- Schott F.A. and J.P. McCreary. 2001. The monsoon circulation of the Indian Ocean. *Progress in Oceanography* 51:1-123.
- Timm J. and M. Kochzius. 2008, Geological history and oceanography of the Indo-Malay Archipelago shape the genetic population structure in the false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*), *Molecular Ecology* 17:3999-4014.
- Timm J., S. Planes and M. Kochzius. 2012, High similarity of genetic population structure in the false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) found in microsatellite and mitochondrial control region analysis. *Conservation Genetics* 13:693-706.
- Vogler C., J. Benzie, P.H. Barber, M.V. Erdmann, Ambariyanto, C. Sheppard, K. Tenggardjaja, K. Gérard and G. Wörheide. 2012. Phylogeography of the Crown-of-Thorns Starfish in the Indian Ocean. *PLOS One* 7(8):1-10.