

Progetto *Pelobates* nel Parco Naturale della
Valle del Ticino Piemonte

Pelobates project in the Ticino Valley Natural Park of Piedmont

LIFE00 NAT/IT/007233



ANALISI GENETICA

responsabile scientifico

Prof. Emilio Balletto

Università degli studi di Torino

Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo

Gennaio 2004



Università degli Studi di Torino
DIPARTIMENTO di BIOLOGIA ANIMALE e dell'UOMO
Via Accademia Albertina, 13 – 10123 TORINO – Italy
Il Direttore Tel. 011.670-4605
Segreteria: 011.670-4600
e-mail emilio.balletto@unito.it

CARATTERIZZAZIONE E VARIABILITÀ GENETICA DI *Pelobates fuscus insubricus*

RELAZIONE FINALE

Gli scopi che si prefiggevano per questo studio consistevano 1) nell'indagare se *Pelobates fuscus insubricus* rappresenti davvero una Unità Evolutivamente Significativa (ESU) nei rispetti di *Pelobates fuscus fuscus* e 2) nell'appurare se la popolazione presente nel Parco Piemontese del Ticino presenti livelli di variabilità genetica sufficienti a garantire la sua sopravvivenza nel medio-lungo periodo, senza che debbano necessariamente venire a manifestarsi problemi di natura genetica, quali la manifestazione di alleli capaci di provocare l'insorgere di scarsa vitalità, o comunque di fitness ridotta, collegabili con livelli d'inbreeding troppo elevati. In tale eventualità negativa, infatti, sarebbe prospettabile compiere uno studio di fattibilità d'interventi di cross-breeding con esemplari provenienti da altre zone della Pianura Padana.

1) Caratterizzazione genetica di *Pelobates fuscus insubricus*

Come è noto, *Pelobates fuscus* è specie politipica comprendente due sottospecie. *Pelobates fuscus fuscus*, distribuita dall'Europa Centrale, a partire dalla valle del Reno fino alla Danimarca e agli Urali. *Pelobates fuscus insubricus* ha invece areale più ristretto, essendo endemica del bacino Padano-Veneto, dal Piemonte (zona di Carmagnola), fino al Ravennate.

Poiché *Pelobates fuscus insubricus* è stato preventivamente elencato nell'Allegato II della Direttiva Habitat (CEE 92/43 del 21.05.1992) come taxon prioritario asteriscato, è ormai di grande importanza accertare se esso rappresenti effettivamente una ESU. Solo in questo caso, infatti, anche tenendo in considerazione la sua grande rarità e la sua ristretta localizzazione geografica, esso potrebbe a buon titolo rappresentare anche una Unità di Gestione (MU). La prosecuzione degli investimenti di cui è stato oggetto, sia in termini di tipo conservazionistico, sia di sforzo di ricerca, sarebbe allora pienamente giustificata.

È stata pertanto effettuata la caratterizzazione genetica di alcuni individui campionati nel Parco Piemontese del Ticino e quindi appartenenti alla sottospecie endemica *Pelobates fuscus insubricus*. Tali individui sono stati confrontati con altri individui appartenenti alla sottospecie nominale, *Pelobates fuscus fuscus*. Come outgroup abbiamo infine preso in esame alcuni esemplari di *Pelobates cultripes*, vale a dire della specie geograficamente a noi più prossima fra le 3 che costituiscono globalmente il genere *Pelobates*. Per quanto riguarda *Pelobates fuscus fuscus* e *Pelobates cultripes* ci siamo avvalsi di esemplari conservati in collezioni museologiche e conservati in alcohol.

La raccolta e lo studio del materiale di *Pelobates fuscus insubricus* è stata invece effettuata solo dopo avere ottenuto il necessario permesso da parte del Ministero per



l'Ambiente e delle Autorità Regionali territorialmente competenti. I campioni analizzati e le località di provenienza sono stati elencati In Tabella 1.

Specie	Provenienza	Individui analizzati	Tessuto utilizzato e metodo di conservazione
<i>Pelobates cultripes</i>	Spagna (Siviglia)	2	Muscolo linguale – alcool etilico
<i>Pelobates cultripes</i>	Francia (Hèrault)	1	Muscolo linguale – alcool etilico
<i>Pelobates cultripes</i>	Francia (Opoul-Pèrillos)	1	Muscolo linguale – alcool etilico
<i>Pelobates fuscus fuscus</i>	Ungheria (Nadudvar)	2	Muscolo linguale – alcool etilico
<i>Pelobates fuscus fuscus</i>	Slovenia (Petrovci)	2	Muscolo linguale – alcool etilico
<i>Pelobates fuscus insubricus</i>	Italia (Cameri)	8	Biopsia caudale su subadulti viventi

Tabella 1. Specie di appartenenza, località di provenienza, numero di individui analizzati e tessuto utilizzato per l'estrazione del DNA.

Per lo studio genetico dei *taxa* in esame, dopo vari tentativi si è deciso di utilizzare la sequenza nucleotidica di un tratto della regione di controllo (*D-loop* o *AT-rich region*) del cromosoma mitocondriale. Poiché tale regione è relativamente libera da forti costrizioni funzionali, e quindi poco soggetta a pressioni selettive, essa presenta infatti una elevata frequenza di fissazione delle mutazioni, dimostrandosi quindi un ottimo marcatore, utile per la discriminazione a livello nucleotidico fra entità tassonomiche filogeneticamente molto affini.

Il DNA totale (nucleare e mitocondriale) è stato estratto a partire dai tessuti elencati in Tabella 1; è tuttavia in corso di studio la possibilità di ottenere quantità utili di campioni tissutali mediante metodi non invasivi, quale ad esempio il raschiamento della mucosa boccale. Il protocollo di estrazione del DNA totale ha previsto la preventiva digestione del tessuto mediante proteasi, seguita dalla precipitazione alcoolica del campione.

La successiva amplificazione genica mediante PCR di un tratto del *D-loop*, condotta utilizzando primer universali per gli anfibi Anuri, ha prodotto un amplicone di circa 0.9 Kb. Dopo purificazione mediante migrazione elettroforetica su gel di agaroso, i prodotti di amplificazione ottenuti sono stati sequenziati e risolti su di un sequenziatore automatico ALF-ExpressII (AP-Biotech). Per limiti intrinseci alla strumentazione utilizzata, dell'intero tratto sequenziato è stato possibile analizzarne correttamente il 70% (circa 630 posizioni nucleotidiche su circa 900 totali).

Cyt b AL	5'- GAATYGGRRGGWCAACCAGTAGAAGACCC -3'
Control PH	5'- GTCCATAGATTCASTTCCGTCAG -3'

Tabella 2. Sequenze dei primer utilizzati per l'amplificazione mediante PCR e per il sequenziamento (Goebel et al., 1999)



L'allineamento e l'analisi delle sequenze nucleotidiche hanno permesso di accertare l'affinità genetica fra le popolazioni. In totale, delle 630 posizioni nucleotidiche allineate, ne sono risultate 526 invariabili e 93 variabili fra i diversi individui analizzati.

In Tabella 3 sono riportati il numero di sostituzioni nucleotidiche osservate (al di sopra della diagonale) e i valori delle distanze genetiche calcolate secondo il metodo di Tamura-Nei (al di sotto della diagonale).

	Pc SPA	Pc FRA	Pff HUN	Pff SLO	Pfi ITA
Pc SPA		11	79	81	79
Pc FRA	0.018		76	78	76
Pff HUN	0.146	0.139		7	21
Pff SLO	0.150	0.143	0.012		22
Pfi ITA	0.144	0.138	0.035	0.036	

Tabella 3. Pc: *Pelobates cultripes*; Pff: *Pelobates fuscus fuscus*; Pfi: *Pelobates fuscus insubricus*. SPA: Spagna; FRA: Francia; HUN: Ungheria; SLO: Slovenia; ITA: Italia Nord-Occidentale. Il numero di sostituzioni nucleotidiche osservate e i valori delle distanze genetiche calcolate secondo il metodo di Tamura-Nei sono riportati rispettivamente al di sopra e al di sotto della diagonale

P. cultripes e *P. fuscus* sono nettamente separabili dal punto di vista genetico, sia in base alla loro distanza genetica, valutabile al 14-15 %, sia in conseguenza di una inserzione/delezione di 7 coppie di basi in posizione relativa 64-70 del tratto sequenziato.

All'interno delle singole popolazioni, nei casi in cui sono stati analizzati più individui (Italia, Spagna, Ungheria e Slovenia), non si riscontra variabilità nucleotidica interindividuale; sono altresì risultate identiche le sequenze dei due singoli individui francesi appartenenti a distinte popolazioni (Hérault e Opoul-Périllos). Tuttavia, è stato possibile evidenziare un certo grado di divergenza nucleotidica fra le popolazioni spagnole e francesi di *P. cultripes* (11 sostituzioni nucleotidiche, con una distanza genetica del 1.9 %) e fra le popolazioni ungheresi e slovene di *P. fuscus fuscus* (7 sostituzioni nucleotidiche, con una distanza genetica del 1.2 %). Quindi le popolazioni conspecifiche geograficamente separate appaiono, almeno in certa misura, geneticamente distinguibili.

Per quanto riguarda *P. fuscus*, oltre alla divergenza fra popolazioni ungheresi e slovene, è da sottolineare che queste ultime sono inequivocabilmente distinte dalla popolazione italiana non soltanto da un significativo numero di sostituzioni nucleotidiche (distanza

genetica 3.55 %) ma, soprattutto, da una inserzione di 14 coppie di basi in posizione 82-95, esclusiva e diagnostica della popolazione italiana.

I valori di distanza genetica calcolati secondo Tamura-Nei sono infine stati utilizzati per la costruzione di un albero filogenetico secondo il metodo Neighbor-Joining (Figura 1)

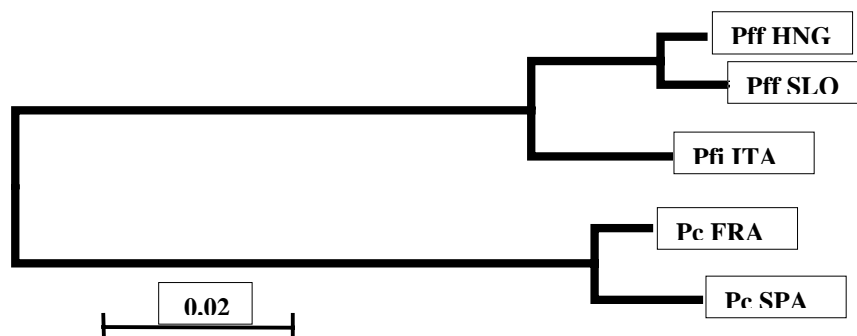


Figura 1. Albero di Neighbor-Joining costruito in base alle distanze genetiche di Tamura-Nei

Sulla base dei risultati ottenuti si può concludere che viene nettamente confermato che *P. cultripes* e *P. fuscus* rappresentano due specie distinte. All'interno di *P. fuscus* è possibile considerare la popolazione italiana come un sistema genetico nettamente differenziato rispetto alle popolazioni europee orientali. Appare quindi lecito distinguere due sottospecie, una europea orientale, *Pelobates fuscus fuscus* e una endemica dell'Italia Nord-Occidentale, *Pelobates fuscus insubricus*.

Per quanto riguarda il primo obiettivo che ci eravamo preposti, di conseguenza, possiamo concludere che *Pelobates fuscus insubricus* costituisce una Unità Evolutivamente Significativa (ESU) e può a buon diritto rappresentare una Unità di Gestione (MU). Tenendo in considerazione anche la grande rarità e la ristretta localizzazione geografica di questo taxon, esso è certo meritevole di grande attenzione a livello conservazionistico e scientifico.

2) Variabilità genetica della popolazione di *Pelobates fuscus insubricus* presente nel Parco Piemontese del Ticino.

Lo studio da noi condotto ha dovuto sfortunatamente confrontarsi con le condizioni climatiche, straordinariamente avverse, che si sono manifestate nel corso dell'intera durata del progetto. Nella zona in esame, infatti, le estati del 2002 e del 2003 sono state caratterizzate da grandissima siccità primaverile-estiva. Di conseguenza, nella impossibilità, per ragioni conservazionistiche, di utilizzare individui adulti, abbiamo dovuto compiere la nostra indagine sulla base delle 8 larve elencate in Tab. 1. Tali larve, peraltro, sono state raccolte tutte assieme, su di una estensione d'acqua di pochi metri quadrati.

Nonostante le sequenze nucleotidiche ottenute abbiano rivelato di appartenere ad un unico aplotipo mitocondriale, non si può al momento escludere che la variabilità genetica della popolazione presente nel Parco sia compatibile con la sopravvivenza a tempo medio lungo della popolazione stessa.

Le 8 larve analizzate, infatti, potrebbero essere tutte "fratelli" e per tale ragione condividere il medesimo cromosoma mitocondriale, che come è noto è trasmesso per via materna.



Università degli Studi di Torino
DIPARTIMENTO di BIOLOGIA ANIMALE e dell'UOMO
Via Accademia Albertina, 13 – 10123 TORINO – Italy
Il Direttore Tel. 011.670-4605
Segreteria: 011.670-4600
e-mail emilio.balletto@unito.it

Emilio Balletto - Piero Cervella