



**Dipartimenti di Scienze
dell'Ambiente e della Vita
Università del Piemonte Orientale
Viale Teresa Michel 11 ,
15121 Alessandria**

ALLEGATO 1

INDAGINE FILOGENETICA SU POPOLAZIONI DEL GAMBERO AUTOCTONO PRESENTI NEL TERRITORIO DEL PARCO ADDA NORD

A cura di:

Alessandro Negri, Irene Pellegrino, Guido Bernini

L'introduzione di specie invasive, di ibridi artificiali o il traslocamento di individui da una popolazione all'altra, anche appartenenti allo stesso taxa ma soggetti a pressioni ambientali differenti, può avere un profondo impatto sull'integrità delle comunità native attraverso la perdita degli adattamenti a condizioni locali (Allendorf et al., 2001; Randi, 2008). La mescolanza genetica e l'introgresione di alleli "alieni" possono manifestarsi con riduzioni della fitness e bruschi declini demografici (*outbreeding depression*, Templeton, 1986), fino al rischio di estinzione delle popolazioni. La definizione del corretto inquadramento tassonomico e della distribuzione geografica delle linee genetiche presenti nelle diverse popolazioni appare perciò un prerequisito fondamentale per l'attuazione di adeguati piani di gestione e conservazione di specie selvatiche, soprattutto se soggette a minaccia di estinzione. (Moritz, 1994; Avise, 2000).

Lo stato tassonomico (l'inquadramento sistematico) del gambero d'acqua dolce, *Austropotamobius pallipes*, nel corso delle ultime cinque decadi è stato soggetto a continue revisioni e ad un acceso dibattito per l'assenza di caratteri morfometrici distintivi (Ghia et al., 2006). Dati molecolari, basati su l'analisi di sequenza del gene mitocondriale 16S, hanno permesso di risolvere la complessa tassonomia di questo taxa suggerendone la suddivisione in due differenti specie (Grandjean et al., 2000, 2002): *A. pallipes*, presente in Francia, Svizzera, Germania, Inghilterra e nell'Italia nord occidentale (Liguria e nel Piemonte orientale) e *A. italicus* (Faxon, 1914) distribuito in Italia, Dalmazia e nella penisola iberica (Fratini et al., 2005; Grandjean et al., 2000; Souty-Grosset et al., 2006). Sono inoltre accettate 4 differenti sottospecie: *A. i. carsicus* (M. Karaman, 1962) *A. i. carinthiacus* (Albrecht, 1981), *A. i. italicus* (Faxon, 1914), *A. i. meridionalis* (Fratini et al., 2005). Questi dati hanno trovato conferma anche in studi condotti tramite l'analisi di sequenza del gene Citocromo Ossidasi I (COI mtDNA), un marcatore dotato di maggior variabilità genetica rispetto al 16S (Trontelj et al 2005, Zaccara 2004, Zaccara et al. 2005, Pedraz-Lara et al., 2010).

Per quest'indagine sono stati genotipizzati 26 esemplari (tabella1) provenienti dai corsi d'acqua: torrente valle di Culigo(n=3), torrente valle Ibraulia (n=4), torrente Cif (n=5), rio Madonna (n=4), torrente Gallavesa (n=3), rio di Cabenaglio (n=2), torrente Greghentino (n=5). Il campionamento, effettuato attraverso l'asportazione di un pereopode, non ha previsto il sacrificio di alcun animale. I tessuti biologici sono stati forniti Laboratorio Acque Interne, Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente dell'Università di Pavia. Lo studio genetico è stato effettuato attraverso l'analisi di sequenza di una porzione del DNA mitocondriale corrispondente all'intero gene Citocromo Ossidasi I (COI mtDNA). Per ogni individuo è stata ottenuta una sequenza di circa 1200 coppie di basi (bp) ricavata unendo il prodotto del sequenziamento di due ampliconi di regioni contigue (porzione 5' COI mtDNA e 3'COI mtDNA). La regione 5' è stata ottenuta disegnando una nuova coppia di primers (FC-5'COIF_TTTGGACTTGAGCTGGGATAG; FC-5'COIR_AAATTATCCCTAATGTACCAAAAGC)

tramite la quale è possibile ottenere frammenti di circa 760 bp mentre la regione contigua (a valle) è stata amplificata utilizzando i primers FC_COI3'FGCATCTGGATAATCAGAATACC - FC_COI3'R-GCATTGTCATGGTATCACA in grado di generare ampliconi di circa 630 bp. Entrambe le coppie di primers sono risultate funzionali sia per *A.pallipes* che per le diverse sottospecie di *A.italicus*. L'inquadrimento sistematico di ogni esemplare analizzato è stato definito tramite la costruzione di un albero filogenetico applicando il software Paup 4.0 (Swofford 2002) e la procedura di neighbour-joining (NJ; Saitou & Nei 1987) .

Il set di dati includeva sequenze di riferimento relative ad esemplari di *A.pallipes*, *A.i. carinthiacus*, *A.i.carsicus* e *A.i.meridionalis* ottenuti da precedenti campionamenti, il cui stato tassonomico era stato definito anche attraverso l'analisi di sequenze del gene 16S rRNA.

ID	Corso	ID Campione	aplotipo (n)	Taxon
41	Madonna	LC9, LC10, LC15, LC16	Ai14 (2); Ai23 (1); Ai66 (1)	<i>A.i.carsicus</i> , <i>A.i.carinthiacus</i>
44	Cif	LC1, LC2, LC3, LC4, LC5	Ai15 (2); Ai28 (1); Ai29 (2)	<i>A.i.carsicus</i> , <i>A.i.carinthiacus</i>
43	Culigo	LC6, LC7, LC8	Ai13 (2); Ai22 (1)	<i>A.i.carsicus</i>
45	Ibraulia	LC11, LC12, LC13, LC14	Ai29 (1); Ai31 (1); Ai32 (1); Ai33 (1)	<i>A.i.carsicus</i> , <i>A.i.carinthiacus</i>
75	Gallavesa	LC17, LC18, LC19	Ai71 (3)	<i>A.i.carsicus</i>
77	Cabenaglio	LC20,LC21	Ai68 (1); Ai69 (1)	<i>A.i.carsicus</i>
78	Greghentino	LC22, LC23, LC24, LC25, LC26	Ai23(3); Ai70 (2)	<i>A.i.carsicus</i> , <i>A.i.carinthiacus</i>

Tabella 1

L'allineamento di sequenze di 1173 coppie relative al gene COImtDNA ha portato all'identificazione di 15 aplotipi (Ai13ADN Ai14ADN Ai15ADN Ai22ADN Ai23ADN Ai28ADN Ai29ADN Ai31ADN Ai32ADN Ai33ADN Ai66ADN Ai68ADN Ai69ADN Ai70ADN Ai71ADN) cioè 15

differenti sequenze mitocondriali presenti in uno o in più dei 26 campioni provenienti dalla provincia di Lecco, definiti da 66 siti di mutazione.

L'albero filogenetico (fig1) mostra come gli aplotipi identificati in questo studio tendano a distribuirsi in due principali raggruppamenti corrispondenti alle sottospecie *A.i.carinthiacus* (clado A-aplotipi; Ai23ADN-Ai28ADN-Ai29ADN) e *A.i.carsicus* (clado C-aplotipi; Ai13ADN-Ai14ADN-Ai15ADN-Ai22ADN-Ai31ADN-Ai32ADN-Ai33ADN-Ai66ADN-Ai68ADN-Ai69ADN-Ai70ADN-Ai71ADN), entrambi ben differenziati dai campioni di riferimento relativi ad esemplari di *A.i.meridionalis* (clado B) e *A. pallipes*.

La distanza genetica media tra i due principali cluster è risultata del 5.5% in accordo con precedenti studi filogenetici relativi popolazioni naturali di *Austropotamobius spp* campionate all'interno del bacino idrografico del fiume Po (Zaccara 2004, Zaccara et al, 2005), dove era stata considerata però ad una porzione del gene COI di soli 454 coppie di basi. La divergenza nucleotidica media tra le due sottospecie e gli aplotipi di *A. pallipes* è risultata molto simile, oscillando tra 7.8.% per *A. i. carinthiacus* e il 8% per *A. i. carsicus*. La presenza in alcuni dei corsi d'acqua indagati di esemplari ascrivibili ad *A.i.carinthiacus* e *A.i.carsicus* sembra indicare come quest' area di studio possa rappresentare una probabile zona di contatto tra le due sottospecie.

Bibliografia

- Allendorf, F., Luikart, G., 2007. Conservation and the genetic of populations, Malden
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P., Wenburg, J.K., 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 613-622.
- Avise J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harward University Press.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
- Barbanera, F., Pergams, O.R.W., Guerrini, M., Forcina, G., Panayides, P., Dini, F., 2010. Genetic consequences of intensive management in game birds. *Biological Conservation* 143, 1259-1268.
- Barton, N.H., 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10, 551-568.
- Cardillo, M., Mace, G.M., Jones, K.E., Bielby, J., Bininda-Emonds, O.R.P., Sechrest, W., Orme, C.D.L., Purvis, A., 2005. Multiple Causes of High Extinction Risk in Large Mammal Species. *Science* 309, 1239-1241.
- Ghia D., P.A. Nardi, A. Negri, F. Bernini, A. Bonardi, G. Fea and M. Spairani, 2006. Syntopy of *A. pallipes* and *A. italicus*: genetic and morphometrical investigations. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 380-381 : 1001-1018
- Grandjean, F., Bouchon, D., Souty-Grosset, C., 2002. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae) with a re-examination of the status of *Austropotamobius berndhauseri*. *J. Crustacean Biol.* 677, 681.
- Grandjean, F., Harris, D.J., Souty-Grosset, C., Crandall, K.A., 2000. Systematics of the European endangered crayfish species *Austropotamobius pallipes* (Decapoda: Astacidae). *J. Crustacean Biol.* 20, 522-529.
- Jiguet, F., Devictor, V., Ottvall, R., Van Turnhout, C., Van der Jeugd, H., Lindström, Å., 2010. Bird population trends are linearly affected by climate change along species thermal ranges. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Moritz C.C., 1994. Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 373-375.
- Olden, J.D., LeRoy Poff, N., Douglas, M.R., Douglas, M.E., Fausch, K.D., 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 18-24.
- Pedraza-Lara C, F. Alda, S. Carranza , I. Doadrio. 2010. Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57:327-342

- Randi, E., 2008. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology* 17, 285-293.
- Saitou N, Nei M, 1987. "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees". *Mol Biol Evol* 4 (4): 406–425.
- Seehausen, O., 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 198-207.
- Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 4.0b2a. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Templeton, A.R., 1986. Coadaptation and outbreeding depression. *Conservation Biology*, 105-116.
- Thomas, C.D., Cameron, A., Green, R.E., Bakkenes, M., Beaumont, L.J., Collingham, Y.C., Erasmus, B.F.N., de Siqueira, M.F., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A.S., Midgley, G.F., Miles, L., Ortega-Huerta, M.A., Townsend Peterson, A., Phillips, O.L., Williams, S.E., 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427, 145-148.
- Trontelj, P., Machino, Y., Sket, B., 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 34, 212–226.
- Zaccara S., 2004. Phylogeography of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in Italy: implication for its taxonomic status and conservation management. PhD., Università degli studi dell'Insubria (Milano).
- Zaccara, S., Stefani, F., Galli, P., Nardi, P.A., Crosa, G., 2004. Taxonomic implications in conservation management of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) (Decapoda, Astacidae) in Northern Italy. *Biol. Conserv.* 120, 1–10.