

Determinazione genetica della presenza delle rane verdi alloctone *Pelophylax ridibundus* e *Pelophylax kurtmuelleri* (Amphibia, Anura, Ranidae) in due località della Romagna

PAOLO LAGHI

Museo di Ecologia, Via alla Rocca 21 - 47014 Meldola (Fc) (Italy) - E-mail: spelerpes@alice.it

DANIO MISEROCCHI

Museo Civico di Storia Naturale di Ferrara, Via Filippo De Pisis 24 - 44121 Ferrara (Italy) - E-mail: danio.miserocchi@gmail.com

MARCO VALLI

Hydrosynergy Soc. Coop., Via Emilia 168 - 40068 San Lazzaro di Savena (Bo) (Italy) - E-mail: m.valli@hydrosynergy.it

RIASSUNTO

Mediante un marcatore genetico nucleare (PLÖTNER *et al.* 2009; HUASWALDT *et al.*, 2012) sono stati valutati diciotto campioni da esemplari di rane verdi in Provincia di Forlì-Cesena con il solo riscontro delle alloctone *P. ridibundus* e *P. kurtmuelleri*.

Parole chiave: *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax kurtmuelleri*, Northern Italy, serum albumin.

ABSTRACT

Genetic determination of the presence of non-native green frogs *Pelophylax ridibundus* and *P. kurtmuelleri* (Amphibia, Anura, Ranidae) in two places of Romagna.

Using a nuclear DNA marker (PLÖTNER *et al.*, 2009; HUASWALDT *et al.*, 2012) were evaluated eighteen samples from specimens of green frogs in the Province of Forlì-Cesena with the only response of the non-native *P. ridibundus* and *P. kurtmuelleri*.

Keywords: *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax kurtmuelleri*, Northern Italy, serum albumin.

INTRODUZIONE

Nel presente elaborato si riporta l'identificazione di *P. ridibundus* e *P. kurtmuelleri* in provincia di Forlì-Cesena, tramite il protocollo sviluppato da HUASWALDT *et al.* (2012) basato sulla differenza nella lunghezza dell'introne-1 del gene per l'albumina (SAI-1) e il retrotrasposone non-LTR *RanaCR1* che intercorre tra *P. ridibundus* e *P. lessonae* (PLÖTNER *et al.*, 2009).

La tassonomia e la distribuzione delle rane verdi in Italia sono state affrontate per mezzo di marcatori morfometrici, bioacustici e molecolari (UZZELL & HOTZ, 1979; SANTUCCI *et al.*, 1996; CANESTRELLI & NASCETTI, 2008) evidenziando come l'approccio combinato di diverse metodologie possa contribuire a risolvere la difficoltà di distinguere le forme ibride ibridogenetiche da specie non ibride, difficoltà complicata della recente introduzione di rane verdi alloctone nel nostro paese. In Italia, *P. ridibundus* è presente con popolazioni autoctone esclusivamente nella parte sud-orientale della Provincia di Trieste e con popolazioni alloctone in altre aree della stessa provincia e in alcune località del Trentino Alto Adige; *P. kurtmuelleri*, invece, è segnalata in Liguria (Provincia di Imperia e Savona), Piemonte (Cuneo e Alessandria) (LANZA *et al.*, 2007) e Lombardia (RAZZETTI *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda le altre specie del genere *Pelophylax*, nel

nostro paese sono presenti due synklepton. Il primo formato da *Pelophylax lessonae* e *P. kl. esculentus*, convenzionalmente presente nella pianura Padana a nord di una linea immaginaria che congiunge Genova a Rimini (TEDALDI & LAGHI, 1998; MAZZOTTI *et al.*, 1999; LANZA *et al.*, 2007; TEDALDI *et al.*, 2007) il secondo, diffuso a sud di tale linea (Italia peninsulare e Sicilia), formato da *P. bergeri* e *P. kl. hispanicus* (LANZA *et al.*, 2007).

La L.R. n°15 luglio 2006 e la direttiva 92/43/CEE si occupano della tutela delle specie autoctone, mentre tutti i campioni su cui sono state svolte le analisi appartengono invece a specie alloctone.

AREA E METODI DI STUDIO

L'analisi genetica è stata condotta su diciotto esemplari campionati in due siti in località Meldola (44°07'5.67"N 12°03'53.64"E) e Magliano (44°10'07.85"N 12°05'15.75"E) (Provincia di Forlì-Cesena).

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata tramite il metodo fenolo-cloroformio indicato da KOCHER *et al.* (1989) a partire da porzioni di tessuto conservate in alcool 100% prelevate dalla coda, nel caso di girini, o da una falange da una delle zampe posteriori nel caso degli adulti.

Il DNA estratto è stato amplificato secondo il protocollo pro-

posto da HAUSWALDT *et al.* (2012); tale metodologia permette, tramite una singola reazione di PCR, a cui fa seguito un controllo su gel di agarosio, di individuare un bandeggio diagnostico per i taxa esaminati.

In particolare, una singola banda di circa 800 pb (paia di basi) è diagnostica per *P. ridibundus* mentre una banda di circa 300 pb è diagnostica per *P. lessonae*; nell'ibrido *P. kl. esculentus* si osserva sempre una combinazione delle due bande ereditate da *P. ridibundus* e *P. lessonae*. Talvolta negli ibridi può essere presente una terza banda di circa 600 pb (HAUSWALDT *et al.*, 2012).

Infine, in HAUSWALDT *et al.* (2012), è caratterizzato il bandeggio atteso per altre specie del genere *Pelophylax* consentendo, quindi, anche la potenziale identificazione di taxa originariamente non presenti nel territorio indagato.

RISULTATI

Località Parco delle Fonti (Meldola-FC)

In tabella 1 è riportato il dataset completo, mentre in figura 1 è possibile osservare il profilo dei 10 individui analizzati catalo-

gati con la sigla PdF ed un numero progressivo da 1 a 10.

Dall'analisi molecolare gli esemplari PdF4, PdF5, PdF7 mostrano una banda di circa 800 pb e sono pertanto attribuibili alla specie *P. ridibundus*; gli esemplari PdF1, PdF6 e PdF10 mostrano due bande, a circa 800 e 700 pb; la contemporanea presenza di tali bande è considerata diagnostica per *P. ridibundus* (HAUSWALDT *et al.*, 2012).

Gli esemplari PdF2, PdF3, PdF8, PdF9 mostrano, invece, una banda di circa 700 pb tipica di *P. kurtmuelleri* (HAUSWALDT *et al.*, 2012). Tuttavia, poichè in questo lavoro è riportato un singolo caso di un esemplare *P. ridibundus* con una sola banda di 700 pb, tali individui non possono essere determinati con certezza assoluta se non affiancando ulteriori indagini molecolari a quella già utilizzata. Ulteriori approfondimenti, inoltre, meriterebbero gli individui PdF1 e PdF6, i quali mostrano una banda di 1500 pb e PdF9 con una banda di 1200 pb, non documentate in HAUSWALDT *et al.* (2012).

Località Magliano (FC)

In tabella 2 è riportato il dataset completo, mentre in figura 2 è possibile osservare il profilo degli 8 individui analizzati catalo-

SIGLA	LOCALITÀ	MOME CAMPIONE	DET. SPECIFICA MOLECOLARE
PdF	Parco delle Fonti	PdF1	PRI
PdF	Parco delle Fonti	PdF2	PKU
PdF	Parco delle Fonti	PdF3	PKU
PdF	Parco delle Fonti	PdF4	PRI
PdF	Parco delle Fonti	PdF5	PRI
PdF	Parco delle Fonti	PdF6	PRI
PdF	Parco delle Fonti	PdF7	PRI
PdF	Parco delle Fonti	PdF8	PKU
PdF	Parco delle Fonti	PdF9	PKU
PdF	Parco delle Fonti	PdF10	PRI

Tab. 1. Dataset completo che riporta: sigla, località, nome e determinazione specifica molecolare dei campioni. PRI = *P. ridibundus*, PKU = *P. kurtmuelleri*. Pdf = Parco delle Fonti (Meldola - FC).

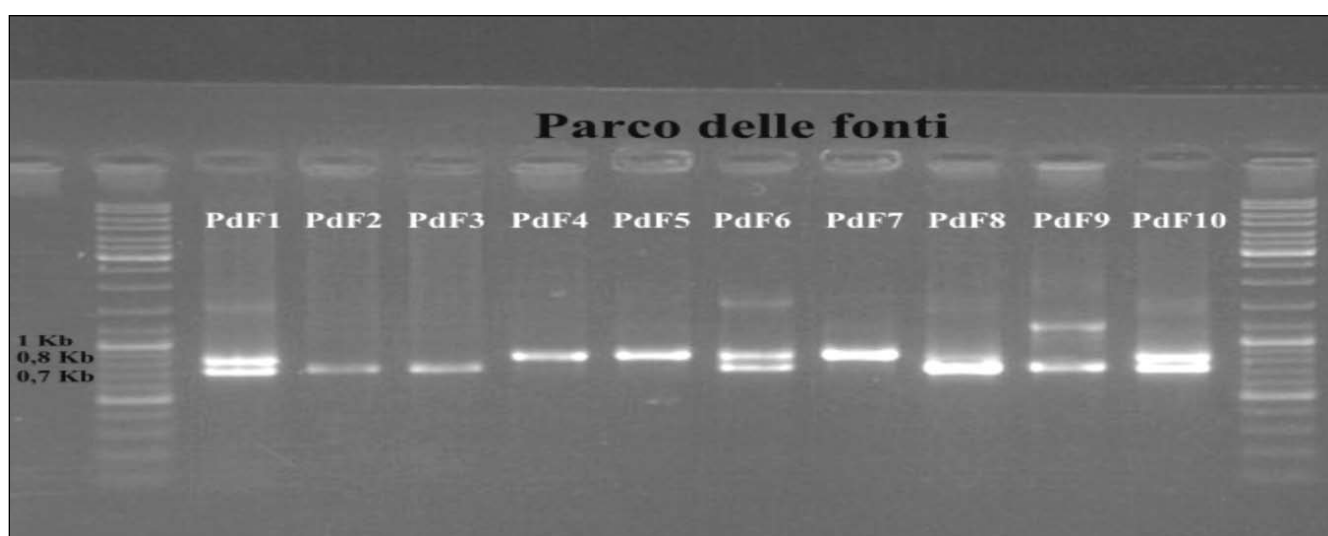


Fig. 1. Profilo degli individui analizzati. A lato dei campioni sono visibili i marcatori di peso molecolare che consentono di determinare la lunghezza delle bande amplificate. Le tre bande più luminose del marcatore corrispondono, a partire dall'alto, rispettivamente a: 3000 pb, 1000 pb e 500 pb (es. 1Kb= 1000 pb). In nero, a lato, sono evidenziate le bande di riferimento più significative per la comprensione dei profili visibili in figura. Pdf = Parco delle Fonti (Meldola - FC).

gati con la sigla Ma e un numero progressivo da 1 a 8. Dall'analisi molecolare gli individui nominati con le sigle da Ma1 a Ma3 e Ma6 mostrano una banda a circa 700 pb diagnostica di *P. kurtmuelleri*; vale, tuttavia, quanto rilevato per alcuni individui in località Parco delle Fonti. Per questo motivo tali individui non possono essere determinati con certezza assoluta se non affiancando ulteriori indagini molecolari a quella già utilizzata. Gli individui Ma4 e Ma8 presentano un'unica banda a circa 800 pb, mentre gli esemplari Ma5 e Ma7 due bande a 800 e 700 pb e sono stati pertanto determinati come *P. ridibundus*.

DISCUSSIONE

Gli esemplari esaminati appartengono a taxa alloctoni e finora non segnalati per la Provincia di Forlì-Cesena (LANZA *et al.*, 2007), mentre non è stata rilevata la presenza di *P. lessonae* e *P. kl. esculentus* (MAZZOTTI *et al.*, 1999; TEDALDI & LAGHI, 1998). La presente indagine genetica preliminare, limitata a due soli siti, necessita quindi di ulteriori approfondimenti. Infatti, è in corso un esteso piano di campionamenti mirato a definire l'effettiva

diffusione di *P. ridibundus* e *P. kurtmuelleri* e/o di altri taxa alieni e verificare l'eventuale sintopia con le rane verdi autoctone.

In tal senso, il protocollo elaborato da HAUSWALDT *et al.* (2012), di rapida esecuzione e dai costi contenuti, rappresenta un valido strumento per effettuare un ampio screening delle popolazioni campionate per determinare, in prima istanza, la presenza/assenza di taxa alieni.

In seguito, qualora si rilevasse la presenza di specie non attese, l'impiego di marcatori genetici mitocondriali (BELLATI *et al.*, 2012), consentirebbe di individuare l'origine geografica dei taxa alloctoni e determinare le possibili conseguenze ecologiche e genetiche sui taxa autoctoni.

Infatti, *P. ridibundus* e *P. kurtmuelleri* possono competere con *P. lessonae* e *P. kl. esculentus* per le risorse trofiche e gli habitat disponibili. Inoltre, *P. ridibundus*, a differenza di *P. kurtmuelleri* (HOTZ *et al.* 1985; BERGER *et al.* 1994) è in grado di produrre ibridi ibridogenetici con *P. lessonae* innescando conseguenze genetiche molteplici e difficili da prevedere (PAGANO *et al.*, 1997; PAGANO *et al.*, 2003; HOLSBECK & JOORIS, 2010; HOLSBECK *et al.*, 2010).

Infatti, in condizioni naturali e in assenza di genotipi alloctoni, *P. kl. esculentus* (sistema L-E), elimina il genoma *lessonae*

SIGLA	LOCALITÀ	NOME CAMPIONE	DET. SPECIFICA MOLECOLARE
Ma	Magliano	Ma1	PKU
Ma	Magliano	Ma2	PKU
Ma	Magliano	Ma3	PKU
Ma	Magliano	Ma4	PRI
Ma	Magliano	Ma5	PRI
Ma	Magliano	Ma6	PKU
Ma	Magliano	Ma7	PRI
Ma	Magliano	Ma8	PRI

Tab. 2. Dataset completo che riporta: sigla, località, nome e determinazione specifica molecolare dei campioni. PRI = *P. ridibundus*, PKU = *P. kurtmuelleri*. MA = Magliano (FC).

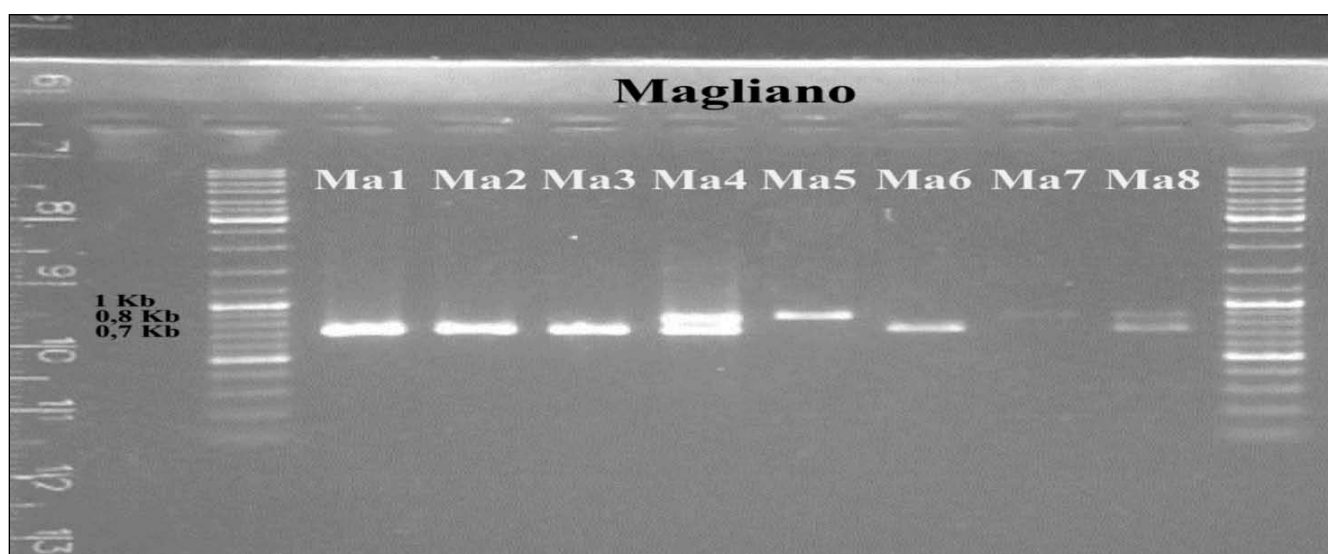


Fig. 2. Profilo degli individui analizzati. A lato dei campioni sono visibili i marcatori di peso molecolare che consentono di determinare la lunghezza delle bande amplificate. Le tre bande più luminose del marcatore corrispondono, a partire dall'alto, rispettivamente a: 3000 pb, 1000 pb e 500 pb (es. 1Kb= 1000 pb). In nero, a lato, sono evidenziate le bande di riferimento più significative per la comprensione dei profili visibili in figura. MA = Magliano (FC).

dalla linea germinale e trasmette clonalmente il solo genoma *ridibundus* secondo un meccanismo riproduttivo noto come ibridogenesi. Gli ibridi formano popolazioni miste con uno dei due taxa parentali e più precisamente con *P. lessonae* nel territorio indagato.

Diversamente, se introdotta in un sistema L-E, *P. ridibundus* può incrociarsi con entrambi i taxa nativi, producendo prole con genoma *ridibundus* in incroci con *P. kl. esculentus* e nuova prole ibrida in incroci con *P. lessonae*.

Entrambi gli scenari sono potenzialmente in grado di generare un rapido aumento di *P. ridibundus* nella popolazione, con progressiva sostituzione dei due taxa nativi e l'affermazione di popolazioni formate esclusivamente da individui di tale specie (VORBURGER & REYER, 2003; HOLSBECK *et al.*, 2008; 2010; HOLSBECK & JOORIS, 2010).

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano Stefano Mazzotti e Dino Scaravelli per le riletture e gli utili consigli al seguente lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- BELLATI A., RAZZETTI E., RESTEGHINI M., SACCHI R., PELLITTERI-ROSA D., CASIRAGHI M., BERNINI F., GALEOTTI P. & FASOLA M., 2012 - First molecular characterization of invasive alien populations of *Pelophylax kurtmuelleri* (Gayda, 1940) and new records from Italy. Oral communication at the "IX Congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica", Bari-Conversano, Italy, 26th - 30th September.
- BERGER L., UZZELL T. & HOTZ H., 1994 - Postzygotic reproductive isolation between Mendelian species of European water frogs. In: II International symposium on ecology and genetics of European water frogs, 18-25 Sept 1994, vol 39. Wrocław, Poland, *Zoologica Poloniae*, 209-242 pp.
- CANESTRELLI D. & NASCETTI G., 2008 - Phylogeography of the pool frog *Rana (Pelophylax) lessonae* in the Italian peninsula and Sicily: multiple refugia, glacial expansions and nuclear-mitochondrial discordance. *Journal of Biogeography*, 35: 1923-1936.
- HAUSWALDT S.T., HÖER M., OGIELSKA M., CHRISTIANSEN D.G., DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA D., CZERNICA E. & VENCE M., 2012 - A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*). *Molecular Ecology Resources*, 12(5): 797-805.
- HOLSBECK G., MERGEAY J., HOTZ H., PLÖTNER J., VOLCKAERT F.A.M. & DE MEESTER L., 2008 - A cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex: the toll of uncontrolled commercial trade and weak international legislation. *Molecular Ecology Resources*, 17: 5023-5035.
- HOLSBECK G. & JOORIS R., 2010 - Potential impact of genome exclusion by alien species in the hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Biological Invasions*, 12: 1-13.
- HOLSBECK G., MERGEAY J., VOLCKAERT F.A.M. & DE MEESTER L., 2010 - Genetic detection of multiple exotic water frog species in Belgium illustrates the need for monitoring and immediate action. *Biological Invasions*, 12: 1459-1463.
- HOTZ H., MANCINO G., BUCCI-INNOCENTI S., RAGGHIANI M., BERGER L. & UZZELL T., 1985 - *Rana ridibunda* varies geographically in the ability of its genomes to induce hybridogenesis. *Journal of Experimental Zoology*, 236: 199-210.
- KOCHER T.D., THOMAS W.K., MEYER A., EDWARDS S.V., PÄÄBO S., VILLABLANCA F. & WILSON A.C., 1989 - Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceeds of Academy of Science, USA* 86, 6196-6200.
- LANZA B., ANDREONE F., BOLOGNA M. A., CORTI C. & RAZZETTI E., 2007 - *Fauna d'Italia / Amphibia*. Edizioni Calderini de Il sole 24 ORE Editoria Specializzata s.r.l.
- MAZZOTTI S., CARAMORI G., BARBIERI C., 1999 - Atalante degli Anfibi e dei Rettili dell'Emilia-Romagna (Aggiornamento 1993/1997) - *Quaderni della Stazione di Ecologia del Museo Civico di Storia naturale di Ferrara*, 12: 1-121.
- PAGANO A., JOLY P. & HOTZ H., 1997 - Taxon composition and genetic variation of water frogs in the Mid-Rhone floodplain. *Life Science*, 320: 759-766.
- PAGANO A., DUBOIS A., LESBARRÈRES D. & LODÉ T., 2003 - Frog alien species: a way for genetic invasion? *Comptes Rendus Biologies*, 326: 86-92.
- PLÖTNER J., KÖHLER F. & UZZELL T., 2009 - Evolution of the serum albumin intron-1 is shaped by a 5' truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (*Neobatrachia*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53: 784-791.
- RAZZETTI E., PELLITTERI-ROSA D., SACCHI R., TISO E. & BERNINI F., 2010. Primi dati sulla presenza di *Pelophylax kurtmuelleri* (Gayda, 1940) in Lombardia. In Di Tizio L., Di Cerbo A.R., Di Francesco N., Cameli A. (Eds), 2010 Atti VIII Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica (Chieti, 22-26 settembre 2010), Ianieri Edizioni, Pescara, 584 pp.
- SANTUCCI F., NASCETTI G. & BULLINI L., 1996 - Hybrid zones between two genetically differentiated forms of the pond frog *Rana lessonae* in southern Italy. *Journal of Evolutionary Biology*, 9: 429-450.
- TEDALDI G. & LAGHI P., 1998 - Atlante erpetologico della Provincia di Forlì-Cesena: risultati dopo cinque anni di attività (Amphibia, Urodela, Anura). *Quaderno di Studi e Notizie di Storia naturale della Romagna*, 10: 33-45.
- TEDALDI G., LAGHI P. & PASTORELLI C., 2007 - Gli Anfibi e i Rettili. In: L. Casini, S. Gellini (a cura di). *Atlante dei Vertebrati tetrapodi della provincia di Rimini*. Provincia di Rimini, pp. 88-152.
- UZZELL T. & HOTZ H., 1979 - Electrophoretic and morphological evidence for two forms of green frogs (*Rana esculenta* complex) in peninsular Italy (Amphibia, Salientia). *Mitteilungen aus dem zoologischen Museum in Berlin*, 55: 13-27.
- VORBURGER C. & REYER H.U., 2003 - A genetic mechanism of species replacement in European waterfrogs? *Conservation Genetics*, 4: 141-155. doi:10.1023/A:1023346824722.