

Francesco Belluardo^{1,2}, Luca Cornetti^{1,3}, Samuele Ghielmi⁴, Giovanni Giovine⁵, Gentile F. Ficetola^{6,7}, Giorgio Bertorelle³, Cristiano Vernesi¹, Heidi C. Hauffe¹.

¹Dip. di Biodiversità ed Ecologia Molecolare, Centro Ricerca e Innovazione, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (TN); ²Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Milano; ³Dip. di Scienze della vita e biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara; ⁴Museo Insubrico di Storia Naturale di Clivio e Induno Olona, Clivio (VA); ⁵Stazione Sperimentale Regionale per lo Studio e la Conservazione degli Anfibi in Lombardia, Lago di Endine, Casazza (BG); ⁶Dip. di Scienze dell'Ambiente e di Scienze della Terra, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milano; ⁷Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), CNRS UMR 5553, Université Joseph Fourier, Grenoble (Francia).

Introduzione

Zootoca vivipara è una piccola lucertola eurasiatica (fig. 1) che presenta in Italia due sottospecie parapatriche, *Z. v. vivipara* e *Z. v. carniolica*, caratterizzate da differenziate modalità riproduttiva. La prima è ovovivipara, mentre la seconda è ovipara [1,2]. Negli ultimi 4,5 milioni di anni le due sottospecie hanno vissuto in allopatria per centinaia di migliaia di anni, durante i quali hanno sviluppato una forte divergenza in termini genetici, filogenetici, cariotipici ed ecologici (fig. 2) [2,3,4,5]. In questo lasso di tempo potrebbe essersi sviluppata, inoltre, una qualche forma di barriera riproduttiva e, quindi, essersi avviato un processo di speciazione. L'analisi di eventuali aree di sintopia esistenti tra le due sottospecie è molto utile al fine di ottenere indicazioni circa il possibile isolamento riproduttivo e, di conseguenza, per comprendere il grado dell'eventuale processo di speciazione [6,7]. Lindtke et al. (2010) [8] hanno già analizzato un'area di sintopia (Carinzia, Austria) tra *Z. v. vivipara* e *Z. v. carniolica*, individuando 2 ibridi su 37 individui analizzati, basando le analisi esclusivamente su caratteri fenotipici. Nel presente studio si è analizzata la prima area di sintopia individuata in Italia tra *Z. v. vivipara* e *Z. v. carniolica*, situata in Val Mora, una piccola valle nelle Alpi Orobie bergamasche, tramite l'utilizzo di marcatori mitocondriali (citocromo-b) e nucleari (microsatelliti), al fine di individuare eventuali individui ibridi tra le due sottospecie presenti nell'area e ottenere, quindi, indicazioni circa l'eventuale processo di speciazione.



Fig. 1. Individuo adulto di *Z. vivipara* (foto di K. Tabarelli de Fatis)

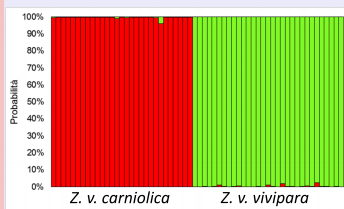


Fig. 8. Probabilità di ogni individuo, basata sulle frequenze alleliche dei 13 loci microsatelliti, di appartenere alla sottospecie parentale (aplotipo mitocondriale di appartenenza) inferita dall'analisi di Structure 2.3.4 [18]. I colori rosso e verde indicano il valore di probabilità di appartenere rispettivamente a *Z. v. carniolica* e *Z. v. vivipara*. Si noti l'assenza di ibridi (individui con simili valori di probabilità di appartenere ad entrambi i gruppi) e l'estrema omogeneità interna ai due gruppi.



Fig. 4. Val Mora. Prato nella zona di sintopia.

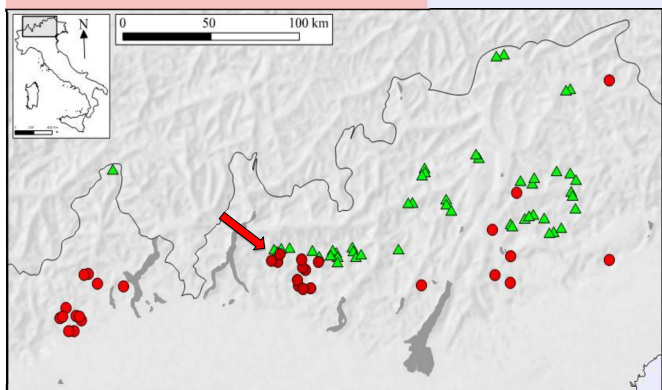


Fig. 2. Mappa di distribuzione di *Z. v. vivipara* (triangoli verdi) e *Z. v. carniolica* (cerchi rossi) nell'arco alpino italiano. La freccia rossa indica l'area di studio indagata in Val Mora. [2]

Materiali e Metodi

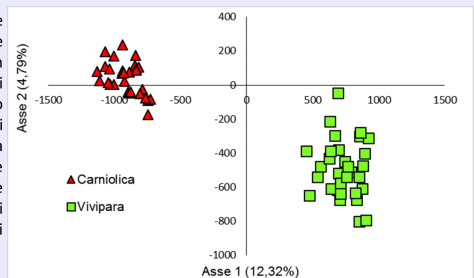
L'area di campionamento (1,27 Km²), situata in Val Mora, è posta ad un'altitudine di 1400-1800 m (fig. 3). La zona di sintopia vera e propria si trova a 1510 m di quota (fig. 4). Sono stati raccolti 60 campioni (fig. 5) prelevando l'estremità della coda agli individui catturati, poi utilizzata per le indagini genetiche. In laboratorio si sono ottenute le sequenze del gene mitocondriale citocromo-b (385pb [9]) e le frequenze alleliche di 13 loci microsatelliti [10,11,12]. Ogni individuo è stato assegnato ad una delle due sottospecie sulla base dell'aplotipo mitocondriale osservato, essendo le due indistinguibili su base morfologica [13,14]. Si è ricercata la presenza di ibridi in base a discordanze tra l'aplotipo mitocondriale (sottospecie assegnata) e le frequenze alleliche nucleari, per ogni individuo. Si sono, inoltre, analizzati la distanza genetica e la struttura genetica delle due sottospecie.

Fig. 5. Femmina adulta di *Z. v. vivipara* catturata durante il campionamento. Si noti il ventre gonfio, indicativo dello stato gravido.

Risultati

I 60 individui campionati sono stati assegnati alle due sottospecie in base ai risultati delle analisi sul DNA mitocondriale (29 individui di *Z. v. carniolica* e 31 individui di *Z. v. vivipara*) (fig. 6). La distanza tra l'aplotipo di *Z. v. carniolica* e il più vicino di *Z. v. vivipara* è risultata di ben 19 mutazioni. Non sono stati rilevati individui ibridi. La probabilità [15] che uno o più individui non appartengano alle linee pure parentali, ma derivino da un evento di ibridazione, non supera il 2%. Le popolazioni delle due sottospecie costituiscono due raggruppamenti ben distinti tra loro geneticamente ed estremamente omogenei al loro interno (fig. 7 e 8). Ciò viene dimostrato anche dagli alti valori calcolati, nel confronto tra le due sottospecie, dell'indice F_{ST} [7] (0,381) e degli alleli privati (54,1% *Z. v. carniolica*, 64,56% *Z. v. vivipara*).

Fig. 7. Analisi delle Corrispondenze Fattoriali [16] effettuata tramite il software Genetix 4.05 [17]. Gli individui con aplotipo mitocondriale di *Z. v. carniolica* si dispongono nella parte sinistra del grafico ben distinti dagli individui con aplotipo di *Z. v. vivipara* nella parte destra; ciò indica una forte distanza genetica tra le due sottospecie. Non si rilevano strutture interne ai due gruppi. L'assenza di individui in posizione intermedia tra i due gruppi indica l'assenza di ibridi.



Discussione e Conclusioni

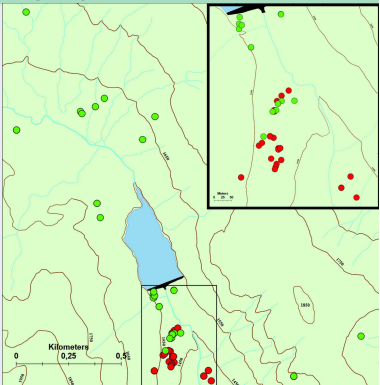
Dai risultati emerge chiaramente l'assenza di flusso genico tra le due sottospecie nell'area di contatto rilevata in Val Mora. In quest'area il processo di speciazione e l'isolamento riproduttivo possono, quindi, essere considerati completi. Le centinaia di migliaia di anni vissuti in allopatria hanno determinato non solo una forte differenziazione tra le due sottospecie riscontrabile dal punto di vista genetico, filogenetico, cariotipico ed ecologico [2,3,4,5], ma hanno anche portato al completamento del processo di speciazione.

I risultati di questo studio hanno anche importanti implicazioni a livello conservazionistico. *Z. v. carniolica* dovrebbe, infatti, essere gestita in modo separato da *Z. v. vivipara* (considerata non a rischio da IUCN [19]), rappresentando, *Z. v. carniolica*, di fatto una specie distinta rispetto a *Z. v. vivipara*. Ciò risulta particolarmente importante a causa delle già note estinzioni locali o regressioni delle ormai rare popolazioni planiziali italiane che dimostrano come l'aumento della pressione antropica e, probabilmente, i cambiamenti climatici, siano fattori di rischio per la persistenza di questa sottospecie in Italia [1,20].

Fig. 6 (a destra). Mappa dei campioni raccolti in Val Mora distinti tra le due sottospecie sulla base degli aplotipi mitocondriali di appartenenza. Gli individui di *Z. v. vivipara* sono rappresentati dai cerchi verdi, quelli di *Z. v. carniolica* dai cerchi rossi. Le isoipse distano tra loro 100 m. Nel riquadro in alto a destra è riportato l'ingrandimento dell'area di sintopia.



Fig. 3. Val Mora. Veduta della diga e del relativo lago artificiale, in direzione sud.



Bibliografia

- [1] Corti C et al., 2010. Calderini, Mi.
- [2] Cornetti L et al., 2014. PLoS ONE, 9: e85912.
- [3] Odierna G et al., 2001. Ecology, 24: 332-340.
- [4] Surget-Groba Y et al., 2001. Mol. Phylogenet. Evol., 18: 449-459.
- [5] Surget-Groba Y et al., 2006. Biol. J. Linn. Soc., 87: 1-11.
- [6] Jiggins CD & Mallet J, 2000. Trends Ecol. Evol., 15: 250-255.
- [7] Allendorf FW & Luikart G, 2007. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- [8] Lindtke D et al., 2010. Salamandra, 46: 73-82.
- [9] Smith MF & Patton JL, 1991. Mol. Biol. Evol., 8: 85-103.
- [10] Boudjemadi K et al., 1999. Mol. Ecol., 8: 513-525.
- [11] Remón et al., 2008. Mol. Ecol. Resour., 8: 1351-1353.
- [12] Agata K et al., 2011. Mol. Ecol. Resour., 11: 586-589.
- [13] Mayer W et al., 2000. Herpetozoa, 13: 59-69.
- [14] Guillaume CP et al., 2006. Russ. J. Herpetol., 13: 1-10.
- [15] Anderson EC & Thompson EA, 2002. Genetics, 160: 1217-1229.
- [16] Benzecri JP, 1973. Dunod, Parigi, FRA.
- [17] Belkhir K et al., 1996-2004. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, FRA.
- [18] Pritchard JK et al., 2000. Genetics, 155: 945-959.
- [19] www.iucnredlist.org
- [20] Surget-Groba Y et al., 2002. Biol. Cons., 106: 365-372.

