



Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile

Dottorato in

“Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche”

XIX Ciclo

“Sistematica molecolare e coevoluzione parassita-ospite,
in specie del genere *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae),
parassite di uccelli ittiofagi”

(SSD Bio/07)

Coordinatore:
Prof. Giuseppe Nascetti

Dottorando:
Michela Paoletti

Tutor:
Dott.ssa Simonetta Mattiucci

INDICE

Introduzione e obiettivi della ricerca	3
1. Dati bibliografici	7
1.1 Il genere <i>Contracaecum</i>	
1.1.1 Aspetti co-evolutivi parassita-ospite	17
1.2 Areali di distribuzione delle specie di uccelli ittiofagi oggetto di studio	19
1.3 Co-evoluzione parassita-ospite	24
2. Materiali e metodi	26
2.1 Elettroforesi multilocus: materiale	26
2.2 Elettroforesi multilocus: metodo	26
2.2.1 Tecnica MAE	26
2.2.2 Nomenclatura dei loci e degli alleli	29
2.2.3 Patterns elettroforetici	29
2.3 DNA mitocondriale (Citocromo Ossidasi II): materiale	33
2.4 DNA mitocondriale: metodo	33
2.4.1 Il DNA mitocondriale come marcatore genetico	33
2.4.2 Estrazione del DNA	36
2.4.3 Amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)	37
2.4.4 Sequenziamento	39
2.4.5 Analisi delle sequenze	39
2.5 Analisi statistiche e filogenetiche	41
3. Risultati	43
3.1 Elettroforesi multilocus	43
3.2 Analisi delle sequenze ottenute dalla mtDNA <i>cox-2</i>	57
3.3 Relazioni genetiche tra le specie del genere <i>Contracaecum</i> a livello nucleare (allozimi)	60
3.4 Gli allozimi come marcatori per il riconoscimento delle specie	63
3.5 Relazioni genetiche tra le specie di <i>Contracaecum</i> a livello mitocondriale (<i>cox-2</i>)	66
3.6 Identificazione delle forme larvali	72
3.7 Descrizione morfologica della specie <i>C. bioccai</i>	77
4. Discussione	82
4.1 Aspetti di sistematica molecolare	82
4.2 Aspetti ecologici	86
4.3 Aspetti co-evolutivi	89
5. Considerazioni conclusive	92
APPENDICE A	95
Lavori consultati	I-XVI

Introduzione e obiettivi della ricerca

Il parassitismo e le relazioni ospite-parassita nell'ambito di una comunità e di un ecosistema, hanno suscitato da vari anni l'interesse di numerosi ricercatori (Poulin & Morand, 2004). Infatti, i diversi aspetti di questa relazione interspecifica hanno trovato ampio spazio in numerosi studi che vanno dal riconoscimento delle specie biologiche di parassiti mediante metodiche genetico-molecolari, al ruolo svolto dai parassiti nelle popolazioni ospiti ed, indirettamente, nell'ecosistema. I parassiti mostrano, inoltre, un'enorme diversità di cicli biologici che implicano differenti modalità riproduttive, capacità di dispersione, efficaci meccanismi nel parassitare un ospite, ecc. (Criscione *et al.*, 2005). Le specie parassite si sono dimostrate molto utili come indicatori biologici di strutture e stabilità di reti trofiche, della biodiversità di un ecosistema, di inquinamento, di variabili ambientali, di distruzione ed alterazione dell'habitat, di migrazione dei loro ospiti e della biologia delle popolazioni ospiti (MacKenzie, 1990; 2002; Thomas *et al.*, 1996; Mattiucci *et al.*, 2004; Marcogliese, 2005). D'altro canto, la relazione ospite-parassita si è rilevata molto utile anche come modello per stabilire e monitorare lo stato di salute di specie soggette a cali demografici, e quindi, anche ai fini della conservazione di specie ospiti.

La specie-specificità è spesso molto sviluppata nelle relazioni ospite-parassita; non soltanto si verifica frequentemente la presenza di una specie di parassita in una sola specie di ospite, ma c'è anche una corrispondenza tra specifici genotipi di parassita e specifici genotipi di ospite che essi possono parassitare. Nella situazione più estrema si verifica una stretta corrispondenza biunivoca ("a uno a uno") tra i geni che conferiscono patogenicità a un parassita e i geni che conferiscono resistenza ad un ospite (Bullini *et al.*, 1998).

Tuttavia le popolazioni sia dell'ospite che del parassita possono essere un complesso di pools genici; pertanto risulta indispensabile poter distinguere le specie biologiche sia dei parassiti che degli ospiti. Fino a qualche decina di anni fa, l'unico metodo per l'identificazione della specie, soprattutto per quanto riguarda la specie parassita, era l'approccio morfologico che tuttavia nel corso degli anni si è rivelato insufficiente nel riconoscimento di specie biologiche e per stabilire le affinità tra specie o popolazioni, rendendo necessario affiancare allo studio morfologico anche studi di genetica molecolare. In generale, le metodiche genetiche e di biologia molecolare offrono grandi possibilità per lo studio dell'evoluzione della specificità dell'ospite, i patterns di speciazione e i cicli biologici. A tal proposito, l'utilizzo di marcatori genetici ha, in generale, rivoluzionato negli ultimi decenni la sistematica e la filogenesi dei parassiti. In passato, infatti, lo stato tassonomico dei parassiti veniva determinato solo

morfologicamente e pertanto si definivano le “morfo-specie” piuttosto che le “specie biologiche”. Ad oggi i soli caratteri morfologici risultano pochi e spesso contraddittori, indicando che a volte il carattere morfologico distintivo è di scarso interesse filogenetico; ciò può essere dovuto a diversi fenomeni come il fatto che l’adattamento alla vita parassitaria può aver portato a fenomeni di convergenza evolutiva, e/o parallelismo morfologico, anche in presenza di isolamento riproduttivo, oppure che i processi di formazione delle specie non comportino necessariamente un cambiamento a livello morfologico, soprattutto nei casi in cui i segnali di riconoscimento non sono di natura visiva, ma olfattiva, chimica, ecc., o, ancora, che si possono verificare pressioni selettive divergenti su alcuni caratteri che determinano un rapido differenziamento, ma che spesso non coinvolgono i meccanismi di isolamento riproduttivo. Grazie all’introduzione dell’approccio molecolare è stato pertanto possibile scoprire l’esistenza di “specie gemelle”; questo termine fu introdotto da Mayr (1942) per indicare popolazioni di individui morfologicamente molto simili o uguali tra loro, ma riproduttivamente isolate e pertanto anche geneticamente differenti. Tali specie però, presentano spesso livelli di divergenza genetica inferiori a quelli esistenti tra specie affini, morfologicamente differenziate, come risultato di processi di speciazione recenti. Le specie gemelle sono particolarmente numerose tra organismi endoparassiti. Ciò dipende da vari motivi, come ad esempio l’esistenza di pressioni selettive in favore del mantenimento di un fenotipo immutato in situazioni ecologiche che permangono simili e stabili nel tempo.

Il fenomeno dell’esistenza delle specie gemelle è stato ampiamente dimostrato nell’ambito dei nematodi anisakidi, endoparassiti allo stadio adulto, di mammiferi marini (pinnipedi e cetacei) e di uccelli ittiofagi. Questi parassiti sono stati oggetto, in questi ultimi anni, di studi di sistematica molecolare allo scopo di caratterizzarne la struttura genetica, permettendo di riconoscere nell’ambito della stessa morfo-specie, pools genici distinti e riproduttivamente isolati (specie gemelle), consentendo di chiarirne il ciclo biologico e fenomeni di competizione interspecifica.

Molti studi sono stati condotti, in questi ultimi anni, per esempio, sui nematodi anisakidi del genere *Anisakis*, che hanno consentito di individuare specie gemelle nell’ambito di alcune morfo-specie, di caratterizzarne geneticamente altre, nonché di identificare geneticamente nuovi taxa; hanno permesso inoltre, di chiarire gli aspetti ecologici che riguardano il ciclo biologico di questi parassiti, le relazioni co-evolutive ospite-parassita, l’utilizzo di specie di *Anisakis* come “biological tags” nell’identificazione degli stocks ittici, ecc. (Nascetti *et al.*, 1986; Mattiucci *et al.*, 2000; Valentini *et al.*, 2005; Mattiucci & Nascetti, 2006). Le forme larvali del genere *Anisakis*, infatti, nonostante tentativi di fornire caratteri

morfologici per l'identificazione a livello specifico, non possono essere correttamente identificate a livello di specie; l'utilizzo di marcatori nucleari (allozimi) ha permesso la precisa identificazione delle specie di *Anisakis* ad oggi conosciute, ad ogni stadio di sviluppo e per entrambi i sessi (Nascetti *et al.*, 1986; Mattiucci *et al.*, 1986; 1997a; 1998; 2001). I marcatori allozimici hanno dimostrato che le larve Type I (Berland, 1961) comprendono cinque specie di *Anisakis* (le specie gemelle del complesso *A. simplex*: *A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. simplex* C) (Nascetti *et al.*, 1986), *A. typica* (Mattiucci *et al.*, 2002) ed *A. ziphidarum* (Paggi *et al.*, 1998). Il morfotipo Type II (Berland, 1961) comprende invece le larve di *A. physeteris*, *A. brevispiculata* (Orecchia *et al.*, 1986; Mattiucci *et al.*, 2001; 2002; 2005) e *A. paggiae* (Mattiucci *et al.*, 2005).

Ricerche analoghe hanno evidenziato la presenza di altri complessi di specie gemelle anche nell'ambito della specie *Pseudoterranova decipiens*, precedentemente considerata ad ampia valenza ecologica in quanto parassita di numerosi mammiferi marini (Nascetti *et al.*, 1993; Orecchia *et al.*, 1994; Mattiucci *et al.*, 1998; Paggi *et al.*, 1999; 2000). Tali studi hanno dimostrato, infatti, che *P. decipiens* è un complesso di ben cinque specie gemelle (*P. bulbosa*, *P. decipiens* s.s., *P. decipiens* E, *P. azarasi*, *P. krabbei*); *P. bulbosa* è parassita della foca barbata, mentre altre due specie del complesso, *P. krabbei* e *P. decipiens* s.s., si ritrovano, rispettivamente, nella foca grigia e nella foca comune (Nascetti, 1992; Mattiucci *et al.*, 1998). E' stato pertanto ipotizzato che la competizione interspecifica in questi endoparassiti può aver portato, nel tempo, ad una sostanziale separazione delle nicchie, sia tra specie dello stesso complesso, che tra gruppi diversi; le risorse vengono dunque ripartite adattandosi o ad ospiti diversi e/o a microhabitat all'interno dello stesso ospite (mucosa gastrica, stomaco, intestino) (Nascetti *et al.*, 1992).

Gli approcci genetico-molecolari applicati anche ai nematodi del genere *Contracaecum*, parassiti allo stadio adulto di mammiferi marini (pinnipedi) e di uccelli ittiofagi, hanno permesso di individuare specie gemelle anche nell'ambito della specie *C. osculatum* (Rudolphi, 1802), precedentemente considerata cosmopolita e ad ampia valenza ecologica in quanto parassita di 16 specie di pinnipedi, soprattutto focidi (Deljamure, 1955; Fagerholm & Gibson, 1987), sia della Regione Boreale Artica (*C. osculatum* A, B e C) che della Regione Antartica (*C. osculatum* D ed E) (Nascetti *et al.*, 1993; Orecchia *et al.*, 1994; Bullini *et al.*, 1997; Mattiucci *et al.*, 1998). Questi marcatori hanno inoltre dimostrato l'esistenza di specie gemelle nell'ambito della morfospecie *C. ogmorhini*, parassita di otaridi dell'emisfero australe e boreale, indicate come *C. ogmorhini* s.s. e *C. margolisi* (Mattiucci *et al.*, 2003). Inoltre tali studi hanno dato la possibilità di individuare possibili fenomeni di co-

evoluzione parassita-ospite tra le specie del genere *Contracaecum* caratterizzate geneticamente mediante allozimi e analisi delle sequenze della mtDNA *cox-2* (es. il complesso *C. osculatum* (*C. osculatum* A, B, C, D ed E), *C. miroungae*, *C. radiatum*, *C. ogmorhini* s.s. e *C. margolisi* e i loro ospiti definitivi (focidi ed otaridi) (Mattiucci *et al.*, 2006).

I marcatori genetico-molecolari basati sull'analisi dei sistemi gene-enzima, hanno, inoltre, individuato l'esistenza di una forte eterogeneità genetica nell'ambito di tutte le specie del genere *Contracaecum*, permettendo di rilevare un elevato differenziamento genetico tra le specie di questo genere, che raggiungono lo stadio adulto in pinnipedi e quelle dello stesso genere, che maturano invece, in uccelli ittiofagi, dimostrando che questi due gruppi di specie rappresentano due clusters filogeneticamente ben distinti (Nascetti *et al.*, 1990).

Il lavoro sperimentale qui riportato si inserisce in questo contesto ed ha avuto, come oggetto, lo studio della variazione genetica di specie di nematodi anisakidi appartenenti al genere *Contracaecum* parassite, allo stadio adulto, di uccelli ittiofagi, mediante l'utilizzo di marcatori genetico-molecolari, sia nucleari (20 loci enzimatici) che mitocondriali (sequenze del gene della *cox-2*), al fine di: *a*) individuare la presenza di specie gemelle e/o nuovi taxa in questo gruppo di specie; *b*) quantificare la loro divergenza genetica, analizzata sia a livello nucleare che mitocondriale; *c*) studiarne le relazioni genetiche; *d*) individuarne gli areali di distribuzione, anche in rapporto alla biologia ed ecologia dell'ospite definitivo; *e*) definirne i cicli biologici con l'identificazione delle forme larvali; *f*) evidenziare possibili fenomeni co-evolutivi ospite-parassita tra le specie del genere *Contracaecum* e i loro ospiti definitivi (uccelli ittiofagi).

1: Dati bibliografici

1.1 Il genere *Contracaecum*

Il genere *Contracaecum* (famiglia Anisakidae), proposto da Railliet & Henry, comprende numerose specie di nematodi parassiti, allo stadio adulto, di uccelli ittiofagi e mammiferi marini (pinnipedi). Il ciclo biologico delle specie di *Contracaecum*, parassite di uccelli ittiofagi fino ad ora conosciute, è molto complesso e non del tutto chiarito; questo prevede come ospiti intermedi, crostacei e pesci d'acqua dolce, marina o salmastra (Fig. 1.1). Più di 50 specie sono state descritte da numerosi Autori come parassite allo stadio adulto di uccelli ittiofagi. Di queste, Hartwich (1964), nella sua revisione delle specie di *Contracaecum* parassite di uccelli piscivori, ne riconosce come valide solo alcune (che in parte sono descritte in questa tesi), ponendo in sinonimia tutte le altre specie che fino ad allora erano state descritte. In generale, secondo l'attuale classificazione (Barus *et al.*, 1978), le specie del genere *Contracaecum* parassite di uccelli ittiofagi, comprendono nematodi con i seguenti caratteri morfologici: a) estremità cefalica provvista di tre labbra senza "dentigerous ridges", b) presenza di interlabia generalmente ben sviluppate, c) sistema escretore asimmetrico, confinato alla corda laterale sinistra, d) poro escretore situato alla base delle labbra sub-ventrali o vicino all'anello nervoso, e) intestino provvisto di un cieco anteriore che si dispone lungo l'esofago, f) esofago muscolare, con o senza ventricolo, con cieco posteriore o appendice ghiandolare, g) può essere presente il "gubernaculum"; sono numerose le papille post-cloacali; gli spicoli sono lunghi, alati, di uguale lunghezza o leggermente disuguali.

Secondo Barus (1978), gli uccelli ittiofagi (che colonizzano specchi d'acqua dolce, marina o salmastra) sono ospiti definitivi di almeno 15 specie appartenenti al genere *Contracaecum* Railliet et Henry, 1912, alcune delle quali sono state utilizzate in questo lavoro. Le specie appartenenti al genere *Contracaecum* parassitano solitamente lo stomaco e il proventricolo di uccelli acquatici, causando spesso lesioni patologiche nei loro ospiti (Huizinga, 1971; Fagerholm *et al.*, 1996; Abollo *et al.*, 2001; Dezfuli *et al.*, 2002).

Di seguito viene riportato un elenco delle specie che sono state caratterizzate geneticamente in questo studio, parassite, allo stadio adulto, di uccelli appartenenti alle famiglie Phalacrocoracidae, Pelicanidae, Spheniscidae, Ardeidae e Alcidae.

✓ *Contracaecum microcephalum* (Rudolphi, 1809), specie tipo del genere *Contracaecum*, parassita allo stadio adulto del piccolo cormorano, *Ph. pygmaeus*, ed occasionalmente, di *Ph. carbo*, specie diffusa in tutta Europa oltre che in Asia e Africa (Barus, 1978). Il ciclo biologico di questa specie non è ancora del tutto chiaro, ma studi sperimentali condotti da Mozgovoy, Semenova e Shakhmatova (1965; 1968) sembrano indicare che le uova vengano rilasciate prima della schiusa e che il primo stadio larvale si formi 6-7 giorni dopo il rilascio in acqua; successivamente la prima forma larvale assume vita libera. A questo stadio le larve si muovono attivamente nell'acqua fino ad incontrare il primo ospite intermedio, identificato in alcune specie di copepodi come specie appartenenti al genere *Cyclops*, all'interno del quale vanno incontro alla seconda muta; il primo ospite intermedio costituisce una risorsa trofica per libellule, chironomidi e avannotti di diverse specie di carpa che trasferiscono in questo modo le larve di *C. microcephalum* al secondo ospite intermedio; a loro volta, i secondi ospiti intermedi vengono ingeriti dall'ospite definitivo (uccelli ittiofagi) all'interno dello stomaco dei quali si completa la metamorfosi della larva nello stadio adulto; in seguito la femmina adulta depone le uova che vengono poi espulse in ambiente acquatico attraverso le feci dell'ospite definitivo e il ciclo può ricominciare.

Descrizione morfologica (da Barus, 1978)

Maschio: 22-30 paia di papille precloacali arrangiate in due linee longitudinali: sono presenti sette paia di papille postcloacali, tutte semplici; le prime due paia di papille postcloacali sono posizionate a breve distanza dietro la cloaca, le altre cinque paia nella metà inferiore della coda (tre paia situate più lateralmente, due paia più centralmente). Gli spicoli possiedono ali longitudinali, sono simili, leggermente subuguali (sinistro lungo 1.41-3.65 mm, destro lungo 1.40-3.50 mm).

Femmina: lunghezza del corpo 12.37-37.20 mm, larghezza massima del corpo 0.27-0.85 mm. Esofago lungo 1.85-4.33 mm, ventricolo con appendice lunga da 0.70 a 1.24 mm, cieco intestinale lungo 1.40-3.29 mm. Estremità posteriore del corpo conica, punta arrotondata. Fasmidi 0.074- 0.194 mm. Uova 0.057-0.068x0.041-0.050 mm, da sferiche ad ovali, con superficie liscia o granulosa.

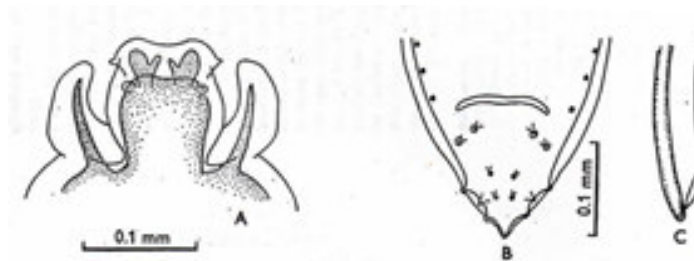


Fig. 1.2. *C. microcephalum*; A= labbro dorsale; B= estremità caudale del maschio (vista ventrale); C= estremità distale dello spiccolo (Barus, 1978).

- ✓ ***Contracaecum micropapillatum*** (Stossich, 1890), parassita allo stadio adulto di *Pelecanus onocrotalus* ed accidentalmente di *Ph. carbo*. Questa specie è diffusa in Inghilterra, Jugoslavia, Bulgaria e Romania, oltre che in Asia (Barus, 1978). Il ciclo biologico di questa specie prevede il rilascio in acqua delle uova da parte dell'ospite definitivo (tramite le feci) che impiegano dai 4 ai 25 giorni per schiudersi e rilasciare il primo stadio larvale liberamente natante; il primo ospite intermedio è costituito da diverse specie di copepodi e avannotti all'interno dei quali le larve perdono la cuticola e penetrano nell'emocele. Dopo 4-6 giorni avviene la seconda muta e le larve passano al secondo ospite intermedio (libellule, girini e alcune specie di pesci) nei quali le larve si ingrandiscono e si incistano senza compiere mute; attraverso la rete trofica le larve giungono poi nell'ospite definitivo (Barus, 1978).

Descrizione morfologica (da Barus, 1978)

Sono presenti labbra, alcune delle quali più larghe che lunghe. Polpa labiale formante due lobi nella parte anteriore, ognuno dei quali è ulteriormente diviso da un'incisione in un lobo laterale e un piccolo lobulus in posizione mediana. Interlabia grandi tre quarti della lunghezza delle labbra, con punte distintamente biforcute.

Maschio: lunghezza del corpo 10.30-25.20 mm, larghezza massima del corpo 0.41-0.88 mm. Esofago lungo 2.18-3.74 mm, ventricolo con appendice lunga 0.50-1.16 mm e cieco intestinale lungo 1.58-2.69 mm. Estremità posteriore del corpo conica, appuntita. Sono presenti 29-45 paia di papille precloacali, arrangiate in due linee longitudinali e quattro paia di papille postcloacali: tre paia di papille postcloacali sono formate da papille doppie e un paio da papille semplici; il primo paio di papille doppie è situato all'estremità del primo terzo della coda e l'altro paio nella metà più bassa; il paio di papille semplici è posizionato lateralmente all'ultimo paio di papille doppie. Spicoli simili, subuguali (sinistro lungo 1.21-3.46 mm, destro lungo 1.29-3.53 mm), con ali longitudinali.

Femmina: lunghezza del corpo 11.80-30.80 mm, massima larghezza del corpo 0.40-0.77 mm. Esofago lungo 2.62-4.12 mm, ventricolo con appendice lunga 0.67-1.54 mm, cieco intestinale lungo 2.00-3.47 mm. Estremità posteriore del corpo conica, appuntita. Fasmidi 0.083-0.118 mm. Uova 0.056-0.062x0.047-0.049 mm.



Fig. 1.3. *C. micropapillatum*; A= labbro dorsale; B= estremità caudale del maschio (vista ventrale); C= estremità distale dello spiccolo (Barus, 1978).

- ✓ *Contracaecum septentrionale* Kreis, 1955, descritto come parassita del cormorano crestatto, *Ph. aristotelis*, si trova occasionalmente anche in *Ph. carbo*. È diffuso soprattutto in Islanda. In letteratura non ne è riportato il ciclo biologico (Barus, 1978).

Descrizione morfologica (da Barus, 1978)

Lunghezza delle labbra 0.103-0.147 mm. Entrambe le labbra sublaterali sono coniche, con una base molto larga, ognuna con una papilla e una polpa labiale divisa in due larghe parti basali e una parte anteriore triangolare. Le labbra dorsali sono distintamente divise in due parti, delle quali la basale è largamente arrotondata nella parte anteriore, invaginata al centro. Le interlabia coniche, nei maschi sono lunghe 0.064-0.086, nelle femmine 0.076-0.118 mm.

Maschio: lunghezza del corpo 31.6-38.0 mm, larghezza massima del corpo 0.88-1.24. Lunghezza del ventricolo 0.168-0.210 mm, appendice 0.756-1.029 mm e cieco intestinale 2.05-2.14 mm. Gli spiccoli sono lunghi 12.57-15.16 mm. Sono presenti 30-35 paia di papille precloacali, e sei paia di postcloacali. Due delle papille postcloacali sono situate immediatamente dietro la cloaca, vicino alla linea ventrale. Dietro sono posizionate due paia di papille latero-ventrali e, vicino alla punta della coda, ci sono due altre paia di papille molto piccole. La coda è lunga 1.21-1.66 mm.

Femmina: lunghezza del corpo 39-45 mm, larghezza massima del corpo 1.30-1.89 mm. Lunghezza del ventricolo 0.189-0.378 mm, appendice 1.00-1.13 mm e cieco intestinale 1.51-2.08 mm. Coda conica, lunga 0.90- 0.95 mm.

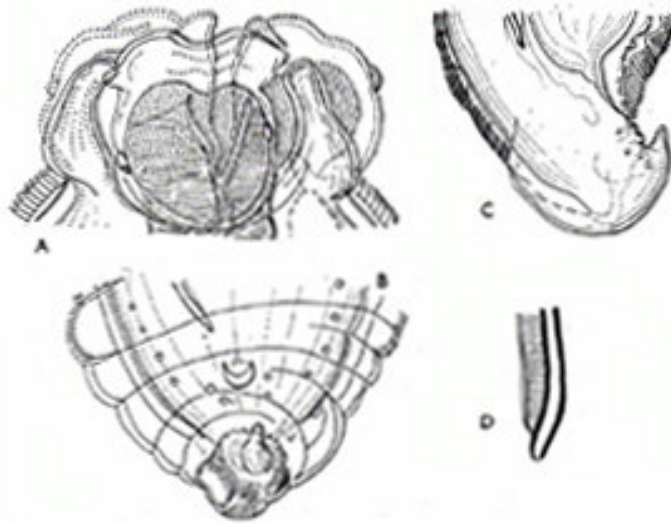


Fig. 1.4. *C. septentrionale*; A= estremità cefalica (vista dorsale); B= estremità caudale del maschio (vista ventrale); C= estremità posteriore del maschio (vista laterale); D= estremità distale dello spiccolo (Barus, 1978).

- ✓ ***Contracaecum rudolphii*** Hartwich, 1964, parassita allo stadio adulto di molte specie di uccelli ittiofagi in tutto il mondo (ad esempio *Ph. carbo*, *Ph. aristotelis*, *Ph. pygmaeus*). Il ciclo biologico di *C. rudolphii* è tuttora poco chiaro, ma estremamente complesso. Studi sperimentali condotti da Huizinga (1966), Mazgovoï, Shakmatova & Semenova (1965; 1968) hanno permesso di ipotizzare il ciclo biologico di questa specie; con un approccio sperimentale effettuato nel 1966, Huizinga infettò diverse specie di pesci (*Fundulus heteroclitus* e *Lebistes reticulatus*) con i copepodi *Cyclops vernalis* e *Tigriopus californicus* a loro volta parassitati sperimentalmente con larve di *Contracaecum* al II° stadio. Quanto osservato da Huizinga fa supporre che le uova deposte dalle femmine mature vengano rilasciate in ambiente acquatico tramite le feci espulse dall'ospite definitivo; lo sviluppo delle uova avverrebbe in 10-14 giorni in acqua di mare, a temperature intorno ai 21 C°. Intorno al settimo giorno la larva compirebbe la prima muta, si trasformerebbe nel II° stadio larvale e assumerebbe vita libera (le forme larvali sarebbero particolarmente adattate all'ambiente marino). A questo stadio di sviluppo, la larva infetterebbe il suo primo ospite intermedio costituito da alcune specie di copepodi localizzandosi nell'emocele del crostaceo.

Successivamente la larva verrebbe trasferita ad alcune specie di pesci (di acqua dolce o marina) (*Belone belone*, *Uranoscopus* sp. (Ass, 1961), *Tautoglabrus adspersus*, *Pseudopleuromectes americanus*, *Fundulus heteroclitus* e *Myxocephalus octodecimspinosus* (Huizinga, 1966); più recentemente Moravec (1994) ha osservato *C. rudolphii* in alcuni ciprinidi europei quali *Vimba vimba*, *Rutilus rutilus* e *Abramis brama*. Nei pesci la larva compirebbe la sua ultima metamorfosi passando dallo stadio II allo stadio III; infine, i pesci verrebbero predati dagli ospiti definitivi (specie di uccelli ittiofagi sopra citate).

Descrizione morfologica (da Barus, 1978)

Labbra leggermente più larghe che lunghe. Polpa labiale che forma due lobi ognuno diviso in altri due laterali arrotondati e un lobo mediano arrotondato anch'esso. Interlabia grandi quattro quinti della lunghezza delle labbra, con punta distintamente biforcata.

Maschio: lunghezza del corpo 12.10-33.90 mm, larghezza massima del corpo 0.24- 0.95 mm. Esofago lungo 2.03-4.26 mm, ventricolo con appendice 0.58-1.37 mm e cieco intestinale lungo 1.53-3.68 mm. Estremità posteriore del corpo conica, con punta arrotondata. 27-43 paia di papille precloacali arrangiate irregolarmente su due linee longitudinali. Sette paia di papille postcloacali semplici: le prime due paia si trovano vicino alla cloaca, mentre le restanti 5 paia, sono situate nella terza metà rispetto alla lunghezza della coda e di queste, tre paia sono più laterali e due paia più mediane. Spicoli simili, leggermente subuguali (sinistro lungo 4.05-9.98 mm; destro lungo 4.46-9.19 mm), con ali longitudinali.

Femmina: lunghezza del corpo 10.10-57.60 mm, larghezza massima del corpo da 0.29 a 1.51 mm. Esofago lungo 1.62-5.48 mm, ventricolo con appendice 0.62-1.58 mm e cieco intestinale lungo 1.28-4.12 mm. Estremità posteriore del corpo conica, con punta arrotondata. Fasmidi aperti 0.068-0.165 mm dalla fine della coda. Uova da sferiche a ovali, 0.059-0.073x0.041-0.059 mm.

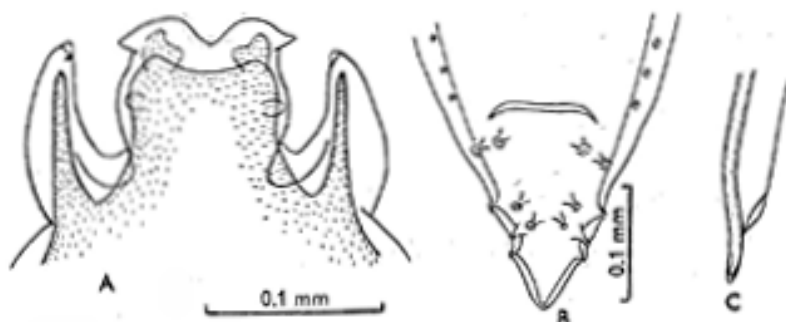


Fig. 1.5. *C. rudolphii* (s.l.); A= labbro dorsale; B= estremità caudale del maschio (vista ventrale); C= estremità distale dello spiccolo (Barus, 1978).

- ✓ ***Contracaecum multipapillatum*** (Von Fräsche, 1882) Luker, 1941, parassita allo stadio adulto per lo più di Pelecanidi; tale specie ha un ciclo biologico che non era stato mai osservato prima del 1967 e che sembrerebbe in parte chiarito grazie ad uno studio sperimentale condotto da Huizinga. In realtà, questo nematode è stato osservato la prima volta in *Anhinga anhinga leucogaster*, un uccello d'ambiente d'acqua dolce della Florida. Nell'esperimento, le uova prelevate dall'ospite definitivo sono state incubate ad una temperatura di 21 C° ed è stato osservato che la prima metamorfosi avveniva dopo 4-5 giorni (I stadio larvale) e dopo 5-7 giorni la larva assumeva vita libera (II stadio larvale) se tenuta in acqua di lago; in acqua di mare la stessa fase richiedeva da 7 a 10 giorni. A 21 C° le larve rimanevano vive e mobili da 10 a 20 gg in acqua di lago mentre morivano in circa 7 gg se tenute in acqua di mare. Il passo successivo è stato quello di infettare artificialmente il copepode *Cyclops vernalis* (primo ospite intermedio del ciclo) ed è stato osservato un tasso di mortalità più elevato in copepodi che presentavano un'infestazione di più di 5 larve di *C. multipapillatum* rispetto ai copepodi non infetti. In una fase successiva, il pesce *Lebistes reticulatus* è stato infettato quando gli sono stati fatti ingerire i copepodi infetti (l'ingestione diretta delle forme larvali da parte del pesce porta le larve stesse alla morte nel giro di un giorno); le larve erano state ritrovate poco dopo incapsulate nel mesentero, nella parete intestinale, nel fegato e nel sacco pericardico dell'ospite; è stato inoltre osservato che maschi e femmine dei pesci ospite venivano infettati con uguale frequenza. Il trasferimento delle larve tra ospiti è possibile nelle relazioni preda-predatore che coinvolgono pesci piccoli e pesci più grandi. Come negli altri casi, un uccello ittiofago ingerisce poi i pesci infetti e la larva può completare il suo ciclo vitale passando al IV stadio larvale ed infine alla forma adulta per ricominciare il ciclo. Non è riportata in letteratura una descrizione morfologica dettagliata.

- ✓ ***Contracaecum pelagicum*** (Johnston & Mawson, 1942) descritto come parassita allo stadio adulto di uccelli ittiofagi appartenenti alle famiglie Spheniscidae (es. *Spheniscus magellanicus*) e Diomedidae (es. *Diomedea melanophrys*). Sembra essere localizzato prevalentemente a livello della mucosa dello stomaco dell'ospite definitivo. E' stato osservato per la prima volta in due località delle coste argentine, Penisola di Valdes e Mar del Plata, ma il suo ospite definitivo *S. magellanicus* è diffuso anche in Sud America (Yorio *et al.*, 2001) e occasionalmente è stato osservato

in Australia, Nuova Zelanda e nelle isole Sud-Atlantiche. Portes-Santos (1984) e Fagerholm *et al.* (1996) hanno riportato questa specie nel pinguino *S. magellanicus* rispettivamente sulle coste brasiliane e Sud Africane. Il ciclo biologico di *C. pelagicum* sembrerebbe avere come ospite intermedio la specie di pesce *Engraulis anchoita* (Timi *et al.*, 2001; Garbin *et al.*, 2007 in pubblicazione), la preda preferita della specie *S. magellanicus*.

Descrizione morfologica (da Portes-Santos, 1984)

Lunghezza del corpo 31.03-31.77 mm, larghezza del corpo 40.96-52.53 mm nei maschi e 40.96-52.53x 0.69-0.75 mm nelle femmine. Labia latero-ventrali con due papille, una grande e una piccola, laterali. Interlabia 0.05-0.07 mm, larghe nella regione di inserzione, appuntite e biforcute. Ogni labbro possiede una papilla localizzata centralmente. Esofago lungo 2.99-3.45 mm, ventricolo poco differenziato, cieco intestinale lungo 2.11-3.90.

Maschio: due spicoli uguali, dilatati anteriormente e appuntiti all'estremità posteriore. Gubernaculum assente. 28-31 paia di papille precloacali, delle quali 5 paia, piccole, precedono la base dello spicolo; 7 paia di papille postcloacali, due delle quali grandi, alla base della cloaca, 3 paia laterali e due ventrali. Coda con piccola protrusione appuntita.

Femmina: uova 0.05-0.06x0.04-0.05 mm. Coda appuntita, con piccola protrusione. Un paio di papille caudali, distanti 0.08-0.10 mm dall'estremità caudale.

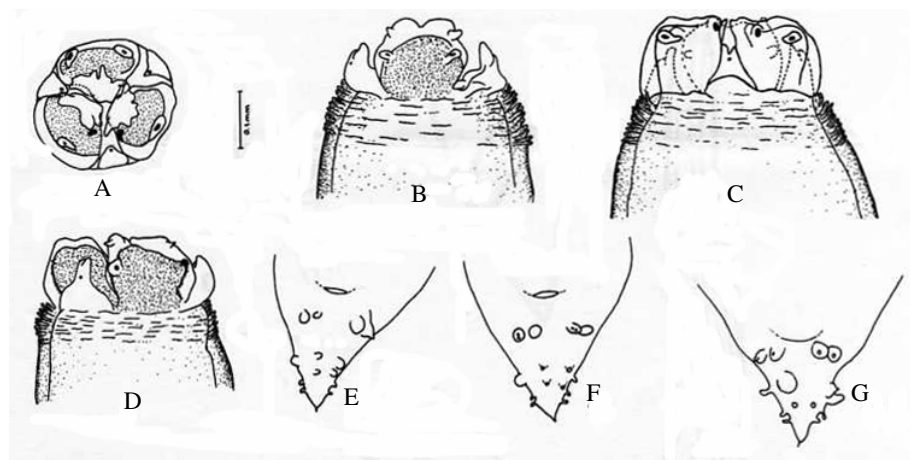


Fig. 1.6. *C. pelagicum*; A: vista frontale delle labbra; B: labbro dorsale e interlabia; C: labbro latero-ventrale visto parzialmente di lato; D: labbro latero-ventrale; E e F: coda di esemplare maschio vista parzialmente di lato; G: coda di esemplare maschio, vista di lato (Portes-Santos, 1984).

- ✓ *Contracaecum variegatum* (Rudolphi, 1809) parassita allo stadio adulto di uccelli Alcidae (es. *Uria aalge*) e Gavidae (es. *Gavia immer* e *G. stellata*). E' localizzato nell'intestino e nello stomaco dell'ospite definitivo. La sua distribuzione geografica comprende Europa, Asia (Russia, Mongolia e Giappone), America Centrale ed Australia (Barus *et al.*, 1978). Al momento non è ancora sufficientemente noto il ciclo biologico di questo nematode parassita, relativamente agli ospiti intermedi coinvolti.

Descrizione morfologica (da Barus, 1978)

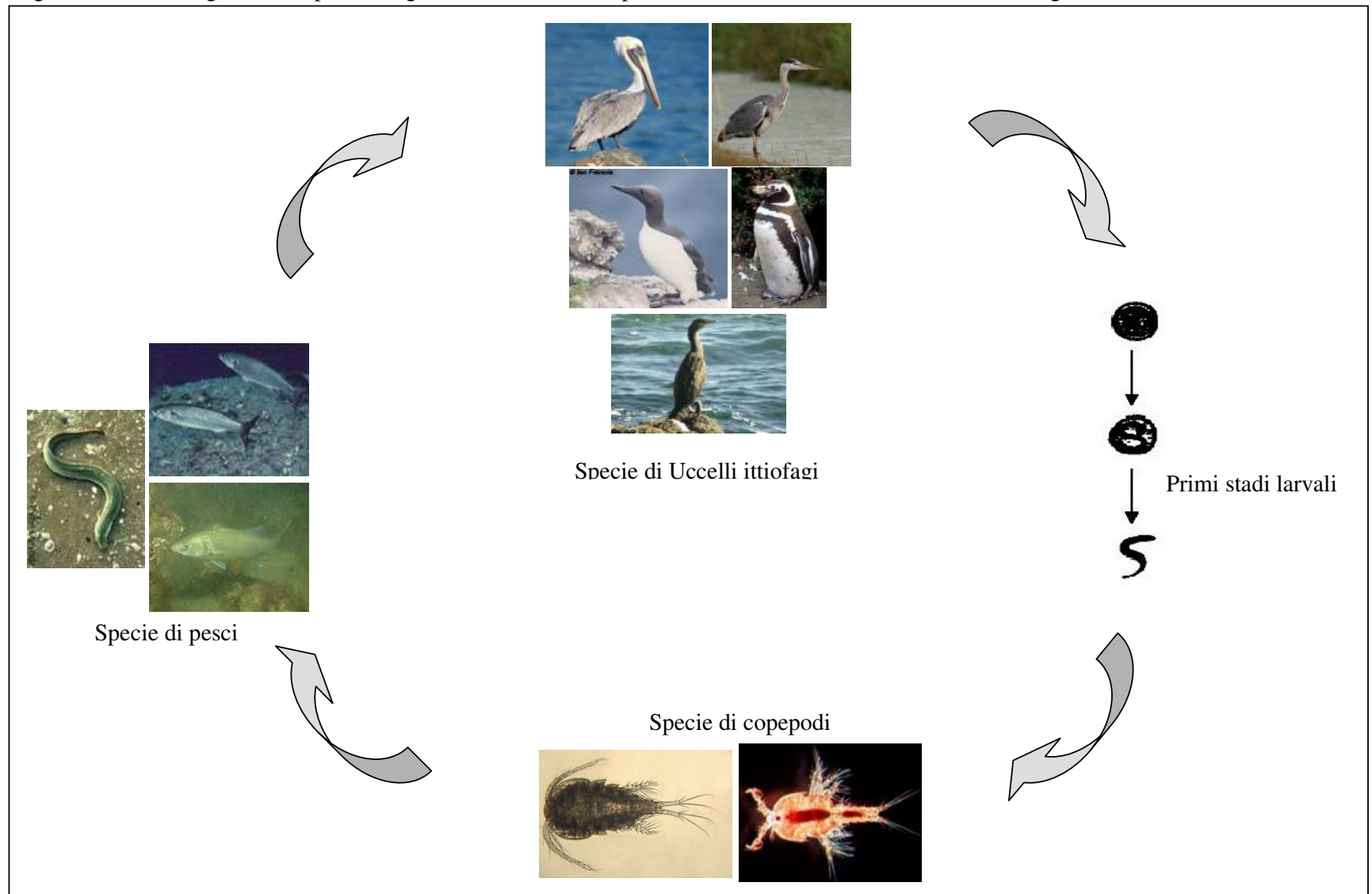
Bocca con labbra esagonali arrotondate. Base delle labbra della stessa larghezza come il margine opposto. Interlabia grandi due terzi della lunghezza del labbro con punte biforcute.

Femmina: lunghezza del corpo 8.50-36.60 mm; larghezza massima del corpo da 0.25 a 0.79 mm. Esofago lungo da 1.36 a 3.70 mm, ventricolo con appendice 0.52-1.07 mm e cieco intestinale lungo 0.90-2.88 mm. Estremità posteriore del corpo conica, con estremità arrotondata. Uova 0.061-0.106x0.049-0.071 mm, con la superficie finemente granulosa.



Fig. 1.7. *C. variegatum*; A= labbro dorsale; B= estremità caudale del maschio (vista ventrale); C= estremità distale dello spiccolo (Barus, 1978).

Fig. 1.1. Ciclo biologico delle specie del genere *Contracaecum* parassite, allo stadio adulto, di uccelli ittiofagi.



I criteri morfologici per il riconoscimento dello status del rank tassonomico delle specie sopra citate e delle altre specie, sono a tutt'oggi molto pochi se si escludono alcuni studi morfologici (Fagerholm, 1998). A tale scopo, negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche basate sull'utilizzo di marcatori genetici per l'identificazione sistematica di specie gemelle all'interno di alcune morfospecie. Inoltre, fino ad oggi è stato limitato lo sforzo fatto per l'analisi della loro sistematica allo scopo di fornire dati ecologici riguardanti le preferenze di ospiti definitivi, cicli biologici e relazioni filogenetiche tra le specie di *Contracaecum* parassiti di uccelli ittiofagi, rispetto a quelle dei loro ospiti definitivi.

L'eterogeneità genetica di specie del genere *Contracaecum*, parassite di uccelli ittiofagi, è stata suggerita per la prima volta da studi effettuati mediante la tecnica dell'elettroforesi multilocus (Bullini *et al.*, 1986; Nascetti *et al.*, 1990; D'Amelio *et al.*, 1990; Mattiucci *et al.*, 2002), come, ad esempio, nel caso di *C. rudolphii* (s.l.) campionato in *Phalacrocorax carbo sinensis* Blumenbach, 1798 (la sottospecie Euroasiatica del "cormorano grande"). I marcatori genetici forniti dall'elettroforesi multilocus, hanno evidenziato la presenza di 2 specie gemelle all'interno di *C. rudolphii*, denominate *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B, le quali si trovano in condizioni di simpatria nello stesso ospite, in varie aree geografiche della regione dell'Europa boreale (Mattiucci *et al.*, 2002). Lo stesso risultato è stato confermato da studi basati sull'analisi degli SSCP del primo (ITS-1) e secondo (ITS-2) spaziatore interno trascritto, del DNA ribosomale (rDNA), che, inoltre, consideravano valida la specie *C. septentrionale* Kreis, 1955 (Li *et al.*, 2005).

1.1.1 Identificazione morfologica di forme larvali di *Contracaecum*

L'identificazione delle forme larvali, a livello di specie, di nematodi anisakidi prelevate da specie di pesci, loro ospiti intermedi, è praticamente impossibile a livello morfologico poiché queste presentano caratteristiche molto simili; tale caratterizzazione risulta ancora più difficile tra specie di *Contracaecum* parassite, allo stadio adulto, di pinnipedi e quelle parassite di uccelli ittiofagi. Il riconoscimento sicuro delle forme larvali, a livello di specie, è stato reso possibile dalla recente applicazione di tecniche genetico-molecolari su questi parassiti. Tuttavia, alcuni studi, riportano una caratterizzazione morfologica generale che distingue due tipi larvali all'interno genere *Contracaecum*: larve Type 1 e Larve Type 2 (Moravec *et. al.*, 1994; 1995).

Descrizione morfologica

Larve Type 1 (Fig. 1.8 a): corpo lungo 4.88-5.49 mm e largo 0.218-0.231 mm. In generale sono caratterizzate da un corpo piccolo e dalla presenza di un'appendice ventricolare molto lunga, che eccede leggermente la lunghezza del cieco intestinale. Sono state osservate in specie di pesci Cipriniformi e Siluriformi.

Larve Type 2 (Fig. 1.8 b): corpo di colore bruno, lungo 20.40-23.53 mm e largo 0.680-0.775. In generale questo tipo di larve si distingue dal precedente per la lunghezza del cieco intestinale e quella dell'appendice ventricolare, nonché per le dimensioni del corpo. Sono state osservate in specie di pesci Anguilliformi, Cipriniformi e Perciformi.

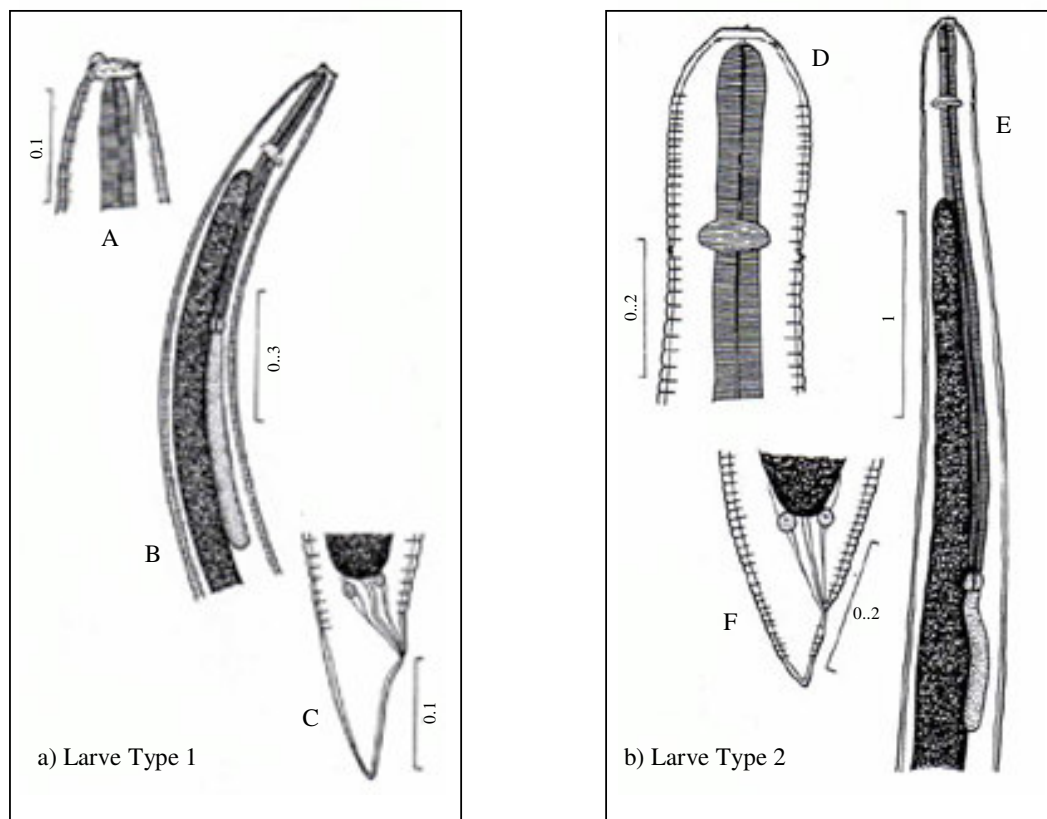


Fig. 1.8. Larve di *Contracaecum* sp.; a) Larve Type 1: A = estremità cefalica, vista laterale; B = estremità anteriore; C = coda. b) Larve Type 2: D = estremità cefalica, vista ventrale; E = estremità anteriore; F = coda.

1.2 Areali di distribuzione delle specie di uccelli ittiofagi oggetto di studio

Vengono riportate di seguito alcune informazioni circa la classificazione tassonomica e la distribuzione geografica delle specie di uccelli ittiofagi, ospiti definitivi dei nematodi anisakidi appartenenti alle specie del genere *Contracaecum* studiate in questo lavoro.

- ✓ *Phalacrocorax carbo*: esistono diverse sottospecie tra cui *Phalacrocorax carbo sinensis* Blumenbach, 1798 e *Phalacrocorax carbo carbo* Linneaus, 1758 (Ordine: Pelecaniformi; Famiglia: Phalacrocoracidae): diffusa quasi in tutto il mondo, in particolare in Nord America, Canada, Groenlandia, Asia, Africa ed Europa e Australia (Fig. 1.9).

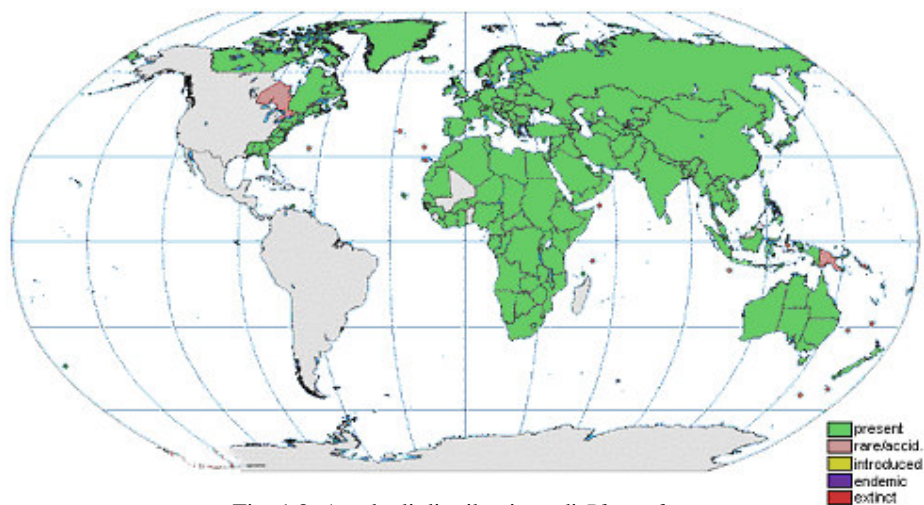


Fig. 1.9. Areale di distribuzione di *Ph. carbo*.

- ✓ *Phalacrocorax pygmaeus* Pallas, 1773 (Ordine: Pelecaniformi; Famiglia: Phalacrocoracidae): diffuso in tutta Europa, Nord Africa, Asia, Medio Oriente; non è presente nel continente americano (Fig. 1.10).

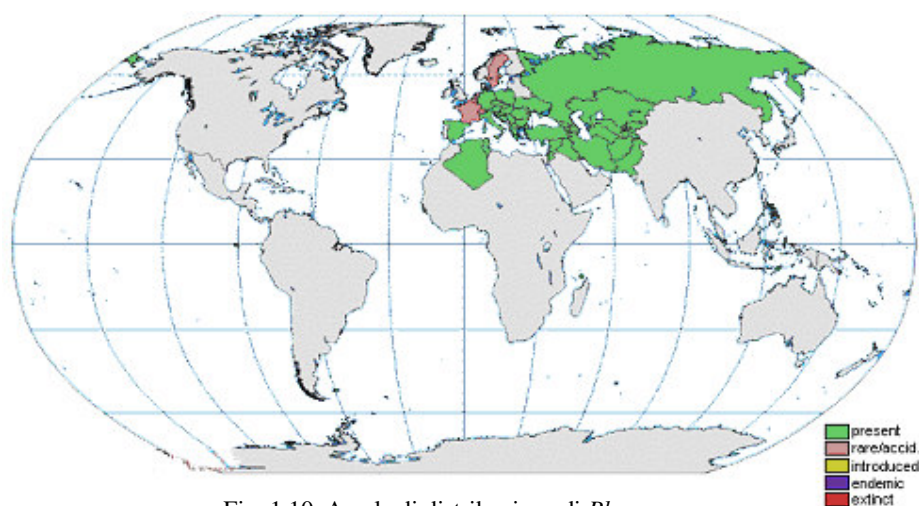


Fig. 1.10. Areale di distribuzione di *Ph. pygmaeus*.

- ✓ *Phalacrocorax aristotelis* Linnaeus, 1761 (Ordine: Pelecaniformi; Famiglia: Phalacrocoracidae): è diffuso in tutta Europa, Nord Africa, Asia del Nord e Islanda; non è presente in America (Fig. 1.11).

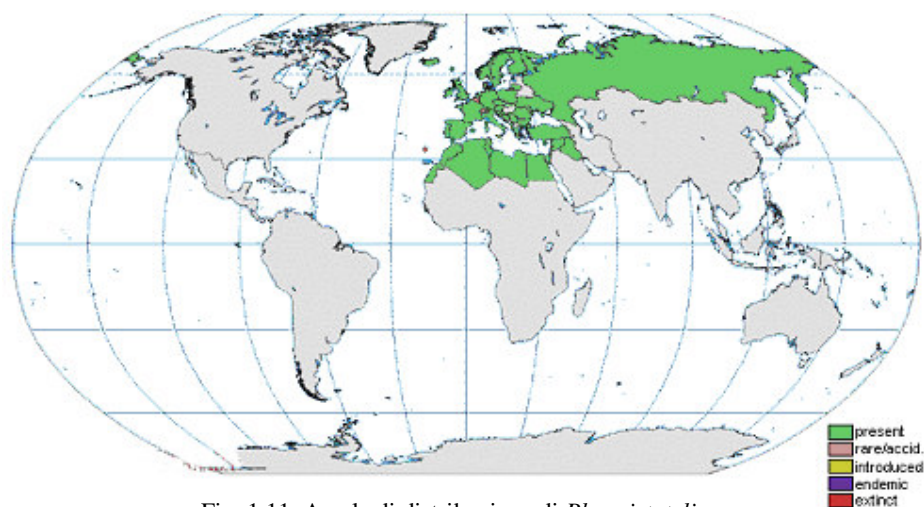


Fig. 1.11. Areale di distribuzione di *Ph. aristotelis*.

- ✓ *Pelecanus onocrotalus* Linneaus, 1758 (Ordine: Pelecaniformi; Famiglia: Pelecanidae): diffuso in tutta Europa, Africa, Asia e Medio Oriente; non è presente in America (Fig. 1.12).

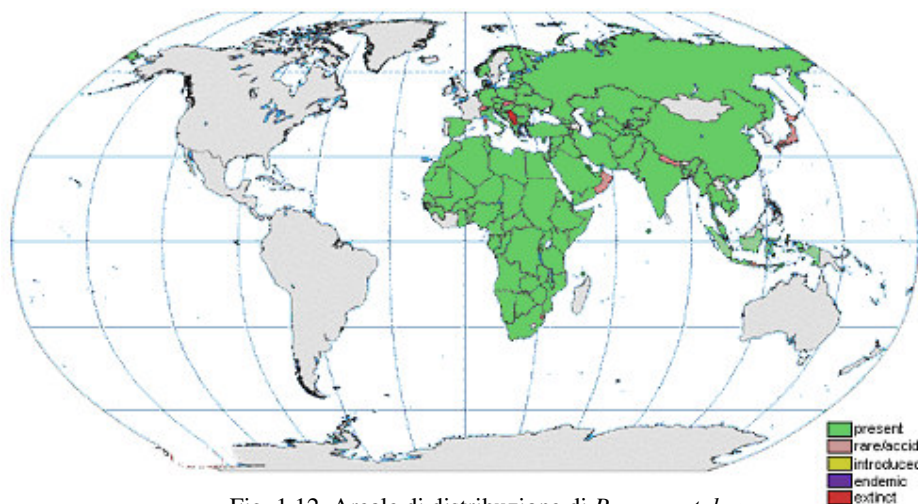


Fig. 1.12. Areale di distribuzione di *P. onocrotalus*.

- ✓ *Pelecanus crispus* Bruch, 1832 (Ordine: Pelecaniformi; Famiglia: Pelecanidae): diffuso nell'Europa Orientale, Asia, parte del Nord Africa e sulle coste scandinave; accidentale in Italia e negli stati dell'Europa centrale, assente nell'Europa Orientale e nel continente americano (Fig. 1.13).

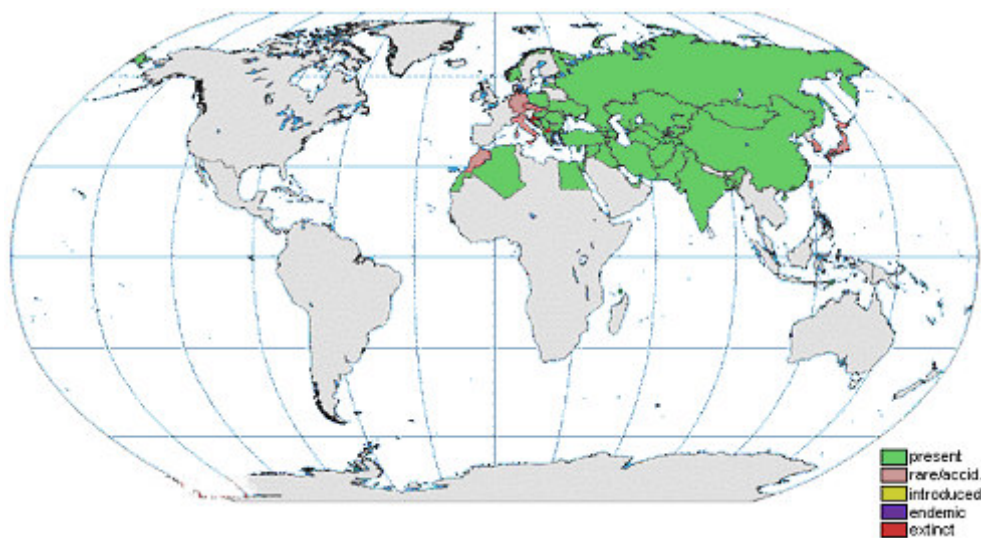


Fig. 1.13. Areale di distribuzione di *P. crispus*.

- ✓ *Pelecanus occidentalis* Linnaeus, 1766 (Ordine: Pelecaniformi; Famiglia: Pelecanidae): diffuso in America Centrale e Sud America; presenza accidentale in Nord America, Canada e nelle regioni più meridionali dell'America Latina (Fig. 1.14). Assente in Asia, Africa, Europa ed Asia.

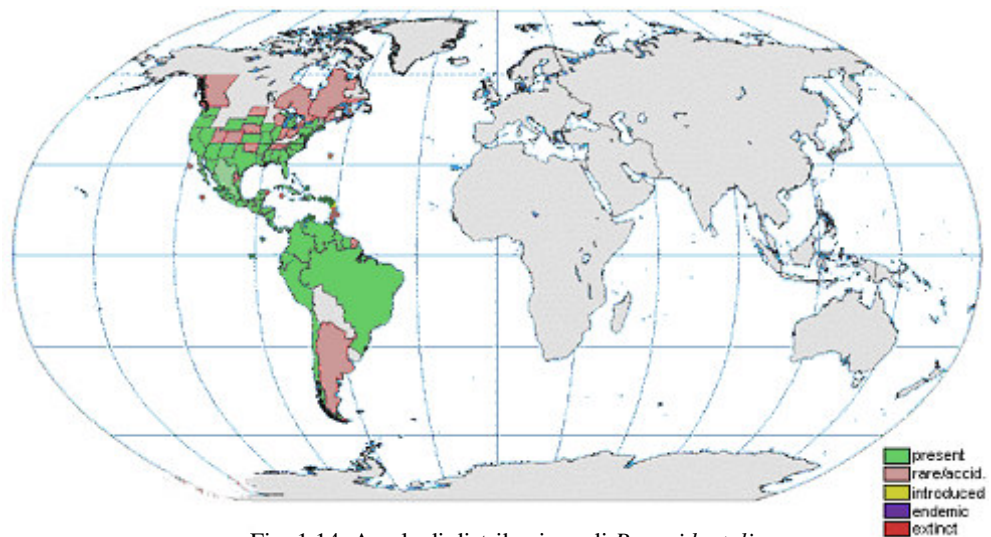


Fig. 1.14. Areale di distribuzione di *P. occidentalis*

- ✓ *Spheniscus magellanicus* Forster, 1781 (Ordine: Sphenisciformi; Famiglia: Spheniscidae): diffuso in quasi tutta l'America Latina (accidentale in Colombia, Perù, Bolivia e parte del Cile) e in Oceania; non è presente in Europa e Asia (Fig. 1.15).



Fig. 1.15. Areale di distribuzione di *S. magellanicus*.

- ✓ *Ardea cinerea* Linneaus, 1758 (Ordine: Ciconiformi; Famiglia: Ardeidae): diffuso in Europa Africa, Asia Occidentale; accidentale in America Latina Orientale, Islanda e Groenlandia (Fig. 1.16).

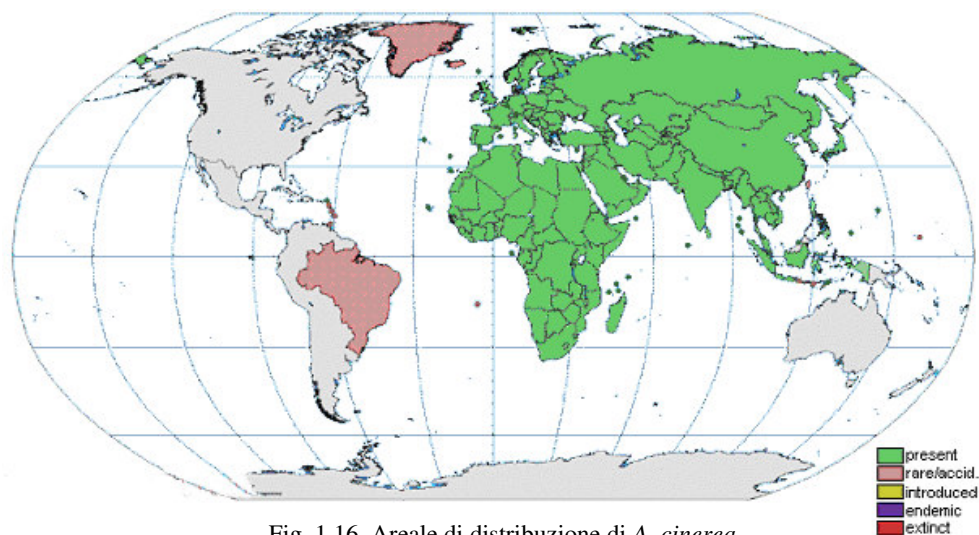


Fig. 1.16. Areale di distribuzione di *A. cinerea*.

- ✓ *Uria aalge* Pontoppidan, 1763 (Ordine: Choradriiformi; Famiglia: Alcidae): diffuso in quasi tutta Europa (accidentale in Italia), coste occidentali degli Stati Uniti, Groenlandia, Islanda, Nord Asia e in una piccola area dell'Africa Occidentale; accidentale nelle regioni più a Nord del continente americano (Fig. 1.17).

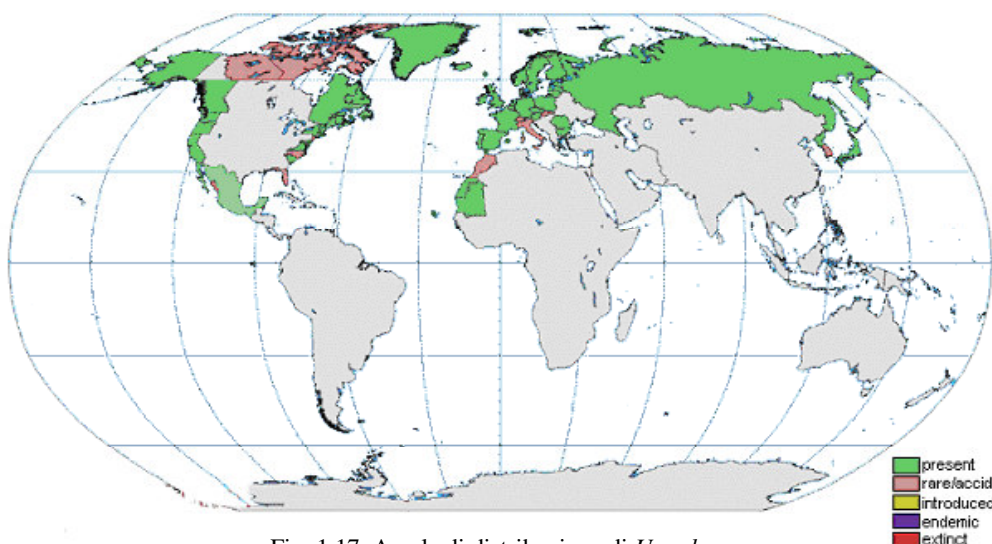


Fig. 1.17. Areale di distribuzione di *U. aalge*.

1.3 Co-evoluzione parassita-ospite

Come accennato nell'introduzione, uno degli aspetti di maggior interesse per quanto riguarda lo status biologico dei parassiti è il concetto di co-evoluzione ospite-parassita; in generale con il termine "co-evoluzione" si intende l'insieme di quei processi evolutivi che portano una specie (il parassita) all'adattamento alla vita parassitaria all'interno di un'altra specie (l'ospite). Lo studio della co-evoluzione parassita-ospite comprende sia lo studio di fenomeni di co-adattamento, di specificità dell'ospite, dell'influenza del genoma dell'ospite su quello del parassita (Toft & Carter, 1990), sia lo studio della co-filogenesi ospite-parassita, cioè lo studio di quanto la storia evolutiva di un parassita sia parallela a quella del suo ospite. Secondo Ridley (1996), per co-evoluzione si intende l'evoluzione interdipendente di due specie tra le quali esiste un'interazione ecologica. L'intensa ricerca che si sta portando avanti in questi anni, ha come sviluppo del concetto di co-evoluzione ospite-parassita, diversi aspetti quali l'influenza e la patogenicità espressa dal parassita e i relativi meccanismi di difesa dell'ospite, l'espressione del co-adattamento ospite-parassita, e ancora, la "co-speciazione" (Fig. 1.18, d)) ospite-parassita. La co-evoluzione è quindi intesa sia come evoluzione dei pools genici delle specie interagenti che può portare al co-adattamento di tratti evolutivi sia dell'ospite che del parassita (resistenza dell'ospite e virulenza del parassita), sia in scala temporale, come cladogenesi dell'ospite e del parassita (co-speciazione).

In generale con il concetto di relazioni co-evolutive ospite-parassita si intende fenomeni di co-speciazione, colonizzazione o "host switching", duplicazione ed estinzione, che possono aver accompagnato la storia evolutiva di parassiti e dei loro ospiti definitivi. Oggi, stabilire il grado di congruenza o meno del parallelismo tra le relazioni evolutive di gruppi di specie parassite e quella di taxa di ospiti correlati, è possibile grazie allo studio filogenetico ottenuto dall'utilizzo di marcatori nucleari e di opportune metodiche statistiche. Quando le due filogenesi sono congruenti, verosimilmente si saranno verificati eventi co-evolutivi. È abbastanza poco frequente trovare casi in cui la topologia degli alberi che mostrano le relazioni filogenetiche tra le specie di parassiti e i loro ospiti sia perfettamente speculare; molto spesso si tratta di un insieme di fenomeni di congruenza e non (Paterson & Gray, 1997). L'incongruenza tra le due relazioni filogenetiche può essere dovuta a tre eventi (Fig. 1.18): a) "duplication", cioè il parassita subisce un evento di speciazione non seguito da duplicazione di una linea evolutiva dell'ospite; b) "sorting event" ossia un fenomeno che può aver portato all'estinzione del parassita a causa del fallimento dello stesso di colonizzare un

nuovo ospite in seguito ad un evento di speciazione; c) “host switching” ovvero quando una specie di parassita risulta specifica per due specie di ospiti che filogeneticamente sono ben distinte, ma ecologicamente simili;

Allo stato attuale, non esistono molti lavori che riguardano gli studi sulla co-evoluzione ospite-parassita, studiata mediante le stesse metodiche genetico-molecolari. Tuttavia, lavori recenti sono stati condotti da alcuni Autori (Beveridge & Chilton, 2001; Desdevises *et al.*, 2002; Legendre *et al.*, 2002).

Tra i nematodi anisakidi, l'esistenza di parallelismi tra le filogenesi di nematodi appartenenti al genere *Anisakis* e la filogenesi dei loro ospiti definitivi (cetacei), è stata recentemente suggerita su base nucleare e mitocondriale (Mattiucci & Nascetti, 2006).

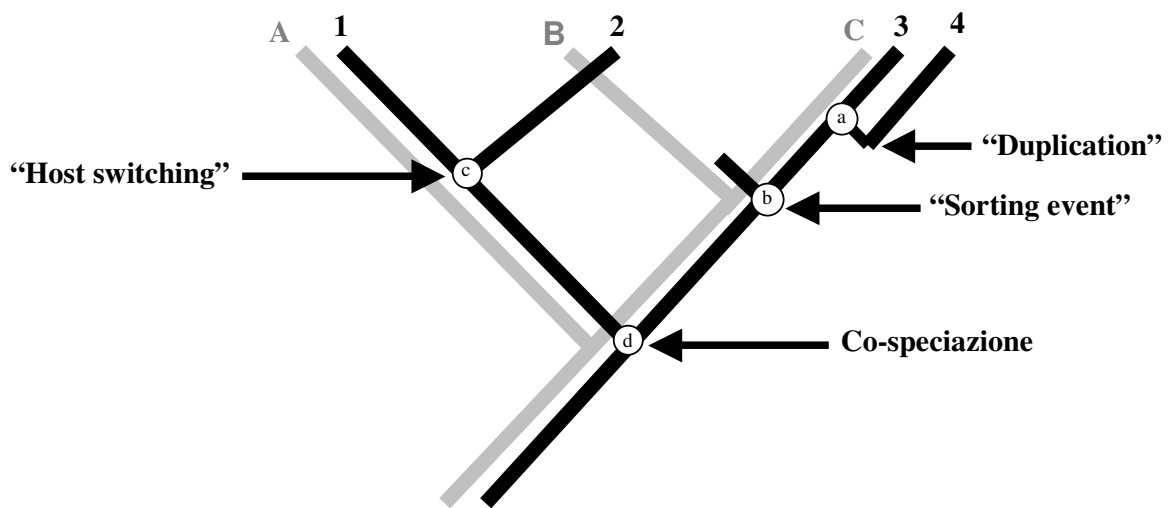


Fig. 1.18. Rappresentazione grafica delle possibili incongruenze filogenetiche negli eventi di co-speciazione. In nero è rappresentato il parassita, in grigio l'ospite.

2. Materiali e metodi

2.1 Elettroforesi multilocus (MAE): materiale

E' stata studiata la variazione genetica mediante elettroforesi multilocus, di 1162 esemplari di nematodi del genere *Contracaecum*, parassiti allo stadio adulto, di uccelli ittiofagi appartenenti a diverse famiglie e provenienti da aree geografiche diverse. Sono state anche saggiate alcune forme larvali (20), reperite in specie ittiche (es. *Mugil incilis*, *Anguilla anguilla*, *Dicentrarchus labrax*). I campioni sono stati in parte spediti in laboratorio congelati e conservati a -80 °C e in parte conservati in etanolo. In tabella 2.1 è riportato il materiale saggiato, relativamente all'ospite, luogo di provenienza, numero di esemplari saggiati e stadio del ciclo biologico; la figura 2.1 mostra la provenienza degli ospiti definitivi (uccelli ittiofagi) e quella dei loro relativi esemplari di parassiti.

2.2 Elettroforesi multilocus (MAE): metodi

Gli esemplari campionati sono stati saggiati in un primo momento, utilizzando un marcatore di tipo nucleare; in particolare, è stata utilizzata la tecnica dell'elettroforesi multilocus (MAE) e sono stati analizzati 20 loci enzimatici (*Iddh*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Mdh-4*, *Icdh*, *6Pgdh*, *Np*, *Sod-1*, *Sod-2*, *Gapdh*, *Aat-2*, *Adk-2*, *cEst-1*, *Pgm-2*, *PepC-1*, *PepC-2*, *Mpi*, *Gpi*, *Pgm-1*).

2.2.1 Tecnica MAE

L'elettroforesi multilocus è una tecnica che si basa sulla separazione di proteine per mezzo di un campo elettrico. I supernatanti degli omogenati ottenuti dai campioni di tessuto vengono caricati su un substrato omogeneo, costituito da amido, agar, poliacrilammide, o altre sostanze gelatinose.

In dettaglio, in una fase iniziale i campioni di tessuto per ogni individuo vengono omogeneizzati meccanicamente in 5 µl d'acqua distillata mediante l'uso di pestelli. Successivamente si preparano dei cartellini di carta Whatmann 3 MM che vengono fatti imbibire con il tessuto precedentemente trattato.

Il gel per questo studio è stato preparato utilizzando amido sciolto in proporzione del 10% nel sistema tampone più adatto ad ogni enzima (Tab. 2.2). La soluzione ottenuta viene portata ad ebollizione, degassata con una pompa a vuoto e poi versata su piastre di plexiglas di 16 x 21,5 x 0,7 cm. Una volta che il gel si è solidificato, con un pettine di plexiglas munito di 21 denti, si pratica un solco longitudinale lungo uno dei due lati maggiori della piastra, posto da 2,5 a 6 cm dal bordo, a seconda della “corsa” (al positivo e/o al negativo) dell’enzima che si sta analizzando.

Nei pozzetti ricavati nel gel sono posti poi i cartellini (5 x 5 mm) precedentemente imbibiti con l’estratto di tessuto. Successivamente, la piastra contenente il gel viene collocata orizzontalmente su due vaschette, anch’esse di plexiglas, provviste d’elettrodi e contenenti il tampone adatto, *bridge buffer* (Tab. 2.2); delle apposite spugnette consentono il contatto tra i bordi del gel e le vaschette del tampone consentendo di chiudere il ponte per il passaggio della corrente. Il gel viene quindi sottoposto ad un campo elettrico che permette alle proteine di migrare, ciascuna nella direzione e ad una velocità che dipendono dalla carica netta a quel determinato pH, nonché dalle dimensioni e dalla forma della proteina stessa. La migrazione avviene in una cella frigorifera a temperatura costante di 4-5 °C. La durata della migrazione può variare da 4h30m fino a 6h30m così come l’amperaggio applicato varia tra i 50 e i 100 mA, in funzione dell’enzima da studiare e del sistema tampone utilizzato. Al termine della migrazione i cartellini sono estratti dal gel e lo stesso viene tagliato in due fette (in senso orizzontale) con del filo di nylon teso. Ciascuna delle due fette viene trattata con una soluzione colorante specifica per ogni enzima.

Tale soluzione è composta da un substrato su cui agisce l’enzima, un coenzima (NAD o NADP) ed un colorante che si lega al prodotto della reazione. Alcune soluzioni sono usate direttamente allo stato liquido, altre invece vengono rese solide con agar allo 0.8% in soluzione tampone tris HCl 0,05 M (pH 8), precedentemente portato ad ebollizione e poi lasciato raffreddare fino alla temperatura di circa 48°C. Dopo la colorazione, i gel vengono messi ad incubare al buio, in una stufa a 37 °C per un tempo variabile tra i 15 minuti e le 2 ore, in funzione dell’enzima. Alla fine del processo descritto, sul gel appaiono delle bande colorate e, a seconda del loro numero e posizione, si può determinare il genotipo di ciascun individuo al locus che codifica per quel particolare enzima.

Tabella 2.2. Lista degli enzimi studiati con relative codice numerico, loci codificanti, migrazione elettroforetica (+ anodale, - catodale), sistemi buffer e procedure di colorazione, per i campioni di specie di *Contracecum* esaminati.

Enzima/Codice numerico	Loci codificanti	Migrazione	Sistema buffer	Procedura per la colorazione/referenze
<i>Idditol dehydrogenase</i> (1.1.1.1)	<i>Iddh</i>	-	3	Nascetti <i>et al.</i> (1986) denominato come <i>Sdh</i>
<i>Malate dehydrogenase</i> (1.1.1.3)	<i>Mdh-1</i>	+	5	Nascetti <i>et al.</i> (1986)
	<i>Mdh-2</i>	+	5	“
	<i>Mdh-3</i>	-	5	“
<i>Isocitrate dehydrogenase</i> (1.1.1.4)	<i>Icdh</i>	+	3	“
<i>6-Phosphogluconate dehydrogenase</i> (1.1.1.4)	<i>6Pgdh</i>	+	5	“
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> (1.2.1.1)	<i>Gapdh</i>	+	3	“
<i>Superoxide dismutase</i> (1.15.1.1)	<i>Sod-1</i>	+	3,4	“
	<i>Sod-2</i>	-	3,4	“
<i>Nucleoside phosphorylase</i> (2.4.2.1)	<i>Np</i>	+	4,7	mod. da Nascetti <i>et al.</i> (1986); sol. colorante: 0.05 M
<i>Aspartate amino ttransferase</i> (2.6.1.1)	<i>Aat-2</i>	+	3	Nascetti <i>et al.</i> (1986)
<i>Adenilate kinase</i> (2.7.4.3)	<i>Adk-2</i>	-	5,3	“
<i>Colorimetric esterase</i> (3.1.1)	<i>cEst-1</i>	+	4	“
	<i>PepC-1</i>	+	3	20mg L-leucyl alanine, 3mg peroxidase, 0.05mg L-amino
	<i>PepC-2</i>	+	3	acid oxidase, 10mg orthodianisidine, 10mg MnCl ₂ , agar 0.8% in 30ml tris/HCl 0.05 pH 8
<i>Mannose phosphate isomerase</i> (5.3.1.8)	<i>Mpi</i>	+	4	Nascetti <i>et al.</i> (1986)
<i>Glucose phosphate isomerase</i> (5.3.1.9)	<i>Gpi</i>	+	4	“
<i>Phosphoglucomutase</i> (5.4.2.2)	<i>Pgm-1</i>	+	6	“
	<i>Pgm-2</i>	+	6	“

* sistemi buffer: 1. Discontinuo tris/citrate (Na), Poulik (1957); 2. Discontinuo tris/citrate (Li), modificato da Poulik (1957); 3. Continuos tris/citrate, Selander *et al.* (1971); 4. tris/versene/borate, Brewer & Sing (1970); 5. Phosphate citrate, Harris (1966); 6. tris-maleate, modificato da Brewer & Sing (1970); 7. 0.1M tris-maleate pH=7.8, Richardson *et al.* (1986).

2.2.2 Nomenclatura dei loci e degli alleli

Gli enzimi che hanno la stessa funzione enzimatica, ma sono codificati da loci diversi (definiti isozimi) si presentano, all'analisi elettroforetica, con una mobilità differente; per distinguerli sono stati numerati in ordine decrescente a partire da quello più anodico, ad esempio *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Ldh-3* e così via.

Per gli allozimi, cioè quegli enzimi che sono codificati da alleli diversi dello stesso locus, è stata adottata una nomenclatura che esprime la loro mobilità relativa rispetto all'allele "100", che per definizione viene dato all'allele più frequente della popolazione, ad esempio *Ldh-1⁹⁰*, *Ldh-1¹⁰⁰*; la mobilità degli alleli rispetto a quello più comune viene determinata dalla distanza in mm tra le varie bande che compaiono sul gel dopo la fase di colorazione precedentemente descritta.

2.2.3 Patterns elettroforetici

Nell'interpretazione dei patterns è basilare la conoscenza della struttura dell'enzima, in particolare se esso è un monomero o un polimero. In entrambi i casi, gli omozigoti sono caratterizzati da un'unica banda in quanto entrambi gli alleli codificano per la stessa sequenza aminoacidica. Per gli eterozigoti, l'interpretazione è più complessa; di norma è possibile identificare il numero di subunità della struttura quaternaria dell'enzima, in base al numero di bande che compaiono negli individui eterozigoti, presupponendo che le subunità dell'enzima completo, possano aggregarsi casualmente a formare isozimi omomeri ed eteromeri (Harris & Hopkinson, 1976). Nei monomeri gli eterozigoti si presentano con due bande (una per ciascun allozima); poiché entrambe le forme allozimiche sono attive, gli alleli di quel locus sono detti codominanti. Quando l'enzima è polimerico, l'eterozigote presenta una struttura composta da più bande; sono infatti presenti due bande omomeriche, rappresentanti le combinazioni delle subunità dello stesso allozima, e altre bande eteronome che corrispondono a molecole ibride formate dalla combinazione delle catene polipeptidiche dei due alleli (Allendorf & Utter, 1979).

Per gli enzimi dimerici quindi l'eterozigote è costituito da tre bande (a₂, ab, b₂), per i trimeri si hanno quattro bande (a₃, a₂b, ab₂, b₃), nel caso dei tetrameri sono presenti cinque bande (a₄, a₃b, a₂b₂, ab₃, b₄) e così via.

In generale se la proteina è costituita da n subunità, nell'eterozigote si avranno $n+1$ isoismi di cui 2 omomeri e $n-1$ eteronomi. L'intensità delle bande è diversificata in funzione del contributo di ciascun allozima all'attività enzimatica totale: i rapporti d'intensità seguono i coefficienti dello sviluppo di potenza ennesima di un binomio, per i dimeri si ha 1:2:1, per i trimeri 1:3:3:1, per i tetrameri 1:4:6:4:1, ecc..

Tab. 2.1. Specie di *Contracaecum* studiate mediante elettroforesi multilocus. N = n° di esemplari saggiati.

Ospite definitivo	Parassita	N	Stadio del ciclo vitale	Località di campionamento
<i>Pelecanus crispus</i> (Pelecanidae)	<i>C. multipapillatum</i> (s.l.)	172	A	Psatatopi (Grecia)
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelecanidae)	“	40	A	Totumo (Nord Colombia)
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelecanidae)	<i>C. bioccai</i>	32	A	Totumo (Nord Colombia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. rudolphii</i> (s.l.)	168	A	Laguna di Venezia (Nord Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	194	A	Oristano, Sardegna (Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	40	A	Baia di Gdansk (Polonia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	62	A	Tarquini, Lazio (Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	26	A	Lago di Matsury (Polonia)
<i>Phalacrocorax aristotelis</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. septentrionale</i>	69	A	Húsavík (Islanda)
<i>Phalacrocorax carbo carbo</i> (Phalacrocoracidae)	“	62	A	Karmøy (Norvegia)
<i>Phalacrocorax pygmaeus</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. microcephalum</i>	92	A	Lago di Scutari (Yugoslavia)
<i>Pelecanus onocrotalus</i> (Pelecanidae)	<i>C. micropapillatum</i>	85	A	Assuan (Egitto)
<i>Spheniscus magellanicus</i> (spheniscidae)	<i>C. pelagicum</i>	30	A	Penisola di Valdés (Argentina)
<i>Uria aalge</i> (Alcidae)	<i>C. variegatum</i>	43	A	Le Croisic (Francia)
<i>Ardea cinerea</i> (Ardeidae)	<i>Contracaecum</i> sp.	47	A	Kerfeuille (Francia)
<i>Mugil incilis</i> (Mugilidae)	Larve Type 2	10	L ₃	Totumo (Nord Colombia)
<i>Anguilla anguilla</i> (Anguillidae)	Larve Type 1	10	L ₃	Tarquini (Italia)

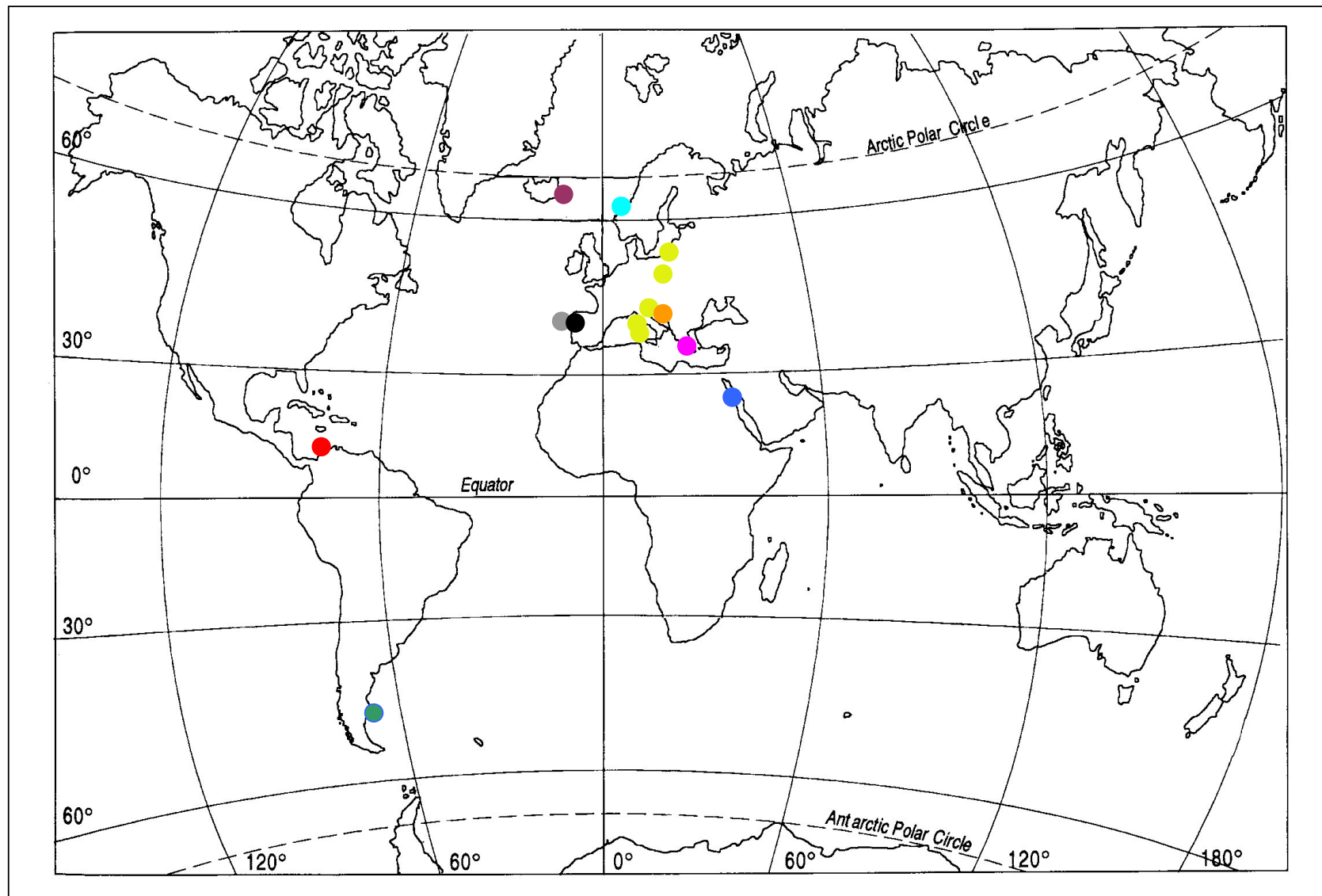


Fig. 2.1. Località di campionamento degli ospiti definitivi (uccelli ittiofagi) delle specie di *Contracaecum* studiate: ● *Phalacrocorax carbo sinensis*; ● *Phalacrocorax aristotelis*; ● *Phalacrocorax carbo carbo*; ● *Phalacrocorax pygmaeus*; ● *Pelecanus onocrotalus*; ● *Pelecanus crispus*; ● *Pelecanus occidentalis*; ● *Spheniscus magellanicus*; ● *Uria aalge*; ● *Ardea cinerea*.

2.3 DNA mitocondriale (Citocromo Ossidasi II): materiale

89 esemplari dei 1182 studiati mediante elettroforesi multilocus, appartenenti a specie diverse, sono stati analizzati per un frammento del gene della Citocromo Ossidasi II (*cox-2*) del mtDNA, lungo 519 bp. In tabella 2.3 è riportato l'elenco del materiale saggiato, l'ospite definitivo, il numero di esemplari analizzati, il luogo di provenienza e stadio del ciclo biologico.

2.4 DNA mitocondriale: metodi

2.4.1 Il DNA mitocondriale come marcatore genetico

Parte degli individui saggiati mediante elettroforesi sono stati analizzati utilizzando come marcatore il mtDNA; l'utilizzo di questo marcatore è relativamente recente e risulta molto efficace per l'analisi della struttura e della variabilità genetica di popolazioni animali. Tale tecnica è particolarmente vantaggiosa nello studio degli eventi evolutivi recenti in quanto il mtDNA presenta caratteristiche particolari quali l'alto tasso di mutazione, l'assenza di ricombinazione, l'ereditarietà materna e l'assenza di introni (Gyllenstein *et al.*, 1985). La molecola di DNA mitocondriale (mtDNA), localizzata negli organelli citoplasmatici deputati alla respirazione cellulare, è una molecola circolare chiusa, lunga circa 16 kb, piccola e semplice rispetto alle dimensioni ed alla complessità della struttura del DNA genomico. Il mtDNA risulta più simile al DNA dei batteri che alla cromatina degli eucarioti (non sono presenti proteine istoniche e non si conoscono meccanismi di compattamento); anche i meccanismi di trascrizione e di traduzione sono molto simili a quelli presenti nei procarioti fermo restando, però, che il genoma di questi organismi risulta molto più complesso rispetto a quello mitocondriale. La molecola di mtDNA può dunque essere facilmente sottoposta a tecniche quali clonaggio e/o amplificazione mediante PCR (polymerase chain reaction). In questo modo è possibile individuare anche le sostituzioni nucleotidiche silenti mediante il sequenziamento di specifici geni o sequenze spaziatrici. Tali sostituzioni, non essendo soggette a selezione, risultano essere degli ottimi marcatori genetici nell'analisi della variazione intraspecifica.

Solo alcune delle proteine legate alla respirazione cellulare e gli RNA coinvolti nella sintesi proteica sono effettivamente codificanti nel mtDNA. Inoltre, non essendo presenti gli introni, le regioni intrageniche sono di dimensioni ridotte; la regione più vasta non codificante è costituita dalla regione di controllo detta d-loop; oltre a tale regione, si possono riconoscere i

geni per il citocromo b (*cyt b*), tre sub-unità della citocromo ossidasi (CO I; II; III), sette sub-unità del complesso NADH-deidrogenasi (ND 1,2, 3, 4, 4L, 5, 6) e due dell'ATPasi (ATP 6 e 8), due RNA ribosomali (12S e 16S) e 22 tRNA (Fig. 2.2).

Poiché il processo di duplicazione dei mitocondri (simile alla divisione batterica) è identico sia nella mitosi che nella meiosi, i gameti e le cellule somatiche possiedono mtDNA identico.

In natura sono conosciute due metodologie di ereditarietà di tali organelli; quella biparentale, caratteristica dei lieviti e di alcune piante, secondo la quale i mitocondri di un individuo provengono da entrambi i gameti (maschile e femminile), e quella uniparentale, come negli animali superiori e nei vegetali, secondo la quale i mitocondri di un individuo provengono da un solo gamete. Tranne rare eccezioni, i mitocondri presenti negli zigoti dei metazoi, derivano totalmente da cellule uovo e di conseguenza il mtDNA è ereditato per via citoplasmatica materna.

In rare occasioni si presentano differenti linee mitocondriali nelle cellule di un individuo (eteroplasmia) che sembrano essere legate a mutazioni avvenute lungo una linea materna; esistono, tuttavia, delle eccezioni in cui si riscontra un contributo paterno alla popolazione di mitocondri nello zigote, come ad esempio in *Mytilus edulis* (Steward *et al.*, 1995). L'eteroplasmia, essendo rara e di durata limitata, in mancanza di fenomeni di selezione è persa per deriva genetica (Chapman *et al.*, 1982), ed è difficilmente osservabile, ma rappresenta un passaggio obbligato nell'origine della diversità mitocondriale delle popolazioni naturali.

L'utilizzo del DNA mitocondriale nell'analisi della variabilità genetica è determinato dal fatto che esso evolve negli animali ad un tasso 5/10 volte maggiore rispetto al DNA nucleare (Brawn *et al.*, 1979); tale proprietà è dovuta a due fattori: 1) il limitato numero di geni presenti e il ruolo da loro svolto che sembrerebbe essere causa di una minore accuratezza nei meccanismi di replicazione; 2) l'ambiente particolarmente ricco di radicali dell'ossigeno originati dalla catena respiratoria. E' quindi evidente che l'elevata frequenza di mutazione, unitamente alla ridotta pressione selettiva contro le mutazioni stesse, determina l'elevata variabilità del mtDNA.

Il mtDNA non è ricombinante, ogni clone rappresenta un singolo allele (aplotipo mitocondriale o mitotipo) caratterizzato dalla combinazione di mutazioni, spesso numerose, associate tra loro. Sono state sviluppate numerose tecniche filogenetiche (Farris, 1972; Felsenstein, 1973; 1981; 1993; Fitch & Farris, 1974; Swofford *et al.*, 1981) per inferire i meccanismi di origine ed evoluzione della diversità tra sequenze di DNA. La ricostruzione delle genealogie attraverso il mtDNA è più facile e attendibile rispetto alle ricostruzioni basate su geni nucleari, ovvero gli alberi che si ottengono sono maggiormente rappresentativi dei processi di separazione e

isolamento riproduttivo tra individui. Infatti, per i marcatori nucleari, a causa della ricombinazione e dell'assortimento tra geni indipendenti, la genealogia di un gene può differire da quella di un altro ed entrambe da quella degli individui che li portano; la duplicazione e la perdita di geni rende, inoltre, difficile il riconoscimento delle reali omologie (identità per discendenza) dalle parologie (identità per duplicazione) (Page & Holmes, 1998). Inoltre, essendo il mtDNA trasmesso pressochè unicamente dalle femmine, le popolazioni dei geni mitocondriali sono più piccole e, quindi, maggiormente soggette a fenomeni stocastici rispetto ai geni nucleari presentando sovente pattern di distribuzione geografica meno omogenei.

L'analisi del mtDNA è stata ulteriormente impiegata nello studio dei fenomeni di colonizzazione e demografia delle popolazioni (Avise & Saunders, 1984; Avise *et al.*, 1987) e in studi filogenetici.

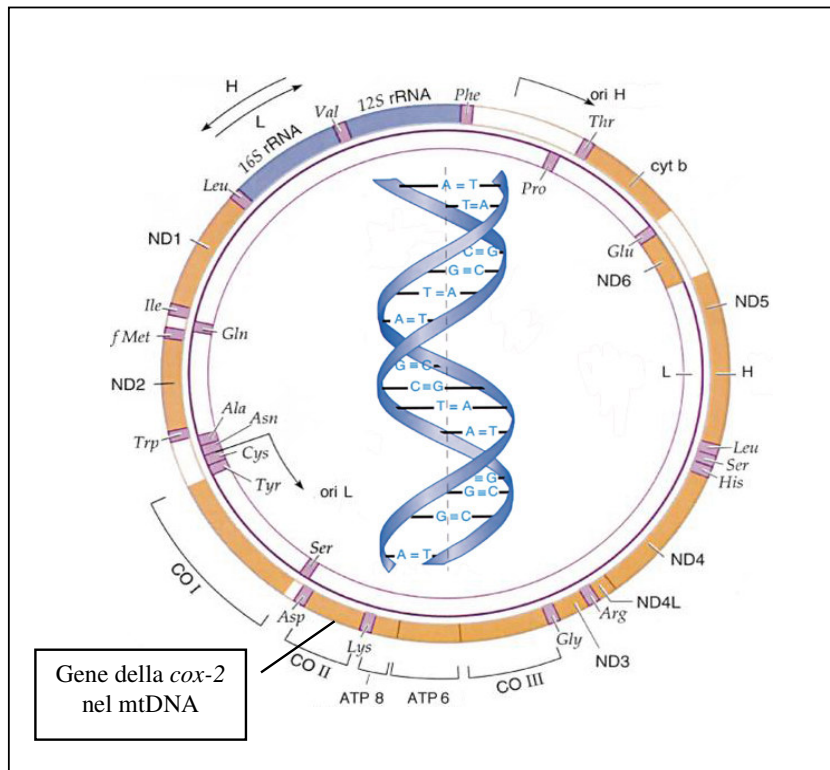


Fig. 2.2. Rappresentazione grafica della molecola del mtDNA. Viene evidenziata la posizione del gene della *cox-2*.

2.4.2 Estrazione del DNA

Il DNA totale è stato estratto da frammenti degli individui conservati a -80 °C o in etanolo. Per gli esemplari conservati in etanolo è stato effettuato un trattamento preventivo all'estrazione con TBS per eliminare l'etanolo stesso dai tessuti. L'estrazione del DNA è stata effettuata secondo il metodo CTAB/fenolo-cloroformio modificato (Murray & Thompson, 1980), e risospeso in 50 µl di TE (tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8).

Nelle metodiche di indagine non ha interferito l'eventuale presenza di RNA; non è stato, pertanto, necessario sottoporre la soluzione ottenuta a trattamento con RNAasi.

Per ogni individuo è stata analizzata una quantità di circa 10 mg di tessuto; il protocollo di estrazione prevede che il tessuto venga omogeneizzato in 500 µl di tampone di estrazione CTAB [tris-HCl 0.1 M, pH 8; NaCl 1.4 M; EDTA 0.02 M; CTAB (bromuro di hexadecyltrimetilammonio) 2% e digeriti con 5 µl di proteinasi K (20 µg/ml) a 56 °C per 3-4 ore. Al termine della "digestione", si aggiungono 500 µl di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (in rapporto 25:24:1); i campioni vengono poi mantenuti in agitazione per 5' al fine di emulsionare le due fasi, acquosa e organica, e facilitare l'estrazione delle proteine e dei loro prodotti di digestione. Centrifugando le provette per 15' a 13000 giri/minuto si provoca la precipitazione delle proteine e la separazione delle due fasi. La fase più pesante contenente i prodotti proteici della digestione si trova nella parte inferiore della provetta rispetto alla fase acquosa che, essendo più leggera, viene a trovarsi nella parte superiore e, di conseguenza, è facilmente prelevabile e viene quindi messa in tubi puliti. Per assicurare una separazione accurata tale passaggio si ripete due volte, prima con fenolo:cloroformio:alcol isoamilico e poi in cloroformio assoluto.

Gli acidi nucleici (DNA e RNA) contenuti nella fase acquosa vengono fatti precipitare a -20 °C con 1000 µl di etanolo assoluto in presenza di NaCl (20µl, 5 mM). Un'ulteriore centrifugazione (15' a 13000 giri/minuto) permette di far concentrare DNA ed RNA in fondo ai tubi a formare il pellet in modo da poter eliminare l'etanolo. A questo punto, un successivo step è costituito da un lavaggio mediante etanolo al 70% (500 µl) il quale permette di allontanare i sali residui. Si elimina quindi l'etanolo al 70%, il pellet viene asciugato all'aria per almeno 6 ore e successivamente risospeso in 50 µl di TE (tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8). La soluzione di DNA così ottenuta viene conservata a -20 °C fino al successivo utilizzo.

2.4.3 Amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)

La soluzione ottenuta attraverso il protocollo sopra descritto risulta molto eterogenea contenendo molecole sia di DNA che di RNA, di lunghezza e provenienza diverse (DNA nucleare e mitocondriale, RNA di varia natura), in un numero di copie variabile di alcuni ordini di grandezza (da alcune centinaia nel caso dei geni nucleari a molte migliaia per geni mitocondriali e RNA). Tale soluzione di acidi nucleici viene successivamente sottoposta alla tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction). In questo caso la reazione a catena della DNA polimerasi (PCR, Saiki *et al.*, 1988) ha un ruolo estremamente importante in quanto permette:

- i) l'amplificazione selettiva di porzioni specifiche di DNA mediante l'utilizzo di opportuni oligonucleotidi d'innescio (primers). Sono disponibili in letteratura collezioni di primers complementari al mtDNA (Simon *et al.*, 1994; Palumbi, 1996).

- ii) la produzione di un elevatissimo numero di copie del prodotto desiderato. La disponibilità di un alto numero di copie di un frammento rende possibile sia la sua visualizzazione mediante tecniche non specifiche (come il bromuro di etidio o il silver staining), molto più economiche e di più sicura manipolazione rispetto ai metodi basati su onde radioattive specifiche, sia il sequenziamento di tale frammento. La PCR costituisce pertanto una valida alternativa alle tecniche di clonaggio del DNA.

In questo studio è stato amplificato un frammento di mtDNA utilizzando due coppie di primers; in particolare, è stato amplificato un frammento interno del gene della *cox-2* ottenuto dalla combinazione dei 2 primers (Nadler & Hudspeth, 2000) 211F (5'-TTT TCT AGT TAT ATA GAT TGR TTY AT-3') e 210R (5'-CAC CAA CTC TTA AAA TTA TC-3'); l'amplificazione mediante PCR ha permesso di amplificare un frammento di DNA, compreso tra questi due primers, lungo 519 paia di basi. La reazione di PCR è stata realizzata utilizzando un "thermal cycler" Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) in 50 µl di soluzione (Master Mix) con: 10 ng di DNA totale, 2,5 u di Taq polymerase (Promega) con il tampone di reazione fornito dal produttore, 0,2 µM di ciascun primer, 10 µl di MgCl₂ 2,5 mM, 1 µl di dNTP 0.2 mM e 1 µl di DMSO (dimetilsolfossido). Il programma di reazione per l'amplificazione del frammento di interesse consta di una fase iniziale di 3 minuti a 94 °C (per garantire la completa denaturazione di tutto il DNA a doppio filamento inizialmente presente) seguita da 34 cicli costituiti da 30 secondi a 94 °C (fase di denaturazione), 1 minuto a 45 °C (annealing), 1 minuto e 30 secondi a 72 °C (estensione), e infine, un ciclo di 10 minuti a 72 °C (per permettere il completamento dell'attività di sintesi dei frammenti incompleti eventualmente ancora presenti) (Nadler & Hudspeth, 2000).

Il prodotto di reazione è stato controllato sottoponendo 5µl dello stesso a migrazione elettroforetica su gel d'agarosio all' 1.8% in TBE (0.045M tris-borato; 0.001M EDTA, pH 8) contenente 0.01% di bromuro di etidio. Quest'ultimo si intercala alle basi di DNA e risulta fluorescente quando è posto su una sorgente di luce ultravioletta di opportuna lunghezza d'onda. I frammenti di DNA appaiono, quindi, come bande luminose sullo sfondo scuro del gel (Fig. 2.3); l'intensità luminosa, dipendendo dalla quantità di Bromuro di Etidio legata, è maggiore nei frammenti più lunghi. Le dimensioni del frammento possono essere stabilite in maniera approssimativa facendo migrare nello stesso gel un marcatore di peso, ovvero una miscela di frammenti di DNA di lunghezza nota (Fig. 2.3).

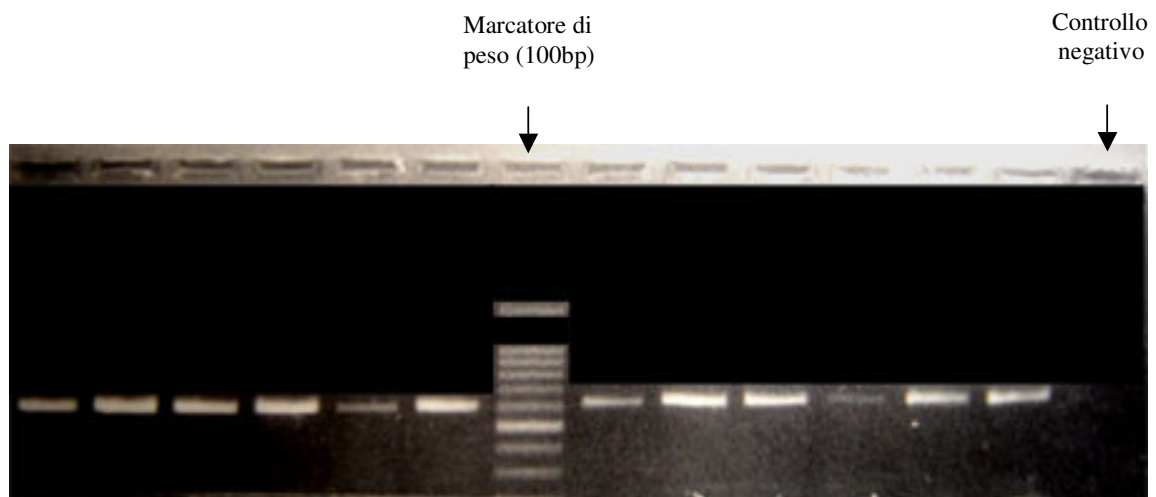


Fig. 2.3. PCR della porzione del gene della *cox2*; al centro del gel è stato posizionato il marcatore di peso (100 bp), mentre nell'ultimo pozzetto è stato caricato il controllo negativo.

2.4.4 Sequenziamento

I prodotti di PCR degli individui saggiati sono stati successivamente spediti alla ditta MacroGen Inc. in Korea dove sono stati purificati e quindi sequenziati. In totale sono stati sequenziati 89 esemplari appartenenti a 12 specie diverse.

Il principio del sequenziamento automatico è una modificazione del sequenziamento descritto da Sanger *et al.* (1977), basato sulla terminazione controllata della replicazione enzimatica in vitro del DNA. La reazione risulta essere analoga alla PCR sopra descritta, ma con l'utilizzazione di un solo primer; viene sintetizzato un solo filamento usando l'altro come stampo (templato); di conseguenza non si verifica un aumento esponenziale del prodotto, caratteristico della PCR. Sono stati utilizzati gli stessi primers della reazione di PCR (211F e 210R per le sequenze del gene della *cox-2*).

Per ogni campione entrambi i filamenti vengono sequenziati in modo da effettuare un accurato controllo della lettura della sequenza mediante la procedura dell'allineamento e del controllo reciproco da cromatogramma. In caso di ambiguità il campione è stato nuovamente sequenziato.

2.4.5 Analisi delle sequenze

Le sequenze sono state controllate direttamente dal cromatogramma per entrambi i filamenti mediante l'ausilio del programma CHROMAS (Fig. 2.4) versione 2.01 (McCarthy-Technelysium Pty. Ltd., 1998-2005) e successivamente sono state allineate con il programma Clustal X versione 1.81 (Thompson *et al.*, 1994;1997).

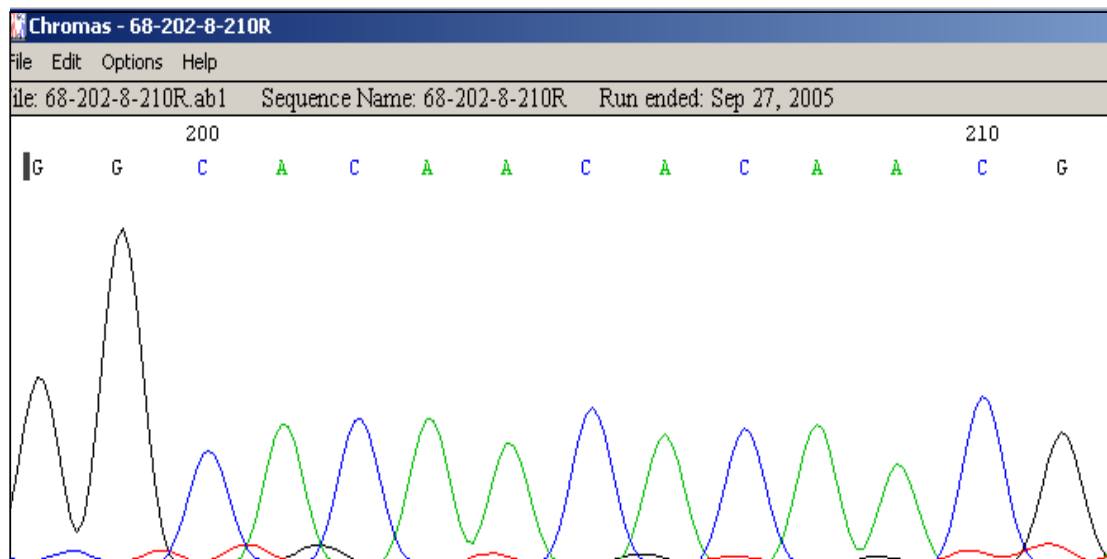


Fig. 2.4. Cromatogramma per la visualizzazione e l'analisi delle sequenze

Tab. 2.3. Specie di *Contracaecum* studiate a livello della mtDNA *cox-2*. N= n° di esemplari saggiati.

Ospite definitivo	Parassita	N mtDNA	Stadio del ciclo vitale	Località di campionamento
<i>Pelecanus crispus</i> (Pelecanidae)	<i>C. multipapillatum (s.l.)</i>	12	A	Psatatopi (Grecia)
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelecanidae)	“	11	A	Totumo (Nord Colombia)
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelecanidae)	<i>C. bioccai</i>	10	A	Totumo (Nord Colombia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. rudolphii (s.l.)</i>	7	A	Laguna di Venezia (Nord Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	6	A	Oristano, Sardegna (Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	4	A	Baia di Gdansk (Polonia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	4	A	Tarquini, Lazio (Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	4	A	Lago di Matsury (Polonia)
<i>Phalacrocorax aristotelis</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. septentrionale</i>	2	A	Hüsavik (Islanda)
<i>Phalacrocorax carbo carbo</i> (Phalacrocoracidae)	“	3	A	Karmoy (Norvegia)
<i>Phalacrocorax pygmaeus</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. microcephalum</i>	4	A	Lago di Scutari (Yugoslavia)
<i>Pelecanus onocrotalus</i> (Pelecanidae)	<i>C. micropapillatum</i>	12	A	Assuan (Egitto)
<i>Spheniscus magellanicus</i> (Spheniscidae)	<i>C. pelagicum</i>	5	A	Penisola Di Valdés (Argentina)
<i>Uria aalge</i> (Alcidae)	<i>C. variegatum</i>	3	A	Le Croisic (Francia)
<i>Ardea cinerea</i> (Ardeidae)	<i>Contracaecum</i> sp.	2	A	Kerfeuille (Francia)
<i>Mugili incilis</i> (Mugilidae)	Larve Type 2	4	L ₃	Totumo (Nord Colombia)
<i>Anguilla anguilla</i> (Anguillidae)	Larve Type 1	3	L ₃	Tarquini, Lazio (Italia)

2.5 Analisi statistiche e filogenetiche

Per quanto riguarda l'elaborazione dei dati allozimici ottenuti dalla sperimentazione in laboratorio sono state eseguite le analisi riportate di seguito. La divergenza genetica delle popolazioni e delle specie è stata stimata usando i seguenti indici: la distanza genetica standard, D_{nei} (Nei, 1972) e la "chord-distance", D_c (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967); l'analisi genetica delle popolazioni è stata ottenuta utilizzando il programma BYOSIS-1 (Swofford & Selander, 1989). E' stata calcolata anche la variabilità genetica per gli esemplari saggiati a livello allozimico, utilizzando i criteri di significatività P_{99} e P_{95} per il calcolo del χ^2 . E' stata inoltre calcolata l'eterozigosi media attesa (H_e) per ogni specie di *Contracaecum* analizzata. Con il programma MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) è stata analizzata la divergenza genetica, per il set di dati mitocondriali, utilizzando i seguenti indici: la distanza Kimura-2parametri*, K2P (Kimura, 1980) e la p-distance**, D_p (Nei & Kumar, 2000).

Per l'analisi filogenetica sono state effettuate diverse elaborazioni; la divergenza genetica per i dati mitocondriali, a livello interspecifico, è stata stimata utilizzando l'analisi della "massima parsimonia" (MP) mediante l'utilizzo del programma PAUP 4.0 (Swofford, 2003). Gli alberi filogenetici sono stati ottenuti utilizzando il programma MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004); per le sequenze ottenute dall'amplificazione del gene della *cox-2* sono stati realizzati NJ e UPGMA, utilizzando Kimura-2-parametri e p-distance. La veridicità delle relazioni genetiche è stata valutata utilizzando l'analisi di bootstrap non parametrica (Felsenstein, 1985), con 100 repliche per la MP e 1000 repliche per gli alberi filogenetici realizzati con MEGA 3.1. I valori di bootstrap uguali o maggiori di 60 sono da considerarsi ben supportati (Hills & Bull, 1993). Sia per i dati allozimici che mitocondriali è stata inoltre effettuata una analisi *Multi Dimensional Scaling* (MDS), utilizzando il programma SYN-TAX 2000 (Podani, 2005), per verificare la congruenza dei due set di dati. Infine, per il set di dati ottenuto dall'analisi mitocondriale è stato realizzato un network, disegnato con il programma NETWORK 4.0 (Forster *et al.*, 2001).

* = Questo modello di distanza è la proporzione (p) dei siti nucleotidici ai quali due sequenze sono differenti quando messe a confronto. Ciò è ottenuto dalla divisione del numero di nucleotidi differenti per il numero totale di nucleotidi confrontati. Questo modello non applica nessuna correzione per sostituzioni multiple allo stesso sito (*multiple hits*), per tasso di sostituzione doppio (per esempio, differenze nei tassi transizionali e trasversionali) o differenze in tassi di evoluzione tra i siti.

** = Il modello Kimura-2-parametri (Kimura, 1980; 1983) corretto per sostituzioni multiple allo stesso sito (*multiple hits*), tiene conto sia dei tassi di sostituzione transizionali e trasversionali, assumendo che le frequenze dei quattro nucleotidi siano le stesse e che i tassi di sostituzione non variano tra i siti. La matrice di sostituzione ha due parametri, uno per le transizioni e uno per le trasversioni. Le quattro basi azotate, quindi, non sono equivalenti, ma si distinguono sulla base della struttura chimica. Le transizioni sono le mutazioni che trasformano una purina in un'altra purina o una pirimidina in un'altra pirimidina ($A \leftrightarrow G$ e $C \leftrightarrow T$), mentre le trasversioni trasformano una purina in una pirimidina o viceversa ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow T$).

3. Risultati

3.1 Elettroforesi multilocus (MAE)

L'analisi elettroforetica di 20 loci enzimatici, ha permesso di identificare tutti gli esemplari riportati in tabella 2.1 (§ 2.1). In base ai loci diagnostici individuati tra le specie *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B in precedenti studi genetici (Nascetti *et al.*, 2000; Mattiucci *et al.*, 2002), è stato possibile identificare i 168 esemplari di *C. rudolphii* (*s.l.*) (Tab. 3.1) prelevati in *Phalacrocorax carbo sinensis*, della laguna di Venezia (Tab. 2.1, § 2.1). Di questi, 102 sono stati identificati come appartenenti a *C. rudolphii* A, in quanto mostravano gli alleli *Mdh-4*¹⁰⁰, *Sod-1*¹⁰⁰, *PepC-1*¹⁰⁰ (Tab. 3.2), mentre 66 individui sono stati riconosciuti come *C. rudolphii* B, essendo caratterizzati dagli alleli *Mdh-4*¹⁰³, *Sod-1*⁸⁷ e *PepC-1*¹⁰⁵ (Tab. 3.2). Sulla base degli stessi loci diagnostici, dei 194 esemplari di *C. rudolphii* (*s.l.*) campionati in *Ph. carbo sinensis* provenienti da Oristano (Sardegna), 108 sono stati attribuiti alla specie *C. rudolphii* A, 86 alla specie *C. rudolphii* B (Tab. 3.1); infine, dei 62 esemplari campionati alle saline di Tarquinia (Italia), 41 sono stati identificati come *C. rudolphii* A e i restanti 21, come *C. rudolphii* B (Tab. 3.1). Il campione di *Contracaecum* da *Ph. carbo sinensis* proveniente dal Nord-Est della Polonia (Lago Matsury) è stato geneticamente identificato come *C. rudolphii* B, mentre i 40 esemplari campionati nella Baia di Gdansk (Polonia) sono risultati appartenere alla specie *C. rudolphii* A (Tab. 3.2);

Nell'ambito della morfospécie *C. multipapillatum* (*s.l.*) campionata in *P. crispus* in Grecia (Psatatopi), l'analisi elettroforetica ha evidenziato significative discordanze fra genotipi attesi e osservati secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg per alcuni loci enzimatici tra i 20 studiati; veniva infatti, riscontrata la completa assenza di alcune classi di eterozigoti attesi. Nella tabella 3.3 viene riportato, come esempio, il genotipo osservato ed atteso secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg al locus *Aat-2*. Quando si suddivideva il set di individui di *C. multipapillatum* (*s.l.*) in due sub-campioni, rispettivamente secondo gli alleli *Aat-2*⁸⁷ e *Aat-2*⁹⁴, *PepC-2*⁷⁰ e *PepC-2*⁷⁸, anche gli altri risultano in equilibrio di Hardy-Weinberg. Sulla base dei risultati ottenuti è stato possibile pertanto attribuire i 2 sub-campioni a due pools genici distinti; il sub-campione caratterizzato dagli alleli *Aat-2*⁹⁴ e *PepC-2*⁷⁰ è stato denominato *C. multipapillatum* A (Tab. 3.1); quello caratterizzato dagli alleli *Aat-2*⁸⁷ e *PepC-2*⁸⁰ è stato denominato, invece, *C. multipapillatum* B (Tab. 3.1). I risultati ottenuti ci permettono di affermare che i due pools genici sono riproduttivamente isolati, pur essendo stati riscontrati in sympatria nello stesso ospite (*P. crispus*) e nella stessa area geografica (Psatatopi, Grecia);

pertanto, dei 172 esemplari di *Contracaecum* (s.l.) campionati in *P. crispus* (Tab 2.1, § 2.1), è stato possibile assegnare 84 individui alla specie *C. multipapillatum* A (Aat-2⁹⁴ e PepC-2⁷⁰) (Tab. 3.2) e 88 alla specie *C. multipapillatum* B (Aat-2⁸⁷ e PepC-2⁸⁰) (Tab. 3.2).

Per quanto riguarda la popolazione di *Contracaecum* prelevata in *P. occidentalis* in Colombia (Totumo) e morfologicamente corrispondente alla specie *C. multipapillatum* (s.l.), essa mostrava alleli ad alcuni loci (*Mdh-4*, *Adk-2*, *Pep C-1* e *Pep C-2*, *Gpi*, *Pgm-2*) non osservati ne nelle specie del complesso *C. multipapillatum* (*C. multipapillatum* A e B), ne nelle altre specie qui geneticamente studiate. Il campione si mostrava geneticamente omogeneo (Tab. 3.2). Anche in questo caso, gli esemplari saggiati risultavano corrispondere ad un nuovo pool genico, qui denominato come *C. multipapillatum* C. Questi tre pools genici distinti, indicati come *C. multipapillatum* A, B e C, rappresentano pertanto un complesso di specie gemelle della specie *C. multipapillatum* (s.l.) D'altro canto, altri esemplari (32) campionati in *Pelecanus occidentalis*, del Nord della Colombia (Totumo Marsh) e morfologicamente riferibili alla morfospécie *C. rudolphii* (s.l.), (secondo Hartwich, 1964, § 1.3), mostravano ad alcuni loci (*Mdh-4*, *Pep C-1*, *Pep C-2*, *Adk-2*, *Pgm-2*) (Tab. 3.2), alleli ben distinti da quelli precedentemente osservati in *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B, così come dalle altre specie del genere *Contracaecum*, considerate nel presente lavoro. Gli esemplari di *Contracaecum* reperiti in *P. occidentalis*, rappresentano, pertanto, un nuovo pool genico corrispondente ad una nuova specie di *Contracaecum*, denominata *C. bioccai* (Mattiucci *et al.*, in corso di stampa). Sono stati, infine, caratterizzati geneticamente gli esemplari morfologicamente riferibili alla specie *C. microcephalum*, reperiti in *Ph. pygmaeus*, del lago di Scutari (Yugoslavia); esemplari di *C. micropapillatum*, campionati in *P. onocrotalus*; il campione di *Contracaecum* riconducibile morfologicamente alla specie *C. variegatum* e reperiti in *U. aalge*; gli esemplari di *C. pelagicum*, da *S. magellanicus*; infine gli esemplari di *C. septentrionale*, campionati in *Ph. aristotelis*. Le frequenze alleliche di tutte le specie studiate sono riportate in tabella 3.2.

Gli esemplari di *Contracaecum* campionati in *Ardea cinerea*, morfologicamente riferibile alla specie *C. microcephalum* (s.l.), ritrovata in lagune di acqua dolce nella parte interna della costa Nord-Occidentale della Francia (Kerfeuille), mostrano nuovi alleli ai loci *Np*⁹⁴, *cEst-1*¹⁰⁶, *Gpi*¹⁰⁶ (Tab. 3.2), che identificano un nuovo pool genico, qui definito come *Contracaecum* sp.. Tuttavia, essi verranno studiati ulteriormente per chiarire se appartengano ad una specie già descritta precedentemente, su base morfologica, o se costituiscano una specie da descrivere anche morfologicamente.

I valori di variabilità genetica calcolati ai seguenti parametri: percentuale di loci polimorfici (criterio del P_{99} e P_{95}) ed eterozigosi media attesa (He), sono riportati in tabella 3.4. Per alcune specie sono riportati i valori per campioni secondo la località di campionamento.

I valori di diversità genetica osservati tra le specie studiate, mediante indice di Nei (D_{Nei}) e di Cavalli-Sforza (D_c), sono riportati in tabella 3.5. I valori di differenziamento più bassi si osservano all'interno dei complessi di specie gemelle quali, il *C. rudolphii* complex (ad es. *C. rudolphii* A versus *C. rudolphii* B $D_{Nei} = 0.31$) e *C. multipapillatum* complex (*C. multipapillatum* A, *C. multipapillatum* B e *C. multipapillatum* C, in media $D_{Nei} \sim 0.30$). Il nuovo taxon, *C. bioccai*, è risultato geneticamente più affine alle specie gemelle *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B (in media $D_{Nei} = 0.82$) e a *C. septentrionale* ($D_{Nei} = 0.78$). I valori di differenziamento genetico più elevato si riscontrano tra le specie del complesso *C. multipapillatum* e specie differenziate anche morfologicamente (vedi § 1.3), quali quelle appartenenti al complesso *C. rudolphii* (in media $D_{Nei} = 1.20$) o a specie ad esso affini, come *C. septentrionale* (in media $D_{Nei} = 1.62$). Valori di differenziamento genetico più elevati, in assoluto, si riscontrano tra *C. variegatum* e specie del complesso *C. multipapillatum* (in media $D_{Nei} \sim 2.29$). Infine, *Contracaecum* sp. mostra un valore di differenziamento genetico più basso nel confronto con *C. microcephalum* ($D_{Nei} = 0.50$) e *C. micropapillatum* ($D_{Nei} = 0.69$), mentre sono notevolmente più elevati rispetto alle specie del complesso *C. multipapillatum* (in media $D_{Nei} \sim 1.52$) e/o a quelle del complesso *C. rudolphii* (in media $D_{Nei} \sim 1.10$) e *C. septentrionale* ($D_{Nei} = 1.37$).

Tab. 3.1. Identificazione su base genetica degli esemplari di specie del genere *Contracaecum*; N= numero di esemplari studiati.

Ospite definitivo	Parassita	N	Stadio del ciclo vitale	Località di campionamento
<i>Pelecanus crispus</i> (Pelecanidae)	<i>C. multipapillatum</i> A	84	A	Psatatopi (Grecia)
<i>Pelecanus crispus</i> (Pelecanidae)	<i>C. multipapillatum</i> B	88	A	Psatatopi (Grecia)
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelecanidae)	<i>C. multipapillatum</i> C	40	A	Totumo (Nord Colombia)
<i>Pelecanus occidentalis</i> (Pelecanidae)	<i>C. bioccai</i>	32	A	Totumo (Nord Colombia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. rudolphii</i> A	102	A	Laguna di Venezia (Nord Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	108	A	Oristano, Sardegna (Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	41	A	Tarquinia, Lazio (Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	40	A	Baia di Gdansk (Polonia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. rudolphii</i> B	86	A	Oristano, Sardegna (Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	21	A	Tarquinia, Lazio (Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	66	A	Laguna di Venezia (Nord Italia)
<i>Phalacrocorax carbo sinensis</i> (Phalacrocoracidae)	“	26	A	Lago di Matsury (Polonia)
<i>Phalacrocorax aristotelis</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. septentrionale</i>	69	A	Húsavík (Islanda)
<i>Phalacrocorax carbo carbo</i> (Phalacrocoracidae)	“	62	A	Karmøy (Norvegia)
<i>Phalacrocorax pygmaeus</i> (Phalacrocoracidae)	<i>C. microcephalum</i>	92	A	Lago di Scutari (Yugoslavia)
<i>Pelecanus onocrotalus</i> (Pelecanidae)	<i>C. micropapillatum</i>	85	A	Assuan (Egitto)
<i>Spheniscus magellanicus</i> (spheniscidae)	<i>C. pelagicum</i>	30	A	Penisola di Valdés (Argentina)
<i>Uria aalge</i> (Alcidae)	<i>C. variegatum</i>	43	A	Le Croisic (Francia)

Continua

Continua Tab. 3.1

Ospite definitivo	Parassita	N	Stadio del ciclo vitale	Località di campionamento
<i>Ardea cinerea</i> (Ardeidae)	<i>Contracaecum</i> sp.	47	A	Kerfeuille (Francia)
<i>Mugil incilis</i> Mugilidae	<i>C. multipapilatum</i> C (Larve Type 2)	10	L ₃	Totumo (Nord Colombia)
<i>Anguilla anguilla</i> Anguillidae	<i>C. rudolphii</i> A (Larve Type 1)	10	L ₃	Tarquini, Lazio (Italia)

Tab. 3.2. Frequenze alleliche ai 20 loci studiati per le 12 specie di *Contracaecum*, parassite allo stadio adulto di uccelli ittiofagi. *= *CBO*: *C. bioccai*; *CRA*: *C. rudolphii* A; *CRB*: *C. rudolphii* B; *CS*: *C. septentrionale*; *CMI*: *C. micropapillatum*; *CMP*: *C. microcephalum*; *CPE*: *C. pelagicum*; *CMA*: *C. multipapillatum* A; *CMB*: *C. multipapillatum* B; *CMC*: *C. multipapillatum* C; *CVR*: *C. variegatum*; *CSP*: *Contracaecum* sp.. N= esemplari saggiati per ogni specie.

SPECIE*												
LOCUS	<i>CBO</i>	<i>CRA</i>	<i>CRB</i>	<i>CS</i>	<i>CMI</i>	<i>CMP</i>	<i>CPE</i>	<i>CVR</i>	<i>CMA</i>	<i>CMB</i>	<i>CMC</i>	<i>CSP</i>
<i>Iddh</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
70	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000
72	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.983	1.000	0.000
75	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
77	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.983	0.000	0.000	0.000
80	0.000	0.030	0.110	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
90	0.000	0.080	0.850	0.080	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
95	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
100	0.984	0.820	0.021	0.920	0.000	0.978	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
109	0.016	0.030	0.021	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
115	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Mdh-1</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
72	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
80	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
84	0.000	0.010	0.021	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
88	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.800
90	0.000	0.000	0.000	0.931	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
92	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000
96	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
100	1.000	0.800	0.979	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
108	0.000	0.190	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
112	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Mdh-2</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Continua

Continua Tab. 3.2

SPECIE*												
LOCUS	CBO	CRA	CRB	CS	CMI	CMP	CPE	CVR	CMA	CMB	CMC	CSP
<i>Mdh-3</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Mdh-4</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
100	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
103	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000
104	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
105	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
110	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
113	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Icdh</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
86	0.000	0.040	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
90	0.000	0.020	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
95	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000
97	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
98	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
100	0.000	0.510	1.000	0.989	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
107	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>6-Pgdh</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
73	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.117	0.000	0.000
80	0.000	0.050	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
83	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000
85	0.000	0.030	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
90	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.022	0.000	0.000	0.983	0.850	1.000	0.000
98	0.016	0.000	0.000	0.939	0.000	0.978	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000
100	0.984	0.870	0.979	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
114	0.000	0.050	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000

Continua

Continua Tab. 3.2

SPECIE*												
LOCUS	CBO	CRA	CRB	CS	CMi	CMP	CPE	CVR	CMA	CMB	CMC	C SP
<i>G-apdh</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
100	0.000	1.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
103	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
105	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
107	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
110	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Sod-1</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
87	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
97	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
100	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000
104	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
106	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Sod-2</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	30	47
100	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
105	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
110	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Np</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
80	1.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
88	0.000	0.290	0.010	0.950	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
92	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
94	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
96	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000
100	0.000	0.710	0.990	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
136	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
145	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Continua

Continua Tab. 3.2

LOCUS	SPECIE*											
	<i>CBO</i>	<i>CRA</i>	<i>CRB</i>	<i>CS</i>	<i>CMI</i>	<i>CMP</i>	<i>CPE</i>	<i>CVR</i>	<i>CMA</i>	<i>CMB</i>	<i>CMC</i>	<i>CSP</i>
<i>Aat-2</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
84	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
87	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
90	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
92	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
94	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
100	0.000	1.000	1.000	0.969	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000
102	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Adk-2</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
90	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
94	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
98	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
100	0.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
105	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
110	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>cEst-1</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
90	1.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
94	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
98	0.000	0.070	0.071	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
100	0.000	0.900	0.900	0.939	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000
104	0.000	0.030	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
106	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000

Continua

Continua Tab. 3.2

LOCUS	SPECIE*											
	<i>CBO</i>	<i>CRA</i>	<i>CRB</i>	<i>CS</i>	<i>CMi</i>	<i>CMP</i>	<i>CPE</i>	<i>CVR</i>	<i>CMA</i>	<i>CMB</i>	<i>CMC</i>	<i>CSP</i>
<i>PepC-1</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
80	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000
89	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
95	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
100	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
105	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
110	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>PepC-2</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
70	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
78	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000
80	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
85	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
100	1.000	0.940	0.990	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
104	0.000	0.060	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Mpi</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
70	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000
76	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.900	0.383	0.000	0.000
80	0.000	0.010	0.021	0.172	0.000	0.598	0.000	0.000	0.000	0.217	0.000	0.000
85	0.000	0.040	0.079	0.000	0.000	0.402	0.000	0.000	0.100	0.083	0.000	0.000
92	0.000	0.260	0.550	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	1.000	0.000
95	0.406	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
100	0.000	0.450	0.279	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
105	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.300
107	0.000	0.220	0.071	0.500	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.700
110	0.594	0.020	0.000	0.328	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Continua

Continua Tab. 3.2

LOCUS	SPECIE*											
	<i>CBO</i>	<i>CRA</i>	<i>CRB</i>	<i>CS</i>	<i>CMI</i>	<i>CMP</i>	<i>CPE</i>	<i>CVR</i>	<i>CMA</i>	<i>CMB</i>	<i>CMC</i>	<i>CSP</i>
<i>Gpi</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
90	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
94	1.000	0.040	0.921	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
98	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
100	0.000	0.950	0.079	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
105	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
106	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
108	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Pgm-1</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
82	0.000	0.000	0.000	0.019	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
88	0.000	0.010	0.000	0.519	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.950	1.000	0.000
90	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
94	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
96	1.000	0.000	0.000	0.431	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
100	0.000	0.990	0.979	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000
104	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.033	0.000	0.000
110	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Pgm-2</i>												
(N)	32	250	240	131	85	92	30	43	84	88	40	47
100	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000
105	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000
107	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000

Tab. 3.3. Genotipi osservati ed attesi, secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg, nei campioni di *C. rudolphii* (s.l.) da *Ph. carbosinensis* e *C. multipapillatum* (s.l.) da *P. crispus*. *P* = livello di significatività del test χ^2 .

Locus	genotipi	<i>C. rudolphii</i> (s.l.) (ospite: <i>Ph. carbo sinensis</i>)					
		Campione totale		Subcampione n° 1 <i>C. rudolphii</i> A		Subcampione n° 2 <i>C. rudolphii</i> B	
		Osservati	Attesi	Osservati	Attesi	Osservati	Attesi
<i>Pep C-1</i>	<i>100/100</i>	250	127,40	250	250	-	-
	<i>100/105</i>	-	244,90	-	-	-	-
	<i>105/105</i>	240	117,60	-	-	240	240
		$\chi^2 = 245,37$	$P <<< 0.001$	$\chi^2 = 0$	$P = 1$	$\chi^2 = 0$	$P = 1$
Locus	genotipi	<i>C. multipapillatum</i> (s.l.) (ospite : <i>P. Crispus</i>)					
		Campione totale		Subcampione n° 1 <i>C. multipapillatum</i> A		Subcampione n° 2 <i>C. multipapillatum</i> B	
		Osservati	Attesi	Osservati	Attesi	Osservati	Attesi
<i>Aat-2</i>	<i>94/94</i>	88	44,73	84	84	-	-
	<i>87/94</i>	-	85,96	-	-	-	-
	<i>87/87</i>	84	41,29	-	-	88	88
		$\chi^2 = 86,04$	$P <<< 0.001$	$\chi^2 = 0$	$P = 1$	$\chi^2 = 0$	$P = 1$

Tab. 3.4. Percentuale di loci polimorfici calcolata con il criterio del 95% e 99% ed eterozigosi media attesa (He), per le 12 specie di *Contracaecum* studiate.

Specie di <i>Contracaecum</i>	Località di campionamento	% di loci polimorfici (P_{99})	% di loci polimorfici (P_{95})	He
<i>C. bioccai</i>	Totumo (Colombia)	15.0	5.0	0.03
<i>C. rudolphii</i> A	Oristano, Sardegna (Italia)	62.5	41.7	0.19
	Tarquinia (Italia)	66.7	45.8	0.17
	Baia di Gdansk (Polonia)	58.3	45.8	0.17
<i>C. rudolphii</i> B	Oristano, Sardegna (Italia)	45.0	16.7	0.10
	Tarquinia (Italia)	41.7	12.5	0.10
	Lago Matsury (Polonia)	58.3	25.0	0.11
<i>C. septentrionale</i>	Húsavík (Islanda)	45.0	30.0	0.09
<i>C. microcephalum</i>	Lago di Scutari (Yugoslavia)	15.0	5.0	0.03
<i>C. multipapillatum</i> A	Psatatopi (Grecia)	15.0	5.0	0.01
<i>C. multipapillatum</i> B	Psatatopi (Grecia)	20.0	15.0	0.06
<i>Contracaecum</i> sp.	Kerfeuille (Francia)	10.0	10.0	0.04

Tab. 3.5. Matrice dei valori medi di distanza genetica standard tra le specie di *Contracaecum*, parasite di uccelli ittiofagi, calcolata con la formula di Nei (1972) (D_{Nei} , sotto la diagonale) e con la D_c Cavalli-Sforza & Edwards (1967) (sopra la diagonale). *CBO*: *C. bioccai*; *CRA*: *C. rudolphii* A; *CRB*: *C. rudolphii* B; *CS*: *C. septentrionale*; *CMI*: *C. micropapillatum*; *CMP*: *C. microcephalum*; *CPE*: *C. pelagicum*; *CMA*: *C. multipapillatum* A; *CMB*: *C. multipapillatum* B; *CMC*: *C. multipapillatum* C; *CVR*: *C. variegatum*; *CSP* *Contracaecum* sp..

Specie	<i>CBO</i>	<i>CRA</i>	<i>CRB</i>	<i>CS</i>	<i>CMP</i>	<i>CMI</i>	<i>CPE</i>	<i>CMA</i>	<i>CMB</i>	<i>CMC</i>	<i>CVE</i>	<i>CSP</i>
<i>C. bioccai</i>	-	0.70	0.66	0.66	0.78	0.79	0.75	0.83	0.83	0.83	0.76	0.78
<i>C. rudolphii</i> A	0.89	-	0.44	0.61	0.60	0.69	0.71	0.76	0.72	0.72	0.80	0.70
<i>C. rudolphii</i> B	0.76	0.31	-	0.66	0.62	0.71	0.76	0.75	0.77	0.71	0.78	0.72
<i>C. septentrionale</i>	0.78	0.63	0.83	-	0.72	0.80	0.76	0.83	0.78	0.76	0.76	0.78
<i>C. microcephalum</i>	1.36	0.56	0.64	1.00	-	0.66	0.78	0.77	0.79	0.75	0.78	0.57
<i>C. micropapillatum</i>	1.50	0.84	0.99	1.56	0.78	-	0.75	0.73	0.75	0.78	0.83	0.64
<i>C. pelagicum</i>	1.19	0.96	1.32	1.25	1.38	1.20	-	0.83	0.85	0.83	0.83	0.80
<i>C. multipapillatum</i> A	1.88	1.23	1.18	1.86	1.35	1.05	1.89	-	0.46	0.66	0.85	0.78
<i>C. multipapillatum</i> B	1.85	1.02	1.32	1.42	1.52	1.20	2.27	0.30	-	0.63	0.85	0.80
<i>C. multipapillatum</i> C	1.88	1.02	0.95	1.26	1.39	1.39	1.90	0.59	0.68	-	0.85	0.80
<i>C. variegatum</i>	1.26	1.53	1.35	1.29	1.38	1.90	0.92	2.30	2.27	2.30	-	0.78
<i>Contracaecum</i> sp.	1.37	0.86	1.01	1.37	0.50	0.69	1.61	1.38	1.58	1.61	1.39	-

3.2 Analisi delle sequenze ottenute dalla mtDNA *cox-2*

Gli esemplari appartenenti alle specie del genere *Contracaecum* analizzate mediante elettroforesi multilocus sono stati in parte sequenziati per la regione del DNA mitocondriale del gene della Citocromo Ossidasi II (mtDNA, *cox-2*). In particolare, sono stati sequenziati un totale di 89 individui per un frammento di 519 paia di basi del gene della mtDNA *cox-2*, tra quelli che sono stati caratterizzati geneticamente mediante allozimi. Tale frammento è stato trovato ricco in A+T per tutte le specie di *Contracaecum* analizzate (64.2, 70.0, 60.6 e 64.9 rispettivamente alla prima, seconda, terza posizione e a tutte le posizioni), come osservato per altri nematodi (Thomas & Wilson, 1991; Hugall *et al.*, 1997) (Tab. 3.6). Inoltre, sono stati identificati 190 (~36%) siti variabili e 172 siti informativi per la parsimonia, per le 519 bp analizzate. L'allineamento di tutte le sequenze degli individui saggiati in questo lavoro è riportato in Appendice A.

A livello mitocondriale, i valori di distanza genetica osservati tra le specie di *Contracaecum* finora studiate, sono stati calcolati utilizzando le distanze *Kimura-2-parametri* (K2P) e *p-distance* (D_p), e sono riportati in tabella 3.7. Il valore di differenziamento più basso per K2P è stato trovato tra le specie *C. pelagicum* e *C. variegatum* (K2P = 0.03); Valori bassi sono risultati anche quelli tra le specie gemelle del complesso *C. multipapillatum* (*C. multipapillatum* A, *C. multipapillatum* B e *C. multipapillatum* C) e quelle del complesso *C. rudolphii* (*C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B) che sono rispettivamente K2P = 0.11 e K2P = 0.09, mentre i valori più elevati di distanza genetica sono stati quelli riscontrati, a livello interspecifico, tra specie distinte anche morfologicamente come ad esempio *C. pelagicum* versus *C. microcephalum* (K2P = 0.18). Valori di distanza genetica elevati si riscontrano anche tra *C. bioccai* e le specie del complesso *C. multipapillatum* (valore medio K2P ~ 0.14).

Sono stati inoltre sequenziati gli esemplari di *Contracaecum* sp. da *Ardea cinerea* che, come osservato mediante MAE, sembrano costituire un taxon ancora differente. *Contracaecum* sp. mostra elevati livelli di differenziamento, a livello mitocondriale, rispetto a tutte le specie di *Contracaecum* studiate (Tab. 3.7). Il valore di distanza genetica più basso si osserva nei confronti di *C. rudolphii* A (K2P = 0.12), mentre i valori più elevati si osservano nel confronto con *C. pelagicum* (K2P = 0.17).

Specie parassita	Prima posizione				Seconda posizione				Terza posizione				Tutte le posizioni			
	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
<i>C. bioccai</i>	37.0	15.6	27.2	20.2	61.3	4.6	12.1	22.0	32.3	14.5	27.1	26.1	43.8	11.3	22.2	22.7
<i>C. rudolphii</i> A	37.0	15.6	27.2	20.2	59.4	5.6	7.6	27.5	31.8	15.0	28.3	24.9	42.7	12.1	21.0	24.2
<i>C. rudolphii</i> B	37.0	15.6	27.2	20.2	56.6	9.3	13.5	20.6	31.2	15.6	28.3	24.9	41.6	13.5	23.0	21.9
<i>C. septentrionale</i>	37.0	15.6	27.2	20.2	63.6	2.9	11.2	22.4	32.4	15.0	27.7	24.9	44.3	11.2	22.0	22.2
<i>C. variegatum</i>	37.0	15.6	27.2	20.2	58.0	4.4	16.0	21.6	31.8	15.0	27.7	25.4	42.3	11.7	23.6	22.4
<i>C. microcephalum</i>	37.1	16.0	27.2	19.7	58.1	2.3	8.8	30.8	34.0	12.3	28.3	25.4	43.1	10.2	21.4	25.3
<i>C. micropapillatum</i>	37.0	16.2	27.2	19.7	57.5	4.5	10.2	27.7	34.2	12.6	27.1	26.1	42.9	11.1	21.5	24.5
<i>C. pelagicum</i>	37.0	15.6	27.2	20.2	56.6	5.9	14.8	22.7	31.5	15.3	27.7	25.4	41.7	12.3	23.2	22.8
<i>C. multipapillatum</i> A	37.0	15.6	27.2	20.2	57.9	5.7	11.4	25.0	32.9	13.3	28.8	25.0	42.6	11.5	22.4	23.4
<i>C. multipapillatum</i> B	37.0	15.6	27.1	20.3	61.4	3.9	8.3	26.4	31.8	14.5	28.9	24.9	43.4	11.3	21.4	23.9
<i>C. multipapillatum</i> C	37.0	15.7	27.1	20.2	58.1	5.5	11.0	25.4	33.5	12.6	29.6	24.3	42.9	11.3	21.4	23.9
<i>Contracaecum</i> sp.	37.6	15.6	27.2	19.7	55.5	6.4	12.1	26.0	34.1	12.7	27.2	26.0	42.4	11.6	22.2	23.9
Valori medi	37.1	15.7	27.1	20.1	58.7	5.0	11.3	25.0	32.6	14.0	28.0	25.3	42.8	11.5	22.1	23.5
Percentuale di A+T	64.2				70.0				60.6				64.9			

Tabella 3.7. Matrice dei valori medi di distanza genetica calcolata con *Kimura-2-parametri* (sotto la diagonale) e *p-distance* (sopra la diagonale), tra le specie di *Contracaecum* studiate, parassite di uccelli ittiofagi. *CBO*: *C. bioccai*; *CRA*: *C. rudolphii* A; *CRB*: *C. rudolphii* B; *CS*: *C. septentrionale*; *CMi*: *C. micropapillatum*; *CMP*: *C. microcephalum*; *CPE*: *C. pelagicum*; *CMA*: *C. multipapillatum* A; *CMB*: *C. multipapillatum* B; *CMC*: *C. multipapillatum* C; *CVR*: *C. variegatum*; *CSP*: *Contracaecum* sp..

Specie di <i>Contracaecum</i>	<i>CBO</i>	<i>CRA</i>	<i>CRB</i>	<i>CS</i>	<i>CMi</i>	<i>CMP</i>	<i>CPE</i>	<i>CMA</i>	<i>CMB</i>	<i>CMC</i>	<i>CVR</i>	<i>CSP</i>
<i>C. bioccai</i>	-	0.11	0.12	0.11	0.13	0.12	0.12	0.14	0.12	0.12	0.12	0.14
<i>C. rudolphii</i> A	0.12	-	0.08	0.08	0.11	0.13	0.11	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11
<i>C. rudolphii</i> B	0.13	0.09	-	0.10	0.14	0.14	0.13	0.14	0.12	0.12	0.12	0.14
<i>C. septentrionale</i>	0.12	0.09	0.11	-	0.11	0.12	0.13	0.14	0.10	0.11	0.11	0.12
<i>C. micropapillatum</i>	0.15	0.12	0.16	0.12	-	0.11	0.13	0.11	0.10	0.11	0.13	0.12
<i>C. microcephalum</i>	0.14	0.14	0.15	0.13	0.13	-	0.16	0.13	0.11	0.11	0.15	0.14
<i>C. pelagicum</i>	0.11	0.13	0.14	0.14	0.14	0.18	-	0.15	0.15	0.14	0.03	0.15
<i>C. multipapillatum</i> A	0.15	0.14	0.16	0.15	0.13	0.14	0.17	-	0.10	0.10	0.15	0.14
<i>C. multipapillatum</i> B	0.13	0.13	0.13	0.11	0.11	0.12	0.17	0.11	-	0.07	0.14	0.13
<i>C. multipapillatum</i> C	0.13	0.13	0.14	0.12	0.12	0.12	0.16	0.11	0.08	-	0.13	0.13
<i>C. variegatum</i>	0.13	0.12	0.13	0.12	0.15	0.17	0.03	0.17	0.16	0.15	-	0.14
<i>Contracaecum</i> sp.	0.16	0.12	0.16	0.14	0.13	0.15	0.17	0.15	0.15	0.14	0.15	-

3.3 Relazioni genetiche tra le specie del genere *Contracaecum* da MAE

Sulla base delle frequenze alleliche e dei valori di distanza genetica ottenuti dall'analisi MAE, è stato possibile studiare le relazioni genetiche tra le specie del genere *Contracaecum* (parassite di uccelli ittiofagi) studiate in questo lavoro. Le analisi effettuate, utilizzando differenti metodologie (UPGMA, *Multi Dimentional Scaling* (MDS), hanno prodotto risultati analoghi. L'analisi fenetica (UPGMA), riportata in figura 3.1. evidenzia l'esistenza di due clusters principali: il primo comprende le specie *C. bioccai*, *C. rudolphii* A, *C. rudolphii* B, *C. septentrionale*, *C. micropapillatum*, *C. microcephalum*, *Contracaecum* sp., *C. variegatum* e *C. pelagicum*; nel secondo sono incluse, invece, le specie del complesso *C. multipapillatum* (*C. multipapillatum* A, *C. multipapillatum* B e *C. multipapillatum* C). Nell'ambito del primo cluster è possibile distinguere dei cladi: in uno sono riunite le specie *C. rudolphii* A, *C. rudolphii* B, *C. septentrionale* e *C. bioccai*; in un altro clade sono comprese le specie *C. micropapillatum*, *C. microcephalum* e *Contracaecum* sp.. Quest'ultima risulta, secondo questa analisi, più geneticamente affine alla specie *C. microcephalum*; un terzo clade, infine, comprende le specie *C. variegatum* e *C. pelagicum* che, risultano tra di loro correlate.

Sulla base delle frequenze alleliche calcolate per tutte le specie studiate in questo lavoro, è stata realizzata un'analisi MDS (*Multi Dimensional Scaling*) con il programma SYN-TAX 2000, che mostra l'esistenza di 4 raggruppamenti di specie (Fig. 3.2): un gruppo riunisce le 3 specie *C. microcephalum*, *C. micropapillatum* e *Contracaecum* sp.; un altro raggruppamento comprende le specie *C. variegatum* e *C. pelagicum*; in un altro compaiono le specie del complesso *C. rudolphii* (*C. rudolphii* A e B), *C. bioccai* e *C. septentrionale*; infine, le specie del complesso *C. multipapillatum* (*C. multipapillatum* A, B e C), risultano costituire un gruppo differenziato dagli altri.

Fig. 3.1. UPGMA ottenuto sulla base della distanza di Nei (1972), di tutte le specie studiate.

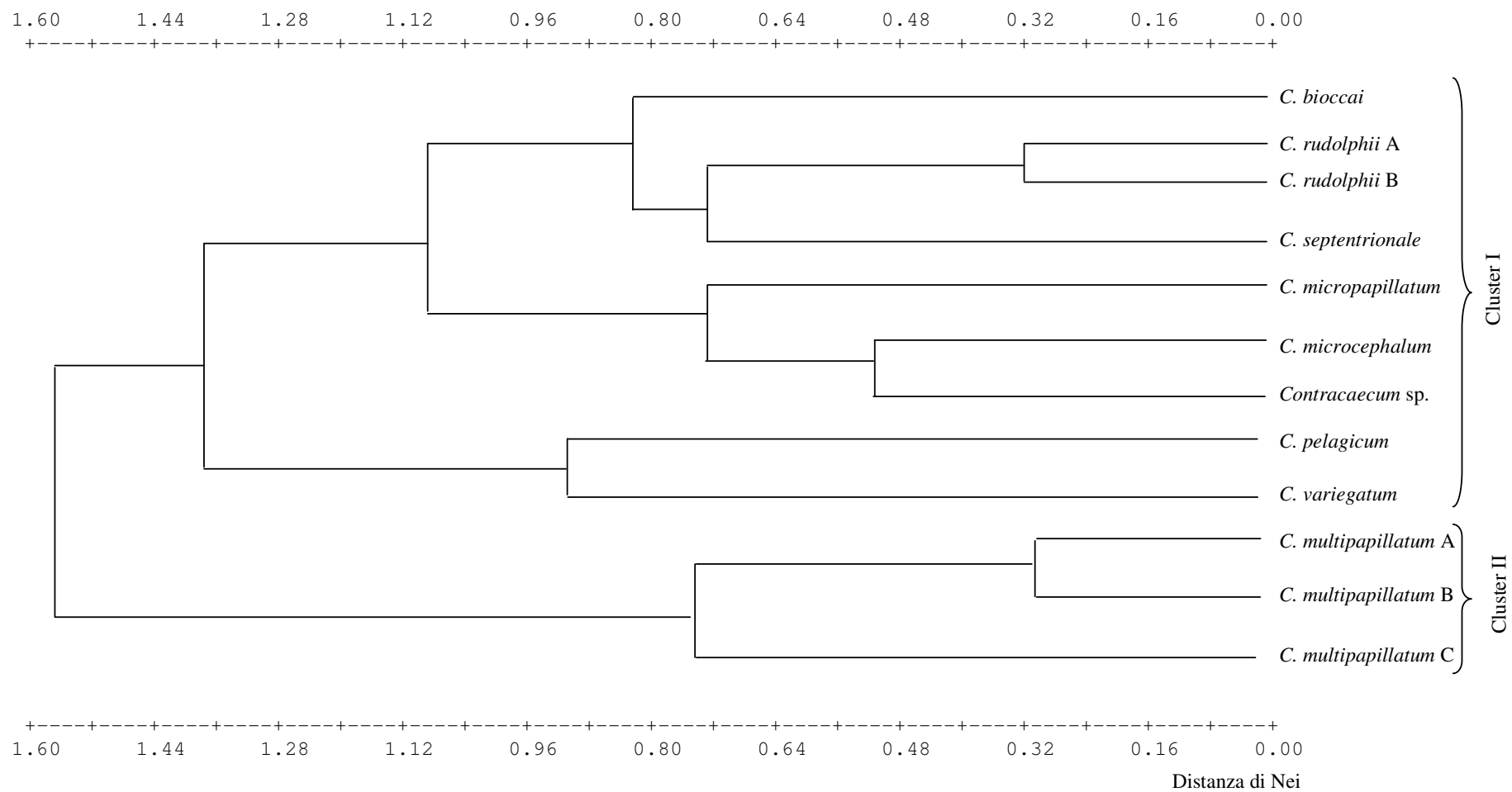
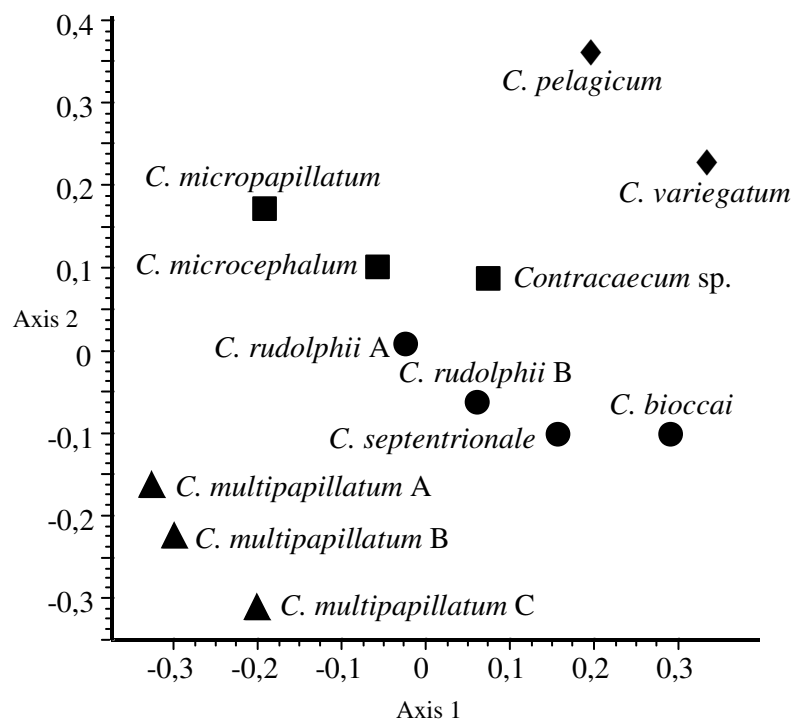


Fig. 3.2. *Multi Dimensional Scaling* (MDS) realizzata sulla base delle frequenze alleliche ottenute dai 20 loci enzimatici, studiati nelle specie del genere *Contracaecum*.



3.4 Gli allozimi come marcatori per il riconoscimento delle specie.

L'elettroforesi multilocus sulle specie del genere *Contracaecum* qui studiate, ha permesso di individuare loci diagnostici tra le varie specie che ne permettono l'identificazione a qualsiasi stadio di sviluppo (Tab. 3.8).

Sulla base degli alleli ai loci diagnostici è possibile definire chiavi biochimiche come quella riportata in tabella 3.9, permettendo di identificare gli esemplari delle specie finora studiate.

Tab. 3.8. Alleli ai loci diagnostici tra le specie del genere *Contracaecum*, parassite di uccelli ittiofagi. *CBO*: *C. bioccai*; *CRA*: *C. rudolphii* A; *CRB*: *C. rudolphii* B; *CS*: *C. septentrionale*; *CMI*: *C. micropapillatum*; *CMP*: *C. microcephalum*; *CPE*: *C. pelagicum*; *CMA*: *C. multipapillatum* A; *CMB*: *C. multipapillatum* B; *CMC*: *C. multipapillatum* C; *CVR*: *C. variegatum*; *CSP* *Contracaecum* sp..

Locus	<i>CBO</i>	<i>CRA</i>	<i>CRB</i>	<i>CS</i>	<i>CMI</i>	<i>CMP</i>	<i>CPE</i>	<i>CMA</i>	<i>CMB</i>	<i>CMC</i>	<i>CVR</i>	<i>CSP</i>
<i>Iddh</i>	100	90, 100	80, 90	90, 100	80	100	100	77	721	72	75	100
<i>Mdh-1</i>	100	100, 108	100	72, 90	80	96	108	92	92	92	112	88,108
<i>Mdh-4</i>	104	100	103	103	113	108	108	105	105	110	103	105
<i>Icdh</i>	107	86, 100	100	100	90	100	97	86	86	100	95	98
<i>6-Pgdh</i>	100	80, 100, 114	100	98	90	98	100	90	73, 90	90	98	98
<i>Gapdh</i>	103	100	100	103	100	107	110	100	100	100	105	100
<i>Sod-1</i>	104	100	87	104	100	103	97	103	103	103	106	100
<i>Sod-2</i>	100	100	100	105	100	100	110	100	100	100	110	100
<i>Np</i>	80	88, 100	100	88	136	145	92	96	96	96	92	94
<i>Aat-2</i>	92	100	100	100	90	100	94	94	87	100	102	100
<i>Adk-2</i>	105	100	100	90	100	100	100	94	94	98	110	90
<i>cEst-1</i>	90	98, 100	98, 100	98, 100	104	104	90	100	100	100	90	106
<i>PepC-1</i>	110	100	105	89	80	89	108	80	89	95	108	80
<i>PepC-2</i>	100	100, 104	100	100	80	100	108	70	78	85	108	80
<i>Mpi</i>	95, 110	92, 100, 107	85, 92, 100, 107	80, 107, 110	95	80, 85	107	76, 85	70, 76, 80, 85, 92,100	92	110	105, 107
<i>Gpi</i>	94	100	94, 100	100	100	108	100	105	105	90	98	106
<i>Pgm-1</i>	96	100	100	88, 96	82	96	82	104	88	88	100	100
<i>Pgm-2</i>	100	100	100	100	100	100	100	105	105	107	100	100

Tab. 3.9. Chiave biochimica per il riconoscimento delle specie del genere *Contracaecum*, parassite, allo stadio adulto, di uccelli ittiofagi, finora geneticamente studiate.

	Locus	Alleli		Specie di <i>Contracaecum</i>
1.	<i>Np</i>	94	→	<i>Contracaecum</i> sp.
		136	→	<i>C. micropapillatum</i>
		145	→	<i>C. microcephalum</i>
		88, 96, 100		2.
2.	<i>PepC-2</i>	70	→	<i>C. multipapillatum</i> A
		78	→	<i>C. multipapillatum</i> B
		85	→	<i>C. multipapillatum</i> C
		100, 108		3.
3.	<i>Iddh</i>	75	→	<i>C. variegatum</i>
		80, 90, 100		4.
4.	<i>Mdh-4</i>	100	→	<i>C. rudolphii</i> A
		104	→	<i>C. bioccai</i>
		103, 105, 108		5.
5.	<i>Sod-1</i>	87	→	<i>C. rudolphii</i> B
		97	→	<i>C. pelagicum</i>
		100, 103, 104		6.
6.	<i>Adk-2</i>	90	→	<i>C. septentrionale</i>

3.5 Relazioni genetiche tra le specie del genere *Contracaecum* a livello mitocondriale (*cox-2*).

L'analisi delle sequenze del mtDNA ottenute dall'amplificazione di 519 paia di basi della *cox-2*, ha permesso di studiare le relazioni genetiche tra le specie studiate. È stata eseguita una *Massima Parsimonia* (MP). Lo studio della *Massima Parsimonia* (MP) sulle 89 sequenze ottenute mediante amplificazione del gene della *cox-2* ha confermato l'appartenenza degli esemplari studiati ai taxa caratterizzati geneticamente mediante MAE (Fig. 3.3). Questo tipo di analisi è di immediata applicazione poiché non ci sono opzioni (Morrison, 2005); ogni ramo dell'albero rappresenta un particolare cambiamento dello stato del "carattere". Per contro, il metodo risponde all'incremento della complessità di informazioni (dati), potendo falsare in qualche modo il diagramma (ad esempio un set di dati può essere rappresentato da più di un albero). L'albero ottenuto con il programma PAUP 4.0 è rappresentato in figura 3.3. Tutti i "caratteri" sono considerati "unrooted" e hanno lo stesso peso; 329 di questi sono costanti, mentre 172 sono considerati informativi per la parsimonia. L'albero mostra: un cluster in cui sono incluse le specie del complesso *C. multipapillatum*, *C. microcephalum* e *C. micropapillatum*; un cluster comprendente le specie *C. bioccai*, *C. pelagicum* e *C. variegatum*; un ulteriore cluster sembrerebbe essere costituito dalle specie *C. rudolphii* A, *C. rudolphii* B e *C. septentrionale*; la specie *Contracaecum* sp. risulta far parte di un clade a parte. I valori di bootstrap sono ben supportati per i legami secondari.

L'analisi fenetica, ottenuta con l'UPGMA dai valori di distanza genetica K2P è riportata in figura 3.4. La topologia dell'albero mette in evidenza l'esistenza di due clusters principali: nel primo sono riunite le specie appartenenti al complesso *C. rudolphii*, *C. septentrionale*, *C. bioccai*, *C. variegatum* e *C. pelagicum*; nel secondo cluster sono invece raggruppate le specie appartenenti al complesso *C. multipapillatum*, *C. microcephalum*, *C. micropapillatum* e *Contracaecum* sp.. Nell'ambito del primo cluster è possibile osservare un'ulteriore suddivisione: un clade comprendente le specie *C. variegatum* e *C. pelagicum* e l'altro in cui sono presenti le specie del *C. rudolphii* complex, *C. septentrionale* e *C. bioccai*. All'interno del secondo cluster sono visibili tre cladi distinti: un clade comprende le specie del complesso *C. multipapillatum*, un altro riunisce le specie *C. microcephalum* e *C. micropapillatum*, mentre in un terzo clade si posiziona la specie *Contracaecum* sp.. I nodi ai legami con valori di bootstrap ≥ 60 sono ben supportati.

Sulla base della stessa distanza genetica (K2P), è stato realizzato un NJ (Fig. 3.5). La topologia ottenuta mediante NJ risulta essere identica a quella dell'UPGMA, con l'eccezione del legame tra le specie *C. bioccai*, *C. variegatum* e *C. pelagicum*; nel NJ infatti, le due specie *C. variegatum* e *C. pelagicum* formano un clade separato da *C. bioccai*. Tuttavia queste specie fanno parte di un cluster più ampio in cui si riscontrano anche le specie del complesso *C. rudolphii* e *C. septentrionale*. L'altro cluster principale che lega le specie del complesso *C. multipapillatum*, *C. microcephalum*, *C. micropapillatum* e *Contracaecum* sp., rimane invariato rispetto all'UPGMA.

Sulla base delle 89 sequenze nucleotidiche, è stato disegnato, inoltre, un network, utilizzando il programma NETWORK 4.0, realizzato sulla *Massima Parsimonia*. L'albero del network è rappresentato in figura 3.6. Il grafico mostra anche i vettori mediani, che rappresentano l'ipotetico "individuo ancestrale", mentre i rami, i cambiamenti evolutivi; in questo modo il network può essere interpretato come un mezzo per ricostruire la vera filogenesi dei campioni in esame (Morrison, 2005). Un network di questo tipo, mostra come rami separati, tutte le differenze nello stato dei "caratteri" tra i taxa (un ramo per ogni individuo) (Morrison, 2005). Il diagramma include, inoltre, una media di tutti gli alberi più "parsimoniosi". Anche in questo caso è possibile osservare una sostanziale congruenza con gli alberi ottenuti mediante gli altri metodi, con la sola incompatibilità del posizionamento della specie *Contracaecum* sp., che si inserisce tra le specie del complesso *C. rudolphii* e le specie geneticamente più affini ad essa (*C. variegatum*, *C. pelagicum* e *C. septentrionale*) e *C. bioccai*.

Le relazioni genetiche tra le specie analizzate, sono state studiate anche mediante analisi *Multi Dimensional Scaling* (MDS), utilizzando la matrice di distanza calcolata in precedenza per la distanza genetica *K-2parametri* (fig. 3.7). Si può osservare come sia mantenuto ben definito il raggruppamento delle specie del complesso *C. multipapillatum* e quelle del complesso *C. rudolphii* (insieme alle specie ad esso affini); le specie *C. variegatum* e *C. pelagicum* rimangono sostanzialmente vicine tra loro e al gruppo di specie geneticamente più affini. Si osserva inoltre che la specie *Contracaecum* sp., si posiziona in modo più distaccato rispetto a tutte le altre specie studiate, insieme a *C. microcephalum* e *C. micropapillatum*.

Fig. 3.4. UPGMA realizzato sulla base delle sequenze (519 bp del gene della *mtDNA cox-2*) tra gli esemplari appartenenti alle specie del genere *Contracaecum*; bootstrap su 1000 repliche. *P. ceticola* e *A. pegreffii* sono state incluse come outgroups.

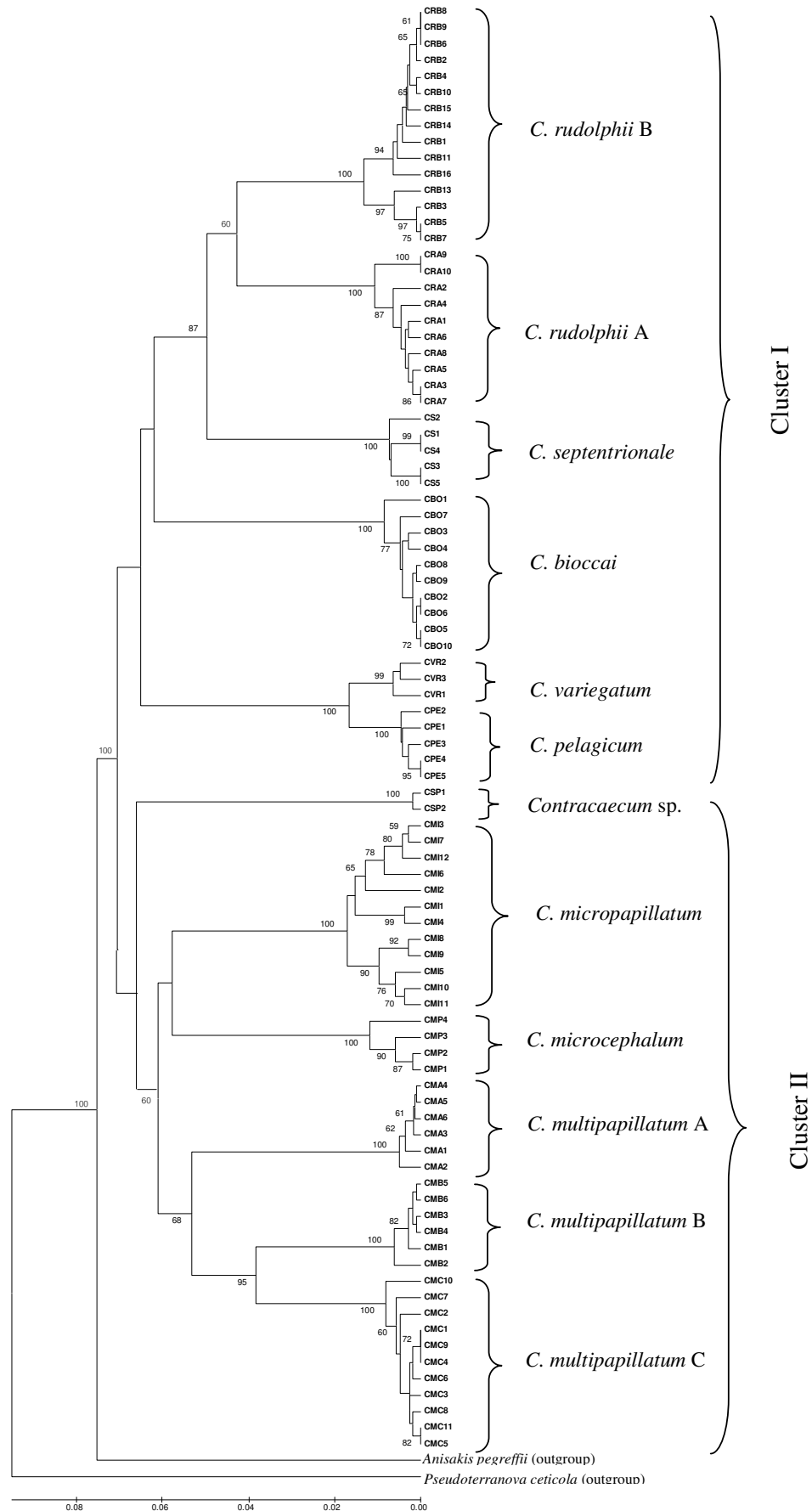


Fig. 3.5. NJ realizzato sulla base delle sequenze (519 bp del gene della *mtDNA cox-2*) tra gli esemplari appartenenti alle specie del genere *Contracaecum*; bootstrap su 1000 repliche. *P. ceticola* e *A. pegreffii* sono stati inclusi come outgroups..

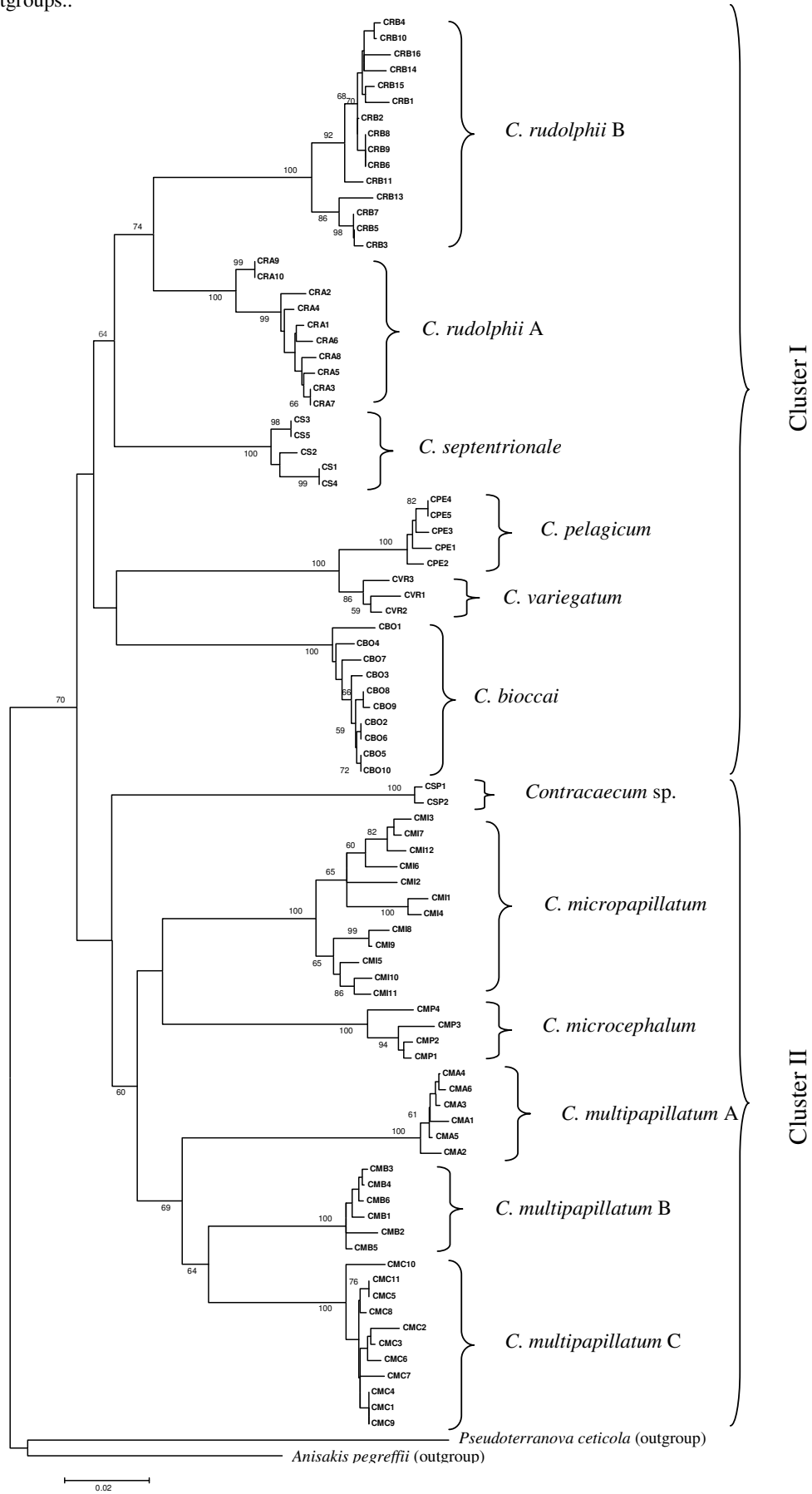


Fig. 3.6. Network (Forster *et al.*, 2001) realizzato sulla base delle 89 sequenze del gene della *cox-2* (519 bp della *mtDNA cox-2*) per una *Massima Parsimonia*; *Pseudoterranova ceticola* e *Anisakis pegreffii* sono stati inclusi come outgroups.

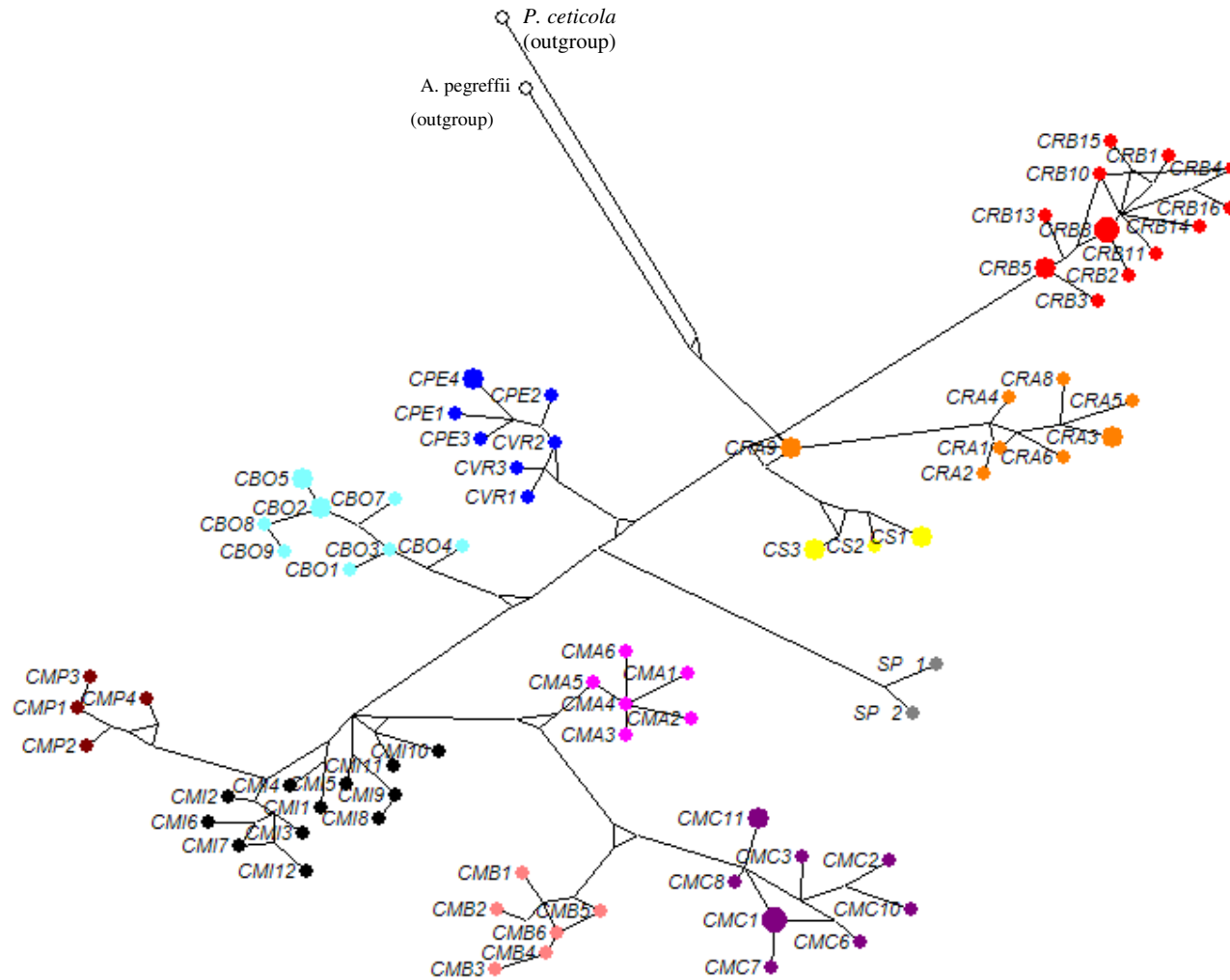
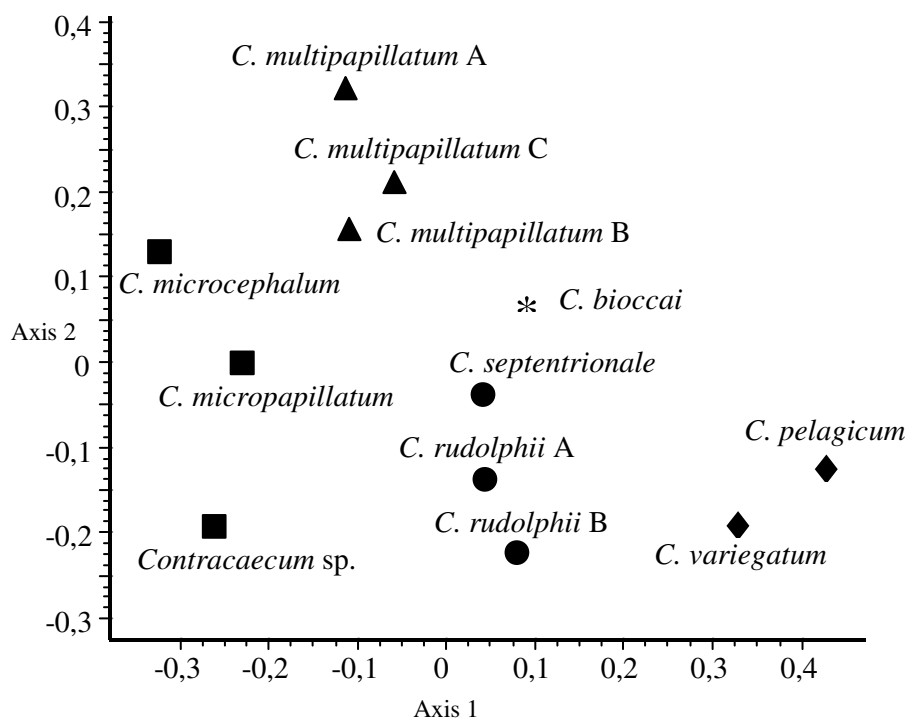


Fig. 3.7. *Multi Dimensional Scaling* (MDS) realizzata sulla base dei valori della matrice di distanza genetica Kimura-2parametri, ottenuta dall'analisi delle sequenze della *mtDNA cox-2* (519 bp) tra le specie di *Contracaecum* studiate.



3.6 Identificazione delle forme larvali

Le forme larvali di *Contracaecum* raccolte in *Mugil incilis* da Totumo (Nord della Colombia) (Tab. 2.1), sono state saggiate sia mediante marcatori nucleari (allozimi) che a livello mitocondriale (*cox-2*). Utilizzando i marcatori genetici ottenuti ai loci diagnostici riportati (Tab. 3.7 e Tab. 3.8), è stato possibile attribuire, su base allozimica, le larve (10) L₃ Type 2 (*sensu* Moravec, 1995), alla specie *C. multipapillatum* C. Analogamente, il sequenziamento della mtDNA *cox-2* di queste larve, ha permesso di ottenere gli stessi risultati. In figura 3.8 viene riportato l'allineamento delle sequenze ottenute per le forme larvali con quelle degli esemplari adulti precedentemente sequenziati. Per quanto riguarda, invece, gli esemplari (10) di larve L₃ Type 1 (*sensu* Moravec, 1995) campionate da *Anguilla anguilla* sia l'analisi allozimica che quella mitocondriale hanno permesso di attribuirle alla specie *C. rudolphii* A. L'allineamento delle sequenze ottenute per queste larve è mostrato in figura 3.9.

Fig. 3.8. Allineamento delle sequenze delle forme larvali campionate in *Mugil incilis* e degli esemplari adulti della specie *C. multipapillatum* C, ottenute dall'amplificazione del gene della mtDNA *cox-2*. L'assenza di * implica una o più basi differenti fra le sequenze riportate.

CMC9	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC4	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC1	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC7	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMCL1	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC11	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC5	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC8	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMCL3	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC6	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC3	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMCL2	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC2	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATACATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC10	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGCAGAGTTT
CMCL4	GTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT

CMC9	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMC4	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMC1	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMC7	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMCL1	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMC11	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMC5	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMC8	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMCL3	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMC6	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMC3	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMCL2	TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG

CMC2 TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMC10 TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
CMCL4 TTCCTACTTTGATTTTAGTTATGCAGATAATTCCTTCTTTAAGTTTGTGTATTATTATG
* * * * *

CMC9 GTTTAATGAACCTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC4 GTTTAATGAACCTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC1 GTTTAATGAACCTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC7 GTTTAATGAACCTTGGACAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMCL1 GTTTAATGAACCTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC11 GTTTAATGAATTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC5 GTTTAATGAATTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC8 GTTTGATGAATTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMCL3 GTTTAATGAATTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC6 GTTTAATGAACCTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC3 GTTTAATGAATTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMCL2 GTTTAATGAATTTAGATAGGAGCTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC2 GTTTAATGAATTTAGATAGGAGCTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMC10 GTTTAATGAATTTAGATAGGAGCTTGACAATTAAAGTTACTGGGCACCAGTGATATTGAA
CMCL4 GTTTAATGAATTTAGATAGGAGCTTGACAATTAAAGTTACTGGGCATCAGTGATATTGAA
* * * * *

CMC9 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC4 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC1 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC7 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMCL1 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC11 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC5 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC8 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMCL3 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC6 GTTATGAGTTTAGAGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC3 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGACC
CMCL2 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC2 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMC10 GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
CMCL4 GTTATGAGTTTAGGGATGTCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATAAAAGTCTTTGGATC
* * * * *

CMC9 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC4 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC1 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC7 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMCL1 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC11 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC5 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC8 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMCL3 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC6 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC3 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMCL2 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC2 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMC10 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
CMCL4 AGTTGGAGTTGGGGGAGCCCCGTCTTTTGGAAAGTGGATAATCGTTGTGTTATTCCCTTGTG
* * * * *

CMC9 ATACTAATATTTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMC4 ATACTAATATTTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMC1 ATACTAATATTTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMC7 ATACCAATATTTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMCL1 ATACTAATATTTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA

CMC11	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMC5	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMC8	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMCL3	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMC6	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMC3	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMCL2	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMC2	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMC10	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
CMCL4	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATCCATTCTTGGGCTTTGCCTA
	**** *
CMC9	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC4	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC1	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC7	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMCL1	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC11	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC5	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC8	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMCL3	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC6	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC3	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMCL2	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC2	GACCTTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMC10	GGCTCTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
CMCL4	GGCTCTCTATTAAATTGGATGCTATAAGTGGTATTTTGAGCACCTTGTCTTATAGTTTTTC
	* ** *
CMC9	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC4	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC1	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC7	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMCL1	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC11	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC5	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC8	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMCL3	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC6	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC3	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMCL2	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC2	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMC10	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
CMCL4	CTGTGGTTGGTGTTTTTTACGGGCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTTA
	***** *
CMC9	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC4	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC1	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC7	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMCL1	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC11	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC5	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC8	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMCL3	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC6	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC3	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMCL2	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC2	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC10	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMCL4	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA

Fig. 3.9. Allineamento delle sequenze di una larva da *Anguilla anguilla* e degli esemplari adulti della specie *C. rudolphii* A, ottenute dall'amplificazione del gene della mtDNA *cox-2*. L'assenza di * implica una o più basi differenti fra le sequenze riportate.

```

CRA3      GCTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRA7      GCTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRA5      GCTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRAL1     GCTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRA8      GCTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRA6      GCTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRA1      GCTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRA2      GTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRA4      GTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRA9      GTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
CRA10     GTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
*  *****

CRA3      TCCCGACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRA7      TCCCGACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRA5      TCCCGACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRAL1     TCCCGACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRA8      TCCCGACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRA6      TCCCGACTTTGATTTTGGTGATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRA1      TCCCGACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRA2      TCCCGACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRA4      TCCCGACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRA9      TCCCAACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
CRA10     TCCCAACTTTGATTTTGGTTATACAAATGATCCCTTCTTTAAGTTTACTTTATTATTATG
**** *****

CRA3      GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA7      GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA5      GTCTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRAL1     GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA8      GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA6      GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA1      GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA2      GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGCCATCAGTGGTATTGAA
CRA4      GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGGA
CRA9      GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA10     GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
** *****

CRA3      GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRA7      GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRA5      GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRAL1     GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRA8      GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRA6      GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRA1      GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRA2      GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRA4      GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRA9      GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
CRA10     GTTATGAGTTTAGGGATATCCCTGGTTTGGAGTTTGATTCTTATATGAAGTCTTTAGATC
*****

CRA3      AGTTAGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCTTGTTG
CRA7      AGTTAGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCTTGTTG
CRA5      AGTTAGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCTTGTTG

```

CRA1 AGTTAGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCCTTGTG
 CRA8 AGTTAGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCCTTGTG
 CRA6 AGTTAGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCCTTGTG
 CRA1 AGTTAGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCCTTGTG
 CRA2 AGTTAGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTACCGTGTG
 CRA4 AGTTAGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCCTTGTG
 CRA9 AGTTGGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCCTTGTG
 CRA10 AGTTGGAATTGGGGGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTGTTGTGCCCTTGTG
 ***** ** *****

CRA3 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA7 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA5 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA1 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA8 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA6 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA1 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA2 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA4 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA9 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 CRA10 ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCCA
 ***** *

CRA3 GGCTTTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGCGGTATTCTTAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA7 GGCTTTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGCGGTATTCTTAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA5 GGCTTTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGCGGTATTCTTAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA1 GGCTTTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGCGGTATTCTTAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA8 GGCTTTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGCGGCATTCTTAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA6 GGCTTTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTCTTAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA1 GGCTTTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTCTTAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA2 GGCTTTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTCTTAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA4 GGCTTTCTATTAAGTTAGATGCTATGAGTGGTATTCTTAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA9 GGCTTTCTATTAAGTTGGATGCTATGAGTGGTATTCTAAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC
 CRA10 GGCTTTCTATTAAGTTGGATGCTATGAGTGGTATTCTAAGGACTTTGTCTTATAGTTTTTC

CRA3 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA7 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA5 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA1 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA8 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA6 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA1 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA2 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA4 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA9 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 CRA10 CTATTGTGGGGGTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTTA
 ***** **

CRA3 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
 CRA7 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
 CRA5 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
 CRA1 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
 CRA8 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
 CRA6 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
 CRA1 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
 CRA2 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
 CRA4 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
 CRA9 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTTTGTTGGATAATTTTA
 CRA10 TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTTTGTTGGATAATTTTA

3.7 Descrizione morfologica della specie *C. bioccai*

Gli esemplari caratterizzati geneticamente e riferibili al nuovo taxon *C. bioccai*, sono stati anche analizzati morfologicamente. Di seguito ne viene riportata la descrizione.

Olotipo: esemplare maschio prelevato dallo stomaco di *P. occidentalis* (Totumo, Nord Colombia). Le regioni anteriori e posteriori dell'olotipo sono depositate al British Museum of Natural History di Londra.

Paratipi: tre maschi ed una femmina campionati dallo stesso ospite (*P. occidentalis*).

Sono stati inoltre esaminati altri tre maschi e tre femmine provenienti dallo stesso ospite definitivo.

Descrizione morfologica del nuovo taxon C. bioccai (da Mattiucci *et al.*, in corso di stampa)

La descrizione morfologica è stata effettuata su 7 maschi e 4 femmine. Il corpo è ricoperto da una cuticola striata trasversalmente. Sono presenti labbra dorsali e ventro-laterali con depressione mediale marcata sul margine superiore, “dentigerous ridges” assenti. Il labium dorsale presenta due papille; ogni labium ventro-laterale è dotato di una doppia papilla e di una papilla singola. Sono presenti interlabia, ben sviluppate e con la punta distintamente biforcata. L'esofago si presenta con un ventricolo globulare ridotto. Il ventricolo presenta un'appendice solida diretta posteriormente. E' inoltre presente un cieco intestinale. Il poro escretore è situato alla base delle labbra (Fig. 3.10).

Maschio: le misurazioni dell'olotipo sono riportate in parentesi. Tutte le misure, quando non indicate, sono espresse in mm. Lunghezza totale del corpo tra 21.00 e 27.00 (27.00); l'esofago misura in mm tra 4.10 e 4.80 (4.70) in lunghezza e tra 0.30 e 0.50 in larghezza (0.40). Appendice esofagea 0.60-0.90 (0.80); cieco intestinale 3.20-3.50 (3.4); Gli spicoli sono leggermente subuguali, con ali longitudinali; lo spicolo destro ha dimensioni che variano tra 5.80 e 6.20 (6.20), mentre il sinistro tra 6.00 e 6.50 (6.50); rapporto tra lunghezza degli spicoli e lunghezza del corpo presenta un intervallo che varia tra 1.32 e 1.40 (1.40); l'estremità distale dello spicolo è leggermente arrotondata e lunga 40 μm (40 μm); la lunghezza della coda varia tra 2.40 e 2.80 (2.50) con l'estremità distale arrotondata. Sono presenti numerose papille prossimali e disposte su una singola linea; si distinguono un paio di papille prossimali (p) laterali alla cloaca; 2 paia di papille paracloacali (pc); sono presenti 4 paia di papille distali (d) delle quali d1, d2 e d4 sono disposte secondo una linea longitudinale, mentre la d3 è disposta lateralmente alla d1. Le misure sono le seguenti: p = 10 (10) μm ; pc = 15 (15) μm ; d1 = 10 (10) μm ; d2 = 10 (10) μm ; d3 = 10 (10)

μm ; $d_4 = 10$ (10) μm . Le distanze tra le varie papille sono le seguenti: $d_1-d_2 = 30$ (30) μm ; $d_2-d_4 = 30$ (30) μm ; $d_1-d_4 = 60$ (60) μm ; $d_3-d_4 = 50-60$ (50) μm ; $d_1-d_3 = 30-40$ (40) μm ; l'intervallo della distanza tra pc e d3 è pari a 60 (60) μm . Un paio di papille molto piccole simili a fasmidi sono situate lateralmente a d4.

Femmina: le misurazioni sono riportate, in mm, su quattro esemplari. La lunghezza totale del corpo è 26.00-34.00; l'esofago 0.40 e 0.60, l'appendice ventricolare 0.60-0.90; la lunghezza del cieco varia tra 3.20 e 3.60; La vulva è situata nel primo terzo del corpo. Le uova sono subsferiche e presentano dimensioni che variano tra 0.040 e 0.050.

Caratteri morfologici distintivi: in accordo con i caratteri morfologici con valore diagnostico per le specie di *Contracaecum* parassite di uccelli ittiofagi (come ad esempio la lunghezza degli spicoli, la morfologia dell'estremità distale dello spicolo e la biforcazione della punta dell'interlabia) mantenute da Hartwich (1964), gli esemplari in nostro possesso, campionati in *P. occidentalis* nella Colombia del Nord, potrebbero essere assegnati a *C. rudolphii* (s.l.). Tuttavia, i marcatori genetico-molecolari qui utilizzati hanno dimostrato che gli individui saggiati appartengono ad un taxon ben distinto dalle specie gemelle precedentemente identificate come *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B.

Oltre all'ospite definitivo (*Ph. carbo sinensis*) in cui sono stati campionati gli esemplari saggiati in questo lavoro, *C. rudolphii* (s.l.) è stato riscontrato anche in altre specie di uccelli ittiofagi presenti in America centrale e meridionale, riportate di seguito: *Ph. brasiliensis* Gmelin, presente nel sud del Cile (Torres *et al.*, 2005), *Ph. auritus* (Lesson) (Fedynich *et al.*, 1997), *Ph. albiventer* (Lesson) sulle coste argentine, *Pelecanus occidentalis* (Courtney & Forrester, 1974) in Florida e Porto Rico (Dyer *et al.*, 2002). Inoltre sono state ritrovate altre specie di *Contracaecum* parassite di *P. occidentalis*, oltre gli individui campionati e analizzati in questo contesto, che includono *C. mexicanum* e *C. multipapillatum* (Dyer *et al.*, 2002) che sono facilmente distinguibili dal nuovo taxon per non avere una doppia papilla paraoccale (pc), per il pattern di distribuzione delle papille prossimali e per la lunghezza degli spicoli.

Deardoff e Overstreet (1980) hanno riportato la presenza di *C. microcephalum* nel *P. occidentalis* e nel *P. erythrorhynchos* (Gmelin) (Golfo del Messico) a volte in sintopia (nello stesso ospite definitivo) con *C. multipapillatum* (s.l.) e *C. rudolphii* (s.l.). Tuttavia, la nuova specie messa in evidenza in questo lavoro, in accordo con la lunghezza degli spicoli e con la presenza di interlabia distintamente biforcute, non può essere riconosciuta come *C. microcephalum* (*sensu* Hartwich, 1974; Barus *et al.*, 1978) dalla quale risulta bene differenziata anche geneticamente, sia a livello di allozimi che mitocondriale. Date le

caratteristiche precedentemente descritte, il nuovo taxon *C. bioccai* è morfologicamente differenziato anche dalla specie *C. variegatum* (*sensu* Hartwich, 1964; Barus *et al.*, 1978), per dimensione e aspetto degli spicoli, essendo molto più lunghi ed appuntiti nella loro estremità distale (§ 1.); *C. bioccai* è inoltre ben differenziata geneticamente da *C. variegatum*.

Tra queste specie definite da Hartwich (1964) e riconsiderate più tardi da Barus *et al.* (1978), la sola specie a cui gli esemplari campionati in *P. occidentalis* e qui riconosciuti come una nuova specie assomigliano di più, potrebbe essere *C. travassosi* Gutierrez 1943, descritto per la prima volta in *Ph. albiventer* (King) in Argentina; tale somiglianza è dovuta alla disposizione longitudinale delle papille distali (d1, d2, d3 e d4) sulla base della figura originale, e riportata anche da Morgan *et al.* (1949), per *C. travassosi* riscontrato in *Pandion haliaetus* Linnaeus, 1758, nel Nord America. Come riportato dalla descrizione originale data da Gutierrez (1943), la papilla paracloacale è doppia anche se nel disegno originale sembra essere costituita da due papille separate sebbene molto vicine l'una all'altra. Tuttavia una riesaminazione morfologica di un maschio paratipo di *C. travassosi* ha messo in evidenza che la lunghezza degli spicoli in *C. bioccai* è di 5.80-6.20 mm, cioè differente rispetto ai 9.3 nel paratipo *C. travassosi* (rapporto lunghezza del corpo/spicoli, 1.25 mm); inoltre, risultano differenti anche l'ospite definitivo e l'area geografica di provenienza. La nuova specie è anche morfologicamente distinta da *C. plagiaticum* Lent & Freitas, 1948, descritto in *Nycticorax nycticorax* in Uruguay; a conferma di quanto detto, una riesaminazione morfologica di un maschio paratipo di *C. plagiaticum* ha messo in evidenza che la nuova specie è morfologicamente differente per la lunghezza degli spicoli (5.80-6.20 mm nel nuovo taxon rispetto a 3.2 mm di *C. plagiaticum*).

Altre specie di *Contracaecum* che hanno una somiglianza con gli esemplari della nuova specie sono *C. pelagicum* Jonhston & Mawson, 1942, descritta in alcune specie di *Diomedea* in Australia e più tardi ritrovata anche negli albatross in Uruguay (Lent e Freitas, 1948), in *Spheniscus magellanicus* (Forster) del Brasile (Portes-Santos, 1984) e recentemente ridescritto in *S. magellanicus* e *Diomedea melanophris* (Temminck) in Argentina (Garbin *et al.*, 2007 in corso di stampa). Infatti, *C. bioccai* presenta spicoli più lunghi (5.80-6.20 mm) rispetto alla lunghezza di 4.3-4.50 mm in *C. pelagicum* e una differente morfologia dell'estremità distale degli spicoli; inoltre non corrisponde la distribuzione geografica data per questa specie. E' stato inoltre dimostrato che *C. bioccai* è anche geneticamente ben differenziata, sia a livello allozimico che mitocondriale, da *C.*

pelagicum campionato in *S. magellanicus* sulle coste argentine. Inoltre, è anche morfologicamente differente dalla specie *C. oschmarini* Mosgovoy, 1950, descritta in *Uria lomvia* (Linneaus) nell'Europa dell'Est e messa in sinonimia da Hartwich (1964), per quanto riguarda la lunghezza degli spicoli (5.80-6.20 in *C. bioccai* in confronto a 4.6-4.9 di *C. oschmarini*); anche in questo caso l'area geografica di reperimento e l'ospite definitivo sono differenti.

Infine, la nuova specie risulta morfologicamente differente dalle specie gemelle *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B essendo inferiore la lunghezza degli spicoli (5.80-6.20) rispetto a quella di *C. rudolphii* A (6.8-7.2) e *C. rudolphii* B (8.6-9.0) (Mattiucci, dati non pubblicati); altro carattere distintivo tra le tre specie è la disposizione delle papille distali d1, d2 e d4 che nella nuova specie sono disposte su una linea longitudinale, mentre la d3 è posizionata lateralmente alla d1, mentre in *C. rudolphii* A e B le papille distali sono disposte a formare un quadrilatero, essendo le papille d3 e d4 disposte lateralmente. Inoltre in *C. rudolphii* A la dimensione della papilla d2 è più piccola (0.5-0.6 μm) rispetto sia a *C. rudolphii* B che alla nuova specie (Mattiucci, dati non pubblicati).

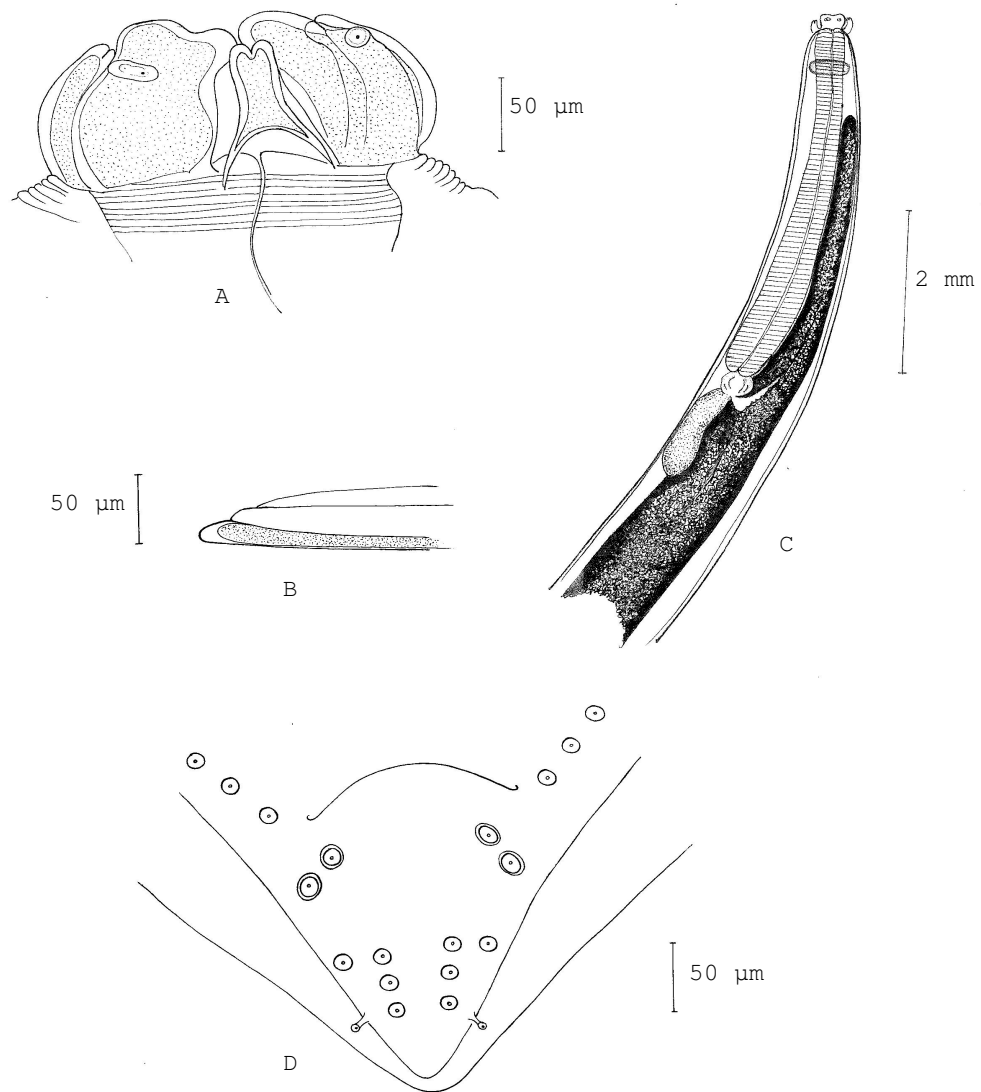


Fig. 3.10. *C. bioccai*; A= estremità cefalica, vista laterale; B= estremità distale dello sopitolo; C= estremità anteriore, vista dorsale; D= estremità caudale del maschio, vista ventrale; (da Mattiucci, in corso di stampa, disegno originale).

4. Discussione

4.1 Aspetti di sistematica molecolare

In questo lavoro è stato evidenziato come l'approccio genetico-molecolare sia fondamentale in questo gruppo di nematodi per riconoscere le specie biologiche. Da un lato l'elettroforesi multilocus (MAE) è in grado di determinare l'esistenza di specie biologiche poiché presenta il vantaggio di dimostrare l'esistenza di isolamento riproduttivo, anche in specie presenti in simpatria nello stesso ospite. D'altro canto il DNA mitocondriale (mtDNA) è estremamente efficace nel discriminare specie strettamente correlate, anche a livello di "sibling"; sebbene tale marcatore presenti delle limitazioni in quanto soggetto a saturazione di A+T (poiché, in generale, presenta un tasso di mutazione molto elevato) che lo rende non del tutto idoneo nell'evidenziare relazioni genetiche tra taxa al di sopra del livello di specie (Blouin *et al.*, 1998).

Entrambi i marcatori molecolari, però, hanno permesso di individuare geneticamente nuove specie appartenenti al genere *Contracaecum*, parassite allo stadio adulto di uccelli ittiofagi. Sia l'analisi MAE che l'analisi delle sequenze della mtDNA *cox-2*, hanno messo in evidenza l'esistenza di nuovi pools genici, corrispondenti a nuovi taxa. In particolare, essi hanno permesso di: a) individuare specie gemelle nell'ambito della specie *C. multipapillatum* (s.l.), denominate *C. multipapillatum* A, B e C; b) caratterizzare geneticamente due nuovi taxa, *C. bioccai* e *Contracaecum* sp.; c) caratterizzare sulla base di entrambi i marcatori, le specie *C. microcephalum*, *C. pelagicum*, *C. variegatum*, *C. septentrionale*, *C. micropapillatum*, *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B; d) stimare i livelli di differenziamento genetico tra le specie analizzate; e) studiarne le relazioni genetiche; f) individuare caratteri morfologici distintivi che hanno consentito la descrizione del nuovo taxon, *C. bioccai*.

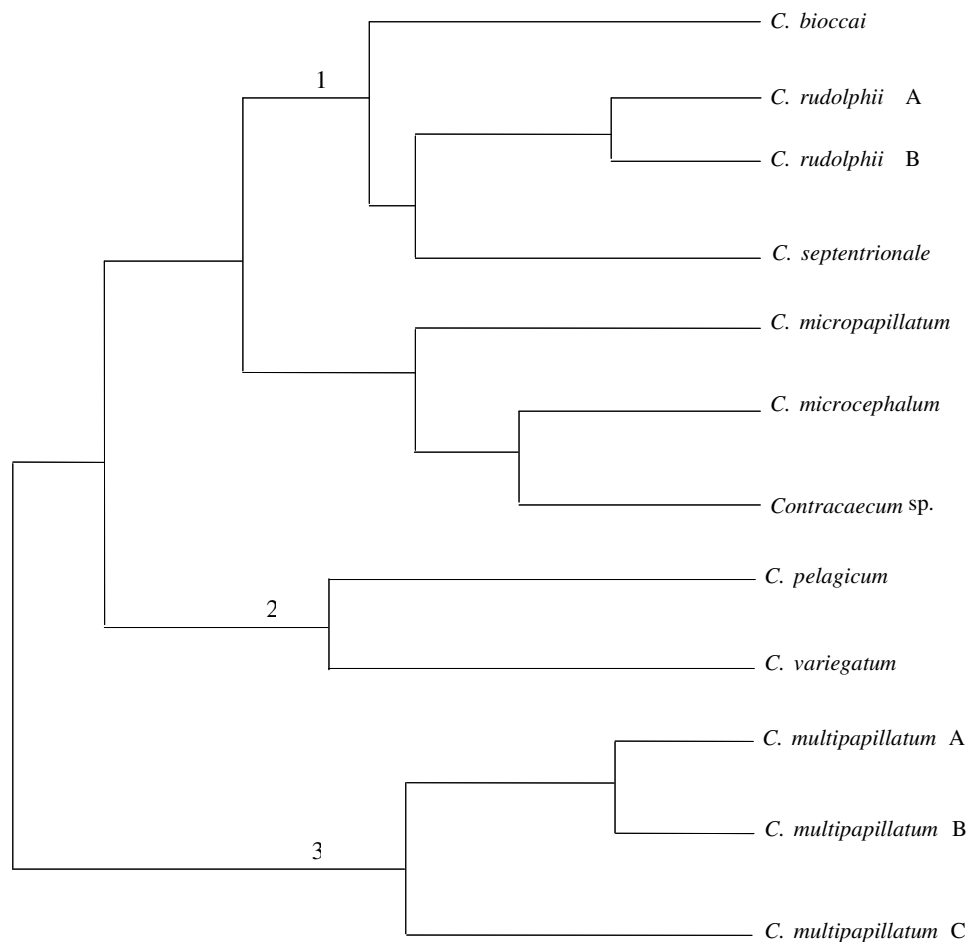
I livelli di differenziamento genetico ottenuti sia a livello nucleare che mitocondriale, per le specie del genere *Contracaecum* studiate in questo lavoro, sono risultati confrontabili con quelli ottenuti tra altri gruppi di nematodi anisakidi. Valori di divergenza genetica simili, ottenuti per le specie gemelle dei complessi *C. rudolphii* (es. *C. rudolphii* A versus *C. rudolphii* B $D_{Nei} = 0.31$ e $K2P = 0.09$) e *C. multipapillatum* (in media $D_{Nei} = 0.6$ e $K2P = 0.10$) sono stati osservati tra specie gemelle di altri nematodi anisakidi come quelle del complesso *Anisakis simplex* (es. *A. simplex* s.s. versus *A. pegreffii* $D_{Nei} = 0.40$ e $K2P = 0.05$), parassite di cetacei, o tra specie gemelle, sia

allopatriche che simpatriche, del complesso *C. osculatum* (in allopatria: *C. osculatum* A versus *C. osculatum* E $D_{Nei} = 0.20$ e $K2P = 0.09$; in simpatia: *C. osculatum* A versus *C. osculatum* B $D_{Nei} = 0.41$ e $K2P = 0.09$), parassite allo stadio adulto di pinnipedi (Nascetti *et al.*, 1993; Mattiucci *et al.*, 2006). Valori di differenziamento genetico più elevati che sono stati osservati, in questo lavoro, tra specie del genere *Contracaecum*, parassite di uccelli ittiofagi, morfologicamente anche distinte (es. *C. rudolphii* A versus *C. multipapillatum* A $D_{Nei} = 1.23$ e $K2P = 0.14$), sono analoghi a quelli riportati tra *A. typica* versus *A. pegreffii* ($D_{Nei} = 1.45$ e $K2P = 0.14$) (Mattiucci & Nascetti, 2006) e /o tra *C. osculatum* s.s. versus *C. margolisi* ($D_{Nei} = 1.42$ e $K2P = 0.15$) (Mattiucci *et al.*, 2003; 2006). Le analisi delle relazioni genetiche ottenute dai due marcatori sono risultati congruenti nell'evidenziare che le specie gemelle dei due complessi, *C. rudolphii* (s.l.) e *C. multipapillatum* (s.l.), appartengono a due clusters ben distinti (rispettivamente Clade 1 e Clade 3 in figura 4.1). L'UPGMA dai dati mitocondriali mostra una topologia, rispetto ai legami tra le specie sopra menzionate, del tutto simile a quella osservata nell'UPGMA ottenuta dai dati allozimici (Fig. 4.1). Tuttavia i dati risultano incongruenti riguardo alla posizione della specie *C. bioccai*, che risulta essere geneticamente più affine, su base mitocondriale, alle specie *C. pelagicum* e *C. variegatum*, anche se il legame non è supportato (Fig. 3.5); mentre la stessa specie, nell'UPGMA ottenuto dai dati elettroforetici (Fig. 3.4), si inserisce nel cluster unitamente a *C. septentrionale* e alle specie del complesso *C. rudolphii* (Clade 1, Fig. 4.1). Queste analisi mostrano, inoltre, che le due specie *C. variegatum* e *C. pelagicum* formano un clade ben distinto e supportato (Clade 2); tuttavia la posizione di queste due specie nell'UPGMA dalla mtDNA *cox-2*, all'interno del cluster comprendente le specie del complesso *C. rudolphii*, *C. bioccai* e *C. septentrionale*, non è supportata. Mentre nell'UPGMA ottenuto dagli allozimi le specie *C. microcephalum*, *C. micropapillatum* e *Contracaecum* sp. si inseriscono in un unico cluster unitamente alle specie del complesso *C. rudolphii*, a *C. bioccai*, *C. septentrionale*, *C. pelagicum* e *C. variegatum*, in quello ottenuto dalla mtDNA *cox-2* esse si posizionano nello stesso cluster delle specie del complesso *C. multipapillatum*, pur formando due clade separati, uno costituito dalle specie *C. microcephalum* e *C. micropapillatum* e l'altro da *Contracaecum* sp.; inoltre, la specie *Contracaecum* sp., nell'UPGMA ottenuto dall'analisi dei dati allozimici (Fig. 3.1), risulta geneticamente più affine alla specie *C. microcephalum*, mentre nel NJ ottenuto dall'analisi dei dati mitocondriali, forma un legame con *C. micropapillatum* (Fig. 3.4); tuttavia entrambi i valori di bootstrap ai rispettivi nodi del

legame sopramenzionato sono bassi (< 60), non consentendo di risolvere la posizione della specie *Contracaecum* sp. all'interno del NJ.

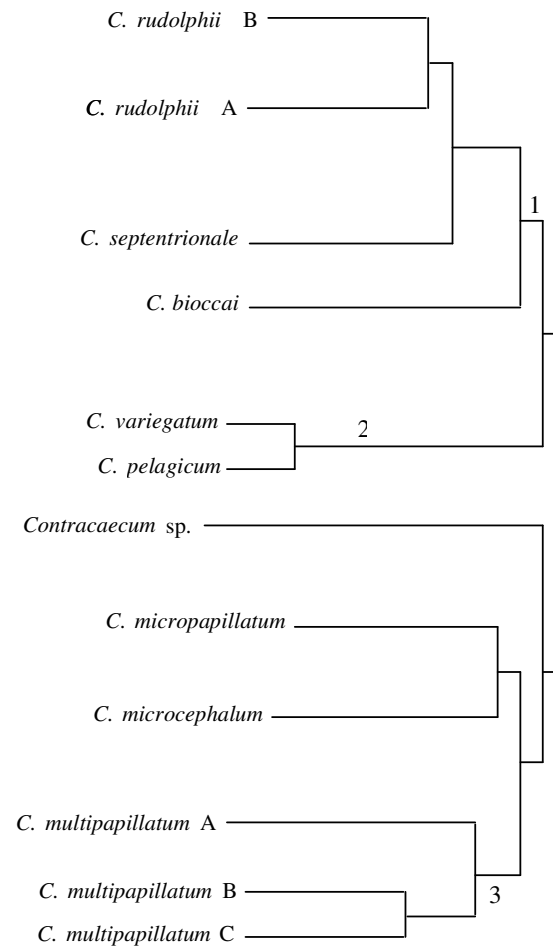
L'analisi multivariata delle frequenze alleliche e dell'analisi delle sequenze, mostrano raggruppamenti simili a quelli osservati nelle topologie precedentemente discusse. In entrambi i casi, è possibile notare la presenza di quattro raggruppamenti principali (Fig. 3.2, § 3.3 e Fig. 3.7, § 3.4). I gruppi ottenuti rispecchiano i quattro cladi ottenuti in tutte le elaborazioni eseguite per entrambi i tipi di marcatori (allozimi e mtDNA *cox-2*) (Fig. 3.1, § 3.3; Fig. 3.3, 3.4 e 3.5, § 3.4; Fig. 4.1, § 4.1): un gruppo comprende le specie del complesso *C. rudolphii*, *C. septentrionale* e *C. bioccai*; un altro raggruppamento include le specie *C. variegatum* e *C. pelagicum*; un terzo gruppo sembra rappresentato dalle specie del complesso *C. multipapillatum* (*C. multipapillatum* A, B e C); mentre le specie *C. micropapillatum*, *C. microcephalum* e *Contracaecum* sp. formano un raggruppamento ancora separato.

Fig. 4.1. UPGMA ottenuti dall'analisi dei dati allozimici (frequenze alleliche) e mitocondriali (sequenze del gene della mtDNA *cox-2*); i numeri si riferiscono ai cladi discussi nel testo



UPGMA realizzato dall'elaborazione delle frequenze alleliche ottenute per le 12 specie di *Contracaecum* studiate; l'albero è stato realizzato sulla base della distanza di Nei (D_{Nei} , 1972)

86



UPGMA realizzato dall'elaborazione delle sequenze ottenute dall'amplificazione del gene della *cox-2* del mtDNA; l'albero è stato realizzato sulla base della distanza di Kimura (K2P, 1980)

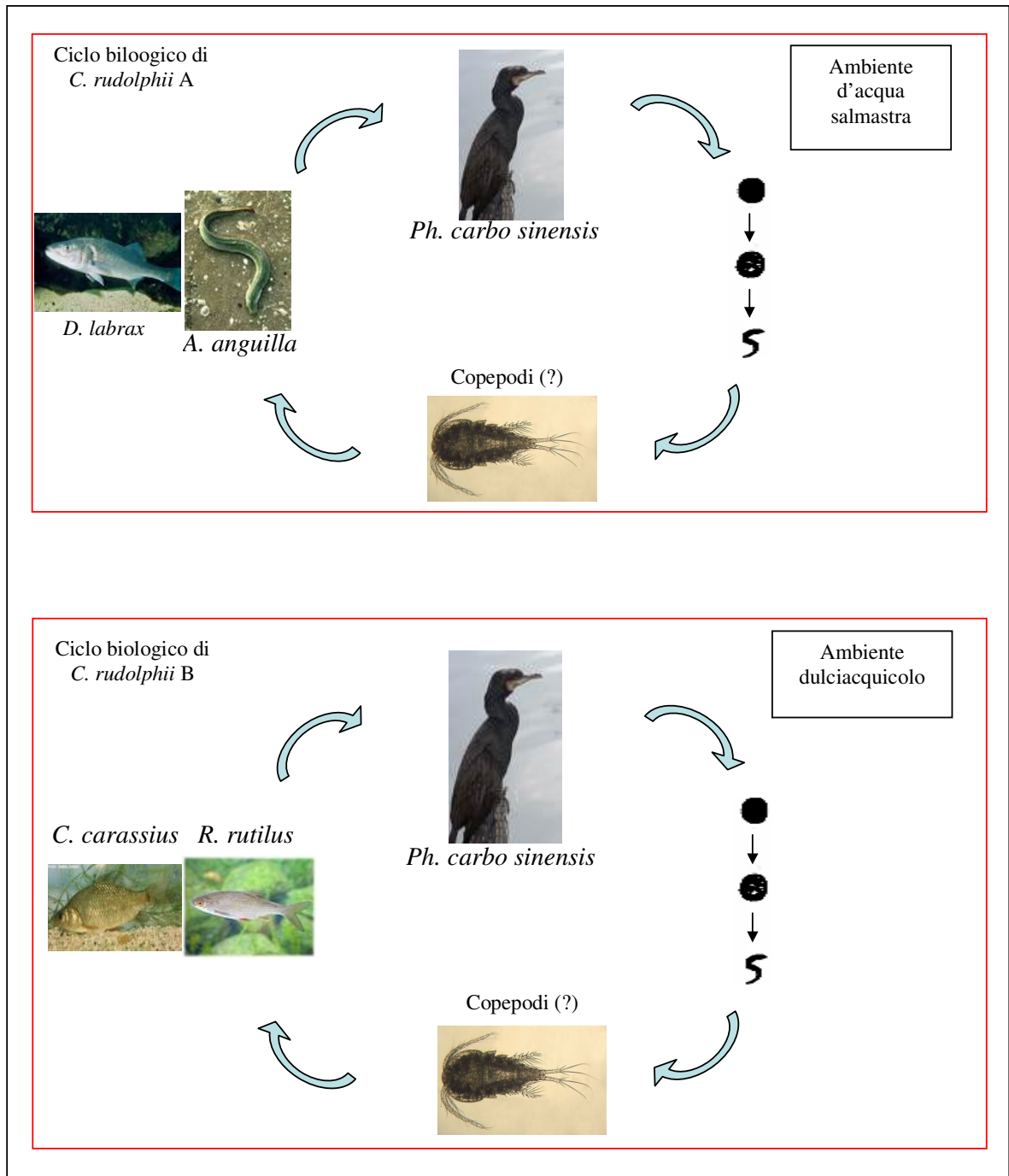
4.2 Aspetti ecologici

La caratterizzazione genetica, sia a livello allozimico che mitocondriale, delle specie del genere *Contracaecum* qui studiate e la possibilità di identificarle a livello specifico a qualsiasi stadio di sviluppo, ha permesso di chiarire anche aspetti ecologici riguardanti i loro cicli biologici, le preferenze verso diversi ospiti (definitivi e/o intermedi) e i loro areali di distribuzione.

La specie *C. rudolphii* B, ad esempio, è la sola specie gemella del complesso *C. rudolphii* identificata geneticamente in esemplari di cormorani di acque interne, come il Lago Matsury in Polonia, suggerendo che questa specie possa avere un ciclo biologico legato ad ambienti di acqua dolce, coinvolgendo alcune specie di copepodi, come primo ospite intermedio e pesci ciprinidi, quali secondi ospiti intermedi. A conferma di ciò, sono stati trovati pesci di acqua dolce come *Carassius carassius* e *Rutilus rutilus*, campionati nel Lago Matsury (Polonia) e parassitati da forme larvali di *C. rudolphii* B (Mattiucci, com. pers.). Ciò farebbe supporre che il ciclo biologico di *C. rudolphii* B sia adattato ad ambienti dulciacquicoli (Fig. 4.2).

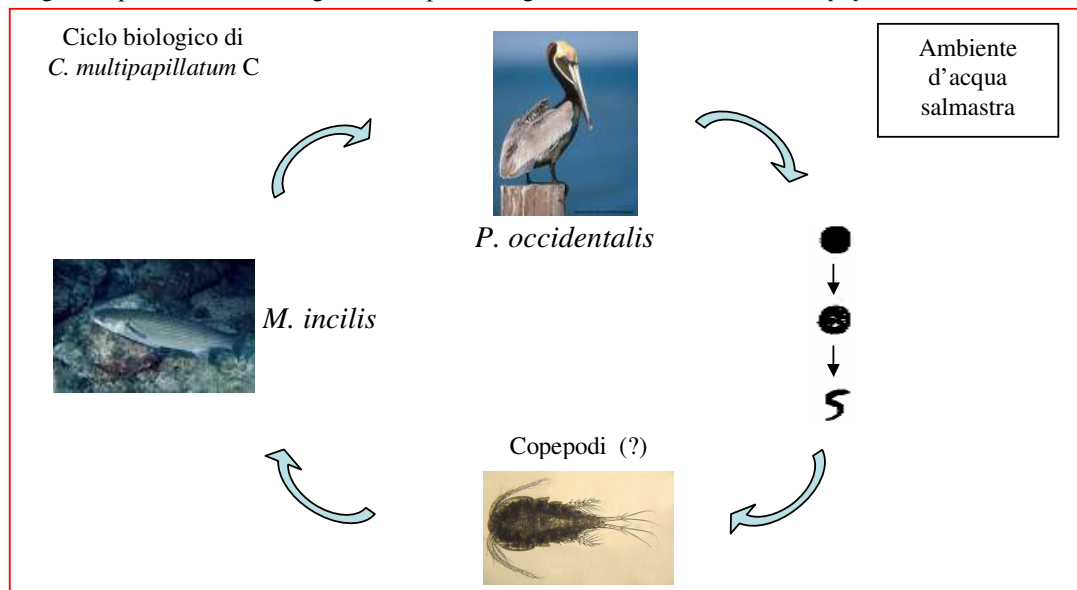
Al contrario, poiché in esemplari di *Anguilla anguilla* campionati nelle Saline di Tarquinia, sono state identificate larve di *C. rudolphii* A, ciò farebbe ipotizzare che il ciclo biologico di questa specie di *Contracaecum* si svolga in ambienti salmastri con coinvolgimento di ospiti intermedi quali specie di copepodi e pesci presenti in questi ambienti (*A. anguilla*, *Dicentrarchus labrax* e *Sparus auratus*) (Mattiucci *et al.*, 2002 e dati non pubblicati) (fig.4.2). D'altro canto, numerosi esemplari adulti corrispondenti a *C. rudolphii* A, sia nel corso di questa che in ricerche precedenti, sono stati identificati in cormorani campionati in numerose lagune costiere d'Italia (Laguna di Venezia, Burano, Laguna di Sabaudia, Oristano e Policoro) (Nascetti, 2000; Mattiucci *et al.*, 2002), suggerendo che la specie *C. rudolphii* A possa completare il suo ciclo biologico in aree salmastre del Mediterraneo. Allo stato attuale non sono state ancora ritrovate forme larvali di *C. rudolphii* B in specie ittiche di questi ecosistemi del Mediterraneo (Mattiucci *et al.*, 2002). D'altra parte, la presenza di *C. rudolphii* B in cormorani catturati in queste stesse aree, in sympatria con *C. rudolphii* A, farebbe supporre che *C. rudolphii* B, possa essere trasportata dal suo ospite definitivo (*Ph. carbo sinensis*) durante le migrazioni compiute da questo uccello ittiofago dal Nord-Europa.

Fig. 4.2. Ipotetici cicli biologici delle specie del genere *Contracaecum* *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B.



Inoltre, i dati qui riportati, sembrano indicare che il ciclo biologico della specie *C. multipapillatum* C in paludi costiere della Colombia (Totumo), coinvolga specie di ambiente salmastro. In particolare, il ciclo biologico di *C. multipapillatum* C coinvolgerebbe specie di copepodi e specie di pesci della famiglia Mugilidae, come *Mugil incilis*, in cui sono state identificate, in questa ricerca, forme larvali corrispondenti alla suddetta specie di *Contracaecum*, che mostra anche alti livelli di infestazione in questa specie ittica (Olivero-Verbel *et al.*, 2005) (fig. 4.3).

Fig. 4.3. Ipotetico ciclo biologico della specie del genere *Contracaecum* *C. multipapillatum* C.



4.3 Aspetti co-evolutivi

Uno degli obiettivi di questo lavoro era quello di evidenziare possibili aspetti co-evolutivi ospite-parassita tra le specie del genere *Contracaecum*, qui geneticamente caratterizzate, e i loro ospiti definitivi finora conosciuti. E' stato quindi indagato il possibile parallelismo tra le relazioni genetiche fra specie del genere *Contracaecum* e le relazioni genetiche, stabilite recentemente mediante marcatori molecolari, tra specie di uccelli, alcune delle quali ospiti definitivi delle specie di *Contracaecum* qui studiate. Le relazioni genetiche tra le specie di uccelli sono state recentemente analizzate sulla base della combinazione dei geni esone protooncogene *c-mos*, G-3PDH (Introne 11), 12s rRNA, tRNA^{Val}, 16s rRNA (Van Tuinen *et al.*, 2001). Queste relazioni mostrano (Fig. 4.3) che le specie di uccelli appartenenti alla famiglia Phalacrocoracidae costituiscono un clade distinto da quelle appartenenti alla famiglia Pelecanidae. Ad una prima analisi della relazione ospite-parassita, la topologia dell'albero relativo alle specie aviarie (Van Tuinen *et al.*, 2001) e il NJ ottenuto per i dati della mtDNA *cox-2* sulle specie di *Contracaecum* studiate (Fig. 3.1), mostra un parallelismo tra le specie del complesso *C. rudolphii* (*C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B), *C. septentrionale* (specie che sono state identificate in cormorani) e le specie di uccelli ittiofagi della famiglia Phalacrocoracidae.

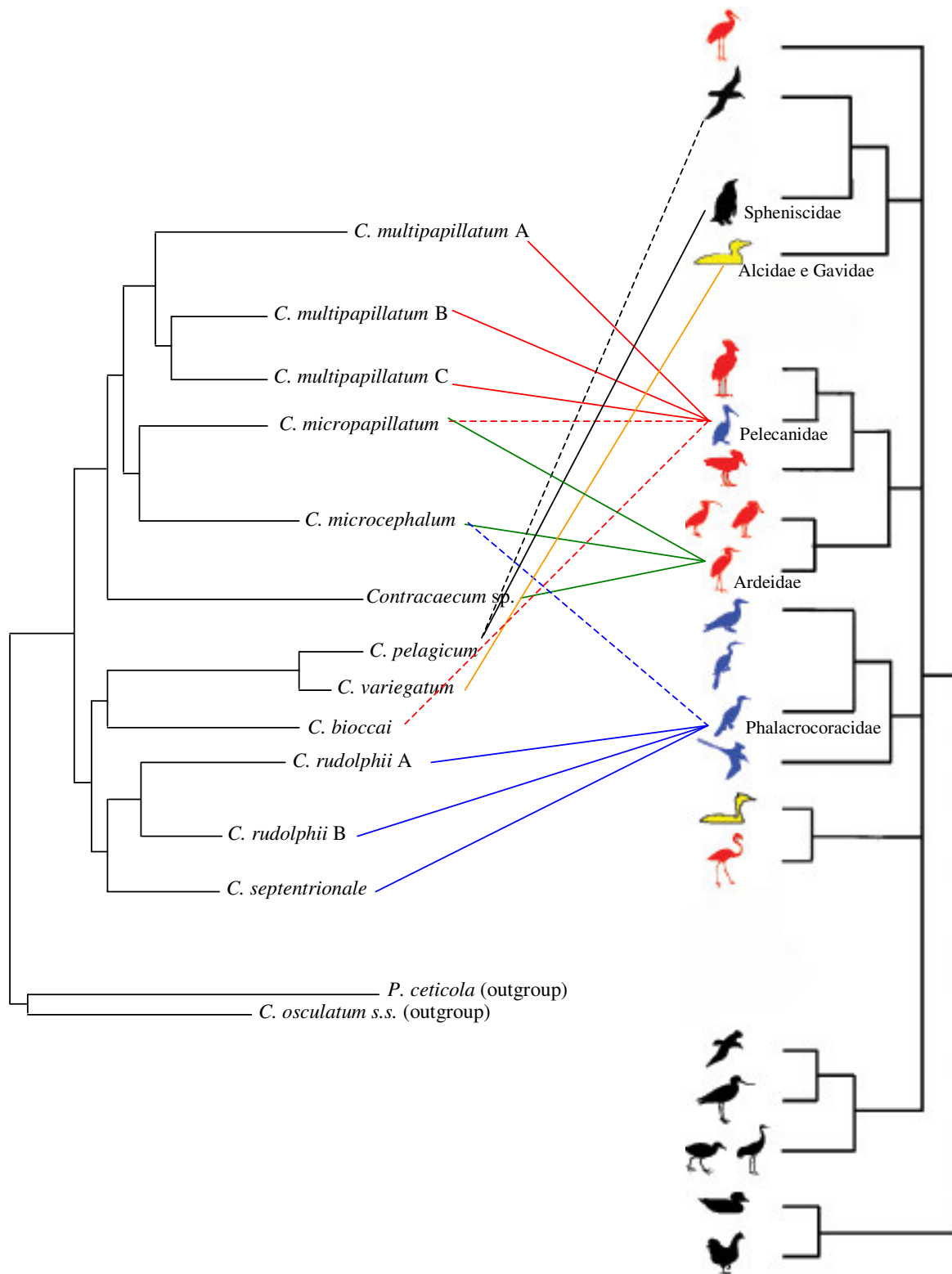
Il confronto tra gli alberi filogenetici relativi agli uccelli e alle specie di *Contracaecum* studiate, ha messo in evidenza anche un altro parallelismo tra la specie *C. multipapillatum* (*s.l.*), con le specie di uccelli della famiglia Pelecanidae; *C. multipapillatum* A e B infatti sono state campionate da *P. crispus*, mentre *C. multipapillatum* C, da *P. occidentalis*. Anche in questo caso si può osservare come la filogenesi degli uccelli riportata da Van Tuinen *et al.* (2001) concordi con quanto ottenuto in questo lavoro, sia dall'analisi nucleare che mitocondriale. Nel pelecanide *P. occidentalis*, sono stati campionati anche esemplari geneticamente riconosciuti come *C. bioccai*, specie che però non segue questo parallelismo rispetto alle altre specie di *Contracaecum* campionate in Pelecanidi (Fig. 4.3). Ciò potrebbe essere spiegato tenendo conto che il range di distribuzione di *P. occidentalis* è molto vasto, estendendosi da spiagge sabbiose a lagune e coste dell'America centrale; tale specie include nella sua dieta sia pesci di acqua dolce che salmastra aumentando così notevolmente le sue possibilità di infezione. D'altro canto, l'area di Totumo, nel nord della Colombia (dove sono stati campionati gli esemplari appartenenti alla specie *C. bioccai*), è un bacino d'acqua relativamente piccolo con un livello di salinità basso, frequentato da numerose altre specie di uccelli acquatici, incluse specie di cormorani dell'emisfero ovest, come *Ph. olivaceus* e *Ph. auritus* e altre specie di uccelli presenti in quest'area, che potrebbero rappresentare possibili

altri ospiti definitivi per *C. bioccai*. Riteniamo pertanto che la presenza di questa specie nel pellicano bruno, *P. occidentalis* possa rappresentare un “host switching” (Fig. 4.3).

Un altro possibile parallelismo è quello che si può evidenziare tra la specie indicata come *Contracaecum* sp. (campionata in *Ardea cinerea*) e *C. microcephalum* (riscontrata qui in *Ph. pygmaeus*, ma descritta originariamente anche in *Ardea cinerea*), e gli uccelli appartenenti alla famiglia Ardeidae (Fig. 4.3); la presenza di *C. microcephalum* nel piccolo cormorano *Ph. pygmaeus* potrebbe, anche in questo caso, rappresentare un “host switching”.

Infine, anche le due specie *C. pelagicum* e *C. variegatum*, reperite qui rispettivamente in uccelli delle famiglie Spheniscidae e Alcidae, sembrano appartenere ad un clade separato come quello formato dai loro rispettivi ospiti definitivi (Fig. 4.3); questo clade però, non viene supportato al legame filogenetico definito su base molecolare per le specie degli uccelli, come è possibile osservare in figura.4.3.

Fig. 4.3. Confronto fra relazioni filogenetiche tra le specie del genere *Contracaecum* studiate (a sinistra) (NJ ottenuto dall'analisi delle sequenze della mtDNA *cox-2*) e tra specie di uccelli, loro ospiti definitivi (a destra) (albero filogenetico ottenuto dalla combinazione di sequenze amplificate per i geni G3PDH (introne 11), 12s rRNA, tRNA^{Val}, e 16s rRNA da Van Tuinen *et al.*, 2001).



5. Considerazioni conclusive

La combinazione dei risultati dei due marcatori (MAE e mtDNA), ha permesso di: *i*) caratterizzare geneticamente 12 specie del genere *Contracaecum*, parassite di uccelli ittiofagi; *ii*) chiarire aspetti del ciclo biologico di alcune specie di *Contracaecum* studiate in questo lavoro, quali *C. rudolphii* A e B e *C. multipapillatum* C; *iii*) determinare, in parte, la distribuzione geografica delle specie di *Contracaecum* finora caratterizzate geneticamente anche in relazione agli areali di distribuzione dei loro ospiti definitivi.

I risultati ottenuti dall'analisi delle relazioni filogenetiche mediante MAE e mtDNA *cox-2*, si sono dimostrati congruenti nell'evidenziare l'esistenza di due clusters ben distinti (Fig. 3.1 § 3.3; Fig. 3.3, 3.4 e 3.5, § 3.4); tutte le elaborazioni, infatti, mostrano la presenza di due raggruppamenti principali: l'uno comprendente sempre le specie *C. rudolphii* A e B e la specie *C. septentrionale* (molto ben supportato) e l'altro in cui compaiono sempre le specie *C. multipapillatum* A, B e C (ugualmente ben supportato). Anche i livelli di differenziamento genetico, sia a livello allozimico che della mtDNA *cox-2*, osservati tra questi due complessi di specie, sono molto alti (*C. rudolphii* (*s.l.*) versus *C. multipapillatum* (*s.l.*), in media $D_{Nei} = 1.12$ e $K2P = 0.14$). Questi valori sono confrontabili con quelli osservati per altre specie di nematodi anisakidi (specie del genere *Anisakis*, in cetacei e specie di *Contracaecum*, in pinnipedi), caratterizzate geneticamente in precedenza (§ 4.1) (Valentini *et al.*, 2005; Mattiucci *et al.*, 2006). La netta separazione tra i due clusters, ottenuta su base genetico-molecolare, risulta evidente anche a livello morfologico allo stadio adulto, avendo le specie di *C. rudolphii* (*s.l.*) alcuni caratteri morfologici ben distinti (patterns di distribuzione delle papillae paracloacali, morfologia a lunghezza degli spicoli, ecc.) da quelle del complesso *C. multipapillatum* (*s.l.*) (§ 1.1). Inoltre, questi due complessi di specie mostrano un morfotipo larvale nettamente distinto (§ 1.1.1); è stato dimostrato, infatti, in questo lavoro, che il morfotipo larvale Type 1 caratterizza le specie del complesso *C. rudolphii* (*s.l.*), mentre il Type 2, caratterizza quelle del complesso *C. multipapillatum* (*s.l.*).

Le elaborazioni ottenute dall'analisi dei due marcatori utilizzati presentano, tuttavia, incongruenze per le posizioni occupate da alcune specie di *Contracaecum* studiate, a livello mitocondriale e/o allozimico (Fig. 3.1, 3.3, 3.4 e 3.5, § 3.4). Un'incongruenza è rappresentata dalla posizione filogenetica delle specie *C. pelagicum* e *C. variegatum* che mostrano valori di differenziamento genetico ($K2P = 0.03$) paragonabili a quelli che si ottengono per complessi di specie gemelle in altre specie di anisakidi (Matejusova *et al.*, 2001) e che, pertanto, potrebbero rappresentare due "sibling". Anche la somiglianza a livello morfologico sembra

avvalorare tale ipotesi. I valori di differenziamento genetico a livello mitocondriale potrebbero essere spiegati con la loro relativamente recente divergenza, in seguito ad un evento di “host switching”. Queste posizioni, come abbiamo visto, non sono mai molto ben supportate e necessitano pertanto di essere analizzate con altri marcatori e su altre popolazioni e/o specie.

I risultati ottenuti mostrano, inoltre, un possibile parallelismo nell’associazione ospite-parassita tra famiglie di uccelli ittiofagi e specie di *Contracaecum* (Fig. 4.3, § 4.3). Sono stati evidenziati infatti, possibili fenomeni di co-speciazione tra le specie di *Contracaecum* del complesso *C. rudolphii* e della specie *C. septentrionale* e i Phalacrocoracidi e le specie del complesso *C. multipapillatum* e i Pelecanidi, mentre possibili eventi di “host switching” potrebbero aver accompagnato la storia evolutiva di *C. bioccai*, *C. microcephalum* e *C. micropapillatum*. Ulteriori specie di *Contracaecum*, campionate in altri ospiti definitivi, potranno eventualmente chiarire questi fenomeni co-evolutivi che, d’altro canto, sono stati già documentati in altri nematodi anisakidi, come le specie del genere *Anisakis* e i cetacei (loro ospiti definitivi) e specie di *Contracaecum/Phocascaris* e specie di pinnipedi e otarie (loro ospiti definitivi) (Valentini *et al.*, 2005; Mattiucci & Nascetti, 2006; Nascetti *et al.*, 1993; Orecchia *et al.*, 1994; Mattiucci *et al.*, 1998; Paggi *et al.*, 2000).

Nel corso di questo studio sono stati calcolati i valori di diversità genetica a livello allozimico; i valori stimati al parametro *He* (eterozigosi media attesa) sono risultati molto elevati, in generale, in *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B e simili a quelli riportati in altri nematodi anisakidi (Mattiucci *et al.*, 1997a). Questa elevata diversità può essere legata alla vagilità dell’ospite definitivo (*Ph. carbo sinensis*) di *C. rudolphii* A e *C. rudolphii* B, che ha un areale di distribuzione molto ampio. Per contro, gli alti livelli di diversità genetica possono essere correlati all’elevata dimensione di popolazione osservata per questi nematodi, nei loro ospiti definitivi. Infatti, alti livelli di infestazione (prevalenza, P=100% e abbondanza, A~200-500 individui per ospite) vengono generalmente osservati in questi uccelli ittiofagi. L’elevata dimensione di popolazione dei parassiti, a sua volta, è correlata all’alto numero di esemplari delle popolazioni degli ospiti. Infatti, in questi ultimi anni, le popolazioni di cormorani hanno subito un significativo incremento numerico in tutta Europa, legato a progetti di conservazione di queste specie di uccelli. Ciò fa sì che elevate dimensioni di popolazioni degli ospiti mantengano elevate le dimensioni delle popolazioni di parassiti con una conseguente riduzione dei fenomeni di deriva genetica dei loro pools genici.

Inoltre, la stima della diversità genetica e i livelli di infestazione delle specie di *Contracaecum* studiate potrebbe risultare utile nell’utilizzare queste specie di nematodi come

indicatori biologici, con particolare riguardo allo stato delle reti trofiche di ecosistemi marini, salmastri e dulciacquicoli, come già osservato per altre specie di nematodi anisakidi, quali quelle del genere *Pseudoterranova* e *Contracaecum* (parassiti allo stadio adulto di pinnipedi) delle regioni Artiche ed Antartiche (Mattiucci *et al.*, 1997b; Mattiucci & Nascetti, 2007).

APPENDICE A

Allineamento delle sequenze ottenute dall'amplificazione del gene della *Cox-2* degli individui di *Contraecaecum*, parassiti allo stadio adulto, di uccelli ittiofagi.

CMA4	GTTTTTATTTTAAAAGAAAGAAAATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMA6	GTTTTTATTTTAAAAGAAAGAAAATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMA3	GTTTTTATTTTAAAAGAAAGAAAATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMA5	GTTTTTATTTTAAAAGAAAGAAAATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMA1	GTTTTTATTTTAAAAGAAAGAAAATTGAGTATCAGTTTGGGGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMA2	GTTTTTATTTTAAAAGAAAGAAAATTGAGTATCAATTTGGGGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMB3	GTTTTTATTTTAAGAGGAAGAAGATCGAGTATCAGTTTGGAGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMB4	GTTTTTATTTTAAGAGGAAGAAGATCGAGTATCAGTTTGGAGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMB6	GTTTTTATTTTAAGAGGAAGAAGATCGAGTATCAGTTTGGAGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMB1	GTTTTTATTTTAAGAGGAAGAAGATCGAGTATCAGTTTGGAGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMB5	GTTTTTATTTTAAGAGGAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGAGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMB2	GTTTTTATTTTAAGAGGAAGAAGATCGAGTATCAGTTTGGAGAGCTTTTATGTAGGGTTT
CMC1	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC9	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC4	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC2	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATACATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC3	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC6	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC11	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC5	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC8	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC7	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGTAGGGTTT
CMC10	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGAGAGCTTTTGTGCAGAGTTT
CMI1	GTTTCTATTTTAAGAGAAAAAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAACTTTATGTAGTGTTT
CMI4	GTTTCTATTTTAAGAGAAAAAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAACTTTATGTAGTGTTT
CMI3	GTTTCTATTTTAAGAGAAAAAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAACTTTATGTAGTGTTT
CMI7	GTTTCTATTTTAAGAGAAAAAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAACTTTATGTAGTGTTT
CMI12	GTTTCTATTTTAAGAGAAAAAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAACTTTATGTAGTGTTT
CMI6	GTTTCTATTTTAAGAGAAAAAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAACTTTATGTAGTGTTT
CMI2	GTTTCTATTTTAAGAGAAAAAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAACTTTATGTAGTGTTT
CMI8	GTTTCTATTTTAAGAGAAAGAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAACTTTATGTAGTGTTT
CMI9	GTTTCTATTTTAAGAGAAAGAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CMI10	GTTTCTATTTTAAGAGAAAGAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CMI11	GTTTCTATTTTAAGAGAAAGAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CMI5	GTTTCTATTTTAAGAGAAAGAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CMP2	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAGTTGTTATGTAGTGTTT
CMP1	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTTT
CMP3	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAAGATTGAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTTT
CMP4	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAATATCAGTTTGGGGAGCTGTTATGTAGTGTTT
SPB1	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAATATCAATTTGGTGAGCTTTTGTGTAGTGTTT
SPB2	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAATATCAATTTGGTGAGCTTTTGTGTAGTGCT
CBO2	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CBO6	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CBO5	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CBO10	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CBO8	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CBO9	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CBO3	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CBO7	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CBO4	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CBO1	GTTTTTATTTTAAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAGCTTTTATGTAGTGTTT
CVR1	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGTGAACTTTATGTAGTGTTT
CVR2	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGTGAACTTTATGTAGTGTTT
CVR3	GTTTTTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTATCAATTTGGTGAACTTTATGTAGTGTTT
CPE4	GTTTCTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAGTTTGGTGAACTTTATGTAGTGTTT
CPE5	GTTTCTATTTTAAGAGTAAGAAGATTGAGTACCAGTTTGGTGAACTTTATGTAGTGTTT

[illegible]

<i>A.pegreffii</i>	TTCCTACTTTAATTTTGGTTGCTCAGATGGTGCCTTCTTTGAGTTTACTTTATTATTATG
<i>P.ceticola</i>	TCCCGACTTTGATTTTGGTGGCTCAGATAGTGCCTTCTTTAAGTCTTCTTTACTATTATG
	* *

CMA4	GTTTGATAAACTTGGATAGTAGTTTGACTATTAAAGTCACTGGGCACCAAGTGGTATTGGA
CMA6	GTTTGATAAACTTGGATAGTAGTTTGACTATTAAAGTCACTGGGCACCAAGTGGTATTGGA
CMA3	GTTTGATAAACTTGGATAGTAGTTTGACTATTAAAGTCACTGGGCACCAAGTGGTATTGGA
CMA5	GTTTGATAAACTTGGATAGTAGTTTGACTATTAAAGTCACTGGGCACCAAGTGGTATTGGA
CMA1	GTTTGATAAACTTGGATAGTAGTTTGACTATTAAAGTCACTGGGCACCAAGTGGTATTGGA
CMA2	GTTTGATAAACTTGGATAGTAGTTTGACTATTAAAGTCACTGGGCACCAAGTGGTATTGGA
CMB3	GTTTAATGAACCTGGATAGTAGCTTGACGGTTAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMB4	GTTTAATGAACCTGGATAGTAGCTTGACGGTTAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMB6	GTTTAATGAATCTGGATAGTAGCTTGACGGTTAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMB1	GTTTAATGAATCTGGATAGTAGCTTGACGGTTAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMB5	GTTTAATGAATCTGGATAGTAGCTTGACGGTTAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMB2	GTTTAATGAATCTGGATAGTAGCTTGACGGTTAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CMC1	GTTTAATGAACCTAGATAGGAGTTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC9	GTTTAATGAACCTAGATAGGAGTTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC4	GTTTAATGAACCTAGATAGGAGTTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC2	GTTTAATGAATTTAGATAGGAGCTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC3	GTTTAATGAATTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC6	GTTTAATGAACCTAGATAGGAGTTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC11	GTTTAATGAATTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC5	GTTTAATGAATTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC8	GTTTGATGAATTTAGATAGGAGTTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC7	GTTTAATGAACCTGGACAGGAGTTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMC10	GTTTAATGAATTTAGATAGGAGCTTGACAATTAAGGTTACTGGGCACCAAGTGATATTGAA
CMI1	GTTTGATGAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCACCAATGGTATTGAA
CMI4	GTTTGATGAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCACCAATGGTATTGAA
CMI3	GTTTGATGAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCACCAATGGTATTGAA
CMI7	GTTTGATGAATTTGGACAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCACCAATGGTATTGAA
CMI12	GTTTGATGAATTTGGACAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCACCAATGGTATTGAA
CMI6	GTTTGATGAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGTCACCAATGGTATTGAA
CMI2	GTTTGATGAATTTGGACAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCACCAATGGTATTGAA
CMI8	GTTTGATGAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCATCAATGGTATTGGA
CMI9	GTTTGATGAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCATCAATGGTATTGGA
CMI10	GTTTGATGAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCATCAATGGTATTGGA
CMI11	GTTTGATGAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCATCAATGGTATTGGA
CMI5	GTTTGATGAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACCGGGCATCAATGGTATTGGA
CMP2	GGTTGATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTTAAGGTTACTGGGCATCAGTGGTATTGAA
CMP1	GGTTGATAAAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACTGGGCATCAGTGGTATTGAA
CMP3	GGTTGATAAAATTTGGACAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACTGGGCATCAGTGGTATTGAA
CMP4	GGTTGATAAAATTTGGATAGGAGTTTGACTGTTAAGGTTACTGGGCATCAGTGGTATTGAA
SPB1	GTTTAATGAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTTAAGGTGGTGGGCCATCAATGGTACTGAA
SPB2	GTTTAATGAACCTGGATAGTAGTTTAACTGTTAAGGTGGTGGGCCATCAATGGTACTGAA
CBO2	GTTTAATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CBO6	GTTTAATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CBO5	GTTTAATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CBO10	GTTTAATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CBO8	GTTTAATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CBO9	GTTTAATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CBO3	GTTTAATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CBO7	GTTTAATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CBO4	GTTTAATAAAATTTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CBO1	GTTTAATAAAATCTGGATAGAAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGATATTGGA
CVR1	GTTTAATAAAATTTGGATAGTAGTCTTACGGTGAAGGTTACAGGTCATCAATGGTATTGAA
CVR2	GTTTAATAAAATTTGGATAGTAGTCTTACGGTGAAGGTTACAGGTCATCAATGGTATTGAA
CVR3	GTTTAATAAAATTTGGATAGTAGTCTTACGGTGAAGGTTACAGGCCATCAATGGTATTGAA
CPE4	GTTTAATAAAATTTGGACAGTAGTCTTACGGTGAAGGTTACGGGTCATCAATGATATTGAA
CPE5	GTTTAATAAAATTTGGACAGTAGTCTTACGGTGAAGGTTACGGGTCATCAATGATATTGAA
CPE3	GTTTAATAAAATTTGGACAGTAGTCTTACGGTGAAGGTTACGGGTCATCAATGATATTGAA
CPE1	GTCTAATAAAATTTGGACAGTAGTCTTACGGTGAAGGTTACGGGTCATCAATGATATTGAA
CPE2	GTTTAATAAAATTTGGACAGTAGCCTTACGGTGAAGGTTACGGGTCATCAATGATATTGAA

CS1	GTTTGATAAATCTTGATAGTAGTTTGACTGTAAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CS4	GTTTGATAAATCTTGATAGTAGTTTGACTGTAAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CS2	GTTTGATAAATCTTGATAGTAGTTTGACTGTAAAGGTTACTGGCCATCAATGGTATTGAA
CS3	GTTTGATAAATCTTGATAGTAGTTTGACTGTAAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CS5	GTTTGATAAATCTTGATAGTAGTTTGACTGTAAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRA3	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA7	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA5	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA8	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA1	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA6	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA4	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGGA
CRA2	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGCCATCAGTGGTATTGAA
CRA9	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRA10	GTTTGATAAACCTTGATAGTAGTTTGACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGAA
CRB9	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB6	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB8	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB2	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB4	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB10	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB16	GTTTAATAAACCTTGACAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB14	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAAACCGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB15	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB1	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB11	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB5	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB7	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB3	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
CRB13	GTTTAATAAACCTTGATAGTAGTTTAACTGTGAAGGTTACTGGTCATCAATGGTATTGAA
<i>A.pegreffii</i>	GTTTGATGAATCTTGATAGTAATTTAACTGTTAAAGTTACTGGTCATCAGTGGTATTGGA
<i>P.ceticola</i>	GTTTGATAAACCTTGACAGAAACCTAACTGTTAAGGTAACCGGACATCAGTGGTATTGAA
	* * * * *

CMI10	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTACCTA
CMI11	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTACCTA
CMI5	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTGATCCATTCTTGGGCTTTACCTA
CMP2	ATACTAATATCCGGTTTTTGTATTACGTCGGGGGATGTGATTCAATCTTGGGCTTTACCTA
CMP1	ATACTAATATCCGGTTTTTGTATTACGTCGGGGGATGTGATTCAATCTTGGGCTTTACCTA
CMP3	ATACTAATATCCGGTTTTTGTATTACGTCGGGGGATGTGATTCAATCTTGGGCTTTACCTA
CMP4	ATACTAATATCCGGTTTTTGTATTACGTCAGGGGATGTGATTCAATCTTGGGCTTTACCTA
SPB1	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCGA
SPB2	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCGA
CBO2	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CBO6	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CBO5	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CBO10	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CBO8	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CBO9	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CBO3	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CBO7	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CBO4	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CBO1	ACACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGTGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CVR1	ATACCAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGCGATGTGATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
CVR2	ATACCAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGCGATGTGATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
CVR3	ATACCAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGTGACGTGATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
CPE4	ATACCAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGTGATGTGATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
CPE5	ATACCAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGTGATGTGATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
CPE3	ATACCAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGTGATGTGATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
CPE1	ATACCAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGTGATGTGATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
CPE2	ATACCAATATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGTGATGTGATCCATTCTTGAGCTTTGCCTA
CS1	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CS4	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CS2	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCTGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CS3	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCCGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CS5	ATACTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCCGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTACCTA
CRA3	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRA7	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRA5	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRA8	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRA1	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRA6	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRA4	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRA2	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRA9	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRA10	ATACTAATATCCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCA
CRB9	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACTTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCTA
CRB6	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACCTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCTA
CRB8	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACCTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCTA
CRB2	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACCTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCTA
CRB4	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACCTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCA
CRB10	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACCTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCA
CRB16	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACCTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCTA
CRB14	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACCTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCTA
CRB15	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACCTCGGGGGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCTA
CRB1	ATACTAACATTCGTTTTTGTATTACCTCGGGCGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCTA
CRB11	ATACTAACATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCTA
CRB5	ATACTAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCA
CRB7	ATACTAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCA
CRB3	ATACTAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGTGATGTTATCCACTCTTGAGCTTTGCCA
CRB13	ATACTAATATTCGTTTTTGTATCACTTCGGGCGATGTTATTCACTCTTGAGCTTTGCCA
<i>A.pegreffii</i>	ATATTAATGTTTCGTTTTTGTATTACTTCGGGGGATGTTATTCATTCTTGGGCTTTGCCTA
<i>P.ceticola</i>	ATATTAATATTCGTTTTTGTATTACTTCCGGGGATGTGATTCACTCTTGAGCTTTGCCA
	* * * * *

CMA4	GATTGTCTATTAAGTTAGATGCTATAAGTGGTATTTTGGTACTTTGTCTTATAGGTTTC
CMA6	GATTGTCTATTAAGTTAGATGCTATAAGTGGTATTTTGGTACTTTGTCTTATAGGTTTC

[illegible]

CMP2	CTGTTGTTGGTGTTTTTTATGGGCAATGTTCTGAGATTTGTGGTGCAAATCATAGTTTTA
CMP1	CTGTTGTTGGTGTTTTTTATGGGCAATGTTCTGAGATTTGTGGTGCAAATCATAGTTTTA
CMP3	CTGTTGTTGGTGTTTTTTATGGGCAATGTTCTGAGATTTGTGGTGCAAATCATAGTTTTA
CMP4	CTGTTGTTGGTGTTTTTTATGGGCAGTGTTCTGAGATTTGTGGTGCAAATCATAGTTTTA
SPB1	CTGTGGTGGGGGTTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGGGCAAACCATAGTTTTA
SPB2	CTGTGGTGGGGGTTTTTTATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGGGCAAACCATAGTTTTA
CBO2	CTGTTGTAGGTGTTTTTTACGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAATCACAGTTTTA
CBO6	CTGTTGTAGGTGTTTTTTACGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAATCACAGTTTTA
CBO5	CTGTTGTAGGTGTTTTTTACGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAATCACAGTTTTA
CBO10	CTGTTGTAGGTGTTTTTTACGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAATCACAGTTTTA
CBO8	CTGTTGTAGGTGTTTTTTACGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAATCACAGTTTTA
CBO9	CTGTTGTAGGTGTTTTTTACGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGGGCTAATCACAGTTTTA
CBO3	CTGTTGTAGGTGTTTTTTACGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
CBO7	CTGTTGTAGGTGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAATCACAGTTTTA
CBO4	CTGTTGTAGGTGTTTTTTACGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
CBO1	CTGTTGTAGGTGTTTTTTACGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
CVR1	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGCTTTA
CVR2	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGCTTTA
CVR3	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGCTTTA
CPE4	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGCTTTA
CPE5	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGCTTTA
CPE3	CTATTGTGGGAGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGCTTTA
CPE1	CTATTGTGGGGGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGCTTTA
CPE2	CTATCGTGGGAGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGCTTTA
CS1	CCCTTGTTGGGGGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGAGATTTGTGGCGCTAATCATAGTTTTA
CS4	CCCTTGTTGGGGGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGAGATTTGTGGCGCTAATCATAGTTTTA
CS2	CTCTTGTTGGGGGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGAGATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTA
CS3	CTCTTGTTGGGGGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGAGATTTGTGGCGCTAATCATAGTTTTA
CS5	CTCTTGTTGGGGGTTTTTTATGGTCAGTGTTCTGAGAGATTTGTGGCGCTAATCATAGTTTTA
CRA3	CTATTGTGGGGGTTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRA7	CTATTGTGGGGGTTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRA5	CTATTGTGGGGGTTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRA8	CTATTGTGGGGGTTTTTTACGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRA1	CTATTGTGGGGGTTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRA6	CTATTGTGGGGGTTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRA4	CTATTGTGGGGGTTTTTTACGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRA2	CTATTGTGGGGGTTTTTTATGGCCAGTGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRA9	CTATTGTGGGGGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRA10	CTATTGTGGGGGTTTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRB9	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB6	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB8	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB2	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB4	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB10	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB16	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGCGCTAACCACAGTTTTA
CRB14	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB15	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB1	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGCCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB11	CTATTGTAGGAGTTTTTTACGGTCAATGCTCGGAAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
CRB5	CTATTGTAGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCGGAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRB7	CTATTGTAGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCGGAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRB3	CTATTGTAGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCGGAATTTGTGGTGCTAACCATAGTTTTA
CRB13	CTATTGTAGGAGTTTTTTATGGTCAATGTTTCGGAATTTGTGGTGCTAACCACAGTTTTA
<i>A.pegreffii</i>	CTACTGTAGGTGTGTTTTATGGTCAATGTTTCAGAGATTTGTGGGGCTAACCATAGTTTTA
<i>P.ceticola</i>	CTACTGTGGGTGTGTTATATGGTCAGTGCTCTGAAATTTGTGGGGCCAATCATAGTTTTA
	* *
CMA4	TGCCTATTGCTTTAGAAAGTTACTTTGATAGATAAATTTTA
CMA6	TGCCTATTGCTTTAGAAAGTTACTTTGATAGATAAATTTTA
CMA3	TGCCTATTGCTTTAGAAAGTTACTTTGATAGATAAATTTTA
CMA5	TGCCTATTGCTTTAGAAAGTTACTTTGATAGATAAATTTTA
CMA1	TACCTATTGCTTTAGAAAGTTACTTTGATAGATAAATTTTA

CMA2	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTGATAGATAATTTTA
CMB3	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGATGGATAATTTTA
CMB4	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGATGGATAATTTTA
CMB6	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGATGGATAATTTTA
CMB1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGATGGATAATTTTA
CMB5	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGATGGATAATTTTA
CMB2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGATGGATAATTTTA
CMC1	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC9	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC4	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC2	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC3	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC6	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC11	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC5	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC8	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC7	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMC10	TGCCTATTGCTTTGGAAGTTACTTTAATGGATAATTTTA
CMI1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMI4	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMI3	TGCCCCATTGCCTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMI7	TGCCCCATTGCCTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMI12	TGCCTATTGCCTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMI6	TGCCCCATTGCCTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMI2	TGCCCCATTGCCTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMI8	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMI9	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMI10	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGCTGGATAATTTTA
CMI11	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGCTGGATAATTTTA
CMI5	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMP2	TACCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMP1	TACCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CMP3	TACCTATTGTTTTGGAGGTTACCTTGTTGGATAATTTTA
CMP4	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTGTTGGATAATTTTA
SPB1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
SPB2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CBO2	TGCCTATTGCTTTAGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CBO6	TGCCTATTGCTTTAGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CBO5	TGCCTATTGCTTTAGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CBO10	TGCCTATTGCTTTAGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CBO8	TGCCTATTGCTTTAGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CBO9	TGCCTATTGCTTTAGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CBO3	TGCCTATTGCTTTAGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CBO7	TGCCTATTGCTTTAGAGGTTACTTTGTTGGATAATTTTA
CBO4	TACCTATTGCTTTAGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CBO1	TGCCCCATTGCTTTAGAGGTTACTTTATTGGATAATTTTA
CVR1	TGCCAATTGCTTTGGAAGTAACCTTGTTGGATAATTTTA
CVR2	TGCCAATTGCTTTGGAAGTAACCTTGTTGGATAATTTTA
CVR3	TGCCAATTGCTTTGGAAGTAACCTTGTTGGATAATTTTA
CPE4	TGCCAATTGCTTTGGAAGTAACCTTGTTAGATAATTTTA
CPE5	TGCCAATTGCTTTGGAAGTAACCTTGTTAGATAATTTTA
CPE3	TGCCAATTGCTTTGGAAGTAACCTTGTTAGATAATTTTA
CPE1	TGCCAATTGCTTTGGAAGTAACCTTGTTAGATAATTTTA
CPE2	TGCCAATTGCTTTGGAAGTAACCTTGTTAGATAATTTTA
CS1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTGTTGGATAATTTTA
CS4	TGCCTATTGCTTTGGAGGTAACCTTGTTGGATAATTTTA
CS2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTTGTTGGATAATTTTA
CS3	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTTGTTGGATAATTTTA
CS5	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTTGTTGGATAATTTTA
CRA3	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
CRA7	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
CRA5	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
CRA8	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA

CRA1	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
CRA6	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
CRA4	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
CRA2	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTCTCTTGGATAATTTTA
CRA9	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTTTGTTGGATAATTTTA
CRA10	TGCCTATTGCTTTGGAGGTGACTTTGTTGGATAATTTTA
CRB9	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB6	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB8	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB2	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB4	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB10	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB16	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB14	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB15	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB1	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB11	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB5	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB7	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB3	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
CRB13	TACCTATTGCTTTGGAGGTAACTTTGTGGATAATTTTA
<i>A.pegreffii</i>	TGCCCATTGCTTTGGAAGTGACTTTGTTGGATAATTTTA
<i>P.ceticola</i>	TGCCCATTGCTCTGGAAGTTACTTTATTAGATAATTTTA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *

LAVORI CONSULTATI

- Abollo E., Gestal C., Pascual S., 2001. Anisakid infection in the European shag *Phalacrocorax aristotelis aristotelis*. *J. Helminthol.*, 75: 209-214.
- Allendorf F.W. & Utter F.M., 1979. Population genetics. In *Fish physiology*, edited by W.S. Hoar, D.J. Randall and J.R. Brett. New York, *Academic Press*, 8:407-54.
- Ardizzone G.D. & Corsi F., 1997. Atlante delle risorse ittiche demersali dei mari italiani. *Atl. Ital. Dem. Fish. Res. Trawl surveys 1985 - 1987*. Erredi grafica, Genova, 479 pp.
- Arduino P., Nascetti G., Cianchi R., Plotz J., Mattiucci S., D'Amelio S., Paggi L., Orecchia P., Bullini L., 1995. Isozyme variation and taxonomic rank of *Contracaecum radiatum* from the Antarctic Ocean (Nematoda, Ascaridoidea). *Syst. Parasitol.*, 30: 1-9.
- Ass M.J., 1961. The life cycle of nematodes of the genus *Contracaecum*. *Trudi Karadagskoi Biolog. Stant.*, 17: 110-112.
- Aura R.L., Valtonen E.T., Andersin A.B., 1990. On the acanthocephalan infection in some glacial relict crustaceans in Finland. *Ann.s Zool.i Fenn.*, 27: 245-251.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigl J.E., Reeb C.A., Saunders N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. and Syst.*, 18: 489-522.
- Avise J.C., Saunders N.C., 1984. Hybridization and introgression among species of sunfish (genus *Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*, 108: 237-255.
- Barus V., Sergeeva T.P., Sonin M.D., Ryzhikov K.M., 1978. Helminths of fish-eating birds of the Palearctic region. I. *Nem. Ac.*, Prague: pp. 318.
- Berland B., 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, 2: 1-50.

- Beveridge I. & Chilton N.B., 2001. Co-evolutionary relationships between the nematode subfamily Cloacininae and its macropoid marsupial hosts. *Int. J. Parasitol.*, 31(9) : 976-996.
- Blouin M.S., Yowell A.C., Courtney C.H., Dame J.B., 1998. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Mol. Biol. and Evol.*, 15: 1719-1727.
- Bouillon D.R. & Dempson J.B., 1989. Metazoan parasite infections in landlocked and anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*, Linnaeus) and their use as indicators of movement to sea in young anadromous charr. *Can. J. Zool.*, 67: 2478-2485.
- Brawn W.M., George M.Jr., Wilson A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 967-1971.
- Brewer G.J. & Sing C.F., 1970. An introduction to isozyme techniques. *Academic Press*.
- Bullini L., Nascetti G., Paggi L., Orecchia P., Mattiucci S., Berland B., 1986. Genetic variation of ascaridoid worms with different life cycles. *Evolution*, 40: 437-440.
- Bullini L., Arduino P., Cianchi R., Nascetti G., D'amelio S., Mattiucci S., Paggi L., Orecchia P., Plotz J., Smith J.H., Bratney J., 1997. Genetic and ecological research on Anisakid endoparasites of fish and marine mammals in the Antarctic and Arctic-Boreal regions. *Antar. Comm.: Species, Structure and Survival*. Edited by Battaglia, Valencia and Walton: 39-44.
- Bullini L., Pignatti S., Virzo De Santo A., 1998. *Ecologia generale*. Ed. UTET, Torino, 1998, pp. 520.
- Casey J. & Pereiro J., 1995. European hake (*M. merluccius*) in the north-east Atlantic (pp. 125-147). In: J. Alheit and T. J. Pitcher (Eds.) *Hake: Biology, fisheries and markets*. Chapman & Hall, London. 478 pp.

- Cavalli-Sforza L.L. & Edwards A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Gen.*, 19: 233-257.
- Chapman R.W., Stephens J.C., Lansman R.A., Avise J.C., 1982. Models of mitochondrial DNA transmission genetics and evolution in higher eucaryotes. *Genet. Res.*, 40: 41-57.
- Cimmaruta R., Bondanelli P., Nascetti G., 2005. Genetic structure and environmental eterogeneity in the European hake (*Merluccius merluccius*). *Mol. Ecol.*, 14 (8): 2577-2591.
- Courtney C.H., Forrester D., 1974. Helminth Parasites of the Brown Pelican in Florida and Lousiana. *Proc. Helminth. Soc. Washington*, 41: 89-93.
- Criscione C.D., Poulin R., Blouin M.S., 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol. Ecol.*, 14: 2247-2257.
- D'Amelio S., Nascetti G., Mattiucci S., Cianchi R., Orecchia P., Paggi L., Berland B., Bullini L., 1990. Ricerche elettroforetiche su alcune specie del genere *Contracaecum*, parassiti di uccelli ittiofagi (Ascaridida: Anisakidae). *Parassitologia*, 32 (Suppl. 1): 77.
- Deardoff T.L., & Overstreet R.M., 1980. *Contracaecum multipapillatum* (= *C. robustum*) from fishes and birds in the northern Gulf of Mexico. *J. Parasitol.*, 66: 853-856.
- Deljamure S.L., 1955. *Helminthofauna of marine mammals (Ecology and Phylogeny)*, Ed. Skrjabin, *Academy of Sciences U.S.S.R.* National Technical Information Service, U.S. Departmet of Commerce, Springfield.
- Desdevises Y., Morand S., Jousson O., Legendre P., 2002. Coevolution between *Lamellodiscus* (Monogenea: Diplectanidae) and Sparidae (Teleostei): the study of a complex host-parasite system. *Evolution*, 56(12): 2459-2471.
- Dezfuli B.S., Volponi S., Feltrami I., Poulin R., 2002. Intra- and interspecific density-dependent effects on growth in helminth parasites of the cormorant, *Phalacrocorax carbo sinensis*. *Parasitology*, 124: 537-544.

- Dyer W.G., Williams E.H., Mignucci-Giannoni A.A., Jimenez-Marrero N.M., Bunkley-Williams L., Moore D.P., Pence D.B., 2002. Helminth and arthropod parasites of the brown pelican, *Pelecanus occidentalis*, in Puerto Rico, with a compilation of all metazoan parasites reported from this host in the Western Hemisphere. *Av. Path.*, 31 (5): 441-448.
- Fagerholm H.P. & Gibson D.I., 1987. A redescription of the pinniped parasite *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda, Ascaroidea), with an assesment of its antiboreal circumpolar distribution. *Zool. Scr.*, 16: 19-24.
- Fagerholm H.P., 1998. Intra-specific variability of the morphology in a single population of the seal parasite *Contracaecum osculatum* (Rudolphi) (Nematoda: Ascaroidea), with a description of the species. *Zool. Scripta*, 18: 33-41.
- Fagerholm H., Overstreet R.M., Humphrey-Smith I., 1996. *Contracaecum magnipapillatum* (Nematoda: Ascaroidea): resurrection and pathogenic effect of a common parasite from the proventriculus of *Anous minutus* from the Great Barrier Reef, with a note on *C. variegatum*. *Helminthologia*, 33: 195-207.
- Farris J.S., 1972. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Amer. Natural.*, 106: 645-668.
- Fedynich A.M., Pence D.B., Bergan J.F., 1997. Helminth community structure and pattern in sympatric population of Double-Crested and Neotropic cormorants. *J. Helminthol. Soc. Washington*, 64: 176-218.
- Felsenstein J., 1973. Maximum Likelihood and Minimum-Steps Methods for Estimating Evolutionary Trees from Data on Discrete Characters. *Syst. Zool.*, 22 (3): 240-249.
- Felsenstein J., 1981. Skepticism towards Santa Rosalia, or why are there so few kinds of animals? *Evolution*, 35: 124-138.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

- Felsenstein J. & Kishino H., 1993. Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies? A reply to Hills and Bull. *Sist. Biol.*, 42: 193-200.
- Fiorentini L., Caddy J.F., de Leiva J.I., 1997. Long and short-term trends of Mediterranean fishery resources. *FAO Studies and Reviews, Gen. Fish. Coun. Medit.*, 69: 72.
- Fitch W.M. & Farris J.S., 1974. Evolutionary trees with minimum nucleotide replacements from amino acid sequences. *J. Mol. Evol.*, 3: 263-278.
- Forster P., Torroni A., Renfrew C., Röhl A., 2001. Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol. Biol. Evol.* 18:1864-1881.
- Garbin L.E., Navone G.T., Diaz J.I., Cremante F., 2007. Further studies of *Contracaecum pelagicum* (Nematoda: Anisakidae) in *Spheniscus magellanicus* (Aves: Spheniscidae) from two Southwest Atlantic coast sites. *J. Parasitol.* (in corso di stampa).
- Gibson D.I., 1972. Flounder parasites as biological tags. *J. Fish Biol.*, 4: 1-9.
- Gutierrez R.O., 1943. Sobre la morfología de una nueva especie de *Contracaecum* (Nematoda: Ascaroidea). *Rev. Brasil. Biol.*, 3: 159-172.
- Gyllesten U., Wharton D., Wilson A.C., 1985. Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *J. Hered.*, 76: 321-324.
- Harris H., 1966. Enzyme polymorphism in man. *Proc. Royal Soc. London.*, Ser. B, 164: 298-310.
- Harris H., & Hopkinson D.A., 1976 *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. North-Holland, Amsterdam.
- Hartwich G., 1964. Revision der vogelparasitischen Nematoden Mitteleuropas II.- Die Gattung *Contracaecum* Railliet and Henry, 1912 (Ascaridaidea). *Mitteil. Zool. Museum in Berlin*, 40: 15-53.

- Hartwich G., 1974. *Keys to genera of the Ascaridoidea*. In: Anderson, R.C., Chabaud, A.G., Wilmott, S. (Eds.), *CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates*. Farnham Royal, Commonwealth Agricultural Bureau, Richmond, p. 153.
- Hills D.M. & Bull J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42: 182-192.
- Hu M., & Gaser R.B., 2006. Mitochondrial genomes of parasitic nematodes: progress and perspectives. *Trends in Parasitol.*, 22: 78- 84.
- Hugall A., Stanton J., Moritz C., 1997. Evolution of the AT-rich mitochondrial DNA of the root knot nematode, *Meloidogyne hapla*. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 40-48.
- Huizinga H.W., 1966. Studies on the life cycle and development of *Contracaecum spiculigerum* (Rudolphi, 1809) (Ascaroidea: Heterocheilidae) from marine piscivorous birds. *J. Elisa Mitchell Sci. Soc.*, 82: 180-195.
- Huizinga H.W., 1971. Contracaeciasis in pelicaniform birds. *J. Wild. Dis.*, 7: 198-204.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kimura M., 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, MA.
- Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.*, 5:150-163.
- Legendre P., Desdevises Y., Bazin E., 2002. A statistical test for host-parasite coevolution. *Syst. Biol.*, 51(2): 217-234.
- Lent H. & Freitas J.F.T., 1948. Una colecao de Nematodeos, parasitos dos Vertebrados, do Museu de Historia Natural de Montevideo. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*, 46: 1-71.

- Li A., D'Amelio S., Paggi L., He F., Gasser R.B., Lun Z., Abollo E., Turchetto M., Zhu X., 2005. Genetic evidence for the existence of sibling species within *Contracaecum rudolphii* (Hartwich, 1964) and the validity of *Contracaecum septentrionale* (Kreis, 1955) (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol. Res.*, 96: 361-366.
- Lile N.K., 1992. The influence of host phylogeny and ecology on the parasite fauna of four Pleuronectidae flatfish species from north Norway. *Bull. Scand. Soc. Paras.*, 2: 41-52.
- Lucker J.T., 1941. A redescription of *Contracaecum multipapillatum* (Von Drasche, 1882) (Nematoda: Anisakidae). *J. Parasitol.*, 27: 505-512.
- MacKenzie K., 1990. Cestode parasites as biological tags for mackerel (*Scomber scombrus* L.) in the Northeast Atlantic. *J. Cons. Int. pour l'Explor. la Mer*, 46: 155-166.
- MacKenzie K., 2002. Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology*, 124: S153-S163.
- Matejusova I., Koubkova B., D'Amelio S., Cunningham C.O., 2001. Genetic characterization of six species of diplozoids (Monogenea: Diplozoidae). *Parasitology*, 123: 465-474.
- Mattiucci S., Nascetti G., Bullini L., Orecchia P., Paggi L., 1986. Genetic structure of *Anisakis physeteris* and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascarida: Anisakidae). *Parasitology*, 93: 383-387.
- Mattiucci S., Nascetti G., Cianchi R., Paggi L., Arduino P., Margolis L., Bratney J., Webb S.C., D'Amelio S., Orecchia P., Bullini L., 1997a. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J. Parasitol.*, 83: 401-416.
- Mattiucci S., Nascetti G., Cianchi R., Paggi L., Bullini L., 1997b. Diversità genetica in nematodi anisakidi parassiti di pesci e mammiferi marini. *VIII Congresso S.It.E.* Parma, 10-12 Settembre, 1997, 18: 301-305.

- Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Ishikura H., Kikuchi K., Sato N., Cianchi R., Bullini L., 1998. Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda: Ascaridoidea). *Syst. Parasitol.*, 40: 81-92.
- Mattiucci S., Nascetti G., Santos C.P., Cianchi R., Di Benedetto C., Ramos R., Bullini L., Paggi L., 2000. *Anisakis typica* (Diesing, 1860) (Nematoda: Anisakidae): genetic variation and divergence from the other species of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845. *Parassitologia*, 42, (Suppl. 1): 175.
- Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Abollo E., Webb S.C., Pascual S., Cianchi R., Bullini L., 2001. Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *Int. J. Parasitol.*, 31: 9-14.
- Mattiucci S., Turchetto M., Brigantini F., Nascetti G., 2002. On the occurrence of the sibling species of *Contracaecum rudolphii* complex (Nematoda: Anisakidae) in cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*) from Venice and Caorle lagoons: genetic markers and ecological studies. *Parassitologia*, 44(suppl. 1): 105.
- Mattiucci S., Cianchi R., Nascetti G., Paggi L., Sardella N., Timi J., Webb S.C., Bastida R., Rodriguez D., Bullini L., 2003. Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson (1941) (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Syst. Parasitol.*, 54: 13-23.
- Mattiucci S., Abaunza P., Ramadori L., Nascetti G., 2004. Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J. Fish Biol.*, 65 (2): 495-510.
- Mattiucci S., Nascetti G., Dailey M., Webb S.C., Barros N., Cianchi R., Bullini L., 2005. Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.*, 61: 157-171.

- Mattiucci S. & Nascetti G., 2006. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasité*, 13: in press.
- Mattiucci S., Paoletti M., Contadini R., Nascetti G., 2006. Relazioni genetiche tra specie del genere *Contracaecum* (Reyllet & Henry, 1912), parassiti di pinnipedi ad aspetti co-evolutivi ospite-parassita". *XVI Congresso S.It.E.*, 19-22 Settembre 2006, Viterbo-Civitavecchia.
- Mattiucci S. & Nascetti G., 2007. Genetic diversity and infection levels of anisakid nematode parasites of aquatic organisms of Boreal and Austral regions. *Veter. Parasitol.*, in corso di stampa.
- Marcogliese D.J., 2005. Parasites of the superorganisms: are they indicators of ecosystem health? *Int. J. Parasitol.*, 35(7) : 705-716.
- Mayr E., 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- McCarthy C., 1998-2005. *Crhomax*; Technelysium Pty. Ltd., www.technelysium.com
- McGladdery S.E. & Burt M.D.B., 1985. Potential of parasites for use as biological indicators of migration, feeding and spawning behaviour of Northwestern Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Can. J. Fisher. and Aquat. Sci.*, 42: 1957-1968.
- Moravec F., 1994. *Parasitic Nematodes of freshwater fishes of Europe*. Kluwer Academic Publishers., 144-145.
- Moravec F., Vivas-Rodriguez C., Sholz T., Vargas-Vazquez J., Mendoza-Franco E., Schmitter-Soto J.J., Gonzales-Solis D., 1995. Nematodes parasitic in fishes of cenotes (= sinkholes) of the Peninsula of Yucatan, Mexico. Part 2. Larvae. *F. Parasitol.*, 42: 199-210.
- Morgan B.B., Schiller E., Rausch R., 1949. The occurrence of *Contracaecum travassosi* (Nematoda) in North America. *J. Parasitol.*, 35: 541-542.

- Morrison D.A., 2005. Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. *Int. J. Parasitol.*, 35: 567-582.
- Moser M. & Hsieh J., 1992. Biological tags for stock separation in pacific herring *Clupea harengus pallasii* in California. *J. Parasitol.*, 78: 54-60.
- Mozgovoi A.A., Shakmatova V.I., Semenova M.K., 1965. Study of life cycle of *Contracaecum spiculigerum* (Ascaridata: Anisakidae) nematode of fish eating birds. *Mater. Nauchn. Konf. Vses. Obshch. Gelmint.*, part IV: 169-174.
- Mozgovoi A.A., Shakmatova V.I., Semenova M.K., 1968. Study of life cycle of *Contracaecum spiculigerum* (Ascaridata: Anisakidae) parasite of domestic and game birds. *Trudy Gelmint Lab.*, 19: 129-136.
- Murray M.G. & Thompson W.F., 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nuc. Ac. Res.*, 8: 4321-4325.
- Nadler S.A. & Hudspeth D.S.S., 2000. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.*, 86: 380-393.
- Nadler S.A., D'Amelio S., Fagerholm H-P., Berland B., Paggi L., 2000. Phylogenetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Host, 1932 (Nematoda: Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology*, 121: 455-463.
- Nascetti G., Paggi L., Orecchia P., Smith J.W., Mattiucci S., Bullini L., 1986. Electrophoretic studies on *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North East Atlantic. *Int. J. Parasitol.*, 16 : 633-640.
- Nascetti G., Bullini L., Cianchi R., Paggi L., Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Berland B., 1990. Genetic relationships among anisakid species belonging to the genera *Contracaecum* and *Phocascaris*. *Bull. Soc. Franc. Parasitol.*, 8 (suppl. 1): 261.

- Nascetti G., Ishikura H., Sato N., Kikuchi K., Margolis L., D'Amelio S., Mattiucci S., Paggi L., Orecchia P., Cianchi R., Bullini L., 1992. Electrophoretic studies of *Anisakis* parasite from Japanese waters. *Proc. VIth European Multicollloquium of Parasitology*, September 7-11, 1992, the Hague, the Netherlands.
- Nascetti G., Cianchi R., Mattiucci S., D'Amelio S., Orecchia P., Paggi L., Bratney J., Berland B., Smith J.W., Bullini L., 1993. Three sibling species within *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-boreal region: reproductive isolation and host preferences. *Int. J. Parasitol.*, 23: 105-120.
- Nascetti G., Mattiucci S., Cianchi R., Berland B., Bullini L., Paggi L., 2000. Genetic relationship among *Contracaecum* spp. (Nematoda: Anisakidae), parasites of cormorants and pelicans of the Boreal Region. *Acta parasitol.*, 45: 153.
- Navone G.T., Etchegoin J.A., Cremante F., 2000. *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakidae) from *Egretta alba* (Aves: Ardeidae) and comments on other species of this genus in Argentina. *J. Parasitol.*, 86: 807-810.
- Nei M., 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Nat.*, 106: 283-292.
- Nei M. & Kumar S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University press, New York.
- Oliver P.A. & Massutí E., 1995. Biology and fisheries of western Mediterranean hake (*M. merluccius*). In *Hake: Biology, Fisheries and Markets* (Alheit, J. & Pitcher, T. J., eds.), London: Chapman & Hall, pp. 181-202.
- Olivero-Verbel J., Baldiris-Avila R., Arroyo-Salgado B., 2005. Nematode infection in *Mugil incilis* (Lisa) from Cartagena Bay and Totumo marsh, north of Colombia. *J. Parasitol.*, 91: 1109-1112.
- Olson R.E. & Pratt I., 1973. Parasites as indicators of English sole (*Parophrys vetulus*) nursery grounds. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, pp. 405-411.

- Orecchia P., Berland B., Paggi L., Nascetti G., Mattiucci S., Bullini L., 1986. Divergenza genetica di specie dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris* (Ascaridida, Anisakidae) con diverso ciclo biologico. *Ann. Ist. Sup. San.*, 22: 345-348.
- Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Paggi L., Plotz J., Cianchi R., Nascetti G., Arduino P., Bullini L., 1994. Two new members in the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda, Ascaridoidea) from the Antarctic. *Int. J. Parasitol.*, 24: 367-377.
- Page R.D.M. & Holmes E., 1998. *Molecular evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford, 346 (3): pp. 315-334.
- Paggi L., Nascetti G., Webb S.C., Mattiucci S., Cianchi R., Bullini L., 1998. A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) from beaked whale (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. *Syst. Parasitol.*, 40: 161-174.
- Paggi L., Mattiucci S., Nascetti G., Santos C.P., Ramos R., Di Benedetto A.P., Cianchi R., Bullini L., 1999. *Anisakis typica* (Nematoda: Anisakidae): morphological characters and genetic markers (allozymes) for its differentiation from other species of the genus *Anisakis*. 5th Int. Sym. Fish Parasitol., Ceske De Jovice, 9-13 August 1999, Abstract: 105.
- Paggi L., Mattiucci S., Gibson D.I., Berland B., Nascetti G., Cianchi R., Bullini L., 2000. *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda: Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Syst. Parasitol.*, 45: 185-197.
- Palumbi S.R., 1996. Nucleic acid II: The polymerase chain reaction. *Mol. Syst.*, Eds. Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K., Sinauer, Ass. Ma. U.S.A.: 205-247.
- Paterson A.M. & Gray R.D., 1997. Host-parasite cospeciation, host switching and missing the boat. In "*Host-parasite evolution: general principles and avian models*" (Clayton D.H. & Moore J. Eds.), pp. 236-250, *Oxford University Press*, Oxford.

- Podani J., 2005. Multivariate exploratory analysis of ordinal data in ecology: pitfalls, problems and solutions. *J. Veget. Sci.*, 15: 497-510.
- Portes-Santos C., 1984. Un nematòdeo parasito do pinguim *Spheniscus magellanicus* (Forster) (Ascaroidea: Anisakidae). *Mem. Ist. Oswaldo Cruz*, 79(2): 233-237.
- Poulik M.D., 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature* (Lond.), 180: 1477-1479.
- Poulin R. & Morand S., 2004. *Parasite biodiversity*. *Smith. Inst. Press*, Washington, D.C.
- Raillet A. & Hanry A., 1912. Quelques nematodes parasites des reptiles. *Bull. Soc. Phat. Exot.*, 5: 251-259.
- Richardson B.J., Baverstock P.R., Adams S.M., 1986. *Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies*. *Academic Press*, Orlando, Florida.
- Ridley M., 1996. *Evolution*. 2nd ed. *Blackwell Science*, Oxford.
- Rydlo M., 1985. Parasites as indicators of feeding habits of the host as exemplified by *Chalcaburnus chalcoides mento*, *Vimba vimba elongata* and *Salvelinus alpinus*. *Osterr. Fisch.*, 38: 279-285.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 5463-5467.
- Selander R.K., Smith M.H., Yang S.Y., Johnson W.E., Gentry J.B., 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetics IV, Univ. Texas Publ.*, 7103: 49-90.

- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6): 651-701.
- Sindermann C.J., 1961. Parasites tags for marine fish. *J. Wildl. Manage.*, 25: 41-47.
- Skrjabin K.L. & Kurokhim V.I., 1945. On the rearrangement of the nemathods of the order Ascaridida Skrjabin, 1915. *Dok. Akad. SSSR*, 49: 297-299.
- Steward D.T., Saavedra C., Stanwood R.R., Ball A.O., Zouros E., 1995. Male and female mitochondrial DNA lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Mol. Biol. Evol.*, 12(5): 735-747
- Stuart M.D. & Strier K.B., 1995. Primates and parasites: a case for a multidisciplinary approach. *Int. J. Primat.*, 16: 577-593.
- Swofford D.L. & Selander R.B., 1981. Biosys-1: a Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.*, 72: 281-283.
- Swofford D.L. & Selander R.B., 1989. BYOSIS-1, a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics, version 1.7. *Champaign III: Nat. Hist. Surv.*, 31 pp.
- Swofford D.L., 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts.
- Thomas W.K. & Wilson A.C., 1991. Mode and tempo of molecular evolution in the nematode *Caenorhabditis*: cytochrome oxidase II and calmodulin sequences. *Genetics*, 128: 269-279.
- Thomas F., Verneau O., de Meeûs T., Renaud F., 1996. Parasites as to host evolutionary prints: insights into host evolution from parasitological data. *Int. J. Parasitol.*, 26 (7): 677-686.

- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucl. Ac. Res.*, 22: 4673-4680.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Geanmougin F., Higgins D.G., 1997. The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Ac. Res.*, 24: 4876-4882.
- Timi J.T., Sardella N.H. & Navone G.T., 2001. Parasitic nematodes of *Engraulis anchoita* Hubbs et Marini, 1935 (Pisces, Engraulidae) off the Argentine and Uruguayan coasts, South West Atlantic. *Acta Parasitol.*, 46: 186-193.
- Toft C.A. & Carter A.J., 1990. Parasite-host coevolution. *Trends Ecol. Evol.*, 5: 326-329.
- Torres P., Ortega J., Schlatter R., 2005. Nematode parasites of the digestive tract in Neotropic cormorant chicks (*Phalacrocorax brasilianus*) from the River Cruces Ramsar site in southern Chile. *Parasitol. Res.*, 97: 103-107.
- Turner H.M., 1985. Parasites of eastern oyster from subtidal reefs in a Louisiana estuary with a note on their use as indicators of water quality. *Estuaries*, 8: 323-325.
- Valentini A., Mattiucci S., Bondanelli P., Webb S.C., Mignucci-Giannone A., Colom-Llavina M.M., Nascetti G., 2005. Genetic relationships among Anisakis species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox-2* sequences, and comparison with allozyme data. *J. Parasitol.*, 92(1): 156-166.
- Van Tuinen, 2001. Convergence and divergence in the evolution of aquatic birds. *Proc. R. Soc. Lond. B*, pp. 1342-1350.
- Wedemeyer G.A & Goodyear C.P., 1984. Diseases caused by environmental stressors. In: *Diseases of marine Animals*, Vol. IV Part. 1, Pisces Biologische Anstalt Helgoland. (Edited by Kinne O.), pp. 424-434, Hamburg.

Yorio P., Frere E., Gandini P. and A. Schiavini, 2001. Tourism and recreation at seabird breeding sites in Patagonia, Argentina: Current concerns and future prospects. *Bird Conserv. Int.*, 11: 231-245.

Zhokhov A.Y. & Kasyanov A.N., 1995. On the possibility of using parasites as biological markers to identify ecomorphs of roach, *Rutilus rutilus*, in Rybinsk reservoir. *J. Ichthyol.*, 35: 44-51.

Parte dei risultati ottenuti in questo lavoro sono stati oggetto di

Comunicazioni:

- 1) **Mattiucci S., Paoletti M., Olivero J., Arrollo B., Baldiris R., Nascetti G. (2005).** Genetica de especies del género *Contracaecum*, Railliet Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae), parasitos del pelicano marron, *Pelecanus occidentalis* de Colombia: marcadores moleculares para la identificacion larval y relaciones genética entre congeneros. *Parasitologia Latinoamericana* 60: 363-364.
- 2) **Mattiucci S., Paoletti M., Oliviero J., Baldiris R., Nascetti G. (2006).** Evidence for new species of *Contracaecum* Railliet et Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae), parasites of fish-eating birds from Colombia: genetic relationship between congeners and larval identification. *XXIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, 21-24 Giugno 2006. Parassitologia*, 48: 351.
- 3) **Mattiucci S., Paoletti M., Contadini R., Nascetti G. (2006).** Relazioni genetiche tra specie del genere *Contracaecum* (Reyllet & Henry, 1912), parassiti di pinnipedi ad aspetti co-evolutivi ospite-parassita”. *XVI Congresso S.It.E.*, 19-22 Settembre 2006, Viterbo-Civitavecchia.
- 4) **Mattiucci S., Olivero J , Paoletti M. , Arrollo B., Baldiris R., Nascetti G. (2006) .** Genetic evidence for new species of genus *Contracaecum* (Nematoda, Anisakidae), parasites of the brown pelican, *Pelecanus occidentalis*, from Colombia: genetic relationships between congeners, and larval identification. *XI International Congress of Parasitology*, Glasgow August, 2006.
- 5) **Paoletti M., Mattiucci S., Olivero-Verbel J., Arroyo-Salgado B., Baldiris-Avila R., Nascetti G. (2006).** Specie gemelle di nematodi anisakidi del genere *Contracaecum*, parassiti di uccelli ittiofagi: marcatori genetico-molecolari e studi ecologici. *XVI Congresso S.It.E.*, 19-22 Settembre 2006, Viterbo-Civitavecchia.

- 6) **Bondanelli P., Paoletti M., Cimmaruta R., Nascetti G., Podani J. (2006).**
Identifying fish stocks by multivariate analysis. *XVI Congresso S.It.E.*, 19-22
Settembre 2006, Viterbo-Civitavecchia.

Pubblicazioni:

- 1) **Mattiucci S., Paoletti M., Olivero-Verbel J., Baldiris R., Arroyo-Salgado B., Garbin L., Navone G., Nascetti G.** *Contracaecum bioccai* n. sp. from the brown pelican, *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): genetic evidence and morphological description. *Systematic Parasitology*, (in corso di stampa).

Ringraziamenti

Uno ringraziamento speciale va al Prof. Olivero-Verbel e collaboratori, del Gruppo di Chimica Ambientale e Computazionale dell'Università di Cartagena, per il campionamento del materiale proveniente dalla Colombia. Ringrazio in modo particolare il Prof. Nascetti del Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile (Viterbo) e la Dott.ssa Mattiucci, del Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica (Roma), per il grande sostegno datomi nel corso di questo lavoro. Ringrazio, inoltre, il Dott. Canestrelli per l'aiuto offertomi nella risoluzione di alcuni problemi incontrati durante l'elaborazione dei dati. Infine ringrazio la mia famiglia per avermi sempre sostenuto.