

**“Analisi della parassitofauna delle rane verdi
del complesso *Rana esculenta*: un metodo di
valutazione dell’eterogeneità e dello stato
ambientale dell’ecosistema lago di Vico.”**



Dottorando Paolo Cipriani

Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile



Università degli Studi della Tuscia di Viterbo
Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile

Dottorato in
“Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche”

XXI Ciclo - BIO/07

“Analisi della parassitofauna delle rane verdi del complesso
Rana esculenta: un metodo di valutazione dell’eterogeneità e dello stato
ambientale dell’ecosistema lago di Vico.”

Coordinatore:

Prof. Roberta Cimmaruta

Dottorando:

Paolo Cipriani

Tutor:

Dott.ssa Simonetta Mattiucci

INDICE:

Introduzione ed obiettivi della ricerca.....	Pag. 01
--	---------

PARTE INTRODUTTIVA:

1.1 L'analisi qualitativa delle acque lacustri	Pag. 04
1.1.1 Le rane verdi come bioindicatore	Pag. 05
1.2.2 Caratteristiche morfologiche ed etologiche delle rane verdi	Pag. 09
1.2 Il monitoraggio biologico.....	Pag. 10
1.3 I parassiti come indicatori biologici	Pag. 12
1.4 Il declino globale degli anfibi	Pag. 14

AREA DI STUDIO:

2.0 Il lago di Vico	Pag. 18
2.1 Caratteristiche morfologiche, climatologiche ed idrologiche dell'area oggetto di studio	Pag. 18
2.2 La Riserva Naturale Regionale "Lago di Vico"	Pag. 19
2.3 Stazioni di campionamento e monitoraggio	Pag. 20

MATERIALI E METODI:

3.1 Campionamento degli anfibi	Pag. 26
3.2 Analisi chimico fisica delle acque	Pag. 27
3.3 Analisi parassitologica	Pag. 28
3.4 Metodi genetici per l'identificazione delle rane	Pag. 29
3.4.1 Elettroforesi multilocus	Pag. 29
3.5 Studio morfologico delle specie parassita	Pag. 31
3.5.1 Trematoda Digenea	Pag. 31
3.5.2 Nematoda	Pag. 32
3.6 Parametri epizootologici	Pag. 32
3.7 Metodi genetico-molecolari per l'identificazione di <i>Rhabdias</i>	Pag. 33
3.7.1 Il DNA mitocondriale come marcatore genetico	Pag. 33
3.7.2 Estrazione del DNA	Pag. 36
3.7.3 Amplificazione mediante PCR (Polimerase Chain Reaction).....	Pag. 37
3.7.4 Sequenziamento	Pag. 38
3.7.5 Analisi delle sequenze	Pag. 39
3.7.6 Analisi statistiche e filogenetiche	Pag. 39

RISULTATI:

4.1	Analisi chimico-fisiche delle acque del lago di Vico	Pag. 41
4.2	Frequenze relative delle specie <i>R. esculenta</i> e <i>R. lessonae</i>	Pag. 41
4.3	Studio della composizione parassitaria di <i>Rana spp.</i>	Pag. 42
4.3.1	Trematoda.....	Pag. 43
4.3.2	Nematoda.....	Pag. 45
4.3.2.1	I parassiti del genere <i>Rhabdias</i>	Pag. 45
4.3.2.2	<i>Oswaldocruzia filiformis</i>	Pag. 48
4.3.2.3	Cosmocercinae.....	Pag. 50
4.3.3	Cestoda.....	Pag. 52
4.4	Dati epizootologici	Pag. 52
4.5	Studi di sistematica molecolare nei nematodi del genere <i>Rhabdias</i>	Pag. 54

DISCUSSIONE:

5.1	Il complesso <i>Rana esculenta</i> come ospite in relazione alle località di campionamento...	Pag. 57
5.1.1	Complesso <i>R. esculenta</i> e condizioni chimico-fisiche in anni precedenti, 1999-2003.....	Pag. 61
5.2	I parassiti.....	Pag. 63
5.2.1	Variazione dei livelli di infestazione dai parassiti rinvenuti in relazione ai siti di campionamento delle specie ospite	Pag. 63
5.2.1	Livelli di infestazione dei parassiti rinvenuti in relazione alle specie ospite.....	Pag. 65
5.3	Aspetti di sistematica molecolare su specie del genere <i>Rhabdias</i>	Pag. 66

Bibliografia	Pag. 68
--------------------	---------

Credits	Pag. 79
---------------	---------

A Francesco

Introduzione ed obiettivi della ricerca

Negli ultimi decenni le popolazioni di anfibi di tutto il mondo sono andate incontro ad un drammatico declino. Numerose sono le cause cui ricondurre tale crollo demografico, dalla distruzione degli habitat al cambiamento climatico globale, dall'aumento delle radiazioni ultraviolette che raggiungono il suolo, alle contaminazioni ambientali. Un'ulteriore causa è stata l'introduzione di specie aliene ed agenti patogeni che a queste si accompagnano.

Come possibile conseguenza di questo declino demografico la variabilità genetica, in termini di risorse genetiche delle specie di vari anfibi, risulta essere in calo, comportando un aumento della sensibilità verso patogeni e parassiti, risultato dell'abbassamento delle capacità di risposta immunitaria. Questa ipotesi evoluzionistica viene definita come ipotesi della "Regina rossa" (Van Valen, 1973). Alcuni di questi patogeni possono essere implicati nel declino degli anfibi, contribuendo ad un meccanismo che torna a svantaggio della diversità globale di questo gruppo di vertebrati. Tra i patogeni possiamo annoverare anche i parassiti.

I parassiti, siano essi protozoi o metazoi, sono organismi caratterizzati da una grande diversità di cicli vitali e sono adattati a vivere all'interno o all'esterno di altri organismi, che fungono da "ospite". Virtualmente, tutte le forme di organismi a vita libera sono specie ospite di parassiti, ed il parassitismo, nel senso più ampio del termine, è considerato il più comune stile di vita sulla terra (Price, 1980): praticamente tutti gli ecosistemi ospitano e sono influenzati da questa relazione interspecifica. Oltre il 50% degli organismi attualmente descritti può essere classificato tra i parassiti (Price, 1980). Questi sono dipendenti dall'ospite dal punto di vista metabolico, in quanto si nutrono "a sue spese", dal punto di vista riproduttivo, ed anche da quello "strutturale", in quanto l'ospite è spesso il "microhabitat" in cui essi vivono. Sono spesso caratterizzati da complessi cicli vitali che coinvolgono diversi ospiti (parassiti eteroxeni o dixeni), continue trasformazioni in differenti forme larvali e fasi a vita libera, oppure possono svolgere il loro ciclo solo su un ospite (parassiti monoxeni), con forme larvali a vita libera.

I parassiti sono anche in grado di influenzare la biologia dei loro ospiti in vario modo, a livello fisiologico, riproduttivo, o comportamentale, alterando a volte tassi di mortalità e natalità, regolando la densità della popolazione ospite, giocando quindi un "ruolo chiave" nello strutturare le comunità ecologiche (Anderson & May, 1979; Dobson & Hudson, 1986; Marcogliese, 2002, 2004). La predazione ed il parassitismo sono tra le relazioni più importanti per il mantenimento a lungo termine della stabilità di una comunità (Bullini *et al*, 2002).

I parassiti possono essere anche un utile mezzo per tracciare relazioni e strutture di reti trofiche, come indicatori per stimare la biodiversità di un ecosistema, di inquinamento, di variabili ambientali, della biologia delle popolazioni ospiti e delle loro migrazioni (MacKenzie, 1990; Marcogliese & Cone 1997; Brooks & Hoberg, 2000; Marcogliese, 2001; Mattiucci & Nascetti, 2007, 2008). Il rapporto ospite-parassita costituisce anche un modello per stabilire e monitorare lo stato di salute di specie soggetti a cali demografici, e per condurre valutazioni sulla conservazione di specie ospiti. Quest'ultimo aspetto appare quanto mai importante nell'ambito del problema del declino globale degli anfibi.

Ciononostante, i parassiti sono organismi trattati spesso con disdegno da gestori di risorse ambientali, dai media, ed anche dal mondo scientifico, a causa della loro cattiva fama a livello globale essendo spesso associati, non a torto, a fastidiose, ed in tal caso mortali, malattie infettive; essi vengono pertanto considerati organismi senza valore e, dove possibile, da eradicare: questo approccio tende a non comprendere ed ignorare la complessità biologica di queste criptiche creature, nonché l'importanza del loro ruolo negli ecosistemi (Marcogliese, 2004).

Questo studio ha avuto come oggetto l'analisi della parassitofauna di una popolazione di rane verdi del complesso *Rana esculenta* nelle acque litorali del lago di Vico (Italia Centrale). Il complesso *Rana esculenta* è un complesso ibridogenetico di specie. Questo complesso è stato usato come indicatore ambientale di acque lentiche, dapprima, ed in seguito delle condizioni lacustri (Semlitsch, 1993; Fioramonti *et al.*, 1997; Scialanca, 1999; Boncompagni *et al.*, 2002; Di Rosa *et al.*, 2002; Andreani *et al.*, 2003; Venanzi, 2003), e fornisce informazioni alternative o complementari a quelle che si ottengono dagli indici chimici e biologici comunemente utilizzati. In particolare l'obiettivo del lavoro è stato lo studio della composizione e diversità della parassitofauna della popolazione di anfibi appartenenti a questo complesso presenti al lago di Vico al fine di aggiungere al sistema anfibi-ambiente un ulteriore indicatore di qualità ambientale, costituito dallo studio della loro composizione parassitaria.

Considerando inoltre che l'ibridogenesi produce combinazioni genetiche nuove date dall'unione di due diversi genomi, un'analisi delle "performances" degli individui ibridi di rane verdi "ospiti" di varie forme di parassiti può contribuire alle conoscenze sui rapporti di co-adattamento ospite parassita (Mouliat *et al.* 1995; Arnold, 1997). Mentre si suppone, infatti, che l'ibridazione tra genomi filogeneticamente distanti possa aumentare la suscettibilità verso un parassita, a causa del crollo del co-adattamento genetico (*genetic co-adaptation*), al contrario, l'ibridogenesi tra taxa strettamente correlati (come nel caso delle rane verdi) può portare all'

aumento della resistenza ai parassiti grazie ad un effetto “eterotico” (Sage *et al.*, 1986; Dupont & Crivelli, 1988; Whitman, 1989; Moulia, 1999).

Quindi, lo scopo ultimo di questo lavoro è stato quello di studiare e confrontare la parassitofauna ed i livelli di infestazione in rane delle due diverse specie appartenenti a questo complesso.

PARTE INTRODUTTIVA

1.0 L'analisi qualitativa delle acque lacustri

Nella valutazione della qualità delle acque di un lago è generalmente riconosciuta l'importanza di uno studio integrato che affianchi alle analisi chimico-fisiche anche un monitoraggio biologico. Mentre il primo approccio fornisce utili informazioni sul tipo e sulla quantità degli inquinanti presenti nelle acque al momento del prelievo, il secondo è utile per conoscere gli effetti dell'interazione dei vari inquinanti tra di loro e con l'ambiente e quindi per studiare la situazione complessiva, presente e passata, dell'ecosistema. A tale riguardo, negli ultimi anni sono stati introdotti specifici indici biologici in grado di valutare l'entità dei fenomeni di degrado ambientale dei laghi; essi hanno ormai raggiunto un buon livello di attendibilità in molteplici situazioni, come conferma l'ampia diffusione del loro utilizzo.

Nel caso del lago di Vico, la complessità dei diversi impatti antropici subiti ha reso necessario un approccio in grado di integrare diverse metodologie di valutazione della qualità ambientale. Per tali ragioni, al fine di mettere in evidenza cambiamenti di trofia, durante gli ultimi anni sono stati raccolti dati relativi ai parametri chimico-fisici classici ed è stato condotto uno studio di tipo biologico sulle frequenze relative degli individui appartenenti a due specie di rane verdi: *Rana lessonae* e *Rana esculenta*. Nelle acque interne italiane queste due specie formano il complesso *Rana esculenta*, che si è dimostrato un indicatore sensibile della qualità di tali ambienti, come testimoniano ricerche condotte perlopiù in habitat fluviali (Andreani, 1995; Andreani, 1999; Venanzi, 1999; Andreani *et al.*, 2003; Venanzi, 2003). Per quanto riguarda le acque lacustri alcuni studi sono stati svolti sui laghi di Bolsena e Vico (Scialanca *et al.*, 1999; Passatore, Tesi di Laurea, 2004).

L'idea di utilizzare il complesso "*esculenta*" come bioindicatore si basa sulla stretta correlazione esistente tra i livelli osservati di diversità genetica e quelli di stress ambientale. Si pensa che l'adattamento ad habitat disturbati richieda un'elevata eterozigosi individuale, che migliorerebbe la capacità di risposta dei singoli esemplari alle fluttuazioni dell'ambiente (Ipotesi della Regina Rossa, Van Valen, 1973). Il tasso elevato di eterozigosi permette alla specie ibrida (*R. esculenta*) di prevalere in situazioni di stress naturale o antropico, mentre *R. lessonae* tende a prevalere in habitat poco disturbati o relativamente integri; sono molti i lavori che considerano, da diversi punti di vista, la competizione tra *R. lessonae*, *R. ridibunda* (specie parentali) e l'ibrido *R. esculenta*. Da questi studi viene confermata una maggiore capacità adattativa di *R. esculenta* in

ambienti mutevoli (Semlitsch & Reyer, 1992; Rist *et al.*, 1997; Fioramonti *et al.*, 1997; Andreani, 1999; Plenet *et al.*, 2000; Hellriegel & Reyer, 2000; Di Rosa *et al.*, 2002).

1.1.1 Le rane verdi come bioindicatore

Soprattutto negli ultimi anni si sta sviluppando l'interesse per la diversità genetica di popolazioni naturali sottoposte a disturbo ambientale e si stanno ampliando le conoscenze sulle correlazioni tra variabilità genetica e capacità di risposta agli stress (Arnault & Dufournel, 1994; Taddei *et al.*, 1997; Plenet *et al.*, 2000; Vorburger, 2001)

Molti lavori, attraverso l'analisi della struttura genetica degli organismi, hanno evidenziato che il grado di eterozigosi rispecchia spesso la qualità dell'ambiente in cui sono inseriti. Di conseguenza, si è pensato di analizzare la struttura genetica delle popolazioni animali per il monitoraggio ambientale e si stanno cercando specie indicatrici e sistemi enzimatici il più possibile sensibili ed appropriati agli ambienti che si vogliono esaminare.

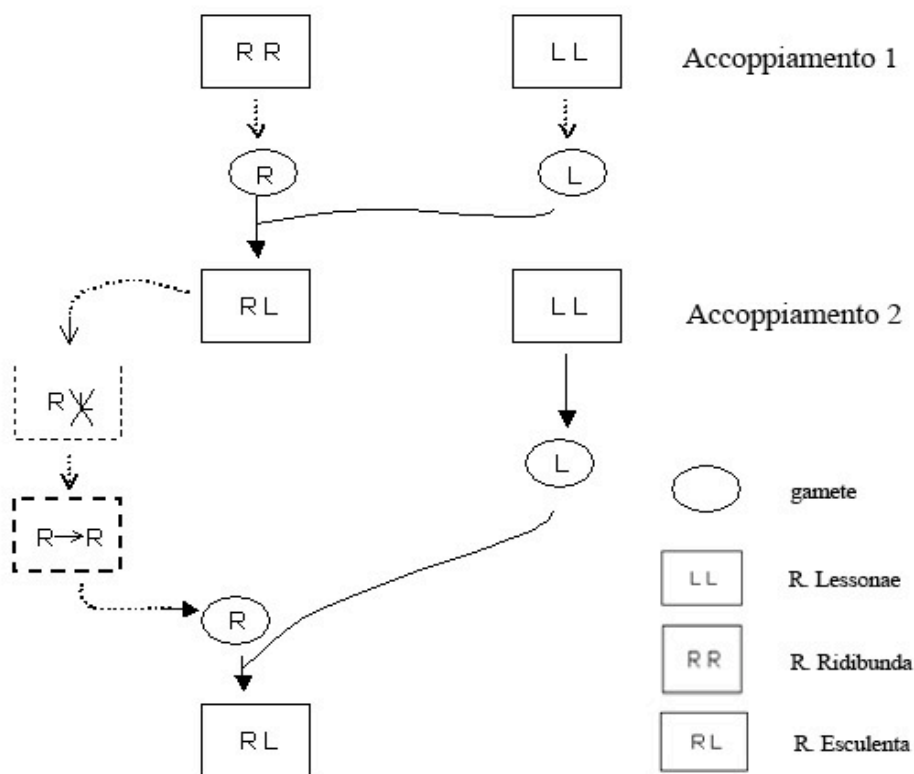
Il sistema a due specie di rane verdi, *R. lessonae* e *R. esculenta*, sintopiche e strettamente affini, ma con diversa tolleranza agli stress, si è rivelato un indicatore abbastanza sensibile del livello di inquinamento, in particolare di quello derivante dall'immissione di pesticidi nell'ambiente come conseguenza delle attività agricole (Semlitsch *et al.*, 1995; Fioramonti *et al.*, 1997; Boncompagni *et al.*, 2002; Di Rosa *et al.*, 2002; Andreani *et al.*, 2003; Venanzi, 2003).

R. esculenta è un ibrido interspecifico tra *R. lessonae* e *R. ridibunda*; gli individui di questa specie sono generati attraverso un particolare meccanismo riproduttivo, l'ibridogenesi. Durante la gametogenesi l'ibrido esclude uno dei due genomi parentali e produce solo gameti che contengono l'altro genoma. Siccome tale esclusione è premeiotica, la ricombinazione attraverso crossing over viene evitata e il genoma che rimane è trasmesso clonalmente. Le rane verdi generalmente creano, in uno stesso territorio, popolamenti misti formati da individui ibridi e da individui di una delle due specie parentali. In Italia le popolazioni di rane verdi sono composte dalle specie *R. lessonae* e *R. esculenta* (sistema L-E), in questo caso il genoma "*ridibunda*" viene trasmesso, mentre quello della specie *lessonae* viene perso. In tale sistema, dove *Rana ridibunda* non è più simpatica, la popolazione di *R. esculenta* può persistere solamente attraverso una sorta di parassitismo sessuale, deve cioè accoppiarsi in ogni generazione con *R. lessonae* per riacquisire il genoma che aveva perso.

Negli accoppiamenti tra le rane del complesso L-E si possono avere quattro combinazioni che danno vita a quattro distinti genotipi (Fig. 1.1). Per esempio, i due accoppiamenti eterogami

($L♀ \times E♂$ e $E♀ \times L♂$) producono una progenie di *R. esculenta*, con alta eterozigosi. Invece gli accoppiamenti omogami del tipo $E♀ \times E♂$ danno luogo ad individui della specie *R. ridibunda* (genotipo RR) con una variabilità genetica estremamente bassa, dal momento che hanno due genomi trasmessi clonalmente da entrambi i genitori. I girini RR non arrivano a metamorfosare a causa dell'accumulo di mutazioni recessive nocive (Semlitsch & Reyer, 1992).

Fig 1.1 Sistema di ibridogenesi nel complesso *R. esculenta*. L'accoppiamento n. 1 è una ibridazione interspecifica che introduce la linea ibrida *R. esculenta*. L'accoppiamento n.2 è il consueto metodo di riproduzione dell'ibrido: durante la gametogenesi il genoma *lessonae* viene eliminato e viene rimpiazzato da un genoma *ridibunda*, clonato da quello preesistente. Ne derivano gameti *ridibunda* che unendosi con gameti *lessonae* danno vita ad un individuo *esculenta*.



Sembra che gli accoppiamenti in natura non avvengano casualmente, ma riflettano specifiche preferenze sessuali (Reyer *et al*, 1999; Hellriegel & Reyer, 2000; Roseli *et al.*, 2000); a queste abitudini si aggiunge che gli individui adulti di *R. lessonae* trovano facilmente il partner per l'accoppiamento, potendosi accoppiare indifferentemente con l'una e con l'altra specie, mentre

quelli della specie ibrida necessitano, per produrre prole vitale, dell'accoppiamento esclusivamente con individui di *R. lessonae*. Questo fa pensare che, presumibilmente, in natura si trovino più girini di *R. lessonae* che di *R. esculenta*, che verranno poi selezionati dalle condizioni ambientali, determinando i rapporti riscontrati negli adulti (Venanzi, 2003).

E' stato osservato come, in ambienti meno disturbati, *R. lessonae* abbia migliori capacità competitive rispetto a *R. esculenta*, mentre *R. esculenta* tenda a prevalere dove lo stress ambientale è maggiore (limitata disponibilità di cibo, presenza di competizione intra- ed inter-specifica, instabilità del regime idrico) (Semlitsch & Reyer, 1992)

Fig. 1.2 Fenotipi degli adulti (L, E) e possibili genotipi (LL, LR, RL, RR) della progenie ottenuta da accoppiamenti ibridi tra le specie *R. lessonae* e *R. esculenta*

		MASCHIO	
		<i>Rana lessonae</i> (L)	<i>Rana esculenta</i> (E)
FEMMINA	<i>Rana lessonae</i> (L)	LL <i>lessonae</i> (L)	LR <i>esculenta</i> (E)
	<i>Rana esculenta</i> (E)	RL <i>esculenta</i> (E)	RR <i>ridibunda</i> (R)

Numerosi studi dimostrano inoltre che *R. esculenta* ha una capacità adattativa superiore rispetto alla specie parentale; questo sembra essere dovuto essenzialmente all'elevato grado di eterozigosi del suo genoma, che ne aumenta la fitness potenziale ampliando il range di variazione di parametri ambientali che questa specie può tollerare (Rist *et al.*, 1997; Vorburger, 2001; Venanzi, 2003).

Ci sono tre caratteristiche principali che rendono le rane verdi particolarmente sensibili nei riguardi della qualità delle acque:

- Come gli altri vertebrati, si trovano ai più alti livelli della catena alimentare. Perciò sono in grado di rispondere sensibilmente alla presenza di sostanze nocive e riescono a dare informazioni riguardanti anche i livelli trofici inferiori.
- Possiedono una sensibilità agli inquinanti superiore rispetto agli altri vertebrati acquatici, come i pesci o gli uccelli, dal momento che esse realizzano gli scambi necessari per la respirazione e l'osmoregolazione attraverso la cute. Sono dunque soggette ad assorbire, attraverso l'intera superficie del corpo, le eventuali sostanze tossiche presenti nell'acqua (Boncompagni *et al*, 2002).
- Il loro ciclo vitale si compie in due ambienti: quello terrestre e quello acquatico, cui sono legate per la deposizione delle uova e per lo sviluppo larvale. Questa circostanza fa sì che le rane verdi siano condizionate dalle caratteristiche ambientali di due diversi habitat, rendendole capaci di integrare e manifestare gli effetti di disturbi di natura diversa: pH elevato, modificazioni della costa, scarsa quantità di ossigeno disciolto, presenza di sostanze tossiche nelle acque, limitata disponibilità di cibo, ecc..

A conferma della validità di questo sistema come bioindicatore sono i risultati di alcuni studi condotti sui girini di *R. ridibunda*, *R. lessonae* e *R. esculenta*, finalizzati a valutare le differenze nella loro capacità competitiva. E' risultato che le dimensioni corporee ed il tempo di metamorfosi dipendono dalle condizioni ambientali, ma il numero totale dei metamorfosati dipende dalle interazioni tra il genotipo larvale e l'ambiente. E' quindi confermato che la competitività tra i girini delle due specie di rana è differenziata: mentre *R. esculenta* tende a prevalere in ambienti disturbati, *R. lessonae* ha maggior successo in condizioni ambientali costanti, come indicato dai tassi di metamorfosi e di sopravvivenza, dalla velocità nel raggiungimento della metamorfosi e dalla taglia raggiunta (Semlitsch & Reyer, 1992; Semlitsch *et al.*, 1993). Inoltre, come accennato precedentemente a proposito del grado di stress ambientale, è stato osservato che i girini di *R. esculenta* prevalgono in condizioni ambientali limite, come dimostrano anche alcuni esperimenti condotti per indagare circa gli effetti del fungicida agricolo Trifeniltina (TPT) e del pH sulla crescita e lo sviluppo dei girini del complesso L-E. In condizioni di pH elevato ed in presenza di TPT disciolto nelle acque la specie *R. lessonae* è risultata più vulnerabile (Semlitsch *et al.*, 1995; Fioramonti *et al.*, 1997).

In conseguenza delle differenze sopra discusse, nella capacità di adattamento delle due specie ai fenomeni di disturbo ambientale, la proporzione della specie ibrida rispetto al suo parentale può variare dal 5 al 95%. (Hellriegel & Reyer, 2000). Si è quindi pensato di risalire all'inquinamento dell'ambiente calcolando la frequenza relativa delle due specie di rane verdi. Il gruppo di ricerca di

Ecologia dell'Università degli Studi della Tuscia ha cercato di arrivare alla validazione di un indice biotico basato sul bioindicatore complesso *Rana esculenta*. Per raggiungere tale obiettivo si sono analizzate le frequenze misurate in diversi transetti su fiumi Italiani e si sono messe in relazione con indici di natura diversa; da tali ricerche è stato possibile affermare che tra i vari indici biotici e bioindicatori presi in considerazione esiste generalmente una buona correlazione. In alcuni casi le rane del complesso *esculenta* tendono ad essere più “pessimiste” rispetto agli altri indici, suggerendo probabilmente una loro maggiore sensibilità alla presenza di pesticidi piuttosto che ad altri fattori come la scarsità di ossigeno (Andreani *et al.*, 1997; Andreani, 1999; Plenet *et al.*, 2000; Andreani *et al.*, 2003; Venanzi, 2003). Sulla base di una tabella in cui vengono associati gli intervalli delle frequenze relative e le cinque Classi di Qualità fluviale, è stata proposta la conversione delle frequenze relative delle due specie in un indice biologico, l'indice Rana esculenta (I.R.e.) (Andreani *et al.*, 2003). Questo indice viene applicato da pochissimo tempo negli ambienti fluviali e dovrà essere consolidato per permetterne un utilizzo su larga scala.

Per quanto riguarda gli ambienti lacustri le ricerche sono ancora agli inizi: sono state studiate le popolazioni di rane verdi di due sistemi di acque lentiche del Lazio, il Lago di Mezzano (Mazzetti, 1998) ed il Lago di Vico (Scialanca *et al.*, 1999; Mucciolo, 2000).

1.1.2 Caratteristiche morfologiche ed etologiche delle rane verdi

Nella regione paleartica si conoscono principalmente sette specie di rane verdi: *R. ridibunda*, *R. lessonae*, *R. shqipericana*, *R. epeirotica*, *R. bedriagae*, *R. perezi* e *R. saharica*.

Sono anche presenti diversi taxa di origine ibrida che possiedono una copia del genoma “ridibunda”. In particolare in Europa centro-orientale e in Italia la specie parentale è *R. lessonae* e la linea filetica ibrida è rappresentata da *R. esculenta*. Le popolazioni di rane verdi in Italia sono generalmente costituite da sistemi misti, formati dalle due specie citate sopra.

Gli individui adulti di *Rana lessonae* presentano una lunghezza del corpo compresa tra i quattro e gli otto centimetri. E' presente un marcato dimorfismo sessuale: i maschi sono più piccoli, con gli arti anteriori più robusti e sono muniti di un cuscinetto sul primo dito della mano che durante la fregola si copre di spinule cornee. Tale struttura permette ai maschi di aggrapparsi alle femmine trattenendole sotto le ascelle per la copula. I maschi sono anche provvisti di sacco vocale ai lati della gola, estroflettibile durante il canto. Il colore del dorso varia da individuo ad individuo

passando dal verde al bruno, al nero e di norma presenta una linea che dalla punta del muso giunge sino all'apice posteriore. Molto spesso all'altezza dei fianchi vi sono macchie bronzate ricche di ghiandole. Il ventre appare sempre chiaro, in genere bianco con macchie nerastre.

La rana verde si nutre di invertebrati e di piccoli vertebrati. Gli individui possono allontanarsi dall'acqua anche per chilometri, facilitati dal tubercolo del piede che gli permette di scavare il terreno e nascondersi sotto terra quando le condizioni climatiche sono sfavorevoli. Svernano sotto il fango da novembre a fine febbraio. Da aprile a giugno, nel periodo dell'accoppiamento, i maschi cantano sia di giorno che di notte; le larve fuoriescono dalle uova dopo circa una settimana dalla deposizione e metamorfosano in due-tre mesi, la maturità sessuale viene raggiunta dopo un anno.

1.2 – Il monitoraggio biologico

Per poter individuare la pressione esercitata da una qualsiasi forma di inquinamento è utile affidarsi ai descrittori biologici che, oltre a fornire risposte sulla situazione complessiva dell'ecosistema, detengono una sorta di “memoria ambientale”. L'uso dei bioindicatori nel monitoraggio delle acque interne è ormai previsto dalla normativa nazionale ed internazionale; in Italia il Decreto Legislativo 152/99, in proposito della definizione dello stato di qualità ambientale dei laghi, affianca alle analisi da effettuarsi sulla matrice acquosa determinazioni sul biota che possano eventualmente integrare le prime (D. Lgs. 11-5-1999, n. 152- All. 1, Cap.3).

Questo tipo di approccio presenta alcuni vantaggi e limiti qui di seguito discussi:

Vantaggi:

- Consente di segnalare episodi saltuari di inquinamento, gli organismi sono infatti sentinelle sempre presenti nelle acque. Gli scarichi saltuari di sostanze tossiche a causa della loro episodicità possono sfuggire ad un controllo chimico, mentre determinano effetti su organismi acquatici.
- Permette di segnalare la presenza di fattori di disturbo che sfuggono ad altri metodi di indagine. Lo stress per un organismo non si identifica necessariamente in variazioni di concentrazione di determinate sostanze. Si pensi ad esempio alle profonde modificazioni causate da alterazioni del regime idrologico.
- Risponde anche alle interazioni tra diversi fattori di stress, in quanto gli organismi rispondono all'insieme degli stimoli nei loro effetti sinergici ed antagonisti.
- Nella maggior parte dei casi non richiede costose attrezzature.

Limiti:

- E' difficile evidenziare relazioni ben definite di causa-effetto tra fattori di stress e risposta della comunità. I metodi di analisi dei dati tendono ad evidenziare pochi fattori responsabili della struttura osservata e, focalizzando l'attenzione sulle componenti più rilevanti, si possono perdere di vista altri elementi (esistenza di microhabitat, particolare andamento climatico nel periodo studiato) che influiscono in misura minore sulle caratteristiche della comunità.
- Gli indici biotici non forniscono sempre informazioni precise sulla natura degli inquinanti e non consentono quindi un monitoraggio delle acque alternativo all'analisi chimica.

Un organismo è sempre il prodotto del suo ambiente di vita e quindi ogni organismo può costituire un indicatore delle condizioni dell'ambiente. Per esigenze pratiche occorre però delimitare l'ambito di definizione degli indicatori biologici dal campo enormemente più vasto delle risposte biologiche.

L'indicatore biologico è una risposta che, per le sue caratteristiche, si dimostra utile per stimare o prevedere gli effetti di varie cause di stress dell'ambiente. Se poi, nell'interpretazione di un determinato processo si possono collegare fra loro i segnali di più indicatori, essi possono essere combinati a formare un indice (Campatoli *et al.*, 1994).

Nella scelta degli indicatori appropriati per la protezione ambientale si devono ricercare particolari attributi; un indicatore "ideale" dovrebbe, in primo luogo, indicare senza ambiguità, attraverso la sua presenza, parametri ambientali precisi. Tale ideale è raramente realizzato, ma un buon indicatore ambientale dovrebbe anche:

- Fornire informazioni traducibili in un scala di valori di comprensione universale, che abbracci tutta l'ampiezza delle possibili variazioni e che disponga di unità di misura. (Campatoli *et al.*, 1994)
- richiedere un campionamento semplice da realizzare, senza il bisogno di numerosi operatori o di un equipaggiamento costoso
- avere una distribuzione cosmopolita; infatti l'assenza di specie con esigenze ecologiche ristrette e con una distribuzione limitata, potrebbe non essere necessariamente correlato a fenomeni di inquinamento
- essere associati ad abbondanti dati sulla loro autoecologia
- poter essere allevati con facilità in laboratorio, in modo tale da permettere uno studio più approfondito sulle loro risposte alle modifiche ambientali (Hellawell, 1986).

Nel termine “monitoraggio biologico” vengono compresi sia i test di tossicità sulle risposte biomolecolari e fisiologiche di organismi sottoposti alla presenza di sostanze tossiche, sia il monitoraggio degli ecosistemi per valutarne l’integrità a seguito di perturbazioni ambientali.

1.3 I parassiti come indicatori biologici

Alle osservazioni sulla frequenza delle specie di rane appartenenti al complesso *Rana esculenta* ed il loro rapporto con le variabili ambientali, il presente lavoro si propone di aggiungere lo studio della fauna parassitaria di questi anfibi. I parassiti sono caratterizzati da cicli vitali che coinvolgono diversi ospiti. Chiaramente questi cicli di vita sono peculiari per ogni specie, e prevedono, in alcuni casi, fasi a vita libera nel terreno, utilizzo di ospiti “provvisori” come ospiti paratenici, fasi a vita libera in acqua, e spesso il passaggio obbligato in specifici ospiti intermedi, dentro i quali devono trascorrere una o più fasi del loro ciclo biologico. Questa varietà nello sviluppo dei loro cicli conferisce a queste specie un legame diverso, l’una dall’altra, agli ambienti con i quali vengono in contatto, sebbene, nell’ospite definitivo, il loro “microhabitat” possa coincidere. Sfruttando la conoscenza dei cicli di questi parassiti e la loro biologia, si è pertanto in grado di trarre informazioni relative al comparto ambientale che hanno attraversato e trarne informazioni utili al monitoraggio ambientale.

In questi ultimi anni le popolazioni di parassiti e il loro rapporto con i propri ospiti sono stati utilizzati come ulteriori indicatori di stress ambientale, di biodiversità, struttura delle reti trofiche, etc., in contesti multidisciplinari. I parassiti, avendone conosciuto la biologia, il ciclo vitale, la storia evolutiva, possono essere dei validi bioindicatori di particolari e puntuali forme di degrado ambientale. Studi di tipo filogenetico di diversi sistemi anfibio-parassita hanno fornito sia preziose indicazioni relative ai patterns biogeografici di interrelazione ospite parassita, ed anche alla natura delle relazioni coevolutive tra i vari ospiti e tra questi ed i parassiti (Ernst & Ernst, 1980; Platt, 1992).

Studiando la parassitofauna di una popolazione di anfibi nel suo complesso, si ottengono molteplici informazioni: la diversità di specie dei diversi taxa di elminti è tale che, avendo i parassiti cicli vitali e caratteristiche ecologiche molto diverse tra loro, rispondono anche in modo diverso alle alterazioni ambientali. Oltre alle informazioni sullo stato ambientale, l’analisi della parassitofauna di popolazioni di anuri potrebbe anche fornire importanti informazioni in merito ad alcuni aspetti del declino globale degli anfibi. Alcuni Autori sono infatti convinti che questo aumento di mortalità in alcune popolazioni sia causato dall’emergenza di “nuovi” patogeni virulenti, magari specie “alloctone” ed “invasive” introdotte accidentalmente, verso i quali le popolazioni di anfibi locali

non avrebbero evoluto un'effettiva difesa immunologica (Daszak *et al.*, 1999). Un'ulteriore ipotesi è anche quella che patogeni e parassiti, a cui comunemente l'ospite controbatte con una risposta immunitaria, trovino una "strada spianata" in seguito al calo delle difese immunitarie dell'ospite provocato da "stressors" ambientali di origine antropica, quali ad es. inquinanti e pesticidi. In aree di intensa attività agricola, l'andamento della parassitofauna tende a seguire "trend" legati alle caratteristiche ecologiche della zona in esame e al tipo di inquinanti che vengono rilasciati. E' stato riscontrato, per esempio, che esiste un legame tra aumento dello stato trofico di un bacino e l'abbondanza di trematodi digenei, spiegato dal fatto che l'aumento della produzione algale rende disponibili maggiori risorse alimentari per i gasteropodi, che sono ospiti secondari obbligati per questo taxa di parassiti. L'aumento di trofia, se da un lato può incrementare la presenza di trematodi, dall'altro può portare a fenomeni di immunosoppressione in popolazioni di anfibi che, di conseguenza, si trovano più esposti a parassiti più patogeni (Marcogliese *et al.*, 2008).

E' stato osservato da studi condotti in Canada da King, su popolazioni di *Rana pipiens*, che l'attività agricola e l'impatto sull'ambiente che questa comporta, tendeva ad influire in modo cospicuo sull'entità delle infestazioni dei vari parassiti sugli anuri ospiti. Le diverse sostanze rilasciate in natura possono influenzare in modo differenziato i diversi tipi di parassiti, in modo spesso dipendente dalle caratteristiche del loro ciclo biologico (King *et al.*, 2007). Studi condotti in laboratorio mostrano come la patogenicità di parassiti con ciclo monoxeno, come *Rhabdias ranae*, risultava aumentare in ambienti caratterizzati da un forte stress ambientale ed alte concentrazioni di pesticidi, come conseguenza dell'immunosoppressione degli ospiti (Gendron *et al.*, 2003). Tuttavia King fa anche notare come *R. ranae*, in ambiente naturale, denoti un andamento diverso, dimostrando una spiccata sensibilità all'inquinamento da pesticidi (King *et al.*, 2007), probabilmente imputabile alla fase a vita libera nel terreno del suo ciclo biologico monoxeno.

1.4 Il declino globale degli anfibi

Negli ultimi trent'anni è stata documentata a livello globale un'elevata erosione della biodiversità, che sembrerebbe coinvolgere quasi tutte le classi di piante ed animali (Lawton & May 1995). Parte di questa complessiva crisi di biodiversità è rappresentata dal declino globale degli anfibi (Blaustein *et al.* 1994; Houlihan *et al.* 2000; Stuart *et al.* 2004).

Molte specie di rettili ed anfibi, negli ultimi anni ed in varie parti del mondo, sono venute incontro ad un allarmante declino demografico, in taluni casi talmente grave da causare la scomparsa di intere popolazioni ed in casi ancor più gravi l'estinzione di specie. Un declino generalizzato che ha inizio negli anni '50 con un picco negli anni '60 e continua con un tasso minore tutt'ora (Houlihan *et al.*, 2000). Più di 500 popolazioni di rane e salamandre sono in declino, e molte sono in un regime speciale di conservazione (Alford & Richards, 1999). In alcune aree, il declino delle popolazioni di anfibi sembra essere maggiore di quello di altri gruppi tassonomici (Pounds *et al.* 1997, 1999, Stuart *et al.* 2004). Vari fattori, tra i quali patogeni, la diffusione di malattie e fungosi, l'introduzione di specie alloctone, contaminanti, distruzione dell'habitat, cambiamenti climatici globali, l'aumento delle radiazioni UV-B, stanno contribuendo a questo fenomeno (Alford & Richards, 1999; Blaustein & Kiesecker, 2002; Beebee & Griffiths, 2005).

Il problema ha oramai assunto carattere globale e sono decine gli articoli che ogni mese riempiono le pagine di importanti riviste scientifiche per documentarne cause ed effetti ed avallare ipotetiche cause cui ricondurre questo incidente fenomeno.

Gli anfibi, considerati "organismi sentinella" vista la loro sensibilità alle caratteristiche ambientali, sembrano rispondere ai cambiamenti climatici ed ambientali oramai globalmente evidenti con forti fluttuazioni delle popolazioni, ed in taluni casi, con la scomparsa delle stesse. La maggior parte delle specie di questo ampio gruppo tassonomico vive una fase larvale a strettissimo contatto con l'acqua, per poi separarsi da questo mezzo e passare ad una fase più terrestre. Proprio per questa caratteristica del loro ciclo vitale, gli anfibi sono soggetti a stressor chimico-fisici connessi ad entrambi gli ambienti in cui vivono.

Un non trascurabile aspetto del fenomeno è che il declino di alcune popolazioni di anfibi si manifesta in aree che risultano relativamente poco disturbate dall'uomo e le sue attività in modo diretto, come parchi nazionali, aree protette, zone rurali distanti da grandi centri urbani (Blaustein & Bancroft, 2007).

Il declino delle popolazioni di anfibi non si manifesta in modo omogeneo, e tende a variare non solo di regione in regione, ma anche tra diverse popolazioni della stessa specie. Piuttosto che singole cause, sembra emergere da diversi studi che sia la sinergia tra vari stress chimico-fisici

ambientali, i patogeni e la competizione con eventuali specie introdotte, ad alterare il vulnerabile status di popolazioni fortemente adattate al proprio ambiente e molto sensibili a variazioni.

Malgrado il fenomeno sia oramai globale e la mole di studi che cerca di individuarne le cause sia molto cospicua, ancora molte ombre rimangono al riguardo, e si cerca un fattore comune che possa spiegare un effetto dai risultati drammaticamente simili in aree così diverse e disomogenee.

Radiazioni UV-B

Le radiazioni UV-B (288-315nm), tra le più dannose per i sistemi biologici di quelle che incidono sulla superficie terrestre, possono essere direttamente letali nei confronti di alcune specie di anfibi, ma nella maggior parte dei casi hanno effetti deleteri sulle uova, sulla metamorfosi e sullo sviluppo. L'azione deleteria delle radiazioni UV-B si ripercuote sugli anfibi anche in modo indiretto, in quanto queste radiazioni sono in grado di alterare molecole e composti già di per se nocivi, aumentandone la tossicità.

Contaminanti ambientali

Gli anfibi risultano essere esposti e danneggiati da un ampio numero di contaminanti ambientali, quali pesticidi, erbicidi, fungicidi, fertilizzanti, e numerose altre sostanze inquinanti (Blaustein *et al.*, 1997; Sparling *et al.*, 2000; Boone & Bridges, 2003). Parte di questi contaminanti ha spesso una distribuzione locale, ed interessano popolazioni di anfibi che vivono in aree geografiche delimitate, dove attività agricole, produttive o antropiche impattano fortemente il territorio; in altri casi invece contaminanti possono avere un'ampia dispersione per via aerea, ricadendo poi al suolo attraverso le piogge, ed andando ad impattare aree lontane dal punto di origine. Lo stesso può accadere nei corsi d'acqua, dove la diluizione può apparentemente mitigare gli effetti letali di alcuni di questi composti, il cui accumulo nelle catene trofiche può però in seguito manifestarsi con altrettanto gravi conseguenze sugli organismi.

Contaminanti trasportati per via aerea nell'atmosfera hanno il potenziale effetto di andare a colpire popolazioni di anfibi in zone remote, non impattate in modo diretto da attività antropiche; anche bassi livelli di inquinanti rilasciati da precipitazioni atmosferiche sono potenzialmente dannosi verso gli anfibi (Blaustein *et al.*, 2003).

I pesticidi possono essere letali per gli anfibi, come dimostrato da molteplici studi sperimentali (Cooke, 1981; Blaustein *et al.*, 1997; Sparling *et al.*, 2000; Boone & Bridges, 2003). Gli effetti più comuni sembrano tuttavia essere meno diretti, come la riduzione della crescita e dello sviluppo, o la comparsa di anomalie comportamentali. Oltre ai pesticidi, altre sostanze di origine antropica, come i nitrati presenti in zone con attività agricole, pastorali, o rilasciati da scarichi industriali ed urbani,

possono avere un impatto negativo sulle popolazioni di anfibi. Alte concentrazioni di nitrati, di ammonio, e di pesticidi condizionano negativamente lo stadio larvale degli anfibi (Withgott, 2002; De Wijer *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2004; Griffis-Kyle & Ritchie, 2007).

Alcuni studi hanno dimostrato come l'esposizione a pesticidi possa provocare immunosoppressione degli ospiti, riscontrabile con un aumento dei livelli di infestazione di batteri e funghi parassiti (Carey, 1993; Taylor *et al.*, 1999).

Temperatura

L'innalzamento globale della temperatura ha degli effetti diretti sugli anfibi, molto dipendenti dall'umidità del suolo e necessariamente legati nel periodo riproduttivo a zone umide. Soprattutto le specie che depongono le uova in pozze effimere, vedono aumentata la mortalità delle forme larvali a causa della più veloce evaporazione dell'acqua nei loro siti di riproduzione.

Gli anfibi sono ectotermi, la loro pelle è umida e permeabile e le uova sono sprovviste di guscio: essendo così direttamente esposte a suolo, acqua e radiazione solare, possono assorbire facilmente sostanze tossiche dal terreno, e sono molto esposti a fenomeni legati a temperature e precipitazioni (Blaustein *et al.*, 2003, 2007).

Patogeni (funghi e protozoi)

Un'altra causa che va assumendo sempre maggiore importanza relativamente al declino degli anfibi, è quella della diffusione delle malattie, ed in particolare della chitridiomicosi causata da *Batrachochytrium dendrobatidis*, originaria dell'Africa e diffusasi nel resto del pianeta mediante il commercio internazionale di *Xenopus laevis* (Weldon *et al.*, 2004; Fisher & Garner, 2007). In Italia la presenza di questo fungo è stata riscontrata finora solamente in Umbria su *Rana esculenta* (Simoncelli *et al.*, 2005), su *Bombina pachypus* nell'Appennino Tosco-Emiliano (Stagni G *et al.*, 2004) e su *Euproctus platycephalus* in Sardegna (Bovero *et al.*, 2006). Condizioni climatiche inusuali possono stressare anfibi, e potenzialmente sono in grado di alterarne lo sviluppo ed aumentare la suscettibilità verso la chitridiomicosi, così come verso altre patologie (Kiesecker *et al.*, 2001). Anche l'innalzamento delle temperature sembrerebbe svolgere un ruolo chiave, creando condizioni favorevoli alla trasformazione del fungo da una forma quiescente saprofitica ad una forma patogena, con conseguente cambiamento delle interazioni tra le specie da mutualistiche a parassitiche (Di Rosa *et al.*, 2007).

Un altro enigmatico patogeno, appartenente al gruppo dei Mesomicetozoi, *Amphibiocystidium ranae*, si è aggiunto di recente alle specie identificate come molto patogene, ed è stato rinvenuto in popolazioni di rana verde presso Solomeo, (Umbria, Italia centrale).

Parassiti (metazoi)

Ci sono molteplici legami tra il disturbo antropico e l'emergenza di particolari specie parassita, causa di patogenità e mortalità di anfibi (Johnson *et al.*, 2001; Kiesecker, 2002; Carey *et al.*, 2003; Johnson & Chase, 2004). I parassiti possono regolare l'abbondanza della popolazioni ospite tramite un aumento della mortalità degli ospiti maggiormente infestati (May & Anderson, 1978).

Un esempio è lo studio sperimentale condotto sul nematode polmonare *Rhabdias bufonis* nel rospo comune, *Bufo bufo*: l'infestazione da *R. Bufonis* riduce la crescita, le performances fisiche e la sopravvivenza delle fasi di sviluppo giovanili dei rospi (Goater & Ward, 1992; Goater 1994). E' oramai evidente che l'interazione tra inquinanti derivati da attività agricole e parassitismo giochi un importante ruolo nel declino globale di molte popolazioni di anfibi (Daszak *et al.*, 1999).

AREA DI STUDIO

2.0 Il lago di Vico

Il Lago di Vico è situato in provincia di Viterbo ad un'altitudine di 510 m sul livello del mare; il bacino, di origine vulcanica, è completamente racchiuso dalla cerchia dei Monti Cimini ed è inserito nell'omonima riserva naturale istituita nel 1982, dell'estensione di circa 3200 ettari.

2.1 Caratteristiche morfologiche, climatologiche ed idrologiche dell'area oggetto di studio

L'apparato vulcanico di Vico è caratterizzato da una cerchia calderica occupata dal lago omonimo; i morfotipi collinari culminano con il Monte Fogliano (965 m s.l.m.) e con il Monte Venere (838 m s.l.m.). Le pendici esterne della caldera degradano verso il Mar Tirreno ad Ovest e la Valle del Tevere ad Est.

Una sintesi delle principali caratteristiche morfologiche, climatologiche ed idrologiche dell'area del Lago di Vico è presentata in Barbanti (1969) ed in Barbanti *et al.* (1971).

I tipi litologici prevalenti del bacino imbrifero sono le formazioni vulcaniche con la prevalenza dei tufi, più o meno consolidati, rispetto alle lave. Le precipitazioni sono piuttosto abbondanti, come conseguenza dell'altitudine: relativamente al periodo 1919-1964, è stata calcolata una media di 1406 mm per anno. Il regime pluviometrico è di tipo transizionale fra quello sublitoraneo-appenninico e quello marittimo; manca infatti un secondo picco primaverile e le precipitazioni meteoriche sono concentrate nel semestre autunno-invernale, con un picco massimo a novembre. Il livello idrometrico del lago, presenta un'escursione annuale piuttosto contenuta, con un massimo in primavera ed un minimo in autunno. Nel periodo 1952-1969 l'escursione media annuale è stata di 67 cm. Il lago non ha immissari e l'acqua entra nel bacino direttamente con le piogge, per dilavamento superficiale del bacino idrografico e, probabilmente, anche per immissione dalla falda acquifera sottostante. L'unico emissario del lago è il "Rio Vicano", un canale artificiale la cui portata viene regolata attraverso una chiusa. Il tempo teorico di ricambio idrico è relativamente elevato (17 anni), come conseguenza di una modesta vivacità idrologica: l'areale contribuente è infatti di superficie molto limitata, soprattutto se confrontato con il volume d'acqua raccolto nella conca lacustre.

Negli ultimi vent'anni il Lago di Vico è andato incontro ad un processo di progressivo deterioramento dovuto essenzialmente all'eutrofizzazione (Bazzanti *et al.*, 1989, 1994; Provini *et al.*, 1992). Il carico esterno di fosforo che ogni anno giunge al lago è infatti notevolmente aumentato: si è passati da 1430 kg/anno nel 1970 a circa 2031 kg/anno nel 1990 (Leone & Marini, 1993). Ciò può essere messo in relazione con una diversa utilizzazione del terreno prospiciente le

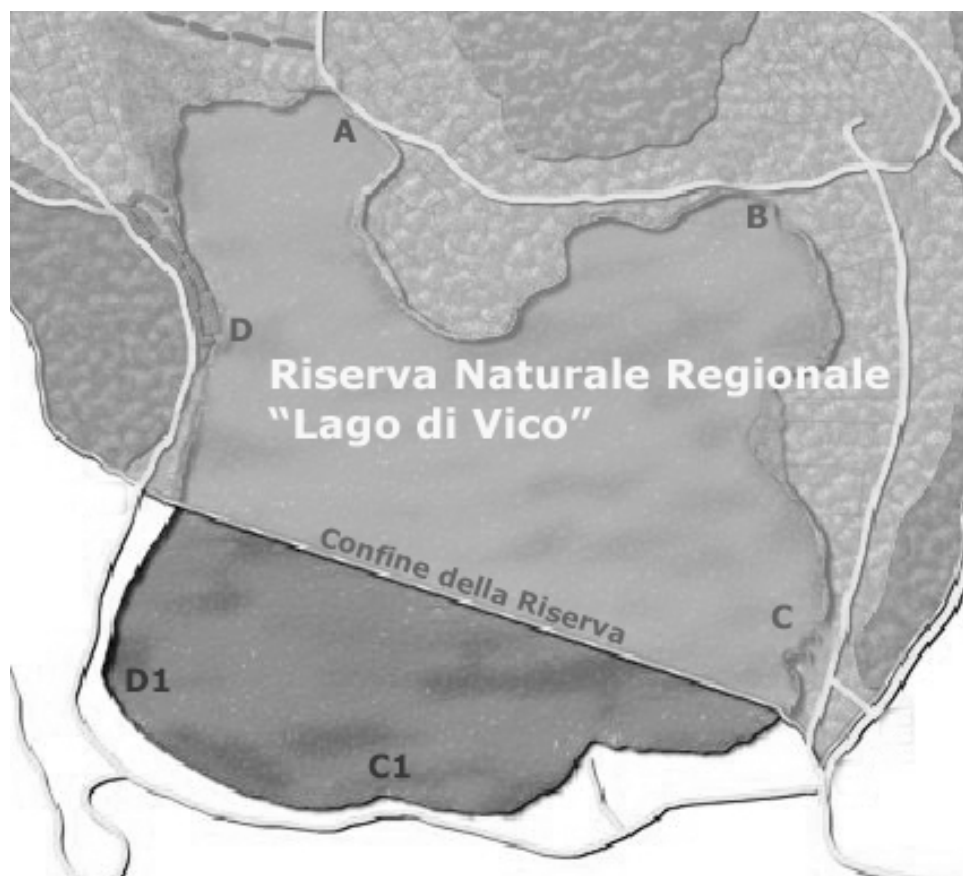
rive e con una sostanziale modificazione delle attività umane che insistono sul bacino imbrifero del lago: alla riduzione di boschi, pascoli e paludi è corrisposto un concomitante aumento del terreno coltivato e di quello urbanizzato. Oltre che all'estensione del suolo coltivato, questo incremento del carico esterno è attribuibile anche ad un cambiamento delle tecniche di lavorazione del terreno ed ad un aumento nell'uso dei fertilizzanti. Inoltre, sebbene la quota del carico di fosforo dovuta agli animali da pascolo si sia drasticamente ridotta dal 1970 al 1990, è notevolmente aumentata quella connessa con le attività ricreative (bar e ristoranti): si è passati infatti dalle 20.000 presenze per anno del 1970 alle circa 200.000 presenze per anno del 1990 (Leone & Marini, 1993).

Il lago di Vico costituisce un esempio di territorio che, seppur influenzato secolarmente dalla presenza dell'uomo, ha mantenuto un elevato valore naturalistico e paesaggistico, cosa che ne fa un importante punto di riferimento turistico [Leone, 1998].

2.2 La Riserva Naturale Regionale “Lago di Vico”

La Riserva è stata istituita nel 1982 con la Legge Regionale n° 47, ampliata con la L.R. n° 81 del 1985; copre una superficie di 3.300 ettari (*Fig. 2.1*).

Fig. 2.1 Carta del lago di Vico con i confini della Riserva Naturale



L'elemento caratterizzante della fauna del Lago sta nella presenza di una ricchissima avifauna acquatica, per la quale la Riserva rappresenta uno dei luoghi di svernamento e di sosta più importanti del Lazio. Durante il periodo invernale, per circa 5 mesi, la Riserva offre rifugio ed alimento a più di 5000 tra folaghe, anatre selvatiche di varie specie, tra cui la moretta e il moriglione, le cosiddette anatre tuffatrici, che vivono dove l'acqua è alta e si tuffano per alimentarsi delle alghe che crescono sul fondo del lago. Le anatre di superficie invece, come il germano reale, l'alzavola, la marzaiola, il codone, il mestolone e la canapiglia, frequentano le acque basse intorno ai canneti. Nelle acque aperte del lago, soprattutto nella stagione invernale, troviamo numerosi il gabbiano reale ed il gabbiano comune.

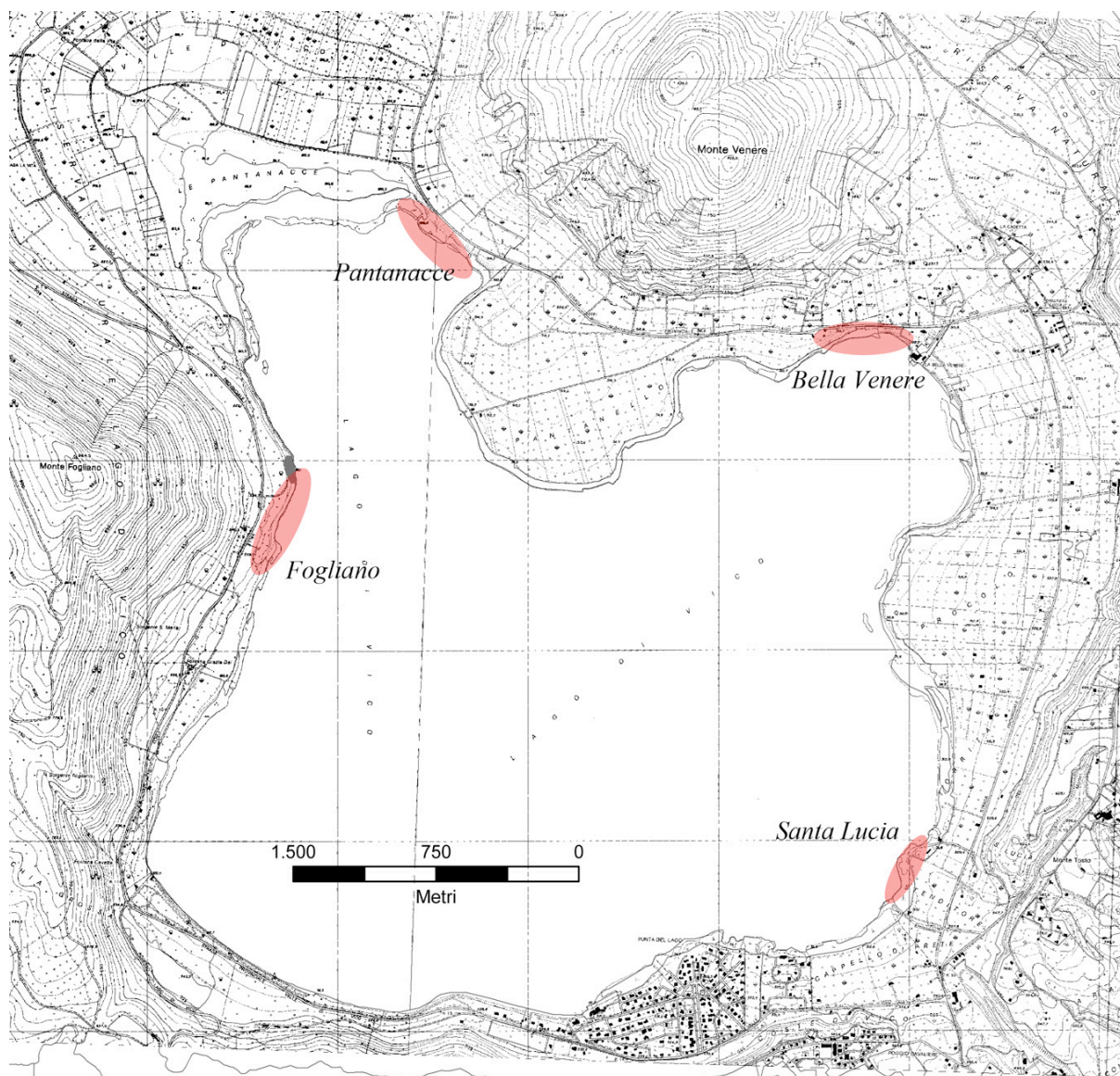
3.1 Stazioni di campionamento e monitoraggio

Sono state scelte 4 diverse stazioni, in modo da coprire diversi punti del lago ed essere rappresentative della situazione generale, tutte caratterizzate comunque dalla presenza di anfibi. La morfologia e la collocazione geografica del lago è tale che alcuni punti del bacino risultano ecologicamente disomogenei tra loro, sia per caratterizzazione ecologica che per esposizione ai venti ed illuminazione, ma soprattutto per il tipo e l'intensità dell'impatto antropico.

Le stazioni monitorate (*Fig. 2.2*) sono state le seguenti:

- Pantanacce (A)
- Bella Venere (B)
- S.Lucia (C)
- Fogliano (D)

Fig. 2.1 : Carta del lago di Vico e disposizione delle stazioni di monitoraggio.



- **Pantanacce (A)**



La stazione “Pantanacce” si trova in direzione nord rispetto al bacino lacustre, ed è caratterizzata dalla presenza, sul litorale, di zone umide ed aree occupate da canneti, intervallate a zone di intensa attività agricola. Queste aree a coltivo, costituite per lo più da noccioleti, in alcuni casi sono situate proprio a ridosso di tratti di costa. L’abbondante vegetazione acquatica è caratterizzata da idrofite radicate flottanti o affioranti, il substrato è quasi completamente formato da limo. Dal punto di vista antropico/turistico, è forse la parte di lago che registra il minor numero di presenze, vista la mancanza di spiagge, il fondale limaccioso ed i canneti che occupano quasi interamente il litorale.

La zona ospita una ricchissima e variegata avifauna acquatica, soprattutto nel periodo invernale e primaverile, mentre la presenza di molluschi gasteropodi nelle acque costiere si è dimostrata estremamente esigua, probabilmente a causa delle caratteristiche non ottimali del substrato litoraneo, molto sabbioso e limaccioso.

- **Bella Venere (B)**



La stazione “Bella Venere” si trova nell’area nord-est del bacino del lago di Vico, sulla destra della stazione balneare e turistica più grande del lago. Sui declivi limitrofi alle sponde, è molto intensa l’attività agricola. Probabilmente è l’area in cui la qualità ambientale dell’ecosistema risente maggiormente delle attività antropiche. Il litorale si presenta piuttosto vario, con alternanza di aree sabbiose, canneti e aree sassose.

- **S.Lucia (C)**



La stazione “S.Lucia”, posizionata a Sud Est del lago, è caratterizzata dalla prevalenza di fitti canneti che lasciano spazio a piccole spiaggette. Parte dei terreni retrostanti questa località è coperta da coltivazioni a nocciolo. Il substrato è prevalentemente a sabbia, ghiaia e ciottoli.

L’avifauna migratoria in questa area è presente in modo cospicuo nel periodo di passo invernale e primo primaverile. Sono inoltre presenti in quest’area zone di nidificazione dell’avifauna stanziale. Denotata anche la presenza di nutrie. Nel periodo estivo la zona è frequentata da un discreto numero di bagnanti.

- **Fogliano (D)**

La stazione “Fogliano” si trova sul versante ovest del lago, dove sorge l’omonimo centro studi. La zona è caratterizzata da piccole spiagge alternate a piccole macchie di canneto, sovrastate da una fitta zona boschiva; il substrato si compone di sabbia, ghiaia, ciottoli e limo. In prossimità di questo sito si è riscontrata la presenza di una sorgente di acqua calda.

Cospicua la presenza in zona di avifauna, sia migratoria svernante, che stanziale.

MATERIALI E METODI

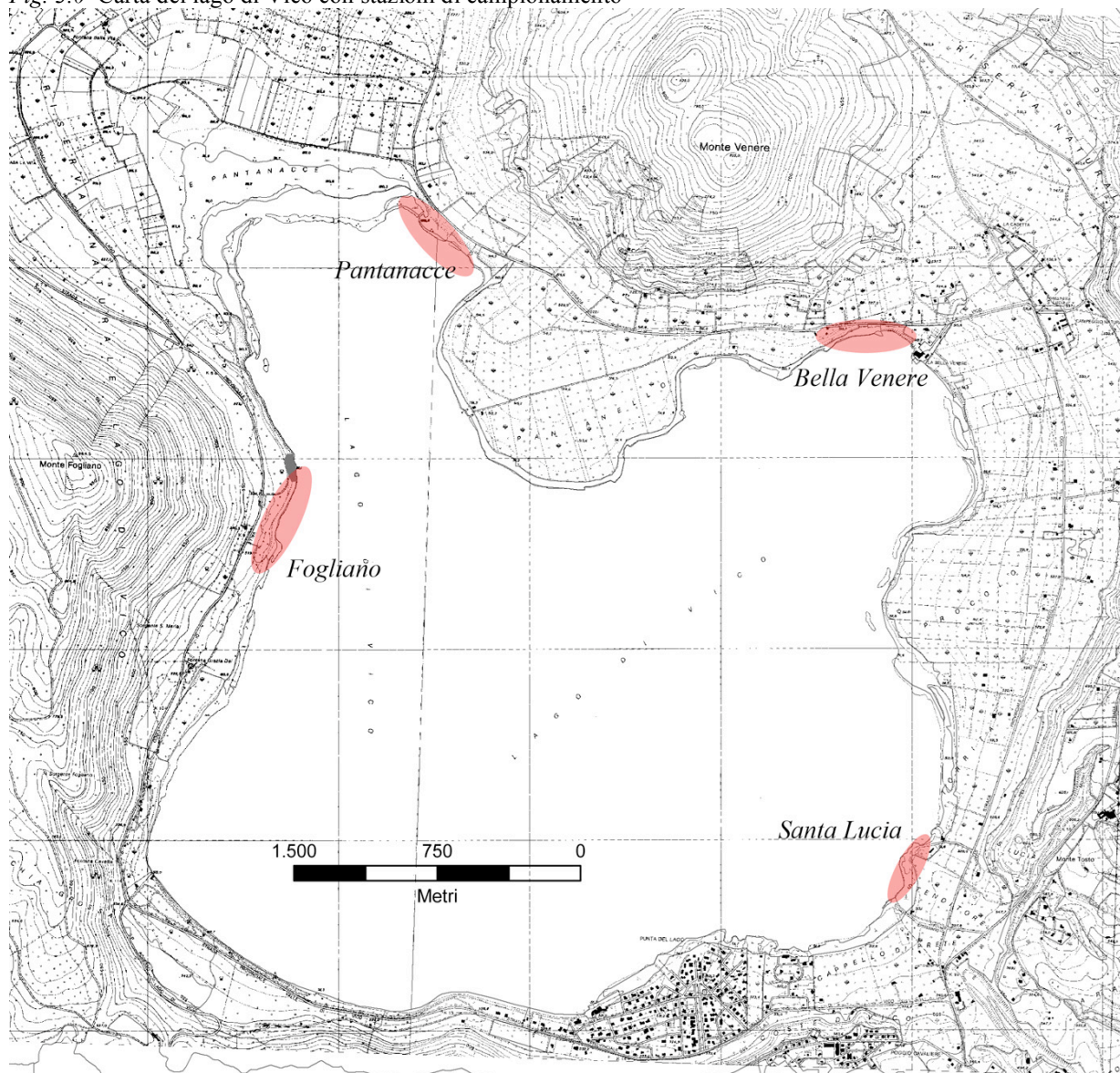
3.1 Campionamento degli anfibi

I campionamenti degli anfibi sono stati condotti nel periodo tra giugno e luglio 2008 e 2009, in 4 diversi siti (*Fig 3.0*). E' stato reperito un totale di 206 esemplari di rana verde, 147 nel 2008 e 59 nel 2009. Si è cercato, durante il secondo anno di campionamento, di mantenere un numero minore di catture per l'analisi parassitologia, al fine di non alterare demograficamente la comunità erpetologica del lago. Venivano però affiancati alle catture per lo studio diretto dei parassiti degli ulteriori prelievi non invasivi della falangina (toe-clipping) di alcuni anuri, utili per poter poi effettuare la valutazione delle frequenze del complesso E/L in modo più attendibile, con una maggiore quantità di campioni, ed un diverso peso statistico.

L'entità dei campionamenti è spesso funzione della domanda alla quale si vuole rispondere; nella maggior parte dei casi per rendere possibili analisi statistiche di fauna parassitaria un campione di circa 20 individui per classe (età, taglia, sesso, località, mese) può essere sufficiente (Goater, 2001).

Gli individui, campionati dopo il tramonto con l'ausilio di torce elettriche, venivano mantenuti vivi fino all'arrivo in laboratorio, dove poi veniva effettuata l'analisi parassitologica. Il metodo di eutanasia adottato è quello riportato nella maggior parte dei lavori recenti e conforme a misure etiche di trattamento di animali, ossia l'immersione degli anuri in una soluzione tampone 0,8% tricaine methane sulfonate (MS-222).

Fig. 3.0 Carta del lago di Vico con stazioni di campionamento



3.2 Analisi chimico fisica delle acque

Le principali variabili chimico-fisiche rilevate durante il periodo di studio sono state (metodologia modificata da Standard Methods, 2006): temperatura dell'acqua ($^{\circ}\text{C}$), conducibilità a 20°C ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, azoto nitrico, nitroso e ammoniacale (mgN l^{-1}), fosforo totale ed ortofosfato (mgP l^{-1}).

3.3 Analisi parassitologica

L'analisi parassitologia veniva condotta preferibilmente su individui soppressi al momento, in modo da poter osservare i parassiti ancora in vita, più facili da individuare, estrarre, ed eventualmente essere mantenuti per una successiva identificazione; in altri casi, si procedeva all'etichettatura dei campioni ed al congelamento a -80°.

Per ogni individuo veniva effettuata la misurazione della lunghezza SVL (Snout-Vent Length), la determinazione del sesso, e ne veniva asportato un campione di muscolo, conservato in freezer a -80°, per la successiva determinazione della specie di rana tramite elettroforesi.

Ogni individuo veniva etichettato con un proprio codice, e tenendo conto della forte eterogeneità del sistema lago di Vico (Cipriani, 2003; Passatore, 2003), affiancato da informazioni sulla precisa località e data di campionamento. Queste informazioni sono risultate essere molto importanti, dal momento che ospiti campionati da diverse stazioni, sebbene nella stessa area geografica, possono ospitare parassiti molto diversi a causa delle locali differenze nella catena alimentare e/o per la presenza-assenza di ospiti intermedi (Aho, 1990).

La dissezione degli anfibi, e l'analisi parassitologica, sono state condotte secondo il protocollo Goater & Goater (2001):

- esame della superficie esterna dell'ospite sia ad occhio nudo che con lo stereomicroscopio, per eventuali cisti e/o ectoparassiti
- analisi della cavità orale
- analisi dei bulbi oculari
- a seguito dell'apertura del ventre dell'ospite, analisi della cavità interna del corpo
- separazione degli organi interni in diverse piastre petri con soluzione biologica
- separazione del canale digerente ed analisi di stomaco, intestino, e retto
- ispezione dei polmoni
- controllo degli altri organi, sia superficie esterna che contenuto
- raccolta dei parassiti dai vari organi, conta degli individui, e successiva identificazione

Tutti i parassiti raccolti venivano conservati in bottigliini Eppendorf, preferenzialmente in alcool a 70°, e quando il numero di individui rinvenuti lo permetteva, venivano divisi ed in parte anche congelati a -80°. Ogni bottigliino veniva etichettato con una sigla indicante la specie ospite, il taxon più vicino possibile alla specie del parassita, località, anno e numero sequenziale.

Alcuni degli individui estratti venivano utilizzati direttamente per l'identificazione della specie, che richiedeva un procedimento diverso tra trematodi e nematodi. I trematodi richiedono un processo di colorazione che possa permettere di differenziare le varie strutture morfologiche interne, chiave dell'identificazione. Per i nematodi invece era sufficiente il montaggio su vetrino in lattofenolo per

permettere l'osservazione al microscopio ottico. La determinazione dei taxa dei parassiti rinvenuti nelle rane è stata condotta nella maggior parte dei casi su base morfologica, mancando per molti gruppi di questi organismi dati di tipo genetico-molecolare già pubblicati. Solo nel caso di un nematoda polmonare, *Rhabdias sp.*, i cui individui sono stati sequenziati geneticamente, l'identificazione morfologica è stata affiancata da analisi di tipo molecolare.

3.4 Metodi genetici per l'identificazione delle rane

3.4.1 Elettroforesi multilocus

I tessuti dei diversi individui di rana verde sono stati conservati alla temperatura di -80°C per essere sottoposti ad indagini elettroforetiche. Solo attraverso l'analisi dei geni o delle proteine è possibile distinguere le due specie di rana, che si differenziano assai poco nella morfologia esterna (Balletto *et al.*, 1986).

Lo studio dei loci genetici saggiati è stato condotto mediante elettroforesi su gel d'amido. È stato utilizzato amido della Connaught Laboratories Ltd. (Starch- Hydrolysed). L'amido viene disciolto in proporzione del 12% nel sistema tampone più adatto ad ogni enzima. La soluzione risultante viene portata ad ebollizione, degassata con una pompa a vuoto, e quindi versata su piastre di plexiglas di 16 X 21,5 X 0,7 cm. Il gel viene poi lasciato raffreddare a temperatura ambiente per circa 20 minuti. L'analisi elettroforetica viene poi condotta su campioni di muscolo omogenati manualmente in 0,5 ml di acqua deionizzata. L'omogenato viene fatto assorbire da cartellini (5 X 5 mm) di carta (Chromatography paper) Whatmann 3 MM. Successivamente tali cartellini vengono inseriti in un taglio longitudinale praticato nel gel da 2,5 a 6 cm dal bordo di uno dei due lati maggiori della piastra. In seguito il gel viene posto orizzontalmente su due vaschette provviste di elettrodi e contenenti il tampone adatto (bridge buffer). Il contatto tra gel ed elettrodi è assicurato da apposite spugnette. La migrazione elettroforetica avviene in una cella termostata a 5°C . Il voltaggio e la durata della migrazione nel campo elettrico dipendono dall'enzima da studiare e dal sistema tampone usato, (range: 70-85 V, 5 ore). Al termine della migrazione i cartellini vengono estratti e il gel viene tagliato con un filo di nylon teso, in modo da ottenere due fette. Su ciascuna di queste fette viene poi versata una soluzione colorante specifica per l'enzima da analizzare. Essa contiene: il substrato su cui agisce l'enzima stesso, il coenzima adatto (in genere NAD o NADP), ed un colorante che si lega al prodotto della reazione catalizzata dall'enzima. Alcune soluzioni coloranti vengono solidificate con agar allo 0,8% in soluzione tampone tris HCl 0,05 M (pH 8,6), precedentemente portato al punto di ebollizione e poi raffreddato a 48°C , mentre altre vengono

utilizzate allo stato liquido. Dopo la colorazione, i gel vengono incubati alla temperatura di 37°C, generalmente al buio, per un tempo variabile da 15 min. a 3 ore, a seconda dell'enzima da evidenziare. I sistemi tampone utilizzati, le condizioni della migrazione elettroforetica e i riferimenti bibliografici per le tecniche di colorazione sono elencati nelle *Tab. 3.1* come riportato da Domenico Venanzi nella sua tesi di dottorato (2003).

Tab. 3.1 Procedure elettroforetiche (Venanzi, 2003)

Enzima	Tamponi di colorazione	coenzimi	enzimi	substrati	metodi di visualizzazione
Pgm	0,05 M Tris/HCl	NADP 5 mg	EC 1.1.1.49	glucosio-1-fosfato 80 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg
	pH 8 30 ml		G6Pdh 0,02 mg		agar 0.8%
Ldh	0,05 M Tris/HCl	NAD 15 mg		acido L-lattico 50 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg
	pH 8 30 ml				agar 0.8%

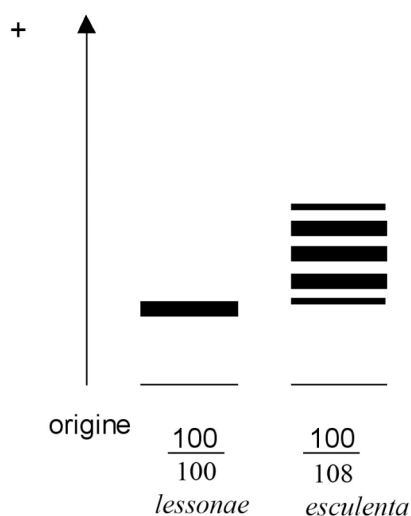
L'attribuzione di ogni individuo saggiato alla specie di appartenenza è stata effettuata tramite lo studio del genotipo ai seguenti loci diagnostici: Lattato deidrogenasi (Ldh-1), 6-Fosfogluconato deidrogenasi (6-Pgdh).

I pattern elettroforetici (zimogrammi) ai singoli loci diagnostici sono rappresentati *Fig. 3.1*. Gli individui omozigoti ad un dato locus presentano in genere un pattern elettroforetico monobanda, in quanto entrambi gli alleli codificano per la stessa sequenza aminoacidica. Per i loci che codificano per enzimi a struttura tetramerica (es. Ldh-1, *Fig. 3.1*), le possibili combinazioni dei due tipi di catene negli eterozigoti risultano in cinque tipi di tetrametri (aaaa, aaab, aabb, abbb, bbbb), che si evidenziano in un pattern elettroforetico a cinque bande.

Per esempio, l'enzima Ldh-1 è un tetrametro che nelle popolazioni prese in esame migra verso l'anodo. *R. lessonae* per questo enzima presenta un pattern elettroforetico monobanda, infatti tutti gli individui sono omozigoti per l'allele Ldh-1¹⁰⁰; in questa specie il genotipo osservato è Ldh-1^{100/100}.

Invece, tutti gli esemplari *R. esculenta* risultano essere eterozigoti, con genotipo Ldh-1^{100/108}, dovuto all'espressione dell'allele Ldh-1¹⁰⁰ di *R. lessonae* e dell'allele Ldh-1¹⁰⁸ di *R. ridibunda*. In questo caso a seguito del processo di elettroforesi si viene a formare un pattern a cinque bande (*Fig. 3.1*).

Fig. 3.1 Pattern elettroforetici (zimogrammi) e genotipi osservati ai loci: Ldh-1



3.5 Studio morfologico delle specie parassita

3.5.1 Trematoda Digenea

Per lo studio dei digenei ci si basava sull'osservazione di preparati *in toto*, dapprima osservati a fresco e successivamente fissati, colorati e montati secondo la metodologia riportata di seguito:

- il parassita veniva posto su un vetrino portaoggetti ed orientato in posizione dorso-ventrale in modo che le ventose fossero rivolte verso l'osservatore;
- veniva schiacciato con un vetrino coprioggetto (per esaminare le strutture interne è necessario che essi siano appiattiti) e lasciato in una capsula di Petri in acqua in un frigorifero a temperature basse, e successivamente veniva aggiunto alcool a 70°;
- veniva in seguito colorato con carminio toracico per 50 minuti;
- veniva differenziato in alcool cloridrico;
- veniva disidratato mediante successivi passaggi in alcool crescente, avendo cura di effettuare tali passaggi ad intervalli regolari di 10-15 minuti;
- veniva immerso in salicilato di metile.

Terminata la colorazione, il parassita veniva montato su un vetrino portaoggetti con balsamo del Canada.

Per il riconoscimento sono state utilizzate le seguenti chiavi e fonti bibliografiche:

J.D. Smyth & M.M. Smyth, “Frogs as host-parasite systems I”, 1980; D. I. Gibson, R. A. Bray and A. Jones, 2003. “Keys to the Trematoda”, CABI Publishing; S. Prudhoe & R.A. Bray “Platyhelminth parasites of the amphibian”, Oxford University Press, 1982.

3.5.2 Nematoda

Per quanto riguarda i nematodi, la chiarificazione è necessaria per studiare la morfologia degli organi interni che hanno valore ai fini sistematici; per alcuni di essi venivano allestiti preparati *in toto* montati in lattofenolo per uno studio morfologico preliminare basato su vari caratteri, tra i quali:

- lunghezza del corpo
- lunghezza delle varie strutture interne (esofago, spicoli nei maschi,)
- conformazione dell'esofago
- presenza di papille
- presenza gubernaculum

altri caratteri venivano via via richiesti nella consultazione delle chiavi per l'identificazione. Per il riconoscimento sono state utilizzate le seguenti chiavi e fonti bibliografiche:

Anderson R.C., Chabaud A.G., Willmott S., “CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates”, CAB, 1978; Yamaguti S., “Sistema helmintum Vol III”, Interscience Publisher, New York, 1961.

3.6 Parametri epizootologici

La valutazione dei livelli di infestazione parassitaria di ciascuna area di campionamento è stata calcolata in accordo al protocollo di Bush *et al.* (1977) tramite il software Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel & Rozsa, 2005).

Prevalenza ed intensità media sono i dati descrittivi più importanti relativi a popolazioni di parassiti relative ad un determinato ospite, e permettono di valutare l'entità delle infestazioni e quantificarne la presenza all'interno degli ospiti nell'area di campionamento. Per poter interpretare dati parassitologici a livello ecologico è “d'uopo” utilizzare nella descrizione dei campioni di ospiti i

valori di intensità media ed abbondanza media (Margolis *et al.*, 1982; Papp, 1987; Bush *et al.*, 1997).

La prevalenza è il rapporto tra il numero di ospiti infetti da almeno un individuo di una particolare specie parassita e il numero totale di ospiti esaminati. E' comunemente espresso come una percentuale. L'intensità media è la media aritmetica tra il numero totale di parassiti trovati in una determinata specie ospite, e il numero di ospiti infetti del medesimo campione (Margolis, *et al.* 1982). L'abbondanza media è la media aritmetica tra il numero d'individui di una particolare specie parassita ed il numero totale di ospiti campionati, inclusi quindi individui risultati negativi.

3.7 Metodi genetico-molecolari per l'identificazione di *Rhabdias*

3.7.1 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 (Gyllensten *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. 3.2).

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.

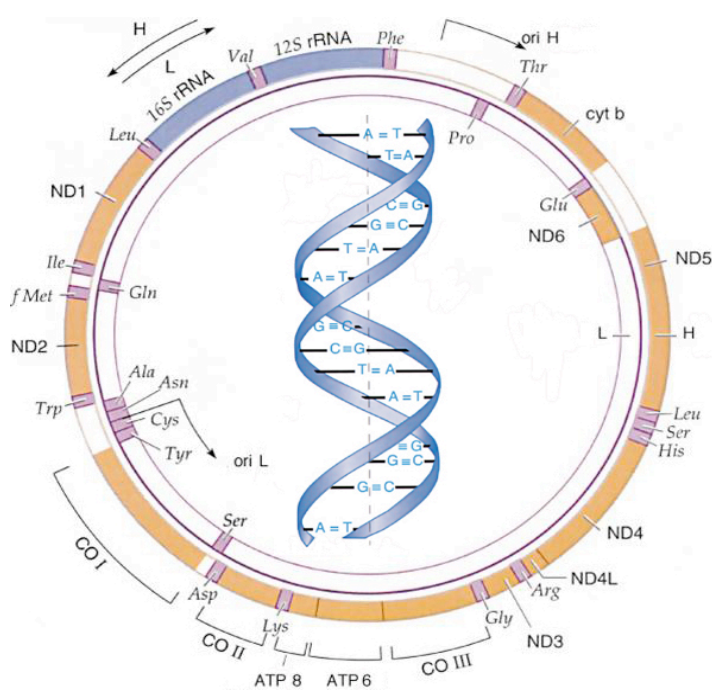
L'utilizzo del DNA mitocondriale nell'analisi della variabilità genetica è determinato dal fatto che esso evolve negli animali ad un tasso 5/10 volte maggiore rispetto al DNA nucleare (Brawn *et al.*, 1979); tale proprietà è dovuta a due fattori: 1) il limitato numero di geni presenti e il ruolo da loro 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 pressoché 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. 3.2



3.7.2 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.

3.7.3 Amplificazione mediante PCR (Polimerase 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-1* ottenuto dalla

combinazione dei 2 primers citazione primers *cox1* HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACC6ATCA-3') e LCO1490 (5'-

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'); l'amplificazione mediante PCR ha permesso di

amplificare un frammento di DNA, compreso tra questi due primers, lungo 677 paia di basi. La

reazione di PCR è stata realizzata utilizzando un "termal 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 2 minuti a 94

°C (per garantire la completa denaturazione di tutto il DNA a doppio filamento inizialmente

presente) seguita da 35 cicli costituiti da 30 secondi a 94 °C (fase di denaturazione), 45 secondi a 45

°C (annealing), 1 minuto 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) (Lhermitte-Vallarino N. et al., 2008).

Il prodotto di reazione è stato controllato sottoponendo 5µl dello stesso a migrazione elettroforetica su gel d'agarosio all' 1% in TBE (0.045M tris-borato; 0.001M EDTA, pH 8) contenente 0,4% di Gel Red. 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. 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.

3.7.4 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.

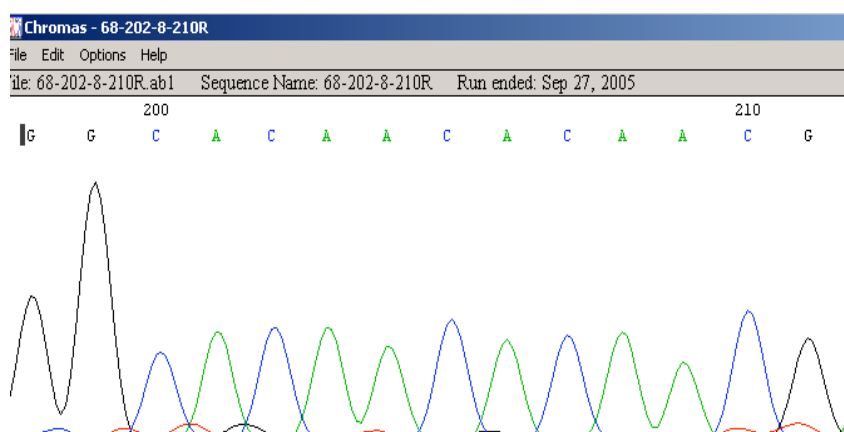
Il principio del sequenziamento automatico è una modificazione del sequenziamento descritto da Sanger *et al.* (1977), basato sulla terminazione controllata della replicazione enzimatica in vitro del DNA. La reazione risulta essere analoga alla PCR sopra descritta, ma con l'utilizzazione di un solo primer; 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 (HCO2198 e LCO1490 per le sequenze del gene della *cox-1*).

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.

3.7.5 Analisi delle sequenze

Le sequenze sono state controllate direttamente dal cromatogramma per entrambi i filamenti mediante l'ausilio del software CHROMAS (Fig. 3.3) 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 3.3 Controllo delle sequenze con il software CHROMAS 2.01
(McCarthy-Technelysium Pty. Ltd., 1998-2005)



3.7.6 Analisi statistiche e filogenetiche

Con il programma MEGA 4.0 (Kumar *et al.*, 2004) è stata analizzata la divergenza genetica, per il set di dati mitocondriali, utilizzando la distanza Kimura-2parametri**, K2P (Kimura, 1980). Per l'analisi filogenetica è stata condotta realizzando un Neighbour-Joining con il programma MEGA 4.0. La veridicità delle relazioni genetiche è stata valutata utilizzando l'analisi di bootstrap non parametrica (Felsenstein, 1985), con 1000 repliche. I valori di bootstrap uguali o maggiori di 60 sono da considerarsi ben supportati (Hills & Bull, 1993). Per i dati mitocondriali è stata inoltre effettuata una *Multi Dimentional Analysis* (MDS), utilizzando il programma SYN-TAX 2000 (Podani, 2005).

** = 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 ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $C \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow T$).

RISULTATI

4.1 Analisi chimico-fisiche delle acque del lago di Vico.

I dati relativi alle caratteristiche chimico-fisiche delle acque nelle diverse stazioni di campionamento sono stati ottenuti grazie alla partecipazione del gruppo di Ecologia delle Acque Interne del Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, coordinato dal Dott. Fabrizio Scialanca, nell'ambito di un progetto, in collaborazione con Assessorato Ambiente della Provincia di Viterbo e l'Istituto Superiore di Sanità, per la caratterizzazione trofica del lago di Vico e sue eventuali ipotesi gestionali.

I principali parametri limnologici (valori medi rilevati nei primi 6 mesi del 2009), quali fosforo totale P-Tot. (mg P l⁻¹), azoto nitrico N-NO₃ (mg N l⁻¹) e azoto ammoniacale N-NH₃ (mg N l⁻¹), sono riportati in *Tab 4.1*.

Tab 4.1 Valori medi dei parametri limnologici nelle località di campionamento del lago di Vico, rilevati nei primi 6 mesi del 2009

	Ronciglione	Fogliano	Bella Venere	Santa Lucia
P-Tot. (mg P l⁻¹)	0.053	0.038	0.050	0.030
N-NO₃ (mg N l⁻¹)	0.063	0.070	0.100	0.058
N-NH₃ (mg N l⁻¹)	0.049	0.052	0.075	0.044

4.1 Frequenze relative delle specie *R. esculenta* e *R. lessonae*

Durante i due anni di campionamento sono stati reperiti 206 esemplari di rana verde, rispettivamente 147 nel 2008, e 59 nel 2009. Tutti questi esemplari sono stati identificati geneticamente. Le frequenze relative di *Rana esculenta* e *R. lessonae*, identificate mediante marcatori genetici (alleli di loci diagnostici), sono riportate in *Tab 4.2*

I dati ottenuti riguardanti la frequenza delle due specie nei popolamenti di rana verde sono stati sottoposti al test del χ^2 che ne ha confermato la significatività statistica ($P < 0,05$).

Tab 4.2 Frequenze relative tra *Rana esculenta/lessonae* 2008/2009.

N= numero totale esemplari, *n*= numero esemplari delle due specie, %= frequenza relativa

	Stazione	N	n <i>esculenta</i>	n <i>lessonae</i>	% <i>esculenta</i>	% <i>lessonae</i>
2008- 2009	Pantanacce	49	24	25	49	51
	Bella Venere	56	47	9	84	16
	Santa Lucia	43	16	27	37	63
	Fogliano	49	29	20	59	41

4.3 Studio della composizione parassitaria di *Rana spp.*

Nel corso della nostra indagine sono state identificate 10 specie di metazoi parassiti, come riportato in *Tab 4.3*. In particolare sono state identificate: 4 specie di digenei, 5 specie di nematodi, ed una specie di cestode.

Tab 4.3 Lista di metazoi parassiti rinvenuti nel complesso *Rana esculenta*

	Ordine	Specie	localizzazione nell'ospite
Nematoda	Rhabditida	<i>Rhabdias</i> sp.	Polmoni
	Strongylida	<i>Oswaldocruzia filiformis</i> (Goeze, 1782)	Intestino/Stomaco
	Oxyurida	<i>Neoxysomatium brevicaudatum</i> (Zeder, 1800)	Retto/Intestino
		<i>Cosmocerca ornata</i> (Dujarden, 1845)	Retto/Intestino
	Spirurida	<i>Icosiella neglecta</i> (Diesing, 1851)	Tessuto muscolare
Trematoda	Digenea	<i>Protosocus confusus</i> (Looss, 1894)	Intestino/Stomaco
		<i>Pleurogenoides medians</i> (Olsson, 1786)	Intestino
		<i>Pleurogenes intermedius</i> (Issaitschikow, 1926)	Intestino
		<i>Diplodiscus subclavatus</i> (Goeze, 1782)	Retto
Cestoda	Cyclophyllidea	<i>Nematotaenia dispar</i> (Goeze, 1782)	Intestino

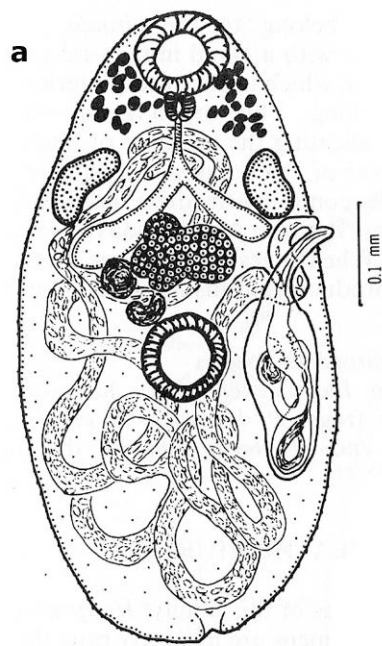
4.3.1 Trematoda

Quattro specie di trematodi sono state rinvenute all'interno degli ospiti analizzati e identificate su base morfologica: *Protosocus confusus* (Loss, 1894), *Pleurogenoides medians* (Olsson, 1796), *Pleurogenes intermedius* (Issaitschikow, 1926), *Diplodiscus subclavatus* (Goeze, 1782). Tutte e quattro le specie sembrano essere piuttosto comuni in rana verde in base a dati riportati in letteratura (Smith & Smith, 1980).

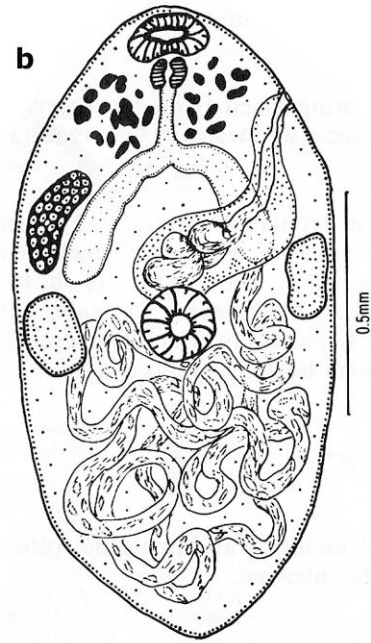
Tutte le specie identificate erano parassiti allo stadio adulto sia di *Rana esculenta* che di *R. lessonae* studiate, e sono state rinvenute tutte nel canale digerente. In particolare *P. confusus*, *P. medians* e *P. intermedius* dall'intestino tenue, e raramente dallo stomaco; *D. subclavatus* è stato sempre rinvenuto nel retto.

Le differenze morfologiche tra i diversi taxa sono piuttosto evidenti (Fig. 4.1) tranne che per *Pleurogenes* e *Pleurogenoides*, appartenenti alla famiglia dei Pleurogenidae (Loss, 1899), per i quali dimensioni e struttura interna risultano essere molto simili; in questo caso la diversa disposizione dell'ovario ha permesso di distinguere i due generi, e le due specie.

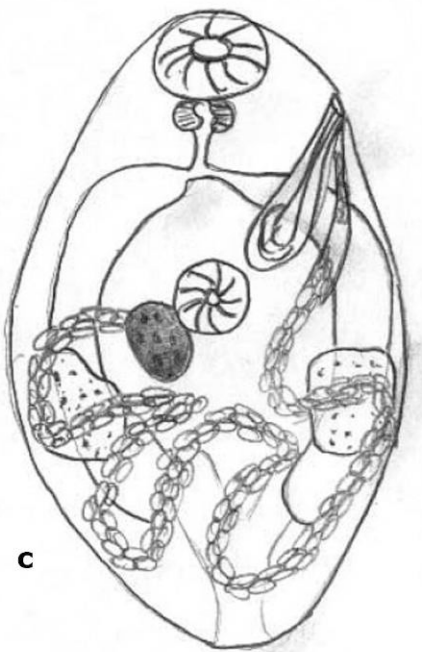
Fig. 4.1 Le 4 specie di trematodi rinvenute in rana verde (“a” e “b” da Smyth & Smyth, 1980)



Prosotocus confusus



Pleurogenoides medians



Pleurogenes intermedius



Diplodiscus subclavatus

4.3.2 Nematoda

Cinque diverse specie di nematodi sono state rinvenute in *Rana esculenta* e *R. lessonae*; di queste alcune più comunemente riportate in letteratura come parassiti di rana verde, ed altre più rare. Essi sono: *Oswaldocruzia filiformis* Goeze, 1782, *Neoxysomatium brevicaudatum* Zeder 1800 e *Cosmocerca ornata* Dujardin, 1845 appartenenti alla famiglia Cosmocercidae, sottofamiglia Cosmocercinae; *Rhabdias* sp. (Stiles & Hassall, 1905) appartenente alla famiglia Rhabdiasidae, *Icosiella neglecta* Diesing, 1851 appartiene alla famiglia Onchocercidae.

I diversi nematodi erano caratterizzati da uno specifico microhabitat all'interno dell'ospite: i parassiti del genere *Rhabdias* nella sua forma adulta, ermafrodita, parassitano i polmoni dell'ospite. Al contrario, *Oswaldocruzia* si trova nell'intestino tenue, e, sporadicamente, anche nello stomaco. Gli appartenenti alla famiglia Cosmocercidae prediligono l'intestino crasso ed il retto; *Icosiella*, appartenente all'ordine Spirurida, è stata rinvenuta molto raramente nei tessuti muscolari ventrali delle rane (Tab. 4.3)

L'identificazione dei nematodi è stata eseguita su base morfologica, dal momento che tra i gruppi le differenze, sia di dimensione che di struttura, sono notevoli.

Sebbene per tutte le specie appartenenti all'ampia famiglia Cosmocercidae si è cercato di portare l'identificazione a livello specifico, tuttavia, per le stime dei livelli di infestazione, questi diversi taxa sono stati considerati come un unico gruppo, identificato col nome della sottofamiglia Cosmocercinae, in quanto queste specie hanno il ciclo biologico, le modalità di trasmissione e la localizzazione nell'ospite molto simili tra di loro.

4.3.2.1 I parassiti del genere *Rhabdias*

Le specie del genere *Rhabdias* comprendono parassiti polmonari cosmopoliti di anfibi e rettili. Sono ermafroditi proterandrici; gli esemplari maschi maturano nei polmoni, quindi gli spermatozoi prodotti durante la prima fase della maturazione vengono conservati all'interno del ricettacolo. In una seconda fase quindi le femmine producono uova fertilizzate che vengono rilasciate nei polmoni dell'ospite, espulse all'interno della cavità boccale, e da qui ingerite all'interno del canale digerente. Giunte nel retto, una parte delle uova si schiude subito, ed una parte viene espulsa con le feci. A questo punto il parassita può seguire uno sviluppo "omogonico" o uno "eterogonico". Nel primo caso, le larve, all'esterno, si trasformano direttamente in larve L3 infestanti e, una volta a contatto con il tegumento degli anfibi, possono penetrare la pelle dell'ospite, cercando di raggiungere, attraverso la cavità corporea, i polmoni. Nel caso dello sviluppo "eterogonico", invece, la forma larvale segue una fase a vita libera, che può durare dai 3 ai 10 giorni, in cui le larve sono soggette a

varie mute e si sviluppano sessi separati, cui segue un accoppiamento, all'esterno, tra individui maschi e femmine. Le uova fertilizzate seguono uno sviluppo viviparo, e la femmina madre degenera servendo come cibo per lo sviluppo delle larve stesse, che mutano nella forma L3 "infestante" per l'ospite (Smyth & Smyth, 1980). Queste larve oramai mature assumono un comportamento tale da poter venire in contatto con l'ospite, migrando in zone "esposte". Una volta a contatto con la pelle dell'anfibio, penetrano all'interno di essa ed attraversando il tessuto muscolare raggiungono i polmoni (Goater *et al.*, 1992).

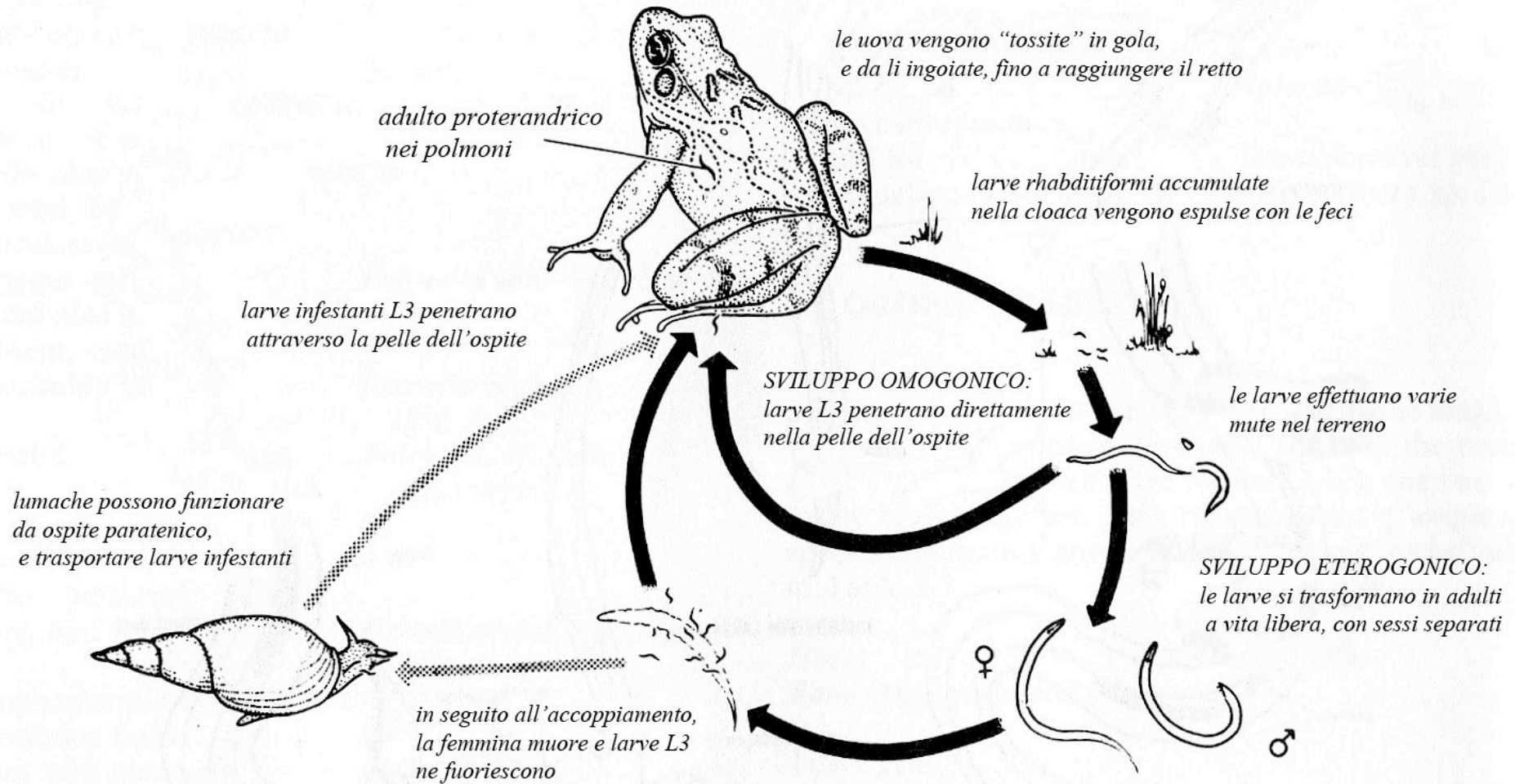
Rhabdias sp. svolge un ruolo patogeno verso gli ospiti, nutrendosi del loro tessuto polmonare; nella fase a vita libera invece si nutre di batteri ed altri microrganismi coi quali viene a contatto nel terreno (Lee & Atkinson, 1977; Spieler & Schierenberg, 1995; Roberts & Janovy Jr., 2000).

Uno studio condotto da Goater *et al.*, 1992 ha dimostrato che, in condizioni sperimentali, *Rhabdias bufonis* può alterare la crescita e la sopravvivenza di individui giovanili di *Bufo bufo*, ed in modo proporzionale alla severità dell'infestazione. I rospi infestati da *Rhabdias* sembrano essere meno vagili, e si nutrono con un efficienza del 50% (Goater *et al.*, 1992)

Osservazioni preliminari, da noi condotte nell'ambito dello studio della parassito fauna di *Rana italica* (Cipriani *et al.*, 2009), hanno mostrato una correlazione positiva, statisticamente significativa, tra i livelli di infestazione di *Rhabdias sp. B* nei polmoni di *R. italica* ed infestazioni da *Amphibiocystidium ranae*, un protozoo molto patogeno, recentemente descritto (Pascolini *et al.*, 2003), appartenente all'ordine dei Dermocystida. Nelle popolazioni colpite e decimate da questo virulento patogeno i livelli di infestazione da *Rhabdias sp. B* sono risultati eccezionalmente elevati, sia nei valori di prevalenza ($P=100\%$) che di intensità media ($Im>70$) dell'infestazione.

Fig. 4.2 Il ciclo di vita di *Rhabdias* sp. (secondo Smyth & Smyth, 1980), modificato.

CICLO VITALE DI RHABDIAS SP.



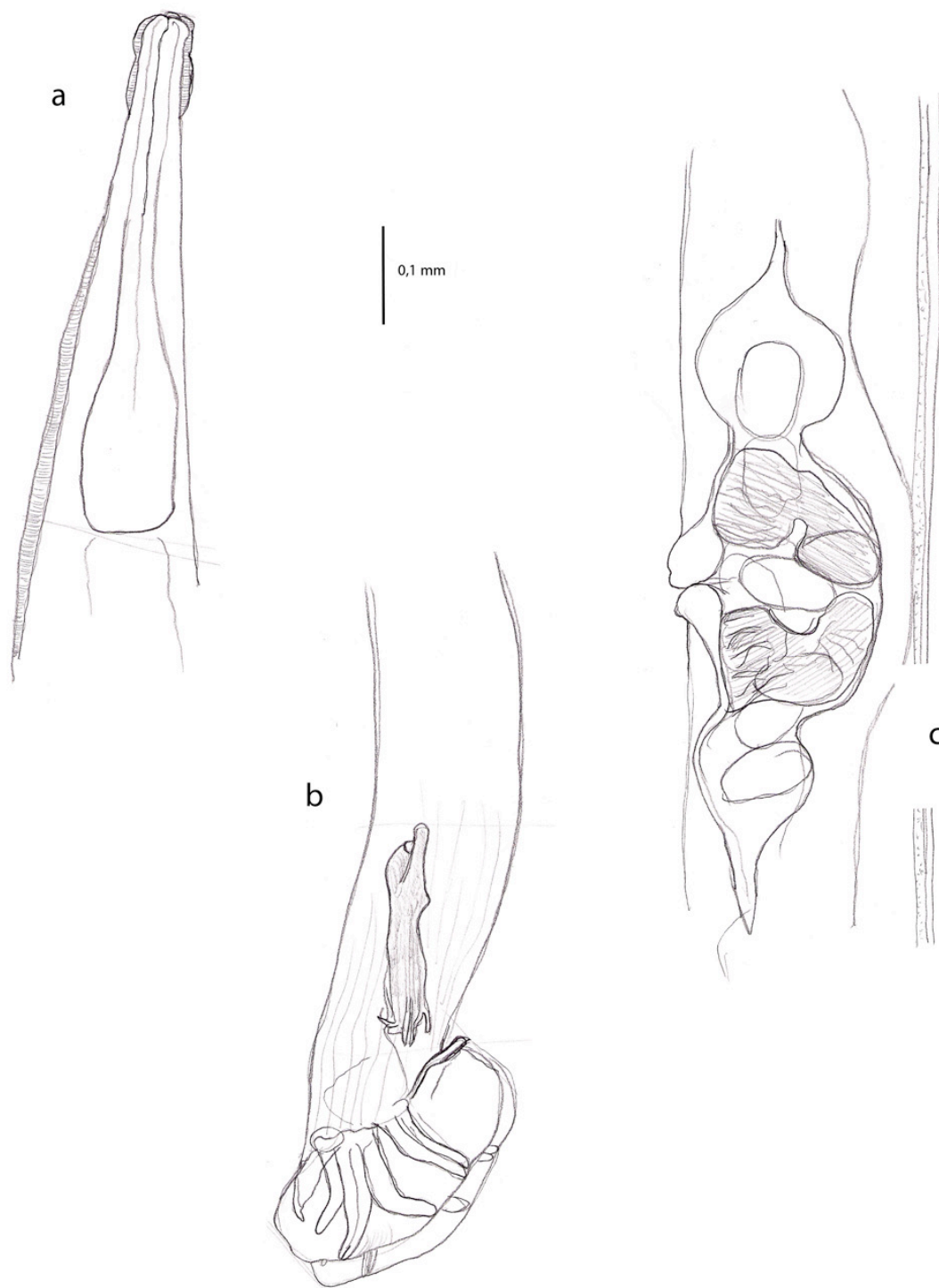
4.3.2.2 *Oswaldocruzia filiformis*

Oswaldocruzia filiformis (Fig. 4.3) è un tricostrongilide piuttosto comune negli anfibi dell'area paleartica. L'adulto si trova preferenzialmente nella prima parte dell'intestino, ma in alcuni casi alcuni individui possono essere reperiti anche nello stomaco e nell'intestino crasso. Morfologicamente si caratterizza per essere un nematode molto lungo e filiforme, con un pronunciato dimorfismo sessuale. Il maschio, oltre che per essere di dimensioni minori, si distingue facilmente per la presenza all'estremità posteriore di una evidente “*bursa*”, struttura che durante l'accoppiamento utilizza per ancorarsi alla femmina (Fig. 4.3 b).

Il ciclo vitale di questa specie è poco conosciuto. Tuttavia, in base a studi condotti da Hendrikx, avviene secondo queste modalità: le uova, rilasciate con le feci dell'ospite all'esterno, sembrano essere piuttosto grandi, tanto da contenere una ingente quantità di nutrimento; questo permette alle larve di effettuare delle mute all'interno delle uova e di fuoriuscirne dopo circa 14 giorni come L3. La fase a vita libera è pertanto piuttosto ridotta. La larva infestante raggiunge l'ospite attraverso il cibo, probabilmente attraverso un ospite accidentale paratenico. L'infestazione avviene necessariamente per ingestione, sebbene in precedenza si pensasse che questa specie potesse entrare nell'ospite attraverso l'epidermide (Hendrikx, 1983).

Le specie appartenenti al genere *Oswaldocruzia* non sembrano essere parassiti particolarmente patogeni, sebbene siano state osservate a volta alcune necrosi sul tessuto stomacale dell'ospite causate da forme larvali, e dei danni minori causati da adulti nei villi e nell'epitelio dell'intestino (Hendrikx, 1983; Hendrikx *et al.*, 1983; Griffin, 1989)

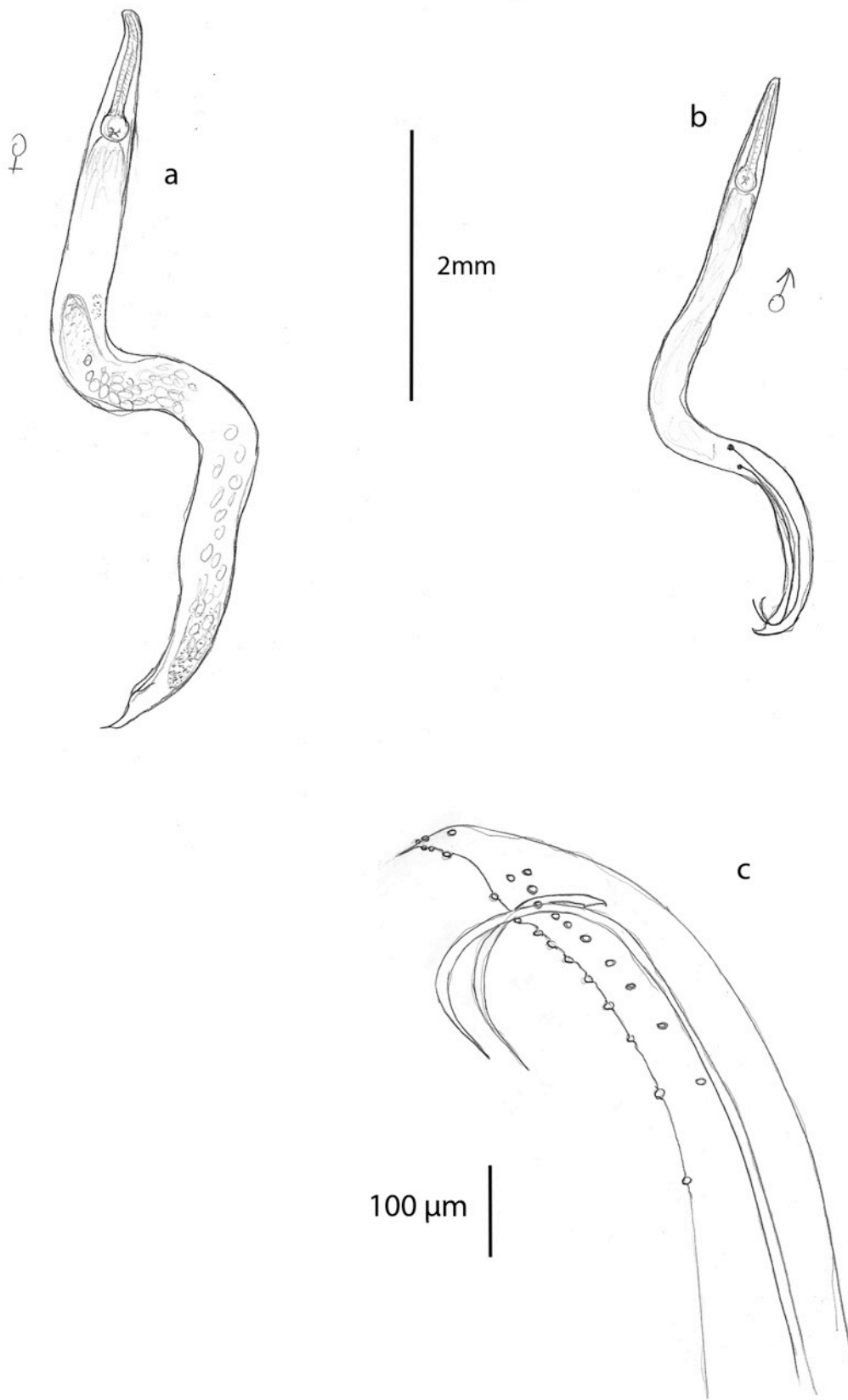
Fig. 4.3 *Oswaldocruzia filiformis* a: estremità cefalica; b: estremità caudale maschio; c: particolare dell'apertura vulvare (disegni originali)



4.3.2.3 Cosmocercinae

Le due specie appartenenti alla sottofamiglia Cosmocercinae identificate su base morfologica sono *Neoxysomatium brevicaudatum* Zeder 1800 e *Cosmocerca ornata* Dujardin, 1845. Entrambe le specie condividono un ciclo biologico simile e sono localizzate, in forma adulta, all'interno della parte terminale dell'intestino del loro ospite. La patogenicità di questo taxa non sembra essere rilevante, in quanto questi parassiti si nutrono principalmente di batteri, e la loro struttura boccale non sembra tale da produrre danni alla mucosa dell'intestino dell'ospite (Colam, 1971). Il ciclo biologico diretto di queste specie sembra caratterizzato da una breve fase a vita libera, cui segue la penetrazione all'interno dell'ospite per via cutanea, o, in alcuni casi, per ingestione (Anderson, 1992).

Fig. 4.4 *Neoxysomatium brevicaudatum*. a: femmina adulta; b: maschio adulto; c: estremità caudale di esemplare maschio



4.3.3 Cestoda

Una sola specie di cestodi è stata identificata su base morfologica, *Nematotaenia dispar* (Goeze, 1782) Luhe, 1910, sia nella sua forma adulta che larvale (tenia e plerocercioide). Sebbene i cestodi sembrano essere piuttosto rari negli anfibi, la prevalenza calcolata sul totale della popolazione di rane verdi osservate è del 17%, per cui questo parassita sembra che nell'ecosistema lago di Vico trovi condizioni favorevoli per poter svolgere il suo ciclo di vita. Il genere *Nematotaenia* è caratterizzato da uno scolice con quattro ventose, corpo cilindrico che tende a restringersi nella parte posteriore; la lunghezza media si aggira sui 140 mm, ma non sono rari individui capaci di superare i 200 mm. Il ciclo vitale è poco conosciuto, e non è noto se diretto o se coinvolga ospiti intermedi.

4.4 Dati epizootologici

I risultati relativi a prevalenza (P) ed intensità media (Im) dell'infestazione per i vari taxa di parassiti nelle due specie di rana del complesso *esculenta*, suddivisi tra le 4 stazioni di campionamento, sono riportati in *Tab. 4.4*.

Dalle analisi statistiche effettuate con il software *Quantitative Parasitology 3.0*, sono emerse differenze significative nei livelli di infestazione delle specie parassita rinvenute sia rispetto alle aree di campionamento, sia rispetto alla specie di rana verde esaminata. Un range dei valori di significatività (*P*) dei vari test condotti è riportato in *Tab. 4.4*.

In particolare, differenze statisticamente significative sono state osservate nei valori di prevalenza (P%) dell'infestazione di *Rhabdias* sp. e di *Oswaldocruzia filiformis* sia in *Rana esculenta* che in *R. lessonae*, rispetto alle 4 diverse stazioni di campionamento. Anche la prevalenza da *Nematotaenia dispar* in *R. esculenta* sembra differire in modo significativo nelle 4 stazioni di campionamento.

Comparando i valori relativi alle infestazioni tra la specie ibrida e quella parentale delle due specie di rane, in ognuna delle quattro stazioni di campionamento, differenze statisticamente significative emergono tra l'intensità d'infestazione (Im) in *R. esculenta* e *R. lessonae* da *Rhabdias* sp. nella stazione di Fogliano e da *Oswaldocruzia filiformis* in quella di Pantanacce (*Tab. 4.4*).

Tabella 4.4 Valori di Prevalenza P(%) e di Intensità (media Im e range) dell'infestazione dalle specie di parassiti identificati nelle rane verdi del complesso esculenta. N= numero di rane esaminate; P= valore di probabilità secondo il test di Fisher; *p*= valori di probabilità secondo il Mood's median test per le differenze nei valori di intensità media osservata in ogni sito tra le due specie di rana esaminate; * 0.05<P<0.01; ** 0.01<P<0.001; *** P<<0.001; (M)= Mood's median test; (F)= Fisher's exact test

		Stazione dicampionamento												
		Fogliano			S. Lucia			B. Venere			Pantanacce			
Parassiti	Specie di Rana	N	P(%)	Im	N	P(%)	Im	N	P(%)	Im	N	P(%)	Im	P
<i>Rhabdias</i> sp.	<i>Esculenta</i>	29	55,2	2,8	16	12,5	13,0	47	0,0	0,0	24	0,0	0,0	*** (F)
	<i>Lessonae</i>	20	50,0	6,3	27	3,7	9,0	9	0,0	0,0	25	0,0	0,0	*** (F)
	<i>P</i>		NS	*(M)		NS	NS		NS	NS		NS	NS	
<i>Oswaldocruzia filiformis</i>	<i>Esculenta</i>	29	41,4	2,3	16	68,8	2,3	47	38,3	1,9	24	16,7	1,0	* (F)
	<i>Lessonae</i>	20	40,0	2,6	27	85,2	7,5	9	55,6	6,2	25	20,0	6,8	*** (F)
	<i>P</i>		NS	NS		NS	NS		NS	NS		NS	*(M)	
Cosmocercinae	<i>Esculenta</i>	29	20,7	4,2	16	25,0	3,0	47	27,7	2,5	24	20,8	3,6	NS
	<i>Lessonae</i>	20	30,0	6,2	27	37,0	3,8	9	11,1	2,0	25	36,0	4,0	NS
	<i>P</i>		NS	NS		NS	NS		NS	NS		NS	NS	
Trematoda Digenea	<i>Esculenta</i>	29	27,6	13,9	16	37,5	7,0	47	44,7	9,9	24	16,7	4,2	NS
	<i>Lessonae</i>	20	20,0	10,8	27	18,5	20,2	9	22,2	7,5	25	16,0	11,0	NS
	<i>P</i>		NS	NS		NS	NS		NS	NS		NS	NS	
Cestoda	<i>Esculenta</i>	29	3,4	9,0	16	18,8	1,3	47	34,0	3,8	24	12,5	1,7	** (F)
	<i>Lessonae</i>	20	5,0	1,0	27	14,8	1,5	9	22,2	10,0	25	12,0	3,3	NS
	<i>P</i>		NS	NS		NS	NS		NS	NS		NS	NS	

4.5.1 Studi di sistematica molecolare nei nematodi del genere *Rhabdias*

Il genere *Rhabdias* comprende numerose specie, tra le quali *Rhabdias bufonis* e *Rhabdias sphaerocephala* sono quelle comunemente riportate come parassiti di anfibi in Europa.

Rhabdias bufonis, Schrank 1788 sembrerebbe essere stata finora considerata come una specie cosmopolita e dall'ampia valenza ecologica, essendo stata rinvenuta in numerose specie di anfibi di tutto il mondo. Ciò farebbe supporre che *Rhabdias bufonis* possa essere un complesso di specie morfologicamente simili, ma riproduttivamente isolate e geneticamente ben distinte (specie gemelle).

Questi aspetti ci hanno indotto a condurre studi di sistematica molecolare sui nematodi del genere *Rhabdias* nelle due specie di rana verde oggetto di studio, *R. esculenta* e *R. lessonae*, a confronto con specie di *Rhabdias* rinvenute in *Rana italica*, *Bufo bufo* e *B. viridis*, provenienti sia dal Lazio, sia da altre aree geografiche italiane.

Tali studi si sono avvalsi dell'analisi del gene mitocondriale della Citocromo Ossidasi I (mtDNA, *cox-1*), in quanto questo gene risulta essere molto variabile ed in grado di distinguere specie gemelle o criptiche di nematodi. In particolare, sono stati sequenziali, per un frammento di 677 paia di basi del gene della mtDNA *cox-1*, un totale di 32 individui di *Rhabdias*, di cui 9 prelevati da rane verdi del complesso *esculenta*, 13 da *Rana italica*, 8 da *Bufo bufo*, 2 da *Bufo viridis*.

Come si osserva nell'analisi della Massima Parsimonia (MP), gli esemplari di *Rhabdias* campionati in *Rana esculenta* e *R. lessonae* clusterizzano in un unico clade, ben supportato dal valore di bootstrap. Questo clade risulta ben distinto da quello formato dagli esemplari di *R. italica* sequenziati per confronto, che formano a loro volta un cluster separato. Questi due cladi risultano inoltre ben differenziati da quelli formati dalle specie di *Rhabdias* campionate in *Bufo bufo* e presumibilmente riferibili morfologicamente alle specie *R. sphaerocephala* e *R. bufonis*.

I dati finora disponibili mostrano che i nematodi del genere *Rhabdias* campionati in rane appartenenti al complesso *R. esculenta* possono essere identificati nella specie qui indicata come *Rhabdias* sp. A, mentre gli esemplari rinvenuti in *R. italica*, sembrerebbero appartenere ad una specie qui denominata *Rhabdias* sp. B.

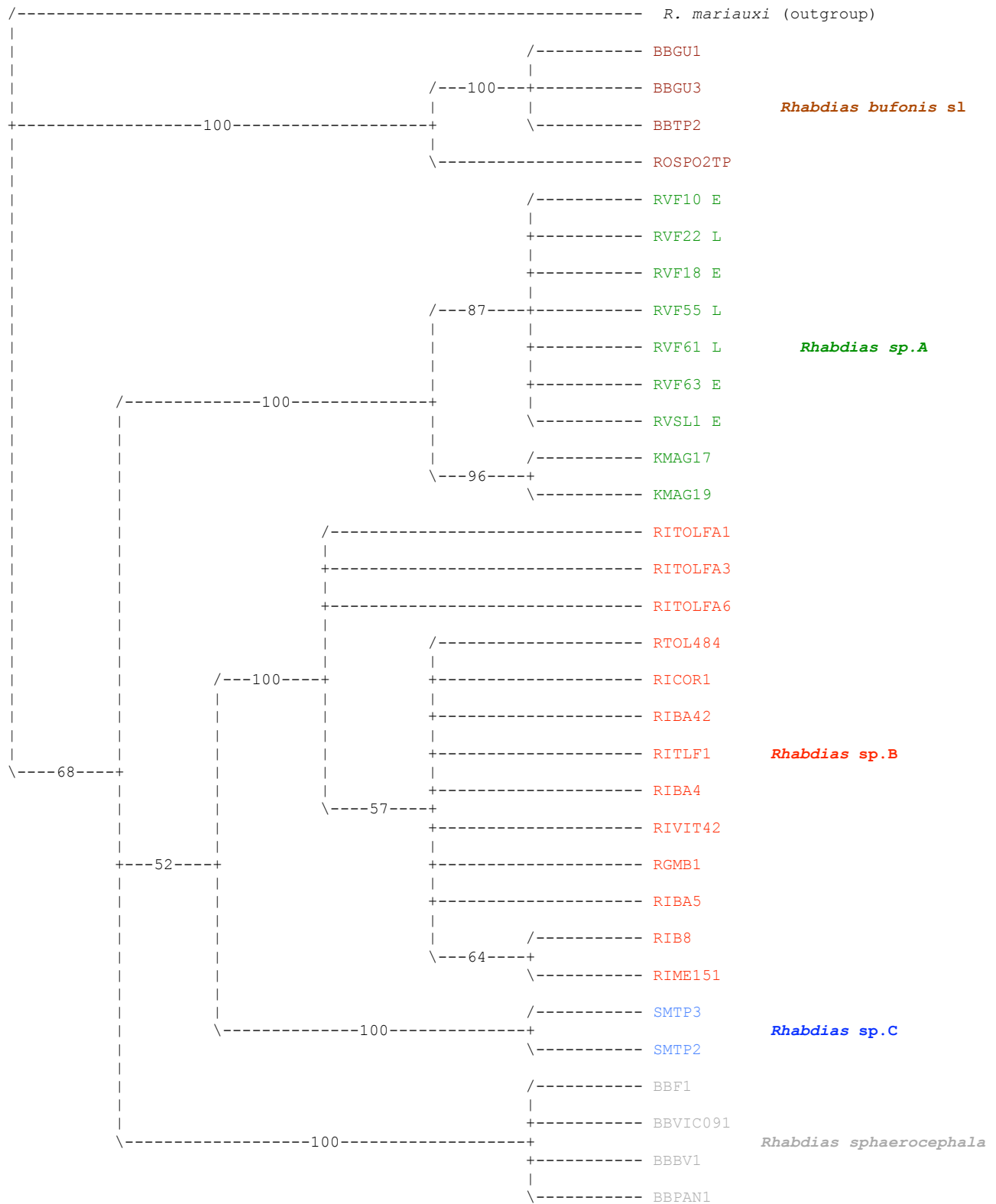
I valori di distanza genetica osservati tra le specie di *Rhabdias* finora studiate sono stati calcolati utilizzando il parametro *Kimura-2-parametri* (K2P), e sono riportati in Tab. 4.5. Le due specie, *Rhabdias* sp. A e *Rhabdias* sp. B, risultano geneticamente affini, come intuibile il valore K2P di 0.08 (in media). Questo valore è del tutto simile a quello finora osservato tra specie gemelle appartenenti ad altri complessi di specie di nematodi.

Tab. 4.5 Valori di Kimura-2-parametri (K2P), sulla base delle sequenze (677bps) del gene mtDNA *Cox-I*, fra le specie di *Rhabdias*

		R.spB	R.spA	R.buf	R.sph	R.spC
<i>Rhabdias</i> sp.B	(R.spB)	–				
<i>Rhabdias</i> sp.A	(R.spA)	0.08	–			
<i>Rhabdias</i> <i>bufonis</i> sl.	(R.buf)	0.19	0.17	–		
<i>Rhabdias</i> <i>sphaerocephala</i>	(R.sph)	0.11	0.11	0.18	–	
<i>Rhabdias</i> sp.C	(R.spC)	0.10	0.10	0.19	0.11	–

Poiché in Gen-Bank sono depositate sequenze dell'ITS per la specie *R. sphaerocephala*, si è proceduto al sequenziamento di esemplari ottenuti da *Bufo bufo*, morfologicamente riferibili a *R. sphaerocephala*. L'allineamento della sequenza ottenuta dai nostri esemplari con quella depositata nel database ha permesso di osservare una corrispondenza al 99%, indicando pertanto che la specie rinvenuta in *Bufo bufo* dall'area del lago di Vico corrisponda con elevata probabilità a *Rhabdias Sphaerocephala*.

Fig. 4.6 *Massima parsimonia* (MP) (ottenuta con il software PAUP 4.0) sulla base delle sequenze (677bps) del gene mtDNA *Cox-I*, tra gli esemplari appartenenti alle specie del genere *Rhabdias*. Ai nodi sono riportati i valori di bootstrap su 100 repliche.

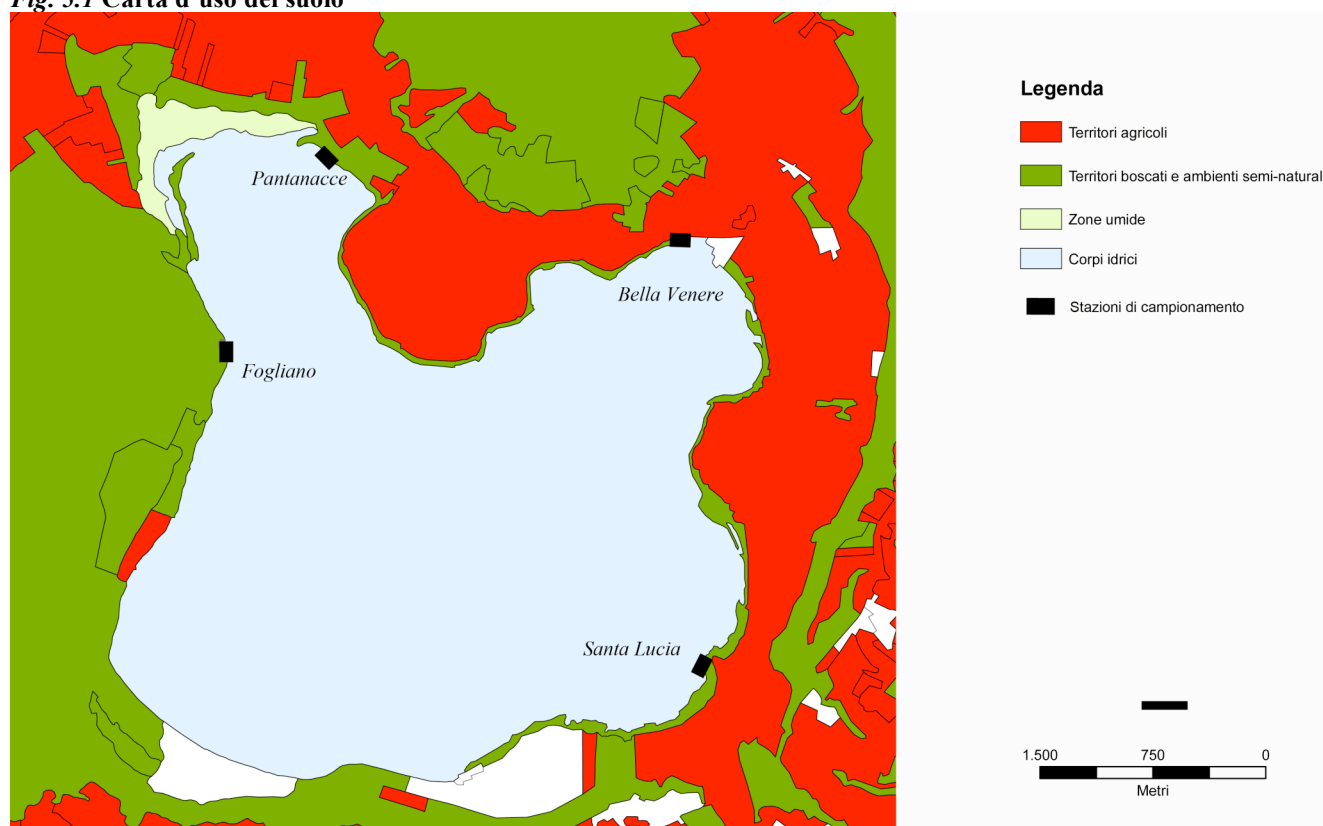


DISCUSSIONE

5.1 Il complesso *Rana esculenta* come ospite in relazione alle località di campionamento

Dall'analisi dei dati ottenuti emerge una generale concordanza tra l'aumento delle concentrazioni medie di fosforo, azoto nitrico ed ammoniacale, e le frequenze relative delle rane del complesso *esculenta*. La specie ibrida *Rana esculenta*, meno sensibile agli stress di origine antropica, prevale, in percentuale, nelle zone in cui i valori delle concentrazioni dei composti di P ed N aumentano. Questo andamento risulta evidente dall'analisi delle aree dei siti di campionamento sulla carta d'uso del suolo (Fig.5.1).

Fig. 5.1 Carta d'uso del suolo



Sito di campionamento: *Bella Venere*

Analizzando singolarmente i diversi siti di campionamento, emerge che nella località Bella Venere il fosforo è risultato piuttosto abbondante, con una concentrazione media annua di 0,05 mgP/l. L'alta concentrazione di tale nutriente potrebbe essere l'effetto delle attività turistico-ricreative concentrate su questa parte di litorale. Anche le coltivazioni di nocciolo che si estendono a ridosso dei primi metri di costa potrebbero contribuire al carico di nutrienti che raggiunge le acque (Fig.5.1). Come infatti dimostrano gli studi di Leone e Ripa (Ripa *et al.*, 2002), il bacino imbrifero retrostante è facilmente soggetto a fenomeni erosivi che favoriscono il trasporto delle sostanze fertilizzanti utilizzate in agricoltura fino alle acque del lago, con conseguente incremento del fenomeno di eutrofizzazione innescato proprio dall'elevato carico di fosforo. L'alta frequenza relativa riscontrata di *R. esculenta*, pari all' 84%, rivela il litorale di Bella Venere quale ambiente degradato; le rane della specie parentale *R. lessonae*, più sensibili ai disturbi ambientali, avendo risentito dell'impatto antropico, sono state superate competitivamente nella loro frequenza relativa dalla specie ibrida.

Sito di campionamento: *Santa Lucia*

I parametri di P ed N esaminati, caratterizzano un ambiente poco contaminato che risente in modo minore del fenomeno di eutrofizzazione. La frequenza dell'indicatore biologico rana verde sembrerebbe essere in accordo con le analisi chimico-fisiche nel dimostrare che questo sito ha un limitato disturbo ambientale. Infatti l'area è circondata da minori estensioni di noccioli rispetto agli altri siti, e la presenza di un fitto canneto in prossimità delle acque lacustri funge da filtro nei confronti della lisciviazione delle sostanze usate in agricoltura.

Sito di campionamento: *Fogliano*

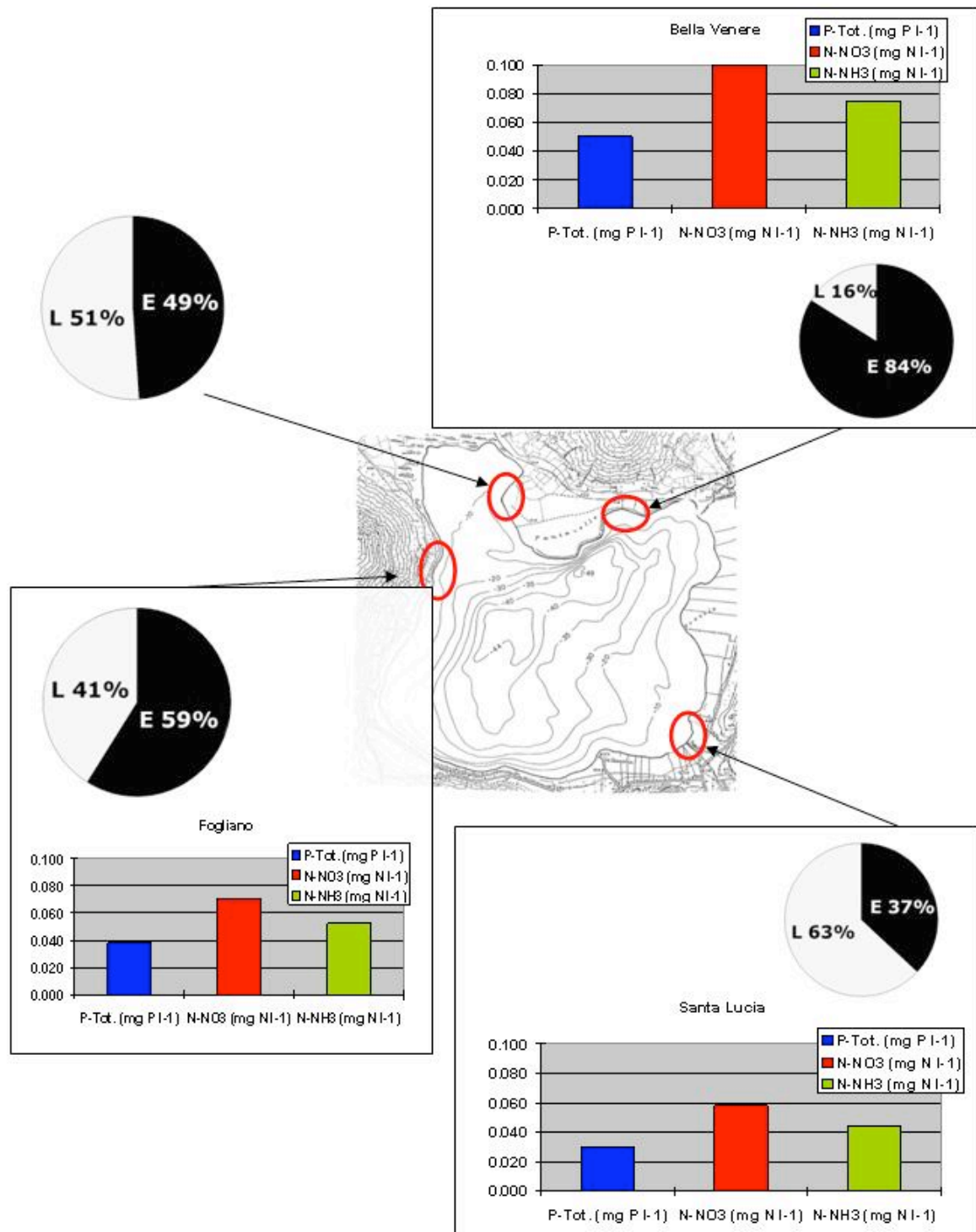
In questa stazione, caratterizzata in generale dall'assenza di impatto antropico diretto da attività agricola (Fig 5.1), le analisi chimico-fisiche hanno tuttavia registrato dei valori di concentrazione piuttosto alti. La concentrazione media di azoto nitrico ha toccato un valore di 0,07 mg N l⁻¹, l' N-NH₃ 0.052 mg N l⁻¹, valori piuttosto alti per una zona che dovrebbe essere quella meno impattata da disturbo antropico e "protetta" alle sue spalle da un fitto bosco di cerro. Probabilmente alcuni dei parametri chimici qui rilevati sono influenzati dalla presenza di una sorgente subacquea di acqua calda. E' per questo che la conducibilità e la concentrazione di fosforo sono risultate piuttosto elevate, pur essendo state misurate in una zona che dovrebbe risentire poco delle fonti esterne di nutrienti. Un'altra plausibile ipotesi è che le correnti e la circolazione delle

acque lacustri possa portare verso il litorale della stazione Fogliano acque provenienti dalla rientranza che il lago forma poco più a nord, zona molto più esposta a fenomeni di lisciviazione e trasporto di sostanze utilizzate in agricoltura.

Sito di campionamento: *Pantanacce*

I campionamenti relativi alle analisi chimico-fisiche del litorale, condotte nelle altre stazioni grazie alla partecipazione del gruppo di Ecologia delle Acque Interne del Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile, non erano previsti per questa stazione. Le frequenze relative delle rane del complesso *R. esculenta* sembrerebbero comunque rilevare una situazione intermedia, in cui la specie ibrida sembra eguagliare, in percentuale, la specie parentale (49% *R. esculenta*- 51% *R. lessonae*). L'area in cui le rane sono state campionate effettivamente mostra una situazione intermedia, come è possibile osservare anche dalla carta d'uso del suolo. Il litorale della zona è pianeggiante, e malgrado l'area sia circondata da coltivazioni intensive di nocciola, probabilmente risente dell'effetto benefico della fascia di canneto che è stata ripristinata con l'innalzamento del livello del lago negli ultimi anni.

Fig. 5.2 Valori dei parametri *P. Tot*, *N-NO₃*, *N-NH₃* e frequenza relativa di *R. esculenta* e *R. lessonae* nelle varie stazioni di campionamento.



5.1.1 Complesso *R. esculenta* e condizioni chimico-fisiche in anni precedenti, 1999-2003

Dal confronto tra le percentuali di *R. esculenta* registrate in studi precedenti, nel 1998 (Scialanca *et al.*, 1999) e 2003 (Passatore, Tesi di laurea 2003), e quelle ottenute nel presente studio, si è riscontrato un deciso cambiamento della frequenza relativa delle due specie di anuri (Fig. 5.3). Le aree meno soggette ad impatto antropico diretto sembrerebbero mostrare un aumento della frequenza relativa di *R. esculenta*, piuttosto lieve nella stazione di campionamento di Santa Lucia, più marcato nel caso di quella di Fogliano, passata quest'ultima da un 13% del 1999 e 17% del 2003, all'attuale valore del 59%. Questo forte aumento della specie ibrida in questa stazione è supportato dai dati relativi alle analisi chimico-fisiche e dai valori di P ed N, che sottolineano un drammatico cambiamento delle caratteristiche ambientali della zona litorale di quest'area del bacino del lago di Vico (Fig. 5.4).

Nel litorale di Bella Venere, zona a maggior impatto antropico, sembra rimanere pressoché costante l'altra frequenza della specie *R. esculenta* (>80% nei tre anni). Questa alta percentuale è spiegata dalla sinergia tra la pressione turistica che si concentra nel periodo estivo e le coltivazioni di nocciolo che si estendono nel pendio retrostante.

La zona di Pantanacce sembra aver avuto nel corso degli anni le oscillazioni maggiori nelle frequenze relative del complesso *R. esculenta*; ciò è probabilmente legato alla conformazione fisica dell'area. La zona paludosa ed il canneto risentono infatti molto della piovosità e del relativo livello idrico del lago. Le maggiori frequenze relative della specie ibrida, corrispondenti ad un peggioramento della situazione delle acque, sono state registrate nel 2003 (*R. esculenta* 74%), anno in cui la piovosità fu estremamente bassa. L'arretramento dell'area paludosa e la netta riduzione della fascia di canneto, ebbe come conseguenza la riduzione dell'importante azione di filtro che questa esercita sulle acque che dai noccioli dilavano nel lago, rendendo l'ecosistema esposto all'impatto esercitato dalle coltivazioni intensive che si concentrano sul versante Nord-Est del bacino. L'innalzamento del livello del lago degli ultimi anni potrebbe aver permesso il ripristino delle aree di canneto, ed inoltre garantito ad un ricambio delle acque di queste zone stagnanti, con conseguenze riscontrabili anche nelle frequenze relative delle due specie di anuri (*R. esculenta* 51%).

Fig. 5.3 Frequenze relative complesso *Rana esculenta* 1999/2009

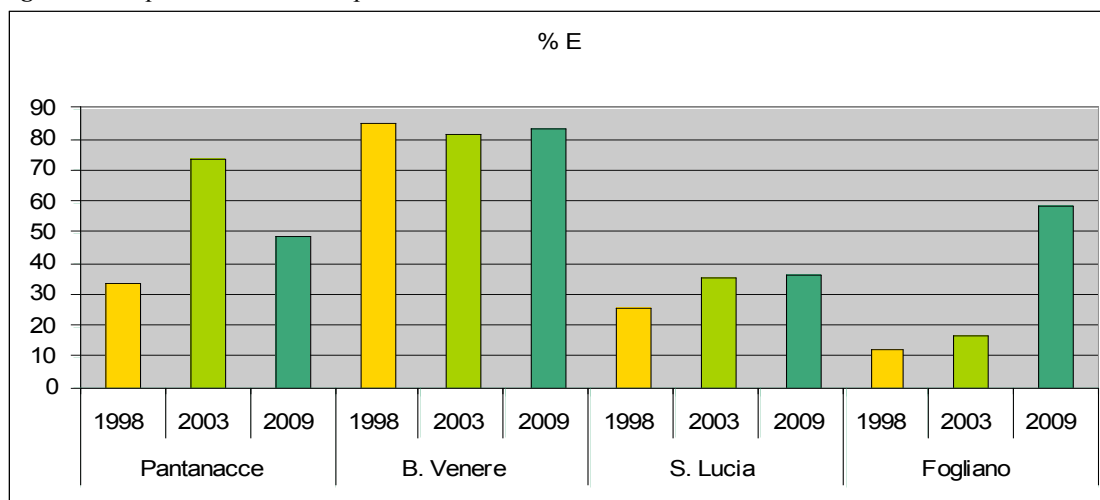
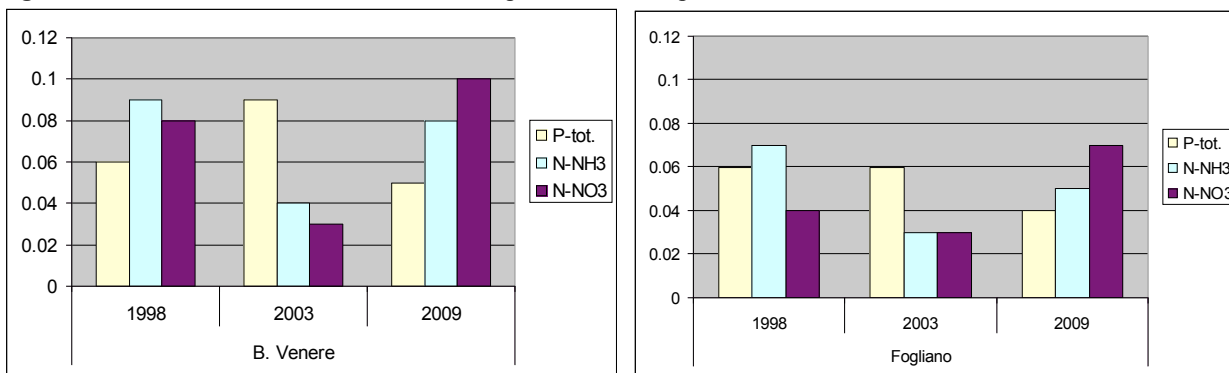


Fig 5.4 Parametri chimici nelle stazioni di campionamento nel periodo 1999-2009



5.2 I parassiti

5.2.1 Variazione dei livelli di infestazione dai parassiti rinvenuti in relazione ai siti di campionamento delle specie ospite

La popolazione di rana verde del lago di Vico ospita complessivamente 10 specie di parassiti metazoi. Tuttavia, la distribuzione di questi parassiti nelle rane delle varie stazioni di campionamento non risulta essere completamente omogenea. E' infatti emersa una significativa variabilità nei livelli di infestazione da alcuni parassiti campionati nelle diverse aree. Si ritiene che alcune di queste variazioni nelle infestazioni siano riconducibili alle caratteristiche ambientali dei siti che, in modo diretto od indiretto, possono influenzare la presenza di alcune di queste specie di metazoi.

Variazione statisticamente significativa di distribuzione tra le varie stazioni è emersa per i nematodi caratterizzati dall'avere nel loro ciclo vitale una fase a vita libera, quali la specie indicata come *Rhadias* sp.A. Questo nematode da adulto è ermafrodita, mentre la fase sessuata della riproduzione è una fase a vita libera nel terreno. Per questo motivo le forme larvali di questo parassita, dovendo trascorrere una parte della loro maturazione nel terreno, per il loro sviluppo fino alla forma infettante per l'ospite, sono molto sensibili a variabili ambientali del terreno stesso. E' stato altresì dimostrato che le specie del genere *Rhadias* siano fortemente suscettibili verso prodotti di sintesi utilizzati in agricoltura, soprattutto pesticidi (Marcogliese, 2008).

I risultati relativi ai livelli di infestazione da *Rhabdias* sp. A in entrambe le specie di *Rana*, nelle diverse stazioni di campionamento, indicano differenze statisticamente significative nei valori di prevalenza. Infatti nelle stazioni esposte in modo diretto alla coltivazione del nocciolo, cioè Bella Venere e Pantanacce, *Rhabdias* sp. A è risultata del tutto assente, aspetto plausibilmente riconducibile alla presenza di pesticidi utilizzati nelle attività agricole, che, per fenomeni di lisciviazione, raggiungono le sponde del lago. Al contrario, nella stazione di Fogliano, lontana da coltivazioni di nocciolo e presumibilmente non contaminata da pesticidi, la prevalenza di questa specie raggiunge valori elevati in entrambi gli ospiti (P=55,2% per *R. esculenta*, 50.0% per *R. lessonae*).

Analogamente, i valori di prevalenza dell'infestazione da nematode *Oswalducrusia filiformis* mostrano differenze statisticamente significative tra le varie stazioni di campionamento, sebbene in questo caso non ci siano zone caratterizzate dalla totale assenza della specie. La zona in cui la prevalenza è massima, per entrambe le specie del complesso, risulta essere Santa Lucia (P=68,8% per *R. esculenta*, 85.2% per *R. lessonae*), dove probabilmente questo parassita trova

condizioni ottimali per il suo ciclo di vita. Anche questo nematode è caratterizzato da una breve fase a vita libera nel terreno, durante la quale, probabilmente tramite ospiti paratenici, riesce a raggiungere l'ospite definitivo.

Pertanto, l'assenza o la minore infestazione di queste specie di nematodi nelle rane campionate nelle zone di Pantanacce e Bella Venere, fortemente impattate dall'attività agricola intensiva ed i prodotti che questa attività richiede, può quindi essere indice di un disturbo antropico, di tipo chimico, in quel determinato sito. Studi condotti da King su *Rana pipiens*, evidenziavano come le infestazioni da *Rhabdias ranae* tendano a diminuire nelle zone caratterizzate da alte concentrazioni di pesticidi, mentre fossero elevate in zone relativamente libere da pesticidi (King, 2007).

Nel caso dell'intensità dell'infestazione dai parassiti appartenenti alla sottofamiglia Cosmocercinae è emerso un dato diverso rispetto agli altri nematodi, in quanto le differenze tra i valori di prevalenza in rane campionate nelle varie stazioni, non sono risultate statisticamente significative. Questi parassiti sembrano, infatti, essere diffusi in modo più omogeneo nelle rane delle varie aree del lago, non essendo influenzati dallo stato ambientale dei siti di raccolta. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che il ciclo vitale, a trasmissione diretta, di questo gruppo di parassiti monoxeni che producono uova già infettanti quando vengono emesse con le feci dall'ospite. Le uova contengono larve allo stadio larvale L3, che non necessitano dello sviluppo larvale a vita libera; pertanto esse risentono in misura minore alle variazioni ambientali. L'assenza di una vera e propria fase a vita libera "garantirebbe" a questo gruppo di nematodi una minore dipendenza dalle caratteristiche dell'ambiente in cui vivono i loro ospiti definitivi.

Nessuna differenza statisticamente significativa è emersa dallo studio di prevalenza ed intensità nelle due specie di anuri per i digenei identificati in relazione alle variazioni ambientali nei siti di campionamento. Ciò sembrerebbe essere in accordo con il ciclo biologico di questi parassiti. Le specie appartenenti a questi digenei hanno la caratteristica comune di presentare nel loro ciclo vitale un ospite intermedio rappresentato da un gasteropode acquatico, verso il quale manifestano una specie-specificità, in cui si sviluppa lo stadio di metacercaria. Alcuni di questi digenei vengono acquisiti dalle rane per ingestione di metacercarie incistate. Tuttavia, la presenza di alti livelli di prevalenza ($P=42.1\%$, valore più alto tra i siti di campionamento) ed intensità dell'infestazione da trematodi è stata osservata nei siti di campionamento di Bella Venere. L'alta prevalenza di trematodi osservata in questa stazione potrebbe avere un legame indiretto con il fenomeno dell'eutrofizzazione. L'aumento di crescita algale rende infatti disponibili maggiori risorse per i gasteropodi acquatici, ospiti intermedi obbligatori nei cicli biologici dei trematodi digenei rinvenuti;

ne consegue un aumento della densità di gasteropodi, ed il conseguente incremento di digenei prassiti.

5.2.2 Livelli di infestazione dei parassiti rinvenuti in relazione alle specie ospite

L'analisi dei livelli di infestazione dei parassiti rinvenuti nelle due diverse specie di rana identificate, ha registrato differenze statisticamente significative, sia per i valori di prevalenza che per quelli di intensità.

Per quanto riguarda la sottofamiglia Cosmocercinae, mentre la distribuzione dell'infestazione sembra essere omogenea nei vari siti di campionamento, tuttavia differenze statisticamente significative sono state riscontrate nei valori di prevalenza quando si considerano le due specie di *Rana* del lago di Vico, indipendentemente dal sito di campionamento (Tab. 5.1). La specie ibrida, *R. esculenta*, mostra una prevalenza minore, statisticamente significativa, dell'infestazione da Cosmocercinae, rispetto alla specie parentale (*R. lessonae*), mentre l'intensità media (I_m) sembra essere costante sia in *R. esculenta* che in *R. lessonae*. Questo andamento dei due valori relativi all'infestazione da parte di questo gruppo di parassiti potrebbe essere spiegato considerando il modo in cui avviene la penetrazione nell'ospite (attraverso il tegumento). Potrebbe essere plausibile ipotizzare che la specie ibrida abbia una maggior capacità di difesa nel momento in cui questi nematodi cercano di penetrarne l'epidermide, il che spiegherebbe la minor prevalenza dell'infestazione.

Analogamente, differenze statisticamente significative sono state osservate nell'infestazione da *Rhabdias* sp. A tra le due specie di rane nella stazione di Fogliano, dove l'intensità media dell'infestazione in *R. lessonae* ($I_m=6.3$) risulta maggiore rispetto a quella osservata in *R. esculenta* ($I_m=2.7$). Una differenza si evidenzia anche per un altro nematode, *Oswaldocruzia filiformis*, per il quale l'intensità media risulta, nella stazione di Pantanacce, maggiore nella specie parentale, *R. lessonae*, piuttosto che in *R. esculenta*.

L'eterogeneità dell'infestazione riscontrata in questi parassiti di cui, soprattutto *Rhabdias* sp. A ed *Oswaldocruzia filiformis*, mostrano una più alta patogenicità verso l'ospite, mostrano una costante analogia sia nei valori di prevalenza che di intensità media verso la specie ospite *R. lessonae*. Questa specie di *Rana* presenta sempre un grado di infestazione maggiore rispetto all'ibrido *R. esculenta*. Una possibile spiegazione di questo fenomeno potrebbe risiedere nel vantaggio eterotico della specie ibrida *R. esculenta*, che è oramai noto essere più resistente ad ambienti degradati e all'impatto antropico, rispetto alla specie *R. lessonae*.

In conclusione, i risultati finora ottenuti sull'analisi della parassitofauna sembrano indicare che questo vantaggio eterotico si possa manifestare anche con una maggiore resistenza nei confronti di parassiti patogeni, rispetto alla specie parentale, la quale invece risulterebbe più suscettibile.

Tab. 5.1 Prevalenza P(%) e Intensità media (Im) dell'infestazione da nematodi parassiti in *Rana lessonae* e *R. esculenta*.

P= valore di probabilità secondo il test di Fisher, test χ^2 o il Mood's median test per le differenze nei valori di prevalenza ed intensità media tra le due specie di rana esaminate; * 0.05<P<0.01; ** 0.01<P<0.001; *** P<<0.001; (M)= Mood's median test; (F)= Fisher's exact test; (χ)= χ^2 test.

	P (%)		P	Im (range)				P
	<i>esculenta</i>	<i>lessonae</i>		<i>esculenta</i>		<i>lessonae</i>		
<i>Oswaldocruzia filiformis</i>	38.5	50.6	NS	2,0	1-7	6,3	1-35	* (B) * (M)
Cosmocercinae	23,9	40.7	* (F) * (k)	3,1	1-13	3,8	1-18	NS
<i>Rhabdias</i> sp.	55,2	50,0	NS	2,8	1-18	6,3	1-17	* (M)

5.3 Aspetti di sistematica molecolare su specie del genere *Rhabdias*

Durante il periodo di studio sono stati reperiti anche altri anfibi oltre alle rane verdi del complesso *esculenta*, dei quali alcuni in sympatria con le rane in esame, altri da aree più lontane rispetto a quella di studio. A seguito dell'esame parassitologico le diverse specie di anfibi hanno mostrato diversi livelli di infestazione da *Rhabdias* spp..

Tenendo conto della patogenicità dei parassiti del genere *Rhabdias* documentata dallo studio condotto da Goater et al., 1992, considerando la correlazione tra *Rhabdias* sp. B ed il patogeno *Amphibiocystidium* descritta nei precedenti paragrafi, vista anche la sensibilità che questo nematode presenta nei confronti di inquinanti ambientali, nel presente studio si è cercato di approfondire la sistematica molecolare delle specie del genere *Rhabdias*.

Il genere *Rhabdias* allo stato attuale comprende numerose specie, descritte nella maggior parte dei casi su base morfologica. Alcune di esse, come ad esempio *Rhabdias bufonis*, sono riportate in letteratura come specie cosmopolite e in grado di parassitare varie specie di anfibi in Europa. Al fine di valutare l'eterogeneità genetica delle specie del genere *Rhabdias* da noi reperite, e per valutare la specie-specificità di questi parassiti per diverse specie di anfibi, sono state condotte analisi genetico-molecolari sugli esemplari reperiti in *Rana Lessonae* e *R. esculenta* dalla nostra

area di studio, a confronto sia con parassiti dello stesso genere trovati in *Bufo bufo* reperito in simpatria con le rane verdi nell'area del lago di Vico, sia con altri anfibi provenienti da aree diverse.

I risultati hanno finora mostrato un'eterogeneità genetica compatibile con l'esistenza di specie diverse del genere *Rhabdias*: dall'analisi delle distanze genetiche emerge, infatti, un'elevata specificità da parte di questo parassita polmonare verso i propri ospiti, tanto che ogni specie di ospite risulterebbe essere infestata da una diversa specie di *Rhabdias*. Tuttavia, riguardo le due rane del complesso oggetto di studio, le analisi genetico-molecolari hanno denotato finora che la specie di *Rhabdias* (qui denominata come *Rhabdias* sp. A) è parassita sia delle specie *Rana esculenta* che di *R. lessonae*. Questo sembra essere anche compatibile con il ciclo biologico di questi parassiti e con l'evidente simpatria e sintopia dei propri ospiti, sebbene *Rhabdias* sp. A mostri diversi livelli di infestazione nelle due specie di *Rana*, come mostrato nel precedente paragrafo.

Ulteriori analisi genetiche sia su altri esemplari che su altri geni saranno condotte al fine di definire la struttura genetica di questa specie. Le analisi morfologiche permetteranno anche di descrivere nuovi taxa appartenenti a questo genere.

Questi primi risultati sembrerebbero indicare comunque una specie-specificità ospite-parassita in questo gruppo di nematodi endoparassiti e gli anfibi finora studiati, e che questa possa essere il risultato di fenomeni di co-evoluzione ospite-parassita, già altresì dimostrati, su base molecolare, in altri gruppi di nematodi endoparassiti di vertebrati (Mattiucci & Nascetti, 2008).

BIBLIOGRAFIA

Alford, R. A., and S. J. Richards. 1999. "Global amphibian declines: a problem in applied ecology." *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30:133-165.

Anderson R.C., May R. M., 1979. "Infectious Diseases and Population Cycles of Forest Insects". *Science* 210, 658 - 661

Anderson R.C., Chabaud A.G., Willmott S., "CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates", *CAB*, 1978

Andreani P., A. Motawi, G. Nascetti, 1997. "Valutazione della qualità delle acque del bacino idrografico del Fiume Marta: applicazione dell'indice biotico esteso e analisi della frequenza relativa di rane verdi del complesso *Rana esculenta*." *S.It.E. Atti*, 18: 457-460.

Andreani P., F. Santucci, G. Nascetti, 2003. "Le rane verdi del complesso *Rana esculenta* come bioindicatori della qualità degli ambienti fluviali italiani." *Biologia Ambientale*, 17 (1): 35-44, 2003

Awise 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.

Balletto E., M. A. Cerchi, S. Salvidio, A. Lattes, A. Malacrida, G. Gasperi, G. Doria, 1986. Area effect in South Western European green frogs (Amphibia, Ranidae). *Boll. Zool.* 53: 97-109.

Barbanti L., 1969. Lago di Vico: rilevamento batimetrico e note geomorfologiche. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 25: 117-139.

Barbanti L., G. Bonomi, A. Carollo, G. Chiaudani, I. Ferrari, M. Gerletti, A. M. Nocentini, D. Ruggiu & L. Tonolli, 1971. *Limnologia ed ecologia dei laghi di Bolsena, Bracciano, Trasimeno e Vico: situazione attuale e prevedibili conseguenze derivanti da una loro utilizzazione multipla*. Ist. Ital. Idrobiol. Ed.: 263 pp.

Bazzanti M., O. Ferrara, F. Margaritora, L. Mastrantuono & E. Stella, 1989. Latium Limnology: ten years of hydrobiological and ecological investigations of lentic waters. *Animal & Human Biology*, 1: 145-158.

Beebee TJC, Griffiths RA, 2005. "The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology?" *Biological Conservation* 125, 271-285.

Blaustein AR, Hokit DG, O'Hara RK and Holt RA (1994). Pathogenic fungus contributes to amphibian losses in the Pacific Northwest. *Biol. Conserv.* 67: 251–254.

Blaustein AR, Wake DB & Sousa WP (1994a). Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv. Biol.* Vol. 8, pp. 60–71.

Blaustein A.R., Romansic J.M., et al., 2003. "Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines." *Diversity and distributions*, 9 ; 123-140

Boncompagni E., C. Fenoglio, R. Vaccarone, P. Chiari, G. Milanesi, S. Barni, M. Fasola, 2002. Morfocitochimica del parenchima epatico di *Rana esculenta* durante la fase larvale ed adulta: rilievi ecotossicologici. Poster E9, IV congresso nazionale societas Herpetologica Italica.

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.

Berger, L, R Speare, HB Hines, G Marantelli, AD Hyatt, KR McDonald, LF Skerratt, V Olsen, JM Clarke, G Gillespie, M Mahony, N Sheppard, C Williams & MJ Tyler (2004). Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Vet.J.*vol. 82, pp.434–439

Brooks, D. R. and E. P. Hoberg, 2000. "Triage for the biosphere: the need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites." *Comparative Parasitology* 67:1–25

Bullini L., Pignatti S., Virzo De Santo A., 2002. "Ecologia Generale", *UTET*

Bush A.O. et al., 1997. "Parasitology meets ecology on its own terms : Margolis et al. revisited". *Journal of Parasitology*, 83(4); 575-583

Carey C, Cohen N, Rollins-Smith L., 1999. "Amphibian declines: an Immunological perspective". *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 23, pp.459–472.

Campatoli S., Ghetti P. F., Minelli A., Ruffo S., "Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane", *ANPA 1994*, Vol. I.

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.

Christin M. S., Gendron A. D., Marcogliese D.J., et al. 2003. "Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection". *Environmental toxicology and chemistry*, vol 22 n 5.

Chubinishvili A. T., 2001. Evaluation of developmental stability and cytogenetic homeostasis in population of European green frogs (*Rana esculenta*-complex) under natural and anthropogenic conditions. *Russian J. of developmental biology*, vol. 32, no.6: 362-366.

Colam B., 1971. "Studies on gut ultrastructure and digestive physiology in *Cosmocerca ornata* (Nematoda: Ascaridida)". *Parasitology*, **62**, 259-272

Corn P.S., 2005. "Climate change and amphibians". *Animal Biodiversity and Conservation*, 28; 59-67

Di rosa I., D. Di cave, L. Morosi, R. Pascolini, 2002. Health status of the *Rana esculenta* complex in central Italy. Poster F12, IV congresso nazionale societ s Herpetologica Italica

Dobson, A. P. and P. J. Hudson. 1986. "Parasites, disease and the structure of ecological communities." *Trends in Ecology and Evolution* 1:11–15

Dubey S, Shine R., 2003. "Origin of the parasites of an invading species, the Australian cane toad (*Bufo marinus*): are the lungworms Australian or American?" *Molecular Ecology*, 17(20) 4418-24

Dupont F., Crivelli A., 1988. "Do parasites confer a disadvantage to hybrids? A case study of *Alburnus alburnus* x *Rutilus rubilio*, a natural hybrid of Lake Mikri Prespa, Northern Greece." *Oecologia*, 75: 587-592

Joly P, Guesdon V, Fromont E, Plenet S, Grolet O, Guegan JF, Hurtrez-Bousses S, Thomas F, Renaud F., 2008. "Heterozygosity and parasite intensity: lung parasites in the water frog hybridization complex". *Parasitology*, 135; 95-104

Farris J.S., 1972. "Estimating phylogenetic trees from distance matrices. " *Amer. Natural.*, 106: 645-668.

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., 1985. "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. " *Evolution*, 39: 783-791.

Fioramonti E., R.D. Semlitsch., H.U. Reyer, & K. Fent, 1997. "Effects of triphenyltin and pH on the growth and development of *R. lessonae* e *R. esculenta* tadpoles." *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 (9): 1940-1947

Fisher MC., 2007. "Potential interactions between amphibian immunity, infectious disease and climate change". *Anim. Conserv.*, vol.10, pp.420–421.

Gendron A.D., Marcogliese J. D., et al. 2003 "Exposure to leopard frog to a pesticides mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*", *Oecologia*

Gibson D.I., Bray R.A. and Jones A., "Keys to the Trematoda". *CABI Publishing*, 2003

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.

Goater C.P., Ward, 1992. "Negative Effects of *Rhabdias bufonis* (Nematoda) on the Growth and Survival of the Toads *Bufo-Bufo*". *Oecologia*, 89(2): 161-165.

Goater T.M. & Goater C.P., "Ecological Monitoring and Assessment Network (EMAN), Protocols for misuring biodiversity: Parasites of Amphibians and Reptiles"

Graf JD, Polls Pelaz M., 1989. "Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex In: Dawley RM, Bogart JP (eds), Evolution and ecology of unisexual vertebrates." *NY State Museum Bulletin* 466, Albany, p p.289–302.

Hendrikx W.M.L., 1983. "Observation on the Routes of Infection of *Oswaldocruzia filiformis* (Nematoda : Trichostrongylidae) in Amphibia". *Parasitenkunde*, 69; 119-126

Hendrikx W.M.L & Van Moppes M.C., 1983. "*Oswaldocruzia filiformis* (Nematoda : Trichostrongylidae): Morphology of developmental stages, parasitic development and some pathological aspects of the infection in Amphibians". *Parasitenkunde*, 69; 523-537

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

Hotz H., P. Beerli, C. Spolsky, 1992. Mitochondrial DNA reveals formation of nonhybrid frogs by natural matings between hemiclinal hybrids. *Mol. Biol. Evol.* 9(4): 610-620.

Houlahan JE, Findlay CS, Schmidt BR, Meyer AH, Kuzmin SL., 2000. "Quantitative evidence for global amphibian population declines." *Nature* 404, 752-755.

<http://www.izan.kiev.ua/ppages/rhabdias/biology.htm>

Kiesecker JM, Blaustein AR & Belden LK (2001). Complex causes of amphibian population declines. *N.Vol.410*, pp. 681–684.

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.*

King C.K., McLaughlin J.D., Gendron A. D., Marcogliese D.J, et al, 2007. "Impacts of agriculture on the parasite communities of northern leopard frogs (*Rana pipiens*) in southern Quebec, Canada" *Parasitology* 134

Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004. "MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment." *Brief. Bioinf.*, 5:150-163.

J. H. Lawton R. M. May, 1996. "[Extinction rates](#)". *Oxford University Press*

Leonard, Z. 2001. "*Rhabdias bufonis*" (On-line), Animal Diversity Web. Accessed October 25, 2009 at http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rhabdias_bufonis.html

Leone A., M. N. Ripa, 2002. Land use pollutant non point sources and related modelling for lakes management. The lake Vico experience. Internat. Conf., residence times in lakes: science, management, education: 86-95.

Leone A. & Marini R., 1993. Assessment and Mitigation of the Effects of Land Use in a Lake Basin (Lake Vico in Central Italy). *Journal of Environmental Management*, 39-50.

Lhermitte-Vallarino N, Barbuto M, K, Boistel R, Ineich I, Wanji S, 2009 “*Rhabdias rhampholeonis* n. sp. and *Rhabdias mariauxi* n. sp. (Nematoda, Rhabdiasoidea), first lung worms from leaf chameleons: description, molecular evidence and notes on biology”. *Parasitology International*, 58(4): 375-83

Lhermitte-Vallarino N, Barbuto M, Junker K, Lebreton, Chirio L., Bain O., 2008. “First report of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasoidea) from lungs of montane chameleons in Cameroon: description of two new species and notes on biology”. *Parasitè*, 15(4):553-64.

McCarthy C., 1998-2005. *Crhomas*; Technelysium Pty. Ltd., www.technelysium.com

Marcogliese D.J., 2008. “The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals”. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 27 (2); 467-484

Marcogliese, D.J., D.K. Cone, 1997. “Parasite communities as indicators of ecosystem stress.” *Parassitologia*, 39: 227-232

Marcogliese D.J., King C.K., Salo H. M., Fournier M., Brousseau P., et al. 2008. “Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*” *Aquatic Toxicology*, in press

Marcogliese, D.J., 2005. Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? *International Journal of Parasitology* 35, 705–716.

Mattiucci S. and Nascetti G., 2007. “Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hemispheres”. [*Veterinary Parasitology*](#) 148: 43-57

Mattiucci, S. and G. Nascetti, 2008. “Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary process.” *Advances in Parasitology*, 66: 47-148

Murray M.G. & Thompson W.F., 1980. “Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. ” *Nuc. Ac. Res.*, 8: 4321-4325.”

- Page R.D.M. & Holmes E., 1998. "Molecular evolution. A phylogenetic approach. " *Blackwell Science*, Oxford, 346 (3): pp. 315-334
- 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.
- Pascolini, R., P. Daszak, A. Cunningham, A. Fagotti, S. Tei, D. Vagnetti, S., Bucci, and I. Di Rosa, 2003. "Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta* complex in Central Italy and description of of *Amphibiocystidium* n. gen. " *Dis. Aquat. Org.* 56: 65–74.
- Passatore L., 2003. "Eterogeneità ambientale dell'ecosistema lago di Vico: indici biotici e bioindicatori nella valutazione della qualità delle acque". Tesi di laurea.
- Pereira CN, DI Rosa I, Fagotti A Simoncelli F, Pascolin R & Mendoza L., 2005. "The pathogen of frogs *Amphibiocystidium ranae* is a member of the order Dermocystidia in the class Mesomycetozoon". *J. of Clinic. Micro.* , vol.43, pp.192-198.
- Plenet S., F. Hervant, P. Joly, 2000. Ecology of the hybridogenetic *esculenta* complex: differential oxygen requirements of tadpoles. *Evolutionary ecology*, vol. 14: 13-23.
- Plenet S., A. Pagano, P. Joly, P.Fouillet, 2000. «Variation of plastic responses to oxygen availability within the hybridogenetic *Rana esculenta* complex." *J.of evolutionary biology*, vol. 13: 20-28
- Podani J., 2005. "Multivariate exploratory analysis of ordinal data in ecology: pitfalls, problems and solutions. " *J. Veget. Sci.*, 15: 497-510.
- Pounds et al, 2006. "Global warming and amphibian losses". *Nature*, 439; 161-167
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, LA Marca E, Master KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Santiago R. Ron, Sanchez-Azofeifa GA, Still CJ & Young BE (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming global warming. *Nat.*, vol.439, pp.161–167.

Price W., 1980. "Evolutionary Biology Of Parasites." *Monographs In Population Biology*

Prudhoe S. & Bray R.A., "Platyhelminth parasites of the amphibian". *Oxford University Press*, 1982.

Ripa M. N., L. Boccia, A. Lo Porto, A. Leone, 2002. Bestmanagement practices for phosphorus control in the Lake Vico basin (Central Italy): spatial allocation and effectiveness evaluation. Internat. Conf., residence times in lakes: science, management, education: 230-233.

Rist L., R. D. Samlitsch, H. Hotz, H. U. Reyer, 1997. Feeding behaviour, food consumption, and growth efficiency of hemiclinal and parental tadpoles of the *Rana esculenta* complex. *Functional ecology*, 11: 735-742.

Roesli M., H. U. Reyer, 2000. Male vocalization and female choice in the hybridogenetic *Rana lessona-Rana esculenta* complex. *Animal behaviour*, vol. 60, no.6: 745-755.

Rorh J.R., Schotthoefer A. M., et al., 2008. "Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species". *Nature, Letters*, Vol 455; 1235-40

Rozsa L., Reiczigel J., Majoros G., 2000. "Quantifying parasites in samples of hosts". *Journal of Parasitology*, 86(2); 228-232

Sage, R. D., Heyneman, D., Lim, K. C. & Wilson, A., 1986. "Wormy mice in a hybrid zone." *Nature* 324: 60-63.

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.

Scialanca F., Andreani P., Mucciolo L. e Nascetti G., 1999 "Valutazione della qualità delle acque litorali del Lago di Vico (Italia Centrale): analisi chimica, studio della comunità macrobentonica e

analisi del rane verdi del complesso *R. esculenta*". *Atti del IX Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia*, Lecce, 14 - 17 settembre 1999: 195-196

Semlitsch R. D., M. Foglia, A. Muller, I. Steiner, E. Fioramonti, K. Fent, 1995. Short term exposure to triphenyltin affect the swimming and the feeding behavior of tadpoles. *Environmental toxicology and chemistry*, vol. 14: 1419-1423.

Semlitsch R. D., H.-U. Reyer, 1992. Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: interactions with pond drying and interspecific competition. *Evolution*. 46 (3): 665-676.

Semlitsch R.D., 1993 "Asymmetric competition in mixed population of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex." *Evolution*, 47: 510-519

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.

Spieler, M., E. Schierenberg. 1995. "On the Development of the Alternating Free-Living and Parasitic Generations of the Nematode *Rhabdias bufonis*". *Invertebrate Reproduction and Development*, 28(3): 193-203.

Smyth J.D. & Smyth M.M. "Frogs as host-parasite systems I", *The Macmillan Press LTD*, U.K.; London, 1980.

Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., 2000. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Press, Pensacola, Florida

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

- Stewart JR, Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 608-613.
- Taddei F., M. Vulic, M. Radman, I. Matic, 1997. Genetic variability and adaptation to stress: 271-290
- 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.
- Tunner HG, Nopp H (1979), Heterosis in the common European water frog. *Naturwissensch.*, vol.66, pp.268–269.
- [Van Valen, L.](#) 1973. "A new evolutionary law". *Evolutionary Theory* 1: 1—30
- Venanzi D., 2003. Tesi di dottorato - Il bioindicatore *R. esculenta* nella valutazione della qualità ecologica delle acque interne: analisi dell'influenza dello stress ambientale sulla mortalità larvale delle due specie (*Rana lessonae* e *R. esculenta*).
- Vorburger C., 2001. Heterozygous fitness effects of clonally transmitted genomes in waterfrogs. *J. of evolutionary biology*, vol. 14:602-610.
- Yamaguti S., "Sistema helmintum Vol III", *Interscience Publisher*, New York, 1961.
- Wycherley J., S.Doran, T. J. C. Beebee, 2002. Male advertisement call characters as phylogeographical indicators in European water frogs. *Biol. J. of the Linnean society*, vol. 77: 355.

