

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “Charles Darwin”  
Sapienza Università di Roma

**Dottorato di Ricerca in Biologia Animale**

XXIV Ciclo

**Implicazioni eco-evolutive e  
conservazionistiche dell'introduzione di rane  
verdi non native del complesso *Rana*  
(*Pelophylax*) *esculenta* in Italia**

**Dottoranda:** Valeria Pasqualini

**Tutor:** Roberto Argano - Daniele Canestrelli

Roma, 2013

*“(...) nelle notti estive e nere  
solo lucciole a guidarci nell'oscurità  
un'era fa  
la crudele pesca delle rane  
in uno stagno usato per l'irrigazione  
io e te  
fratello mio  
con gli ami e la torcia  
(...)  
la piscina di un agriturismo  
ha coperto le rane “  
 (“Le rane”, Baustelle)*

## Indice

INTRODUZIONE.....	5
1. L'INTRODUZIONE DI SPECIE ALLOCTONE.....	7
2. INVASIONI.....	8
2.1. Cause invasività.....	8
2.2. Conseguenze delle invasioni.....	9
3. IBRIDAZIONE E INTROGRESSIONE.....	11
3.1. Zone di contatto secondario.....	11
3.2. Conseguenze ibridazione.....	12
4. RANE VERDI DEL COMPLESSO <i>Rana (Pelophylax) esculenta</i> .....	14
4.1. Distribuzione.....	14
4.2. Differenziamento interspecifico.....	16
4.2.1. <i>Morfologia</i> .....	16
4.2.2. <i>Ecologia ed etologia</i> .....	17
4.2.3. <i>Genetica</i> .....	19
4.3. Marcatori molecolari utilizzati nello studio delle rane verdi.....	20
4.4. Conservazione.....	22
5. MATERIALI E METODI.....	24
5.1. Area di studio.....	24
5.2. Campionamento.....	25
5.3. Procedure di laboratorio.....	26
5.3.1. <i>Estrazione, amplificazione e sequenziamento DNA</i> .....	26
5.3.2. <i>Allozimi</i> .....	27
5.4. Analisi dei dati genetici.....	29
5.4.1. <i>DNA mitocondriale</i> .....	29
5.4.2. <i>Allozimi</i> .....	33
5.5. Analisi della distribuzione potenziale delle specie del gruppo –ridibunda in Italia settentrionale.....	34
6. RISULTATI.....	37
6.1. Diversità genetica mitocondriale.....	37
6.1.1. <i>Determinazione tassonomica ed origine geografica delle rane verdi presenti nell'area di studio</i> .....	37

6.1.2. <i>Area di invasione</i> .....	40
<b>6.2. Analisi di scambio genico</b> .....	<b>40</b>
<b>6.3. Modellizzazione della distribuzione delle specie</b> .....	<b>43</b>
<b>7. DISCUSSIONE</b> .....	<b>46</b>
7.1. <b>Introduzione ed invasione di rane verdi alloctone nell'area di FO-RA</b> .....	<b>46</b>
7.2. <b>Ruolo dell'ibridazione nel processo di invasione</b> .....	<b>47</b>
7.3. <b>Implicazione per la conservazione delle specie native di rane verdi</b> .....	<b>48</b>
<b>Bibliografia</b> ... ..	<b>51</b>

## Indice delle figure e delle tabelle

Fig. 1.....	15
Fig. 2.....	18
Fig. 3.....	24
Fig. 4.....	32
Fig. 5.....	38
Fig. 6.....	39
Fig. 7.....	40
Fig. 8.....	41
Fig. 9.....	44
Tab. 1.....	20
Tab. 2.....	26
Tab. 3.....	27
Tab. 4.....	28
Tab. 5.....	29
Tab. 6.....	31
Tab. 7.....	36
Tab. 8.....	36

## INTRODUZIONE

L'introduzione antropogenica di specie alloctone è un fenomeno ormai drammaticamente diffuso a livello mondiale. Costituisce la seconda causa di declino della biodiversità (Walker & Steffen, 1997), e la quinta minaccia per gli Anfibi (IUCN, 2008).

Le implicazioni di questo fenomeno sono estremamente varie e diversificate. Dal punto di vista socio-economico, si può dire infatti che qualsiasi cambiamento ecologico influenza fortemente i servizi forniti dagli ecosistemi e, di conseguenza, il benessere umano (Millenium Act, 2005). Dal punto di vista conservazionistico esso costituisce motivo di grande preoccupazione, sia sul piano ecologico, sia sul piano genetico. È infatti noto che le specie invasive hanno impatti massicci sulle specie autoctone, a causa spesso del maggior successo di predazione, della maggior competitività e della concomitante introduzione di parassiti e patogeni (Wootton, 1994). Inoltre in molti casi si possono verificare fenomeni di ibridazione con le popolazioni native, nonché tra popolazioni non native introdotte da più aree d'origine (Rhymer & Simberloff, 1996).

Infine le introduzioni rivestono un grande interesse anche dal punto di vista evolutivo: esse infatti possono portare alla formazione di fasce di ibridazione secondarie. Generalmente le fasce di ibridazione secondarie hanno origine storica, legata ai cambiamenti avvenuti nelle ultime decine di migliaia di anni, e non possono dunque essere studiate nella loro evoluzione. L'introduzione da parte dell'uomo di specie alloctone nell'areale di specie ad esse affini, ha portato alla formazione di tali zone in tempi recenti, rendendo possibile l'osservazione di tutte quelle modificazioni ecologiche e genetiche che avvengono sin dall'inizio della perturbazione, ma che sino a poco tempo fa era possibile soltanto ipotizzare (Allendorf & Luikart, 2007).

I complessi di specie delle Rane verdi sono ottimi modelli per lo studio delle problematiche fin qui esposte. Innanzi tutto, da quanto emerso in vari studi, le specie native di tali complessi risentono dell'impatto dell'introduzione di specie affini in diverse zone dei propri areali (vedi ad esempio Pagano et al. 2001; Vorburger & Reyer, 2003; Zeisset & Beebee, 2003; Schmeller et al., 2005; Holsbeek et al., 2008); inoltre le conoscenze attuali sull'ecologia e la variazione genetica di questa specie sono piuttosto dettagliate (Uzzell, 1979; Santucci et al., 1996; Andreani et al., 1997; Arnold, 2002; Wycherley et al., 2002; Vorburger & Reyer, 2003; Lapini, 2005; Lanza et al., 2007; Hotz et al., 2008; Bucci et al., 2009); si tratta poi di specie assai diffuse in tutta Europa, facilmente reperibili e campionabili; infine è un gruppo di organismi che presenta un'interessante caratteristica, essendo composto da diversi complessi ibridogenetici in cui la specie parentale è parassitata

sessualmente dalla specie ibrida, costitutivamente eterozigote, che usa il genoma parentale per ripristinare ad ogni atto riproduttivo il proprio stato ibrido (Berger, 1967, 1968; Schultz, 1969; Spolsky & Uzzell, 1986).

Casi di introduzione di specie alloctone di rane verdi in Italia sono stati segnalati per diverse aree, soprattutto del settentrione (Lanza, 1962; Lapini & Zanghellini, 1995; Bressi, 2006). Tuttavia, a tali segnalazioni non è seguito fino ad oggi alcuno studio sull'esito dell'introduzione in termini di invasione delle aree circostanti. Non è ad esempio noto se all'originaria introduzione abbia fatto seguito un evento di invasione, quale sia l'impatto sulle specie autoctone, né di che natura tale impatto sia. In studi recenti basati su casi di introduzione di rane verdi dell'area balcanica in Europa nord-occidentale, alcuni autori hanno ipotizzato ad esempio che i danni derivanti da tali introduzioni sui popolamenti locali, possano essere mediati non soltanto da eventi di competizione ecologica fra specie autoctone ed alloctone, ma che una componente sostanziale del vantaggio competitivo delle specie alloctone possa essere legato agli esiti di interazioni riproduttive (Vorburger & Reyer, 2003; Plötner et al., 2008; Holsbeek et al., 2008).

Obiettivo di questo lavoro è stato caratterizzare il potenziale invasivo di specie alloctone di rane verdi a seguito di eventi di introduzione in Italia settentrionale, nonché valutare il possibile coinvolgimento e le dinamiche legate ad eventi di ibridazione fra forme alloctone ed autoctone. A tal fine è stato studiato il popolamento a rane verdi di un'area del comprensorio delle province di Forlì-Ravenna, dove è stata recentemente individuata un'area di introduzione di rane verdi alloctone

Gli obiettivi specifici del lavoro sono dunque stati: i) verificare l'effettiva presenza di una o più specie alloctone nell'area; ii) valutare l'estensione geografica dell'area di invasione; iii) verificare l'impatto demografico di tale evento sui popolamenti autoctoni di rane verdi; iv) valutare l'esistenza, l'estensione e la natura di fenomeni di ibridazione; v) stimare il grado di idoneità d'habitat dell'Italia settentrionale per le specie alloctone individuate.

Per raggiungere i primi due obiettivi specifici, sono stati utilizzati marcatori genetici mitocondriali, che in precedenti studi analoghi su aree geografiche diverse sono apparsi particolarmente adatti a tale scopo (Hotz et al., 1992; Holsbeek et al., 2008; Akin et al., 2010). Vista la natura aploide e l'eredità uniparentale del genoma mitocondriale. Per raggiungere gli obiettivi iii e iv è stato necessario integrare il *dataset* con lo studio della variazione genetica a marcatori nucleari. Infine, per stimare l'idoneità d'habitat (obiettivo v), sono stati costruiti modelli di distribuzione potenziale basati sull'analisi di variabili bioclimatiche.

## 1. INTRODUZIONE DI SPECIE ALLOCTONE

L'introduzione antropogenica di specie alloctone è, secondo la Convenzione sulla Biodiversità, la seconda causa di declino della biodiversità a livello globale, dopo la frammentazione degli habitat (Walker & Steffen, 1997; Mack et al., 2000), e la quinta minaccia per gli Anfibi, dopo perdita di habitat, inquinamento, malattie ed incendi (IUCN, 2008).

Le introduzioni possono essere legate all'uomo direttamente o indirettamente: ad esempio i trasporti internazionali ed intercontinentali sono una frequente causa di introduzioni indirette, mentre vengono spesso deliberatamente introdotte specie per scopi ornamentali o alimentari (Ewel et al., 1999; Cox, 2004). Un esempio di introduzione per scopi ornamentali è quello della tartaruga d'acqua (*Trachemys scripta*), originaria dell'America e introdotta in Europa negli anni '80-'90 come animale da compagnia. La sua liberazione in stagni e laghetti l'ha portata ad espandersi anche in zone naturali, entrando in competizione con la specie autoctona *Emys orbicularis* (Cadi & Joli, 2004); il gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii*) è stato invece introdotto dal Sud Est degli Stati Uniti per scopi alimentari e attualmente è diffuso in Africa, Asia, Europa ed America: gran parte di stagni, laghi e canali del Sud Europa sono infestati da questa specie che entra in competizione con i crostacei autoctoni, preda larve di pesci e anfibi e, scavando le sue tane, provoca smottamenti degli argini dei canali (Hänfling et al., 2011).

Secondo alcune stime sono circa 11.000 le specie esotiche presenti in Europa, di cui il 15% è noto causino danni economici ed impatti rilevanti sulla biodiversità (DAISIE European Invasive Alien Species Gateway (<http://www.europe-aliens.org/>)). Un esempio legato alla conservazione degli Anfibi è costituito dall'introduzione di specie ittiche: uno dei casi più conosciuti in Italia è quello delle specie del genere *Gambusia*, introdotte per combattere le zanzare e ormai naturalizzate, rivelatesi predatori di larve di diverse specie di Anfibi (Scoccianti, 2001).

Nonostante la gravità del fenomeno, ancora oggi non si conosce l'entità dell'impatto dovuto all'introduzione di specie alloctone anche perché, se l'evento di introduzione è avvenuto in tempi relativamente recenti, può non esserne subito visibile l'effetto. Esiste infatti un tempo di ritardo (*lag time*) tra colonizzazione e diffusione. Per fare previsioni sulla probabilità di stabilizzazione di una specie alloctona in un'area può essere utilizzato il fattore della pressione dei propagoli che include il numero di individui introdotti ed il numero di eventi di rilascio: un gran numero di individui introdotti ridurrà l'effetto di colli di bottiglia e la nuova popolazione avrà una maggiore variazione genetica, aumentando la sua probabilità di insediarsi in un'area e di divenire invasiva (Allendorf & Luikart, 2007).

## 2. INVASIONI

Le specie invasive sono tutte quelle specie alloctone naturalizzate la cui introduzione in natura o la cui espansione rappresenta una minaccia per la biodiversità (The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. <http://www.iucnredlist.org>).

Uno dei casi meglio documentati riguardanti la fauna anfibia è quello della Rana toro (*Rana catesbeiana*), un anfibio di origine americana introdotto per scopi alimentari in tutti i continenti, sin dagli anni '60; i primi casi studiati riguardano introduzioni in alcune aree della California, dove questa specie predava larve e uova di altri Anfibi ed era entrata in competizione con specie autoctone. Si era infatti notato che la presenza di *R. catesbeiana* influiva sull'abbondanza di altre specie di Anfibi; per quanto riguarda il nostro Paese la rana toro è ormai naturalizzata in gran parte del Nord-Italia (Moyle, 1973; Ficetola et al., 2008).

### 2.1. Cause invasività

Perché si verifichi un'invasione devono essere incontrate una serie di condizioni: per prima cosa si deve presentare un collegamento tra la specie ed il nuovo ambiente, lontano dall'areale nativo della specie; in secondo luogo, perché la popolazione cresca, l'invasore deve avere una tolleranza fisiologica tale da consentirgli riproduzione e sopravvivenza; infine la risultante netta di tutte le interazioni con specie residenti deve permettere la crescita della popolazione insediata (Groom et al., 2006).

La probabilità di invasione dipende sia dalle caratteristiche dell'invasore che da quelle della comunità invasa: le specie con più probabilità di diventare invasive devono essere adattabili e in grado di crescere velocemente. Tali condizioni sono favorite in popolazioni con grande variabilità genetica e per questo, quando gli individui introdotti provengono da diverse popolazioni sorgente hanno spesso maggior successo e più rapida diffusione rispetto al caso in cui provengano da un'unica popolazione (Allendorf & Luikart, 2007); tuttavia possono presentarsi delle condizioni particolarmente favorevoli, quali ad esempio l'assenza di parassiti per la specie introdotta, in cui vengono favorite specie che non presentano le caratteristiche ideali per un invasore (Groom et al., 2006).

L'invasibilità di una comunità dipende invece da due fattori principali: in primo luogo il clima e l'habitat devono essere idonei per il potenziale invasore e in secondo luogo la ricchezza di specie, la forza delle interazioni e la struttura trofica della comunità devono essere tali da consentire



l'insediamento di nuove specie. L'ipotesi della resistenza biotica di Elton (1958) afferma che i sistemi ricchi di specie sono più stabili e quindi meno suscettibili alle invasioni. Complementare a tale ipotesi è quella che il disturbo, sia naturale che antropogenico, può rendere una comunità più facilmente invadibile (Lozon & MacIsaac, 1997), questo perché il disturbo può rendere disponibili risorse fruibili da qualsiasi specie o può sfavorire specie native a vantaggio di specie introdotte (Groom et al., 2006).

In teoria la giusta situazione per un'invasione viene incontrata raramente poiché ogni introduzione coinvolge un'unica combinazione di condizioni abiotiche ed interazioni biotiche. Secondo la regola del 10-10, solo una specie su 10 introdotte si stabilisce e solo una su 10 di queste diventa invasiva (Williamson, 1996). Tuttavia più recentemente è stato riscontrato che la percentuale di invasività sulle specie introdotte è drammaticamente maggiore, arrivando al 50% per ogni fase (Jeschke & Strayer, 2005).

## **2.2. Conseguenze delle invasioni**

Le invasioni hanno implicazioni in diversi campi: economico, conservazionistico ed evolutivo.

Sul piano economico si può dire che gli effetti di qualsiasi cambiamento ecologico influenzano i servizi forniti dagli ecosistemi e, di conseguenza, il benessere umano (Millenium Act, 2005).

L'impatto economico delle specie invasive è molto rilevante a livello mondiale: secondo alcune stime sarebbero necessari nei soli Stati Uniti 138 miliardi di dollari all'anno per il controllo delle specie alloctone (Pimentel *et al.*, 2000) con una perdita per l'agricoltura mondiale di circa 248 miliardi di dollari all'anno (Pimentel *et al.*, 2001). Bisogna poi considerare le perdite dovute ai patogeni, nonché i danni arrecati a pesca, navigazione ed industria; è dunque importante conoscere tali specie, per sviluppare metodi di controllo o di eradicazione (Allendorf & Luikart, 2007). Un esempio ben studiato è quello della cozza zebra (*Dreissena polymorpha*), un bivalve la cui area di diffusione nativa comprende il Mar Caspio ed il Mar Nero e che, a seguito di trasporti marittimi, si è diffuso in gran parte dell'Europa e del Nord America arrecando danni alle infrastrutture marittime ed incidendo per 1 miliardo di dollari sull'economia mondiale, nei soli primi 10 anni di invasione (Pimentel et al. 2000).

A livello conservazionistico gli effetti di una specie invasiva possono essere sia diretti, costituiti dall'interazione con le altre specie attraverso predazione, competizione, parassitismo e malattie, che indiretti attraverso ad esempio la competizione per le risorse e la modificazione

ambientale (Wootton, 1994). Qualora si tratti di specie affini, inoltre, può verificarsi ibridazione con le popolazioni native, nonché tra popolazioni non native in quei luoghi dove sono state introdotte più popolazioni alloctone (Rhymer & Simberloff, 1996). Un caso interessante è quello del rospo delle canne (*Bufo marinus*), considerato tra le 100 specie più invasive al mondo: è stato introdotto in Australia dal Nord e Centro America come agente di controllo per i parassiti delle canne da zucchero, tuttavia è risultato fortemente dannoso per l'ecosistema autoctono attraverso predazione, competizione e portando al declino predatori di anfibi che, ingerendolo, ne risultano avvelenati (Wilson et al., 2011).

A livello evolutivo una popolazione invasiva può infliggere una potente pressione selettiva sulle popolazioni autoctone. Inoltre grande interesse riveste la formazione di fasce di ibridazione, con le conseguenti implicazioni dell'ibridazione introgressiva.

### 3. IBRIDAZIONE E INTROGRESSIONE

#### 3.1. Zone di contatto secondario

L'ibridazione interspecifica consiste nell'accoppiamento tra individui appartenenti a due specie distinte che produce prole vitale (Reyer, 2008).

L'ibridazione è un fenomeno piuttosto frequente in natura: almeno il 10% degli animali ed il 25% delle piante ibridano con almeno un'altra specie (Mallet, 2005). Inoltre esso costituisce uno dei modelli di speciazione ed è causa di radiazioni adattative. Generalmente, però, le zone ibride sono d'antica formazione, e dunque gli eventi che avvengono durante le fasi precoci del processo non possono essere studiati. L'introduzione da parte dell'uomo di popolazioni non native può portare alla formazione di zone ibride secondarie, cioè di quelle zone dove due popolazioni un tempo allopatriche entrano in contatto a causa della rimozione di qualche barriera ecologica (Allendorf & Luikart, 2007); particolarmente interessante è il caso in cui sia presente flusso genico tra specie parentali ed ibridi: il mescolamento genetico di popolazioni pure attraverso il reincrocio di ibridi fertili viene detto introgressione (Liou & Price, 1994; Price, 2008).

La formazione di zone di contatto secondario in tempi recenti costituisce un'opportunità unica per studi evolutivi, rende possibile l'osservazione delle modificazioni ecologiche e genetiche che intervengono durante gli eventi di ibridazione, sin dall'inizio della perturbazione. Un esempio interessante è quello dei girasoli del genere *Helianthus*: il Girasole comune (*H. annuus*) ed il Girasole della prateria (*H. petiolaris*), un tempo con areali non sovrapposti nelle "Great Plains" (Heiser, 1947), sono ora simpatrici nella gran parte del Nord America e si incrociano occasionalmente, originando *hybrid swarms* contenenti ibridi F<sub>1</sub> ed individui risultanti da reincrocio. Ma la cosa più interessante è che dall'ibridazione di queste due specie di girasole sono risultate tre specie altamente localizzate di *Helianthus* (Rieseberg, 1991). In ognuna delle specie derivate, l'ibridazione è stata seguita da una qualche riorganizzazione del genoma, portando ad una forma che è auto-fertile, diversa in morfologia, fitochimica ed habitat, e fortemente isolata riproduttivamente da entrambi i parentali. Una delle specie ibride (*Helianthus paradoxus*) ha avuto successo in un ambiente di stagni salini inadatto ad entrambe le specie parentali presentando caratteristiche morfologiche più adattate a tali habitat, quali foglie più succulente (Lexer et al., 2003, 2003a).

### 3.2. Conseguenze ibridazione

L'ibridazione tra popolazioni native e non native può portare all'estinzione della specie nativa per diversi motivi: innanzi tutto, in caso di sterilità dell'ibrido, si ha un costo per la specie parentale che “spreca” energie riproduttive e questo costo è tanto maggiore quanto più la specie parentale è rara e minacciata.

Conseguenze dell'ibridazione sulla *fitness* possono essere depressione da esoincrocio ed eterosi. Nel primo caso la progenie ibrida ha una *fitness* più bassa dei parentali. La depressione da esoincrocio può essere intrinseca, per incompatibilità genetiche, o estrinseca, per incompatibilità ambientali; nel caso dell'eterosi, o superiorità dell'ibrido, i *loci* interessati hanno vantaggio selettivo in eterozigosi, piuttosto che in omozigosi.

A seguito di ibridazione introgressiva si può avere: fusione di specie, *genetic swamping* (“sommersione genetica”) di una specie da parte di un'altra, rinforzo dell'isolamento riproduttivo tra specie non completamente isolate, trasferimento di materiale genetico tra specie che potenzialmente facilita la loro evoluzione adattativa (Seehausen, 2004).

La fusione di specie si ha quando si blocca il meccanismo di isolamento riproduttivo a causa della rimozione di una barriera; un esempio noto è quello dei pesci Ciclidi del Lago Vittoria, che determinavano la scelta sessuale in base alla colorazione della livrea; in seguito ad eutrofizzazione del lago dove le specie vivono, le colorazioni sono diventate indistinguibili e la scelta sessuale è divenuta casuale, interrompendo l'isolamento riproduttivo tra le due specie (Seehausen et al., 1997).

Quando l'alto flusso genico porta alla perdita di varianza genetica in un *locus* sotto selezione si parla di *genetic swamping* (“sommersione genetica”) (Lenormand, 2002). Tale effetto può essere maggiore in popolazioni rade in cui il flusso genico proviene da popolazioni abbondanti. In questi casi l'immigrazione continua di genotipi localmente non adatti riduce la *fitness* media di una popolazione e potenzialmente può portare all'effetto *hybrid sink*. Questo processo si auto rinforza, infatti l'immigrazione produce ibridi che non sono adatti e che dunque riducono la densità locale, ma fanno aumentare il tasso di immigrazione (Lenormand, 2002). Un esempio è quello delle zanzare del genere *Culex* in Corsica, che non presentano resistenza ad insetticidi nonostante la presenza di pressione selettiva e, a bassa frequenza, di geni che danno resistenza. Questo si può spiegare con il fatto che l'area trattata con insetticidi in tale regione è minima rispetto alla distanza di dispersione della zanzara (Raymond et al., 1994).

Nel caso di rinforzo dell'isolamento riproduttivo successivo ad ibridazione introgressiva le barriere riproduttive evolvono a seguito della selezione contro gli ibridi. Vi sono poi casi in cui gli

ibridi presentano “fenotipi trasgressivi”, che permettono la colonizzazione di nuove aree, non adatte alle specie parentali. Tale processo è stato denominato segregazione trasgressiva e può portare alla formazione di nuove specie (Rieseberg et al., 1999). Collegata a quest'ultimo processo è l'ipotesi dell'origine ibrida, la quale afferma che la probabilità del verificarsi di una rapida radiazione adattativa è maggiore quando contatti secondari tra specie distinte coincidono con situazioni ambientali in cui alcuni genotipi ibridi non hanno svantaggio ecologico e in cui le opportunità ecologiche permettono la ripartizione della nicchia (Seehausen, 2004). Un esempio è quello dello studio condotto da Robbins et al. (2010) su due lucertole del genere *Sceloporus*: *S. woodi* e *S. undulatus*. Il maschio dell'ibrido tra queste due specie risulta avere un comportamento più aggressivo e quindi un maggior successo riproduttivo; l'accoppiamento preferenziale dell'ibrido si accompagna con un isolamento ecologico tale da permettergli di persistere.

Nel caso in cui l'ibridogenesi genera una nuova forma che però non è isolata riproduttivamente dalle forme parentali si ha un trasferimento di materiale genetico tra specie. Tale situazione si verifica in gruppi di organismi che si sono diversificati recentemente e rapidamente e che stanno continuando a farlo (Grant et al., 2005); è questo il caso delle rane verdi che costituiscono diversi complessi di ibridazione (ad esempio *Rana ridibunda-esculenta*) (Berger, 1967, 1968; Schultz, 1969; Spolsky & Uzzell, 1986).

## 4. RANE VERDI DEL COMPLESSO *Rana (Pelophylax) esculenta*

### 4.1. Distribuzione

Le rane verdi del complesso *Rana (Pelophylax) esculenta* (d'ora in poi chiamate *Rana ssp.*) sono distribuite nella regione paleartica occidentale e comprendono diversi *taxa* distinti che popolano parte dell'Asia, dell'Europa e dell'Africa nord-occidentale (Fig. 1):

- la *Rana ridibunda* (Pallas, 1771) ha un areale che si estende dall'Asia centrale, attraverso l'Asia meridionale e occidentale ed arriva all'Europa meridionale, orientale e centrale;

- la *Rana lessonae* (Camerano, 1882) è presente in Italia, in Europa centrale e orientale ed in parte dell'Europa settentrionale;

- la *Rana esculenta* (Linneo, 1758) è una specie ibrida ibridogenetica a distribuzione europea centro-settentrionale;

- la *Rana bedriagae* (Camerano, 1882) è distribuita in Africa nord-orientale (Turchia, Siria, Egitto);

- la *Rana epeirotica* (Schneider, 1984) è diffusa in Grecia nord-occidentale;

- la *Rana perezi* (Soane, 1885) è diffusa in tutta la Penisola Iberica ed in Francia meridionale;

- la *Rana cretensis* (Beerli, 1994) è presente nell'isola di Creta;

- la *Rana shquiperica* (Hotz, 1987) è presente nell'Albania orientale e in Montenegro;

- la *Rana saharica* (Boulenger, 1913) ha un areale che comprende il Marocco e le oasi del Sahara settentrionale.

Vi sono poi forme la cui classificazione è controversa in quanto secondo alcuni autori costituiscono specie distinte, ma secondo altri le caratteristiche genetiche le collocherebbero più appropriatamente all'interno di specie già descritte, tali forme sono:

- la *Rana kurtmuelleri* (Gayda, 1940), presente in Grecia, Albania e nella parte meridionale della Macedonia e da alcuni autori compresa nella specie *Rana ridibunda* (Crochet & Dubois, 2004);

- la *Rana caralitana* (Arikan, 1988), presente in Anatolia, generalmente compresa nella specie *Rana bedriagae*;

- la *Rana cerigensis* (Beerli, 1994) presente nell'isola Karpathos in Grecia, generalmente compresa nella specie *Rana bedriagae*;

- la *Rana bergeri* (Günther, 1986) presente in Italia centro-meridionale, da alcuni autori attribuita ad una forma meridionale di *Rana lessonae* (Canestrelli & Nascetti, 2008).

In questo lavoro si seguirà la seconda denominazione, chiamando quindi la forma meridionale di *Rana lessonae* italiana “*Rana lessonae* SUD” e la forma settentrionale “*Rana lessonae* NORD”.

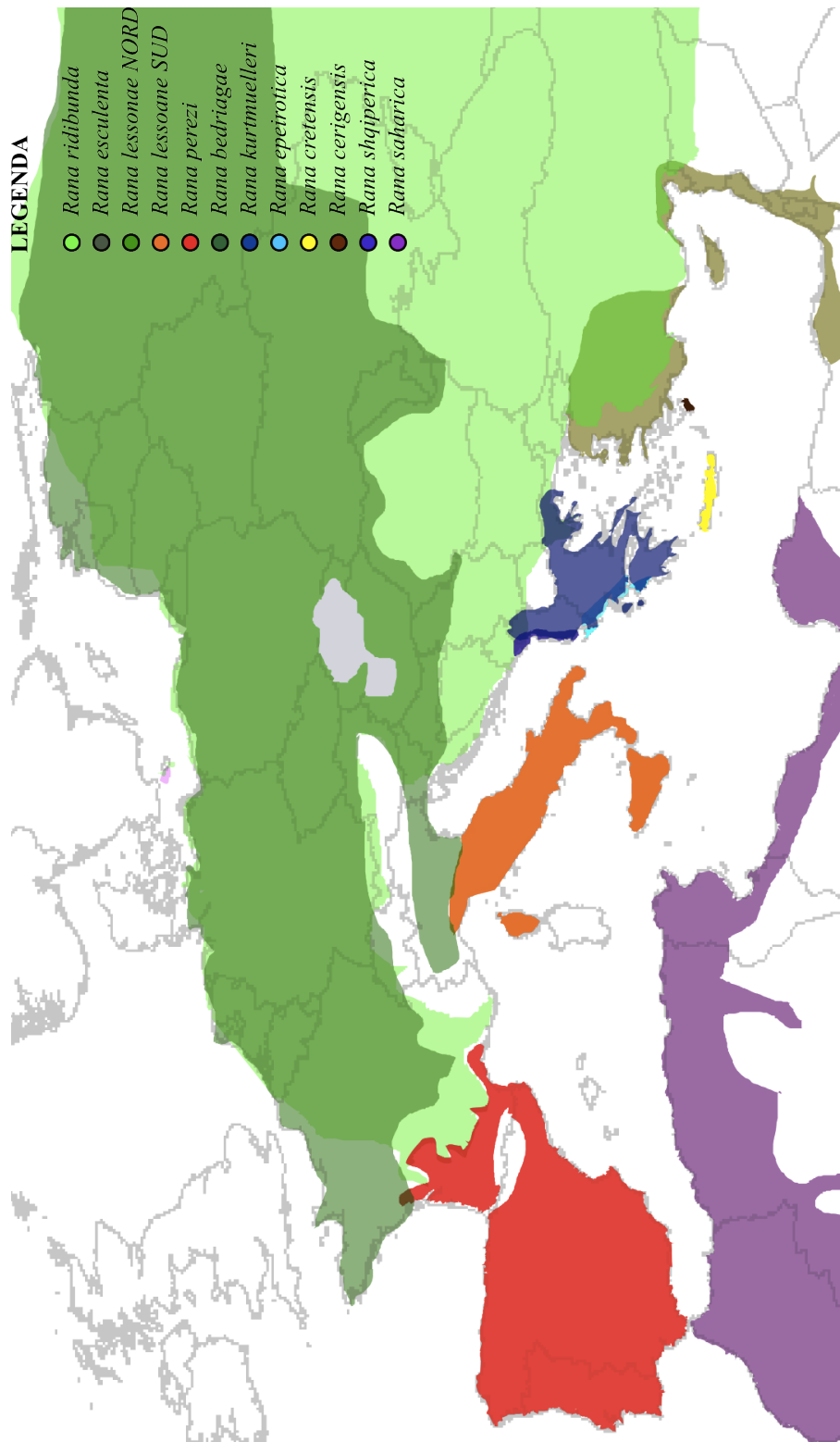


Fig.1. Distribuzione geografica delle specie di *Rana* verde nell'area Palearctica occidentale.

## 4.2. Differenziamento interspecifico

### 4.2.1. Morfologia

Le rane verdi di tutte le specie presentano caratteristiche morfologiche molto simili, per questo è difficile il loro riconoscimento (Pagano & Joly, 1999).

Generalmente la *Rana lessonae* ha dimensioni più ridotte rispetto alle altre specie, la lunghezza massima (muso-urostilo) riscontrata nei maschi è infatti di 70 mm e 83 mm nelle femmine, mentre la taglia più piccola per individui riproduttivi è di 45 mm nei maschi e 55 mm nelle femmine (Lanza, 1983; Nöllert & Nöllert, 1992; Duguet & Melki, 2003; Lapini, 2005). La *Rana ridibunda* arriva a 110 mm nei maschi e 135 mm nelle femmine (Schneider *et al.*, 1993; Gavrilovic *et al.*, 1999; Arnold, 2002). Nell'ibrido *Rana esculenta* le dimensioni vanno dai 45 ai 100 mm nei maschi e dai 55 ai 120 mm nelle femmine (Günther, 1996). La *Rana bedriagae* ha dimensioni che vanno dai 43 mm agli 86 mm nei maschi e dai 43 mm ai 93 mm nelle femmine (Disi & Amr, 2010).

Il dimorfismo sessuale è piuttosto marcato: i maschi sono in media più piccoli, con arti anteriori più robusti e sacchi vocali estroflettibili ai lati della gola (Lanza, 1983). Il I dito della mano è munito, verso l'interno, di un cuscinetto basale che, durante il periodo degli accoppiamenti, si ricopre di piccole e fitte spinule cornee grigie.

La pelle è liscia o debolmente verrucosa, la colorazione dorsale è variabile in tutte le specie e può essere verde-erba brillante, con macchie nere e gialle, o bruno-verdastra, nella *Rana lessonae* e nell'ibrido sono presenti pliche latero-dorsali di color bronzo o brunastro, spesso bordate da file di macchie nere talora fuse in bande irregolari; a volte, in tutte le specie, è presente una linea chiara mediana estesa dalla punta del muso a poco sopra la cloaca (Lanza, 1983; Disi & Amr, 2010). La faccia posteriore delle cosce in *Rana lessonae* e in *R. esculenta* ha una colorazione marmoreggiata di nero oppure oca, su fondo giallo, arancione o verde chiaro, mentre le parti ventrali sono di un bianco uniforme o più raramente di un bianco macchiettato di grigio; in *R. ridibunda* e in *R. bedriagae* la faccia posteriore delle cosce può essere biancastra, grigiasta o verdastra o verde chiaro, mentre la colorazione delle parti ventrali può variare da bianco uniforme a bianco finemente macchiettato di grigio (Lanza, 1983; Günther, 1990, 1996; Kuzmin, 1999; Lapini, 2005).

Tutte le specie presentano un muso appuntito o arrotondato e un corpo piuttosto tozzo non distinto dal muso. Caratteri diagnostici sono la conformazione delle zampe posteriori e delle dita: nel parentale *R. lessonae* le zampe posteriori sono molto corte ed i talloni non si toccano se i femori sono tenuti ortogonali rispetto all'asse del corpo; nella *R. ridibunda* e nella *R. bedriagae* i talloni



tendono a sovrapporsi vistosamente; nell'ibrido le zampe posteriori sono piuttosto lunghe ed i talloni si toccano se i femori sono tenuti ortogonali rispetto all'asse vertebrale (Uzzell & Berger, 1975; Lanza, 1983; Lanza *et al.*, 2007). In *Rana lessonae* le dita della mano sono ottusamente appuntite, con tubercoli sottoarticolari piccoli, moderatamente sporgenti, in molti casi più larghi della metà della lunghezza del primo dito; il loro colore è generalmente bianco-rosato; in *Rana ridibunda* il tubercolo metatarsale è poco rilevato, morbido, di forma rettangolare, di taglia piccola o media, in genere bicolore o nerastro (Lanza, 1983; Arnold, 2002; Lapini, 2005). In *Rana bedriagae* le dita sono appuntite, ben sviluppate, terminano con tubercoli semplici (Disi & Amr, 2010). Nell'ibrido ibridogenetico il tubercolo metatarsale interno ha una forma asimmetrica (deformata in direzione del primo dito) e dimensioni intermedie rispetto a quelle delle specie parentali ed è spesso bicolore (Lanza, 1983; Duguet & Melki, 2003); la lunghezza di tibia e tubercolo metatarsale permettono di distinguere *R. esculenta* da *R. ridibunda*.

Altro carattere diagnostico sono i denti vomerini, che in *Rana lessonae* sono molto piccoli, più o meno arrotondati, obliqui e assai distanziati, in *Rana ridibunda* sono ovali e molto distanti l'uno dall'altro (Lapini, 2005) ed in *Rana esculenta* sono medi, ovali e molto distanti l'uno dall'altro (Lanza, 1983; Lanza *et al.*, 2007).

#### 4.2.2. Ecologia ed etologia

Tutte le rane verdi popolano un'ampia varietà di ambienti acquatici, soprattutto rive di laghi, paludi, stagni e pozze stagionali, acquitrini, canali a corso lento, ruscelli e torrenti, fontanili ed altre vasche artificiali, preferenzialmente scelgono ambienti con vegetazione dove possano ripararsi (Arnold, 2002; Lapini, 2005; Lanza *et al.*, 2007). La presenza di pesci limita fortemente la densità di questi anfibi, che vengono facilmente predati ai diversi stadi di sviluppo. Generalmente le forme ibride-ibridogenetiche, grazie all'elevato tasso di eterozigosi, sono in grado di colonizzare ambienti fortemente antropizzati, al contrario le specie parentali sembrano essere più legate ad ambienti con alto indice di naturalità; la percentuale di ibridi può dunque essere utilizzata come indice di qualità dell'ambiente (Santucci *et al.*, 1996; Andreani *et al.*, 1997, 2003; Bucci *et al.*, 2009).

La distribuzione altitudinale va preferenzialmente dal livello del mare a circa 400 m s.l.m. (Lanza *et al.*, 2007), ma la forma meridionale di *Rana lessonae* è stata rinvenuta fino a 1.800 m s.l.m in Basilicata (Capula, 2006).

Le rane verdi conducono una vita prevalentemente acquatica e nel periodo riproduttivo sono attive sia nelle ore notturne che in quelle diurne. Tra tutte le rane verdi la *Rana lessonae* è la meno legata all'acqua, riuscendo a compiere migrazioni anche per tratti relativamente lunghi a terra, sverna sottoterra scavandosi delle buche con i tubercoli metatarsali molto sviluppati. Invece la *Rana*

*ridibunda* sverna nel fondo delle pozze.

La dieta degli adulti è costituita da diverse specie di invertebrati e da alcuni piccoli vertebrati. Le larve sono invece onnivore (Lanza et al. 2007).

Il periodo di attività annuale dipende dall'area geografica: le rane verdi si riproducono nei mesi primaverili ed estivi, da quando la temperatura dell'aria supera i 13°C circa, ma vi sono piccole variazioni per le diverse popolazioni (Lanza, 1983). L'amplesso è ascellare e la femmina depone, a seconda delle specie, da 1.000 a più di 13.000 uova, che vengono immediatamente fecondate dal maschio (Lanza, 1983). La schiusa avviene dopo 7-30 giorni e le larve metamorfosano in genere in 2-4 mesi.

All'inizio del periodo di attività i maschi si radunano in gruppi molto compatti e cantano in coro. Le vocalizzazioni comprendono quattro tipi di canti: uno riproduttivo, due territoriali e uno di rilascio (Radwan & Schneider, 1998). Le caratteristiche del canto delle varie specie costituiscono tra l'altro un utile elemento diagnostico.

Il canto riproduttivo della *Rana lessonae* è costituito da semplici gracidii ripetuti in sequenza: ciascuno di essi inizia debolmente e aumenta di volume progressivamente per terminare poi all'improvviso. Questo canto può essere descritto come una serie di “crrrroack... crrrroack” (Roché, 1997). La *Rana ridibunda* e la *Rana bedriagae* hanno canti costituiti da una rapida e crescente successione di 7-8 potenti versi, rappresentati con un “crrre-cre-cre-cre-cre”, che assomiglia ad una risata (Lapini, 2005; Schneider & Sinsch, 2001). La specie ibrida *Rana esculenta* ha un richiamo costituito da una caratteristica ripetizione regolare di brevi motivi costituiti di triplette di singole note identiche che suonano come un “Croak... croak...crrrrroak” (Roché, 1997; Lanza, 2007) (Fig. 2).

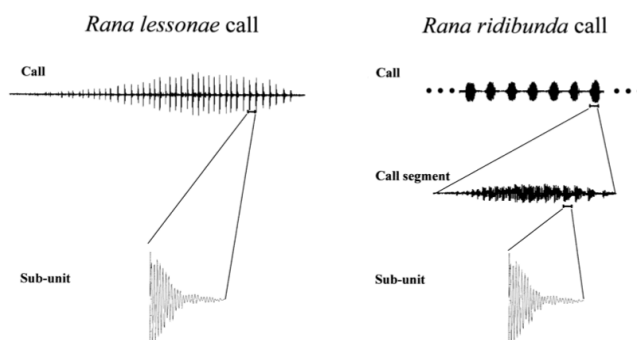


Fig. 2. Sonogrammi dei canti di *Rana lessonae* e *Rana ridibunda* (da Wycherley et al., 2002).

Il ruolo della femmina nella scelta sessuale tra parentali ed ibridi attraverso i richiami è stato considerato determinante (Wycherley et al., 2002; 2002a). Tuttavia recentemente Lengagne e collaboratori (2006) hanno dato una spiegazione alla disproporzione negli accoppiamenti

eterospecifici delle rane verdi; essi infatti osservano che la differenza nei canti riproduttivi tra il parentale *R. lessonae* e l'ibrido *R. esculenta* influenza molto gli accoppiamenti in cori affollati misti, favorendo i maschi *R. lessonae*, più competitivi nell'afferrare la femmina, rispetto agli ibridi che, come i parentali *R. ridibunda*, hanno una strategia di difesa del territorio.

Gli studi di bioacustica sono stati utilizzati per valutazioni tassonomiche, attribuendo ai richiami un ruolo comparabile a quello dei *loci* genetici neutrali per fare inferenze filogeografiche (Sinsch & Schneider, 1996; Wycherley et al., 2002; 2002a). Tuttavia tale punto di vista non è accettato universalmente: le variazioni dei canti, essendo utilizzate negli anuri per la scelta sessuale, sono un buon metodo per discriminare le specie in simpatria, ma non in allopatria, come confermato dai risultati dell'analisi degli allozimi (Schneider & Sinsch, 1999). Questo rende il riconoscimento tassonomico per mezzo dei richiami un sistema non utilizzabile da solo.

#### 4.2.3. Genetica

Fino alla fine degli anni '60 le rane verdi europee erano ascritte da quasi tutti i sistematici a due sole specie, sulla base dei caratteri morfologici ed etologici: *Rana ridibunda* Pallas, 1771 e *Rana esculenta* Linnaeus, 1758; *Rana lessonae* e *Rana perezi* erano considerate sottospecie di *Rana esculenta*. Negli anni '60, grazie alla comparazione di dati morfologici, etologici e biochimici, dapprima Berger (1964) e poi molti altri studiosi (Günther, 1969; Tunner, 1979; Uzzell & Berger, 1975; Uzzell & Hotz, 1979) stabilirono che la *Rana esculenta* non è una normale specie biologica, ma una forma ibrida ibridogenetica originatesi da incroci tra *Rana lessonae* e *Rana ridibunda*; dopo questa scoperta furono condotte diverse ricerche sulla sistematica delle rane verdi europee, utilizzando soprattutto incroci in laboratorio, elettroforesi di allozimi e tecniche immunologiche (Günther & Plötner, 1994; Tunner, 1979; Uzzell, 1979; Hotz et al., 1997). Da tali ricerche è risultato che in Europa esistono diversi complessi ibridi-ibridogenetici: i principali sono il sistema L-E (*lessonae-esculenta*) ed il sistema R-E (*ridibunda-esculenta*); il complesso ibridogenetico L-E è quello più diffuso. L'accoppiamento avviene tra l'ibrido *Rana esculenta* (LR) e la specie parentale sintopica, con genotipo omozigote (RR o LL). Nel caso del complesso L-E prima della meiosi la specie eterozigote perde nelle cellule germinali il genoma L e produce gameti R, per duplicazione del genoma R non ricombinante. A questo punto la fecondazione avviene tra una linea germinale L del genitore con genotipo parentale e una linea germinale R del genitore con genotipo eterozigote, ristabilendo l'ibrido LR (Tab. 1). A causa della caratteristica di sfruttare la specie parentale per mantenere il proprio genoma eterozigote, *Rana esculenta* è considerato un parassita sessuale (Uzzell, 1979; Paolucci et al. 1987; Santucci et al., 1996; Pagano et al., 2003; Vorbürger & Reyer, 2003; Hotz et al., 2008; Schmeller et al., 2007).

	<i>Rana lessonae</i> (LL)	<i>Rana esculenta</i> (LR)
<i>Rana lessonae</i> (LL)	LL ( <i>R. lessonae</i> )	LR ( <i>R. esculenta</i> )
<i>Rana esculenta</i> (LR)	LR ( <i>R. esculenta</i> )	RR ( <i>R. ridibunda</i> )

Tab.1. Complesso *lessonae-esculenta*: schema dei genotipi risultanti dai diversi accoppiamenti.

Gli studi di Holsbeek (2008; 2009) su marcatori mitocondriali e nucleari hanno mostrato inoltre evidenze di ibridazione ed introgressione tra la specie di origine anatolica *Rana bedriagae* e la specie a diffusione centro europea *Rana ridibunda* in aree di recente introduzione antropogenica.

Gli esperimenti di incrocio si basano sul principio che tra specie distinte esistono meccanismi di isolamento postzigotico: gli incroci condotti in laboratorio tra *Rana lessonae* e *Rana esculenta* hanno dimostrato che la prole ibrida è fertile (Günther & Plötner, 1994).

La complessità dei metodi riproduttivi e della storia delle rane verdi europee le rende un ottimo modello per studi evolutivi, ma allo stesso tempo ha reso necessario l'utilizzo di molti marcatori genetici diversi, che, dopo decenni di studi ed affiancati a metodi di indagine etologici e morfologici, hanno permesso di indagare le dinamiche filogeografiche ed evolutive di questo interessante gruppo di Anuri.

#### 4.3. Marcatori molecolari utilizzati nello studio delle rane verdi

I dati elettroforetici si basano sull'analisi delle diverse forme di un enzima codificato da diversi alleli in un singolo *locus* genetico. Dal 20 al 40% dei *loci* codificanti enzimi mostrano variabilità in differenti gruppi di organismi (Parker et al., 1998), per questo tale analisi è un buon metodo per identificare i pattern di eterozigotità e le frequenze alleliche. Vanno però utilizzati simultaneamente molti enzimi per ottenere informazioni rappresentative. Il numero di forme differenti presenti nelle popolazioni può quindi essere determinato per ogni enzima e la variabilità in e tra popolazioni può essere valutata dai risultati delle analisi di tutti gli enzimi. Inoltre dal numero di sostituzioni amminoacidiche nelle proteine si può calcolare il tasso di evoluzione delle

proteine che fornisce un orologio molecolare (Zuckerlandl & Pauling, 1962). Nel caso delle rane verdi europee è stato utilizzato l'evento geologico della Crisi di Salinità del Messiniano (5.61-5.33 Ma), in particolare la fase post-evaporitica ( $5.2 \pm 0.1$  Ma) quando il riempimento del bacino del Mediterraneo isolò le popolazioni di Creta (*R. cretensis*) da quelle del continente e dalle popolazioni di Spagna e Nord Africa (Beerli et al., 1996; Akin et al., 2010).

Tali ricerche portarono alla classificazione di *Rana perezi* come specie distinta ed identificarono nuove specie nell'area balcanica e nord africana (*Rana epeirotica* Schneider, 1984 in Grecia; *Rana shqipERICA* Hotz, 1987 in Jugoslavia; *Rana cretensis* Beerli, 1994 a Creta; *Rana cerigensis* Beerli, 1994 a Karpathos); in più fu esteso l'areale di *Rana bedriagae* alla zona nord africana (Dubois & Ohler, 1994) e fu identificata una forma distinta di *Rana lessonae* nell'area peninsulare italiana, cui fu attribuito il nome di *Rana bergeri* Günther, 1985; negli anni '90 furono descritte diverse altre specie di rane verdi in Europa, che però incontrarono controversie sulla loro attribuzione a specie.

Negli anni '90 la diffusione dell'uso del DNA mitocondriale ha permesso di aggiungere un marcatore, oltre agli allozimi, per stimare i tempi di divergenza delle diverse linee evolutive, chiarendo ulteriormente il quadro biogeografico delle rane verdi europee; l'analisi del mtDNA ha permesso inoltre di identificare l'origine di specie invasive di rane verdi (Hotz et al., 1992; Plötner, 1998; Plötner & Ohst, 2001; Lymberakis et al., 2007; Akin et al., 2010; Holsbeek & Jooris, 2010). Il DNA mitocondriale (mtDNA) è una molecola che negli animali è lunga circa 15.000-20.000 paia di basi e codifica per subunità di molti enzimi mitocondriali e per molte forme di RNA. I vantaggi dell'uso del mtDNA sono numerosi: per prima cosa è presente in centinaia di migliaia di copie nelle cellule, rendendolo una forma di DNA relativamente facile da ottenere; è la forma di DNA con più probabilità di sopravvivere a lungo dopo la morte di un organismo; in quasi tutte le specie il mtDNA è trasmesso senza ricombinazione alla prole, essendo ereditato unicamente per linea materna, fatto che permette indagini sulla matrilinearità; infine possiede una regione non codificante di controllo che è altamente variabile e ad alto tasso di mutazione quindi può dare indicazioni sulla storia più recente, ad esempio di popolazioni affini. Le sequenze ottenute dopo amplificazione e sequenziamento di mtDNA possono essere esaminate per determinare il grado di variabilità nelle popolazioni o il grado di similarità tra le popolazioni.

Tuttavia il DNA mitocondriale va considerato come un'unità di *linkage* che fornisce quindi solo un'informazione parziale di una storia evolutiva delle popolazioni, ed in più il fatto che sia aploide ed ereditato per linea materna implica che dai risultati ottenuti dalla sua analisi non si possano identificare eterozigoti e neanche eventuali geni introgressi (Zhang & Hewitt, 2003). Inoltre, nel caso di specie che si incrociano, quando la selezione contro determinati geni in una

specie elimina gradualmente quelli di un'altra specie, può non essere visibile il fenomeno creando un'illusione di persistenza (Hartman et al., 2012). Per ovviare a queste problematiche l'analisi del DNA mitocondriale va affiancata con l'analisi di marcatori nucleari, quali allozimi o DNA nucleare. I marcatori nucleari possono fornire un modello più accurato ed immediato per identificare ibridi e valutare il grado di introgressione (Vallender et al. 2007). Marcatori nucleari che presentano tassi di mutazione alti e che sono dunque utilizzabili per l'indagine delle divergenze genetiche in specie affini come il complesso delle rane verdi sono ad esempio i microsatelliti, il cui utilizzo si è diffuso a partire dalla fine degli anni '90 ed è stato importante nell'identificazione di invasioni di specie, anche di Rana verde (Zeisset & Beebee, 2001, 2003; Holsbeek et al., 2008; Christiansen & Reyer, 2009).

I microsatelliti sono sezioni di DNA nei quali una sequenza di 1-6 nucleotidi è ripetuta molte volte. Tali sequenze non codificano per proteine e tendono ad essere localizzate in regioni centromeriche o non codificanti dei cromosomi. Il numero di unità di microsatelliti in una certa collocazione varia ed in questo modo essi possono essere analizzati in modo analogo agli alleli di un marcatore di sequenza. I microsatelliti mutano per il cambiamento nel numero delle unità ripetute ed il tasso di mutazione di queste unità è molto più alto del tasso di mutazione dei marcatori di sequenza (Li et al., 2002). Possono dunque essere usati per determinare il grado di variabilità in una popolazione o la similarità di individui da diverse popolazioni poco distanti geneticamente. Esistono tuttavia dei limiti nell'uso dei microsatelliti: essi presentano frequentemente alleli nulli ed omoplasie, che alterano le stime delle frequenze alleliche e dell'eterozigosità e complicano la lettura delle relazioni evolutive (Estoup et al., 2002).

#### **4.4. Conservazione**

Sebbene le rane verdi non possano essere ritenute specie in pericolo, sono infatti classificate come “Least concern” nella “Red List” dell'IUCN (2009), i cambiamenti ambientali prodotti dall'uomo negli ultimi decenni (bonifica di paludi e acquitrini, captazione di sorgenti, inquinamento dei corsi d'acqua) ne stanno comportando la rarefazione (Capula et. al., 2005). La raccolta delle rane verdi per scopi alimentari od ornamentali è attualmente vietata o regolamentata da alcune leggi di tutela della fauna minore vigenti in Europa (Ferri, 2006; Holsbeek et al., 2008), tuttavia, essendo la domanda di tali specie ampia, vengono importate specie esotiche che non compaiono nell'appendice della “Convenzione sul Commercio Internazionale di Specie in Pericolo della Flora e della Fauna” (CITES) e provengono da Paesi che non hanno leggi che le proteggono. Di conseguenza la componente ecologica e l'inquinamento genetico legato all'introduzione di specie affini costituiscono

la minaccia peggiore per questi anfibi in diverse aree dell'Europa, molti lavori si sono occupati di indagare su tali introduzioni: in Spagna (Arano et al., 1995); in Francia (Pagano et al. 2001, 2003; Schmeller et al., 2005), in Gran Bretagna (Zeisset & Beebee, 2001, 2003), in Belgio (Holsbeek et al., 2008, 2010), in Svizzera (Vorburger & Reyer, 2003; Christiansen & Reyer, 2009). In Italia sono documentate introduzioni di *R. ridibunda* e *R. kurtmulleri*, in diverse località del Nord Italia: *R. kurtmulleri* in Liguria e Piemonte nel 1941, dall'Albania (Lanza, 1962); *R. ridibunda* in aree della provincia di Trieste (Bressi, 2006) ed in alcune località del Trentino (Lapini & Zanghellini, 1995).

La specie più sensibile è *Rana lessonae*, legata ad ambienti non disturbati; tale specie è inclusa nell'Allegato III della Convenzione di Berna (1979) e nell'Allegato IV della Direttiva Habitat 92/43/CEE (1992) (D'Antoni et al., 2003); *Rana ridibunda* è invece meno sensibile all'alterazione dell'ambiente, così come *Rana bedriagae* e gli ibridi. Tuttavia, mentre la prima sembra sia tendente ad un aumento della popolazione, la seconda tende a declinare, probabilmente a causa della ridotta dimensione dell'areale (IUCN, 2012).

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1. Area di studio

L'area di introduzione delle rane verdi alloctone oggetto di questo studio si trova nelle province di Forlì-Cesena e Ravenna, in Nord-Italia.

L'area, ampia all'incirca 900 Km<sup>2</sup>, è situata nella parte più meridionale della Pianura Padana e confina ad Est con il mare Adriatico e a Sud e ad Ovest con gli Appennini Tosco-Romagnoli che raggiungono i 1600 m.s.l.m.; tutti questi ambienti costituiscono barriere naturali per le rane verdi; a Nord invece è presente un'area fortemente antropizzata, a coltivazioni intensive trattate con diserbanti e antiparassitari attraverso la quale l'espansione delle rane verdi è molto difficile considerando che tali trattamenti sono velenosi per gli anfibi, come da noi stessi verificato durante i campionamenti (Fig. 3).

L'area di studio è particolarmente interessante dal punto di vista evolutivo trattandosi di una zona di contatto per diverse specie di anfibi, come i tritoni del genere *Triturus* (Scillitani & Picariello, 2000), le raganelle del genere *Hyla* (Canestrelli et al., 2007) e le due forme di *Rana lessonae* presenti in Italia (Canestrelli & Nascetti, 2008).

L'interesse per quest'area è sorto dopo la prima segnalazione di possibile presenza di rane verdi alloctone, avvenuta nell'aprile 2003 tramite il riconoscimento di richiami presumibilmente appartenenti ad individui non autoctoni, nella località di Magliano (FC) (S1).

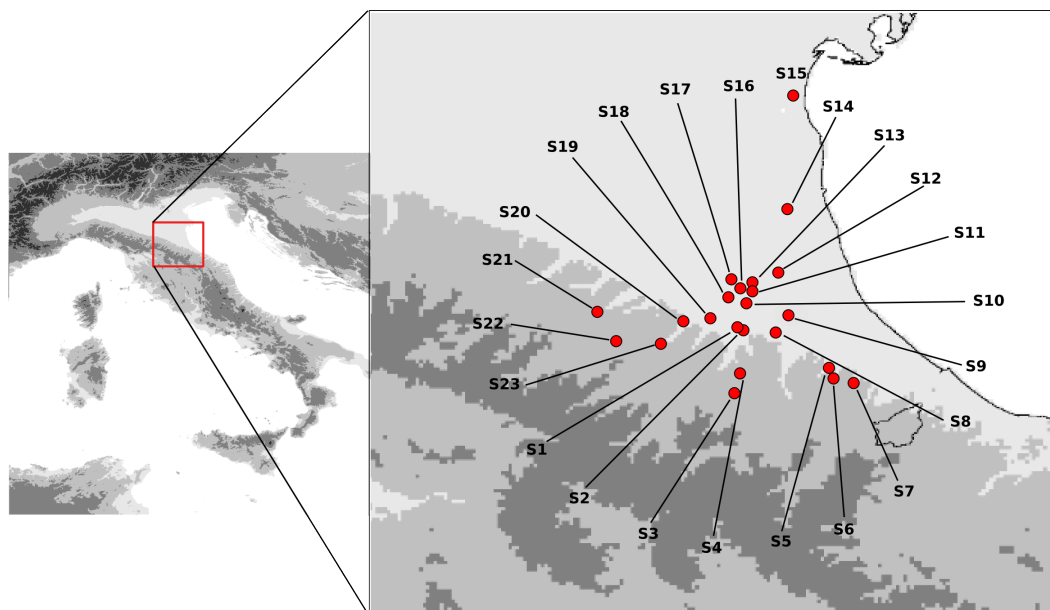


Fig. 3. Distribuzione geografica dei siti di campionamento nell'area provinciale di Forlì-Ravenna, numerati come in Tab. 2 (S1-S23).



## 5.2. Campionamento

Per confermare la natura alloctona degli individui riconosciuti dal canto è stato analizzato geneticamente un campione di questi tramite amplificazione di un frammento di DNA mitocondriale (vedi par. 5.3).

I campionamenti sono stati quindi effettuati partendo dall'area della prima segnalazione e via via ampliando il raggio di campionamento, secondo il seguente schema: partendo dal sito centrale della prima segnalazione (S1), si è proseguito ai 4 punti cardinali a distanze iniziali di 10 Km, poi di 20 Km ed infine di 30 Km dal sito centrale, fermandosi laddove non si trovavano più individui appartenenti a specie alloctone e, in quei casi, andando a diminuire la distanza del campionamento.

In tale modo è stata delimitata l'area di invasione e sono stati individuati mediante i canti 33 siti di presenza di rana verde all'interno delle province di Forlì-Cesena e Ravenna, in 22 di tali siti sono stati raccolti esemplari (Fig. 3). In più sono stati campionati alcuni individui nella zona di Comacchio (S15), a Nord della zona antropizzata presunta barriera all'espansione di rane verdi, per controllare l'assenza di individui alloctoni; il campione totale è risultato così di N = 193 individui (Tab. 2).

Durante le sessioni di campionamento è stata inoltre cercata una possibile fonte di introduzione di rane verdi alloctone mediante interviste ai locali ed una ricerca di documentazione storica presso la camera di commercio. È stato così individuato, a Ravenna, un luogo dove avviene la macellazione di rane provenienti vive dall'Est Europa, di cui è titolare la società FISH & FROG S.R.L., che è risultata in attività a partire dal 1994. Sono stati dunque acquistati alcuni individui (N = 50) presso una pescheria che vi si rifornisce (Tab. 2).

Per le catture sono stati utilizzati retini da pesca, prevalentemente in orari notturni e nei mesi di maggio, giugno e luglio dal 2009 al 2011. Agli individui catturati è stato prelevato del tessuto mediante “toe clipping” (Perret & Joly, 2002), che poi è stato trasportato in azoto liquido e conservato in parte in alcool al 95% per l'analisi del DNA e in parte a -80°C per l'analisi allozimica.

Origine			Individui	
Località	Sito	Coordinate	Sigla	n° individui
Magliano cava (FC)	1	44°09'44.80" N; 12°05'23.60" E	KAA; KAB	25+9
Magliano golf (FC)	2	44°09'44.80" N; 12°05'23.60" E	KBB; KCB	16+2
Piandispino a (FO)	3	44°03'49.70" N; 12°05'28.10" E	KLC	2
Piandispino b (FO)	4	44°03'49.70" N; 12°05'28.10" E	KKC	9
Longiano (CE))	5	44°04'24.80" N; 12°17'35.90" E	KPC	1
Roncofreddo a (FC)	6	44°03'14.20" N; 12°18'28.40" E	KQC	1
Roncofreddo b (FC)	7	44°02'29.40" N; 12°21'14.80" E	KRC	3
Trentola (FO)	8	44°09'37.30" N; 12°10'17.70" E	KJC	9
Borgo Pieve Sistina (CE)	9	44°11'35.61" N; 12°13'02.40" E	KIC	1
Carpinello (FO)	10	44°13'42.10" N; 12° 6'10.90" E	KFC	2
S. Giorgio (FO)	11	44°15'49.80" N; 12°05'17.50" E	KEC	19
Carraie (RA)	12	44°18'04.50" N; 12°10'40.00" E	KHC	2
Coccolia (FC)	13	44°18'42.84" N; 12°06'23.16" E	KVD	11
Ravenna S. Apollinare in Classe	14	44°23'52.59" N; 12°13'34.01" E	KOD	1
Comacchio (RA)	15	44°40'57.90" N; 12°09'24.00" E	KZD	6
Barisano a (FO)	16	44°17'05.90" N; 12°04'13.60" E	KMC	1
Russi (RA)	17	44°20'09.00" N; 12°01'48.54" E	KSD	1
Barisano b (FC)	18	44°16'13.80" N; 12°03'43.90" E	KMD	4
Vecchiazano (FC)	19	44°11'44.79"N; 12°01'12.36" E	KDB1	15
Terre del Sole (FC)	20	44°11'12.80" N; 11°57'36.10" E	KND	12
Riolo Terme (RA)	21	44°16'11.07" N; 11°42'06.99" E	KWD	9
Modigliana (FC)	22	44°08'27.30" N; 11°48'05.50" E	KTC	20
Dovadola (FO)	23	44°08'11.80" N; 11°54'23.80" E	KGC	12
macello	M		KUC; KUE	16+34

Tab. 2. Indicazione geografica dei siti di campionamento rappresentati in Fig. 3. Sono indicati la località e la sigla del sito di provenienza con le coordinate geografiche; la sigla degli individui per ogni sito ed il loro numero.

### 5. 3. Procedure di laboratorio

#### 5.3.1. Estrazione, amplificazione e sequenziamento DNA

In laboratorio si è proceduto con l'estrazione del DNA mediante protocollo C-Tab con Fenol-Cloroformio (Doyle & Doyle, 1987). Il DNA estratto è stato conservato a -20°C.

Come marcatore mitocondriale è stata scelta la subunità 2 del gene mitocondriale del NADH (ND2) essendo presenti in “GenBank” sequenze di tale subunità con provenienze distribuite in tutta l'area di autoctonia delle forme alloctone. Sono state dunque ottenute sequenze parziali (circa 600 paia di basi) mediante amplificazione con reazione a catena della polimerasi (PCR) seguendo protocolli tratti da bibliografia (Plötner & Ohst, 2001; Plötner et al., 2008) e ottimizzati dopo diverse prove. Sono stati utilizzati i *primers* ND2 L2 e ND2 H2 (Plötner et al., 2008) e l'amplificazione è stata condotta in un volume di 25 µl contenente MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), il tampone di reazione (2x), i quattro dNTPs (0,2 mM), i due *primers* (0,2 mM ognuno), l'enzima Taq polimerasi (GoTaq Promega) e 0,2 µl di DNA; la reazione di PCR seguita è: 94°C per 5 minuti, 39 cicli a 94°C per 45 secondi, 48°C per 1 minuto, 72°C per 90 secondi ed uno *step* finale di 72°C per 10 minuti.

Il sequenziamento è stato condotto con un sequenziatore ABI PRISM 377 DNA (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguendo il protocollo “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing”, presso la ditta “Macrogen” (www.macrogen.com).

### 5.3.2. Allozimi

Sono stati esaminati 10 *loci* allozimici, codificanti per 9 enzimi, mediante elettroforesi orizzontale su gel d'amido “StarchArt” modificato da amido di patate (Starch Art Corporation P.O. Box 268, Smithville, TX, USA 78957), disciolto al 14% in un sistema tampone specifico per ogni enzima (Tab. 3).

Il tessuto muscolare di individui utilizzato per l'analisi elettroforetica è stato conservato a -80°C ed omogenizzato meccanicamente con poche gocce d'acqua prima di essere seminato sulla piastra elettroforetica (Pasteur et al., 1987). La durata, il voltaggio e l'amperaggio della corsa elettroforetica variano a seconda dell'enzima (Tab. 4). Le colorazioni specifiche per i diversi enzimi sono state effettuate sulle due fette di gel elettroforetico (Tab. 4).

I *loci* allozimici sono stati selezionati tra quelli già conosciuti in bibliografia come polimorfici per le rane verdi:  $\alpha$ GPDH, G3PDH, LDH, 6PGD, IDH, GOT-1, GOT-2, PGM, MPI, GPI (Tab. 5) (Uzzell & Berger, 1975; Tunner, 1979; Uzzell & Hotz, 1979; Hotz, 1983; Günther & Plötner, 1994; Beerli et al., 1996; Santucci et al., 1996; Hotz et al., 1997; Pagano et al., 2001).

Gli alleli di ciascun *locus* sono stati nominati con una numerazione che tiene conto della mobilità elettroforetica relativa, espressa in mm, prendendo come riferimento l'alozima più frequente nella popolazione di riferimento di Morozzo (terra tipica di *Rana lessonae*) e attribuendogli il valore 100 (Tab. 5) (Shatz, 1991).

Sistemi tampone	Ponti	Gel
1. Tris citrato discontinuo (Poulik, 1957)	Borato di Sodio 0.2 M, pH 8.2	Tris 0.076 M, Acido citrico 0.005 M, pH 8.7
2. Tris citrato continuo (Selander et al., 1971)	Tris 0.687 M, acido citrico monoidrato 0.157 M, pH 8	Tris 0.023 M, Acido citrico 0.005 M, pH 8
3. Tris/versene/borato (Brewer & Sing, 1970)	Tris 0.21 M, acido borico 0.15 M, EDTA 0.006 M, pH 8	Tris 0.021 M, Acido borico 0.02 M, EDTA 0.007 M, pH 8
4. Fosfato/citrato (Harris, 1966)	Citrato di Sodio tribasico 0.15 M, Fosfato di Sodio monobasico 0.24 M, pH 6.3	Tampone ponti diluito 1:40, pH 6.3 con acido citrico 0.2 M
5. Tris/maleato (Brewer & Sing, 1970 modificato)	Tris 0.1 M, Acido maleico 0.1 M, EDTA 0.01 M, MgCl <sub>2</sub> 0.015 M, NaOH 0.125 M, pH 7.4	Tampone ponti diluito 1:10, pH 7.4

Tab. 3. Sistemi tampone utilizzati per l'analisi allozimica.

Enzima	Sistemi tampone	Volt	Tempo (h)	Tamponi di colorazione	Coenzimi	Enzimi	Substrati	Attivatori, inibitori	Metodi di visualizzazione
PGM	5	70	6	5 mL Tris HCl 0.05 M pH 8	10 mg NADP	0.02 mg G6PDH	80 mg glucosio-1-fosfato	10 mg MgCl <sub>2</sub>	15 mg MTT, 3 mg PMS, agar 0.75%
MPI	3	80	5	5 mL Tris HCl 0.05 M pH 8	10 mg NADP	0.02 mg G6PDH; 0.02 mg PGI	25 mg mannosio-6-fosfato	10 mg MgCl <sub>2</sub>	15 mg MTT, 3 mg PMS, agar 0.75%
GOT	1	90	5	50 mL Tris HCl 0.05 M pH 8			10 mg piridossal-5'fosfato	200 mg ac. Aspartico, 100 mg ac. chetoglutarico pH 7.5 con Tris 1 M	150 mg Fast Blue
αGPDH	4	90	6	5 mL Tris HCl 0.05 M pH 8	20 mg NAD		300 mg α-glicero-fosfato	50 mg EDTA	15 mg MTT, 3 mg PMS, agar 0.75%
LDH	2, 5	75	6	5 mL Tris HCl 0.05 M pH 8	20 mg NAD		50 mg acido L(+)-lattico		15 mg MTT, 3 mg PMS, agar 0.75%
6PGD	4	90	6	5 mL Tris HCl 0.05 M pH 8	10 mg NADP		20 mg gluconato-6-fosfato	10 mg MgCl <sub>2</sub>	15 mg MTT, 3 mg PMS, agar 0.75%
GPI	1, 3	90	5	5 mL Tris HCl 0.05 M pH 8	10 mg NADP	0.02 mg G6PDH	10 mg fruttosio-6-fosfato	10 mg MgCl <sub>2</sub>	15 mg MTT, 3 mg PMS, agar 0.75%
G3PDH	2	90	6	50 mL Tris HCl 0.05 M pH 8	30 mg NAD	0.1 ml Aldolasi	125 mg fruttosio-1,6-difosfato incubato a 37°C con Aldolasi per 1h	125 mg Arseniato di Sodio; 3 mg MgCl <sub>2</sub>	30 mg MTT, 3 mg PMS,
IDH	2	80	6	5 mL Tris HCl 0.05 M pH 8	10 mg NADP		30 mg DL-isocitrato	10 mg MgCl	15 mg MTT, 3 mg PMS, agar 0.75%

Tab. 4. Procedure elettroforetiche per l'analisi allozimica.

Enzima	Locus	n° Comm. Enzima	n° loci	Sinonimi	n° alleli	Nomenclatura alleli
A-Glicerofosfato deidrogenasi	$\alpha$ GPDH	EC 1.1.1.8	1	$\alpha$ GDH	5	80 100 110 115 120
Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi	G3PDH	EC 1.2.1.12	1	GAPDH	2	93 100
L-Lattato deidrogenasi	LDH	EC 1.1.1.27	1		7	98 100 106 108 112 116 120
6-Fosfogluconato deidrogenasi	6PGD	EC 1.1.1.43	1	6PGDH	4	88 93 100 105
Isocitrico deidrogenasi	IDH	EC 1.1.1.42	1		2	93 100
Glutammino ossalacetico transaminasi	GOT-1	EC 2.6.1.1	2	sAAT, AAT-1	3	100 105 115
	GOT-2			mAAT, AAT-2	5	85 90 95 100 108
Fosfoglucomutasi	PGM	EC 2.7.5.1	1		3	92 100 106
Mannosio-6-fosfato isomerasi	MPI	EC 5.3.1.8	1		4	93 100 103 105
Glucosio-6-fosfato isomerasi	GPI	EC 5.3.1.9	1	PHI	6	80 88 95 100 108 116

Tab. 5. Enzimi analizzati, loci codificanti, numero e nomenclatura degli alleli utilizzati.

## 5.4. Analisi dei dati genetici

### 5.4.1. DNA mitocondriale

I cromatogrammi delle sequenze di DNA sono stati controllati manualmente usando il software “FinchTV 1.4” (Geospiza inc.). L'allineamento è stato effettuato utilizzando “ClustalX 2.1” (Thompson et al., 1997) impostato con i parametri di *default*.

Il miglior modello di evoluzione delle sequenze è stato scelto tra 88 modelli alternativi attraverso l'utilizzo dell' Akaike Information Criterion (AIC) in JModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). Si è così scelto il modello General Time Reversible (GTR; Tavaré, 1986). Le distanze genetiche fra coppie di sequenze sono state calcolate con “MEGA 5.0” (Tamura et al., 2007).

Per determinare l'esistenza di gruppi di sequenze ben differenziati all'interno dell'area di studio, e per valutare le loro relazioni filogenetiche, è stata condotta un'analisi filogenetica con il metodo di Massima Verosimiglianza (ML) per mezzo del programma “PhyML 3.0” (Guindon et al., 2010). L'analisi è stata effettuata utilizzando il modello di evoluzione precedentemente identificato come migliore, 1.000 repliche di *bootstrap*, ed il resto dei parametri impostati sulle opzioni di *default*. Le relazioni filogenetiche tra aplotipi sono state ulteriormente indagate mediante la costruzione di *network* di parsimonia statistica (con la soglia di 95% per una connessione parsimoniosa), con il software “TCS 1.2.1” (Clement et al., 2000).

Lo studio delle affinità fra gli aplotipi isolati nell'area di Forlì-Ravenna e le varie forme di Rana verde presenti in Europa è stato effettuato in 3 fasi:

1. Il primo passo dello studio è stato quello di verificare se gli individui campionati

nell'area di Forlì-Ravenna appartenessero effettivamente a forme non native. Sono perciò state confrontate le sequenze degli individui campionati con sequenze di controllo di individui autoctoni dell'area di studio ottenute in precedenti lavori (Canestrelli & Nascetti, 2008).

2. In secondo luogo, appurata la presenza di forme alloctone, la specie di appartenenza ed un primo *screening* dell'affinità geografica degli individui campionati sono stati valutati comparando mediante il *Software* "Blastn" (National Library of Medicine) la loro affinità rispetto a sequenze di rana verde georeferenziate e tassonomicamente determinate presenti in "GenBank" (National Library of Medicine).

3. A questo punto è stato effettuato il *download* di tutte le sequenze di ND2 di rana verde presenti in "GenBank" (N=159) (Tab. 7) ed affini a quelle campionate nell'area di Forlì-Ravenna. La provenienza di ogni sequenza ottenuta da "GenBank" è stata annotata e visualizzata tramite "GoogleEarth 6.1.0.5001".

Il *set* di dati definitivo è risultato così composto da 402 sequenze: le sequenze scaricate da "GenBank" (N = 159) (Tab. 6; Fig. 4), quelle provenienti dal campionamento a Forlì-Ravenna (N = 193) e quelle prelevate dal macello (N = 50) (Tab. 2). Da questo primo insieme sono state eliminate 7 sequenze che presentavano sovrapposizione solo parziale: 3 dall'area di Forlì-Ravenna, 2 dal macello e 2 da "GenBank" (N = 395). Tale *dataset* finale è stato utilizzato per inferire l'area geografica di possibile origine degli individui raccolti o delle rispettive linee genealogiche. Questa è stata definita come l'area di provenienza delle sequenze presenti in banca dati, aventi il valore minimo di divergenza rispetto alle sequenze *target*. La divergenza fra sequenze è stata visualizzata e valutata mediante costruzione di *network* di parsimonia statistica.

Paese	Origine		Abbreviazione	Riferimento	Genoma Mt (ND2)						Aplotipo	Accession number	
	Località	Coordinate			les S	les N	rid	bed	car	cer			
<b>Albania</b>	Durrës	41°18'N 19°28'E	1	Plötner 2008			3				R2	AM749704	
<b>Bulgaria</b>	Alepu swamps	42°22'N 27°42'E	2	Plötner 2008			1				R17	AM900654	
	Nessebar	42°39'N 27°44'E	3	Plötner 2008			1				R18	AM749712	
<b>Cipro</b>	Nicosia-1	35°10'N 33°31'E	4	Akin 2010				2				GU812078	
	Northern Cyprus	35°12'N 33°34'E	5	Akin 2010					2			GU812088	
	Troodos	34°43'N 32°54'E	6	Akin 2010				1				GU812079	
<b>Egitto</b>	Cairo	29°57'N 31°13'E	7	Akin 2010				2				GU812072	
<b>Francia</b>	Aramon	43°53'N 04°40'E	8	Plötner 2008			1					AM749707	
	Solenzara (Corsica)	41°50'N 09°24'E	9	Akin 2010	1						L1	GU812135	
	St. Étienne du Gres	43°46'N 04°39'E	10	Plötner 2008			1					AM749711	
<b>Georgia</b>	Batumi	41°38'N 41°40'E	11	Akin 2010				2				GU812112	
	Sukhumi	42°59'N 40°58'E	12	Akin 2010				2				GU812120, GU812121	
<b>Germania</b>	Lebus	52°25'N 14°32'E	13	Plötner 2008			3				R12	AM900647	
<b>Grecia</b>	Aliartos	38°22'N 23°06'E	14	Plötner 2008			3				R20, R14	AM749705, AM749709, AM749710	
	Apolakkia/Rhodos	36°03'N 27°47'E	15	Akin 2010					1			GU812095	
	Archipolis/Rhodos	36°18'N 28°08'E	16	Akin 2010					1			GU812095	
	Chios	38°21'N 26°08'E	17	Akin 2010				3				GU812102	
	Ikaria	37°36'N 26°09'E	18	Akin 2010					3		B6	GU812090	
	Kalanistra	38°03'N 21°50'E	19	Plötner 2008			1					AM749696	
	Kaminia	39°56'N 20°51'E	20	Plötner 2008			1					AM749699	
	Kavasilas	37°52'N 21°16'E	21	Plötner 2008			2					AM749702, AM749697	
	Kythira	36°24'N 22°54'E	22	Plötner 2008			3					AM900645-AM900646, AM749700	
	Lesvos	39°12'N 26°10'E	23	Akin 2010				3				GU812099, GU812100, GU812101	
	Limini Keriou	37°41'N 20°50'E	24	Plötner 2008			5				R5, R8, R10	AM900644, AM900639, AM749698, AM749695, AM900638	
	Mistros	38°36'N 23°48'E	25	Plötner 2008			3				R13, R20	AM900653, AM749706, AM749708	
	Nea Menolada	37°42'N 21°24'E	26	Plötner 2008			2				R6	AM749703, AM900642	
	Olympos	35°44'N 27°10'E	27	Akin 2010					3			GU812093	
	Paradisos	41°06'N 24°48'E	28	Plötner 2008			1					AM749713	
	Samos	37°45'N 26°58'E	29	Akin 2010				2				GU812105, GU812106	
	Skala	36°50'N 22°39'E	30	Plötner 2008			2					AM900662, AM749701	
	Stimfalias Lake	37°20'N 22°06'E	31	Plötner 2008			4					AM900640, AM900641	
	Zakynthos	37°48'N 18°72'E	32	Plötner 2008			5				R5, R8, R10	AM749698, AM900639, AM900644	
	<b>Iran</b>	Pasargad	30°12'N 53°10'E	33	Akin 2010				1				GU812132
	<b>Italia</b>	Carbonare	45°56'N 11°13'E	34	Plötner 2008		3						L5
Metaponto		40°22'N 16°48'E	35	Akin 2010	1							L2	GU812133
Tarsia		39°36'N 16°15'E	36	Akin 2010	1							L3	GU812134
<b>Giordania</b>	Amman	32°02'N 35°48'E	37	Akin 2010				1				GU812076	
	Wadi Mujib	31°26'N 35°49'E	38	Akin 2010				1				GU812075	
<b>Kazakistan</b>	Almaty (Alma-Ata)	43°16'N 76°52'E	39	Akin 2010				1				GU812130	
	Atyrau	47°32'N 52°23'E	40	Akin 2010				4				GU812115, GU812116	
<b>Kyrgyzstan</b>	Bishkek	42°50'N 74°38'E	41	Akin 2010				2				GU812131	
<b>Latvia</b>	Bulduri	57°00'N 23°54'E	42	Plötner 2008			4				R12, R17	AM900652, AM900659	
<b>Lituania</b>	Astagai	54°43'N 24°07'E	43	Plötner 2008			3				R12	AM900648	
<b>Macedonia</b>	Dojransko lake	41°11'N 22°44'E	44	Plötner 2008			1				R12	AM900649	
<b>Polonia</b>	Poznan	52°25'N 16°53'E	45	Plötner 2008			1				R17	AM900660	
<b>Romania</b>	Sfintu-Gheorghe-str.	45°02'N 29°10'E	46	Plötner 2008			4				R12, R17	AM900650, AM900658	
<b>Russia</b>	Dakhovskaya	44°13'N 40°11'E	47	Akin 2010				2				GU812117, GU812118	
	Moscow	55°42'N 37°35'E	48	Plötner 2008			3					AM749711	
<b>Serbia</b>	Beograd	44°50'N 20°30'E	49	Plötner 2008			1				R17	AM900655	
<b>Slovacchia</b>	Bratislava-Devin	48°10'N 17°00'E	50	Plötner 2008			2					AM900656	
	Brodské	48°41'N 17°00'E	51	Plötner 2008			2					AM900657	
<b>Siria</b>	Abu Kamal	34°26'N 40°56'E	52	Akin 2010				3				GU812122, GU812124, GU812126	
	Ansari Mountains	34°48'N 36°06'E	53	Akin 2010				1				GU812073	
	As Suwayda	32°41'N 36°33'E	54	Akin 2010				1				GU812077	
<b>Turchia</b>	Qalat al-Hisn	34°46'N 36°15'E	55	Akin 2010				1				GU812074	
	Alanya	36°36'N 32°04'E	56	Akin 2010					2		B7	GU812091	
	Akçapınar	37°06'N 28°27'E	57	Akin 2010				4				GU812107, GU812108	
	Ankara	39°34'N 33°02'E	58	Akin 2010				1				GU812111	
	Ceyhan	37°05'N 35°49'E	59	Akin 2010				2			B1	GU812081, GU812083	
	Çevlik District	36°07'N 35°55'E	60	Akin 2010				2			B1	GU812082	
	Edremit	39°36'N 27°00'E	61	Akin 2010				2			B5	GU812109, GU812110	
	Fethiye	36°37'N 29°07'E	62	Akin 2010					2			GU812097, GU812098	
	Foça	38°39'N 26°45'E	63	Akin 2010				4				GU812103, GU812104, GU812113, GU812114	
	Hatay Kinkhan	36°29'N 36°27'E	64	Akin 2010				1				GU812085	
Istanbul	41°08'N 28°45'E	65	Akin 2010				1				GU812125		

Tab. 6. Origine, abbreviazione del sito come riportato in Fig. 4, rif. bibliografico, n° di individui per ogni specie, aplotipo e "Accession numbers" dei campioni di *Rana verde* presenti in "Genbank" utilizzati in questo studio. Les S: *R. lessonae* Sud, les N: *R. lessonae* Nord, rid: *R. ridibunda*, bed: *R. bedriagae*, car: *R. caralitana* cer: *R. cerigensis*.

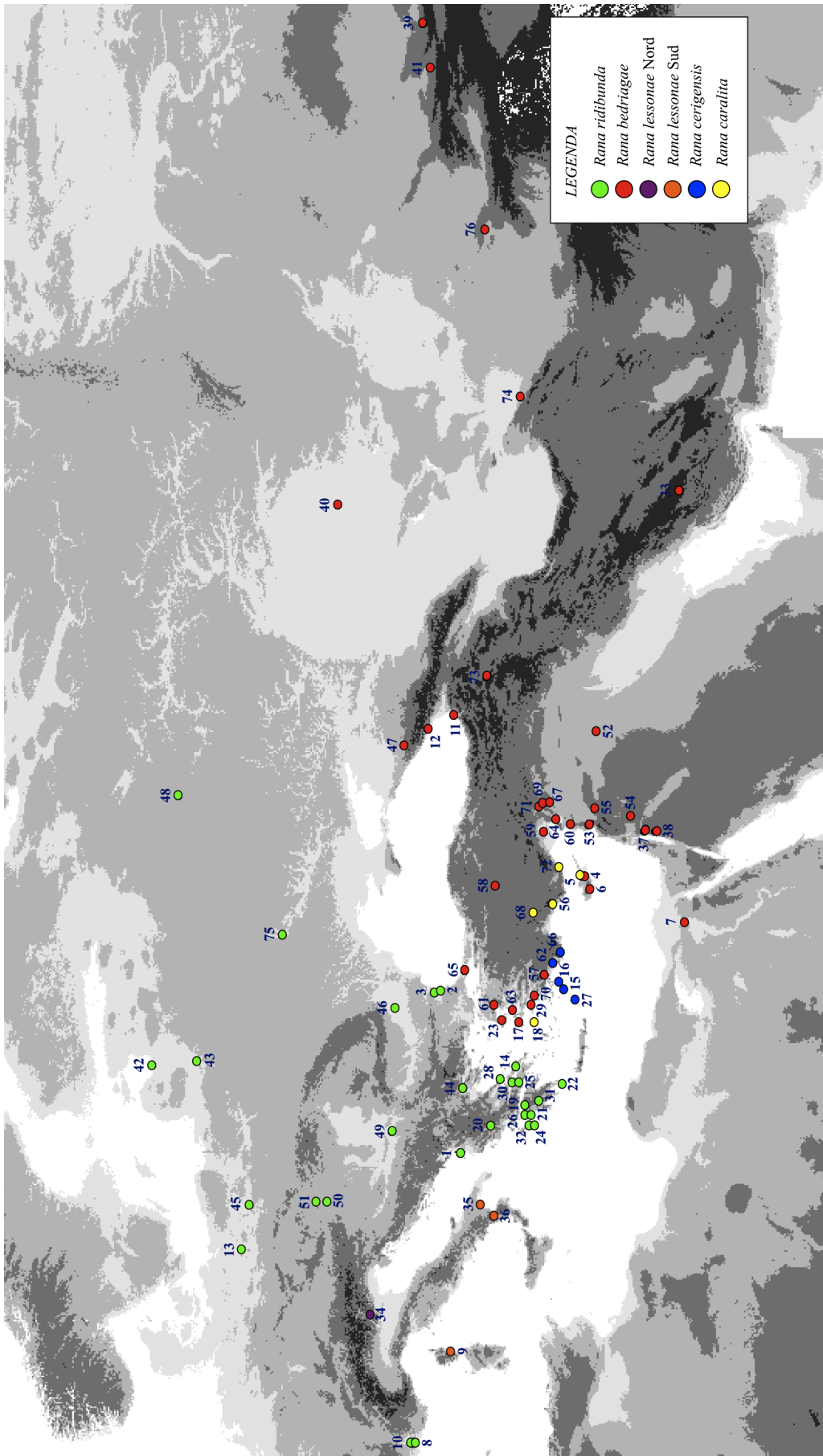


Fig. 4. Distribuzione geografica dei campioni di *Rana* verde presenti in “GenBank” ed utilizzati in questo studio, riportati in Tab. 6.



#### 5.4.2. Allozimi

I genotipi *multi locus* ottenuti mediante analisi elettroforetica di allozimi sono stati analizzati al fine di mettere in evidenza l'esistenza di due gruppi principali di rane verdi, quelli cioè riferibili al gruppo *-lessonae* (autoctono) e al gruppo *-ridibunda* (alloctono), nonché per valutare l'esistenza e l'entità dello scambio genico fra di esse. A tal fine, e dal momento che in precedenti studi sulla variazione genetica in aree di alloctonia, le diverse specie del gruppo *-ridibunda* sono risultate largamente ibridanti, nel presente studio esse sono state considerate cumulativamente. Per la valutazione dell'esistenza e dell'entità dello scambio genico fra i gruppi *-lessonae* e *-ridibunda*, sono stati utilizzati due strumenti analitici, entrambi basati su statistiche Bayesiane, implementati nei software "Structure 2.3.2" (Pritchard et al., 2000) e "NewHybrid 1.1" (Anderson & Thompson, 2002).

In "Structure" gli individui vengono raggruppati in un numero K di gruppi, predeterminato dall'operatore, in modo tale da minimizzare all'interno di essi i disequilibri di Hardy-Weinberg e di "Linkage". L'algoritmo utilizzato permette inoltre di stimare il grado di scambio genico ("admixture") tra i diversi gruppi, stimando il contributo percentuale (q) di ciascuno dei gruppi (2 in questo caso) al genotipo *multilocus* di ogni individuo. Essendo la collocazione geografica degli individui un'informazione a priori priva di valenza analitica, le iterazioni (n = 5) sono state effettuate con l'opzione "locprior" disattivata. Inoltre, essendo interessati ad evidenziare possibili eventi di scambio genico fra gruppi, si è utilizzata la versione dell'algoritmo "admixture". In ogni iterazione sono stati impostati 500.000 *step* delle catene di Markov, di cui i primi 100.000 scartati come *burn-in*. I risultati delle 5 iterazioni sono stati poi comparati ed infine mediati tra loro. Valori del coefficiente di admixture  $q > 0,90$  e  $q < 0,10$  sono stati considerati come indicazione del contributo da parte di un unico gruppo al genotipo dell'individuo analizzato, mentre valori compresi tra 0,10 e 0,90 sono stati considerati come indicazione di co-contribuzione da parte di entrambe i gruppi al genotipo (si veda Vähä e Primmer, 2006 per la definizione delle soglie), e dunque di origine ibrida dell'individuo in esame.

Per valutare se gli individui identificati in precedenza come di origine ibrida ( $0,10 < q < 0,90$  nell'analisi con "Structure") fossero da riferirsi esclusivamente all'esito di accoppiamenti recenti (entro 2 generazioni) oppure al reincrocio di questi con linee parentali (dunque con possibilità di introgressione fra genomi distinti), è stato utilizzato il metodo implementato in "NewHybrid". Questo metodo stima appunto la probabilità a posteriori che il genotipo *multilocus* di un individuo sia attribuibile ad una delle classi parentali (*-lessonae* o *-ridibunda* in questo caso) oppure ad una classe ibrida di prima o seconda generazione (F1, F2, reincrocio [Bk]). L'analisi è

stata effettuata 5 volte, ciascuna con 100.000 *step* delle catene di Markov, di cui i primi 20.000 *step* scartati come *burn-in*. Ciascuno individuo è stato considerato come attribuibile ad una particolare classe ibrida o parentale, soltanto se la probabilità di attribuzione a tale classe risultava  $\geq 0,75$ , altrimenti veniva considerato come non assegnabile.

### **5.5. Analisi della distribuzione potenziale delle specie del gruppo *–ridibunda* in Italia settentrionale**

Per valutare il grado di idoneità bioclimatica dell'area di studio per le specie del gruppo *–ridibunda*, e dunque la probabilità di loro diffusione nell'area, è stata effettuata una modellizzazione della distribuzione spaziale (SDM). A tal fine è stato utilizzato il programma “MaxEnt” (Phillips et al., 2006), che valuta l'idoneità di ogni cella della griglia geografica come una funzione delle variabili ambientali, mediante metodi di massima entropia. Questo metodo presenta il vantaggio di consentire una valutazione dell'idoneità ambientale di un'area per una data specie, partendo dai soli dati di presenza noti per essa. Esso ha inoltre già trovato larga applicazione nella stima della potenziale diffusione di specie introdotte (v.d. ad es. i casi della Rana toro, Ficetola et al., 2007; del pesce del genere *Percottus*, Reshetnikov & Ficetola, 2011; della formica argentina, Roura-Pascual et al., 2009).

Come dati di presenza sono stati utilizzati i punti georeferenziati di tutti gli individui di *Rana ridibunda* e *Rana bedriagae* presenti in “GenBank”, per un totale di 163 siti di presenza (Tab. 7). Le griglie formato ESRI delle condizioni bioclimatiche attuali, con una risoluzione di 30 arc-sec, sono state scaricate da “WorldClim 1.4” (Hijmans et al., 2005). Queste comprendono 19 diverse variabili bioclimatiche, riportate in Tab. 8.

Per ogni specie sono stati costruiti due distinti modelli di distribuzione potenziale: 1) un modello “nativo”, calibrato usando i dati di presenza della specie nell'area nativa e successivamente proiettato sull'area di invasione; 2) un modello “complessivo”, calibrato usando tutti i dati di presenza nelle aree nativa e di invasione.

Le analisi con “Maxent” sono state effettuate utilizzando impostazioni e valori di *default* per la gran parte dei parametri, con alcune eccezioni. Anzitutto, è stato selezionato il valore migliore del parametro di regolarizzazione ( $\beta = 1; 3; \dots; 19$ ). Infatti, Warren e Seifert (2011) hanno mostrato come il valore di *default* offerto da “Maxent” può dare modelli che, pur presentando alti valori di accuratezza predittiva della distribuzione geografica di una specie, non rispecchiano le sue caratteristiche biologiche.

Per verificare la consistenza del modello di predizione il 75% dei siti sono stati utilizzati per

costruire il modello e il restante 25% per testarlo.

È stata calcolata la correlazione tra coppie di variabili con il programma ENMTools (Warren et al., 2010) ottenendo una matrice 19x19; per non avere un modello ridondante sono stati costruiti modelli con un sottoinsieme di variabili, eliminando, tra quelle con valori di correlazione alti e significativi, le variabili con i contributi relativi al modello più bassi. Si sono dunque costruiti modelli con variabili ridotte, tutte biologicamente importanti per le specie in esame: un modello a 13 variabili (BIO1, BIO2, BIO3, BIO4, BIO5, BIO6, BIO8, BIO9, BIO12, BIO13, BIO14, BIO15, BIO18, BIO19) per *Rana ridibunda* ed uno a 12 variabili (BIO2, BIO3, BIO4, BIO6, BIO7, BIO8, BIO9, BIO10, BIO12, BIO15, BIO17, BIO19) per *Rana bedriagae*.

I rendimenti dei vari modelli sono stati comparati con il programma ENMTools (Warren et al., 2010) utilizzando la funzione “*model selection*” ed è stato scelto, per ogni specie, il modello con il valore di AIC-c (“Akaike Information Criterion” corretto, Akaike, 1974; Warren et al., 2010) più basso.

specie	latitudine	longitudine	specie	latitudine	longitudine	specie	latitudine	longitudine
B	30.70313400062827	36.88750400456095	R	24.88333333387986	41.33333333356072	R	4.653300223511338	43.77860089636265
B	36.99685365481979	34.49634288582371	R	35.31373700089576	37.00071599663274	R	23.08410020695585	38.36880005200504
B	33.13130833333334	34.68085833333333	R	22.94460700000002	40.63935000000002	R	28.13599122109209	36.31169364653165
B	28.27127912009623	36.85478952531966	R	-1.960267727843955	46.75468286470891	R	21.84850046035716	38.06329995064912
B	21.7452749673721	41.60863511448218	R	-7.864640999999958	42.340009	R	20.86780167789233	39.76529712393571
B	26.31313605227555	36.55911093374414	R	1.878226996896273	48.08153100125038	R	21.2854000000742	37.87619999938237
B	26.27770702949899	39.26450904007089	R	4.495012000170949	51.07994722222222	R	22.98710000039324	36.1530000053983
B	35.85563591628449	35.67321099517004	R	4.502971000064392	51.09353399982828	R	23.8324999999692	38.52280000196556
B	35.72728055486716	32.32520833376421	R	4.707508001112397	50.91006799962159	R	21.36110001968167	38.03160000436291
B	37.48827785885106	36.05519494675903	R	3.920514999977965	51.01766500026121	R	23.2109999970146	39.29929999965767
B	35.7859000038499	35.52480000221253	R	3.728009999886301	50.93196700014551	R	23.07120024195526	38.66749994452221
B	36.99685369860195	34.49634294200735	R	4.516443998769259	51.00149999929042	R	22.10259999961766	37.34519999936159
B	27.01510052249061	39.6118997958761	R	3.747082000188366	51.01640799927679	R	20.86269999704217	37.80519999911788
B	35.83019999769883	37.08889999953151	R	4.995427777777778	50.88402222222222	R	22.73330033889059	41.21660001106055
B	36.11660000200305	34.81660000039486	R	4.892581000007918	50.76998100042645	R	16.66740005184063	52.38049991498802
B	26.76450006531046	38.66659994427594	R	3.385441000057665	50.7857919995136	R	26.85040000055861	44.64240000031825
B	35.92809999668219	36.12389999941826	R	4.726727777777778	50.85592777777778	R	37.58569982273429	55.71439975716333
B	40.19970000144611	44.22510000117052	R	4.678952777777778	50.95177222222222	R	20.50190000074245	44.83319999987083
B	28.46560004166772	37.11329998780761	R	4.891886111111111	50.8488	R	16.99179999952588	48.15789999859643
B	36.5524938262115	32.68553055890004	R	4.582872000289717	51.00923099981626	R	17.00920000117336	48.69410000073425
B	74.6359999997111	42.83790000018255	R	5.038001999886468	50.97257400061252	R	30.51060007450204	50.41699997030928
B	66.4177000013251	40.08120000117868	R	3.936197222222222	51.00894722222223	R	11.48333329521901	55.19999996433146
B	37.12489972460928	37.28190000850267	R	3.675411111111111	51.06168888888889	R	15.01651341029187	55.01667461786181
B	43.66520000013207	40.03340000012849	R	3.683723000040964	51.03671599982714	R	12.38333843850681	55.76666549002147
B	37.30950000079311	36.81060000047362	R	4.905583333333333	50.977152777777779	R	11.65000002002658	55.20000001626947
B	40.9386000016364	34.44959999948056	R	4.91077199997482	50.97684699964518	R	12.20000001000806	55.96666667900852
B	27.43270011879643	37.61779999688593	R	4.976288888888889	50.949216666666666	R	24.54999800365033	58.36666629254057
B	37.04250002729243	37.33219994830007	R	3.817496070219228	50.99634999662401	R	23.53333325781142	59.08333336882933
B	33.04530000000058	39.57930000003148	R	3.818661111111111	51.015072222222222	R	10.18333037558723	54.24999493552052
B	35.80910000023833	32.033400000321266	R	3.918572222222222	51.01515	R	13.76666137270546	53.56666770060353
B	28.75329999908288	41.13400000012342	R	3.877550999454122	50.97811399956341	R	13.76666310739677	53.56666734866671
B	57.94980000052369	38.32140000050808	R	3.886097222222222	51.009066666666666	R	14.5333333322768	52.416666666686459
B	36.26549999978258	34.77879999851214	R	4.973583333333333	50.949816666666666	R	11.91666671391926	54.03333330901095
B	32.9095078746961	34.72690550471887	R	4.198109073822079	50.90499206172227	R	11.90000000499157	54.0499999950164
B	52.38610015407648	47.54419997424529	R	4.198902777777778	50.905025000000001	R	13.3999999987264	54.41666667802769
B	26.17869999931369	39.21030000077847	R	4.292698839283841	50.80927816423287	R	13.41666665752888	54.38333331831601
B	53.17400000054242	30.20719999962833	R	4.286297222222222	50.80707777777778	R	13.13333331501386	52.83333333518868
B	36.45230000033975	36.49729999936378	R	3.885666666666666	50.985183333333333	R	20.98009600912177	39.15580800675845
B	41.67944727874805	41.64203129510986	R	8.82087600069551	50.85585299945865	R	22.65388898335869	39.80833304906059
B	26.14330063149886	38.35679936048106	R	19.45515241041331	41.32793442064381	R	20.79688399219553	39.81854099987323
B	76.87199999982307	43.28270000120165	R	23.90000000044855	57.00000000033196	R	24.59553604257862	38.8162962163635
B	35.81750000146899	31.44549999827698	R	24.116666666798413	54.71666666700195	R	22.46423101320559	37.61402399344303
B	31.22890164763702	29.96380479012156	R	13.10000099951191	55.38333133846412	R	22.53642900100686	39.61996200090573
B	35.9333333330265	31.9499999938716	R	22.1000000000896	48.43333333362072	R	21.43073397786569	38.36897194897641
B	33.52729999979967	35.16819999962728	R	15.050004590319938	55.13329309475067	R	21.84166699842597	39.45983299970907
B	26.97499877601121	37.76410050269438	R	20.83333333231818	37.68333333265665	R	21.0221960013001	40.88331600232846

Tab. 7. Coordinate geografiche dei campioni di *Rana bedriagae* e *Rana ridibunda* presenti in “GenBank” ed utilizzati per l’analisi SDM.

Variabili bioclimatiche			
BIO1	Temperatura Media Annua	BIO11	Temperatura media del quarto più freddo
BIO2	Intervallo medio diurno di temperatura	BIO12	Precipitazioni annuali
BIO3	Isotermalità (BIO1/BIO7)*100	BIO13	Precipitazioni del mese più umido
BIO4	Temperatura stagionale	BIO14	Precipitazioni del mese più secco
BIO5	Temperatura massima del mese più caldo	BIO15	Precipitazioni stagionali
BIO6	Temperatura minima del mese più freddo	BIO16	Precipitazioni del quarto più umido
BIO7	Intervallo annuale di temperatura	BIO17	Precipitazioni del quarto più secco
BIO8	Temperatura media del quarto più umido	BIO18	Precipitazioni del quarto più caldo
BIO9	Temperatura media del quarto più secco	BIO19	Precipitazioni del quarto più freddo

Tab. 8. Variabili bioclimatiche utilizzate per l’analisi SDM.

## 6. RISULTATI

### 6.1. Diversità genetica mitocondriale

#### 6.1.1. Determinazione tassonomica ed origine geografica delle rane verdi presenti nell'area di studio

Per verificare se gli individui campionati nell'area di Forlì-Ravenna appartenessero effettivamente a forme non native è stato generato un allineamento per il marcatore mitocondriale ND2 pari a 519 paia di basi, con 190 sequenze, corrispondenti a tutti gli individui campionati nell'area di Forlì-Ravenna.

L'analisi filogenetica con il metodo di Massima Verosimiglianza (ML) per mezzo del programma “PhyML 3.0” (Guindon et al., 2010) ha portato alla produzione di un albero (Fig. 5) che mostra l'esistenza di gruppi ben differenziati all'interno dell'area di studio: due gruppi corrispondenti alle due forme di *Rana lessonae* italiane (la forma settentrionale e quella meridionale; Canestrelli & Nascetti, 2008) ed un gruppo ben differenziato che comprende forme mai riscontrate nella penisola italiana.

Il primo *screening* dell'affinità geografica degli individui campionati, valutato comparando la loro affinità rispetto alle sequenze di Rana verde georeferenziate e tassonomicamente determinate presenti in “GenBank”, ha evidenziato la presenza di almeno 2 diverse specie alloctone nell'area di campionamento, provenienti da varie aree dell'Europa e della zona anatolica: la *Rana ridibunda* e la *Rana bedriagae*.

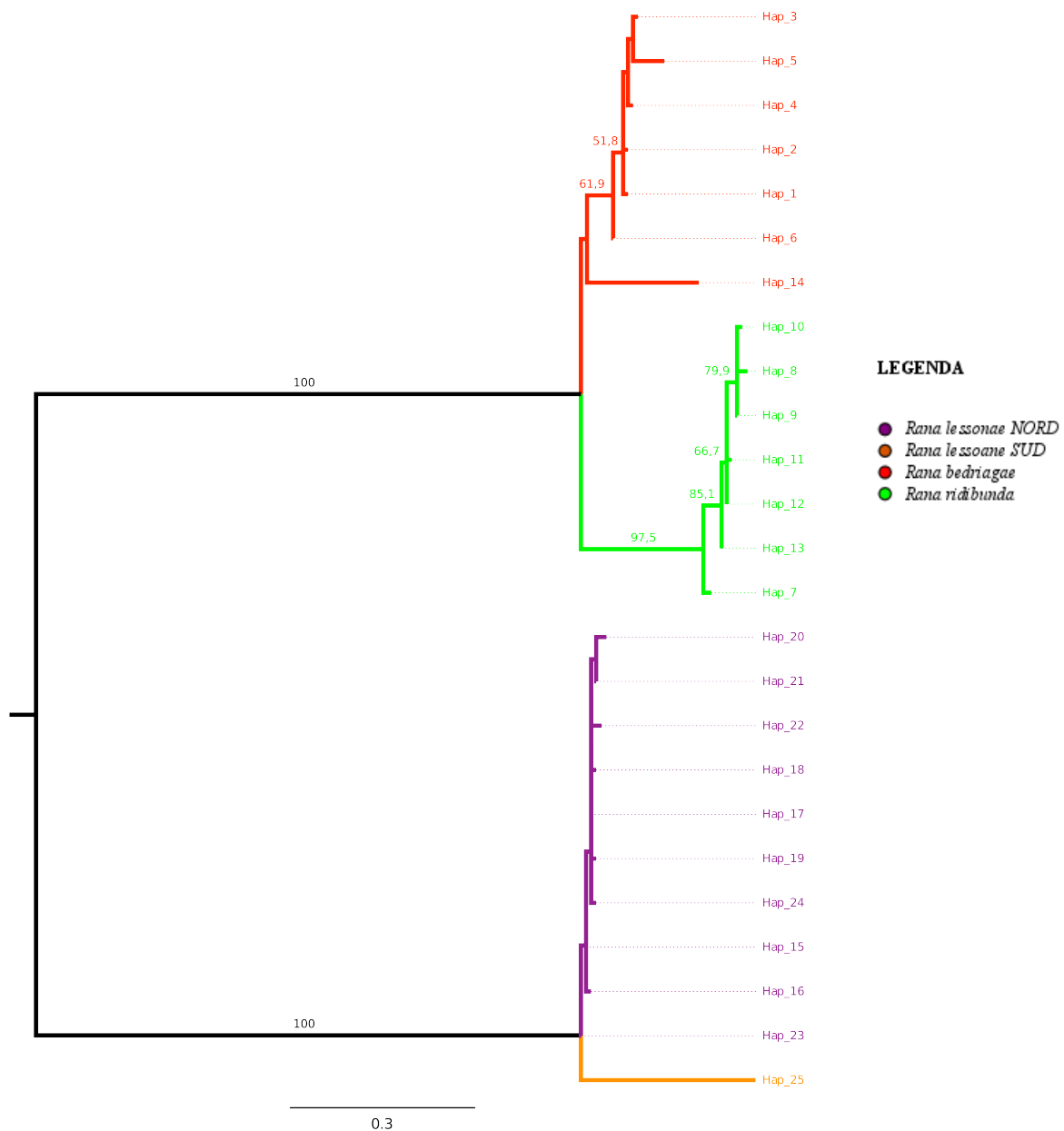


Fig. 5. Albero filogenetico prodotto con metodi di Massima Verosimiglianza a partire dagli aplotipi ND2 individuati nell'area di Forlì-Ravenna. Sono riportati i valori di “bootstrap” > 50.

In Fig. 6 è rappresentato il risultato dell'analisi del *network* di parsimonia statistica. Tale analisi, effettuata sulle sequenze del marcatore mitocondriale ND2 che presentavano una divergenza < 0,5% con quelle dell'area di Forlì-Ravenna e del macello (N = 250), non ha permesso la costruzione di un unico “network”, ma ha identificato 5 diversi aplogruppi che, tenendo conto della provenienza delle sequenze in “GenBank”, hanno diverse aree di origine.

L'allineamento delle 250 sequenze di ND2, comprendente i campioni da “GenBank”, dall'area di Forlì-Ravenna e dal macello, ha permesso di identificare 55 aplotipi: 14 di questi sono

presenti sia nei campioni provenienti dall'area di Forlì-Ravenna, sia nei campioni da “GenBank” e 22 non sono rappresentati in campioni di “GenBank”, i restanti (19) sono presenti solo in sequenze da “GenBank”.

Gli aplogruppi così identificati sono costituiti da: il gruppo della specie *Rana ridibunda* (R), proveniente da almeno 2 aree dell'Europa dell'Est, i gruppi delle 2 forme di *Rana lessonae*, quella presente nell'area meridionale (LS, aplotipi L1-3) e quella presente nell'area settentrionale (LN, aplotipi L4-13) della penisola italiana, 2 gruppi per la specie *Rana bedriagae* (B), uno dei quali comprende anche sequenze attribuite alle specie *Rana caralitana* e *Rana cerigensis*, provenienti da almeno due zone dell'area turco-siriaca. I campioni prelevati dal macello presentano aplotipi identici a quelli delle rane alloctone campionate nell'area di Forlì-Ravenna.

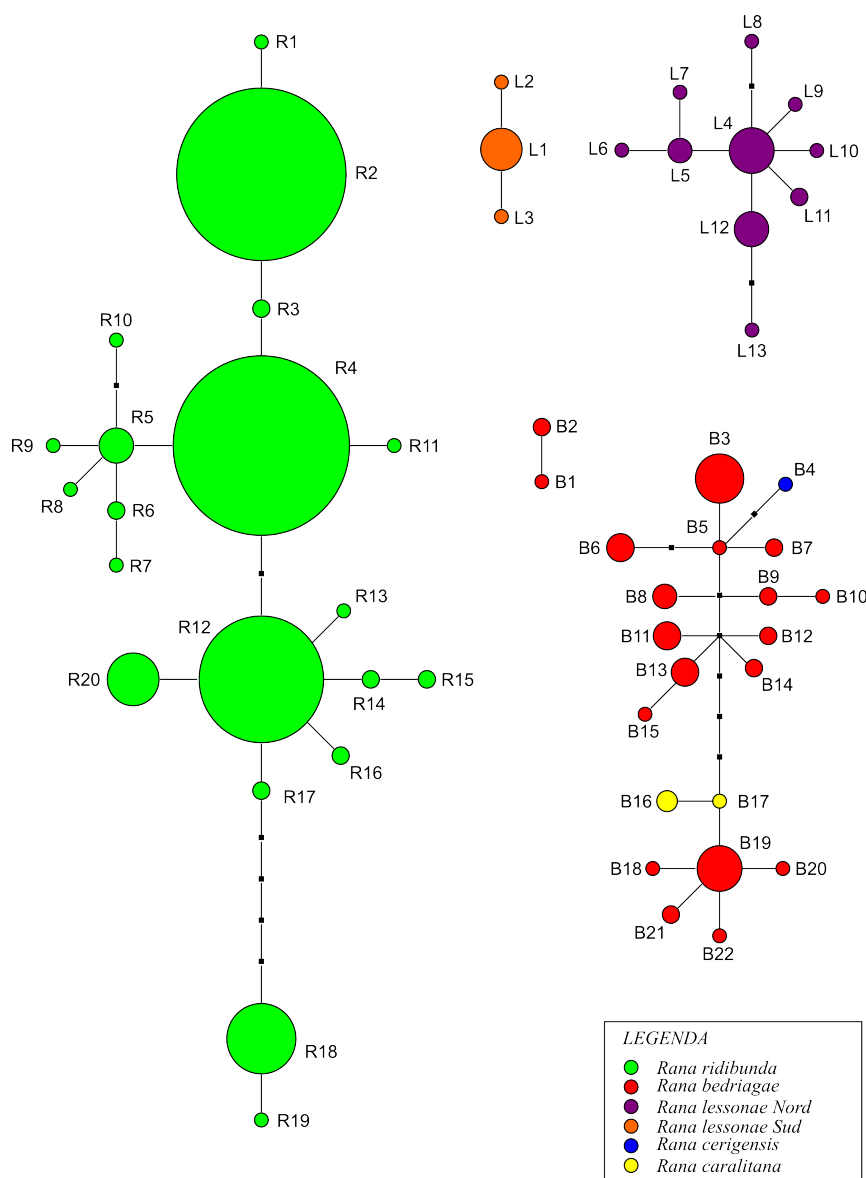


Fig. 6. Network di parsimonia statistica costruiti a partire dagli aplotipi ND2 identificati nell'area di Forlì-Ravenna. In figura sono riportati i nomi degli aplotipi come riportati in Tab. 6.

### 6.1.2 *Area di invasione*

In Fig. 7 è possibile osservare che la distribuzione degli aplotipi mitocondriali nell'area di studio risulta fortemente eterogenea: nell'area a Sud, vicino al confine con l'Appennino Tosco-Romagnolo (S5, S6, S7), sono assenti aplotipi introdotti. In tutta la rimanente area sono invece prevalenti aplotipi alloctoni: prima di tutto aplotipi di *Rana ridibunda* dai Balcani e dall'Est Europa (75% delle sequenze), e in secondo luogo aplotipi di *Rana bedriagae* dalla Turchia e dalla Siria (11% delle sequenze). La proporzione di aplotipi autoctoni nell'area è risultata molto limitata (14% delle sequenze) e costituita da entrambe le forme di *Rana lessonae* presenti in Italia. In particolare sono stati individuati aplotipi appartenenti alla forma settentrionale di *Rana lessonae* in siti più a Sud di dove sono stati individuati aplotipi appartenenti alla forma meridionale di *Rana lessonae* (S7, S9, S20). La popolazione del sito di Comacchio (S15), presa come controllo, è risultata effettivamente costituita da soli individui autoctoni di *Rana lessonae* del Nord.

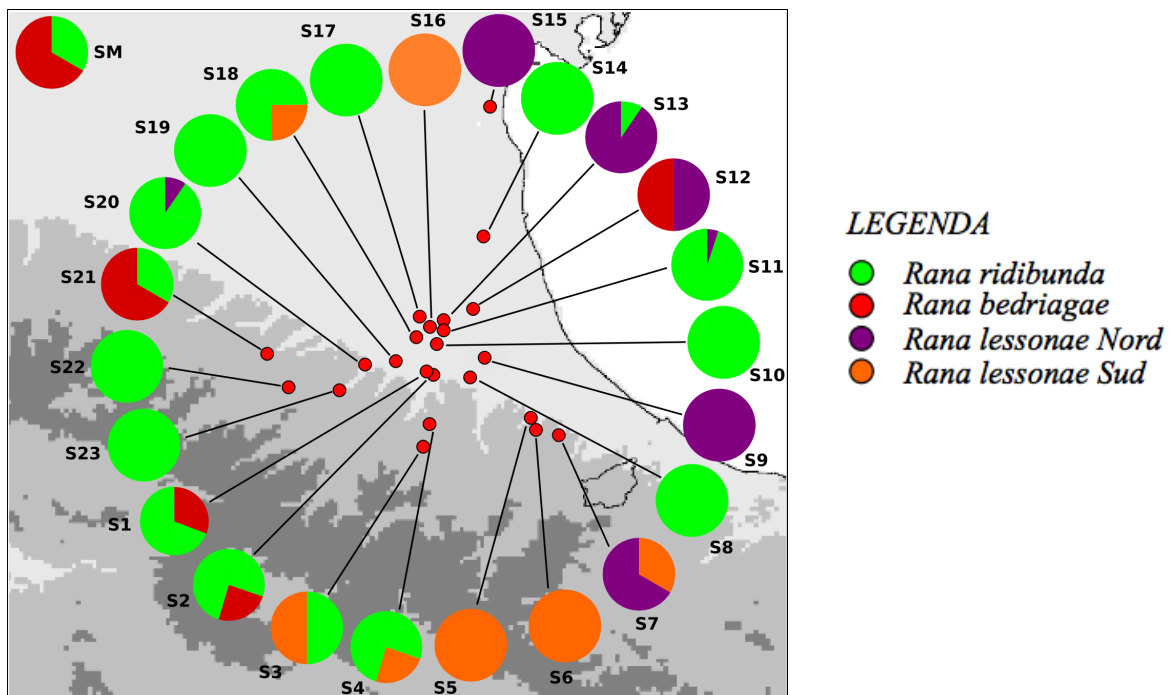


Fig. 7. Distribuzione degli aplotipi ND2 nei diversi siti dell'area di studio, come riportati in Tab.2.

### 6.2. Analisi di scambio genico

L'analisi della struttura genetica del popolamento di rane verdi nell'area di Forlì-Ravenna, effettuata con i software "Structure 2.3.2" e "NewHybrid 1.1", unitamente con l'attribuzione della linea mitocondriale di ciascun individuo analizzato al gruppo *-lessonae* (autoctono) o *-ridibunda* (alloctono) è riportato in Figura 8.



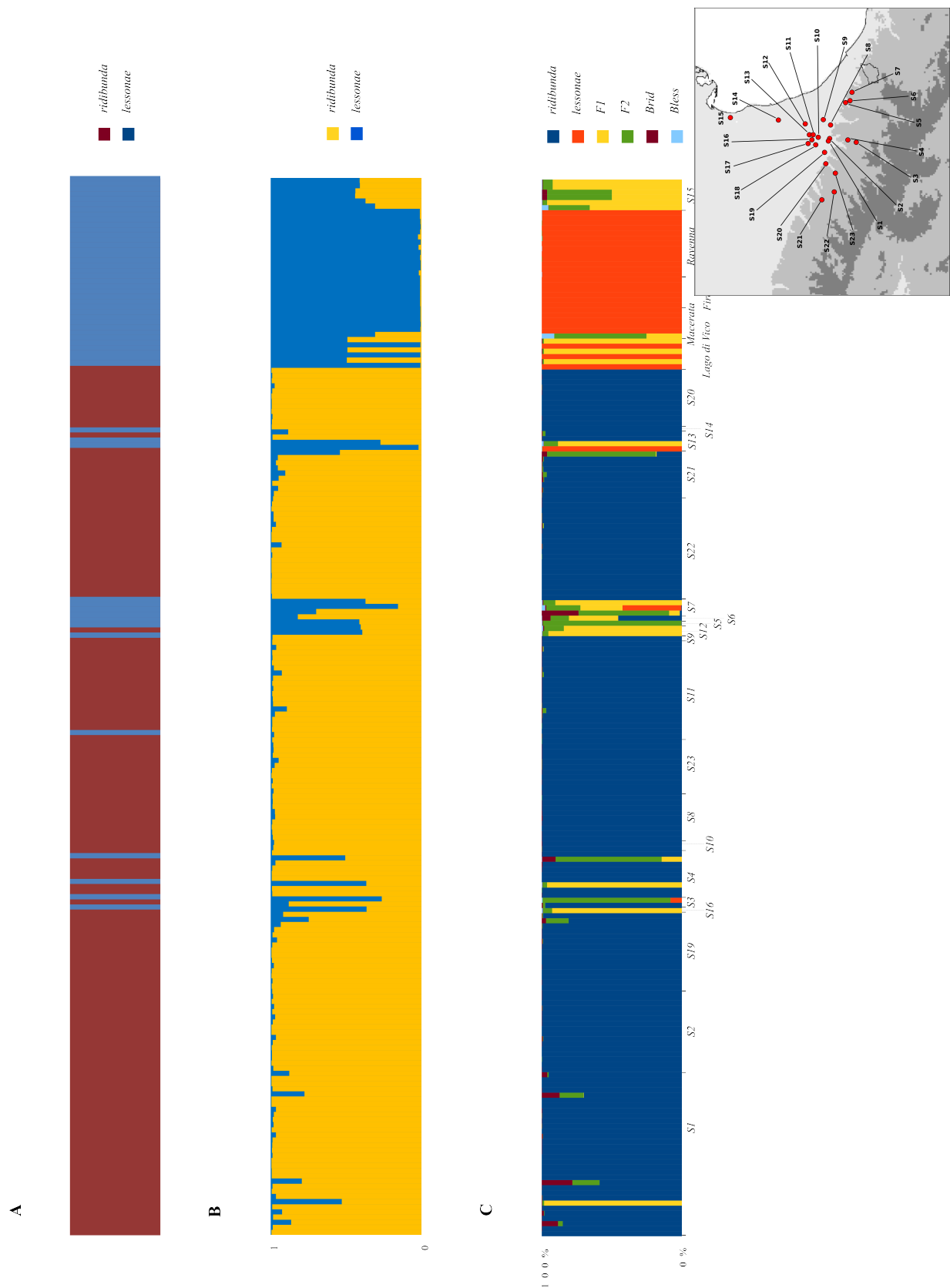


Fig.8. Istogrammi raffiguranti l'attribuzione specifica degli individui analizzati in base all'aplotipo mitocondriale (A), la proporzione di attribuzione ottenuta con il software "Structure" (B), e la probabilità di appartenere a ciascuna delle sei classi genotipiche ottenuta con il software "NewHybrid" (C). Brid= reincroci F1 x ridibunda; Bless= reincroci F1 x lessonae. Accanto è riportata la distribuzione dei siti di campionamento nell'area di Forlì-Ravenna.

Dall'analisi congiunta dei risultati ottenuti con i 3 metodi è stato possibile raggruppare gli individui analizzati nelle seguenti categorie:

1. **Individui con genotipo *ridibunda* puro:** sono considerati tali tutti quegli individui con  $q \geq 0,90$  per il gruppo *-ridibunda* secondo il *software* “Structure”, con probabilità  $\geq 75\%$  di appartenere alla classe genotipica parentale *-ridibunda* secondo il *software* “NewHybrid” e con un genotipo mitocondriale *ridibunda-like*. A tale categoria appartiene l'85,2% (N = 144) degli individui campionati nell'area di Forlì-Ravenna. I siti dove la percentuale di individui di questo tipo è più alta ( $\geq 80\%$ ) sono quelli di Magliano (S1, S2), Trentola (S8), Carpinello (S10), S. Giorgio (S11), Vecchiazano (S19), Terre del Sole (S20), Riolo Terme (S21), Modigliana (S22), Dovadola (S23), tutti localizzati nella zona più interna dell'area di studio.

2. **Individui con genotipo *lessonae* puro:** sono considerati tali tutti quegli individui con  $q \geq 0,90$  per il gruppo *-lessonae* secondo il *software* “Structure”, con probabilità  $\geq 75\%$  di appartenere alla classe genotipica parentale *-lessonae* secondo il *software* “NewHybrid” e con un genotipo mitocondriale *lessonae*. A tale categoria appartiene solo lo 0,6% (N = 1) degli individui campionati nell'area di Forlì-Ravenna, localizzato nel sito di Coccolia (S13).

3. **F<sub>1</sub> *lessonae* x *ridibunda*:** sono considerati tali tutti quegli individui che presentano una probabilità  $\geq 75\%$  di appartenere alla classe genotipica F<sub>1</sub> secondo il *software* “NewHybrid”. A tale categoria appartiene il 4,1% degli individui campionati nell'area di Forlì-Ravenna (N = 7). Tra questi, 2 individui presentano genotipo mitocondriale *ridibunda*, che indica la discendenza da una madre appartenente al gruppo *-ridibunda*, e 5 individui presentano genotipo mitocondriale *lessonae*, che indica la discendenza da una madre appartenente al gruppo *-lessonae*.

Tali individui sono localizzati in percentuali  $\geq 50\%$  nei siti di Carraie (S12) e Barisano (S16), tutti localizzati ai margini dell'area di studio di Forlì-Ravenna.

4. **F<sub>1</sub> *esculenta* x *ridibunda*:** sono considerati tali quegli individui che, pur presentando le percentuali caratteristiche della classe genotipica pura *-ridibunda* ( $q \geq 0,90$  secondo il *software* “Structure” e  $\geq 75\%$  secondo il *software* “NewHybrid”), mostrano genotipo mitocondriale *lessonae-like*, il che sta ad indicare la loro discendenza da una madre appartenente alla specie ibrida-ibridogenetica *Rana esculenta*. A tale categoria appartiene l'1,8% degli individui campionati nell'area di Forlì-Ravenna (N = 3), localizzati con percentuali  $\geq 50\%$  nel sito di Borgo Pieve Sestina (S9).

5. **F<sub>2</sub> :** sono considerati tali quegli individui che presentano una probabilità  $\geq 75\%$  di appartenere alla classe genotipica F<sub>2</sub> secondo il *software* “NewHybrid” e con  $0,1 < q < 0,9$  in “Structure”. A tale categoria appartiene il 2,4 % degli individui (N = 4). Tra questi, 3 individui hanno genotipo mitocondriale *lessonae* e dunque discendono per linea materna dal gruppo

*-lessonae*, mentre un individuo presenta genotipo mitocondriale *ridibunda* e dunque discende per linea materna dal gruppo di origine alloctona *-ridibunda*. Tali individui sono localizzati in percentuali  $\geq 50\%$  nei siti di Piandispino A (S3) e Longiano (S5), ai margini dell'area di campionamento di Forlì-Ravenna.

6. **Individui introgressi:** sono considerati tali tutti quegli individui che presentano  $0,10 < q < 0,90$  per uno dei due gruppi (*-lessonae* o *-ridibunda*) nell'analisi con "Structure" e probabilità  $\leq 75\%$  di appartenere ad una delle precedenti classi secondo il software "NewHybrid". A tale categoria appartiene il 5,9% degli individui (N = 10). Tra questi, 7 individui presentano genotipo mitocondriale *ridibunda* e 3 individui presentano invece genotipo mitocondriale *lessonae*. Tali individui sono localizzati nei siti di Magliano (S1), Piandispino A (S3), Roncofreddo A (S6), Roncofreddo B (S7), S. Giorgio (S11), Vecchiazano (S19), localizzati prevalentemente nella zona centrale dell'area di studio. L'analisi con "NewHybrids" non ha consentito di attribuire alcuno di questi individui alle classi genotipiche "Backcross", suggerendo che trattasi di individui derivati da eventi ibridativi di generazione  $\geq 3$ .

Gli individui di *Rana lessonae* e *Rana esculenta* utilizzati come controlli e provenienti dalle località di Comacchio, Lago di Vico, Macerata, Firenze e Ravenna sono risultati avere in tutti i casi  $q \geq 0,95$  e  $0,3 < q < 0,7$  rispettivamente con l'analisi di "Structure" ed un'attribuzione pari al 100% per *Rana lessonae* e 100%  $F_1$  rispettivamente con l'analisi di "NewHybrids". Infine, come atteso, tutti gli individui di *Rana lessonae* e *Rana esculenta* avevano immancabilmente genotipo mitocondriale *-lessonae*.

#### 6.4. Modellizzazione della distribuzione delle specie

Tra tutti i modelli analizzati con ENMTools, quello con il valore di AIC-c più basso è stato per entrambe le specie il modello con valore di  $\beta$  uguale a 5 e le variabili ridotte (AIC-c = 1129.095 per *Rana bedriagae* e AIC-c = 1583.788 per *Rana ridibunda*).

In Fig. 9 è mostrata la rappresentazione grafica dei modelli di distribuzione potenziale ottenuti per le due specie. I valori di  $AUC_{\text{test}}$  sono, per i modelli "nativi", rispettivamente uguali a 0,954 e 0,825 per la specie *Rana bedriagae* e la specie *Rana ridibunda* e, per i modelli "complessivi", uguali rispettivamente a 0,983 e 0,617, indicando ottime performance dei modelli fatta eccezione per quello riferibile alla specie *Rana ridibunda* nel modello complessivo ( $AUC_{\text{test}} = 0,617$ ).

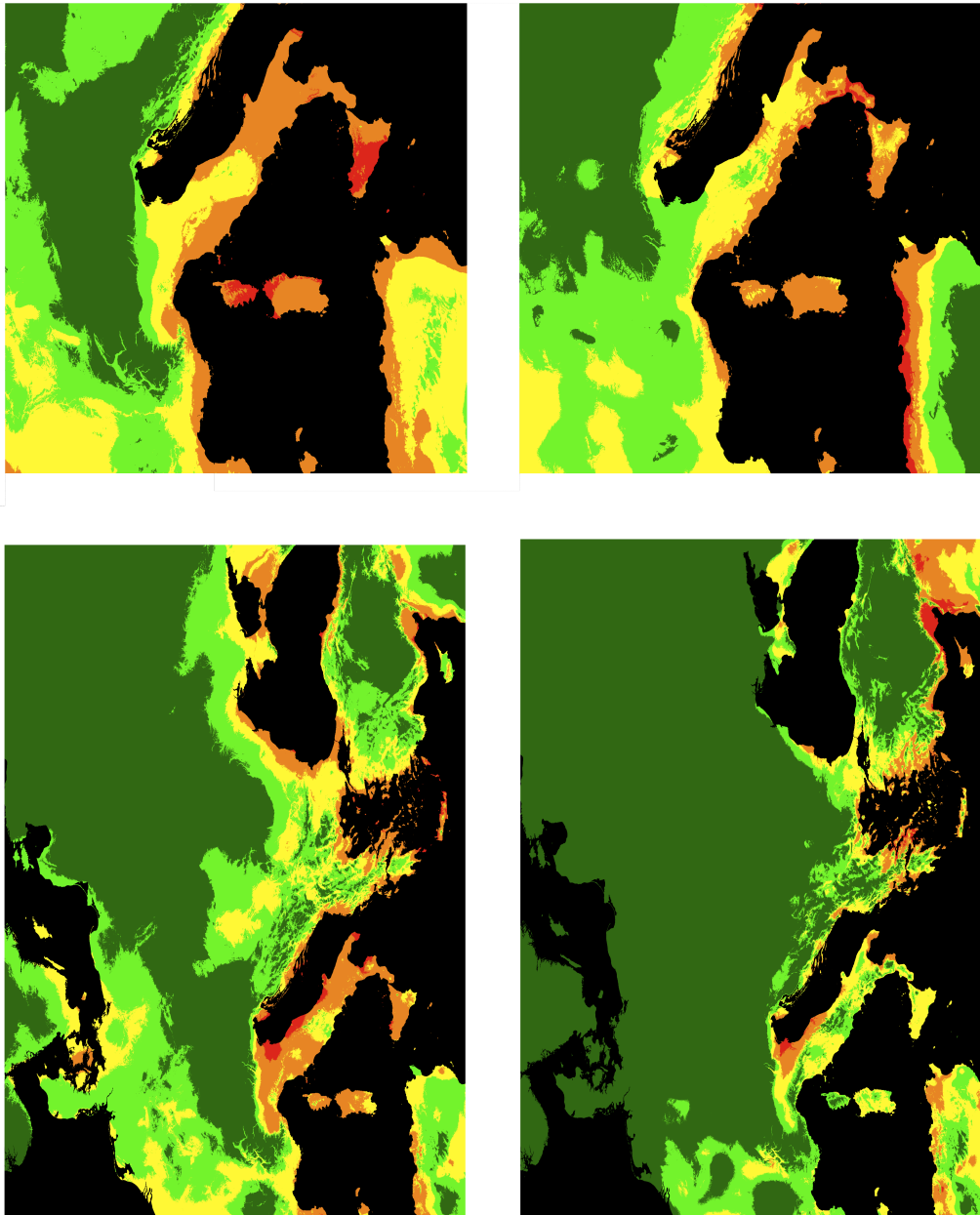
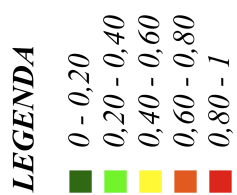


Fig. 9. Mappe di idoneità bioclimatica ottenute con “Maxent” per le due specie di rana verde alloctone individuate. A: modello “complessivo”, ottenuto a partire da dati di presenza sia nell’area nativa che in quella di introduzione. B: modello “nativo”, ottenuto a partire da dati di presenza nell’area nativa.

L' idoneità bioclimatica della penisola italiana è risultata estremamente elevata per entrambe le specie analizzate di Rana verde. In particolare, le aree costiere sono apparse particolarmente idonee per *Rana bedriagae*, mentre *Rana ridibunda* presenta un'elevatissima idoneità anche in aree più interne.

## 7. DISCUSSIONE

Lo studio della variazione genetica mitocondriale e nucleare del popolamento di rane verdi nell'area di Forlì-Ravenna, ha permesso di identificare quest'area come sito di introduzione di almeno 2 specie non native, provenienti da più aree della zona balcanica e anatolica, nonché la possibile causa di tale evento. Dal momento della loro introduzione, queste forme hanno dato luogo ad un processo di invasione (essendo ora presenti in un'area di circa 900 km<sup>2</sup>), cui ha fatto seguito la quasi totale eradicazione delle specie native dall'area. I risultati qui ottenuti, hanno inoltre evidenziato chiaramente come l'interazione competitiva fra specie e forme native e non native non possa ritenersi limitata ad aspetti di tipo ecologico (ad es. competizione trofica), ma coinvolga processi legati a fenomeni di ibridazione, tanto con la specie parentale *R. lessonae* quanto con la specie ibrida *R. esculenta*. Infine, la possibilità di ulteriore diffusione delle specie alloctone in Italia settentrionale e dunque l'urgenza di interventi di gestione, è chiaramente emersa dalle analisi del grado di idoneità ambientale dell'area di studio e di quelle ad essa limitrofe per le specie alloctone individuate.

### 7.1. Introduzione ed invasione di rane verdi alloctone nell'area di Forlì-Ravenna

Rane verdi provenienti dall'Europa orientale sono state identificate fino ad oggi in numerosi siti in Europa occidentale, alcuni dei quali in Italia (Arano et al., 1995; Pagano et al. 2001, 2003; Schmeller et al., 2005; Zeisset & Beebee, 2001, 2003; Holsbeek et al., 2008, 2010; Vorburger & Reyer, 2003; Christiansen & Reyer, 2009; Lanza, 1962; Lapini & Zanghellini, 1995; Bressi, 2006). Tali introduzioni sono state spesso spiegate come effetto collaterale dell'ampio commercio di rane per fini ornamentali e soprattutto eduli, grazie anche alle maggiori dimensioni e dunque all'appetibilità delle forme balcaniche (Holsbeek et al., 2008). Tali commerci sono stati inoltre favoriti dal quadro normativo vigente, che vieta il prelievo in natura a fini alimentari di rane verdi in molti, ma non tutti i paesi europei, permettendo così di ovviare ai divieti attraverso le importazioni. In questo contesto generale, ben si inserisce il caso italiano. Infatti, anche in Italia è fatto divieto del prelievo in natura di rane verdi, mentre non vi è alcuna regolamentazione delle importazioni.

Gli effetti di tali incongruenze ed assenze normative sono del tutto evidenti dai risultati riportati nel presente studio. Anzitutto, l'evento di introduzione è apparso essere legato proprio all'introduzione per fini alimentari di esemplari vivi dall'Europa orientale, presumibilmente da parte di un importatore del ravennate. Inoltre, sebbene non siano identificabili in modo preciso circostanze e tempi dell'introduzione, è invece verosimile supporre che essa possa essere successiva

al 1994, data di inizio delle attività di importazione. Ciò consente a sua volta di ipotizzare che l'ampiezza dell'area di invasione possa essere il risultato di eventi avvenuti in non più di quindici anni. Durante questo breve lasso di tempo le specie alloctone avrebbero dunque ampliato la loro area di diffusione, portando per altro ad una sostanziale eradicazione delle specie autoctone dall'area.

Vale la pena a questo punto ricordare come le rane verdi in oggetto presentino capacità dispersive abbastanza modeste, dell'ordine al massimo di pochi chilometri per generazione. Alla luce dell'ampiezza dell'area invasa, è possibile dunque ipotizzare che l'insieme dei vantaggi competitivi (ecologici, riproduttivi) evidenziati per le specie alloctone (v.d. anche di seguito), siano di tale entità da consentirne una diffusione confrontabile a quella che potrebbero presentare in assenza di competitori autoctoni.

A ulteriore supporto dell'elevato potenziale invasivo delle specie alloctone di rane verdi Europee in Italia settentrionale, la modellizzazione della distribuzione spaziale potenziale di queste specie ha indicato chiaramente come non vi siano sostanziali difformità fra l'idoneità stimata per l'area effettivamente invasa fino ad ora e gran parte della restante porzione della penisola italiana.

Considerati congiuntamente, i risultati fin qui discussi suggeriscono fortemente la necessità di una più profonda e rapida comprensione dei processi coinvolti nel favorire tale invasione, nonché dello sviluppo di piani di gestione volti alla conservazione delle specie native.

## **7.2. Ruolo dell'ibridazione nel processo di invasione**

Da diversi anni ormai è noto che rane verdi alloctone possono generare impatti sulle popolazioni native in vari modi, ad esempio attraverso competizione trofica o mediante predazione diretta soprattutto a carico delle fasi larvali (Nöllert & Nöllert 1992). Più recentemente sono stati inoltre documentati vari casi in cui nelle aree di invasione si sono verificati fenomeni di ibridazione interspecifica, peraltro facilitata dalle peculiari abitudini riproduttive delle specie di origine ibrida (Vorbürger & Reyer, 2003; Plötner et al., 2008; Holsbeek et al., 2008). Mancano tuttavia studi volti a caratterizzare tali fenomeni ibridativi. Attraverso lo studio congiunto della variazione mitocondriale e nucleare, in questo lavoro è stato possibile metterne in evidenza alcuni aspetti chiave, nonché valutare la plausibilità di alcune ipotesi recentemente avanzate (Holsbeek et al., 2008) circa le modalità con cui l'ibridazione interspecifica si verifica fra specie di Rana verde e le relative conseguenze.

Anzitutto i risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare con elevato grado di confidenza l'effettivo verificarsi, anche nell'area di studio, di eventi ibridativi interspecifici. L'attribuzione di

diversi individui alla classe genotipica F<sub>1</sub> è stata infatti accompagnata da un'elevata probabilità associata a tale inferenza. Inoltre la presenza di individui attribuibili alle classe genotipica F<sub>2</sub>, indica come la prole frutto dell'ibridazione non sia immancabilmente sterile.

Gli individui F<sub>1</sub> ed F<sub>2</sub> sono poi risultati maggiormente rappresentati nei siti più marginali dell'area di invasione (S3, S5, S9, S12, S13, S16), mentre altrove è emersa una netta prevalenza di genotipi parentali alloctoni, ed un'assenza di quelli autoctoni. Tuttavia, sempre nella zona centrale dell'area di studio, sono stati osservati individui introgressi con genotipo prevalentemente alloctono, non riferibili dunque alle prime due generazioni seguenti l'atto ibridativo (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e reincroci). Pertanto, sulla base di quanto osservato, è possibile affermare che una importante conseguenza degli eventi di ibridazione è l'acquisizione a lungo termine da parte delle forme alloctone di varianti geniche proprie delle specie native. Ciò avvalorava un'importante ipotesi di Holsbeek (2008): che le specie introdotte possano avvantaggiarsi dell'accresciuta variabilità genetica derivante dal trasferimento di forme alleliche dalle specie native. Tale maggior variabilità potrebbe inoltre conferire ulteriori vantaggi alle forme alloctone, sia nella competizione con le specie native sia, ad esempio, nell'interazione con parassiti e patogeni (Plötner, 2005).

Un ulteriore aspetto che emerge dai dati raccolti è che una delle componenti del vantaggio competitivo delle specie alloctone è proprio legato al comportamento riproduttivo. Infatti il 77% degli individui attribuiti alle classi F<sub>1</sub> ed F<sub>2</sub> dall'analisi dei genotipi multilocus allozimici, hanno mostrato genotipo mitocondriale del gruppo *-lessonae*, indicando una discendenza da madre *-lessonae*. Poiché la scelta sessuale nelle rane verdi è a carico delle femmine, questo dato suggerisce una certa preferenza delle femmine autoctone per i maschi alloctoni, maggiore che non nella direzione opposta (ossia femmine alloctone verso maschi autoctoni). Tale apparente minore inclinazione delle femmine autoctone ad evitare accoppiamenti eterospecifici supporta una ulteriore ipotesi avanzata recentemente (Holsbeek et al., 2008): le specie native vedrebbero vanificarsi una proporzione maggiore degli eventi riproduttivi, a causa della ridotta fitness degli ibridi, a tutto vantaggio (in termini demografici) per le specie alloctone.

Tra le ipotesi recentemente avanzate (Pagano et al., 2001; Vorburger & Reyer, 2003; Holsbeek et al., 2008), quella forse più preoccupante riguarda la possibilità di estinzione repentina delle specie di origine ibrida, come *R. esculenta*, per effetto soprattutto del processo di ibridazione. Infatti, i gameti prodotti da *R. esculenta*, trasmettono immancabilmente l'emiclone *-ridibunda*, condizione necessaria alla sopravvivenza della specie ibrida in aree di presenza della sola specie parentale *R. lessonae*. Proprio per questo motivo, l'accoppiamento con specie del gruppo *-ridibunda* o specie ad essa affini costituirebbe una sorta di *cul-de-sac* riproduttivo per *R. esculenta*, in quanto genererebbe individui di tipo *ridibunda*. Tali individui inoltre, proprio in virtù della



ridotta divergenza e dunque della elevata compatibilità fra i due genomi parentali, non presenterebbero verosimilmente significative riduzioni della fitness, andando a costituire un ulteriore vantaggio in termini demografici per le specie alloctone.

Lo studio dell'ibridazione tra *R. esculenta* e le specie alloctone è però complicato proprio dal fatto che l'F1 avrebbe genotipo difficilmente distinguibile come tale, difficoltà che diventerebbe assenza di potere discriminatorio già alla seconda generazione. In questo studio tuttavia, l'analisi congiunta della variazione mitocondriale e nucleare, ci ha permesso di verificare l'ipotesi di cui sopra, almeno per quanto concerne gli ibridi F1. Infatti, la linea mitocondriale di una femmina *R. esculenta* è nota essere di derivazione *-lessonae*. Dunque, un individuo con genotipo nucleare di tipo *ridibunda* avente però linea mitocondriale *lessonae*, non può che derivare da ibridazione tra *R. esculenta* e le specie alloctone. Di tali individui nel *dataset* analizzato ne sono stati identificati 3, fatto che assieme alla totale assenza di individui attribuibili a *R. esculenta*, dimostra la fondatezza delle preoccupazioni poc'anzi espresse. È necessario inoltre sottolineare come quella qui riportata non possa che essere una grossolana sottostima del fenomeno. Infatti, l'esito di incroci, pur plausibili, fra maschi di *R. esculenta* e femmine di tipo *ridibunda* non sarebbero rilevabili, mentre la probabilità di osservare linee mitocondriali *lessonae* in individui di seconda generazione o più, si riduce drasticamente ad ogni generazione.

Infine, la presenza dell'individuo KRC3 nel sito di Roncofreddo B, con genotipo mitocondriale *-lessonae* e nucleare con componente preponderante (ma non esclusiva) del gruppo *-lessonae*, testimonierebbe la possibilità di introgressione anche a partire dalle specie alloctone verso *R. lessonae*.

### **7.3. Implicazione per la conservazione delle specie native di rane verdi**

Studi sulla struttura e la variabilità genetica delle popolazioni di *R. lessonae* hanno mostrato come l'area a sud delle Alpi costituisca in assoluto il più importante *hotspot* di diversità intraspecifica per questa specie, e dunque l'area di maggior rilievo per la sua conservazione (Günther, 1986; Santucci et al., 1996; Canestrelli & Nascetti, 2008). In questo contesto, i risultati riportati nel presente studio assumono significato di particolare preoccupazione conservazionistica.

Anche alla luce delle direttive date agli stati dopo l'incontro di Rio De Janeiro (1992), in cui si raccomandava di fornire una rete legale per la protezione degli ecosistemi, delle specie e delle risorse biologiche in generale, e della presenza di *Rana lessonae* all'interno della direttiva Habitat (1992) e della Convenzione di Berna (1979) (D'Antoni et al., 2003), appare evidente come il quadro qui delineato inviti ad urgenti ed efficaci azioni di gestione volte a garantire la conservazione di

questa specie nonché (da quanto detto circa l'impatto dell'ibridazione interspecifica) della specie ibrida *R. esculenta*.

Va inoltre ricordato come le rane verdi risultino apprezzate sul mercato alimentare in varie aree d'Italia, a sottolineare il rischio di ulteriori introduzioni. A tale proposito vale la pena di menzionare il recentissimo reperimento da parte della scrivente e colleghi di un ulteriore sito di introduzione, questa volta in Aspromonte, un'area non solo ben lontana da quella oggetto di questo studio, ma anche ben differenziata ecologicamente, a ulteriore supporto della gravità del fenomeno e dell'impellenza di azioni concrete.

Come già suggerito in precedenti lavori (Arano et al., 1995; Holsbeek et al., 2008, 2010), l'invasività delle rane verdi provenienti dall'Europa orientale impone la predisposizione di piani di controllo della loro importazione. Tali piani, in analogia con quanto già predisposto per altre specie (ad esempio per elementi della fauna ittica), dovrebbero prevedere il divieto di importazione di animali vivi a fini ornamentali, e l'eventuale possibilità di importazione per fini alimentari, ma limitata ad esemplari già macellati nella zona di allevamento.

Se non venissero presi provvedimenti entro breve tempo, le specie autoctone di rana verde della penisola italiana potrebbero rapidamente estinguersi, a pieno vantaggio di alcune fra le specie più invasive tra gli anfibi europei (cfr. Holsbeek, 2008).

## Bibliografia

Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automatic Control* AC. 19: 719–723.

Akın C., C.C. Bilgin, P. Beerli, R. Westaway, T. Ohst, S.N. Litvinchuk, T. Uzzell, M. Bilgin, H. Hotz, G.D. Guex, J. Plotner. 2010. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal of Biogeography*. 37: 2111–2124.

Allendorf F.W. & G. Luikart. Conservation and the genetics of populations. 2007. Blackwell Publishing.

Anderson, E. C. & E. A. Thompson. 2002. A Model-Based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*. 160 (3): 1217-1229.

Andreani P., A. Motawi, G. Nascetti. 1997. Valutazione della qualità delle acque del bacino idrografico del fiume Marta (Alto Lazio): applicazione dell'Indice Biotico Esteso e analisi della frequenza relativa di rane verdi del complesso *Rana esculenta*. In: *Atti Conv. Scient. "VIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia"*, Parma, 10-12 settembre 1997.

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.

Arano B., G. Llorente, M. Garcia-Paris, P. Herrero. 1995. Species translocations menaces Iberian waterfrogs. *Conservation Biology*. 9 (1): 196-198.

Arnold M. L. A field guide to the Reptiles and Amphibians of Britain and Europe. 2002. Collins London. 272 pp.

Avise J. C., P. C. Pierce, M.J. Van Den Avye, M.H. Smith, W.S. Nelson, M.A. Asmussen. 1997. Cytonuclear introgressive swamping and species turnover of bass after an introduction. *Journal of Heredity*. 88: 14-20.

Beerli P., H. Hotz, T. Uzzell. 1996. Geologically dated sea barriers calibrate a protein clock for aegean water frogs. *Evolution*. 50 (4): 1676-1687.

Berger L. 1964. Is *Rana lessonae* CAMERANO a distinct species? *Annales Zoologici*, Warszawa. 22: 97-102.

Berger L. 1967. Embryonal and larval development of F1 generation of green frogs of

different combinations. *Acta Zoologica Cracoviensia*. 12: 123–160.

Berger L. 1968. Morphology of the F<sub>1</sub> generation of various crosses within *Rana esculenta* complex. *Acta Zoologica Cracoviensia*. 13: 301-324.

Bressi N., 2006 – *Rana ridibunda* Pallas, 1771 / *Rana kurtmuelleri* Gayda, 1940. In: Sindaco R., Doria G., Razzetti E. & Bernini F. (Eds.) – Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia. Societas Herpetologica Italica, Edizioni Polistampa, Firenze: 346-351.

Bucci S., M. Ragghianti, F. Guerrini, V. Cerrini, G. Mancino, A. Morosi, M. Mossone, R. Pascolini. 2009. Negative environmental factors and biodiversity: the case of the hybridogenetic green frog system from Lake Trasimeno. *Italian Journal of Zoology*. 67: 365-370.

Cadi A. & P. Joly. 2004. Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Biodiversity and Conservation* 13: 2511–2518.

Canestrelli D., R. Cimmaruta, G. Nascetti. 2007. Phylogeography and historical demography of the Italian tree-frog *Hyla intermedia* reveals multiple refugia, population expansions and secondary contacts within peninsular Italy. *Molecular Ecology*. 16: 4808–4821.

Canestrelli D. and G. Nascetti. 2008. Phylogeography of the pool frog *Rana (Pelophylax) lessonae* in the Italian peninsula and Sicily: multiple refugia, glacial expansions and nuclear-mitochondrial discordance. *Journal of Biogeography*. 35: 1923–1936.

Capula M. 2006. *Rana lessonae/Rana klepton esculenta*. pp. 334-339. In: Sindaco R., G. Doria, E. Razzetti, F. Bernini. Atlante degli anfibi e dei Rettili d'Italia. Societas Herpetologica Italica, Edizioni Polistampa, Firenze, 792 pp.

Capula M., A. Ceccarelli, L. Luiselli. 2005. Amphibians of Italy: a revised checklist. *Aldrovandia, Bollettino del Museo Civico di Zoologia di Roma*. 1: 101-108.

Christiansen D.G. and H.U. Reyer. 2009. From clonal to sexual hybrids: genetic recombination via triploids in all-hybrid populations of water frogs. *Evolution*. 63: 1754–1768.

Clement M., Posada D., Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9 (10): 1657-1660.

Cox G.W. *Alien species and evolution*. 2004. Island Press.

Crochet P.-A., A. Dubois. 2004. Recent changes in the taxonomy of European amphibians and reptiles. *Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe*: 495-516.

Disi A. M. and Z. S. Amr. 2010. Morphometrics, distribution and ecology of the amphibians

in Jordan. *Vertebrate Zoology*. 60 (2): 147-162.

D'Antoni S., E. Dupré, S. La Posta, P. Verucci. *Fauna Italiana inclusa nella Direttiva Habitat*. 2003. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – Direzione per la Protezione della Natura. 436 pp.

Doyle J.J. & J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.

Dubois A. & A. Ohler. 1994. Frogs of the subgenus *Pelophylax* (Amphibia, Anura, Genus *Rana*): a catalogue with comments on name-bearing types, complete synonymies, proposed common names, and maps showing all type localities. *Zoologica Poloniae*. 39: 139-204.

Duguet R. & F. Melki. *Les Amphibiens de France, Belgique et Luxembourg*. ACEMAV coll., Collection Parthénope, éditions Biotope, Mèze (France). 480 pp.

Elton C.S. *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. 1958. The University of Chicago Press.

Estoup A, P. Jarne, J.M. Cornuet. 2002. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*. 11: 1591–1604.

Evanno G., S. Regnaut, J. Gaudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611–2620.

Ewel, J.J., D.J. O'Dowd, J. Bergelson, C.C. Daehler, C.M. D'Antonio, L.D. Gomez, D.R. Gordon, R.J. Hobbs, A. Holt, K.R. Hopper, C.E. Hughes, M. LaHart, R.R.B. Leakey, W.G. Lee, L.L. Loope, D.H. Lorence, S.M. Louda, A.E. Lugo, P.B. McEvoy, D.M. Richardson, P.M. Vitousek. 1999. Deliberate introductions of species: Research needs. *BioScience*. 49: 619–630.

Falush D., M. Stephens, J.K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*.

Ferri V. 2006. Legislazione: 696-711. In: Sindaco R., G. Doria, E. Razzetti, F. Bernini.. *Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia*. Societas Herpetologica Italica. Edizioni Polistampa, Firenze. 792 pp.

Ficetola G. F., A. Bonin, C. Miaud. 2008. Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. *Molecular Ecology*. 17: 773–782.

Ficetola G. F., W. Thuiller, C. Miaud. 2007. Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species — the American bullfrog. *Diversity and Distributions*. 13 (4): 476–485.

Fitzpatrick B.M. & H. B. Shaffer. 2004. Environment-dependent admixture dynamics in a tiger salamander hybrid zone. *Evolution*. 58: 200-211.

Fitzpatrick B. M., J.R. Johnson, D.K. Kump, H.B. Shaffer, J.J. Smith, S.R. Voss. 2009. Rapid fixation of non-native alleles revealed by genome-wide SNP analysis of hybrid tiger salamanders. *BMC Evolutionary Biology*. 9: 176.

Gavrilovic V., D.D. Cvetkovic, G. Djukic, S. Petkovski. 1999. Comparative morphological study of *Rana balcanica* and *Rana ridibunda*. In: 7<sup>th</sup> International congress on the zoogeography and ecology of Greece and adjacent regions, Athens, Greece, 1-5/4/1996. Vol. 1: 485 pp.

Grant P. R., B. R. Grant, K. Petren. 2005. Hybridization in the Recent Past . *The American Naturalist*. 166 (1).

Groom M.J., G.K. Meffe, C.R. Carroll. Principles of conservation biology. 2006. Sinauer Associates, Inc.

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. 59: 307–321.

Günther R. 1969. Untersuchungen zum Artproblem an europäischen Anuren der Gattung *Rana* (Amphibia). Diss (A), Humboldt Universität zu Berlin.

Günther R. and J. Plötner. 1994. Molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA Morphometric, enzymological and bioacoustic studies in Italian water frogs (Amphibia, Ranidae). *Zoologica Poloniae*. 39: 387–415.

Günther R. Die Amphibien und Reptilien Deutschlands. 1996. Gustav Fisher Verlag, Jena. 825 pp.

Günther R. Die Wasserfrösche Europas, (Anura-Froschlurche). 1990. Westarp, Wissenschaften. 288 pp.

Hänfling B., F. Edwards, F. Gherardi. 2011. Invasive alien Crustacea: dispersal, establishment, impact and control. *BioControl*. 56: 573 – 595.

Hartman P. J.; D. P. Wetzel; P. H. Crowley; D. F. Westnea. 2012. The impact of extra-pair mating behavior on hybridization and genetic introgression. *Theoretical Ecology*. 5:219–229.

Heiser, C. B. and Jr. 1947. Hybridization between the sunflower species *Helianthus annuus* and *H. petiolaris*. *Evolution*: 249 – 262.

Hijmans, R. J., L. Guarino, C. Bussink, P. Mathur, M. Cruz, I. Barrentes, and E. Rojas. 2005.

DIVA-GIS. Vsn. 5.0. A geographic information system for the analysis of species distribution data. DIVA-GIS Manual.

Holsbeek G. & R. Jooris. 2010. Potential impact of genome exclusion by alien species in the hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Biological Invasions*. 12: 1 – 13.

Holsbeek G., G. E. Maes, L. De Meester, F. A. M. Volckaert. 2009. Conservation of the introgressed European water frog complex using molecular tools. *Molecular Ecology*. 18: 1071-1087.

Holsbeek G., J. Mergeay, H. Hotz, J. Plötner, F.A.M. Volckaert, L. De Meester. 2008. A cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex: consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation. *Molecular Ecology*. 17: 5023–5035.

Hotz H. 1983. Genic diversity among water frog genomes inherited with and without recombination. Inaugural Dissertation zur Erlangung der philosophischen Doctorwürde vorgelegt der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich. Zentraisteile der Studenten schaft. Zürich, pp. 136.

Hotz H., P. Beerli, C. Spolsky. 1992: Mitochondrial DNA reveals formation of nonhybrid frogs by natural matings between hemiclinal hybrids. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 610-620.

Hotz. H., T. Uzzell, L. Berger. 1997. Linkage groups of protein-coding genes in western Palearctic water frogs reveal extensive evolutionary conservation. *Genetics*. 147: 255-270.

Hotz H., G.-D. Guex, P. Beerli, R.D. Semlitsch, N.B.M. Pruvost. 2008. Hemiclone diversity in the hybridogenetic frog *Rana esculenta* outside the area of clone formation: the view from protein electrophoresis. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 46 (1): 56–62.

Jeschke J. M. and D. L. Strayer. 2005. Invasion success of vertebrates in Europe and North America. *PNAS*. 102 (20): 7198-7202.

Kuzmin S.L. *The Amphibians of the former soviet Union*. 1999. Pensoft, Sofia. 538 pp.

Lanza B. 1962. On the introduction of *Rana ridibunda* Pallas and *Rana catesbeiana* Shaw in Italy. *Copeia*. 3: 642-642.

Lanza B. *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*. 27. Anfibi, Rettili (Amphibia, Reptilia). 1983. Collana del Progetto Finalizzato “Promozione della Qualità dell'Ambiente”. 1983. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

Lanza B., F. Andreone, M. A. Bologna, C. Corti, E. Razzetti. Fauna d'Italia. Amphibia. Vol. XLII. 2007. Calderini.

Lapini L. and Zanghellini S. 1995. Primi dati su *Rana* cfr. *ridibunda* Pallas, 1771 in Trentino-Alto Adige (Amphibia, Anura, Ranidae). Studi trentini Scienze naturali. Aera biol, Trento. 70 pp.

Lapini L. Si fa presto a dire rana. Guida al riconoscimento degli anfibi anuri nel Friuli Venezia Giulia. 2005. Provincia di Pordenone e Comune di Udine. 48 pp.

Lengagne T., O. Grolet, P. Joly. 2006. Male mating speed promote hybridization in the *Rana lessonae-Rana esculenta* waterfrog system. Behavioral Ecology and Sociobiology. 60 (2): 123-130.

Lenormand T. 2002. Gene flow and the limits to natural selection. TRENDS in Ecology & Evolution. 17: 183-189.

Lexer C., M. E. Welch, J. L. Durphy, L. H. Rieseberg. 2003a. Natural selection for salt tolerance quantitative trait loci (QTLs) in wild sunflower hybrids: Implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. Molecular Ecology. 12: 1225–1235.

Lexer C., M. E. Welch, O. Raymond, L. H. Rieseberg. 2003. The origin of ecological divergence in *Helianthus paradoxus* (Asteraceae): selection on transgressive characters in a novel hybrid habitat. Evolution. 57: 2012–2025.

Li Y.-C., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology. 11: 2453–2465.

Liou, L. W. and T. D. Price. 1994. Speciation by reinforcement of premating isolation. Evolution. 48: 1451–1459.

Lozon J.D. and H.J. MacIsaac. 1997. Biological invasions: are they dependent on disturbance? Environmental Research. 5: 131-144.

Lymberakis P., N. Poulakakis, G. Manthalou, C.S.Tsigenopoulos, A. Magoulas, M. Mylonas. 2007. Mitochondrial phylogeography of *Rana (Pelophylax)* populations in the Eastern Mediterranean region. Molecular Phylogenetic and Evolution. 44: 115-125.

Mack R. N., D. Simberloff, W. M. Lonsdale, H. Evans, M. Clout, F.A. Bazzaz. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. Ecological Applications. 10 (3): 689-710.

Mallet J. 2005. Hybrid speciation. Nature. 446: 279- 283.



Morgan J. T., A. V. Harry, D. J. Welch, R. Street, J. White, P. T. Geraghty, W. G. Macbeth, A. Tobin, C. A. Simpfendorfer, J. R. Ovenden. 2012. Detection of interspecies hybridization in Chondrichthyes: hybrids and hybrid offspring between Australian (*Carcharhinus tilstoni*) and common (*C. limbatus*) blacktip shark found in an Australian fishery. *Conservation Genetics*. 13: 455–463.

Morin P.A., G. Luikart, R.K. Wayne, SNP\_Workshop\_Group. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 19: 208–216.

Moyle P.B. 1973. Effect on introduced bullfrogs, *Rana catesbeiana*, on the native frogs of the San Joaquin Valley, California. *Copeia*. 18-22.

Nöllert A. and C. Nöllert. 1992. *Die Amphibien Europas. Bestimmung, Gefährdung, Schutz*. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co., Stuttgart, 382 pp.

Pagano A. and Joly P. 1999. Limits of the morphometric method for field identification of water frogs. *Alytes*. 16 (3–4): 130–138.

Pagano A., P.A. Crochet, J.-D. Graf, P. Joly, T. Lodé. 2001. Distribution and habitat use of water frog hybrid complexes in France. *Global Ecology & Biogeography*. 10: 433–441.

Pagano A.A. Dubois, D. Lesbarrères, T. Lodé. 2003. Frog alien species: a way for genetic invasion? *Comptes Rendus Biologies*. 326: 85-92.

Paolucci M., M. Borriello, V. Botte, M. Zerani, Polzonetti Magni A. 1987: Taxonomic investigations on six populations of the water frog, *Rana esculenta*, complex from peninsular Italy and Sicily. *Bulletin of Zoology*. 54: 341-346.

Parker P.G., A.A. Snow, M.A. Schug, G.C. Booton, P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*. 79: 361–382.

Pasteur N., P. Pasteur, F. Bonhomme, J. Catalan, J. Britton-Davidian. *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. 1987. Ed. Lavoisier, Paris. 217 pp.

Phillips S.J., R.P. Anderson, R.E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. 190: 231–259.

Perret N. and P. Joly. 2002. Impacts of tattooing and pit-tagging on survival and fecundity in the Alpine newt (*Triturus alpestris*). *Herpetologica*. 58 (1): 131-138.

Pimentel D., L. Lach, R. Zuniga, D. Morrison. 2000. Environmental and economics costs of nonindigenous species in the United States. *BioScience*. 50: 53-65.

Pimentel D., S. Mc Nair, J. Janecka, J. Wrightman, C. Simmonds, C. O’Connell, E. Wong, et

al. 2001. Economic and environmental threats of alien plant, animal and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 84: 1–20.

Plötner J. 1998. Genetic diversity in mitochondrial 12S rDNA of western Palearctic water frogs (Anura, Ranidae) and implications for their systematics. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 36:191–201.

Plötner J. and T. Ohst. 2001. New hypotheses on the systematics of the western Palearctic water frog complex (Anura, Ranidae). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin, Zoologische Reihe*. 77: 5–21.

Plötner J., T. Uzzell, P. Beerli, C. Splosky, T. Ohst, S. N. Litvinchuk, G. D. Guex, H. U. Reyer, H. Hotz. 2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palearctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology*. 21: 668-681.

Plötner J. 2005. Die westpaleäarktischen wasserfrösche von Martyreren der wissenschaft zur biologischen sensation. Laurenti-Verlag, Bielefeld, Germany.

Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25 (7): 1253-1256.

Price T. 2008. *Speciation in birds*. Roberts and Co. Boulder, CO.

Pritchard J.K., M. Stephens, P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945 – 959.

Radwan N.M. and H. Schneider. 1998. Social behaviour, call repertory and variation in the calls of the Pool Frog *Rana lessonae*. *Amphibia-Reptilia*. 9: 329-351.

Raymond M. and M. Marquine. 1994. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* populations: the Corsican paradox. *Journal of Evolutionary Biology*. 7: 315–337.

Reyer H.-U. 2008. Mating with the wrong species can be right. *Trends in Ecology and Evolution*. 23 (6): 289-292.

Reshetnikov A. N., G. F. Ficetola. 2011. Potential range of the invasive fish roach (*Percottus glenii*) in the Holartic. *Biological Invasions*. 13: 2967-2980.

Rhymer J. M. and D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 1996. 27: 83–109.

Rieseberg L. H. 1991. Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (Asteraceae): evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany*. 78: 1218–1237.

Rieseberg L.H., M.A. Archer, R.K. Wayne. 1999. Transgressive segregation, adaptation, and

speciation. *Heredity*. 83: 363-372.

Robbins T.R., J.N. Pruitt, L.E. Straub, E.D. McCoy, H.R. Mushinsky. 2010. Transgressive aggression in *Sceloporus* hybrids confers fitness through advantages in male agonistic encounters. *Journal of Animal Ecology*. 79: 137-147.

Roché J.C. Au pays des grenouilles. Frog talk. 1997. Le Verdier, Sittelle.

Roura-Pascual N., L. Brotons, A. Townsend Peterson, W. Thuiller. 2009. Consensual predictions of potential distributional areas for invasive species: a case study of Argentine ants in the Iberian Peninsula. *Biological Invasions*. 11 (4): 1017-1031.

Santucci F., G. Nascetti, L. Bullini. 1996. Hybrid zones between two genetically differentiated forms of the pond frog *Rana lessonae* in southern Italy. *Journal of Evolutionary Biology*. 9: 429-450.

Shatz I. 1991. Struttura genetica di *Rana esculenta* (Amphibia: Ranidae) in Italia. Tesi Laurea.

Schmeller D.S., A. Pagano, S. Plenet, M. Veith. 2007. Introducing water frogs - Is there a risk for indigenous species in France? *Comptes Rendus Biologies*. 330: 684-690.

Schmeller D.S., A. Seitz, A. Crivelli, M. Veith. 2005. Crossing species' range borders: interspecies gene exchange mediated by hybridogenesis. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*. 272 (1572): 1625-1631.

Schneider H. and U. Sinsch. 1999. Taxonomic reassessment of Middle Eastern water frogs: Bioacoustic variation among populations considered as *Rana ridibunda*, *R. bedriagae* or *R. levantina*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 37: 57-65.

Schneider H. and U. Sinsch. 2001. New bioacoustic records of *Rana bedriagae* Camerano, 1882 (Anura: Ranidae) from Turkey. *Bonner zoologische Beiträge*. 50 (1-2): 35-38.

Schneider H., U. Sinsch, T.S. Sofianidou. 1993. The water frogs of Greece. Bioacoustic evidence for a new species. *Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung*. 31: 47-63.

Schultz R. J. 1969. Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *The American Naturalist*. 103: 605-619.

Scillitani G. & O. Picariello. 2000. Genetic variation and its causes in the crested newt, *Triturus carnifex* (Laurenti, 1768), from Italy (Caudata: Salamandridae). *Herpetologica*. 56 (1): 119-131.

Scoccianti C. Amphibia: aspetti di ecologia della conservazione. 2011. Guido Persichino Grafica, Firenze.

Seehausen O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*. 19 (4): 198-207.

Seehausen O., J.J.M. van Alphen, F. Witte. 1997. Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science*. 277: 1808-1811.

Shultz R.J. 1969. Hybridization, unisexuality in the viviparous fish *Poeciliopsis*. *Science*. 157: 1564-1567.

Sinsch U. & H. Schneider. 1996. Bioacoustic assessment of the taxonomic status of pool frog populations (*Rana lessonae*) with reference to a topotypical population. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 34: 63-73.

Spolsky, C. & Uzzell, T. 1986. Evolutionary history of the hybridogenetic hybrid frog *Rana esculenta* as deduced from mtDNA analyses. *Molecular Biology and Evolution*. 3: 44–56.

Tamura K, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.

Tavaré S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences (American Mathematical Society)*. 17: 57–86.

Thompson J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25: 4876–4882.

Tunner H. G. 1979. The inheritance of morphology and electrophoretic markers from homotypic crosses of the hybridogenetic *Rana esculenta*. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*. 55: 89-109.

Uzzell, T. 1979. Immunological variation in *Rana lessonae* (Amphibia Salientia). *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*. 55: 29-33.

Uzzell, T. and Berger, L., 1975. Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and their hybridogenetic associate, *Rana esculenta*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 127: 13–24.

Uzzell, T. and Hotz. 1979. electrophoretic and morphological evidence for two forms of green (*Rana esculenta* complex) in peninsular Italy (Amphibia, salientia). *Mitteilungen aus dem*

Zoologischen Museum in Berlin. 55: 13-27.

Vähä J.-P. & C. R. Primmer. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*. 15 (1): 63-72.

Vallender R., R.J. Robertson, V.L. Friesen, I.J. Lovette. 2007. Complex hybridization dynamics between golden-winged and blue-winged warblers (*Vermivora chrysoptera* and *Vermivora pinus*) revealed by AFLP, microsatellite, intron and mtDNA markers. *Molecular Ecology*. 16: 2017–2029.

Vorburger C. & H.U. Reyer. 2003. A Genetic Mechanism of Species Replacement in European Water Frogs? *Conservation Genetics*. 4 (2): 141–155.

Walker B. & W. Steffen. 1997. An overview of the implications of global change for natural and managed terrestrial ecosystems. *Conservation Ecology*.

Warren, D. L. & S. N. Seifert. 2011. Ecological niche modeling in Maxent: the importance of model complexity and the performance of model selection criteria. *Ecological Applications*. 21 (2): 335–342.

Warren, D. L., R. E. Glor, M. Turelli. 2010. ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*. 33 (3): 607-611.

Williamson M. *Biological Invasions*. 1996. Chapman & Hall, London.

Wilson B. S., S. E. Koenig, R. van Veen, E. Miersma, D. Craig Rudolph. 2011. Cane toads a threat to West Indian wildlife: mortality of Jamaican boas attributable to toad ingestion. *Biological Invasions*. 13: 55–60.

Wootton J. T. 1994. The nature and consequences of indirect effects in ecological communities. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 25: 443-466.

Wycherley J., S. Doran, T. J. C. Beebee. 2002. Frog calls echo microsatellite phylogeography in the European pool frog (*Rana lessonae*). *Journal of Zoology (London)*. 258: 479-484.

Wycherley J., S. Doran, T. J. C. Beebee. 2002 a. Male advertisement call characters as phylogeographical indicators in European water frogs. *Biological Journal of the Linnean Society*. 77: 355–365.

Zeisset I. & T.J.C. Beebee. 2003. Population genetics of a successful invader: the marsh frog *Rana ridibunda* in Britain. *Molecular Ecology*. 12: 639–646.

Zeisset, I. & T.J.C. Beebee. 2001. Determination of biogeographical range: an application of molecular phylogeography to the European pool frog *Rana lessonae*. Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences. 268: 933–938.

Zhang D.X., G.M. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Molecular Ecology. 12: 563–584.

Zuckerandl E. & L. Pauling. 1962. Molecular disease, evolution and genic heterogeneity. In: M. Kasha and B. Pullmann. Horizons in Biochemistry. Academic press, New York. pp. 189–225.