UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER L'AMBIENTE

TESI DI LAUREA

Analisi genetica delle popolazioni di Lasca (*Protochondrostoma genei*) del bacino dell'alto Po

Relatore: Prof. Leonardo Congiu

Dipartimento di Biologia

Correlatore: Chiara Samassa

Laureanda: Giada Orlando

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

INDICE

RIASSUNTO 3

1 INTRODUZIONE 4

1.1 Lasca 4
1.1.1 Distribuzione geografica 5

1.2 Status e conservazione 6
1.2.1 Progetto Life Minnow 9

1.3 DNA mitocondriale 10

2 SCOPO DELLA TESI 12

3 MATERIALE E METODI 13

3.1 Campioni analizzati 13

3.2 Procedura di campionamento 14

3.3 Estrazione del DNA genomico 15

3.4 D-loop mitocondriale e analisi dati 16

4 RISULTATI E DISCUSSIONE 18

4.1 Analisi DNA mitocondriale 18

4.2 Network di aplotipi 19

5 CONCLUSIONI 21

6 BIBLIOGRAFIA 22

RIASSUNTO

La Lasca, *Protochondrostoma genei*, conosciuta anche come striscia, è una specie di pesci ossei d'acqua dolce appartenente alla famiglia Cyprinidae. Si tratta dell'unico membro del genere Protochondrostoma. Questa specie è nativa del bacino del Mare Adriatico settentrionale, con un'area di distribuzione che si estende dal fiume Vomano, nell'Italia orientale, fino al fiume Soča (Isonzo), nella Slovenia occidentale. Nel complesso, si stima che oggi la specie occupi dal 25% al 60% del suo areale nativo originale ed è stata classificata come Vulnerabile dalla Lista rossa dell'IUCN delle specie minacciate nel 2024. Per impedire l'ulteriore declino di questa specie e di altre cinque dell'areale del bacino dell'alto Po, è nato il progetto Life Minnow. Questo progetto di tesi ha avuto l'obiettivo di valutare il grado di somiglianza o differenziazione genetica tra popolazioni campionate per determinare l'appartenenza ad una o più unità conservazionistiche al fine di supportare futuri piani di reintroduzione e favorire interventi di ripopolamento della Lasca. Lo studio è stato condotto andando ad analizzare il DNA mitocondriale. L'analisi ha previsto l'amplificazione ed il sequenziamento del D loop, la regione ipervariabile di controllo della replicazione in 135 individui, suddivisi in 6 popolazioni. Sono state trovate 29 diverse varianti di sequenza (aplotipi). Nel complesso i risultati di questo studio non mostrano un particolare pattern di distribuzione tale da suddividere in unità conservazionistiche differenti le popolazioni analizzate. Tuttavia, sarebbe opportuno analizzare anche il DNA nucleare per avere maggiori informazioni sulla struttura genetica delle popolazioni di *Protochondrostoma genei*.

1 INTRODUZIONE

1.1 Lasca

La lasca, *Protochondrostoma genei* (Bonaparte, 1839), conosciuta anche come striscia è una specie di pesci ossei d'acqua dolce appartenente all'ordine dei Cypriniformes, famiglia Leuciscidae. Si tratta dell'unico membro del genere Protochondrostoma.[1]

Inquadramento sistematico:

PHYLUM: Chordata

SUBPHYLUM: Vertebrata

CLASSE: Actinopterygii

ORDINE: Cypriniformes

FAMIGLIA: Leuciscidae

GENERE: Protochondrostoma

SPECIE: Protochondrostoma genei

Figura 1 Esemplare di Protochondrostoma genei

È più abbondante nei tratti caratterizzati da un habitat eterogeneo, con la presenza di rapide, correnti, pozze e tratti più tranquilli, un flusso moderato, substrati costituiti da pietre grossolane, strutture sommerse rocciose o legnose, sponde erose, e una vegetazione ripariale ben sviluppata. Si nutre parzialmente di perifiton, che raschia dalla superficie delle rocce sommerse e di altri substrati utilizzando parti boccali specializzate, ma consuma anche detrito organico e macroinvertebrati bentonici. Gli individui adulti raggiungono la maturità sessuale tra i 3 e i 4 anni di età, e il periodo riproduttivo annuale si estende da marzo a giugno, con una tempistica variabile a seconda della posizione geografica e delle condizioni climatiche. Il comportamento riproduttivo è caratterizzato dalla migrazione di individui nuziali per brevi distanze verso specifiche aree a monte, generalmente costituite da letti di ghiaia in acque basse e correnti. I maschi riproduttori sviluppano una colorazione epigamica vistosa e tubercoli nuziali epidermici sulla testa. La specie presenta una strategia riproduttiva frazionata e poligama, con le femmine che possono deporre 2.000-5.000 uova all'anno. Il periodo di incubazione dura circa dieci giorni, ma può variare a seconda della temperatura dell'acqua.

[1] **Fricke, R., Eschmeyer, W.N. and Van der Laan, R.** (eds). 2024. Eschmeyer's Catalog of Fishes: genera, species, references.

1.1.1 Distribuzione geografica

Questa specie è nativa del bacino del Mare Adriatico settentrionale, con un'area di distribuzione che si estende dal fiume Vomano, nell'Italia orientale, fino al fiume Soča (Isonzo), nella Slovenia occidentale. A partire dagli anni '60, la specie è stata ampiamente introdotta nei fiumi che drenano i versanti ligure e tirrenico dell'Italia occidentale. Ad esempio, nella regione dell'Umbria, è presente nei tratti medio-alti del fiume Tevere e nelle sezioni inferiori dei suoi principali affluenti, tra cui i fiumi Chiascio-Topino, Paglia, Nera e Nestore. È stata inoltre segnalata nei laghi artificiali di Corbara, Alviano e Recentino. L'attuale tendenza della popolazione non è stata quantificata, ma si sospetta una riduzione in corso, che potrebbe aver superato il 30% nelle ultime tre generazioni, a causa del continuo declino dell'estensione e della qualità dell'habitat. Il numero esatto di sottopopolazioni rimane incerto. Esistono chiare evidenze di una significativa riduzione della popolazione dalla metà del XX secolo, in particolare nei tratti medio-bassi del fiume Po e dei suoi affluenti. Inoltre, è stata quasi completamente estirpata dal sistema fluviale del fiume Soča (Isonzo), dove potrebbe ora essere limitata a un solo piccolo fiume nella regione Friuli-Venezia Giulia (Italia) e un altro nella regione del Litorale (Slovenia). In Italia, si sospetta che questo declino sia ancora in corso nelle regioni di Piemonte, Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto, Friuli-Venezia Giulia e Abruzzo, sulla base di osservazioni sul campo, della riduzione della qualità dell'habitat e degli effetti delle specie introdotte. L'abbondanza della specie si ritiene invece stabile o in aumento nelle aree in cui è stata introdotta, in particolare nelle regioni di Liguria, Toscana, Umbria e Lazio[2]. Nel complesso, si stima che oggi la specie occupi dal 25% al 60% del suo areale nativo originale, e il suo stato di conservazione è classificato come Vulnerabile dalla Lista rossa dell'IUCN.

Figura 2 Distribuzione geografica Protochondrostoma genei

[2] **Tedesco, P.A., Beauchard, O., Bigorne, R., et al.** (2017). "A global database on freshwater fish species occurrence in drainage basins." *Scientific Data*, **4**, 170141.

1.2 Status e conservazione

Il declino di questa specie è attribuito principalmente alla regolazione dei fiumi e ad altre forme di degradazione antropica dell'habitat, che hanno portato alla perdita diffusa degli ambienti fluviali eterogenei e interconnessi necessari per completare il suo ciclo vitale. La costruzione di dighe, soglie, sbarramenti e altre barriere lungo il suo areale ha alterato gravemente i regimi naturali di flusso e sedimentazione, bloccato le rotte migratorie, frammentato le sottopopolazioni e ridotto l'estensione degli habitat idonei per tutte le fasi della vita. Le dighe idroelettriche hanno causato fluttuazioni innaturali della portata e della temperatura dell'acqua (hydropeaking e thermopeaking), determinando il prosciugamento artificiale dei tratti fluviali a valle e la perdita di habitat stabili per l'accrescimento dei giovani individui. Inoltre, l'effetto combinato di hydropeaking, operazioni di svaso delle dighe, cambiamenti nell'uso del suolo e rimozione della vegetazione ripariale ha portato a un aumento dell'accumulo di sedimenti fini in alcuni siti di riproduzione, probabilmente compromettendo i tassi di schiusa e sopravvivenza di uova e larve. La qualità dell'habitat è stata ulteriormente ridotta da interventi di stabilizzazione delle sponde, canalizzazioni e altre misure per il controllo delle piene o per lo sfruttamento delle risorse idriche a fini agricoli. L'estrazione non regolamentata di acqua rappresenta una minaccia particolarmente grave nei piccoli affluenti e in alcuni siti di riproduzione e crescita a monte. Alcuni habitat sono stati inoltre danneggiati dall'estrazione industriale di ghiaia e altri sedimenti per lo sviluppo urbano, dalla rimozione della vegetazione ripariale e da attività di manutenzione come il drenaggio o la rimozione di rami caduti e detriti, che forniscono riparo e superfici su cui questa specie si nutre. Questa specie è minacciata anche dall'inquinamento diffuso e puntuale di origine agricola, domestica e industriale, che in alcune località ha ridotto l'estensione e la qualità dell'habitat a causa di eutrofizzazione o del rilascio di sostanze tossiche. L'inquinamento può avere un impatto particolarmente grave nei piccoli corsi d'acqua, soprattutto nei periodi di portata ridotta durante l'estate. Il declino della popolazione nel fiume Isonzo si ritiene sia stato almeno in parte causato dalla competizione con la specie alloctona Naso (Chondrostoma nasus), introdotta negli anni '50 per scopi di pesca sportiva. Altre specie ittiche alloctone stabilitesi nell'areale di questa specie includono: Pesce persico sole (*Lepomis gibbosus*), Persico trota (*Micropterus salmoides*), Persico reale (*Perca fluviatilis*), Abramide comune (*Abramis brama*), Rutilo (*Rutilus rutilus*), Barbo comune (*Barbus barbus*), Carassio dorato (Pesce rosso) (*Carassius auratus*), Carassio comune (*Carassius carassius*), Carpa comune (varietà domestica) (*Cyprinus carpio*), Carpa erbivora (*Ctenopharyngodon idella*), Gobione bocca grande (*Pseudorasbora parva*), Pesce gatto nero (*Ameiurus melas*), Siluro (*Silurus glanis*), Trota fario (*Salmo trutta*), Trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Tutte queste specie sono considerate invasive e possono esercitare forti pressioni negative sulla fauna ittica autoctona attraverso competizione, predazione, degrado dell'habitat o trasmissione di parassiti. In alcune parti del bacino del fiume Po, le comunità ittiche native sono state completamente rimpiazzate da quelle alloctone. Inoltre, si ritiene che la predazione da parte di uccelli ittiofagi in forte espansione, in particolare il Cormorano comune (*Phalacrocorax carbo*), rappresenti una minaccia significativa nel bacino del Po. L'impatto negativo di queste minacce potrebbe essere aggravato dal rapido cambiamento climatico nella regione adriatica settentrionale, che sta già causando prolungati periodi di siccità.

Durante l'estate del 2022, una grave siccità in Slovenia ha portato al prosciugamento di alcuni corsi d'acqua in cui questa specie era stata introdotta nell'ambito di un progetto di conservazione. Di conseguenza, numerosi individui sono stati trasferiti manualmente in habitat perenni situati più a valle.[3]

Questa specie è elencata (come *Chondrostoma genei*) nell'Appendice III della Convenzione di Berna e nell'Allegato II della Direttiva Habitat dell'Unione Europea. È stata valutata come In pericolo (Endangered) nell'ultima edizione della Lista Rossa dei Vertebrati Italiani (2022)[4]. È presente all'interno dei confini di diverse aree protette, alcune delle quali fanno parte della rete europea Natura 2000. Questa specie è stata tra i pesci autoctoni oggetto del progetto LIFE "CON.FLU.PO." (LIFE11 NAT/IT/000188), cofinanziato dall'Unione Europea, il cui obiettivo era il ripristino della connettività fluviale in un tratto del sistema del fiume Po [5]. Il progetto si è svolto tra il 2012 e il 2017 e ha previsto una serie di azioni, tra cui l'installazione di un passaggio per pesci che consentisse il superamento di una grande barriera artificiale situata sul corso principale del Po nei pressi della città di Piacenza. Sono stati sviluppati metodi di riproduzione ex situ e reintroduzione per diverse specie, tra cui il Vairone meridionale, e questi sforzi erano ancora in corso nel 2023. È probabile che abbia tratto beneficio anche dal progetto LIFE "LifeTicinoBiosource" (LIFE15 NAT/IT/000989), svoltosi nel bacino del fiume Ticino all'interno del sistema del Po tra il 2016 e il 2021. Le attività di conservazione principali hanno riguardato il miglioramento e il ripristino degli habitat fluviali a favore di diverse specie, tra cui pesci, anfibi, uccelli e insetti. Questa specie è stata inoltre uno degli obiettivi del progetto LIFE "Saving Lasca" (LIFE20 NAT/SI/000644), una collaborazione internazionale svoltasi tra il 2017 e il 2022. Nell'ambito di questo progetto, è stato istituito un nucleo riproduttivo ex situ utilizzando individui provenienti dall'Italia. Inoltre, più di 130.000 individui allevati in cattività sono stati introdotti nei tributari del fiume Vipava, un sito Natura 2000 e affluente di sinistra del basso corso del fiume Soča (Isonzo) in Slovenia, da cui la sottopopolazione autoctona era stata estirpata negli anni 2000. Nel 2020, giovani individui sono stati osservati in due siti del sistema del Vipava, indicando che era avvenuta una riproduzione naturale. Ulteriori sforzi di conservazione hanno incluso la rimozione degli individui di Naso comune dal fiume Vipava, oltre a una vasta serie di attività di sensibilizzazione rivolte ai principali portatori d'interesse, in particolare la comunità di pescatori e i giovani. È stato inoltre elaborato un piano d'azione per la gestione a lungo termine del sito del fiume Vipava, che include una serie di misure per migliorare l'estensione e la qualità dell'habitat, oltre alla continuazione degli sforzi di riproduzione ex situ e reintroduzione. Nel 2022, è stato istituito un nuovo sito Natura 2000 per proteggere quella che potrebbe essere l'ultima sottopopolazione naturale relativamente ampia e ben strutturata presente nella parte italiana del sistema del fiume Soča. Da allora, sono state avviate azioni

[3] **Lorenzoni, M., Esposito, M., Carosi, A., Pedicillo, G., & Pompei, L.** (2018). "Freshwater fish and habitat conservation in Central Italy: The role of habitat fragmentation in the decline of native species." *Ecological Indicators*, **91**, 112-121.
[4] **Rondinini, C., Battistoni, A., Peronace, V., & Teofili, C.** (Eds.). (2022). *Lista Rossa IUCN dei Vertebrati Italiani*. Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica.
[5] **LIFE CON.FLU.PO.** (2017). *Final Report – Conservation and Restoration of River Connectivity in the Po Basin (LIFE11 NAT/IT/000188)*. Available at: www.conflupo.eu

per rimuovere fisicamente gli individui di Naso comune da questo sito. Nell'Italia centrale, nei primi anni 2020 è stato avviato un progetto pilota di traslocazione di individui provenienti da fiumi appartenenti al suo areale non autoctono, per reintrodurli nel fiume Esino, situato nella parte meridionale del suo areale naturale. Alcuni individui sono stati inoltre trasportati nell'Italia settentrionale per essere utilizzati nella produzione di stock per il progetto LIFE "Saving Lasca" [6]. Altri progetti LIFE realizzati nell'Italia settentrionale che potrebbero aver favorito questa specie includono LIFE "Taro" (LIFE98 NAT/IT/005138) e LIFE "Sorba" (LIFE09 NAT/IT/000213), mentre essa è attualmente inclusa nel progetto LIFE "Minnow" (LIFE21 NAT/IT/101074559, 2022-2027), che mira a ripristinare la connettività fluviale nei corsi d'acqua della regione Piemonte.

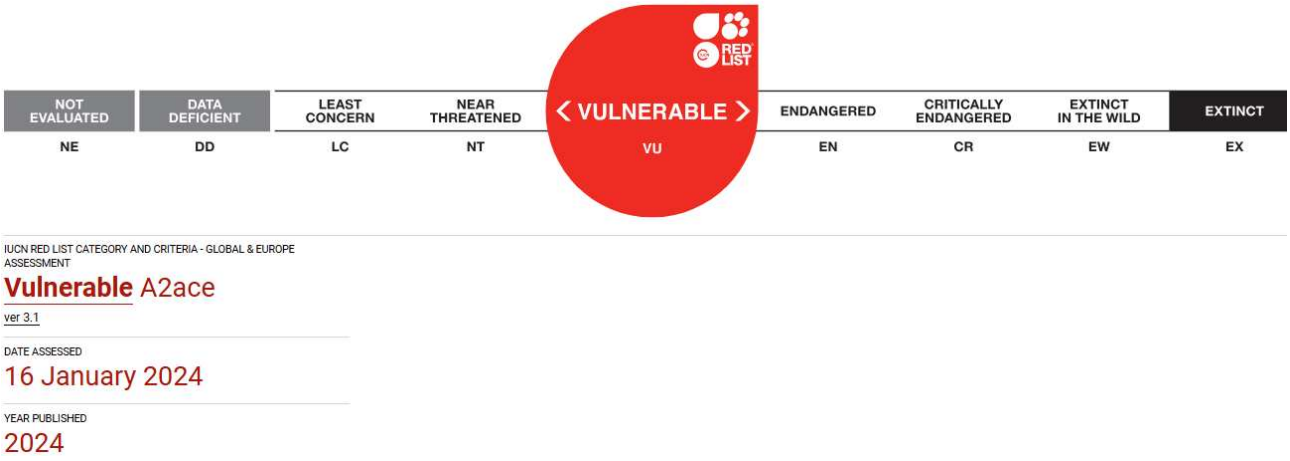

Figura 3 Categoria della lista rossa dell'IUCN a cui appartiene Protochondrostoma genei

[6] **LIFE Saving Lasca** (2022). *Final Report – Conservation Actions for Lasca (Protochondrostoma genei) in the Soča Basin (LIFE20 NAT/SI/000644)*. Available at: www.savinglasca.eu

1.2.1 Progetto Life Minnow

I campioni adoperati in questo studio fanno parte del progetto Life Minnow. L'iniziativa è intitolata "Piccoli pesci, piccoli corsi d'acqua, grandi sfide: la conservazione delle specie minacciate negli affluenti dell'Alto Po" (LIFE21-NAT-IT-LIFE Minnow) è un piano finanziato dal programma dell'Unione Europea Life Natura 2021–2027 e coordinato dal dipartimento DBios dell'Università di Torino, a cui collabora, insieme all'Ente di gestione delle Aree protette del Po piemontese, un ampio partenariato: Istituto Delta Ecologia Applicata, Città Metropolitana di Torino, Politecnico di Torino, Provincia di Cuneo, Provincia di Vercelli e Provincia di Alessandria. Come cofinanziatori ci sono la Regione Piemonte e IREN. Inoltre si promuove la partecipazione di vari stakeholder della comunità locale, tra cui pescatori, studenti e cittadini, ampliando la rete di volontari coinvolti nell'azione di conservazione di tali specie al fine di creare uno spazio di dialogo e collaborazione tra i vari enti partecipanti e la comunità stessa. Il termine "minnow" si riferisce a diverse specie di piccoli pesci d'acqua dolce, le cui popolazioni sono minacciate da molteplici fattori, tra cui il cambiamento climatico, la competizione con specie aliene, le alterazioni degli habitat e le modifiche morfologiche dei corsi d'acqua. Il progetto mira a intervenire nel bacino secondario dell'Alto Po per contrastare il declino di sei specie ittiche protette dalla Direttiva Habitat dell'Unione Europea. Questi pesci, sebbene poco conosciuti, rappresentano una componente essenziale della biodiversità del bacino padano e si trovano attualmente in una situazione critica: la Lampreda padana (*Lampreta zanandreai*), la Lasca (*Protochondrostoma genei*), la Savetta (*Chondrostoma soetta*), il Cobite mascherato (*Sabanejewia larvata*), il Vairone (*Telestes muticellus*) e lo Scazzone (*Cottus gobio*). Ad oggi *T. muticellus* e *C. gobio* sono stati classificati con uno stato di conservazione Least Concern, *L. zanandrea*i come Near Threatened (prossima alla minaccia), *C. soetta* Critically Endangered (in pericolo critico), *S. larvata* e *P. genei* come Vulnerable (vulnerabile). Pur non avendo rilevanza commerciale, questi pesci svolgono un ruolo fondamentale nella rete trofica del sistema fluviale del Po. [7]

Figura 4 Categorie della lista rossa IUCN

Il progetto si prefissa l'obiettivo di implementare azioni mirate al fine di contrastare i principali fattori di minaccia per le specie. Tra queste azioni si identificano il ripristino della connettività di 21 corpi idrici tramite la rimozione di 17 barriere, al fine di consentire il passaggio dei pesci, il ripopolamento delle sei specie sopra citate in corsi d'acqua ove sono poco numerose o estinte, e la lotta alle specie aliene che non appartengono alla comunità ittica del Po, ad esempio il siluro. Allo stesso tempo l'iniziativa si pone il fine di avviare una nuova filiera della mangimistica, grazie al recupero e riutilizzo della biomassa raccolta dalle catture degli alloctoni, effettuato da un'azienda del territorio.

[7] **The IUCN Red List of Threatened Species** https://www.iucnredlist.org/

1.3 DNA mitocondriale

Il DNA mitocondriale (mtDNA) è una molecola circolare di DNA situata esclusivamente nei mitocondri, organelli cellulari responsabili della produzione di energia. Ogni cellula eucariotica può contenerne tra 1000 e 10.000 copie.

Si ritiene che il mtDNA abbia un'origine evolutiva distinta rispetto al DNA nucleare, secondo la teoria endosimbiotica[8]. Questa ipotesi suggerisce che una cellula eucariotica ancestrale abbia inglobato batteri simbiotici capaci di respirazione aerobica. Alcuni di questi batteri, invece di essere digeriti, si adattarono a vivere all'interno della cellula ospite traendo vantaggio dall'ambiente protetto e ricco di nutrienti. Con il passare del tempo, queste condizioni favorirono la completa dipendenza dei batteri dalla cellula ospite e simmetricamente la cellula trasse vantaggio da questa relazione, ottenendo energia attraverso i processi di produzione di ATP associati alla respirazione. Questa mutua dipendenza rappresentò un importante vantaggio evolutivo. La presenza di DNA nei mitocondri fu ipotizzata per la prima volta nel 1956 da Chèvremont attraverso studi citochimici, mentre nel 1963 venne definitivamente confermata con tecniche biochimiche e ultrastrutturali. Da allora, il mtDNA è stato oggetto di numerosi studi per comprenderne la sequenza, l'organizzazione e i meccanismi di espressione.

Il DNA mitocondriale (mtDNA) si distingue dal DNA nucleare per struttura ed ereditarietà. Nei vertebrati, è una piccola molecola circolare a doppia elica di circa 16.500 bp, priva di istoni e non organizzata in cromosomi. Contiene 37 geni, di cui 13 codificano per proteine della catena respiratoria e 24 sono coinvolti nella traduzione mitocondriale (2 rRNA e 22 tRNA). La sua organizzazione è compatta e priva di introni, con sequenze interamente codificanti, a eccezione di un breve segmento vicino all'origine di replicazione. Il mtDNA è aploide e viene ereditato esclusivamente per via materna. I mitocondri dello zigote derivano interamente dalla cellula uovo, mentre quelli paterni, situati nella coda dello spermatozoo, non entrano nell'ovulo o vengono rapidamente eliminati dopo la fecondazione. Di conseguenza, solo le madri trasmettono il mtDNA ai figli, ma solo le figlie lo trasmettono alle generazioni successive.Infine, la replicazione del mtDNA avviene indipendentemente da quella del DNA nucleare, in un compartimento e in un momento distinti, ciò comporta una variazione nella trasmissione del patrimonio mitocondriale tra le cellule durante il processo di mitosi.

Nonostante il DNA mitocondriale (mtDNA) sia altamente conservato in termini di struttura, dimensioni e organizzazione, presenta una notevole variabilità nella sequenza nucleotidica. Il suo tasso di evoluzione è stimato essere 10-20 volte più veloce rispetto ai geni nucleari a singola copia[9], a causa della minor efficienza nei meccanismi di riparazione, all'elevato numero di replicazioni, all'assenza di istoni e alla prossimità alla membrana mitocondriale

[8] **Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F.** (1999). Mitochondrial evolution. *Science, 283*(5407), 1476-1481. https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1476

[9] **Wallace, D. C., Garrison, K., & Knowler, W. C**. (1987). *Maternal inheritance of mitochondrial DNA in humans*. Human Genetics, 77(2), 220-228. https://doi.org/10.1007/BF00292340

interna. Inoltre, essendo coinvolto nella fosforilazione ossidativa, è più esposto ai radicali liberi dell'ossigeno, che aumentano il rischio di mutazioni[10]. L'evoluzione dei geni mitocondriali varia a seconda della regione, per i geni per RNA ribosomiale sono altamente conservati, ideali per studi filogenetici su taxa superiori, mentre la regione di controllo contenente il displacement loop (D-loop), non codificante e priva di pressione selettiva, è altamente variabile e utilizzata negli studi di genetica di popolazione. Il genoma mitocondriale di un individuo è comunemente definito come aplotipo mitocondriale. I polimorfismi del mtDNA, derivanti da mutazioni, conducono alla formazione di diversi aplotipi, che rappresentano varianti specifiche del genoma mitocondriale e vengono utilizzati per caratterizzare e tracciare le relazioni evolutive e filogenetiche tra individui e popolazioni.

Nel presente studio, per analizzare le differenze genetiche tra popolazioni, è stata utilizzata la regione di controllo del mtDNA, in particolare il displacement loop (D-loop) presente nella regione di controllo del mtDNA. Questa regione svolge un ruolo fondamentale nella replicazione del mtDNA, fungendo da sito di innesco per la sintesi del nuovo filamento. Grazie alla sua alta variabilità, il D-loop rappresenta un marcatore ideale per confronti genetici tra specie e popolazioni, permettendo di evidenziare le differenze evolutive in modo efficace.

[10] **Richter, C., Park, J. W., & Ames, B. N**. (1988). *Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 85*(17), 6465-6467. https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465

2 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è quello di valutare la diversità genetica delle popolazioni di Lasca (*Protochondrostoma genei*) nel bacino dell'Alto Po, al fine di definire delle unità conservazionistiche per la preservazione e la gestione della specie. Il presente studio si concentra sull'analisi delle popolazioni presenti nei diversi affluenti del fiume Po su scala geografica ridotta. Questa tesi ha di per sé l'obiettivo di contribuire al progetto Life Minnow. Considerando che il progetto prevede possibili azioni di ripopolamento, è essenziale non solo valutare la compatibilità tra le caratteristiche ecologiche della specie e l'ambiente di reintroduzione, ma anche analizzarne le caratteristiche genetiche. Riconoscere le unità di conservazione è vitale per assicurare una gestione efficace e la salvaguardia delle specie minacciate, andando a garantire che eventuali provvedimenti di ripopolamento siano ponderati su considerazioni genetiche ed ecologiche al fine di limitare il rischio di perdita di variabilità e preservando la diversità genetica entro e tra le popolazioni.

3 MATERIALE E METODI

3.1 Campioni analizzati

Per il presente lavoro sono stati analizzati 135 campioni di tessuto prelevati da altrettanti esemplari di *Protochondrostoma genei*. Gli individui sono stati prelevati da operatori specializzati tra febbraio 2023 e gennaio 2024 da sei siti differenti: fiume Orba (località Bormida), ramo laterale sinistro del Po (località Fontanetto Po), Torrente Chisola, Scolmatore canale Cavour (località Valle case Cascinotti), Torrente Scrivia (località Valle ponte ferrovia Tortona), e torrente Valla (località Guado Olandesi a Squaneto).

Specie	Popolazione	Nr. Individui	Corso d'acqua	Località	Data
Protochondrostoma genei	Pop 1	30	Orba	Bormida	02/04/2023
Protochondrostoma genei	Pop 2	3	Ramo laterale PO	Fontanetto Po	10/03/2023
Protochondrostoma genei	Pop 3	30	Torrente Chisola	N.D.	26/06/2023
Protochondrostoma genei	Pop 4	22	Scolmatore canale Cavour	Valle case Cascinotti	09/06/2023
Protochondrostoma genei	Pop 5	25	Torrente Scrivia	Valle ponte ferrovia Tortona	24/11/2023
Protochondrostoma genei	Pop 6	25	Torrente Valla	Guado Olandesi a Squaneto	09/01/2024

Tabella 1 Nella tabella soprastante vengono riportati il nome della specie, il numero identificativo di ogni popolazione, il numero totale di campioni a disposizione per ogni singola popolazione, il corso d'acqua, la località e la data del campionamento

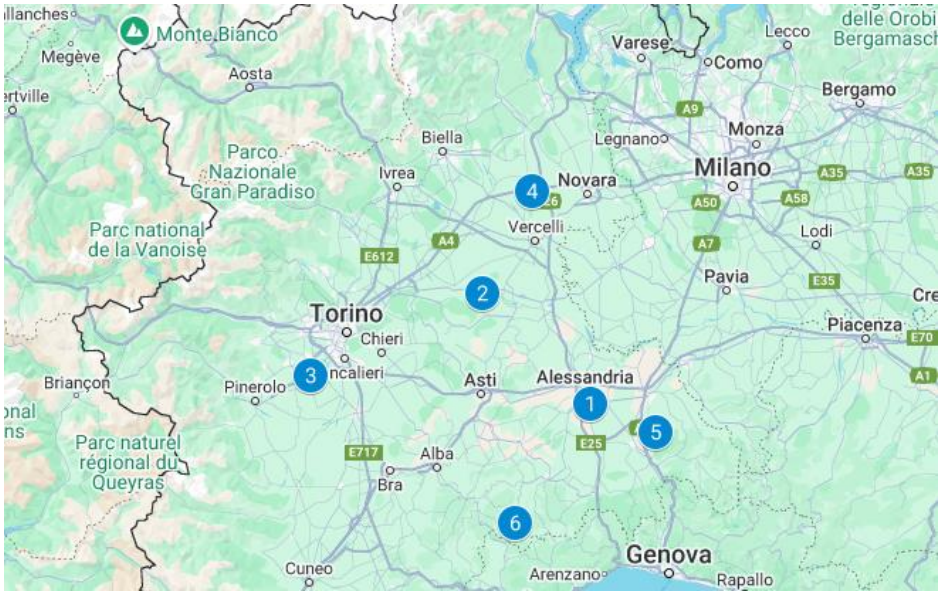

Figura 5 Evidenziati i 6 siti di campionamento di *Protochondrostoma genei*. Ogni numero fa riferimento alla popolazione corrispondente

3.2 Procedura di campionamento

Gli individui utilizzati per questo studio sono stati campionati utilizzando il metodo della pesca elettrica. Questa procedura prevedere l'utilizzo di un elettrostorditore, formato da un generatore di corrente elettrica a cui sono collegati due cavi: un anodo ed un catodo. Quando gli elettrodi vengono posti in acqua, i pesci sono attirati dalla corrente elettrica e cominciano a nuotare verso il polo positivo. Per l'effetto galvanonarcosi i pesci sufficientemente vicini all'elettrodo si immobilizzano in quanto le loro contrazioni muscolari, a causa della corrente, diventano tetaniche. Lo stordimento è solo momentaneo, garantito dal fatto che la corrente è continua o ad impulsi e mai alternata causandone altrimenti la morte, per permettere agli operatori con un retino di poter raccogliere gli individui e porli in delle vasche con un sedativo. A questo punto vengono prelevati dei campioni, solitamente piccoli pezzi di pinna, per poi rilasciare gli animali nel loro ambiente. Gli animali non subiscono nessun tipo di danno irreversibile o deleterio per la loro sopravvivenza. I campioni così ottenuti di *Protochondrostoma genei* sono stati conservati in provette eppendorf, contenenti etanolo puro, mantenute all'interno di freezer a -20 °C, rigorosamente etichettate per consentire l'identificazione univoca dell'individuo.

Figura 6,7,8 Foto della procedura di campionamento e di alcuni esemplari di pesce pescati

3.3 Estrazione del DNA genomico

Il DNA è stato estratto utilizzando il DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN), seguendo il protocollo "Quick-Start Protocol' per i tessuti. Questa metodologia permette l'adsorbimento selettivo del DNA sulla membrana DNeasy in silice, garantendo la rimozione efficace di contaminanti e inibitori enzimatici. Per ogni campione è stato prelevato un pezzetto di circa 30 mg di tessuto con strumenti sterili, asciugato con carta assorbente per tamponare l'etanolo e trasferito in una provetta da 1,5 mL, etichettata con il codice identificativo. Successivamente, sono stati aggiunti 180 µL di Buffer ATL, un buffer di lisi tissutale, e 20 µL di proteinasi K, la quale degrada le proteine contaminanti. Dopo agitazione tramite vortex, le provette sono state incubate a 56 °C per 1 ora in un termoblocco con agitazione (ThermoMixer F2.0, Eppendorf®), risospendendo il contenuto ogni 30 minuti. In seguito, ogni campione è stato trattato con 200 µL di Buffer AL e 20 µL di RNasi, per eliminare l'RNA, e agitato tramite vortex per poi essere incubato nuovamente a 56 °C per 10 minuti. Sono stati poi aggiunti 200 µL di etanolo (96-100%) e la miscela è stata trasferita in colonnine da centrifuga con una membrana in silice inserita all'interno della corrispondente provetta di raccolta. Per permettere agli acidi nucleici il passaggio e il legame con le particelle della membrana, le provette sono state centrifugate a 8000 rpm per 1 minuto. I residui presenti nella provetta sono stati rimossi e la colonnina è stata riposta nel tubo di raccolta. A questa vengono addizionati per il lavaggio 500 µL di Buffer AW1, seguita da centrifugazione a 8000 rpm per 1 minuto e in seguito vengono eliminati gli scarti presenti. Nella colonnina, riposta una seconda volta nel tubo di raccolta, si addizionano 500 µL di Buffer AW2, seguita da centrifugazione a 14000 rpm per 3 minuti. Infine, le colonnine sono state trasferite in nuove provette da 1,5 mL e il DNA è stato eluito con 100 µL di Buffer AE, che ne favorisce il distacco dalla membrana. L'eluizione è stata ripetuta tre volte, intervallata da centrifugazioni a 8000 rpm per 1 minuto.

Il DNA estratto è stato analizzato tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1% in buffer TBE 1X con GelRed (Biotium®), per verificare la riuscita dell'estrazione. Per la quantificazione è stato utilizzato lo spettrofotometro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific™), il cui funzionamento è basato sulla legge di Lambert-Beer, che correla l'assorbimento della luce con la concentrazione di una sostanza. Con l'uso di 1 µL di campione, lo strumento ha permesso di determinare sia la quantità che la qualità del DNA estratto. Queste informazioni, insieme alla valutazione delle bande osservate nella corsa elettroforetica, sono state fondamentali per determinare la giusta diluizione da fare dei campioni per la successiva amplificazione di questi. I campioni sono stati portati tutti alla stessa concentrazione di 20µL/mL.

3.4 D-loop mitocondriale e analisi dati

In questo studio è stato preso in considerazione il D-loop (Displacement loop), la regione ipervariabile di controllo della replicazione, presente nel genoma mitocondriale. Per test precedenti sono stati creati dei primer ottenuti allineando delle sequenze di ciprinidi che sono stati utilizzati anche per questo studio. Le sequenze sono dunque:

Tipologia	Nome	Sequenza
Primer Forward	CR_CIPR_ProF	5' - CTCTCACCCCTGGCTCCCAAAG - 3'
Primer Reverse	CR_CIPR_ProF	5' - TAGGACTCATCTTAGCATCTTCAGTGC - 3'

L'amplificazione è avvenuta mediante PCR, utilizzando i termociclatori SimpliAmp Thermal Cycler Applied Biosystem. Per ogni reazione sono stati impiegati 2µL di DNA concentrato a 20ng/µL, amplificato in 20µL di volume totale partendo dalle seguenti concentrazioni standard:

• 12,7µL di acqua deionizzata;

• 2µL di Buffer 10X

• 1,2µL di MgCl2 concentrato 25mM;

• 1µL di dNTPs 2µM;

• 0,5µL di Primer Forward 10µM;

• 0,5µL di Primer Reverse 10µM;

• 0,1µL di BioThermTMTaq DNA Polymerase a 5 units/ µL

È stato usato il seguente profilo termico:

Inizializzazione	95°	3'	
Denaturazione	95°	30''	
Annealing	55°	30''	x 34 cicli
Estensione	72°	1'	
Terminazione	72°	5'	

Al fine di valutare l'efficacia dell'amplificazione, per tutti i prodotti di PCR è stata eseguita un'elettroforesi su gel di agarosio all'1,8% in tampone TBE 1X, utilizzando GelRed (Biotium®) come agente intercalante. I campioni sono stati purificati con EuroSAP PCR Enzymatic Clean-up kit (EUROCLONE SpA), progettato per rimuovere primer e nucleotidi in eccesso dai prodotti PCR, preparando il DNA per il sequenziamento. Il protocollo prevede l'uso di esonucleasi 1 (Exo1), che degrada i primer a filamento singolo, e della fosfatasi alcalina (SAP), che defosforila i dNTPs in eccesso.

Per ogni campione, 5 µL di prodotto PCR sono stati trasferiti in una nuova microprovetta, aggiungendo 1 µL di SAP e 1 µL di Exo1. Dopo incubazione a 37°C per 5 minuti, gli enzimi sono stati inattivati a 80°C per 10 minuti. I campioni purificati sono stati inviati a Eurofins Genomics per il sequenziamento Sanger. Le sequenze ottenute sono state allineate e verificate manualmente con l'algoritmo MUSCLE nel software MEGA11[11] e, attraverso la visualizzazione dei singoli cromatogrammi, le basi incerte riportate come "N" sono state corrette manualmente, inoltre le regioni iniziali e finali sono state eliminate, in quanto risultanti poco affidabili a causa di possibili errori di lettura da parte dei sequenziatori. Le sequenze ottenute presentano una lunghezza di 812 bp.

Per analizzare la diversità genetica e la struttura della popolazione, i dati sono stati elaborati con PopART[12] che costruisce reti aplotipiche. L'analisi dei network aplotipici è utile per identificare sottogruppi all'interno di una popolazione, esaminare le connessioni tra popolazioni diverse e ricostruire la storia evolutiva di una specifica area geografica

Grazie a questa metodologia, è possibile ottenere una visione più dettagliata della diversità genetica e delle dinamiche evolutive delle popolazioni in esame.

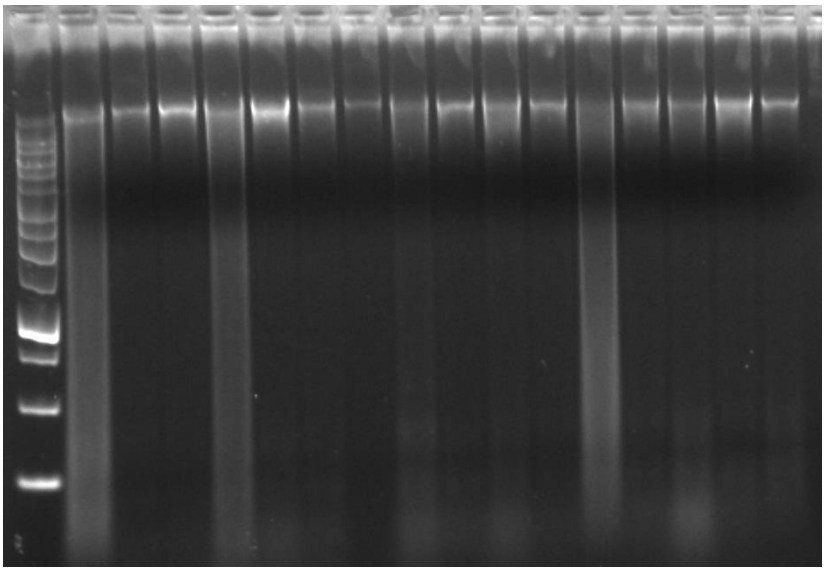

Figura 9 Foto elettroforesi su gel di agarosio 1% dei prodotti di estrazione del DNA di 16 individui di Protochondrostoma genei. In ordine da sx il marcatore di peso molecolare a seguire gli individui da LAS/23/112 a LAS/23/127

[11] **Molecular Evolutionary Genetics Analysis**, Nei et al., 1993
[12] **Population Analysis with Reticulate Trees**, Leigh et al. 2015

4 Risultati e discussione

4.1 Analisi DNA mitocondriale

Mediante l'impiego della coppia di primer CR_CIPR_ProF e CR_CIPR_PheR, progettati sulle regioni che codificano per gli RNA transfer della Prolina e della Fenilalanina, è stato possibile amplificare l'intera regione del D-loop da 135 individui. Di questi 135, 37 non sono risultati amplificati correttamente andando anche a perdere i tre individui appartenenti alla popolazione 2 (vedi tabella 1).

I restanti 98 campioni amplificati sono stati purificati e sottoposti a sequenziamento Sanger presso la Eurofins Genomics. I dati acquisiti sono stati analizzati tramite l'utilizzo del software MEGA11. Delle 98 sequenze analizzate, 8 sono state scartate in quanto risultavano troppo "sporche" e quindi illeggibili e inutilizzabili.

È stato possibile riconoscere 29 aplotipi distinti. Di questi, 12 sono unici e compaiono una sola volta nell'intero allineamento mentre i restanti 17 sono condivisi da più individui.

4.2 Network di aplotipi

Le sequenze genetiche sono state analizzate con il software PopART per generare il network di aplotipi, una rappresentazione grafica delle relazioni evolutive tra diverse varianti genetiche. Questi network vengono utilizzati per visualizzare la struttura delle popolazioni e le connessioni tra aplotipi mitocondriali o nucleari (in questo caso mitocondriali), mostrando come si siano evoluti e correlati nel tempo.

A ciascuna popolazione è stato assegnato un colore distintivo, permettendo così di individuare con maggiore facilità gruppi di aplotipi appartenenti allo stesso sito di campionamento. Ogni aplotipo è rappresentato da un cerchio, la cui dimensione è proporzionale al numero di individui che condividono quella particolare variante genetica nel campione analizzato. Le mutazioni tra gli aplotipi sono indicate da linee di connessione, mentre i nodi intermedi rappresentano aplotipi ipotetici, non direttamente osservati nel campione, ma ricostruiti dal software come passaggi evolutivi tra due varianti esistenti.

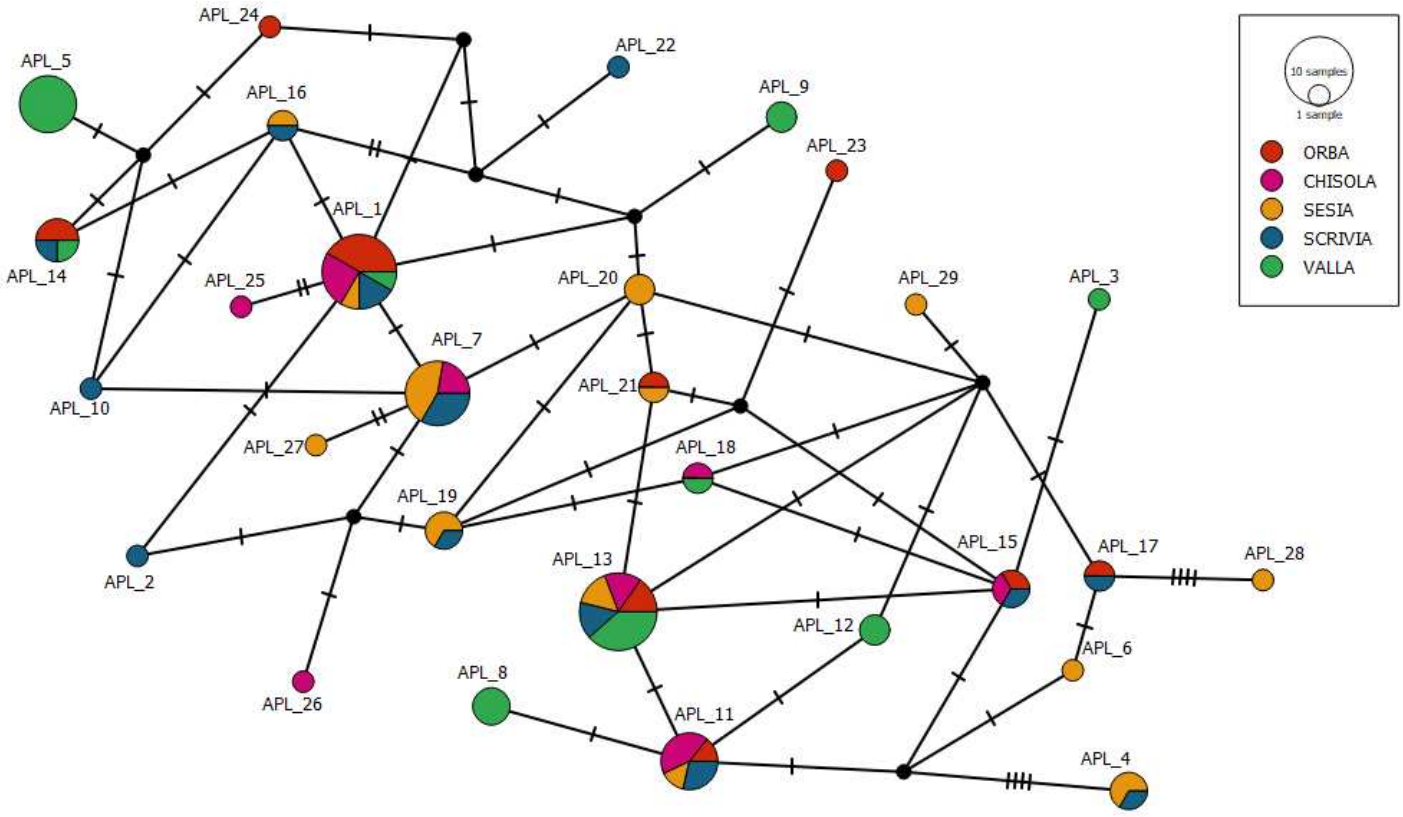

Figura 10 Network degli aplotipi analizzati

Osservando gli aplotipi e tenendo conto dei siti di campionamento si nota come non sia possibile evidenziare dei pattern di differenziamento che possano essere attribuiti a differenziamento tra i diversi siti di campionamento. In particolare si può notare che gli aplotipi più frequenti tendono ad essere riscontrati in tutte le popolazioni. Altri aplotipi, detti "privati" che sono stati cioè trovati solo in una popolazione, probabilmente con un aumento dello sforzo di campionamento mostrerebbero una maggior diffusione geografica. Dal punto di vista gestionale, sulla base dei soli dati mitocondriali non si riescono a distinguere delle unità conservazionistiche differenti e non è possibile quindi evidenziare pattern di differenziamento che vincolino l'eventuale trasferimento di animali. Questo è stato riscontrato anche nello studio di genetica di popolazione di Vairone (*Telestes muticellus*) del bacino dell'alto Po, dove a livello mitocondriale non era stata identificata una particolare suddivisione se non per una popolazione nettamente distinta, da cui ci si aspettava tale risultato per la sua distanza idrogeologica e geografica. Va detto tuttavia che l'informazione mitocondriale, per la sua eredità matrilineare non è in grado di tracciare eventuali isolamenti riproduttivi recenti, che sarebbero meglio analizzabili da marcatori nucleari ad eredità biparentale, come gli SNP o i microsatelliti. Per questo studio sarebbe quindi utile effettuare ulteriori analisi considerando dei marcatori alternativi che possono offrire un quadro più dettagliato dei pattern di differenziamento recente

5 Conclusioni

Per questa tesi è stato condotto uno studio sulla variabilità genetica di un campione di 135 individui di *Protochondrostoma genei* prelevati da 6 siti di campionamento provenienti dal bacino dell'alto Po. L'obiettivo primario è stato quello di determinare, studiandone la struttura genetica, se gli individui esaminati potessero essere considerati geneticamente omogenei e trattabili quindi come singola unità conservazionistica o se al contrario mostrassero differenze tali da dover trattare le diverse popolazioni come entità separate ai fini di futuri interventi conservazionistici. Lo studio ha previsto come tipologia di marcatore molecolare l'utilizzo del DNA mitocondriale. Dai risultati delle analisi mitocondriali non è stata riscontrata nessuna significativa differenza tra le varie popolazioni campionate, il che ci porta a considerare, dal punto di vista gestionale, tali individui come una singola unità conservazionistica. Tuttavia, sarebbe auspicabile condurre ulteriori analisi andando ad utilizzare un diverso tipo di marcatore molecolare, magari nucleare, o ulteriori tecniche su un campione maggiore di individui per avere un quadro più dettagliato sulla struttura genetica delle popolazioni di *Protochondrostoma genei*.

6 Bibliografia

Fricke, R., Eschmeyer, W. N., & Van der Laan, R. (Eds.). (2024). *Eschmeyer's Catalog of Fishes: genera, species, references*.

Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science, 283*(5407), 1476–1481. https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1476

LIFE CON.FLU.PO. (2017). *Final Report – Conservation and Restoration of River Connectivity in the Po Basin (LIFE11 NAT/IT/000188)*. Available at: www.conflupo.eu

LIFE Saving Lasca. (2022). *Final Report – Conservation Actions for Lasca (Protochondrostoma genei) in the Soča Basin (LIFE20 NAT/SI/000644)*. Available at: www.savinglasca.eu

Lorenzoni, M., Esposito, M., Carosi, A., Pedicillo, G., & Pompei, L. (2018). Freshwater fish and habitat conservation in Central Italy: The role of habitat fragmentation in the decline of native species. *Ecological Indicators, 91*, 112–121.

Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Nei, M., et al. (1993).

Population Analysis with Reticulate Trees, Leigh, J. W., et al. (2015).

Richter, C., Park, J. W., & Ames, B. N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 85*(17), 6465–6467. https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465

Rondinini, C., Battistoni, A., Peronace, V., & Teofili, C. (Eds.). (2022). *Lista Rossa IUCN dei Vertebrati Italiani*. Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica.

Tedesco, P. A., Beauchard, O., Bigorne, R., et al. (2017). A global database on freshwater fish species occurrence in drainage basins. *Scientific Data, 4*, 170141.

The IUCN Red List of Threatened Species. https://www.iucnredlist.org/

Wallace, D. C., Garrison, K., & Knowler, W. C. (1987). Maternal inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Human Genetics, 77*(2), 220–228. https://doi.org/10.1007/BF00292340

Apl 1	LAS_133
	LAS_104
	LAS_110
	LAS-23-082
	LAS-23-063
	LAS-23-059
	LAS-23-055
	LAS-23-029
	LAS-23-028
	LAS-23-019
	LAS-23-012
	LAS-23-007
Apl 2	LAS_088
Apl 3	LAS_121
Apl 4	LAS_093
	LAS_094
	LAS_107
Apl 5	LAS_111
	LAS_113
	LAS_116
	LAS_117
	LAS_118
	LAS_123
	LAS_131
Apl 6	LAS_095
Apl 7	LAS_090
	LAS_099
	LAS_102
	LAS_103
	LAS-23-085
	LAS-23-084
	LAS-23-073
	LAS-23-053
	LAS-23-051
Apl 8	LAS_124
	LAS_134
	LAS_135
Apl 9	LAS_120
	LAS_127
Apl 10	LAS_105

Apl 11	LAS_100
	LAS_108
	LAS-23-075
	LAS-23-057
	LAS-23-054
	LAS-23-045
	LAS-23-022
Apl 12	LAS_125
	LAS_132
Apl 13	LAS_089
	LAS_097
	LAS_119
	LAS_122
	LAS_126
	LAS_129
	LAS_130
	LAS-23-079
	LAS-23-072
	LAS-23-060
	LAS-23-050
	LAS-23-025
	LAS-23-010
Apl 14	LAS_096
	LAS_112
	LAS-23-017
	LAS-23-005
Apl 15	LAS_106
	LAS-23-061
	LAS-23-003
Apl 16	LAS_086
	LAS-23-076
Apl 17	LAS_101
	LAS-23-004
Apl 18	LAS_128
	LAS-23-049
Apl 19	LAS_087
	LAS-23-077
	LAS-23-068
Apl 20	LAS-23-078
	LAS-23-067

Apl 21	LAS-23-064
	LAS-23-027
Apl 22	LAS_098
Apl 23	LAS_002
Apl 24	LAS_011
Apl 25	LAS_036
Apl 26	LAS_041
Apl 27	LAS_065
Apl 28	LAS_066
Apl 29	LAS_074

Tabella 2,3,4 Aplotipi con i loro corrispettivi individui