



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

TESI DI LAUREA IN SCIENZE FORESTALI E AMBIENTALI

VARIABILITÀ E DIFFERENZIAMENTO GENETICO IN POPOLAZIONI DI RANA TEMPORARIA
DELLA REGIONE ALPINA DEL TRENINO: DISTRIBUZIONE SPAZIALE E CORRELAZIONE CON
ALCUNI PARAMETRI AMBIENTALI

Relatore:

Prof./Dott. Andrea Battisti

Correlatore:

Dott. Cristiano Vernesi

Laureando:

Alexis Marchesini

Matricola n. 566492

ANNO ACCADEMICO 2010- 2011

“Consideriamo l’insieme di tutte le rane possibili, ciascuna dotata di un genotipo differente. Collochiamo ogni rana in uno spazio genotipico multidimensionale, ciascuno prossimo a tutti i genotipi che differiscono da esso di un’unica mutazione. Immaginiamo che voi possiate misurare la fitness di ogni rana e illustriamo su un grafico la fitness sotto forma di altezza sopra quella posizione nello spazio genotipico. Le altezze risultanti formeranno un paesaggio di fitness sullo spazio genotipico, simile in questo alle Alpi che formano un paesaggio montuoso su una parte dell’Europa”

(da *“Esplorazioni evolutive”* - Stuart Kauffman)

“Yet I also appreciate that we cannot win this battle to save species and environments without forging an emotional bond between ourselves and nature as well — for we will not fight to save what we do not love (but only appreciate in some abstract sense)... We really must make room for nature in our hearts”

(da *“Eight Little Piggies”* - S.J. Gould)

INDICE

RIASSUNTO-ABSTRACT	pag. 7
1. INTRODUZIONE	pag. 9
1.1 BIODIVERSITÀ E VARIABILITÀ GENETICA	pag. 11
1.1.1 Tecniche molecolari per la misura della variabilità genetica	pag. 14
1.2 IL DECLINO GLOBALE DEGLI ANFIBI	pag. 17
1.3 <i>Rana temporaria</i> Linnaeus, 1758 - GENERALITÀ	pag. 22
1.3.1 Inquadramento sistematico	pag. 22
1.3.2 Distribuzione	pag. 22
1.3.3 Descrizione	pag. 24
1.3.4 Biologia ed ecologia	pag. 26
1.3.5 Variabilità intraspecifica	pag. 30
1.3.6 Presenza nell'area di studio	pag. 31
1.3.7 Status e conservazione	pag. 31
1.4 OBIETTIVI DELLA TESI	pag. 33
2. MATERIALI E METODI	pag. 34
2.1 CAMPIONI	pag. 34
2.2 METODICHE DI LABORATORIO	pag. 38
2.2.1 Estrazione del DNA	pag. 38
2.2.2 Amplificazione selettiva del DNA mediante PCR	pag. 38
2.2.3 Elettroforesi capillare e caratterizzazione degli alleli	pag. 43
2.2.4 Definizione del set finale di marcatori microsatelliti da utilizzare in analisi	pag. 44
2.3 DATI ECOLOGICO-AMBIENTALI	pag. 45
2.4 ANALISI STATISTICHE	pag. 47
2.4.1 Analisi dei dati genetici	pag. 47
2.4.2 Ricerca di correlazione tra dati genetici e parametri ecologico-ambientali	pag. 53

3. RISULTATI	pag. 55
3.1 VARIABILITÀ GENETICA INTRAPOPOLAZIONE	pag. 55
3.2 DIFFERENZIAMENTO TRA POPOLAZIONI E STRUTTURA GENETICA	pag. 59
3.3 ISOLATION BY DISTANCE	pag. 67
3.4 DIMENSIONE EFFETTIVA DELLE POPOLAZIONI	pag. 69
3.5 EVENTI DI BOTTLENECK	pag. 71
3.6 CORRELAZIONE TRA DATI GENETICI E PARAMETRI ECOLOGICO-AMBIENTALI	pag. 74
3.6.1 Correlazione tra parametri ecologico-ambientali e variabilità genetica intrapopolazione	pag. 74
3.6.2 Associazione tra parametri ecologico-ambientali e struttura genetica delle popolazioni	pag. 76
4. DISCUSSIONE	pag. 79
4.1 VARIABILITÀ GENETICA INTRAPOPOLAZIONE	pag. 79
4.2 DIFFERENZIAMENTO TRA POPOLAZIONI E STRUTTURA GENETICA	pag. 80
4.3 ISOLATION BY DISTANCE	pag. 82
4.4 DIMENSIONE EFFETTIVA DELLE POPOLAZIONI ED EPISODI DI BOTTLENECK	pag. 84
4.5 CORRELAZIONE TRA DATI GENETICI E PARAMETRI ECOLOGICO-AMBIENTALI	pag. 86
4.5.1 Parametri ecologico-ambientali e variabilità genetica intrapopolazione	pag. 86
4.5.2 Parametri ecologico-ambientali e struttura genetica delle popolazioni	pag. 90
5. CONCLUSIONI	pag. 94
5.1 IMPORTANZA DI RANA TEMPORARIA NEGLI ECOSISTEMI FORESTALI E CONSIDERAZIONI LEGATE ALLA GESTIONE SELVICOLTURALE	pag. 100
6. RINGRAZIAMENTI	pag. 105
7. BIBLIOGRAFIA	pag. 106
8. ALLEGATO 1	pag. 122

RIASSUNTO

Con il presente lavoro è stata condotta un'indagine sulla variabilità genetica di *Rana temporaria* nel territorio della provincia di Trento, sul differenziamento genetico tra popolazioni e sui fattori ecologico-ambientali in grado di influenzarli.

Sono stati tipizzati, per i 13 loci microsatellite selezionati, 320 individui, suddivisi in 12 popolazioni distribuite su tutta l'area indagata.

I livelli di variabilità genetica globalmente si sono rivelati in linea con quelli riscontrati in altre popolazioni europee della specie, mostrando però una situazione eterogenea tra i vari siti. Nessuno dei parametri ecologico-ambientali considerati (latitudine, longitudine, quota, temperatura, piovosità e uso del suolo) è riuscito a spiegare le differenze riscontrate.

Si segnalano i bassi livelli di variabilità (relativamente alle altre popolazioni) rilevati per la porzione centrale del territorio (Valle dell'Adige e massicci montuosi limitrofi), unitamente ad un maggior grado di differenziamento genetico.

In particolare, è stato evidenziato lo stato di criticità in cui versa la popolazione del sito Viote del Monte Bondone (bassi livelli di variabilità genetica, bassa dimensione effettiva stimata, forte isolamento e segnali di un recente episodio di bottleneck).

Per quanto riguarda la struttura delle popolazioni, una prima suddivisione è stata riconosciuta tra le popolazioni appartenenti alla destra e alla sinistra orografica del fiume Adige, con la già citata popolazione del sito Viote che sembra distinguersi da entrambi i gruppi.

Ad una scala più fine è emersa una struttura delle popolazioni irregolare: il differenziamento si è rivelato solo parzialmente correlato alla distanza geografica, e nemmeno le variabili ecologico-ambientali considerate hanno fornito una spiegazione generale ai pattern riscontrati.

Si ipotizza quindi una situazione in cui, nella definizione dei livelli di variabilità genetica e differenziamento, predominano i fattori spaziali e strutturali delle popolazioni-metapopolazioni, sui quali comunque le variabili climatiche ed ambientali possono esercitare la loro influenza, in modo variabile da sito a sito.

Queste considerazioni vanno tuttavia ritenute preliminari: per un quadro più chiaro si rendono necessari ulteriori dati genetici ed ecologici relativi ad altre popolazioni.

Negli ultimi decenni gli anfibi sono andati incontro ad un rapido e drammatico declino su scala mondiale. *Rana temporaria* è una specie molto frequente e non è considerata attualmente minacciata; oltre a fornire indicazioni gestionali per questa specie, studi di landscape genetics come questo, possono inoltre rappresentare importanti punti di partenza anche per indagare le dinamiche di anfibi maggiormente a rischio.

ABSTRACT

In this study, we aimed to investigate the patterns of genetic diversity and differentiation among *Rana temporaria* populations of the alpine region of Trentino, and assess the correlation with ecological and environmental factors.

We analyzed polymorphism in a set of 13 microsatellites loci, in 12 populations spread over the entire area of interest, for a total of 320 individuals genotyped.

The overall levels of genetic diversity were comparable to those found in other European populations, though with a relatively high degree of heterogeneity among sites.

None of the ecological variables considered in the study (latitude, longitude, elevation, temperature, precipitation, land use) were able to explain the recorded differences.

The central part of the area (Adige Valley and adjacent mountain massifs) was characterized with low genetic diversity, together with relatively strong differentiation between populations.

In particular, a critical state has been recognized for the population from the site Viote del Monte Bondone (low levels of genetic diversity, a low value of the estimated effective population size, strong isolation and evidence for a recent bottleneck).

Concerning the population structure, a first general subdivision has been recognized between the population belonging to the orographic right and left side of the Adige river, with the population of the site Viote distinct from both groups.

On a smaller scale, an irregular population structure has been found: the degree of differentiation was only partially correlated with geographical distance, neither the ecological and environmental variables were able to provide a general explanation for the found patterns.

We hypothesize the following situation: the strongest effect on levels of genetic variability and differentiation is related to spatial and structural factors of the populations/metapopulations, on which climatic and environmental variables may, however, show their influence. Such influence seems to be site-specific.

These arguments have to be considered preliminary: for a better understanding, further genetic and ecological data are needed for other populations.

In the last decades, there has been a rapid and dramatic decline in amphibian populations worldwide. *Rana temporaria* is a widespread amphibian and it is not currently considered threatened. A landscape genetics survey like this, in addition to give advices for the management of the studied species, may further provide important basis for understanding the dynamics of more threatened amphibians.

1. INTRODUZIONE

Rana temporaria Linnaeus, 1758 è il più diffuso anfibio europeo ed è frequentemente soggetto di studi ecologici, evolutivisti e genetici (Matsuba & Merila, 2009).

Si tratta di una specie con un range estremamente ampio di habitat, caratterizzata da elevata variabilità morfologica ed adattabilità nei riguardi delle diverse condizioni ecologiche. In particolare, sono documentati gradienti di variazione altitudinali relativamente all'età di raggiungimento della maturità sessuale, la lunghezza del corpo a maturità, la dimensione delle ovature e la dimensione delle uova (Miaud et al., 1999; Bonin et al., 2006), differenze tra popolazioni nella data di deposizione delle uova (Phillimore et al., 2010) e diversi adattamenti per quanto riguarda l'optimum termico e il ritmo di sviluppo larvali, anche su scala geografica ridotta (Olsson & Uller, 2003; Uller et al., 2006).

Secondo la definizione di Reeve e Sherman (1993), un adattamento è una variante fenotipica che possiede la fitness maggiore tra un preciso insieme di varianti in un dato ambiente.

Ogni adattamento ha base genetica ed è il risultato dell'azione della selezione naturale sulla variabilità genetica di una popolazione: quest'ultima rappresenta quindi un parametro fondamentale per la valutazione del potenziale adattativo, inteso come la capacità della popolazione di adattarsi al mutare delle condizioni ambientali.

Rana temporaria si presenta, quindi, come un ottimo modello di studio per indagare la variabilità genetica nelle varie popolazioni ed i diversi parametri ambientali in grado di influenzarla.

Come la maggior parte degli anfibi, mostra, inoltre, una spiccata sensibilità alle modificazioni ambientali di origine antropica (Johansson et al., 2007), che la rendono particolarmente interessante anche in un'ottica di valutazione delle possibili risposte adattative al global change.

Il presente studio si propone un'indagine della variabilità genetica di *Rana temporaria* nel territorio della provincia di Trento, dove la specie è comune e osservabile in siti riproduttivi dalle caratteristiche più svariate, e dei fattori ambientali in grado di influenzarla. Sono stati esaminati il grado di variabilità genetica interna a ciascuna popolazione, il differenziamento genetico tra le popolazioni e il modo in cui le caratteristiche geografiche e ambientali del territorio agiscono nel forgiare i pattern di diversità riscontrati. Nello specifico, è stata effettuata una stima della variabilità a livello di loci neutrali (mediante marcatori autosomici microsatelliti) nelle varie popolazioni campionate. Diversi studi hanno evidenziato una correlazione positiva tra caratteri legati alla fitness e livello di variabilità a marcatori neutrali

come i microsattelliti (Lesbarreres et al, 2005; Johansson et al, 2007).

Un'indagine su scala provinciale della variabilità genetica di *Rana temporaria* è motivata, non solo dalla già citata idoneità di questa specie ad essere assunta come modello per studi sul potenziale adattativo, ma anche dal fatto che, pur non essendo attualmente minacciata nel territorio considerato, appartiene ad un gruppo animale che sta andando incontro ad un forte declino su scala globale (fenomeno noto come *Global Amphibian Decline*) e a cui si auspica verrà riservata una sempre maggior attenzione. Inoltre, i dati acquisiti potrebbero in futuro essere d'aiuto nel fornire suggerimenti di carattere generale ai fini della conservazione di anfibi maggiormente a rischio.

Gli obiettivi di tale ricerca rientrano nell'ambito delle attività del progetto ACE-SAP (Alpine Ecosystems in a Changing Environment: Biodiversity Sensivity and Adaptive Potential), un progetto finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento che coinvolge tre istituzioni locali (Fondazione Edmund Mach, Museo Tridentino di Scienze Naturali, Museo Civico di Rovereto) ed un partner esterno (University of Davis, California) e la cui finalità è di promuovere la ricerca nell'ambito della biodiversità e dei vari aspetti ad essa legati servendosi di una regione alpina, il Trentino, come laboratorio a cielo aperto. In particolare, il lavoro in questione s'inserisce nell'attività A3 del progetto: Adattamento-Ambienti terrestri, il cui scopo è appunto la valutazione del potenziale adattativo delle popolazioni naturali di specie presenti in ambienti terrestri e nella cui ottica sono state selezionate 10 specie vegetali e animali, tra cui *Rana temporaria*.

1.1 BIODIVERSITÀ E VARIABILITÀ GENETICA

“Talchè se ne li corpi, materia et ente non fusse la mutazione, varietade e vicissitudine, nulla sarrebe conveniente, nulla di buono, niente dilettevole”
(da *“Spaccio de la bestia trionfante”* - Giordano Bruno)

Nella sua accezione più semplice la biodiversità o diversità biologica è la varietà della vita considerata a tutti i livelli di organizzazione (Gaston & Spicer, 2004).

Il termine “biodiversità” è un neologismo coniato dall’entomologo E.O. Wilson nel 1986 in sostituzione dell’espressione “diversità biologica”, considerata meno efficace in termini comunicativi. Le differenti elaborazioni del concetto di biodiversità hanno portato alla definizione adottata nel 1992 dalla Convenzione delle Nazioni Unite sulla Diversità Biologica di Rio de Janeiro, secondo cui per biodiversità deve intendersi *“la variabilità fra tutti gli organismi viventi inclusi, ovviamente, quelli del sottosuolo, dell’aria, degli ecosistemi acquatici e terrestri, marini ed i complessi ecologici dei quali sono parte”* (UNEP, 1992).

In seguito la biodiversità è diventata un argomento centrale per la scienza e la politica di tutto il mondo, anche a causa della crescente consapevolezza da parte degli studiosi che la biodiversità del pianeta sta attraversando una profonda crisi, come conseguenza diretta o indiretta delle attività umane.

Con il continuo aumento della popolazione umana ed il prevedibile impatto sulla vita selvatica, è unanime il parere che il tasso di estinzione delle specie sia destinato ad aumentare in modo ragguardevole: 1000 volte o più il “normale” tasso di estinzione dedotto in base ai reperti fossili. Un numero sconosciuto ma molto elevato di specie ha, infatti, subito una riduzione nella dimensione delle popolazioni, e questo le mette a rischio. Le specie vengono perse ad un tasso che supera di gran lunga la nascita di nuove specie. La dimensione del problema è enorme ed è stata battezzata come “sesta estinzione”, poiché la sua entità è confrontabile con quella delle altre estinzioni di massa documentate negli strati geologici (Leakey & Lewin, 1995). A differenza di queste però, la “sesta estinzione” sembra essere un fenomeno dovuto principalmente all’attività umana (Ehrlich & Ehrlich, 1981).

Alcune specie sono minacciate dalla caccia o dalla pesca eccessiva, per altre il pericolo è rappresentato da organismi alloctoni introdotti dall’uomo in regioni al di fuori del loro areale d’origine, ma la causa di estinzione di gran lunga più importante è la distruzione, alterazione o frammentazione degli habitat.

A lungo termine poi, la maggiore minaccia per la diversità biologica è rappresentata dal

riscaldamento globale, determinato dal consumo di combustibili fossili e dalla conseguente emissione di CO₂ e altri “gas serra”. Simulazioni realizzate al computer, basate su differenti scenari, suggeriscono che nei prossimi 50 anni le specie “destinate all’estinzione” saranno tra il 18 e il 35% del totale (Thomas et al., 2004).

Per cercare di diffondere una maggior sensibilizzazione al problema, l'anno 2010 è stato dichiarato dall'O.N.U. l'anno internazionale della biodiversità.

La varietà della vita è espressa in una molteplicità d’aspetti. La biodiversità può essere “scomposta” in tre livelli di scala interconnessi l’uno con l’altro: diversità genetica, diversità a livello di organismi (diversità specifica) e diversità ecologica. La diversità genetica comprende la variabilità delle componenti del codice genetico degli organismi (nucleotidi, geni, cromosomi) e la variazione nel patrimonio genetico all’interno di una popolazione e tra diverse popolazioni (Gaston & Spicer, 2004).

I geni sono sequenze di nucleotidi in una particolare regione (locus) di una molecola di DNA. La diversità genetica è rappresentata da variazioni nelle sequenze nucleotidiche. A loro volta queste variazioni possono esprimersi come differenze di sequenze amminoacidiche nella proteina per la quale codifica quel locus. Tale variazione proteica può determinare una differenza di tipo biochimico funzionale, morfologico o comportamentale, che può causare differenze nel tasso riproduttivo, nella sopravvivenza e nel comportamento degli individui e quindi incidere sulla loro fitness.

L’I.U.C.N., il principale organismo internazionale per la conservazione, riconosce la necessità di preservare la diversità genetica quale una delle tre priorità globali della conservazione. Il cambiamento ambientale è un processo continuo e la diversità genetica è necessaria alle popolazioni per evolversi ed adattarsi a tale cambiamento.

Le popolazioni di grandi dimensioni che praticano naturalmente l’esoincrocio possiedono generalmente al loro interno una notevole quota di diversità genetica, ma questa è tipicamente ridotta nelle specie in pericolo e nelle piccole popolazioni isolate. Queste ultime possono così subire una riduzione nella capacità di adattamento ai cambiamenti ambientali, oltre che soffrire di depressione da inbreeding e/o problemi dovuti ad accumulazione di alleli deleteri (Frankham, 1995b; Higgins & Lynch, 2001).

In altre parole, la diversità genetica è il materiale grezzo su cui agisce la selezione naturale, la quale determina adattamento ed evoluzione per far fronte ai cambiamenti ambientali. Una sua riduzione comporta una diminuzione del potenziale evolutivo di una popolazione o specie e costituisce una grave minaccia per la sua sopravvivenza (Frankham et al., 2006).

Nelle piccole popolazioni, inoltre, le componenti dell’evoluzione dovute a fattori casuali

(deriva genetica) assumono una maggiore importanza, e possono portare, oltre alla perdita o fissazione di alleli, ad un maggior differenziamento genetico.

La genetica di popolazione è la disciplina che si occupa dello studio della struttura genetica delle popolazioni, delle frequenze alleliche, genotipiche e fenotipiche. Essa studia, inoltre, le modalità con cui la diversità genetica varia nel tempo (Hartl & Clark, 1997). I principali fattori in grado di agire su di essa sono i seguenti:

- dimensioni attuali e storiche della popolazione
- eventi “collo di bottiglia” (bottlenecks)
- strategie riproduttive (breeding systems)
- selezione naturale
- differenti tassi di mutazione
- immigrazione ed emigrazione tra popolazioni
- interazioni tra i fattori sopraelencati

La variabilità genetica può essere identificata come la molteplicità di alleli e genotipi presenti nel gruppo oggetto di studio (popolazione, specie o gruppo di specie) ed è quindi tipicamente descritta utilizzando i termini *polimorfismo* (presenza di più di un allele ad un singolo locus), *eterozigotità media* (somma delle proporzioni degli eterozigoti per tutti i loci rapportata al numero totale dei loci campionati) e *diversità allelica* (numero medio di alleli per locus) (Frankham et al., 2002).

Per stimare il potenziale evolutivo di una specie è necessario indagare l'entità della diversità genetica per un buon numero di loci del genoma. È improbabile, infatti, che l'informazione derivante da un singolo locus possa essere rappresentativa della diversità genetica a livello di tutti i loci di una specie. Di conseguenza, i valori di diversità genetica devono rappresentare una media su un campione casuale di molti loci.

La diversità genetica che influenza maggiormente il potenziale evolutivo è la variazione per caratteri quantitativi legati alla fitness riproduttiva. Sfortunatamente, in genere disponiamo di scarse informazioni riguardo a questa forma di diversità genetica, ed una sua misura è spesso difficoltosa e dispendiosa in termini di tempo (Frankham et al., 2002). Da diversi studi è però emersa una correlazione positiva tra i caratteri legati alla fitness ed il livello di variabilità genetica rilevata a marcatori neutrali come i microsatelliti (Lesbarreres et al, 2005; Johansson et al, 2007).

Uno degli aspetti più studiati in genetica delle popolazioni è l'identificazione dell'importanza relativa dei vari fattori ambientali responsabili della struttura spaziale della diversità genetica

rilevata. Quest'ultima è, infatti, diretta conseguenza dell'intensità dei fenomeni di deriva genetica a cui ciascuna popolazione è sottoposta, che dipende dalla dimensione effettiva e dal grado complessivo di isolamento geografico/ecologico (Foll & Gaggiotti, 2006). A loro volta, entrambi questi parametri sono determinati dai vari fattori geografici ed ambientali specifici del territorio considerato (distanza tra popolazioni, latitudine, altitudine, morfologia del territorio, regime climatico, tipo di vegetazione, presenza di barriere geografiche al flusso genico, ecc...).

I recenti rapidi miglioramenti nelle tecniche di analisi genetica, in combinazione con metodologie statistiche già esistenti o nuove (geostatistica, massima verosimiglianza e approccio Bayesiano) e grazie ad una capacità computazionale sempre più potente, hanno determinato la nascita di un nuovo campo denominato *landscape genetics*, disciplina che si propone come una combinazione di genetica delle popolazioni ed ecologia del paesaggio ed ha come obiettivo principale quello di acquisire informazioni sull'interazione esistente, a varie scale geografiche, tra le caratteristiche del paesaggio e i processi microevolutivi, come il flusso genico, la deriva genetica e la selezione (Manel et al., 2003).

1.1.1 Tecniche molecolari per la misura della variabilità genetica

Il primo metodo sviluppato per la misura della variabilità genetica è stato l'analisi elettroforetica della variazione degli *allozimi*, varianti di proteine enzimatiche codificate da diverse forme alleliche di uno stesso gene. Successivamente si è assistito ad una rapida proliferazione di tecniche molecolari in grado di evidenziare i polimorfismi direttamente a livello delle sequenze di DNA. Alcuni di questi marcatori, come RFLP e VNTR (minisatelliti) sono basati sul procedimento di *Southern Blot Hybridization*, altri, come RAPD, SSR (microsatelliti) e AFLP, si basano invece sulla reazione a catena della polimerasi (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). L'avvento di quest'ultima tecnica, ideata da Mullis e collaboratori nel 1986, ha costituito un evento chiave alla diffusione degli studi di genetica di popolazione, in quanto consente la replicazione selettiva in vitro di specifiche sequenze di DNA, permettendo di ottenere la quantità di DNA necessaria alle successive applicazioni anche da un campione di materiale biologico molto ridotto. Ciò ha comportato notevoli vantaggi, come ad esempio la possibilità di effettuare campionamenti non invasivi, aspetto particolarmente importante nella genetica di conservazione.

La PCR si basa sull'attività della DNA polimerasi, enzima che catalizza la replicazione del DNA, che va aggiunto alla mix di reazione contenente il DNA da amplificare assieme ai

deossiribonucleosidi trifosfati (dNTP), e ad una coppia di *primer*: oligonucleotidi sintetici appositamente disegnati per essere complementari alle sequenze conservate che fiancheggiano la zona bersaglio (quella contenente il marcatore). Questi ultimi hanno funzione di innesco, in quanto le DNA polimerasi utilizzate non sono in grado iniziare la sintesi di un nuovo filamento "ex novo", ma possono solo aggiungere nucleotidi ad un filamento pre-esistente.

Il procedimento di amplificazione consiste nel ripetersi di numerosi cicli termici, ciascuno costituito da tre fasi: denaturazione del DNA (separazione dei due filamenti della doppia elica, che avviene ad una temperatura di 94-99°C), appaiamento di una coppia di *primer* (fase di *annealing*; 50-70°C) ed estensione dei filamenti di neoproduzione da parte della DNA polimerasi (ad una temperatura di 65-72°C). Viene così generata, all'interno di un termociclature, una reazione a catena che moltiplica il frammento di DNA di interesse in misura esponenziale.

In seguito allo sviluppo della PCR, i marcatori microsatelliti nucleari, il cui utilizzo in popolazioni naturali risale ai primi anni '90 (Ellegren, 1992), sono divenuti rapidamente la scelta più comune per studi di genetica di popolazione ed ecologia molecolare. Si tratta di marcatori codominanti, neutrali, caratterizzati da un alto livello di variabilità che li rende ideali per lo studio di vari aspetti demografici e biologici di una specie (struttura genetica delle popolazioni, flusso genico, fenomeni di ibridazione, inbreeding, origine degli individui, strategie riproduttive, ecc.).

Noti anche come SSRs (Simple Sequence Repeats) o STRs (Short Tandem Repeats), i microsatelliti sono sequenze di DNA costituite dalla ripetizione in tandem, senza interruzioni, di un singolo motivo lungo non più di 6 paia di basi. A seconda del numero di nucleotidi che costituisce il motivo base sono classificati come dinucleotidici, trinucleotidici, tetranucleotidici, ecc...Il numero di queste ripetizioni è altamente variabile principalmente a causa dello "slittamento" (*slippage*) del filamento di DNA durante la sua duplicazione. In altre parole, durante il processo di replicazione, il filamento nascente può dissociarsi dal filamento stampo e, a causa dell'elevata ripetitività della sequenza, riappaiarsi in maniera errata ("fuori fase"). Se questi errori di "scivolamento" non sono corretti dai meccanismi di riparazione del DNA, si ha l'inserzione o la delezione di una o più copie del motivo ripetuto lungo la sequenza nucleotidica. Individui diversi di una stessa specie o popolazione differiscono quindi non per il motivo base, bensì per il numero di volte in cui il motivo stesso è ripetuto. Il tasso di mutazione dei microsatelliti varia in un range di 10^{-2} – 10^{-5} eventi per generazione, valori piuttosto elevati se paragonati con quelli di altre regioni neutrali di DNA (10^{-9} - 10^{-10}) (Hancock, 1999).

Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato che alcuni microsatelliti sono localizzati in regioni trascritte del genoma e pertanto soggetti a selezione. È noto ad esempio come diverse malattie ereditarie umane (ad es. la corea di Huntington) siano direttamente causate da mutazioni in loci microsatelliti (Li et al., 2004). La neutralità selettiva dei microsatelliti utilizzati in genetica di conservazione va quindi saggiata con opportuni test (Selkoe & Toonen, 2006).

Un altro aspetto a cui prestare attenzione nell'utilizzo di questo tipo di marcatori sono i possibili casi di omoplasia allelica e di alleli nulli. Si parla di omoplasia quando due alleli risultano uguali per la dimensione sebbene non siano identici per discendenza. Essa può avere diverse cause, come mutazioni puntiformi o inserzioni/delezioni nella zona fiancheggiante la ripetizione, che danno luogo ad un nuovo allele della stessa dimensione di un altro già esistente. Le omoplasie così generate sono rilevabili sequenziando gli alleli. Esistono però anche casi di omoplasie tra alleli effettivamente uguali nella sequenza (e quindi non rilevabili). Esse possono originarsi proprio a causa del particolare processo mutazionale dei microsatelliti, nel caso in cui una retro-mutazione porti ad una dimensione allelica già esistente, o ancora quando due alleli non correlati tra loro convergono nella stessa sequenza cambiando il numero di ripetizioni in zone diverse della sequenza stessa. L'omoplasia potenzialmente può dar luogo ad una sottostima della diversità allelica osservata tra le popolazioni, sebbene in generale rappresenti una fonte di errore minima. L'eventuale presenza di alleli nulli, è dovuta generalmente a problemi in fase di amplificazione come, ad esempio, mutazioni nella zona di attacco del primer, che ne impediscono il corretto appaiamento. L'amplificazione non ha quindi luogo, con conseguenti errori nella stima delle frequenze alleliche e genotipiche. Un basso tasso di alleli nulli ha in genere un impatto pressoché irrilevante su molti tipi di analisi (Selkoe & Toonen, 2006); esistono inoltre diversi metodi e relativi software in grado di rilevarne la possibile presenza così da tenerne debitamente conto nelle successive fasi di analisi.

Il rilevamento dei polimorfismi ai loci microsatelliti avviene tramite un sequenziatore automatico, che con un procedimento di elettroforesi su capillare separa i frammenti di DNA prodotti dalla PCR in base alla dimensione. Per ciascuna coppia di primer utilizzata, uno dei due viene marcato con un fluorocromo, molecola che emette una specifica fluorescenza quando sottoposta ad un fascio di luce di determinata lunghezza d'onda. Durante la corsa dei frammenti all'interno del sequenziatore, un raggio laser viene puntato sul capillare eccitando i fluorocromi. La fluorescenza emessa viene rilevata per mezzo di una camera ottica ed i segnali vengono memorizzati e tradotti in forma grafica da appositi algoritmi.

1.2 IL DECLINO GLOBALE DEGLI ANFIBI

“I am glad that the life of pandas is so dull by human standards, for our efforts at conservation have little moral value if we preserve creatures only as human ornaments; I shall be impressed when we show solicitude for warty toads and slithering worms.” (da *“An Urchin in the Storm”* – S.J. Gould)

Sin dal 1990, gli Anfibi sono stati riconosciuti come indicatori biologici degli stress ambientali e dello stato generale di salute di un determinato habitat (Vitt et al., 1990; Mendelson et al., 2006).

Il loro ciclo vitale in parte acquatico ed in parte terrestre li espone ad un’ampia gamma di stress abiotici e agli effetti delle alterazioni ambientali su entrambi gli habitat; la pelle delicata e permeabile e le uova prive di guscio li rendono inoltre particolarmente vulnerabili, condizione aggravata da una generale scarsa mobilità (Blaustein & Kiesecker, 2002).

A causa di queste caratteristiche, gli Anfibi sono perciò tra i Vertebrati che più hanno risentito e continuano a risentire negativamente delle attività dell’uomo (Lanza et al., 2009).

Sin dagli anni 80 gli erpetologi di tutto il mondo hanno cominciato a riportare crescenti casi di declino ed estinzione di popolazioni di anfibi e, al primo Congresso Mondiale di Erpetologia del 1989, fu presa in considerazione l’ipotesi di un attuale declino globale degli anfibi. Tale preoccupazione è stata ormai universalmente confermata da un ampio numero di casi e l’argomento è diventato focus di diverse ricerche. Il declino degli anfibi va inserito all’interno della generale crisi di biodiversità di cui si è parlato in precedenza, tuttavia alcune peculiari caratteristiche lo rendono un fenomeno degno di una particolare attenzione. Oltre al recente aumento dei casi di declino ed estinzione e alla contemporanea comparsa del problema su grandi distanze, suscita particolare allarme il fatto che alcuni di questi casi riguardino popolazioni di aree naturali protette, fatto indicante che la protezione dell’habitat, forse la via migliore per assicurare la sopravvivenza di una specie, non garantisce il successo nel caso di alcuni anfibi.

Inoltre, il citato status di indicatori di salute ambientale fa sorgere la preoccupazione che le cause del loro declino possano minacciare anche specie appartenenti ad altri gruppi di animali.

Non è stata ad oggi individuata una semplice e generale causa che possa essere identificata come responsabile di questo declino in ogni singolo caso analizzato, ma sono state avanzate ben 6 ipotesi, che vengono riportate di seguito. Le prime tre agiscono in modo abbastanza

chiaro, mentre i meccanismi alla base delle restanti ipotesi (global change, inquinamento, malattie) sono molto più complessi e difficili da comprendere, agendo spesso in maniera indiretta, impiegando anni o decenni per manifestarsi e implicando effetti sinergici di fattori multipli (Collins & Storfer, 2003).

1) **Introduzione di specie aliene.** Specie aliene possono spesso causare il declino o persino l'estinzione di popolazioni native di anfibi attraverso una serie di meccanismi che agiscono singolarmente o simultaneamente, tra cui la predazione, la competizione tra gli stadi larvali, l'introduzione di nuovi patogeni e l'ibridazione tra specie affini (Collins & Storfer, 2003).

Fra i più pericolosi predatori di anfibi spiccano i pesci introdotti dall'uomo con finalità varie, da soli in grado di ridurre il successo riproduttivo di intere comunità di anfibi. La predazione, operata da piccoli pesci (*Gambusia* Poey, 1854, *Alburnus* Rafinesque, 1820, ecc.) sulle uova e sulle larve di questi animali, è in grado di ridurre la biodiversità delle comunità di anfibi di vaste zone. Nel nostro paese l'immissione di trote e ciprinidi nelle raccolte d'acqua alpine e appenniniche ha portato alla rarefazione di molte popolazioni di anfibi (Lapini, 2005). Un esempio di anfibio alloctono con effetti negativi di competizione nei confronti delle popolazioni di Anuri locali è rappresentato in alcune zone d'Italia dalla rana toro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), specie di origine nordamericana importata in molti paesi del mondo soprattutto per scopi gastronomici, naturalizzatasi in buona parte della Pianura Padano-Veneta ed in altre aree isolate del resto del nostro paese (Lanza et al., 2009).

2) **Sovrasfruttamento.** Gli effetti del prelievo umano sulle popolazioni di anfibi sono scarsamente noti, ma ci sono prove che in alcuni casi possano essere significativi (Collins & Storfer, 2003). In Italia, il prelievo a scopo alimentare di alcune specie deve essere considerato una causa di rischio solo secondaria, pericolosa solo per alcune singole popolazioni già in crisi (Lapini, 2005).

3) **Alterazione degli habitat.** Cambiamenti nell'uso del suolo (deforestazione, bonifiche, sviluppo industriale e agricolo, costruzione di strade, ecc...) possono facilitare l'estinzione delle popolazioni su scala locale fino a regionale attraverso l'uccisione degli organismi, la distruzione e frammentazione degli habitat o l'impedimento dell'accesso ai siti riproduttivi. L'alterazione degli ambienti causata dalle attività antropiche è ritenuta una delle principali cause della riduzione globale della biodiversità, e gli anfibi non fanno eccezione (Collins & Storfer, 2003).

Questi ultimi risentono probabilmente in misura particolarmente severa delle alterazioni degli habitat data la mole ridotta, la scarsa tolleranza al disseccamento e la limitata capacità di dispersione (Johansson et. al., 2005).

Nel caso specifico di *Rana temporaria*, si è visto come popolazioni di paesaggi caratterizzati da elevata frammentazione (dovuta ad intenso sfruttamento agricolo) possiedano un grado di diversità genetica più basso e una fitness minore rispetto a popolazioni di habitat più continui (Johansson et. al., 2007).

4) **Global change.** I cambiamenti climatici in atto possono potenzialmente avere vari effetti sugli anfibi, a livello di individui, popolazione e comunità. Si ipotizzano variazioni del range latitudinale e altitudinale, effetti negativi sulla sopravvivenza, crescita, riproduzione e capacità di dispersione (Blaustein et al., 2010).

Variazioni del regime climatico possono alterare gli habitat per parametri come vegetazione, suolo e idrologia. Possono venire influenzate la disponibilità alimentare, le relazioni predatore-preda e le interazioni competitive, con conseguenti modifiche della struttura delle comunità. Il climate change può, inoltre, modificare le dinamiche ospite-patogeno e influenzare fortemente il modo in cui le malattie stesse si manifestano (Blaustein et al., 2010). Infine, l'aumento delle radiazioni ultraviolette di tipo B causato dalla riduzione dell'ozono stratosferico può, secondo alcuni autori, contribuire al declino di alcune specie (Blaustein & Kiesecker, 2002), sebbene le osservazioni non siano concordi (Collins & Storfer, 2003).

La velocità con cui temperatura e umidità varieranno nei prossimi anni secondo le previsioni non ha precedenti, e gli anfibi potranno trovare difficoltà nel “seguire” gli slittamenti di habitat a causa delle loro limitate capacità di dispersione (Collins & Storfer, 2003).

Ci sono crescenti prove che gli anfibi abbiano già cominciato a risentire dei cambiamenti climatici anche in Europa. Il declino di alcune specie è già stato messo in relazione con il mutare delle condizioni climatiche, in particolare nelle regioni dove le zone umide sono già scarse ed è previsto un aumento dell'aridità (Henle et al., 2008). Studi di lungo periodo sugli anfibi europei mostrano inoltre una tendenza all'anticipo del periodo riproduttivo in molte specie (Blaustein et al., 2003; Beebe, 1995). Per quanto riguarda gli effetti sulla specie oggetto di questo studio, pare che nell'Europa Centrale e Settentrionale gli anfibi dall'attività riproduttiva precoce (tra cui per l'appunto *R. temporaria*), possano essere soggetti ad un rischio crescente a causa di gelate tardive, una ridotta copertura nevosa e temperature invernali più miti, che comportano un maggior spreco di energie in inverno ed il rischio di

congelamento di ovature o adulti (Henle et al., 2008). L'impatto dei sempre più frequenti eventi climatici estremi come le siccità prolungate, può dar luogo a fluttuazioni drammatiche della dimensione delle popolazioni; risentono maggiormente di tali eventi le specie che si riproducono in pozze temporanee, le quali possono andare incontro ad un completo fallimento della stagione riproduttiva nelle annate più secche. Ne è un esempio il severo declino osservato per il numero di ovature deposte da *Rana temporaria* dopo la grande siccità estiva del 2002 in Finlandia (Piha et al., 2007).

5) Inquinamento degli habitat terrestri e acquatici. Un'ampia gamma di sostanze inquinanti può avere effetti negativi sulle popolazioni di anfibi, tra cui pesticidi, erbicidi, fungicidi, fertilizzanti e numerosi altri composti chimici (Blaustein & Kiesecker, 2002).

Molti insetticidi, vermicidi e anticrittogamici agiscono direttamente sul sistema endocrino di questi animali alterando l'oogenesi e i meccanismi di differenziazione del sesso. Numerose ricerche hanno dimostrato la grande tossicità di gran parte degli erbicidi, che uccidono larve e adulti. Elevati tassi di mortalità delle uova di *Rana temporaria* sono state collegati ad elevate concentrazioni di atrazina, mentre basse concentrazioni di questo diserbante causano frequenti deformità nei girini. Anche tra i fertilizzanti vi sono alcuni prodotti certamente implicati nella diminuzione degli anfibi e concentrazioni di nitrati superiori a 40 mg/l riducono la schiusa delle uova e la sopravvivenza larvale. Infine, l'acidificazione delle precipitazioni atmosferiche dovuta al consumo di combustibili fossili può costituire un'ulteriore causa di declino: la progressiva acidificazione dei biotopi riproduttivi può, infatti, mettere a rischio intere popolazioni, o causare alterazioni nello sviluppo larvale (Lapini, 2005).

6) Emergenza di malattie infettive. Gli anfibi sono soggetti ad epidemie virali, fungine e batteriche, infestazioni di trematodi, ecc...che ne minacciano localmente la sopravvivenza. Tra le più gravi si ricordano le infezioni da *Ranavirus* e la chitridiomicosi (Speare, 2001).

I *Ranavirus* sono importanti patogeni degli anfibi di tutto il mondo, con casi riportati per l'Europa su *Rana temporaria* in Gran Bretagna, dove provocano annualmente la morte di un elevato numero di individui, ma a lungo termine sembrano causare fluttuazioni nelle popolazioni piuttosto che situazioni di declino vero e proprio (Collins & Storer, 2003).

La patologia maggiormente correlata a fenomeni di mortalità di massa su scala globale, con conseguente declino, estinzione di popolazioni locali fino ad estinzione di intere specie sembra invece essere la chitridiomicosi (Daszak et al., 2003). L'agente causale è il fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore, Pessier & D.K. Nichols (1999), descritto per la

prima volta nel 1999 in base a materiale presente su Dendrobatidae allevati negli Stati Uniti (Lanza et al., 2009). Il fungo è associato con il declino e l'estinzione di anuri in Australia, America Centrale e Nord America (con gli effetti peggiori sulle popolazioni di anfibi tropicali di quote elevate), ma coesiste con specie non in declino nelle stesse aree, suggerendo che differenze specie-specifiche nella suscettibilità all'infezione e nei cicli vitali influenzano la sopravvivenza delle popolazioni (Collins & Storfer, 2003). In Europa è stata accertata per la prima volta in Spagna tra il 1997 e il 1999, a carico dell'*Alytes obstetricans* Wagler, 1830, mentre per l'Italia la prima segnalazione in natura risale al 2001 su alcune popolazioni di *Bombina pachypus* (Bonaparte, 1832) del territorio collinare della provincia di Bologna (Lanza et al., 2009).

Alcuni ricercatori classificano la chitridiomicosi nel gruppo delle malattie infettive emergenti (Emerging Infectious Diseases, EIDs), che comprende sia patologie infettive di recente scoperta, sia quelle caratterizzate da un recente rapido aumento di incidenza, virulenza, diffusione geografica o del range di specie ospiti (Daszak et al., 2003). Nel caso della chitridiomicosi, un fattore sicuramente implicato nell'aggravarsi dell'emergenza è l'introduzione antropogenica del patogeno in nuove regioni e specie ospiti, ma è probabile che la situazione sia più complessa, con altri importanti cofattori in gioco, fra i quali un ruolo determinante sembra da attribuirsi al riscaldamento globale (Pounds et al., 2006).

Concludendo, va ricordato come nella realtà sia difficile generalizzare riguardo al declino degli anfibi, fenomeno che sembra risultare da una complessa interazione di fattori agenti spesso in sinergia, e in conseguenza di ciò lo stato delle popolazioni di questi animali è molto variabile a seconda delle locali combinazioni di fattori di rischio (Blaustein & Kiesecker, 2002).

Data la complessità delle dinamiche contesto-dipendenti in gioco, ci si auspica che comprendere il declino degli anfibi possa servire da modello anche per fare una maggior luce sul declino delle altre specie animali (Collins & Storfer, 2003).

1.3 *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 - GENERALITÀ

1.3.1 Inquadramento sistematico

La rana di montagna o rana rossa (*Rana temporaria* Linnaeus, 1758) è un anfibio appartenente all'ordine Anura e alla famiglia Ranidae (rane tipiche). Le specie autoctone europee di questa famiglia sono divise in due gruppi: “rane verdi”, dai costumi tendenzialmente acquatici (genere *Pelophylax* Fitzinger) e “rane rosse” (dette anche “rane brune”), di abitudini più terricole ad eccezione che nel periodo riproduttivo (genere *Rana* Linnaeus 1758) (Lanza et al., 2009).

I rappresentanti europei di quest'ultimo genere possono essere a loro volta suddivisi, in base alla distribuzione, in: 1) specie ad ampia diffusione, comprendenti oltre a *R. temporaria* Linnaeus, 1758, anche *R. dalmatina* Bonaparte 1840 e *R. arvalis* Nilsson, 1842; 2) endemismi iberico-atlantici: *R. iberica* Boulenger, 1879; *R. pyrenaica* Serra-Cobo; 3) endemismi mediterranei: *R. graeca* Boulenger, 1891; *R. italica* Dubois, 1985 e *R. latastei* Boulenger, 1879 (Veith et al, 2003).

1.3.2 Distribuzione

Rana temporaria è la rana rossa più diffusa in Europa (Arnold & Burton, 1985). Il suo areale si estende dalla Spagna settentrionale (aree cantabriche e pirenaiche) agli Urali, dalla Francia, dal Regno Unito e dall'intera penisola Scandinava alla Russia (Urali e contigua Siberia occidentale) e al Kazakistan settentrionale, fino a oltre 70°N e a circa 73°E. Assente in Portogallo, nell'Italia meridionale, in gran parte dei Balcani meridionali e in tutte le isole del Mediterraneo (Fig. 1.3.2.1). Nella parte settentrionale dell'areale è un'entità prevalentemente di pianura e di bassa collina, ma nella porzione meridionale frequenta soprattutto la fascia collinare e montana, spingendosi fino a poco meno di 3000 m sui Pirenei e sulle Alpi (Lanza et al., 2009). In Italia è presente con regolarità su tutto l'arco alpino e sull'Appennino Ligure, mentre la sua distribuzione risulta più frammentaria e irregolare su quello Tosco-Emiliano, dove si spinge fino alle province di Arezzo, Firenze e Forlì-Cesena; una popolazione relictiva vive inoltre sui Monti della Laga (Rieti; Lazio nord-orientale) (Fig. 1.3.2.2). In territorio italiano il suo range altitudinale è compreso tra circa 20 m s.l.m. (Finale Ligure; Savona) ed almeno 2760 m s.l.m. (Parco Nazionale del Gran Paradiso); l'isolata popolazione laziale vive fra i 1400 e i 1600 m s.l.m. (Lanza et al., 2009).

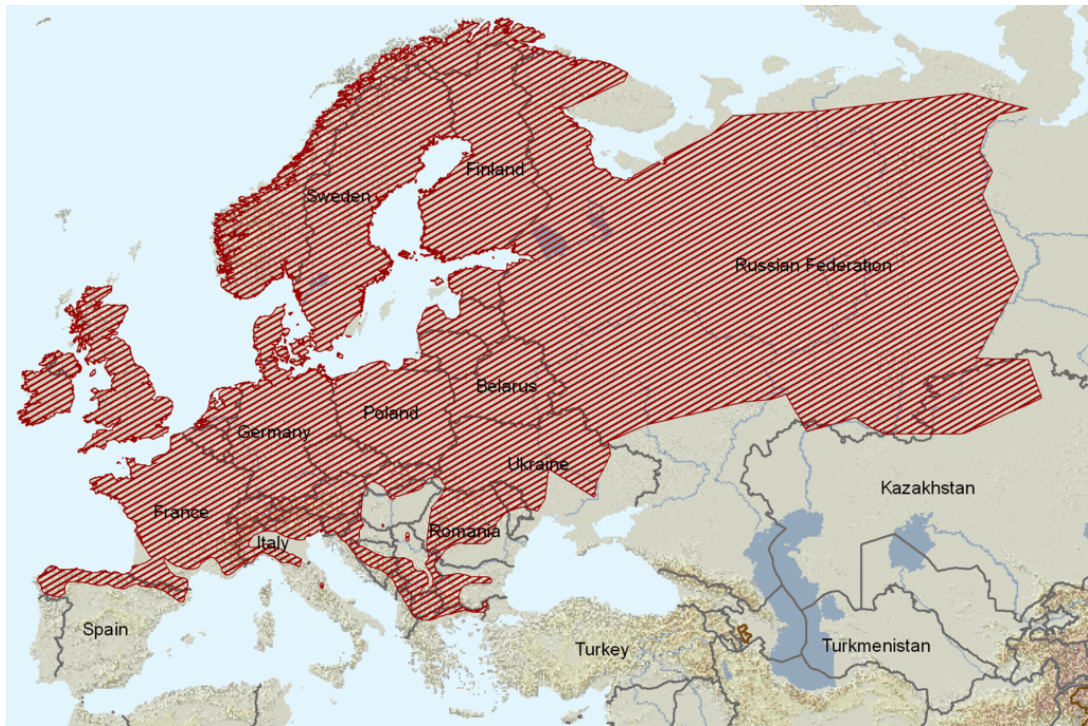


Figura 1.3.2.1: Areale di distribuzione di *Rana temporaria* (Kuzmin et al., 2008).



Figura 1.3.2.2: Distribuzione italiana di *Rana temporaria* (grigio scuro). La freccia indica l'isolata popolazione laziale dei Monti della Laga (Lanza et al., 2009).

1.3.3 Descrizione

Fra le “rane rosse” presenti in Italia è la specie che raggiunge le maggiori dimensioni e ha la corporatura più massiccia. La massima lunghezza dalla punta del muso all’apertura cloacale è di 11 cm, ma in genere gli adulti misurano 6-8 cm (Lanza et al., 2009).

La macchia scura nella regione temporale (Fig. 1.3.3.1), a cui deve il suo nome specifico, è tipica del gruppo delle “rane rosse”, le cosiddette “rane verdi” ne sono, infatti, prive (Lanka et al., 1986).



Figura 1.3.3.1: *Rana temporaria* (Val di Peio, TN). È ben visibile la fascia temporale scura.

La colorazione dorsale è molto variabile (Fig. 1.3.3.2): bruna, rossastra, giallastra, blu-nerastra (nei maschi in fregola), più o meno macchiettata di nero; pliche laterodorsali non parallele, ma disposte come a delineare i fianchi di una brocca (Fig. 1.3.3.3), con le porzioni scapolare e pelvica molto più ravvicinate di quella addominale; labbro superiore più o meno omogeneamente biancastro, crema o giallastro fino all’apice del muso. Macchia temporale e maschera facciale generalmente poco contrastate; timpano un po’ più piccolo dell’occhio nei maschi, molto più piccolo dell’occhio nelle femmine; ventre e gola degli adulti più o meno fortemente marmoreggiati di ocre rossastro, biancastro o crema; le femmine giovani possono talora essere ventralmente immacolate (Lapini, 2005).

Gli individui vecchi tendono ad avere muso arrotondato, i giovani variano considerevolmente nella forma della testa (Arnold & Burton, 1985).



Figura 1.3.3.2: Esempari di *Rana temporaria* caratterizzati da diverse colorazioni dorsali.



Figura 1.3.3.3: *Rana temporaria*, visione dorsale. In evidenza le pliche laterodorsali non parallele.

I maschi si differenziano dalle femmine per la taglia minore, per la già citata colorazione blu-nerastra assunta all'epoca della riproduzione (Fig. 1.3.3.4) e per il tubercolo, ben visibile, presente sul primo dito degli arti anteriori. Tale callosità diviene morbida nel periodo nuziale (Lanka et al., 1986).



Figura 1.3.3.4: Maschio di *Rana temporaria* nel periodo riproduttivo.

1.3.4 Biologia ed ecologia

Rana temporaria è diffusa in una grande varietà di habitat, ma alle nostre latitudini frequenta in maggior misura le aree forestali, i pascoli e le praterie di montagna, con pozze d'alpeggio, torbiere, torrentelli, etc...Nella parte meridionale del suo areale è un'entità prevalentemente alto-collinare e montana; nell'area prealpina si riviene soprattutto nelle valli incassate e boscate, con umidità elevata e temperatura fresca. Al di fuori del periodo riproduttivo ha costumi nettamente terrestri, anche se forse in minor misura delle conspecifiche *R. dalmatina* e *R. arvalis*; in certe stazioni, infatti, gli esemplari si mantengono presso l'acqua per buona parte della stagione.

La riproduzione, a seconda di posizione geografica e quota (ma anche delle condizioni climatiche dell'annata), ha luogo tra fine dicembre e luglio (eccezionalmente, a più bassa quota, pure nella tarda estate o inizio autunno). I maschi raggiungono i siti riproduttivi, distanti anche 1 o 2 km dalle aree di svernamento, di solito un po' prima delle femmine.

Il canto di richiamo del maschio, solitamente emesso sott'acqua, (soprattutto al crepuscolo e di notte, ma talora anche di giorno), ricorda un cupo e prolungato brontolio intermittente.

L'amplesso è ascellare (il maschio sale sul dorso della femmina stringendola alle ascelle); i maschi possono accoppiarsi più volte nel corso della stagione riproduttiva, che per lo più ha una durata di 1-2 settimane ed è quindi di tipo "esplosivo" (Lanza et al., 2009).

La fecondazione, come in tutti gli Anuri, è esterna: le uova vengono inseminate via via che sono emesse dalla femmina. Al momento della deposizione a livello della cloaca della femmina appare inizialmente un piccolo ammasso di uova ed immediatamente dopo viene espulsa violentemente la restante parte dell'ovatura. Il processo dura complessivamente pochi secondi ed è probabilmente il contatto della piccola massa fuoriuscita inizialmente che provoca l'emissione degli spermatozoi da parte del maschio. Alcuni secondi dopo la coppia si allontana nuotando, per poi separarsi dopo pochi minuti. Le ovature al momento della deposizione hanno un peso che varia tra i 30 e i 133 g; nelle 48 ore successive lo sviluppo embrionale raggiunge gli stadi 10-12 e le capsule gelatinose vanno incontro ad un processo d'idratazione che porta ad un notevole aumento di peso (Rolando et al., 1994).

I siti scelti per la deposizione delle uova sono vari: pozze (anche temporanee o di recente formazione), stagni, laghetti, torbiere, acquitrini, abbeveratoi, parti a debole corrente di torrenti e ruscelli, di solito in acque poco profonde. Talora l'accoppiamento avviene in corpi d'acqua con la superficie ancora gelata e circondati dalla neve. Ciascuna femmina depone da 600 a 4500 uova per ovodeposizione, raccolte in 1 o 2 grosse masse globulari del diametro medio di una ventina di centimetri (Fig. 1.3.3.5a), che divengono discoidali o appiattite quando raggiungono la superficie (Lanza et al., 2009). Nel periodo riproduttivo la specie è fortemente gregaria e i suoi grandi ammassi ovulari sono spesso fusi assieme, fino a formare enormi materassi gelatinosi (Fig. 1.3.3.6) che in alcuni luoghi di deposizione comune possono raggiungere il volume complessivo di diversi metri cubi (Lapini, 2005). L'uovo ha un diametro di 2-3 mm (8-10 mm o più con la capsula gelatinosa); ha il polo animale bruno scuro o nerastro e una limitata porzione di quello vegetativo biancastra (Lanza et al., 2009). L'involucro gelatinoso non è limpido come in altre specie di rana ma tipicamente opalescente (Fig. 1.3.3.5b), fatto molto evidente nelle ovature deposte da poco tempo (Lapini, 2005).

Le larve sgusciano dopo 2-3 settimane; alla nascita sono bruno-nerastre e misurano 6-9 mm (Fig. 1.3.3.7a), a completo sviluppo possono raggiungere i 4,5 cm di lunghezza (Fig. 1.3.3.7b). La metamorfosi viene completata in 2-4 mesi; in genere i neometamorfosati abbandonano il sito riproduttivo dalla metà dell'estate all'inizio dell'autunno; in qualche caso tuttavia le larve possono svernare in acqua e metamorfosare l'anno successivo.



a)



b)

Figura 1.3.3.5: a) ovature di *Rana temporaria*; b) particolare che evidenzia la colorazione opalescente dell'involucro.



Figura 1.3.3.6: Ammasso costituito da numerose ovature di *Rana temporaria*.

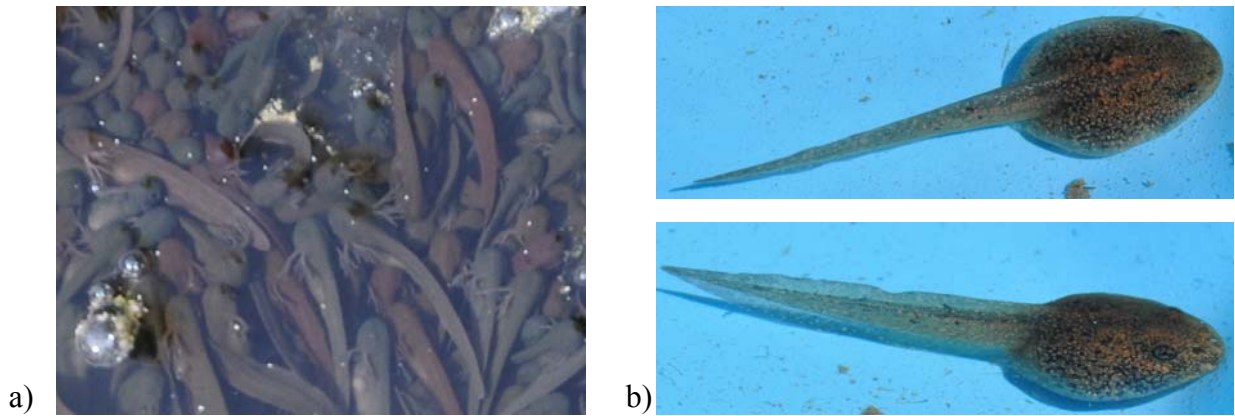


Figura 1.3.3.7: a) larve di *Rana temporaria* pochi giorni dopo la schiusa; b) girini in fase di sviluppo avanzata (visione dorsale e laterale).

La maturità sessuale è raggiunta a 2-3 anni di vita nelle popolazioni di media quota, in quelle alto-montane all'età di 4-6 anni. Lo svernamento avviene sia a terra (soprattutto i giovani) che in acqua (soprattutto gli adulti). Fra le “rane rosse” italiane *R. temporaria* è la più resistente al gelo e talora è osservabile in attività anche con temperature vicine a 0 °C (Fig. 1.3.3.8).

Si mostra invece molto sensibile alle temperature elevate associate a una scarsa umidità dell'aria, ciò che sembra aver impedito una sua maggior diffusione verso sud.

Gli adulti si nutrono di diversi invertebrati; le larve sono onnivore, ma principalmente vegetariane e detritivore. È predata da serpenti del genere *Natrix* e da vari Uccelli e Mammiferi. I girini sono appetiti da Pesci, altri Anfibi (in particolare i tritoni) e dagli stadi larvali di alcuni Insetti (libellule, Ditiscidi, ecc...). La massima longevità in natura è di circa 15 anni, ma la vita media non sembra comunque superare i 5 anni (Lanza et al., 2009).



Figura 1.3.3.8: Giovane esemplare di *Rana temporaria* in attività sulla neve (Viote del Monte Bondone, fotografia scattata in data 2/11/2010).

1.3.5 Variabilità intraspecifica

R. temporaria è morfologicamente e geneticamente la più variabile tra le specie appartenenti al gruppo delle “rane rosse” paleartiche, suggerendo che durante il periodo glaciale abbia potuto sopravvivere in diversi piccoli rifugi glaciali criptici nell’Europa centrale e settentrionale, oltre che nelle più vaste aree di rifugio meridionali (Veith et al., 2003).

In questo scenario di elevata variabilità, differenziazioni su base geografica sono però poco evidenti (Arnold & Burton, 1985).

Nell’ambito del suo vasto areale, a varie popolazioni è stato comunque attribuito da alcuni autori il valore di sottospecie distinte, la cui validità risulta però non sempre universalmente riconosciuta, in quanto i caratteri differenziali appaiono spesso poco consistenti e/o non esclusivi e costanti.

Secondo Grossenbacher (1997), oltre a quella nominale, diffusa in gran parte dell’area di distribuzione della specie, potrebbero essere considerate valide le seguenti sottospecie: *R. t. honorati* (Hèron-Royer, 1881), delle Basses-Alpes (Francia sud-orientale); *R. t. parvipalmata* Seoane, 1885, della Spagna nord-orientale; *R. t. canigoensis* Boubée, 1833, della parte a più alta quota della catena pirenaica.

Veith et al. (2003), sulla base dei risultati ottenuti dall’analisi di 2 diverse porzioni del DNA mitocondriale (16S e citocromo b) e sulla rodopsina nucleare, ritengono valide, oltre alle tre sottospecie sopra ricordate, anche la *R. temporaria* “di Gasser” (catena pirenaica a più bassa quota) e *R. t. aragonensis* (Aragona occidentale; Spagna nord-orientale), differenziatesi, come le altre, a seguito delle alterne vicende climatiche pleistoceniche.

Nel territorio italiano, allo stato attuale delle conoscenze, è presente la sola sottospecie nominale; Grossenbacher (1997) ipotizza tuttavia che sull’Appennino la specie possa essere rappresentata da *R. t. honorati*.

Sulla base dell’analisi genetica di sequenze mitocondriali del citocromo b, diversi studi hanno fornito prove per 2 distinte linee genetiche, l’una riscontrata in prevalenza nell’Europa dell’Est (fino a Francia e Germania orientali) e l’altra ad occidente, con la “linea orientale” che penetrerebbe attraverso le Alpi fino ad interessare alcune località del Sud-Est della Francia e del Nord-Est della Spagna. Una popolazione alpina del Nord Italia inclusa in questi studi (Val Troncea, Torino) si è dimostrata appartenere alla “linea orientale” (Palo et al., 2004).

1.3.6 Presenza nell'area di studio

La rana di montagna è l'anfibio più frequente e maggiormente diffuso in provincia di Trento. È stata osservata nell'ambito di un intervallo altitudinale molto ampio, che spazia dal fondovalle della Val d'Adige fino ai territori strettamente alpini al limite della vegetazione, con una predilezione per la fascia compresa tra i 1500 e 2000 metri s.l.m.

Come già detto, gli ambienti riproduttivi consistono in corpi idrici del tipo più svariato, a conferma di un ampio spettro di variabilità.

Sono stati accertati alcuni casi di sintopia con *Rana dalmatina* nei biotopi di Laghestel di Pinè, Torbiera di Fiavè, Prà all'Albi, La Rupe (Caldonazzi et al., 2002), come anche a La Rocchetta, Palù Redont, sui Monti Lessini ed in località Riposo (osservazioni personali).

1.3.7 Status e conservazione

Nella Red List dell'I.U.C.N. (2006) è assegnata alla categoria LC (least concern), con le motivazioni della sua vasta distribuzione, tolleranza ad un ampio range di habitat, popolazioni di presunta elevata numerosità e perché è ritenuto improbabile un suo declino rapido al punto da giustificare l'inserimento in categorie a più alto grado di minaccia (Kuzmin et al., 2008).

Nella porzione alpina del suo areale italiano, la specie è ancora comune e ben distribuita, anche se globalmente tende a manifestare un certo declino; nell'area prealpina, e più ancora sull'Appennino settentrionale, appare invece più scarsa e localizzata e per lo più in diminuzione. In generale, la distruzione e alterazione dei siti riproduttivi e degli ambienti di vita e l'immissione di pesci nei corpi d'acqua utilizzati per la deposizione delle uova rappresentano i fattori di rischio più rilevanti. Localmente questo Anuro, in particolare sulle Alpi, è pure soggetto a cattura per scopi culinari, tale pratica pare comunque, almeno in Italia, in sostanziale declino; numerosi esemplari restano inoltre vittima del traffico veicolare durante le migrazioni verso e dai siti di riproduzione.

Rana temporaria è presente nell'allegato III della "Convenzione di Berna" e nell'allegato V della "Direttiva Habitat" 92/43/CEE.

Nel "Libro Rosso" edito a cura del W.W.F. è in generale ritenuta "a minor rischio". Solo la popolazione relitta presente sui Monti della Laga (Appennino laziale) è considerata gravemente minacciata, in quanto i laghetti in cui si riproduce, nonostante la loro localizzazione all'interno di un Parco Nazionale, sono sottoposti ad alterazioni di natura antropica, che in un futuro più o meno prossimo potrebbero portare alla sua scomparsa;

incomprensibilmente, la specie non rientra fra quelle protette dalla Legge Regionale laziale 18/1988 (Lanza et al., 2009).

Nella Provincia Autonoma di Trento la Legge Provinciale 25 luglio 1973, n. 16 consente la raccolta di rane per una quantità giornaliera non superiore ad un chilogrammo per persona, a meno che non sia interdetta dal proprietario del fondo. Ne è vietata la cattura dalle ore 19.00 alle ore 7.00. È inoltre vietata la cattura di tutte le specie del genere *Rana* dal 1° marzo al 30 aprile.

1.4 OBIETTIVI DELLA TESI

Rana temporaria è un anfibio molto comune in Europa e colonizza una grande varietà di habitat, con un range altitudinale che spazia dal fondovalle fino a poco meno di 3000 m sui Pirenei e sulle Alpi (Lanza et al., 2009), mostrando grande adattabilità alle diverse condizioni ambientali.

Con questo studio si intende indagare la diversità genetica in popolazioni di *Rana temporaria* nel territorio della provincia di Trento, un'area alpina dove la specie è ampiamente diffusa, e cercare di identificare eventuali fattori ecologici in grado di influenzarla. È stata condotta un'analisi dei polimorfismi in un set di 13 loci nucleari microsatelliti, su campioni provenienti da 12 popolazioni che occupano habitat diversi, distribuiti in tutta l'area considerata.

Nello specifico, ci si propone di:

- valutare i livelli di variabilità genetica interna a ciascuna popolazione, identificando eventuali situazioni di rischio;
- stimare il grado di differenziamento genetico tra le popolazioni;
- determinare la struttura genetica delle popolazioni nel complesso dell'area indagata;
- evidenziare eventuali barriere al flusso genico;
- ricercare delle correlazioni tra i pattern di diversità riscontrati (intra- ed interpopolazione) ed alcune variabili ecologiche. A questo scopo sono stati utilizzati parametri geografici e topografici (latitudine, longitudine, quota altimetrica), dati climatici (temperatura, precipitazioni) ed ambientali (tipologie di uso del suolo).

2. MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONI

Sono stati raccolti campioni provenienti da siti riproduttivi distribuiti su tutto il territorio della provincia di Trento. La scelta delle popolazioni è stata fatta considerando il fiume Adige come barriera geografica separante il territorio considerato in due sottoaree: destra e sinistra orografica del fiume. Per ciascuna delle 2 sottoaree sono stati individuati 5 siti di campionamento situati a diverse fasce altitudinali (Fig. 2.1).

Nel sito di Alpe Cermis sono stati campionati individui provenienti da due sistemi di pozze posti ad una distanza di circa 2 km l'uno dall'altro; considerate le ridotte capacità di dispersione della specie (Smith & Green, 2005) si è deciso di trattare i campioni come due popolazioni distinte (Ce1 e Ce2). Una suddivisione in due popolazioni (ViT e ViS) è stata adottata anche per gli individui provenienti dal sito Viote (Monte Bondone). In quest'ultimo caso i campioni sono stati raccolti in due habitat diversi (torbiera e stagno artificiale), distanziati tra loro circa 1 km, e sin dalle prime analisi si sono dimostrati appartenere a due gruppi genetici ben distinti. Si discuterà di questa specifica situazione nel seguito.

Per tali ragioni il numero finale delle popolazioni ammonta quindi a 12.

Per ogni sito sono state rilevate le coordinate geografiche (WGS84) e la quota altimetrica per mezzo di apparecchiatura GPS portatile; nel caso di campioni provenienti da pozze diverse e ben distinte si è preferito rilevare più coordinate per ciascun sito. In Tabella 2.1 è riportato il riepilogo delle popolazioni campionate per ciascuna delle due sottoaree individuate.

Data la biologia della specie, facilmente localizzabile e gregaria soltanto nel periodo riproduttivo, si è cercato di concentrare i campionamenti soprattutto nell'arco di tale finestra temporale, variabile da zona a zona in dipendenza da vari fattori (tra i quali la quota riveste un ruolo primario).

Quando possibile sono stati prelevati campioni di tessuto da esemplari allo stadio adulto, prelevando, con l'ausilio di pinzette e forbice sterilizzata, un corto frammento di dito (campionamento di tipo semi-invasivo). Questa è una tecnica di marcatura/campionamento molto diffusa per gli anfibi. Studi effettuati su *Bombina variegata* Linnaeus, 1758, ad esempio, non hanno evidenziato effetti significativi di tale pratica sulla salute e condizione corporea di animali così marcati e successivamente ricatturati (Hartel & Nemes, 2006). Tuttavia, in un contesto di crescente diffusione di malattie fungine e virali che affliggono gli anfibi, è bene porre la massima attenzione alle precauzioni igieniche volte ad evitare la

propagazione di pericolose infezioni.

In assenza di animali adulti in attività, sono stati raccolti campioni da ovature (un uovo per ciascuna ovatura), forme larvali nei primi stadi dello sviluppo (in tal caso è stato prelevato l'intero animale) o girini in stadi di sviluppo avanzati (è stato prelevato un breve frammento di coda). Nel caso dei girini, si ricorda come essi nelle prime fasi dello sviluppo rimangono localizzati in gruppi corrispondenti alle ovature d'origine: il campionamento di individui non fratelli non presenta quindi difficoltà. Nel caso di forme larvali più avanzate, invece, che tendono a distribuirsi in maniera più omogenea nelle pozze d'acqua occupate, si è prestata attenzione a campionare individui posti ad una ragionevole distanza l'uno dall'altro.

Ciascun campione è stato conservato, fino al momento dell'analisi, in etanolo al 90 % e alla temperatura di - 80°C.



Figura 2.1: Siti di campionamento sul territorio della provincia di Trento. Per i siti Alpe Cermis e Viote sono stati raccolti campioni da due popolazioni considerate distinte (vedi testo). In giallo e rosso, rispettivamente, i siti appartenenti alla destra e alla sinistra orografica del fiume Adige.

DESTRA OROGRAFICA DEL FIUME ADIGE								
Fascia altitudinale (m s.l.m.)	Sito di campionamento	Popolazione	Latitudine	Longitudine	Quota (m s.l.m.)	Tipologia del sito	N° campioni	
400-650	Fiavè (Valli Giudicarie)	Fia	45,9896512 N	10,8309262 E	651	Torbiera bassa	11	
			45,9903398 N	10,8323841 E	654	Torbiera bassa	16	
						TOT	27	
1000-1150	Ponte Maria (Val Genova)	PMa	46,1659490 N	10,6615381 E	1124	Pozze ai margini torrente	27	
						TOT	27	
1500-1650	Viote (Monte Bondone)	ViT	46,0159189 N	11,0390328 E	1558	Torbiera bassa	4	
			46,0171216 N	11,0391512 E	1555	Torbiera bassa	13	
			46,0171943 N	11,0392083 E	1554	Torbiera bassa	3	
							TOT	20
			ViS	46,0141424 N	11,0520959 E	1518	Stagno artificiale	22
						TOT	22	
1700-1850	Palù di Boniprati (Val Daone)	Bon	45,9314361 N	10,5357205 E	1767	Torbiera di transizione	17	
			45,9370304 N	10,5439683 E	1727	Torbiera di transizione	18	
							TOT	35
> 2000	Rifugio Mandrone (Gruppo dell'Adamello)	RMa	46,2022468 N	10,5700251 E	2431	Pozze d'alta quota	7	
			46,2018460 N	10,5696858 E	2425	Pozze d'alta quota	4	
			46,2018588 N	10,5685542 E	2408	Pozze d'alta quota	11	
			46,2011152 N	10,5677474 E	2410	Pozze d'alta quota	6	
			46,2011766 N	10,5744508 E	2394	Pozze d'alta quota	6	
			46,2006591 N	10,5749440 E	2374	Pozze d'alta quota	2	
								TOT

SINISTRA OROGRAFICA DEL FIUME ADIGE							
Fascia altitudinale (m s.l.m.)	Sito di campionamento	Popolazione	Latitudine	Longitudine	Quota (m s.l.m.)	Tipologia del sito	N° campioni
400-650	Palude di Roncegno (Valsugana)	Ron	46,0497220 N	11,4255560 E	400	Stagno in bosco ripariale di fondovalle TOT	30 30
1000-1150	Dos del Bue (Vattaro)	DDB	45,9801957 N	11,2080381 E	1038	Pozza in bosco di conifere TOT	21 21
1500-1650	Monte Pasubio	Pas	45,8508741 N 45,8520548 N 45,8554776 N	11,1301646 E 11,1322591 E 11,1387733 E	1535 1560 1625	Pozze d'alpeggio Pozze d'alpeggio Pozze d'alpeggio TOT	16 14 7 37
1700-1850	Passo Lavazè (Val di Fiemme)	PLa	46,3567999 N	11,4909948 E	1806	Torbiere di varia natura TOT	23 23
> 2000	Alpe Cermis (Catena del Lagorai)	Ce1	46,2276306 N 46,2288346 N	11,5112389 E 11,5123069 E	2270 2270	Pozze d'alta quota Pozze d'alta quota TOT	19 6 25
		Ce2	46,213726 N 46,210977 N	11,5230570 E 11,5247659 E	2242 2270	Pozze d'alta quota Pozze d'alta quota TOT	10 7 17

Tabella 2.1: Popolazioni campionate, divise nelle 2 sottoaree individuate (destra e sinistra orografica del fiume Adige). Sono riportate le coordinate geografiche Long/Lat delle pozze di raccolta (gradi decimali; datum WGS84), quota, tipologia del sito e numero di campioni tipizzati.

2.2 METODICHE DI LABORATORIO

2.2.1 Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto utilizzando il DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) seguendo il protocollo standard “Purification of Total DNA from Animal Tissues”. Per evitare problemi d’inibizione dovuti alla conservazione in etanolo, prima di iniziare l’estrazione i campioni sono stati lasciati reidrattare in 300 µL di Buffer TE (EDTA 0,5 M, TRIS HCl 1 M; pH 7,4), per un minimo di 15 minuti.

L’estrazione e purificazione del DNA genomico è stata effettuata con l’ausilio dell’estrattore automatico QIAcube® (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA), utilizzando il protocollo standard “DNeasy Blood & Tissue- Animal tissues and rodent tails”. Lo strumento permette di automatizzare le principali operazioni di estrazione e purificazione del DNA; è costituito da una centrifuga, uno shaker e un braccio meccanico e permette di processare contemporaneamente e in breve tempo dodici campioni.

Per l’estrazione sono stati utilizzati circa 25 mg di tessuto o un intero uovo, nel caso di campioni prelevati da ovature.

L’eluizione è stata fatta in 200 µL di Buffer AE (kit Qiagen; 10mM TrisCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) che garantisce un ottimale recupero e stabilità del DNA.

In ogni estrazione è stato inserito un controllo negativo (provetta priva di campione) allo scopo di verificare l’assenza di contaminazioni nei reagenti.

I campioni così ottenuti sono stati lasciati riposare in frigorifero per circa due ore (ad una temperatura di circa 4°C), prima di essere utilizzati per l’amplificazione. Il DNA rimanente è stato conservato a -80°C.

2.2.2 Amplificazione selettiva del DNA mediante PCR

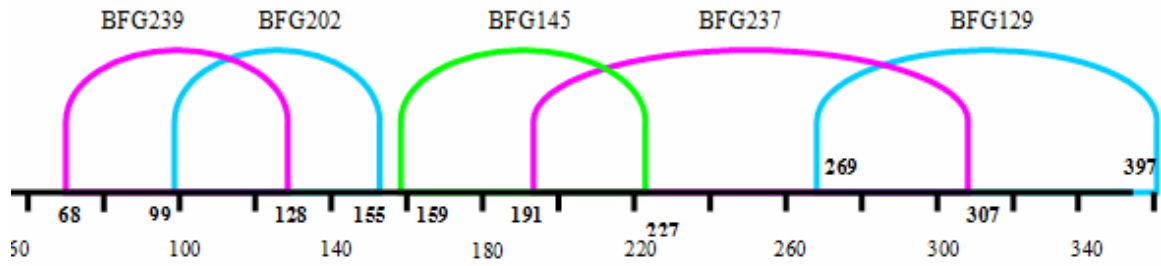
Il DNA estratto è stato impiegato per l’amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) dei 21 loci microsatelliti tetranucleotidici selezionati per lo studio (Tab. 2.2.2).

<i>Locus</i>	<i>Sequenza dei primer 5'-3'</i>	<i>Fluorescenza-5'</i>	<i>T_a (°C)</i>	<i>Ripetizione</i>
BFG239	F: GGAACCCTATAACCGTACCTCC R: CTGGGCAAACACATAAAAAGGT	NED	54	AACT
BFG202	F: AAAACACAGCAACCTCAAGAC R: TCCCTTGCTCTTCTCTCATCC	6FAM	54	CTAA
BFG145	F: CAAACTCAGGCATATTCGTTCA R: TAGATTTGACAGTGGAGCAGGA	VIC	54	TCTA
BFG237	F: GGATTCTACGGATCTTTGGACA R: CCTTCCATTCTGTTTGTAGGC	PET	54	GATA
BFG129	F: GCATGACAGATAAGCATAAG R: AAGCTGTAAATCACTAGGC	6FAM	54	CTAT
BFG072	F: AACTTTGCCACACCTGAAATG R: AATGTTTGTTCATCAGAGAGACCTG	VIC	56	TGTA
BFG099	F: CAGTAAGGAATGGATACTAAGC R: TCCAGTGTAGCATAACAGAGT	PET	56	ACTC
BFG207	F: CAACAAACACAACATCCCCT R: GTTGCCGGATAGTCTGGG	NED	56	CAGA
BFG155	F: GATGCTTGCACTTGCTCC R: GTCAGCACGGATTCATAAAA	6FAM	56	TACT
BFG253	F: GGAACCCTATAACCGTACCTCC R: CTGGGCAAACACATAAAAAGGT	PET	56	AACT
BFG059	F: ACAAATCGAAGGGAGAATGAAG R: AATTAGACCTGTGTTGATGGG	NED	56	ACTC
BFG050	F: TAAGGGAAATTGTGTAATGCCC R: CTGAGGCGATTTAGTTTGCAT	PET	58	GAGT
BFG057	F: AAGGACTTTGCTCGCTTTGTAA R: GGCGATTAAGTTCGCATTTGT	6FAM	58	TGAG
BFG053	F: TTTAGTGAGCATTGTGGTGGAG R: TGTTGAGGAGATTAAGTTCGCA	VIC	58	GTGA
BFG161	F: TCTCCAATGAACAGGAAGCAC R: GCAGCAACAACCTGATTAGAAA	PET	58	AGAA
BFG131	F: CAGTACGTACGCCATATCGTGT R: GTGAAAGGAGGCAGCAAAGT	6FAM	58	TACA
BFG065	F: TATGCAGACAAATCTCCAGTC R: GAAACAGAAGCAAAAGGGATAC	NED	58	GTGA
BFG241	F: TCTGCGCTATCCCTGTGTATAA R: GGTTTATGGGACTGCACTGTTT	NED	56	CATA
BFG130	F: GCAGTTTATAGAGGTGGGG R: ATATCTCCATCCGGTCCA	6FAM	56	TCTT
BFG058	F: CTGCAACTACTCGCATCACT R: CCTGTTCTTTTCTGCCTAATG	PET	56	TTCA
BFG250	F: CCTGTTAGAGAAGCCGATCATT R: TTGACTGGAAGTATTGGGAGT	VIC	56	GATA

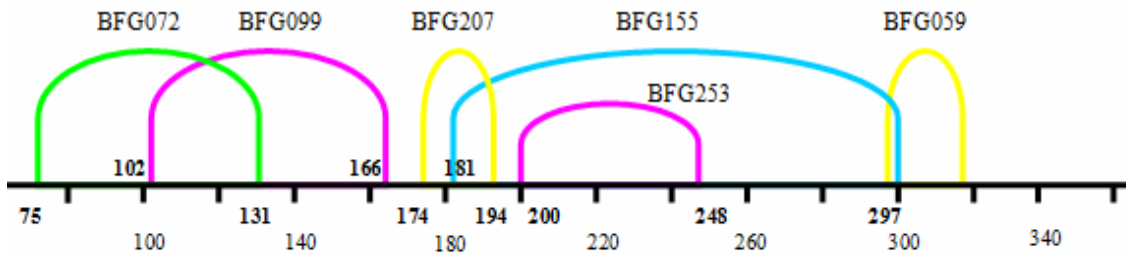
Tabella 2.2.2: Descrizione dei 21 loci microsatelliti selezionati. Sono indicati: sequenza dei primer, tipo di marcatore fluorescente, temperatura di annealing utilizzata e motivo base della ripetizione (Matsuba & Merila 2009).

La preparazione dei campioni nella mix di reagenti è stata effettuata sotto cappa a flusso laminare; in ogni PCR è stata aggiunta una provetta contenente solo i reagenti, utilizzata come controllo per rilevare l'eventuale presenza di contaminazioni negli stessi. Per ogni marcatore sono state inizialmente messe a punto le condizioni di amplificazione in singolo; si è poi proceduto al raggruppamento dei marcatori in 4 multiplex di amplificazione, ottimizzate in base a temperatura di annealing, tipo di fluorescenza e range allelico (Fig. 2.2.3).

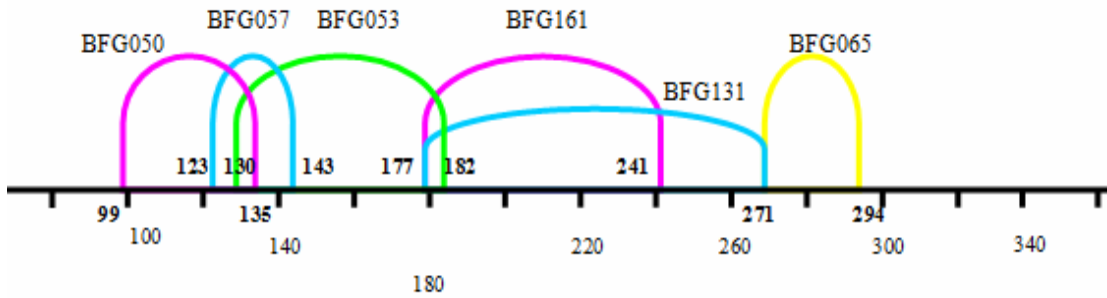
PANEL 1



PANEL 2



PANEL 3



PANEL 4

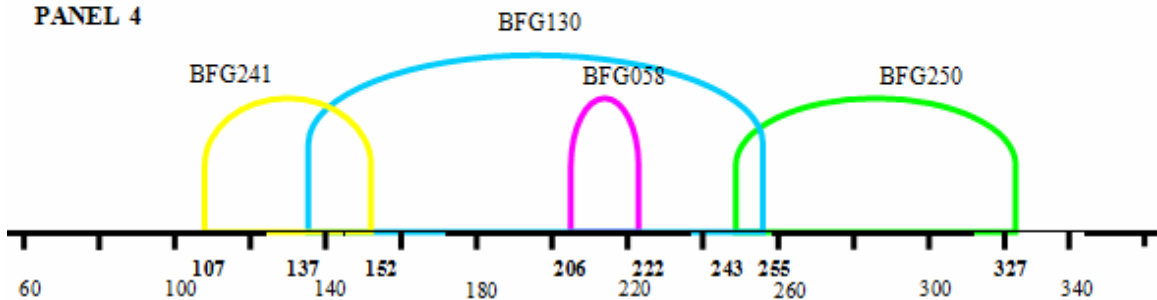


Figura 2.2.3: Rappresentazione grafica delle 4 multiplex messe a punto. Ogni marcatore è raffigurato da un arco di ampiezza corrispondente al range allelico (sull'asse orizzontale è indicata la dimensione in paia di basi); i colori indicano i diversi tipi di fluorescenza utilizzati per la marcatura (blu= 6FAM, giallo= NED, rosa= PET, verde= VIC).

Le PCR sono state eseguite in volume totale di 10 μ L, con reagenti HotMaster™ Taq DNA Polymerase (5-Prime), in termociclatori Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City; CA, USA). La composizione delle mix di reazione utilizzate per i vari pannelli ed i relativi profili termici di amplificazione sono indicati nelle Tabelle 2.2.3, 2.2.4, 2.2.5 e 2.2.6. Per i campioni costituiti da uova, a causa della minore resa è stato a volte necessario ricorrere ad un aumento dei cicli di amplificazione (fino a 40) o della quantità di DNA (fino a 2 μ L). Nei casi più problematici, i marcatori sono stati amplificati in singolo.

Mix di reazione amplificazione in multiplex PANEL 1		Profilo termico di amplificazione		
Reagenti	μl per provetta	Temperatura	Tempo	N° cicli
H ₂ O	5,11	95°C	2'	
Buffer 10X	1	94°C	1'	
BFG239 F/R 10 μ mol/ μ l	0,18	54°C	30''	25
BFG202 F/R 10 μ mol/ μ l	0,08	70°C	30''	
BFG145 F/R 10 μ mol/ μ l	0,14	60°C	2'	
BFG237 F/R 10 μ mol/ μ l	0,2	4°C	infinito	
BFG129 F/R 10 μ mol/ μ l	0,22			
dNTP 10 mM	1			
HotMaster Taq 5 U/ μ l	0,25			
Mix per provetta	9			
DNA	0,5			

Tabella 2.2.3: Composizione della mix di reazione per l'amplificazione in multiplex dei marcatori inclusi nel PANEL 1, e relativo profilo termico di amplificazione.

Mix di reazione amplificazione in multiplex PANEL 2		Profilo termico di amplificazione		
Reagenti	µl per provetta	Temperatura	Tempo	N° cicli
H ₂ O	5,67	95°C	2'	
Buffer 10X	1	94°C	1'	
BFG072 F/R 10 µmol/ µl	0,08	56°C	45''	25
BFG099 F/R 10 µmol/ µl	0,12	70°C	45''	
BFG207 F/R 10 µmol/ µl	0,07	60°C	10'	
BFG155 F/R 10 µmol/ µl	0,12	4°C	infinito	
BFG253 F/R 10 µmol/ µl	0,2			
BFG059 F/R 10 µmol/ µl	0,2			
dNTP 10 mM	1			
HotMaster Taq 5 U/µl	0,25			
Mix per provetta	9,5			
DNA	0,5			

Tabella 2.2.4: Composizione della mix di reazione per l'amplificazione in multiplex dei marcatori inclusi nel PANEL 2, e relativo profilo termico di amplificazione.

Mix di reazione amplificazione in multiplex PANEL 3		Profilo termico di amplificazione		
Reagenti	µl per provetta	Temperatura	Tempo	N° cicli
H ₂ O	4,79	95°C	2'	
Buffer 10X	1	94°C	1'	
BFG050 F/R 10 µmol/ µl	0,3	58°C	30''	25
BFG053 F/R 10 µmol/ µl	0,07	70°C	45''	
BFG161 F/R 10 µmol/ µl	0,12	60°C	10'	
BFG131 F/R 10 µmol/ µl	0,07	4°C	infinito	
BFG057 F/R 10 µmol/ µl	0,22			
BFG065 F/R 10 µmol/ µl	0,2			
dNTP 10 mM	1			
HotMaster Taq 5 U/µl	0,25			
Mix per provetta	9			
DNA	1			

Tabella 2.2.5: Composizione della mix di reazione per l'amplificazione in multiplex dei marcatori inclusi nel PANEL 3, e relativo profilo termico di amplificazione.

Mix di reazione amplificazione in multiplex PANEL 4		Profilo termico di amplificazione		
Reagenti	µl per provetta	Temperatura	Tempo	N° cicli
H ₂ O	5,97	95°C	2'	
Buffer 10X	1	94°C	1'	
BFG130 F/R 10 pmol/ µl	0,07	56°C	45''	30
BFG058 F/R 10 pmol/ µl	0,1	70°C	1'	
BFG250 F/R 10 pmol/ µl	0,15	60°C	10'	
BFG241 F/R 10 pmol/ µl	0,07	4°C	infinito	
dNTP 10 mM	1			
HotMaster Taq 5 U/µl	0,25			
Mix per provetta	9			
DNA	1			

Tabella 2.2.6: Composizione della mix di reazione per l'amplificazione in multiplex dei marcatori inclusi nel PANEL 4, e relativo profilo termico di amplificazione.

2.2.3 Elettroforesi capillare e caratterizzazione degli alleli

La determinazione dei prodotti di PCR (sizing) è stata effettuata tramite elettroforesi capillare per mezzo del sequenziatore automatico a 4 capillari 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City; CA, USA). I campioni di DNA amplificato sono stati caricati sulla piastra di sequenziamento in 18 µl di formammide, a cui è stato aggiunto uno standard interno per l'assegnazione della dimensione dei frammenti (GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard) in concentrazione dell'1% in volume. La formammide ha funzione di agente denaturante della doppia elica e stabilizzante dei filamenti singoli. In fase di caricamento sono stati utilizzati 1 µl di DNA tal quale per i pannelli 1 e 2; 1 µl di DNA diluito 1:2 per i pannelli 3 e 4.

Ai picchi rilevati dallo strumento sono stati assegnati i corrispondenti alleli tramite il software GeneMapper™ versione 3.7 (Applied Biosystems, Foster City; CA, USA). La combinazione di tutti gli alleli rilevati nel set di loci analizzato costituisce la configurazione genotipica individuale.

In ogni piastra di sequenziamento sono stati inseriti dei campioni già tipizzati, in modo da avere dei campioni di controllo ed assicurarsi della ripetibilità delle analisi.

2.2.4 Definizione del set finale di marcatori microsatelliti da utilizzare in analisi

Durante la fase di amplificazione routinaria dei campioni, si è deciso di eliminare 6 dei 21 loci selezionati, a causa di problemi di mancata amplificazione (alleli nulli) o di amplificazione aspecifica (BFG057, BFG253, BFG059, BFG065, BFG241, BFG145).

I marcatori BFG207 e BFG058 sono stati invece esclusi in quanto fenomeni di mutazione ed inserzione-delezione nelle zone immediatamente fiancheggianti la regione della ripetizione e all'interno della stessa, rendevano problematica l'interpretazione degli alleli ed aumentavano il rischio di omoplasie alleliche. Tali irregolarità sono state accertate tramite il sequenziamento degli alleli di un congruo campione di individui, utilizzando primer non marcati.

In seguito a tutte le esclusioni descritte, il numero finale di marcatori utilizzati nelle successive analisi statistiche dei dati ammonta quindi a 13.

2.3 DATI ECOLOGICO-AMBIENTALI

Per la ricerca delle correlazioni con i dati di variabilità genetica, sono stati scelti i seguenti parametri ecologico-ambientali: latitudine, longitudine, quota, temperatura, precipitazione e uso del suolo.

Le coordinate geografiche Long/Lat sono state rilevate in campo mediante apparecchiatura GPS portatile (datum WGS84), e successivamente convertite in coordinate piane UTM (WGS84) tramite il software GRASS GIS.

Quest'ultimo tipo di coordinate è stato utilizzato anche nel calcolo delle matrici delle distanze tra siti nell'analisi di *isolation by distance*.

Le informazioni di temperatura derivano da dati MODIS (Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer). Il MODIS è un dispositivo scientifico presente a bordo dei satelliti Terra (EOS AM) ed Aqua (EOS PM) della NASA, messi in orbita rispettivamente nel 1999 e nel 2002. È stato progettato per raccogliere informazioni sulle dinamiche globali di larga scala, tra cui i cambiamenti nella copertura nuvolosa della Terra, il bilancio dell'energia radiante ricevuta ed emessa dal nostro pianeta, i processi che hanno luogo negli oceani, sui continenti e nella bassa atmosfera. Gli strumenti che lo compongono producono mappe giornaliere della temperatura del suolo (LST- Land Surface Temperature) per l'intero pianeta e sono in grado di acquisire dati a tre risoluzioni spaziali: 250 m, 500 m e 1000 m (<http://modis.gsfc.nasa.gov>). La scala di risoluzione adottata nel presente studio è di 250 m. La ricostruzione dei pixel delle mappe di LST incomplete (a causa di interferenze dovute a nuvole o altri elementi di disturbo) è stata effettuata con l'algoritmo proposto da Neteler (2010).

Come variabili di temperatura sono state scelte: le temperature medie, massime e minime annue; le temperature medie, massime e minime del periodo primaverile-estivo (aprile-luglio). La scelta di queste ultime tre variabili è stata effettuata per focalizzare l'attenzione sulle fasi embrionale e larvale (particolarmente critiche per il successo riproduttivo), tenendo in considerazione il ciclo biologico della specie alle quote dei siti oggetto di studio.

Per le precipitazioni ci si è basati su dati ECA&D (European Climate Assessment and Dataset). ECA&D è un progetto cominciato nel 2003 dal Consiglio dell'EUMETNET (EUropean METeorological NETwork), con l'obiettivo di monitorare e analizzare il clima ed i suoi cambiamenti. L'approccio adottato è quello di un sistema cooperativo per la raccolta, l'archiviazione, il controllo della qualità, l'analisi e la diffusione di dati climatici ad alta risoluzione.

Il risultato è un database di osservazioni giornaliere effettuate da stazioni meteorologiche distribuite in tutta Europa (attualmente si sta gradualmente estendendo anche a nazioni del Medio Oriente e del Nord Africa). Gran parte delle serie climatiche raccolte viene resa pubblica, scaricabile gratuitamente per fini non commerciali dal sito web <http://eca.knmi.nl>.

Non potendo, per diverse ragioni, estrapolare per questo studio serie climatiche pluriennali relative a tutti i siti, ci si è limitati ad utilizzare i dati climatici riferiti all'anno più vicino a quello di campionamento (2010), assumendo che anche le osservazioni di un solo anno possano essere informative delle differenze nel regime climatico tra i vari siti. I valori di temperatura si riferiscono pertanto all'anno 2010, mentre quelli di precipitazione al 2009. Data la logica adottata, tale discrepanza appare concettualmente accettabile. Si cita inoltre uno studio di Jedrzejewska et al. (2003) su popolazioni polacche di *Bufo bufo*, *Rana arvalis*, e *Rana temporaria*, nel quale è stata riscontrata una correlazione positiva tra l'abbondanza delle varie specie e le precipitazioni relative all'anno precedente.

Le variabili di precipitazione considerate sono le precipitazioni annue e le precipitazioni del periodo primaverile (aprile-giugno). Queste ultime appaiono particolarmente importanti per gli anfibi che si riproducono in pozze temporanee (Diaz-Paniagua, 1990; Semlitsch, 2003). Un accorciamento dell'idroperiodo (periodo di presenza dell'acqua nel sito riproduttivo) può comportare infatti conseguenze negative, fino al completo fallimento della riproduzione (e.g. Pechmann et al. 1989; Semlitsch 2003). Una correlazione positiva tra precipitazioni primaverili e abbondanza di anfibi è documentata ad esempio per la Francia mediterranea e per habitat simili del Nord America (Pechman et al. 1989).

Per quanto riguarda la quota, nelle analisi statistiche sono stati utilizzati i valori stimati tramite un modello digitale del terreno (DTM, Digital Terrain Model) con risoluzione spaziale 10 m.

L'uso del suolo, infine, è stato dedotto dalla carta dell'uso del suolo della Provincia Autonoma di Trento (scala 1:10.000).

2.4 ANALISI STATISTICHE

2.4.1 Analisi dei dati genetici

I microsatelliti sono talvolta soggetti ad errori di genotipizzazione, dovuti alla mancata amplificazione di uno dei due alleli (alleli nulli), all'amplificazione preferenziale di alleli di piccole dimensioni (dropout allelico) o all'assegnazione degli alleli a picchi di stutter (prodotti secondari di amplificazione dovuti a fenomeni di slippage), che possono compromettere i risultati delle successive analisi. Per escludere la presenza di tali errori è stato utilizzato il software MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004), impostando 1000 iterazioni, con un intervallo di confidenza del 95%.

I modelli teorici che stanno alla base della genetica di popolazioni, in condizioni di neutralità, hanno come assunti fondamentali l'assenza di *linkage disequilibrium* tra loci (LD; ovvero l'associazione non casuale tra gli alleli di due o più loci) e l'equilibrio di Hardy-Weinberg per le frequenze genotipiche.

L'assenza di *linkage disequilibrium* è stata verificata per ogni popolazione e coppia di loci con il software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet et al., 2001) (18720 permutazioni; P-value per un livello di significatività di 0,01 con correzione secondo Bonferroni).

L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato testato secondo la procedura di Guo e Thompson (1992), tramite il software ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al., 2005) (100000 iterazioni MCMC; 1000 passi di de memorizzazione; P-value per un livello di significatività di 0,05 con correzione secondo Bonferroni).

La variabilità genetica intrapopolazione è stata misurata tramite le seguenti statistiche classiche: numero medio di alleli per locus (A), range allelico medio (R), eterozigotità media attesa (H_e) ed osservata (H_o), alleli privati (PA). Sono state inoltre calcolate: media dei quadrati delle differenze nelle dimensioni alleliche all'interno degli individui (MSD intra) e tra gli individui all'interno della popolazione (MSD inter), e ricchezza allelica (AR). Quest'ultima è una misura del numero di alleli per locus corretta per tener conto della dimensione del campione (El Mousadik & Petit, 1996; Comps et al., 2001); è ottenuta tramite l'utilizzo di un indice di rarefazione e rende possibile confronti tra popolazioni con numerosità campionaria diversa.

Sulla base delle frequenze alleliche è stato infine calcolato l'indice di diversità di Shannon (I ; Shannon, 1948). Sviluppato nell'ambito della teoria dell'informazione e ampiamente utilizzato nello studio di comunità ecologiche, questo indice non gode di altrettanta diffusione

nel campo della genetica di popolazione. Tuttavia, una serie di studi recenti (Sherwin et al. 2006; Rossetto et al. 2008) hanno mostrato, sia con simulazioni al computer che con dataset reali, che le proprietà statistiche di questo indice si prestano in maniera ideale per la misura dell'informazione genetica su scala multipla e per il confronto con altri indici di diversità di tipo non genetico. In particolare, rispetto alle statistiche comunemente utilizzate in genetica di popolazione, l'indice di Shannon ha il vantaggio di essere completamente gerarchico, cosicché ogni livello di diversità può essere incorporato nel successivo, senza che il valore dell'uno sia influenzato dall'altro (Sherwin, 2010).

Per il calcolo degli indici citati sono stati utilizzati i software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet et al., 2001), ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al., 2005), GENEPOP versione 4.1 (Raymond & Rousset, 1995) e GENALEX (Peakall & Smouse, 2006).

La divergenza genetica tra le varie popolazioni è stata stimata tramite gli indici di fissazione F_{ST} (Wright, 1965; Weir & Cockerman, 1984) e R_{ST} (Slatkin, 1995) per ogni coppia di popolazioni. R_{ST} è un indice specifico per i microsatelliti, che tiene conto, oltre che della frequenza allelica nelle popolazioni, anche delle informazioni molecolari associate alle dimensioni alleliche. Il calcolo è stato eseguito con il software ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al., 2005), impostando 1000 permutazioni (P-value per un livello di significatività di 0,05 con correzione secondo Bonferroni). I risultati sono stati rappresentati graficamente tramite la costruzione di alberi con il metodo neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987), per mezzo del software PHYLIP (Felsenstein, 1989).

Gli stessi indici sono stati utilizzati nell'Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA), per verificare in che misura la varianza totale delle frequenze alleliche è spiegata dalle differenze tra i gruppi (in questo caso le popolazioni) e quanta invece dalle differenze tra gli individui all'interno dei gruppi.

Una descrizione delle distanze genetiche esistenti tra individui/popolazioni è stata inoltre fornita dall'Analisi Fattoriale delle Corrispondenze (AFC) (Benzécri, 1973), condotta con il software GENETIX 4.052.2 (Belkhir et al., 1999). L'AFC consiste in un'indagine esplorativa per l'identificazione di associazioni tra variabili sulle cui relazioni non si possiedono informazioni a priori, e ben si presta per variabili qualitative come i diversi alleli ai vari loci. Gli oggetti analizzati (gruppi di individui) saranno visualizzati graficamente come una nuvola di punti in uno spazio costituito da due o tre assi fattoriali principali, scelti tra quelli che meglio spiegano le associazioni riscontrate tra le variabili. L'opzione "AFC 3D sulle popolazioni", implementata in GENETIX, permette di assegnare una priorità maggiore alla ricerca di associazioni tra individui della stessa popolazione; è possibile inoltre visualizzare

ciascuna popolazione come un unico individuo localizzato nel centro di gravità della popolazione stessa.

L'identificazione della struttura delle popolazioni che meglio si adatta ai nostri dati è stata effettuata mediante l'algoritmo di raggruppamento Bayesiano implementato nel software STRUCTURE versione 2.3.3 (Pritchard et al., 2000), che permette di classificare gli individui in cluster a partire dai loro genotipi multilocus, assumendo la presenza di equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) e di linkage equilibrium (LE) all'interno dei gruppi. Il numero di questi ultimi (K) e l'assegnazione degli individui a ciascuno di essi sono definite sulla base della probabilità a posteriori.

Si sottolinea come, per convenzione, di qui in avanti il termine "popolazione" verrà usato solo in riferimento all'insieme dei campioni provenienti da uno stesso sito, mentre per identificare i gruppi geneticamente omogenei, inferiti dai diversi algoritmi di clusterizzazione, si utilizzerà il termine "cluster" (o gruppi).

Si è scelto di utilizzare il modello di discendenza per mescolamento (admixture model), che prevede che gli individui possano avere antenati recenti in più di un gruppo e il modello delle frequenze alleliche correlate (Falush et al., 2003), che assume che le frequenze alleliche nei vari gruppi inferiti possano essere simili, a causa di migrazione o discendenza comune. La scelta finale del valore più probabile di K è stata effettuata con il metodo di Evanno et al. (Evanno et al., 2005).

Si è proceduto inizialmente con un'indagine esplorativa costituita da 5 corse indipendenti di 500000 iterazioni MCMC (con burnin di 125000), per un intervallo di K (numero dei cluster) compreso tra 1 e 15. L'analisi è stata poi ripetuta per un intervallo di K che comprende il valore risultato più probabile ed i quattro valori circostanti (da K-2 a K+2), portando il numero di iterazioni a 1000000 (con burnin di 250000) e mantenendo un numero di corse indipendenti pari a 5.

Un maggior potere di risoluzione nell'identificare differenziazione anche in presenza di struttura genetica debole può essere ottenuto tenendo conto delle distanze geografiche esistenti tra le popolazioni analizzate (Guillot et al., 2005a). A tale scopo si è utilizzato GENELAND versione 3.3 (Guillot et al., 2005b), un pacchetto aggiuntivo del programma per analisi statistiche R (R Development Core Team, 2009). GENELAND, pur basandosi su un modello con assunzioni genetiche analoghe a quelle di STRUCTURE (HWE e LE all'interno dei cluster inferiti), incorpora l'informazione geografica nell'algoritmo di inferenza bayesiana, nella forma di un debole prior, con l'assunzione che la maggior parte delle popolazioni esibisce un certo grado di struttura spaziale, e che la probabilità che due individui

appartengano allo stesso cluster decresce con l'aumentare della loro distanza geografica. Oltre al numero di cluster stimato come più probabile, il software fornisce come output anche la localizzazione spaziale delle discontinuità genetiche tra i suddetti cluster, in forma di una mappa.

Per l'analisi da noi effettuata sono stati utilizzati il modello delle frequenze alleliche non correlate e il modello spaziale di appartenenza alle popolazioni. Il modello delle frequenze alleliche non correlate è stato preferito al modello delle frequenze correlate in quanto quest'ultimo, sebbene si basi su assunti biologicamente più sensati per la maggior parte delle situazioni reali, sembra essere più incline a generare instabilità nell'algoritmo e più sensibile a scostamenti dalle assunzioni del modello (ad es. presenza di *isolation by distance*). In studi condotti su dataset simulati ha infatti mostrato in quasi tutti i casi performance peggiori rispetto al modello delle frequenze alleliche non correlate (Guillot et al., 2005a). Il modello spaziale di appartenenza alle popolazioni assume che il dominio spaziale di ogni popolazione possa essere approssimato dall'unione di un certo numero di poligoni e corrisponde ai pattern spaziali che ci si aspetta nel caso la differenziazione avvenga a causa di limitazioni del flusso genico dovute a barriere fisiche come strade, fiumi, montagne, zone fortemente antropizzate (Guillot et al., 2005a).

Sono state effettuate 5 corse indipendenti di 1000000 iterazioni ciascuna, con un thinning pari a 100 (una iterazione salvata ogni 100). L'analisi è stata poi ripetuta escludendo i campioni della popolazione ViS (rivelatasi frutto di un'introduzione; vedi discussione) e sui valori di probabilità di appartenenza ai cluster così ottenuti è stata basata la successiva fase di ricerca di correlazione tra dati genetici e variabili ambientali.

La presenza di deviazioni dall'accoppiamento casuale non dovute a discontinuità genetiche, come nel caso dell'*isolation by distance* (Frantz et al., 2009), può introdurre una fonte di errore nei metodi bayesiani di clusterizzazione, con una tendenza alla sovrastima del numero di gruppi inferiti (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003).

In una situazione in cui la distribuzione di una specie sia continua (senza quindi la presenza di barriere al flusso genico), ma l'accoppiamento sia ristretto solo a distanze limitate (per esempio a causa di scarse capacità di dispersione), le popolazioni più lontane possono risultare differenziate per un fenomeno detto *isolation by distance* (Wright, 1943) che consiste per l'appunto in un graduale aumento della differenziazione genetica con l'aumentare della distanza geografica tra le popolazioni.

L'ipotesi dell'assenza di correlazione tra le distanze genetiche e geografiche delle popolazioni oggetto di studio è stata testata utilizzando l'opzione ISOLDE della versione on line del

software GENEPOP 4.0.10 (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008).

Il metodo implementato in ISOLDE computa una regressione tra le distanze genetiche tra le varie popolazioni e le corrispondenti distanze geografiche (o il loro logaritmo); viene inoltre testata l'ipotesi nulla di assenza di correlazione attraverso un Mantel test (1000 permutazioni). Per le distanze genetiche sono stati utilizzati i valori di $F_{ST}/(1 - F_{ST})$, mentre come variabile indipendente si è scelto di usare il logaritmo naturale delle distanze geografiche (Rousset, 1997). Per il calcolo di queste ultime, le coordinate geografiche Long/Lat, rilevate tramite GPS (datum WGS84), sono state convertite in coordinate piane UTM (WGS84) tramite il software GRASS GIS versione 6.4.0 (Neteler & Mitasova, 2008).

A partire dai dati genetici in nostro possesso è stata stimata la dimensione effettiva delle popolazioni (N_e), un parametro molto importante in biologia evolutiva e genetica di conservazione. Da un punto di vista genetico, N_e è definita come la dimensione di una popolazione ideale, rispondente al modello di Wright-Fisher (Fisher, 1930; Wright, 1931), che esibisce gli stessi valori della popolazione reale nei riguardi di determinati parametri genetici (Crow & Kimura, 1970). Essa è responsabile degli attuali livelli di variabilità genetica neutrale ed inoltre determina l'entità degli effetti della deriva genetica casuale e della selezione a loci non neutrali (Frankham 1995; Higgins & Lynch 2001).

La stima di N_e è stata ottenuta attraverso il metodo del linkage disequilibrium (LD): in una popolazione isolata con accoppiamento casuale e per loci neutrali (non associati a loci soggetti a selezione), questo è infatti dovuto esclusivamente a fenomeni di deriva genetica e può essere utilizzato per una stima di N_e (Hill, 1981). È stato utilizzato il software LDNE (Waples & Do 2008), che implementa la correzione di Waples (2006) per minimizzare gli errori a cui la stima di N_e è soggetta quando si ha a che fare con un ampio range di dimensioni campionarie e di valori reali della dimensione effettiva. È stato assunto il modello di accoppiamento casuale; per la stima dell'intervallo di confidenza è stato utilizzato il metodo jackknife. Il programma calcola stime separate di N_e usando diversi criteri di esclusione per gli alleli rari; sono stati da noi testati i seguenti valori critici: $P_{crit} = 0,05; 0,02; 0,01$.

Un'altra stima della dimensione effettiva è stata inoltre ricavata con un approccio di Approximate Bayesian Computation (ABC), implementato dal software ONESAMP versione 1.2 (Tallmon et al. 2008) sulla base di alcune statistiche genetiche ad essa correlate. Il programma richiede l'indicazione di una soglia inferiore e superiore per la distribuzione di valori di N_e da utilizzare come prior. Per la scelta di tali valori soglia sono stati considerati i risultati precedentemente ottenuti con LDNE ed eventuali informazioni derivanti da censimenti effettuati o osservazioni personali, mantenendo tuttavia range piuttosto ampi.

La ricerca di eventuali tracce di recenti forti diminuzioni della numerosità effettiva nelle popolazioni studiate è stata eseguita con il software BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996). L'assunzione alla base del modello è che un evento di bottleneck genera un eccesso di eterozigosi, dovuto alla veloce perdita di alleli rari, che ha un effetto maggiore sulla diversità allelica che sull'eterozigosità (Hedrick et al., 1986). Attraverso questo metodo è però possibile rilevare solo forti riduzioni della numerosità effettiva che hanno colpito una popolazione in epoca recente (Cornuet & Luikart, 1996).

L'analisi è stata condotta impostando 1000 permutazioni sotto il modello mutazionale Two Phase Model (TPM), con varianza pari a 12, probabilità di SMM al 90% e livello di significatività di 0.05. La significatività è stata testata con il test di Wilcoxon, considerato il più potente e robusto nei casi, come il nostro, di un numero limitato di loci (< 20) (Piry et al., 1999).

La ricerca di segnali di bottleneck è stata effettuata anche in maniera qualitativa, secondo l'approccio grafico proposto da Luikart et al. (1998). Questo metodo si basa sul fatto che eventi di collo di bottiglia provocano una distorsione nella distribuzione delle frequenze alleliche a loci neutrali, con un caratteristico spostamento della moda. La distribuzione attesa delle frequenze alleliche in una popolazione che non ha subito colli di bottiglia è caratterizzata da una grande proporzione di alleli presenti a basse frequenze. Tradotto in forma grafica, raggruppando gli alleli riscontrati ai vari loci in classi in base alla loro frequenza e disegnando gli istogrammi che rappresentano la proporzione di alleli appartenenti a ciascuna classe, si ottiene una caratteristica distribuzione a forma di "L". Eventi di bottleneck provocano una diminuzione degli alleli rari (frequenza $< 0,1$), destinati a diventare meno abbondanti rispetto ad alleli appartenenti ad una o più classi di frequenza intermedie (ad es. 0,1-0,2). Si genera quindi una distorsione nella teorica distribuzione ad "L", identificabile graficamente.

2.4.2 Ricerca di correlazione tra dati genetici e parametri ecologico-ambientali

La ricerca delle correlazioni tra i valori degli indici di variabilità genetica relativi a ciascuna popolazione ed i corrispondenti parametri ecologico-ambientali è stata effettuata mediante il coefficiente di correlazione di Pearson, calcolato con il software per analisi statistica R (R Development Core Team, 2009).

I vari indici genetici hanno mostrato generalmente un alto grado di autocorrelazione; al fine di una semplificazione del data set, per tale gruppo di variabili è stata quindi implementata un'analisi delle componenti principali (PCA), mediante il software R.

La PCA (Principal Component Analysis) è una tecnica di riduzione della dimensionalità dei dati introdotta da Pearson (1901) e successivamente sviluppata da Hotelling (1933), che gode oggi di ampia diffusione nell'ambito della statistica multivariata (Jolliffe, 2002). Ha come idea centrale la riduzione di un numero più o meno elevato di variabili (rappresentanti altrettante caratteristiche degli oggetti analizzati e più o meno correlate tra loro), in alcune variabili latenti non correlate, che esprimono la maggior quota possibile della varianza presente nei dati (chiamate componenti principali). Ciò viene ottenuto tramite una trasformazione lineare delle variabili, che proietta quelle originarie in un nuovo sistema cartesiano, nel quale la nuova variabile con la maggiore varianza viene proiettata sul primo asse, la variabile nuova, seconda per dimensione della varianza, sul secondo asse, e così via. La riduzione della complessità avviene limitandosi ad analizzare le principali (per quota di varianza espressa) tra le nuove variabili ottenute.

Avendo a che fare con distribuzioni caratterizzate da diversi intervalli di variazione, ciascuna variabile è stata standardizzata sul proprio valore massimo: in questo modo le variabili hanno tutte la stessa scala e quindi lo stesso peso nel determinare le componenti principali (PCA standardizzata).

Per indagare la correlazione tra i pattern di clusterizzazione evidenziati a partire dai dati genetici (con l'approccio bayesiano implementato dal pacchetto GENELAND del software per analisi statistica R) e le variabili ambientali scelte, si è deciso di utilizzare la tecnica dell'analisi di ridondanza (RDA, Redundancy Analysis; Wollenberg, 1977).

L'analisi di ridondanza fa parte dei metodi di correlazione canonica, un insieme di tecniche di statistica multivariata comunemente usati per la ricerca di relazioni lineari tra due set di variabili. La correlazione canonica trova ampio impiego in ecologia, ad esempio per

descrivere le relazioni tra la distribuzione delle specie in una serie di località ed i corrispondenti parametri ambientali (Legendre & Legendre, 1998). A partire da una matrice di dati di risposta (variabile dipendente) e una matrice contenente i predittori (variabile indipendente) per ogni sito o individuo viene prodotto un sistema di assi ortogonali in cui vengono proiettati diagrammi di dispersione. L'analisi di ridondanza, nello specifico, è l'estensione della regressione multipla all'analisi multivariata dei dati; essa deriva, a partire da un insieme di variabili indipendenti, il numero minimo di variabili sintetiche che spieghi la maggior quantità possibile di varianza nell'altro insieme (contenente le variabili dipendenti). Come variabile di risposta per l'RDA è stata utilizzata la probabilità individuale di appartenenza ai cluster inferita da GENELAND, mentre per le variabili indipendenti, dato l'alto grado di autocorrelazione riscontrato tra gruppi di variabili (alta multicollinearità), sono state scelte sulla base di considerazioni ecologiche le seguenti variabili: uso del suolo (fattoriale), temperatura media annua, precipitazione annua e quota. Per una discussione approfondita sull'opportunità di effettuare una scelta su basi ecologiche delle variabili da utilizzare in analisi multivariata (al fine di minimizzare la complessità dei modelli utilizzati, particolarmente per dataset limitati), si fa riferimento a Ginzburg & Jensen (2004).

3. RISULTATI

Per i 13 loci microsatellite selezionati sono stati tipizzati complessivamente 320 individui, suddivisi in 12 popolazioni.

Il software MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) non ha evidenziato particolari errori di genotipizzazione dovuti ad alleli nulli o altri problemi di amplificazione.

Non è stata riscontrata nessuna associazione preferenziale (linkage disequilibrium) statisticamente significativa tra i loci analizzati.

Non sono stati rilevati scostamenti sistematici significativi dall'equilibrio di Hardy-Weinberg in nessuna popolazione e per nessuno dei loci. Solo 5 confronti su 156 (12 popolazioni x 13 loci) hanno mostrato deviazioni significative per $P < 0,05$ (dopo correzione secondo Bonferroni), come mostrato in Tabella 3.1.1.

3.1 VARIABILITÀ GENETICA INTRAPOPOLAZIONE

Nel complesso dei campioni di *Rana temporaria* analizzati, i 13 microsatelliti scelti sono risultati tutti polimorfici, con un numero totale di alleli per locus che varia da 3 a 28 (valore medio di 11,4). All'interno delle diverse popolazioni tuttavia alcuni loci hanno evidenziato un'assenza di polimorfismo: BFG202 per le popolazioni Ce2, DDB, PLa, Pas, Ron, ViS, ViT (in tutte è presente solo l'allele 103) e BFG072 per le popolazioni RMa e PoM (entrambe monomorfiche per l'allele 79).

Una descrizione dettagliata della variabilità dei vari loci nel dataset analizzato e nelle diverse popolazioni è riportata nella Tabella 3.1.2.

Locus	Range allelico	A tot	Popolazioni								
			Ce1			Ce2			Bon		
			A	H _o	H _e	A	H _o	H _e	A	H _o	H _e
BFG239	68-128	15	7	0,96	0,77	7	0,65	0,66	8	0,67	0,76
BFG202	99-107	3	2	0,08	0,08	1	-	-	3	0,17	0,21
BFG237	191-307	28	12	0,96	0,91	13	1,00	0,92	16	0,91	0,91
BFG129	269-397	28	8	0,76	0,83	7	0,88	0,82	14	0,94	0,91
BFG072	75-83	3	3	0,48	0,54	2	0,41	0,52	2	0,12	0,25
BFG099	102-118	5	5	0,56	0,54	4	0,59	0,53	3	0,54	0,52
BFG155	181-229	12	3	0,56	0,60	3	0,12	0,32	8	0,71	0,79
BFG050	99-115	4	2	0,68	0,51	3	0,53	0,54	3	0,51	0,52
BFG053	130-146	4	2	0,44	0,50	2	0,65	0,49	4	0,69	0,55
BFG161	177-217	9	5	0,64	0,68	6	0,82	0,64	7	0,66	0,75
BFG131	177-205	9	6	0,92	0,79	5	0,94	0,78	6	0,69	0,62
BFG250	243-327	16	7	0,72	0,67	8	0,76	0,76	11	0,85	0,88
BFG130	135-219	11	3	0,28	0,25	4	0,29	0,45	9	0,83	0,77

DDB			Fia			PLa			RMa			Pas		
A	H _o	H _e	A	H _o	H _e	A	H _o	H _e	A	H _o	H _e	A	H _o	H _e
5	0,67	0,64	7	0,92	0,82	10	0,87	0,84	6	0,83	0,78	6	0,65	0,77
1	-	-	2	0,08	0,15	1	-	-	3	0,33	0,45	1	-	-
8	0,86	0,84	17	0,93	0,93	18	0,87	0,91	12	0,86	0,88	10	0,84	0,84
10	0,80	0,73	16	0,85	0,92	15	0,81	0,93	10	0,81	0,86	9	0,75	0,82
3	0,52	0,53	2	0,07	0,14	3	0,43	0,54	1	-	-	2	0,27	0,37
2	0,05	0,05	4	0,48	0,55	4	0,65	0,61	3	0,61	0,56	3	0,24	0,24
2	0,05	0,05	6	0,74	0,75	4	0,30	0,48	7	0,83	0,82	2	0,11	0,10
2	0,62	0,51	2	0,41	0,51	3	0,35	0,40	2	0,11	0,11	2	0,57	0,49
2	0,33	0,28	3	0,41	0,37	3	0,61	0,46	2	0,61	0,47	2	0,35	0,51
3	0,43	0,50	8	0,78	0,77	6	0,83	0,73	3	0,69	0,66	4	0,38	0,39
3	0,38	0,51	5	0,56	0,45	8	0,91	0,77	3	0,25	0,27	4	0,49	0,47
7	0,95	0,79	10	0,89	0,88	7	0,91	0,84	7	0,72	0,77	9	0,73	0,81
3	0,50	0,67	4	0,48	0,55	5	0,65	0,59	3	0,31	0,54	6	0,65	0,65

PoM			Ron			ViS			ViT		
A	H _o	H _e	A	H _o	H _e	A	H _o	H _e	A	H _o	H _e
7	0,63	0,61	10	0,83	0,86	5	0,55	0,70	4	0,35	0,068
2	0,04	0,04	1	-	-	1	-	-	1	-	-
12	0,89	0,89	18	0,90	0,92	13	0,86	0,87	5	0,85	0,71
17	0,93	0,91	10	0,80	0,84	9	0,86	0,84	5	0,74	0,71
1	-	-	3	0,47	0,56	2	0,14	0,50	2	0	0,44
4	0,59	0,55	3	0,57	0,51	3	0,64	0,55	2	0,05	0,05
8	0,74	0,80	5	0,63	0,56	5	0,73	0,74	3	0,65	0,54
2	0,37	0,42	2	0,30	0,35	3	0,14	0,13	2	0,35	0,30
3	0,30	0,36	2	0,47	0,50	2	0,14	0,13	2	0,40	0,38
8	0,70	0,75	5	0,77	0,74	5	0,14	0,22	4	0,55	0,54
6	0,52	0,46	5	0,70	0,63	3	0,59	0,47	4	0,70	0,72
10	0,93	0,87	10	0,83	0,84	6	0,68	0,66	6	0,70	0,78
5	0,74	0,64	4	0,53	0,63	2	0,45	0,47	4	0,75	0,67

Tabella 3.1.1: Descrizione dei 13 loci microsatelliti e della loro variazione nelle popolazioni analizzate (A= numero di alleli; H_o= eterozigosità osservata; H_e= eterozigosità attesa). In grassetto le deviazioni significative dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (P<0,05 dopo correzione secondo Bonferroni).

I valori dei vari indici di variabilità genetica calcolati per ciascuna popolazione sono riassunti in Tabella 3.1.2.

<i>Popolazione</i>	<i>N</i>	<i>LP (95%)</i>	<i>A</i>	<i>R</i>	<i>AR media</i>	<i>PA</i>	<i>MSD intra</i>	<i>MSD inter</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>I</i>
Ce1	25	0,92	5,00	6,77	4,70	1	290,93	235,19	0,62	0,59	1,14
Ce2	17	0,92	5,00	6,69	5,00	3	246,64	221,26	0,59	0,57	1,10
Bon	35	1	7,23	9,30	6,25	4	247,83	241,73	0,64	0,65	1,40
DDB	21	0,77	3,92	6,77	3,78	2	282,89	262,87	0,47	0,47	0,87
Fia	27	1	6,62	7,92	6,01	3	245,2	266,37	0,58	0,60	1,30
PLa	23	0,92	6,69	8,30	6,22	5	238,23	270,47	0,63	0,62	1,33
RMa	36	0,92	4,77	5,46	4,32	1	86,88	94,92	0,54	0,55	1,07
Pas	37	0,92	4,62	6,15	4,26	1	168,28	201,43	0,46	0,50	0,99
PoM	27	0,85	6,54	8	5,85	2	209,44	232,86	0,57	0,56	1,22
Ron	30	0,92	6,00	7,69	5,38	0	227,6	201,61	0,60	0,61	1,26
ViS	22	0,92	4,54	5,23	4,26	0	106,57	133	0,45	0,48	0,94
ViT	20	0,92	3,38	5,92	3,34	1	314,37	256,84	0,47	0,50	0,88

Tabella 3.1.2: Indici di diversità genetica per le 12 popolazioni studiate (N= numero di individui tipizzati; LP= proporzione di loci polimorfici; A= numero medio di alleli per locus; R= range allelico medio; AR= ricchezza allelica; PA= numero di alleli privati; MSD intra= media dei quadrati delle differenze delle dimensioni alleliche interne agli individui; MSD inter= media dei quadrati delle differenze delle dimensioni alleliche tra gli individui all'interno della popolazione; H_e ed H_o eterozigotità media attesa e osservata sui loci; I= indice di diversità di Shannon)

Non si riscontrano differenze significative tra i valori medi di eterozigotità osservata e quelli attesi (z-test; livello di significatività 0,05).

Nel complesso delle 12 popolazioni studiate, per i 13 loci microsatelliti è stato riscontrato un numero medio di alleli per locus (A) pari a 5,36. I valori più alti si riscontrano nelle popolazioni Bon (7,23), PLa (6,69), Fia (6,62) e PoM (6,54); i valori più bassi in ViT (3,38), DDB (3,92), ViS (4,54) e Pas (4,62). Tale situazione viene ampiamente confermata dai valori di ricchezza allelica (AR); il valore medio di quest'ultima misura tra le varie popolazioni è di 4,95.

Il range allelico medio più basso viene raggiunto nella popolazione ViS (5,23), seguita da RMa (5,46) e ViT (5,92); i valori più alti corrispondono anche in questo caso a Bon (9,3) e PLa (8,3).

Il maggior numero di alleli privati è stato riscontrato nelle popolazioni PLa e Bon.

La media dei quadrati delle differenze delle dimensioni alleliche (MSD) tra gli individui all'interno della popolazione ha evidenziato i valori più alti nelle popolazioni ViT (314,37), Ce1 (290,93) e DDB (282,89), e i più bassi in RMa (86,88), ViS (106,57) e Pas (168,28).

Le popolazioni RMa e ViS si sono distinte in maniera netta anche per i valori più bassi di MSD tra gli individui all'interno della popolazione (rispettivamente 94,92 e 133), mentre i valori più alti in questo caso si sono avuti nelle popolazioni PLa (270,47) e Fia (266,37).

Per quanto riguarda l'eterozigosità attesa (H_e), i valori si sono attestati in un range relativamente costante (0,47-0,65), per una media di 0,56. Ancora una volta i valori più alti corrispondono alle popolazioni Bon (0,65) e PLa (0,62), mentre quelli più bassi a DDB (0,47), ViS (0,48), Pas e ViT (0,50).

L'indice di diversità di Shannon, infine, ha visto distinguersi per i valori più alti le popolazioni Bon (1,40), PLa (1,33) e Fia (1,30); DDB (0,87), ViT (0,88), ViS (0,94) e Pas (0,99), al contrario, raggiungono i valori più bassi. Il valore medio è risultato di 1,12.

3.2 DIFFERENZIAMENTO TRA POPOLAZIONI E STRUTTURA GENETICA

La stima del grado relativo di differenziamento tra le varie popolazioni fornita dagli indici di distanza genetica F_{ST} (Wright, 1965; Weir & Cockerman, 1984) e R_{ST} (Slatkin, 1995) è riportata in Tabella 3.2.1.

	Ce1	Ce2	Bon	DDB	Fia	Pla	Rma	Pas	PoM	Ron	ViS	ViT
Ce1	-	0,117	0,242	0,131	0,188	0,187	0,372	0,246	0,234	0,168	0,265	0,214
Ce2	0,039	-	0,175	0,020	0,212	0,044	0,417	0,024	0,283	0,011	0,351	0,255
Bon	0,128	0,129	-	0,108	0,056	0,175	0,151	0,189	0,095	0,157	0,227	0,255
DDB	0,165	0,127	0,185	-	0,132	0,020	0,310	0,050	0,196	0,014	0,250	0,191
Fia	0,128	0,121	0,026	0,176	-	0,181	0,039	0,277	-0,001	0,215	0,089	0,173
Pla	0,057	0,044	0,108	0,125	0,090	-	0,342	0,076	0,269	0,081	0,336	0,222
Rma	0,207	0,212	0,092	0,269	0,071	0,157	-	0,447	0,087	0,390	0,283	0,246
Pas	0,139	0,110	0,153	0,130	0,144	0,135	0,226	-	0,345	0,024	0,416	0,358
PoM	0,161	0,164	0,033	0,212	0,024	0,121	0,076	0,178	-	0,277	0,065	0,234
Ron	0,106	0,077	0,068	0,115	0,069	0,088	0,176	0,091	0,110	-	0,330	0,262
ViS	0,183	0,179	0,142	0,241	0,117	0,106	0,153	0,265	0,126	0,174	-	0,257
ViT	0,172	0,169	0,171	0,191	0,177	0,133	0,203	0,218	0,206	0,202	0,215	-

Tabella 3.2.1: Distanze genetiche a coppie tra le popolazioni considerate. I valori di F_{ST} sono riportati sotto la diagonale, quelli di R_{ST} sopra. Le differenze non significative sono indicate in grassetto, i restanti valori sono tutti statisticamente significativi ($P < 0,05$, dopo correzione secondo Bonferroni).

I valori di F_{ST} sono risultati tutti statisticamente significativi; la media corrisponde a $F_{ST} = 0,14$. Per quanto riguarda R_{ST} , alcuni confronti invece si sono evidenziati come non significativi, come indicato in Tabella 3.2.1.

La divergenza genetica maggiore si è riscontrata tra le popolazioni RMa-DDB e ViS-Pas per quanto riguarda i valori di F_{ST} (0,269 e 0,265 rispettivamente); RMa-Pas (0,447) e Ce2-RMa (0,417) per i valori di R_{ST} . Le coppie di popolazioni geneticamente più vicine per i valori di F_{ST} sono risultate invece Fia-PMa (0,024) e Fia-Bon (0,026).

La presenza di una struttura genetica è stata confermata dall'Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA), condotta utilizzando i valori di F_{ST} e R_{ST} . Rispettivamente il 14,08% (con F_{ST}) e il 20,78% (con R_{ST}) della varianza globale sono stati attribuiti alle differenze tra popolazioni.

La struttura genetica e il differenziamento tra popolazioni sono state messe in risalto graficamente dall'Analisi Fattoriale delle Corrispondenze (AFC), realizzata con il software GENETIX (Belkhir et al., 1999) (Fig. 3.2.1).

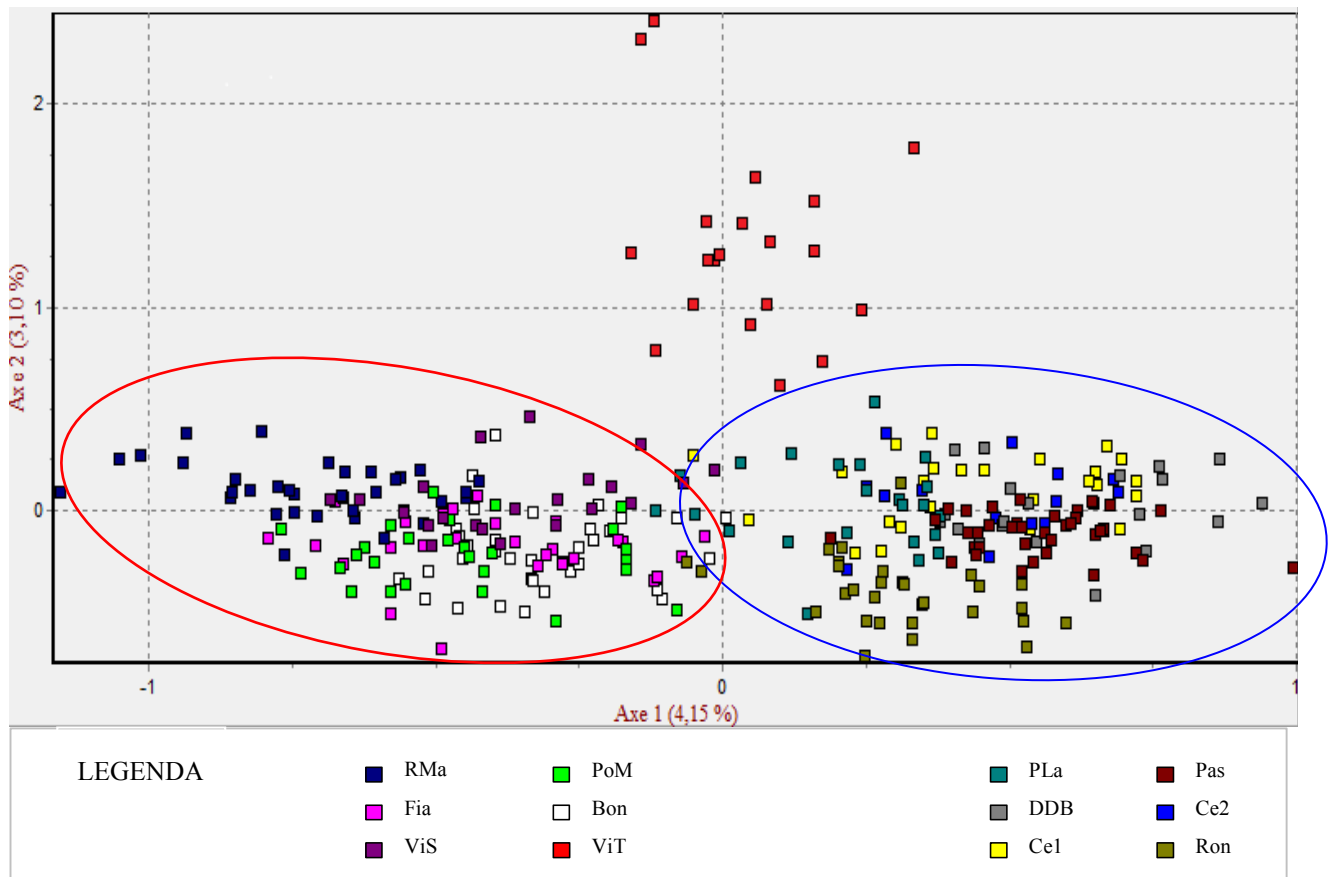


Figura 3.2.1: Analisi Fattoriale delle Corrispondenze (GENETIX). Campioni provenienti da popolazioni diverse sono rappresentati da colori diversi (vedi legenda). Le popolazioni della destra orografica del fiume Adige sono raggruppate sulla sinistra del grafico (ellisse rosso), le popolazioni della sinistra orografica si concentrano invece nella parte destra (ellisse blu). I campioni di ViT (quadrati rossi in alto) sembrano non appartenere a nessuno di questi due gruppi.

Dal grafico in Figura 3.2.1 è risultata evidente la presenza di un certo grado di struttura genetica nel complesso dei campioni analizzati. I punti corrispondenti ad individui della stessa popolazione si sono collocati in porzioni di grafico più o meno circoscritte, generalmente distinguibili. In particolare, si sono individuati tre raggruppamenti principali: le popolazioni che ricadono nella destra orografica del fiume Adige (ellisse rosso), le popolazioni che ricadono nella sinistra orografica del fiume Adige (ellisse blu) e la popolazione ViT.

Appare inoltre evidente che gli individui appartenenti a quest'ultima popolazione sono risultati geneticamente ben differenziati dagli individui di ViS (quadrati color viola), pur provenendo da siti riproduttivi distanti solo un 1 km.

La situazione descritta si è evidenziata in maniera ancor più netta con l'AFC in 3 dimensioni sul centro di gravità delle popolazioni, in cui ciascuna popolazione viene visualizzata come un singolo punto (Fig. 3.2.2).

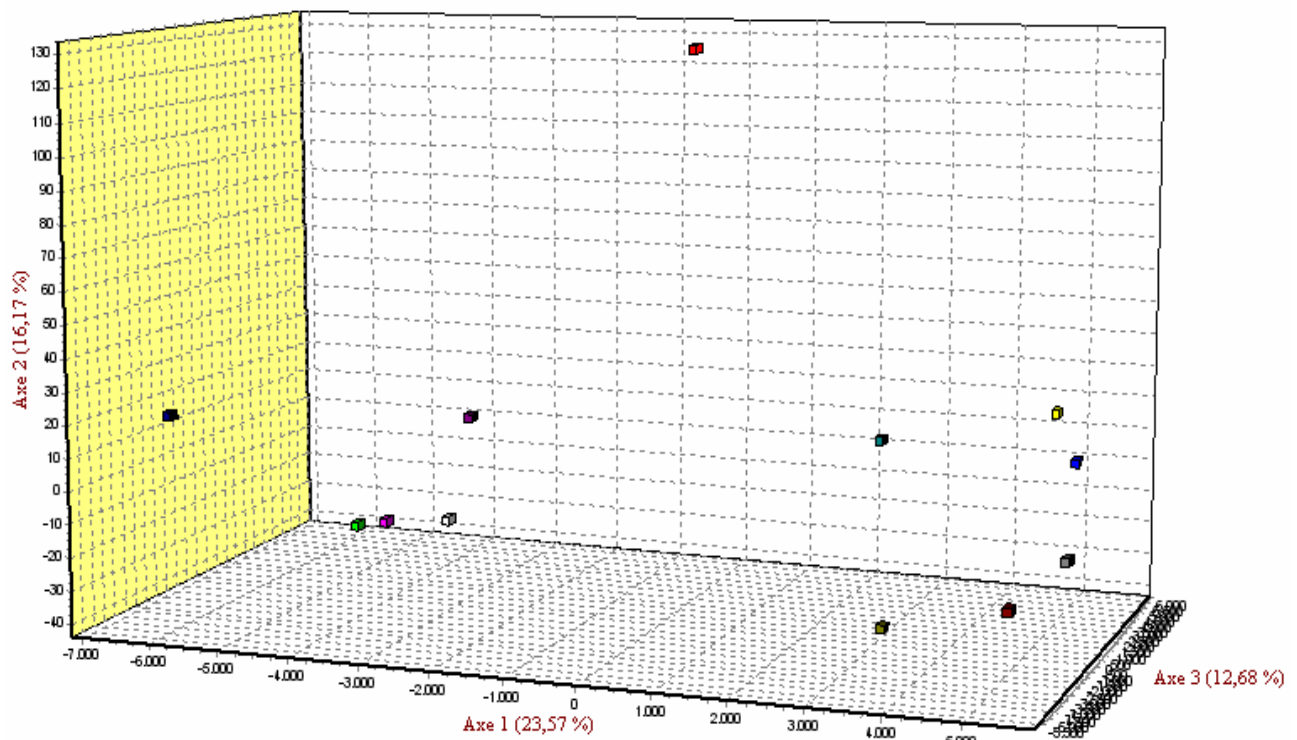


Figura 3.2.2: AFC 3-D sulle popolazioni. Ciascun punto rappresenta una popolazione. È evidente la presenza di 3 gruppi, uno dei quali rappresentato unicamente dalla popolazione ViT (in rosso, nella parte alta del grafico).

Una suddivisione tra le popolazioni di questo tipo è stata confermata anche dagli alberi neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) costruiti con il software PHYLIP (Felsenstein, 1989) sulla base dei valori di F_{st} e R_{st} , come si può notare in Figura 3.2.3.

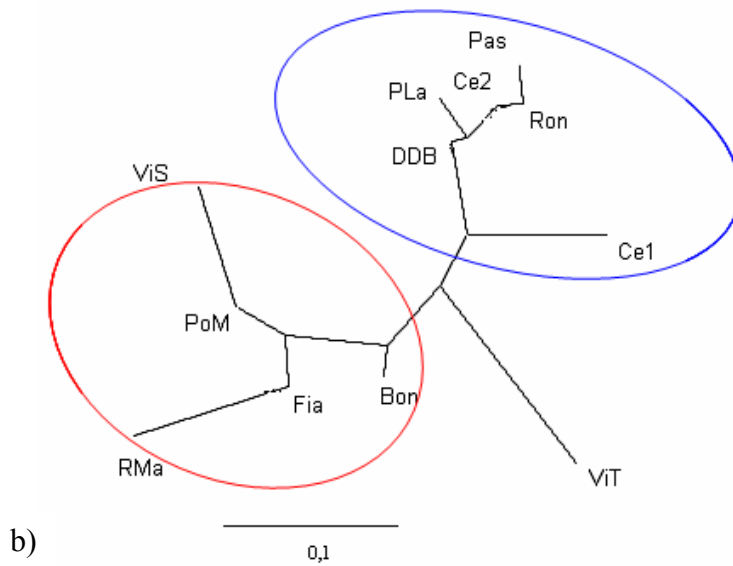
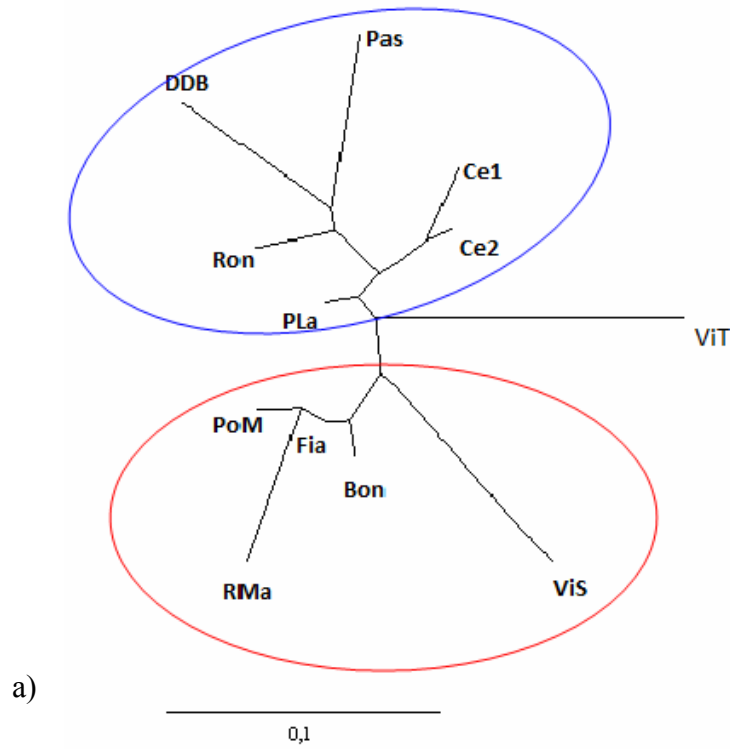


Figura 3.2.3: Alberi neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) delle popolazioni considerate, costruiti sulla base dei valori di FST (a) e RST (b). Le popolazioni della destra orografica del fiume Adige sono evidenziate dall'ellisse rosso, quelle della sinistra orografica dall'ellisse blu. La popolazione ViT costituisce in entrambi gli alberi un ramo intermedio.

Il metodo bayesiano di clustering implementato dal software STRUCTURE ha identificato come struttura di popolazione più probabile la presenza di 7 gruppi geneticamente distinti (K=7). I valori delle probabilità di appartenenza di ciascuna popolazione ai vari cluster sono riportati in Tabella 3.2.3.

Popolazione	<i>Probabilità di appartenenza ai cluster inferiti (STRUCTURE)</i>						
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7
Ce1	0,012	0,014	0,903	0,017	0,008	0,033	0,011
Ce2	0,03	0,008	0,855	0,012	0,006	0,079	0,01
Bon	0,013	0,821	0,017	0,018	0,051	0,063	0,017
DDB	0,842	0,007	0,015	0,013	0,006	0,109	0,009
Fia	0,024	0,776	0,018	0,009	0,09	0,045	0,038
PLa	0,026	0,04	0,447	0,03	0,03	0,333	0,094
RMa	0,006	0,015	0,006	0,011	0,94	0,006	0,017
Pas	0,92	0,009	0,036	0,006	0,006	0,017	0,007
PoM	0,018	0,742	0,011	0,01	0,138	0,043	0,039
Ron	0,044	0,019	0,018	0,007	0,01	0,89	0,012
ViS	0,007	0,023	0,013	0,057	0,027	0,015	0,857
ViT	0,01	0,006	0,008	0,961	0,006	0,005	0,006

Tabella 3.2.3: Probabilità di appartenenza di ciascuna popolazione ai vari cluster inferiti (STRUCTURE). In grassetto sono indicati i valori più alti, dai quali è possibile evincere la composizione più probabile di ciascun cluster.

Le popolazioni ViT e ViS, provenienti da due siti riproduttivi limitrofi, sono risultate ancora una volta ben differenziate tra loro, costituendo ciascuna un gruppo a sé.

Per ogni popolazione, la probabilità di appartenenza di ogni singolo individuo ai diversi cluster inferiti è mostrata in Figura 3.2.4. Si noti come, per K=7, la composizione genotipica delle varie popolazioni sia risultata relativamente omogenea: ciascuna di esse è costituita in massima parte da individui assegnabili con alte probabilità allo stesso cluster. L'unica eccezione è rappresentata dalla popolazione PLa, che, pur essendo costituita per più della metà da individui con alte probabilità di appartenenza al cluster 3 (Ce1+Ce2), possiede anche una discreta quota di individui caratterizzati da alte probabilità di appartenere al cluster 6 (Ron).

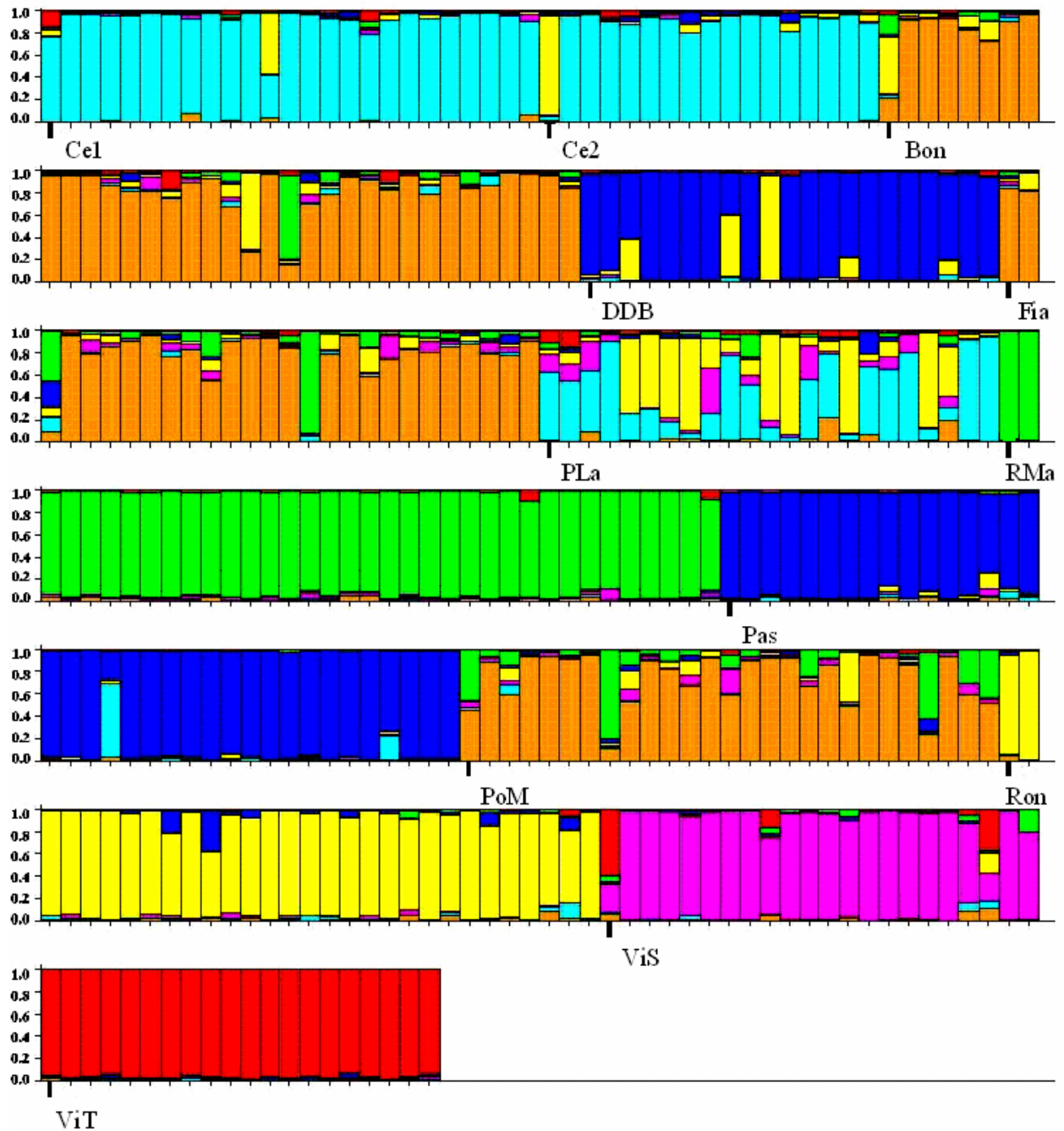


Figura 3.2.4: Struttura genetica inferita dal software STRUCTURE. Ogni individuo è rappresentato da un istogramma, suddiviso in segmenti colorati che corrispondono alle probabilità di appartenenza ai diversi cluster (indicate sull'asse delle ordinate). Gli individui sono raggruppati in base alle rispettive popolazioni di provenienza.

Gli esiti ottenuti si sono rivelati costanti per tutte le corse indipendenti effettuate.

La clusterizzazione bayesiana condotta tenendo conto anche dell'informazione geografica, effettuata con il software GENELAND, ha fornito un risultato analogo, individuando 7 gruppi che corrispondono esattamente a quelli inferiti da STRUCTURE. Una rappresentazione spaziale dei vari cluster è riportata nella mappa di Figura 3.2.5.

Per la stima delle probabilità di appartenenza ai cluster di ciascun individuo, su cui basare la ricerca di correlazioni con le variabili ecologico-ambientali, l'analisi con GENELAND è stata ripetuta escludendo dal dataset i campioni appartenenti alla popolazione ViS.

Come si discuterà più approfonditamente nel seguito, è emerso come quest'ultima popolazione sia in realtà frutto di un episodio di introduzione e pertanto, rappresentando dal punto di vista genetico un'anomalia rispetto alla vicina popolazione ViT (con la quale condivide peraltro le stesse condizioni ambientali), si è deciso di escluderla da questo tipo di analisi.

Eliminando la popolazione in questione, i cluster inferiti si sono ridotti a 6, senza nessuna variazione nelle modalità di raggruppamento delle varie popolazioni.

Una rappresentazione spaziale di ciascun cluster, con la visualizzazione delle discontinuità genetiche sul territorio oggetto dello studio è inclusa nell'Allegato 1.

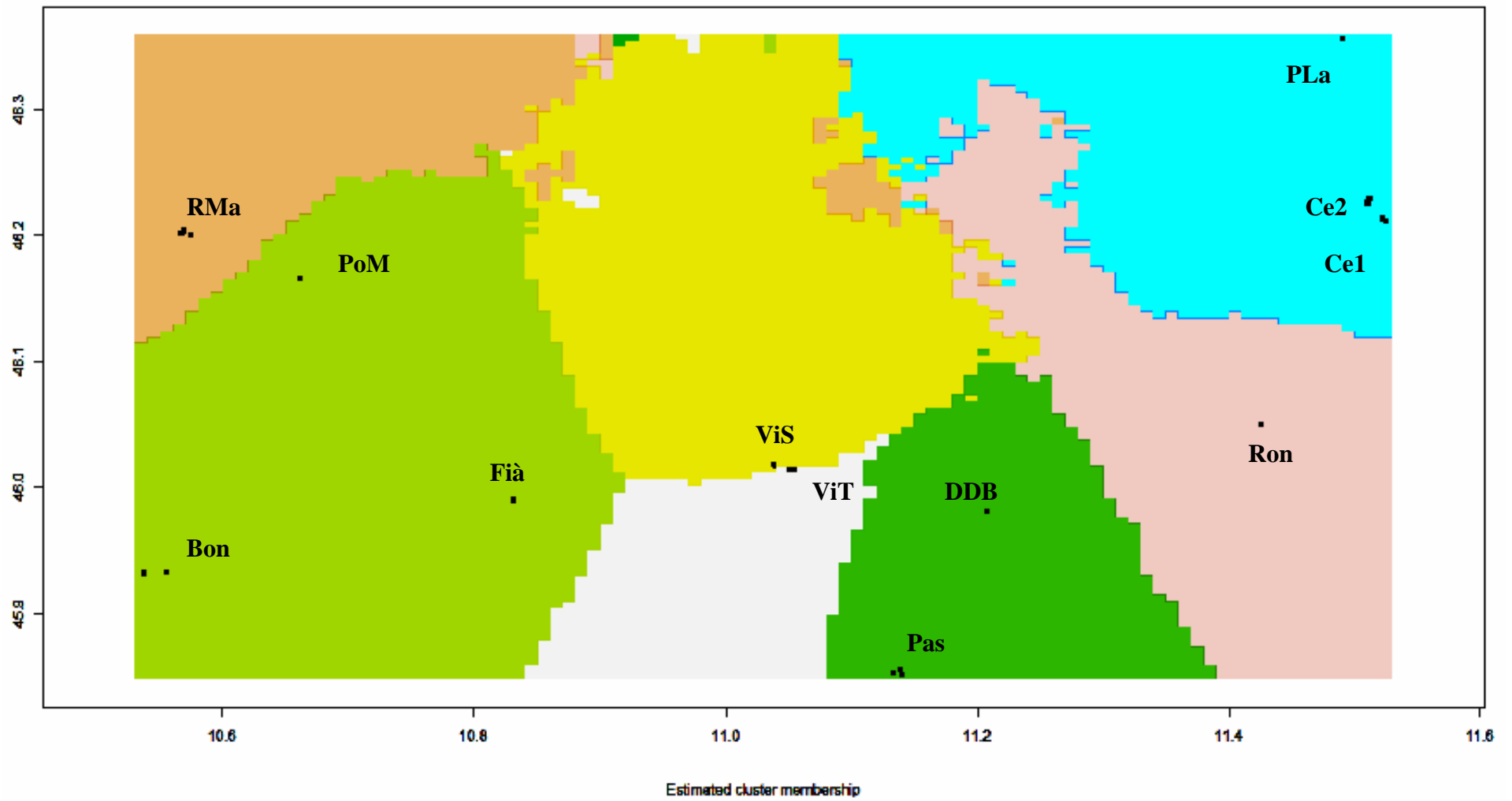


Figura 3.2.5: Rappresentazione spaziale dei sette cluster inferiti (GENELAND).

3.3 ISOLATION BY DISTANCE

Anche nel caso dell'analisi per il rilevamento di eventuale presenza di isolation by distance, è stata esclusa dal dataset la popolazione ViS, per i motivi già descritti in precedenza.

È stata evidenziata la presenza di una correlazione positiva tra distanze genetiche e distanze geografiche per coppie di popolazioni (ISOLDE; valore statisticamente significativo per $P < 0,05$). La retta di regressione risulta $y = -0,248 + 0.039x$ (Fig. 3.3.1).

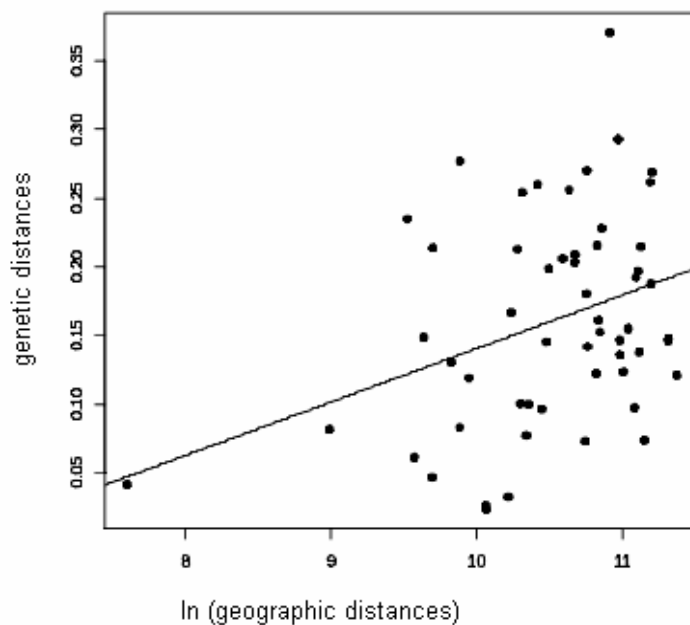


Figura 3.3.1: Regressione delle distanze genetiche tra popolazioni, espresse come $F_{st}/(1-F_{st})$, sul logaritmo delle distanze geografiche

La stessa analisi è stata poi ripetuta escludendo dalle matrici delle distanze i valori relativi al confronto Ce1-Ce2, le popolazioni caratterizzate dalla distanza geografica minore (poco meno di 2 km). Così facendo nell'analisi vengono considerati solo i confronti a coppie tra popolazioni distanti tra loro più del valore escluso (Fig. 3.3.2). La correlazione in questo caso non è risultata statisticamente significativa. Anche la pendenza della retta di regressione è diminuita, seppur non in maniera vistosa ($y = -0,15 + 0.029x$).

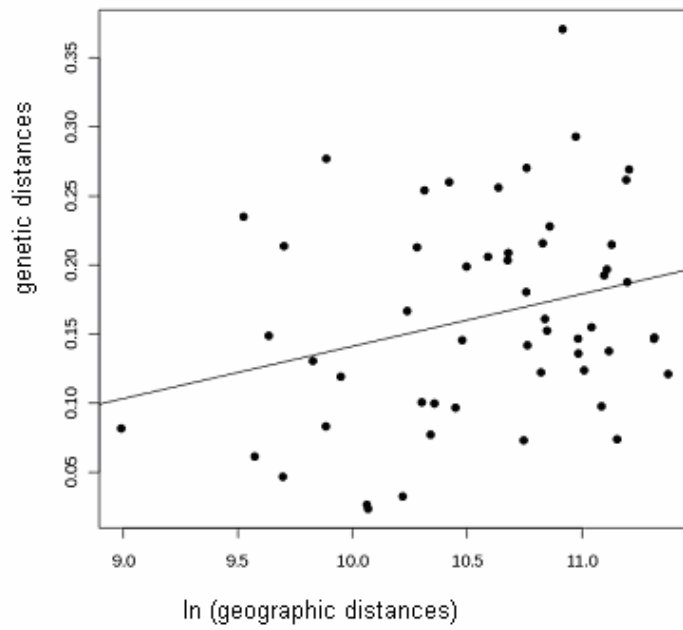


Figura 3.3.2: Regressione delle distanze genetiche tra popolazioni sul logaritmo delle distanze geografiche, escludendo le distanze Ce1-Ce2.

3.4 DIMENSIONE EFFETTIVA DELLE POPOLAZIONI

Le stime della dimensione effettiva delle varie popolazioni sono state ottenute con il metodo del *linkage disequilibrium* (software LDNE) e con un approccio di Approximate Bayesian Computation (ONESAMP), ed hanno fornito esiti diversi, come si può notare in Tabella 3.4.1.

Popolazione	N	LDNE ($P_{crit} = 0,05$)		ONESAMP		
		N_e	Intervallo di confidenza (95%)	Prior	N_e	Intervallo di confidenza (95%)
Ce1	25	27,1	15,8-60,5	2-100	30,1	25,9-38,4
Ce2	17	45,4	20,0-infinito	20-200	19,9	18,3-22,4
Bon	35	169,9	64,7- infinito	20-500	42,5	39-49,8
DDB	21	23,3	13,5-52,5	2-100	18,5	15,9-23,5
Fia	27	172,9	61,6-infinito	50-500	27	25,3-29,1
PLa	23	98,7	34,3-infinito	50-400	26,7	25-29,2
Pas	37	122,4	49,6-infinito	50-400	38,3	35,2- 43
PoM	27	163,7	53,3-infinito	20-400	29,4	26,7-33,4
Ron	30	80,6	38,7-874,3	4-300	43,7	38,1-60,1
ViS	22	38,4	18,6-207,1	2-100	28,7	24-41,2
ViT	20	22,2	12-58,4	2-50	19,6	16,7-25,1
RMa	36	399,8	64,2-infinito	20-1000	50,4	44,7-63,75

Tabella 3.4.1: Stime della numerosità effettiva (N_e) per ogni popolazione ottenute con i software LDNE e ONESAMP. Si noti come LDNE non sia in grado di fornire in alcuni casi un limite superiore dell'intervallo di confidenza; la causa probabile è una dimensione campionaria troppo piccola rispetto al valore reale di N_e (Waples & Do, 2008).

Il software LDNE offre la possibilità di ottenere stime separate escludendo gli alleli con frequenze inferiori a 3 valori critici ($P_{crit} = 0,05; 0,02; 0,01$). La presenza in analisi di loci con molti alleli rari può introdurre il rischio di una sovrastima del valore di N_e (Waples & Do, 2008).

Nel nostro specifico caso, utilizzando come valori critici 0,02 e 0,01, le stime di N_e fornite sono cresciute considerevolmente in quasi tutti i casi, fino a valori in taluni casi poco realistici o negativi (dati non mostrati). Valori negativi di N_e occorrono quando il vero valore della numerosità effettiva è grande e la dimensione del campione troppo piccola; l'interpretazione biologica corrisponde a $N_e = \infty$ (Waples & Do, 2008).

Si è deciso quindi di utilizzare 0,05 come valore soglia di frequenza, al di sotto della quale gli alleli vengono esclusi dalla computazione.

Le stime così ottenute con LDNE si sono attestate in un range relativamente ampio (27,1-399,8); al contrario ONESAMP ha fornito valori molto più simili nelle diverse popolazioni (19,9-50,4).

Come si può notare nella Tabella 3.4.1, le stime fornite da ONESAMP sono apparse subito correlate alla dimensione campionaria. Per testare l'ipotesi che utilizzando questo metodo la dimensione del campione influenzi fortemente l'esito della stima, è stata ripetuta l'analisi per la popolazione RMa con un dataset dimezzato casualmente (N= 18): il programma ha restituito un valore di N_e pari a 19,3, che si discosta dal valore di 50,4 ottenuto con il dataset completo di 36 campioni.

Basandosi sulle sole stime ottenute da LDNE, è stato possibile notare come tutte le popolazioni della parte occidentale del Trentino siano caratterizzate da alti valori di N_e (>100), con un massimo per la popolazione RMa (399,8). Le popolazioni con i valori più bassi di numerosità effettiva sono risultate invece essere ViT (22,2) e DDB (23,3).

3.5 EVENTI DI BOTTLENECK

ViT è stata l'unica popolazione che ha mostrato segnali di un recente collo di bottiglia, evidenziato da un eccesso di eterozigosi statisticamente significativo (livello di significatività: 0,05).

Per confermare il segnale rilevato è stata condotta un'indagine anche attraverso il metodo grafico basato sull'identificazione di eventuali distorsioni nella distribuzione delle frequenze alleliche (Luikart et al., 1998).

Gli alleli riscontrati ai vari loci sono stati raggruppati in 10 classi in base alla loro frequenza (software BOTTLENECK) e, per ciascuna classe, sono stati disegnati gli istogrammi che rappresentano la corrispondente proporzione di alleli. In una popolazione stabile, ci si attende una distribuzione delle frequenze alleliche tipicamente a forma di "L".

La distribuzione delle frequenze alleliche nella popolazione ViT è rappresentata in Figura 3.5.1.

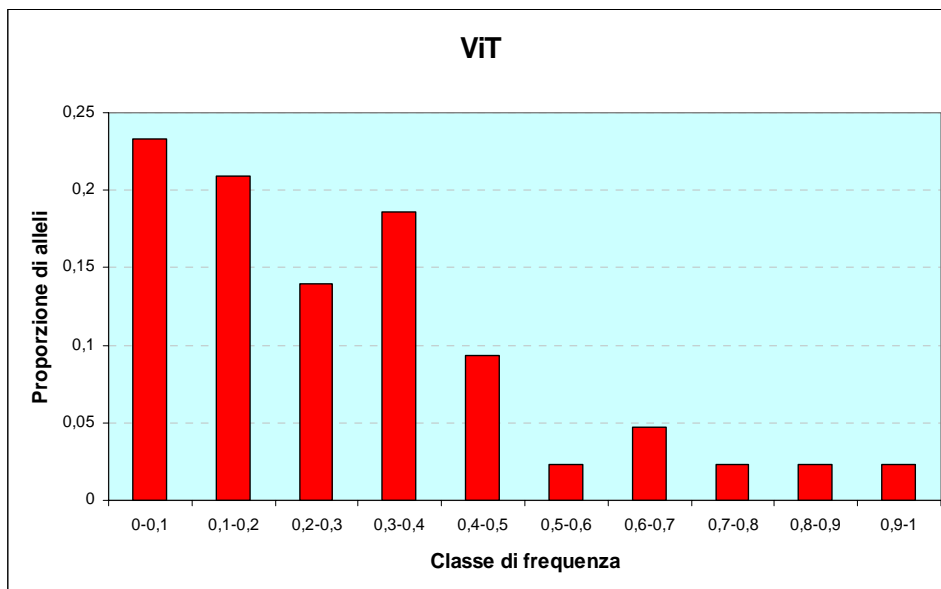


Figura 3.5.1: Distribuzione delle frequenze alleliche nella popolazione ViT. Sull'asse delle ascisse sono rappresentate le classi di frequenza allelica; l'asse delle ordinate corrisponde alla proporzione di alleli.

Condizione necessaria per concludere che una popolazione ha subito un recente collo di bottiglia è uno spostamento della moda nella distribuzione delle frequenze alleliche, rispetto al modello teorico ad L. In altre parole, alla classe di frequenza allelica più bassa deve corrispondere una proporzione di alleli minore di quella di una o più classi intermedie (Luikart et al., 1998).

Sebbene una tale condizione non si sia verificata nella popolazione ViT, come si può notare dal grafico in Figura 3.5.1, si è evidenziata una situazione di distribuzione non compiutamente ad L. La classe di frequenza più bassa è sì la più rappresentata, ma ad essa corrisponde una proporzione di alleli piuttosto bassa (0,23). Questo valore è solo di poco superiore a quello della classe di frequenza immediatamente successiva (0,21), e paragonabile a quello di altre classi intermedie (ad es. la classe 0,3-0,4). Appare evidente un certo grado di distorsione nella distribuzione delle frequenze alleliche rispetto all'ipotetica distribuzione di una popolazione stabile. La caratteristica forma ad L è risultata infatti appena riconoscibile. Tale situazione appare ancora più evidente in un confronto con le distribuzioni riscontrate nelle altre popolazioni (Fig. 3.5.2), che invece hanno mostrato una distribuzione con forma ad L.

Si ricorda come la distorsione nella distribuzione delle frequenze alleliche indotta da un evento di bottleneck dipende dalla sua intensità, ed è rilevabile solo per un numero limitato di generazioni (40-80), oltre le quali la deriva genetica e nuove mutazioni ristabiliscono lentamente le condizioni iniziali (Luikart et al., 1998).

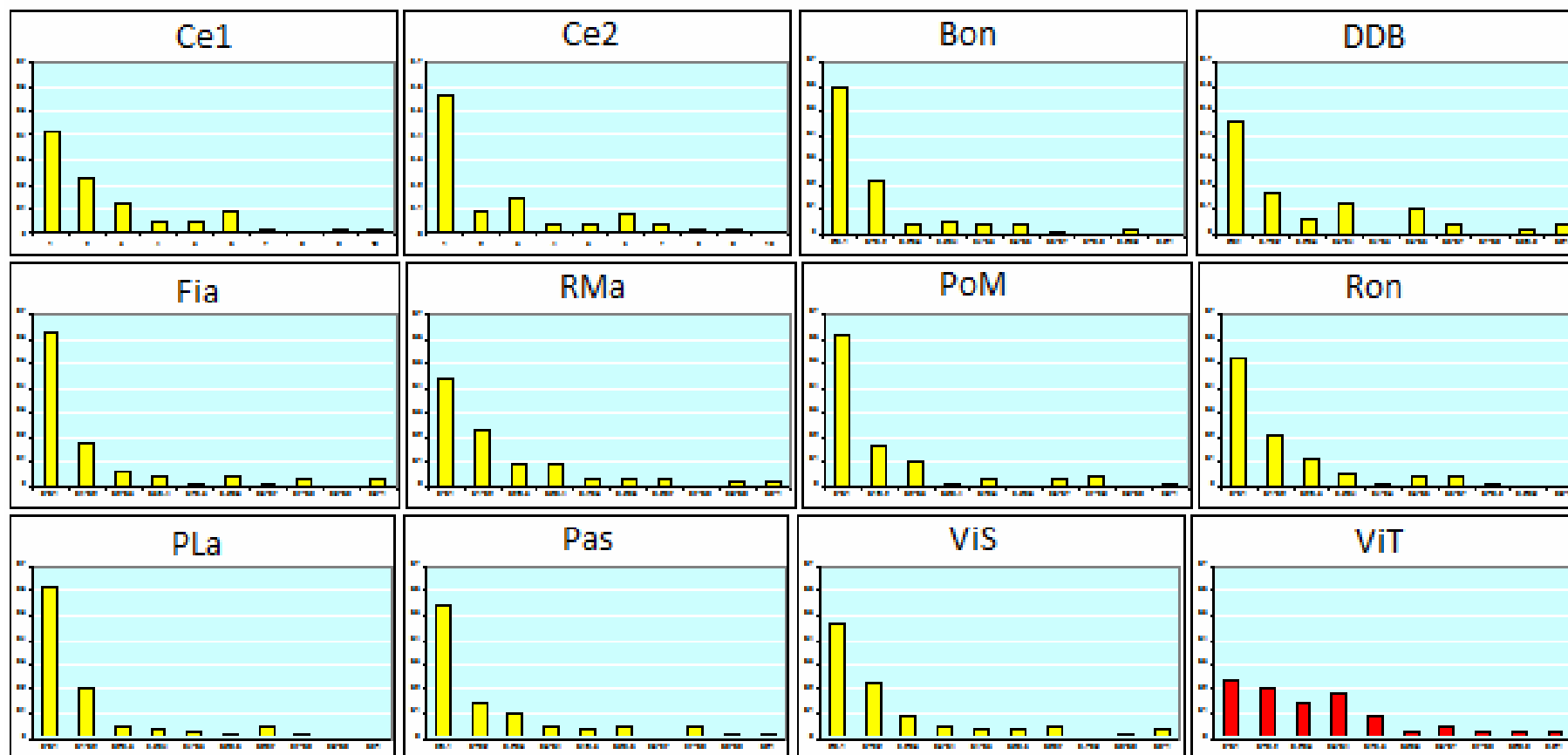


Figura 3.5.2: Distribuzione delle frequenze alleliche nelle 12 popolazioni di *Rana temporaria*. Sull’asse delle ascisse sono rappresentate le classi di frequenza allelica; l’asse delle ordinate corrisponde alla proporzione di alleli (0-1). Si noti la distribuzione ad “L” piuttosto evidente in tutte le popolazioni, ad eccezione della popolazione ViT (rappresentata da istogrammi di colore rosso), caratterizzata da una distribuzione molto più appiattita fino alle classi di frequenza allelica media.

3.6 CORRELAZIONE TRA DATI GENETICI E PARAMETRI ECOLOGICO-AMBIENTALI

3.6.1 Correlazione tra parametri ecologico-ambientali e variabilità genetica intrapopolazione

La PCA standardizzata, condotta per gli indici di variabilità genetica, ha individuato le due componenti principali PC1 (correlata con gli indici He, Ho, I, A, R, AR, ed in misura minore PA) e PC2 (a cui contribuisce in massima parte Ne), che spiegano nel complesso l'87,6 % della varianza presente nei dati.

Non è stato riscontrato nessun tipo di correlazione lineare statisticamente significativa tra le due componenti principali PC1 e PC2 così ottenute, ed i vari parametri ecologico-ambientali considerati (Tabella 3.6.1).

<i>Variabili ecologiche</i>	<i>PC1</i>	<i>PC2</i>
long	-0,161	-0,597
lat	0,238	0,033
elevation	-0,109	0,206
T° mean	0,054	-0,259
T° min	-0,025	-0,272
T° max	0,137	-0,112
T° mean spring	0,050	-0,264
T° min spring	-0,174	-0,282
T° max spring	0,138	-0,121
Prec sum	-0,157	0,577
Prec sum spring	0,057	0,643

Tabella 3.6.1: Coefficienti di correlazione di Pearson tra le componenti principali della PCA standardizzata, condotta per gli indici di variabilità genetica ed i fattori ecologico-ambientali (long= longitudine; lat= latitudine; elevation= quota stimata da modello digitale del terreno (DTM); T° mean, T° min e T° max= temperature medie, minime e massime annue; T° mean spring, T° min spring e T° max spring= temperature medie, minime e massime del periodo primaverile-estivo (aprile-luglio); Prec sum= precipitazioni annue; Prec sum spring= precipitazioni del periodo primaverile (aprile-giugno).

In particolare, i valori più alti del coefficiente di correlazione di Pearson (r) si riferiscono ai confronti PC2-Prec Sum e PC2-Prec Sum Spring. Per quanto riguarda il primo caso la correlazione è però risultata statisticamente non significativa ($P < 0,01$); considerando PC2-Prec Sum Spring, sebbene la correlazione sia risultata marginalmente significativa ($P < 0,05$), l'esito appare condizionato in maniera evidente dalla presenza di un valore outlier (vedi grafico di Fig. 3.6.1.1), che influenza fortemente il valore stimato di r . Pertanto, considerato anche l'esiguo numero di casi utilizzati, la validità statistica di quest'ultima associazione non può essere sostenuta con i soli dati in nostro possesso; sono quindi auspicabili studi più approfonditi ed estesi ad un numero maggiore di popolazioni.

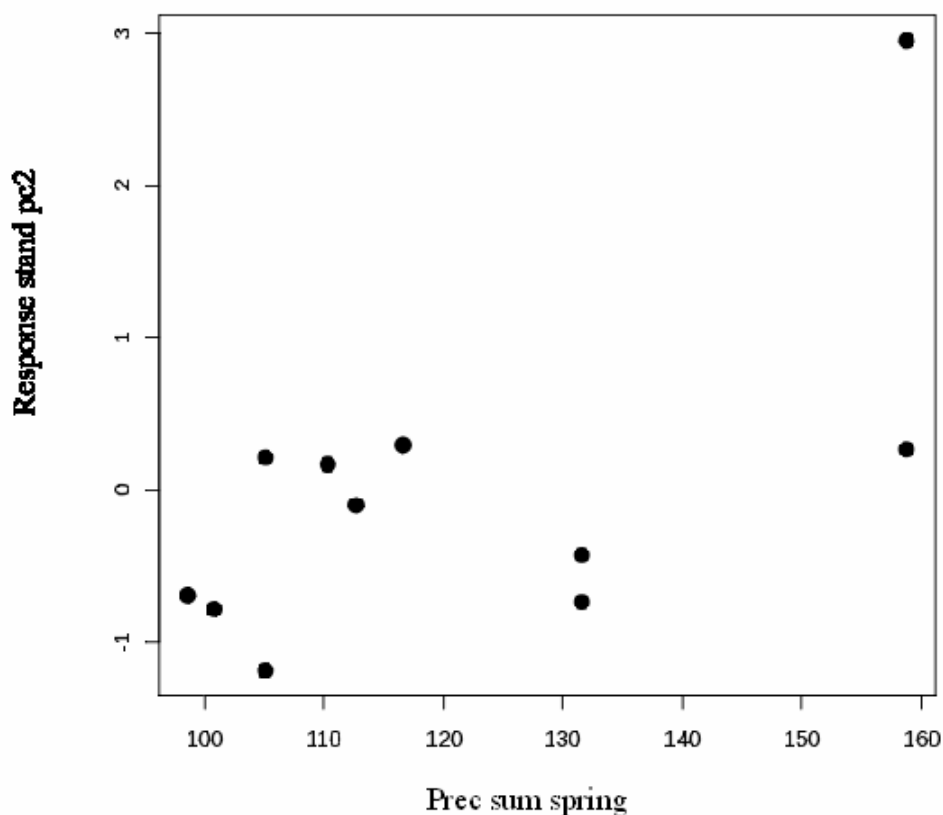


Figura 3.6.1.1: Diagramma di dispersione raffigurante i valori di precipitazione primaverile-estiva (Prec sum spring) in ascissa ed i valori della componente principale PC2 in ordinata. È evidente la presenza di un valore outlier, ben distante dalle altre osservazioni, nella parte in alto a destra del grafico.

L'unico possibile trend che si ritiene opportuno segnalare è quello emerso tra la longitudine e la componente principale PC1: i livelli più alti di quest'ultima corrispondono ai valori più bassi e più alti di longitudine (estremi ovest ed est dell'area di studio), con un picco negativo per longitudini intermedie. La componente PC1, e di conseguenza gli indici di variabilità

genetica che vi contribuiscono in misura maggiore, sembrano quindi manifestare, nei confronti della longitudine, un andamento descrivibile in maniera largamente approssimata da una parabola con concavità verso l'alto (Fig. 3.6.1.2). Si è deciso, dato l'esiguo numero di punti (11), di non ricorrere a nessun tipo di plottaggio polinomiale, limitandosi ad una descrizione qualitativa del pattern riscontrato.

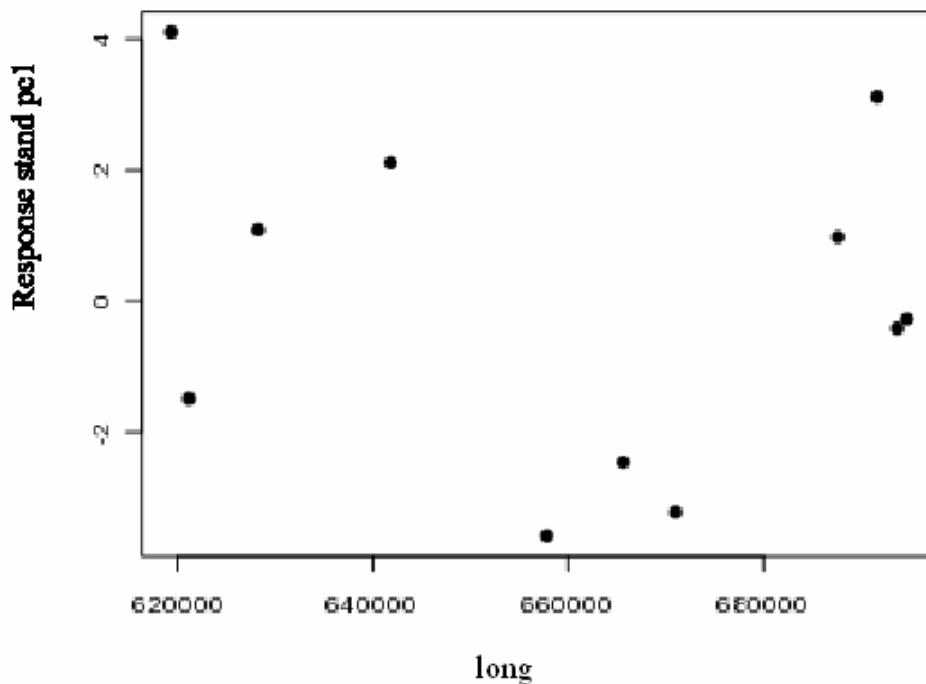


Figura 3.6.1.2: Diagramma di dispersione raffigurante i valori di longitudine in ascissa ed i valori della componente principale PC1 in ordinata.

3.6.2 Associazione tra parametri ecologico-ambientali e struttura genetica delle popolazioni

Per quanto riguarda la relazione tra la probabilità a posteriori di appartenenza ai cluster di ciascun individuo (GENELAND) e le caratteristiche ecologico-ambientali dei siti di campionamento, sia il modello RDA nel suo complesso che i primi due assi (mostrati in Figura 3.6.2) sono risultati statisticamente significativi (test ANOVA; 1000 permutazioni, $P < 0,01$). Anche le variabili utilizzate, sono risultate tutte statisticamente significative per $P < 0,01$ (test ANOVA; 1000 permutazioni).

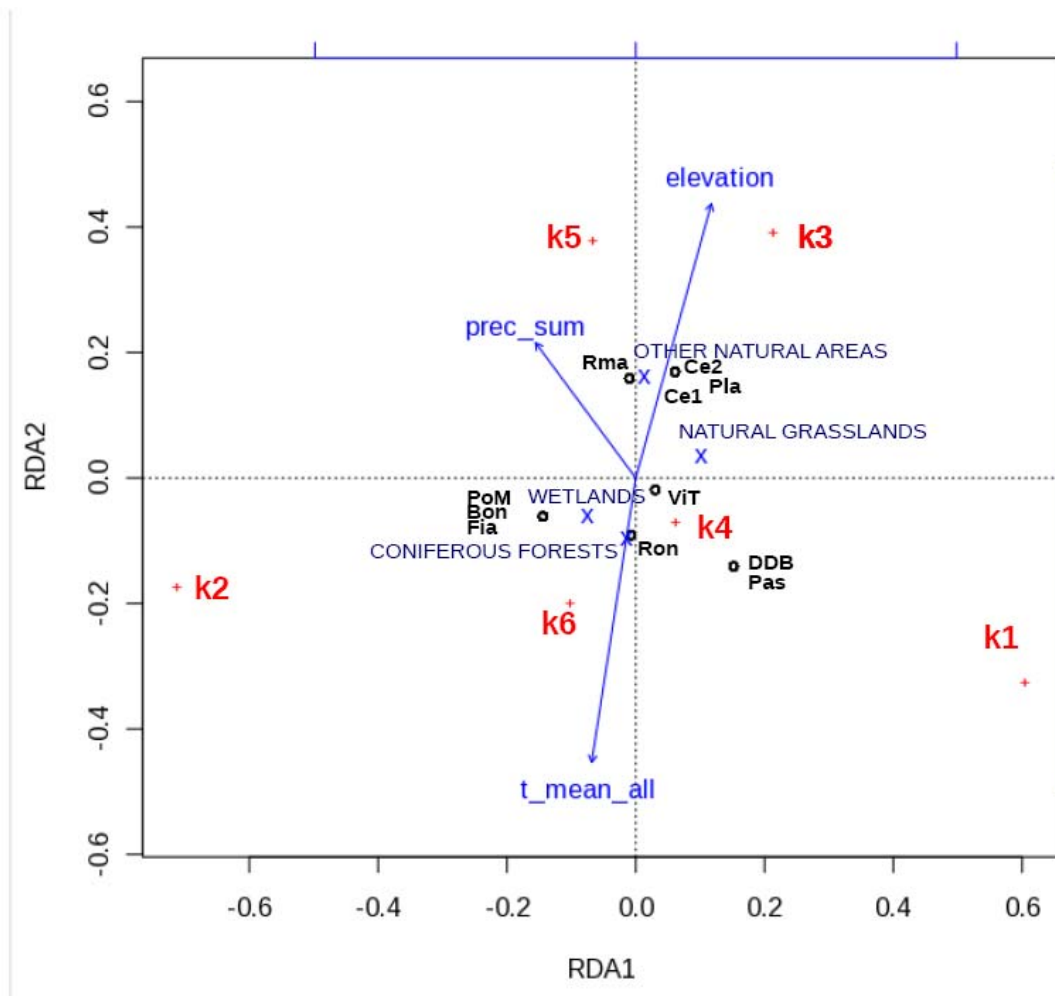


Figura 3.6.2: Grafico dell'analisi di ridondanza (RDA), per l'identificazione di correlazioni tra la struttura delle popolazioni inferita da dati genetici (GENELAND) e i parametri ecologico-ambientali. Le probabilità di appartenenza a ciascun cluster, che rappresentano le variabili di risposta, sono indicate da croci rosse; per quanto riguarda i predittori, temperatura media annuale, precipitazione annua, quota (variabili continue) sono raffigurate da frecce blu, l'uso del suolo (fattore) da croci blu. I pallini bianchi con contorno nero rappresentano i "sites scores" dei vari siti di campionamento, ovvero le combinazioni lineari delle variabili ecologiche proiettate sugli assi RDA1 e RDA2. Si noti come vi siano sovrapposizioni tra siti. (Legenda dei cluster inferiti da GENELAND: K1= Pas, DDB; K2= PoM, Bon, Fia; K3= Ce1, Ce2, PLa; K4= ViT; K5= RMa; K6= Ron).

Come si evince dalla Figura 3.6.2, le posizioni reciproche in cui sono stati proiettati i siti sul grafico dell'RDA corrispondono alla clusterizzazione inferita su base genetica (vedi legenda dei cluster). Le distanze tra di essi variano tuttavia considerevolmente (sebbene in maniera generalmente lineare) se si considera la clusterizzazione genetica (che mantiene i gruppi ben separati) piuttosto che il raggruppamento dei siti sulla base della combinazione delle condizioni ambientali (che posiziona la nuvola di punti nella parte centrale del grafico).

Nello specifico, i siti Ce1, Ce2 e PLa sono stati proiettati nello stesso punto del grafico, nel quadrante in alto a destra, caratterizzato da quote elevate, basse temperature, precipitazioni di media entità e, per quanto riguarda uso del suolo, da praterie naturali o altre aree naturali. Tutti i siti citati fanno parte dello stesso cluster genetico (K3), che pure ricade nello stesso quadrante del grafico.

Il sito RMa, che da solo costituisce il cluster K5, è stato collocato in prossimità dei siti precedenti. RMa ha una localizzazione nell'estremità opposta dell'area di studio rispetto ai siti Ce1, Ce2 e PLa, ma condivide con tali siti quote elevate (e di conseguenza temperature basse). Anche per quanto riguarda l'uso del suolo, RMa mostra affinità con Ce1 e PLa (altre aree naturali) ed in misura minore con Ce2 (praterie naturali).

I siti PoM, Bon e Fia, sono stati rappresentati da un unico punto nel quadrante in basso a sinistra del grafico. Bon e Fia condividono la stessa classificazione per quanto riguarda uso del suolo (aree umide), sia tra loro che con i siti Ron e ViT, posti in zone del grafico relativamente vicine. Tuttavia PoM (foreste di conifere) non condivide tale caratteristica, ed è stato posizionato tra l'altro in un punto del grafico ben lontano dall'unico sito con cui condivide l'uso del suolo (DDB).

Il già citato raggruppamento PoM, Bon e Fia corrisponde alla clusterizzazione inferita da GENELAND; il cluster genetico corrispondente (K2) è stato posizionato però all'estrema sinistra del grafico, ben lontano da K6 (corrispondente a Ron) e K4 (ViT): ciò è in contrasto con la relativa vicinanza nel grafico del gruppo di siti PoM-Bon-Fia con Ron e ViT, desunta sulla base della combinazione dei fattori ambientali.

Ron e ViT sono stati proiettati in punti relativamente vicini, nella parte centrale del grafico. I principali fattori ecologici responsabili di tale raggruppamento sembrano essere l'uso del suolo (aree umide per entrambi i casi) e, in minor misura, i livelli di precipitazione relativamente bassi. Per quanto riguarda il primo punto è bene tuttavia precisare che, nonostante la classificazione comune, si tratti in realtà di habitat profondamente diversi: torbiera di quota medio-alta (ViT) e stagno in bosco ripariale di fondovalle (Ron).

Nel quadrante in basso a destra del grafico sono stati infine proiettati i siti DDB e Pas, più vicini però a K4 (ViT) che a K1 (il loro cluster di afferenza secondo il criterio genetico). Questi ultimi due siti condividono valori relativamente bassi di precipitazioni, caratteristica in comune con ViT e Ron, i siti a cui risultano più vicini nel grafico. Altri siti caratterizzati da bassi valori di precipitazione, come ad es. PLa e Bon, sono stati tuttavia collocati in altre zone del grafico.

4. DISCUSSIONE

4.1 VARIABILITÀ GENETICA INTRAPOPOLAZIONE

Rana temporaria è considerata, sia da un punto di vista morfologico che genetico, la più variabile tra tutte le rane rosse paleartiche (Veith et al., 2003).

I valori di eterozigosità attesa (H_e) nelle popolazioni oggetto del nostro studio si mantengono in un range relativamente costante (0,47-0,65), per una media di 0,56. La ricchezza allelica appare più variabile tra le diverse popolazioni, con un range che va da 3,34 (ViT) a 6,25 (Bon), ed una media di 4,95.

I livelli di variabilità genetica riscontrati all'interno delle popolazioni trentine di *Rana temporaria* possono considerarsi, nel complesso, in linea con quelli riportati per la specie da altri autori, una volta debitamente considerata soprattutto la diversa scala spaziale. Ad esempio, Brede & Beebee (2006), in uno studio di variabilità a 8 loci microsatelliti in 13 popolazioni di *Rana temporaria* provenienti da tutta Europa (Austria, Germania, Francia; Spagna, Svezia, Irlanda, Regno Unito), riportano un valore medio di H_e pari a 0,687 (range 0,615-0,745) e una ricchezza allelica di 5,47 (range 4,61-6,12). Lo studio in questione è stato eseguito utilizzando un set di microsatelliti altamente polimorfici, con un numero medio di alleli per locus, nel complesso di tutti i campioni analizzati, pari a 21, di molto superiore a quello registrato per il nostro dataset (5,36). Palo et al. (2004), per 29 popolazioni di *Rana temporaria* (18 delle quali provenienti dalla Scandinavia; le restanti 11 da Francia, Germania, Polonia, Romania, Russia, Spagna, Svizzera e Regno Unito), riportano un valore medio di H_e pari a 0,535 (range 0,35-0,72), riferito ancora una volta ad un set di 8 loci microsatelliti (con un valore medio di alleli per locus di 24,8). La ricchezza allelica riscontrata varia in un range da 3,5 a 7,3 (media 3,9).

Tornando alle popolazioni del presente studio, si evidenzia come ViT presenti valori bassi (in relazione alle altre popolazioni) in tutti i più importanti indici di variabilità genetica. A questa popolazione corrispondono infatti i valori minimi riscontrati per numero medio di alleli per locus (3,38) e ricchezza allelica (3,34); anche i valori di indice di diversità di Shannon, eterozigosità attesa e osservata sono tra i più bassi. Altre popolazioni che presentano valori relativamente bassi per i più importanti indici di diversità sono DDB, Pas e ViS.

4.2 DIFFERENZIAMENTO TRA POPOLAZIONI E STRUTTURA GENETICA

Generalmente gli anfibi utilizzano habitat riproduttivi discontinui e sono caratterizzati da basse capacità di dispersione ed un alto grado di filopatria (Duellman & Trueb 1986, Sinsch 1990, Blaustein et al. 1994, Beebee 1996, Berry 2001). Ci si attende dunque un grado di differenziazione genetica relativamente alto anche a distanze geografiche piccole (Hitching & Beebee, 1997; Veith et al., 2002).

Tutti i tipi di analisi da noi effettuate sono concordi nell'evidenziare un grado di differenziamento piuttosto alto tra le popolazioni di *Rana temporaria* dell'area di studio.

Il valore medio di F_{ST} riscontrato tra le nostre popolazioni è di 0,14. Vi sono tracce di differenziazione, seppur debole, anche su scala microgeografica, evidenziate da un valore di F_{ST} pari a 0,039 tra le popolazioni Ce1 e Ce2, distanti tra loro poco meno di 2 km. Tale valore è solo di poco inferiore a quello tra la stessa popolazione Ce2 e PLa, che distano ben 16 km l'una dall'altra, ed è superiore a quello tra le coppie Fia-PMa (0,024) e Fia-Bon (0,026).

Nel già citato studio di Brede & Beebee (2006), il valore medio di F_{ST} tra le popolazioni indagate, provenienti da tutta Europa e distanziate perciò centinaia di chilometri, risulta pari a 0,2.

Per popolazioni provenienti da un'area che comprende tutta la regione fennoscandinava si riporta un F_{ST} medio pari a 0,229, per un range da 0,01 a 0,451 (Palo et al., 2004). Il valore minimo si riferisce a due popolazioni distanti circa 100 km; tuttavia tra 2 popolazioni distanziate solo 3,5 km è stato rilevato un F_{ST} di 0,03.

L'elevato grado di differenziamento ($F_{ST}= 0,182$) riscontrato tra le popolazioni ViS e ViT, situate ad un solo chilometro l'una dall'altra, rappresenta un'anomalia che si spiega facilmente alla luce di informazioni storiche sul sito in questione raccolte nel corso del presente studio. La popolazione ViS rappresenta infatti il frutto di un episodio di introduzione, effettuato allo scopo di popolare uno stagno artificiale di recente costruzione. Pur non disponendo di informazioni certe, sembra che gli individui utilizzati per l'introduzione non provengano dalla vicina torbiera, ipotesi che sembra la più plausibile considerando la notevole diversità genetica e la bassa numerosità di quest'ultima popolazione, che ne rende difficile il reperimento degli animali.

Sia l'Analisi Fattoriale delle Corrispondenze che i metodi di clusterizzazione bayesiani dei software STRUCTURE e GENELAND hanno evidenziato la presenza di una struttura

genetica evidente.

Dall'AFC emergono due raggruppamenti principali, che comprendono le popolazioni provenienti da siti localizzati rispettivamente nella destra e nella sinistra orografica del fiume Adige. Rimane estranea a questa suddivisione la popolazione ViT, che sembra costituire un gruppo a sé. Tale situazione viene confermata dagli alberi neighbour-joining costruiti sulla base dei valori di F_{ST} e R_{ST} .

Questa prima suddivisione generale tra le popolazioni indagate appare molto interessante, proponendo per il fiume Adige il ruolo di forte barriera geografica al flusso genico di questa specie. Si potrebbe ipotizzare inoltre che una simile situazione possa derivare da ragioni storico-biogeografiche, il cui approfondimento tuttavia tale aspetto esula dagli obiettivi di questo studio.

L'approccio bayesiano aumenta il potere di risoluzione, rilevando la presenza di 7 cluster. I metodi implementati dai software STRUCTURE e GENELAND conducono a risultati perfettamente concordi. La popolazione ViT mantiene il carattere di unicità evidenziato dall'AFC, formando un gruppo a sé. Anche la popolazione ad essa limitrofa, ViS, frutto di introduzione, clusterizza da sola, a conferma della sua estraneità dal pool genico locale.

Tralasciando queste ultime due popolazioni, la rappresentazione spaziale dei cluster fornita da GENELAND mostra un più alto grado di differenziamento per il Trentino orientale (tre cluster) rispetto al Trentino occidentale (due soli cluster). Questa tendenza è riconoscibile anche nell'AFC, con le popolazioni della parte orientale dell'area di studio rappresentate da nuvole di punti più distanziate le une dalle altre rispetto a quelle della parte occidentale.

Il pattern di clusterizzazione rispecchia solo in parte le distanze geografiche tra le varie popolazioni: appare ad esempio una separazione netta tra le popolazioni RMa e PoM, situate ad una distanza di circa 8 km, valore ben minore della distanza tra la stessa PoM e Fia (23 km), tra Fia e Bon (23 km) e tra PoM e Bon (27 km), tre popolazioni raggruppate nello stesso cluster; spostando l'attenzione nella parte orientale del territorio studiato, che appare caratterizzata da un maggior grado di differenziazione, le popolazioni Ce1 e PLa appartengono allo stesso cluster, pur distando 14 km (valore anche in questo caso maggiore rispetto alla distanza RMa-PoM).

4.3 ISOLATION BY DISTANCE

L'analisi effettuata con o senza il confronto tra le due popolazioni geograficamente più vicine (Ce1-Ce2) ha dato esiti diversi: debole ma significativa correlazione tra distanze genetiche e geografiche nel primo caso, correlazione non significativa nel secondo.

Un'interessante analisi della differenziazione tra popolazioni di *Rana temporaria* è stata condotta su scala gerarchica da Johansson et al. (2006). Il disegno di campionamento adottato può essere così schematizzato: tre regioni poste ad una distanza che varia in un range da 208 a 885 km (Nord, Centro e Sud della Svezia), suddivise in tre sottoregioni, in ciascuna delle quali sono state individuate 9 popolazioni (distanti 5-20 km). Nell'insieme del territorio considerato è stato evidenziato un pattern di *isolation by distance* consistente ($r= 0,749$; $P<0.001$), tuttavia al livello delle sottoregioni sono stati riscontrati solo deboli segnali (correlazioni statisticamente significative solo in due delle 9 sottoregioni totali).

La massima distanza geografica tra le popolazioni del presente studio è di 87 km (Bon-PLa), la nostra scala di indagine si pone quindi ad un livello intermedio tra quello regionale e subregionale dello studio sopracitato, per cui non stupirebbe ritrovare un segnale debole di isolamento per distanza. Si deve comunque precisare che non è possibile un confronto diretto: i territori considerati presentano caratteristiche ambientali notevolmente diverse. Inoltre, in *Rana temporaria* si assiste ad una diminuzione della variabilità genetica intrapopolazione con l'aumentare della latitudine (dovuta probabilmente ai ricorrenti eventi di bottleneck che ne hanno accompagnato la colonizzazione postglaciale), fattore che potrebbe portare ad una maggior differenziazione tra popolazioni (Palo et al., 2004).

Il diverso esito dell'analisi condotta con o senza le distanze genetiche e geografiche tra le popolazioni Ce1-Ce2, potrebbe essere spiegato assumendo che il peso dei fenomeni di differenziamento graduale dovuto a *isolation by distance* sia maggiore a scala ridotta (piccole distanze geografiche, habitat continui), mentre per distanze maggiori (tutte quelle che interessano le popolazioni oggetto dello studio, ad eccezione di Ce1-Ce2) il differenziamento sembra seguire pattern più irregolari. Una spiegazione potrebbe essere fornita ipotizzando che a questa scala prevalgano effetti di barriere locali al flusso genico. L'entità di quest'ultimo, infatti, non va considerata semplicemente una "proprietà" caratteristica di una determinata specie, poiché la dispersione è fortemente influenzata dalla struttura del paesaggio (Piertney et al., 1998; Dieckmann et al., 1999; van Dyck & Matthysen, 1999; Wiens, 2001). Questo aspetto assume particolare importanza per specie che abitano biotopi frammentati, in quanto il

successo dei movimenti tra questi ultimi può essere largamente compromesso da una matrice ambientale inospitale (Watts et al., 2004).

Questo sembra essere proprio il caso di *Rana temporaria*, molto diffusa nel territorio in questione ma, come molti altri anfibi, caratterizzata da una distribuzione a mosaico, con zone ospitali, rappresentate da aree umide idonee alla riproduzione, distribuite in un contesto ambientale spesso inospitale.

L'isolamento inoltre può portare, in piccole popolazioni, ad un forte differenziamento dovuto a fenomeni di deriva genetica; un flusso genico ridotto può infine facilitare l'adattamento locale anche a scala ridotta (Lenormand, 2002).

4.4 DIMENSIONE EFFETTIVA DELLE POPOLAZIONI ED EPISODI DI BOTTLENECK

Come è già stato evidenziato, le stime di numerosità effettiva ottenute con LDNE e ONESAMP hanno prodotto esiti diversi. Tale incongruenza non deve stupire: i due metodi si basano infatti su approcci diversi e sono sensibili in maniera diversa agli eventuali scostamenti dalle assunzioni del modello. Le stime prodotte da ONESAMP si sono rivelate essere fortemente influenzate dalla dimensione campionaria. Tale tipo di bias nella stima fornita in alcuni casi da ONESAMP risulta peraltro già documentato in letteratura (Haag et al., 2010; Sotelo et al., 2008). Per questa ragione si sono considerate più attendibili le stime di N_e ottenute con LDNE.

Sebbene la dimensione effettiva di una popolazione intesa in senso genetico risponda ad un preciso concetto, diverso da quello dal punto di vista demografico, si ritiene interessante presentare un confronto tra i valori di N_e stimati a partire da dati genetici e le indicazioni demografiche in nostro possesso.

Per quanto riguarda la popolazione Fia, sono a nostra disposizione dei dati di censimenti effettuati nel periodo 2000-2005 nel sito Torbiera di Fiavè dall'Associazione Pro Ecomuseo della Judicaria e dal WWF Giudicarie Esteriori (Cisaro Martinoli & Bronzini, 2006).

Le operazioni di censimento sono state eseguite quotidianamente durante la migrazione primaverile, attraverso la conta degli individui nelle trappole e lungo le barriere di protezione. Si sottolinea come tali conteggi, interessando gli individui adulti che migrano verso il sito riproduttivo per l'accoppiamento, possano costituire una stima indicativa del numero di animali in grado di contribuire al pool genico della generazione successiva. Come si può notare in Tabella 4.4 la media armonica relativa ai 6 anni interessati dei censimenti (140,3) risulta dello stesso ordine di grandezza dalla stima di N_e ottenuta da dati genetici con il software LDNE (172,9)

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	Media aritmetica	Media armonica
<i>N° individui</i>	196	162	96	131	107	244	156	140,3

Tabella 4.4: Dati dei censimenti effettuati nel sito Torbiera di Fiavè nel periodo 2000-2005.

Per la popolazione Ron, il cui sito riproduttivo è costituito da un piccolo stagno artificiale, è stata personalmente effettuata un'accurata conta delle ovature, ripetuta per tre volte dal

2/04/2010 al 14/04/2010. Considerando che le femmine di *Rana temporaria* depongono una singola ovatura all'anno (Savage, 1961), il numero di ovature equivale al numero delle femmine riproduttivamente attive nella popolazione (Laurila, 1998). Se moltiplicato per due (assumendo una sex ratio di 1:1) e mediato su più anni, tale valore rappresenterebbe quindi una stima demografica della numerosità effettiva (Seppa & Laurila, 1999). Le ovature contate nella primavera del 2010 ammontano complessivamente a 34; assumendo che ogni singola ovatura sia stata fecondata da un solo maschio, il numero di individui che hanno partecipato alla riproduzione risulterebbe quindi 68. Sebbene tale valore sia da considerarsi indicativo e relativo ad una sola stagione riproduttiva, non si discosta molto dalla stima di N_e ottenuta con LDNE (80,6). La popolazione ViT è stata monitorata per 3 anni consecutivi (2009-2011) e sono state contate rispettivamente 8, 9 e 9 ovature per ciascuna stagione riproduttiva. Moltiplicando per due il numero di ovature, si ottiene nuovamente un valore molto simile alla stima di N_e fornita da LDNE (22,2). Per la popolazione DDB, infine, osservazioni personali relative all'anno 2010 hanno portato al conteggio di circa 15 adulti nel sito riproduttivo (una singola pozza del diametro di qualche metro), poco prima della deposizione delle uova; valore anche in questo caso in linea con la dimensione effettiva stimata con LDNE (23,3).

Possiamo concludere quindi che, nei casi in cui si disponga di osservazioni demografiche, queste sono generalmente dello stesso ordine di grandezza delle stime di N_e ottenute con il metodo del *linkage disequilibrium* (LDNE). Al contrario, le stime ottenute con il metodo di Approximate Bayesian Computation (ONESAMP), manifestando un range di variazione tra le varie popolazioni molto ridotto (19,9-50,4), non sembrano rappresentare valori realistici.

Basandosi sulle stime fornite da LDNE, è possibile notare come le popolazioni del Trentino occidentale abbiano valori di N_e nel complesso superiori a quelle del Trentino orientale.

Il valore più basso di N_e è raggiunto da ViT; la ridotta numerosità della specie in questo sito è ampiamente confermata da osservazioni personali pluriennali. Per questa popolazione sono stati, inoltre, evidenziati segnali di un episodio di collo di bottiglia avvenuto in epoca recente, sia attraverso il rilevamento di un eccesso di eterozigosi (BOTTLENECK), che, seppur in misura solo accennata, analizzando la distribuzione delle frequenze alleliche. Un evento di bottleneck può aumentare la stocasticità demografica di una popolazione, il tasso di inbreeding, la perdita di diversità genetica e la fissazione di alleli deleteri, con conseguente incremento della probabilità di estinzione (Frankham et al., 2006; Lande, 1994; Leberg, 1990; Mills & Smouse 1994; Frankham 1995b). Si pone quindi in risalto lo stato di criticità in cui versa la popolazione ViT.

4.5 CORRELAZIONE TRA DATI GENETICI E PARAMETRI ECOLOGICO-AMBIENTALI

4.5.1 Parametri ecologico-ambientali e variabilità genetica intrapopolazione

L'assenza di correlazione tra gli indici di variabilità genetica delle varie popolazioni ed i fattori ecologico-ambientali scelti può essere dovuta all'esiguo numero di casi (popolazioni) analizzati, alla non considerazione di alcuni parametri che potrebbero al contrario avere un ruolo determinante, come la densità dei potenziali siti riproduttivi (aree umide), la presenza di possibili aree di rifugio attorno ad essi, il grado di antropizzazione ed i fattori di disturbo presenti nel territorio circostante (non descrivibile con il solo parametro dell'uso del suolo relativo alla singola pozza di campionamento) o ancora alla complessità dei fattori ecologici in gioco, che necessiterebbe di tecniche di analisi più raffinate.

Tuttavia ciò potrebbe anche essere interpretato, con la dovuta cautela, come una conferma dell'elevata adattabilità della specie alle diverse condizioni ambientali.

L'unica informazione emersa è che i livelli di variabilità più bassi riscontrati nelle nostre popolazioni si riferiscono in massima parte ai siti posti a longitudini intermedie, nella parte centrale del territorio considerato (Figura 4.5.1). Una spiegazione potrebbe risiedere ad una scala maggiore di quella della singola popolazione, implicando un'interazione tra i fattori ecologici e la struttura spaziale delle popolazioni.

La parte centrale del territorio della provincia di Trento è attraversata dal fiume Adige, ed è pertanto caratterizzata da quote basse e da un elevato grado di antropizzazione. Paragonando la frequenza delle osservazioni della specie nelle varie fasce altitudinali con l'estensione percentuale delle fasce stesse, nel territorio della provincia di Trento emerge una preferenza per la fascia 1500-2000 m; fino a 900 m la specie è comunque ancora ben rappresentata, mentre al di sotto dei 400 m le osservazioni si riducono ad un numero esiguo (Caldonazzi et al., 2002). Le popolazioni della fascia longitudinale intermedia incluse nel nostro studio provengono dal Monte Bondone (ViT), dal massiccio della Vigolana (DDB) e dal Monte Pasubio (Pas). Nei primi due casi si tratta di massicci montuosi isolati: il primo separa la Valle dell'Adige dalla bassa Valle del Sarca, il secondo è situato immediatamente a sud-ovest della città di Trento. Il Monte Pasubio è posto invece al confine tra la provincia di Trento e Vicenza ed è considerato parte delle Prealpi, caratterizzate da condizioni ecologiche diverse dal contesto alpino. Si tratta quindi probabilmente di popolazioni (o insiemi di popolazioni) isolate, situate in aree in cui globalmente la densità della specie è molto bassa.

Generalmente gli anfibi utilizzano habitat riproduttivi discontinui e sono caratterizzati da basse capacità di dispersione ed un alto grado di filopatria (Duellman & Trueb, 1986; Sinsch, 1990, Blaustein et al., 1994; Beebee, 1996; Berry, 2001). Partendo da questi presupposti, appare molto probabile che le popolazioni di anfibi si comportino in realtà come metapopolazioni (Harrison, 1991; Alford & Richards, 1999; Marsh & Trenham; 2001), sebbene tale ipotesi non vada presa come regola generale (Smith & Green; 2005). Nella sua definizione classica, una metapopolazione (Levins, 1969) è un insieme di popolazioni locali che vivono in habitat semi-isolati, connesse dalla dispersione occasionale di alcuni individui, ciascuna con una determinata probabilità di estinzione e la possibilità di venire ricolonizzata. La persistenza di una metapopolazione nel lungo periodo, perciò, può realizzarsi solo su scala regionale. La situazione di *Rana temporaria* non sembra corrispondere ad un modello di metapopolazione con alto tasso di turnover locale, bensì ad un complesso di sottopopolazioni stabili, in cui gli eventi di estinzione sembrano piuttosto rari. L'elevata adattabilità a siti riproduttivi tra i più disparati (comprese pozze d'acqua effimere), fa sì che, nelle aree ospitali, la densità delle "sottopopolazioni" sia alta, favorendo così il flusso genico tra di esse, caratteristica che la distingue da altri anfibi (Brede & Beebee, 2004).

La parte centrale del territorio della provincia di Trento, per le ragioni elencate, sembra invece poter essere caratterizzata da una bassa densità delle "sottopopolazioni", con conseguente elevato grado di isolamento. Questo è confermato ad esempio dalla clusterizzazione bayesiana implementata a partire dai dati genetici, che riconosce la popolazione ViT come un gruppo a sé, separato dalla popolazione DDB, posta a circa 14 km ma sulla sponda opposta della Valle dell'Adige. Un elevato grado di isolamento potrebbe quindi essere il responsabile dei bassi livelli di variabilità genetica riscontrati in queste popolazioni.

In aggiunta alle considerazioni fin qui esposte, va sottolineato inoltre che la parte centrale del territorio considerato (Valle dell'Adige e aree limitrofe) corrisponde alla distribuzione provinciale di *Rana dalmatina* (Fig. 4.5.1). Quest'ultima è una specie affine a *Rana temporaria* ma caratterizzata da esigenze ecologiche diverse, che predilige il fondovalle e la fascia pedemontana (pur spingendosi più in alto in presenza di condizioni adatte), come dimostra la massima frequenza di osservazioni nel territorio considerato rilevata nella fascia 200-300 m (Caldonazzi et al., 2002). La presenza di questa specie limitatamente a quest'area potrebbe rappresentare un ulteriore segnale del fatto che le condizioni ecologiche qui riscontrate si discostano da quelle ottimali per *Rana temporaria* potendo così, almeno parzialmente, rafforzare l'ipotesi che la densità delle popolazioni di *Rana temporaria* nelle zone in questione sia ridotta.

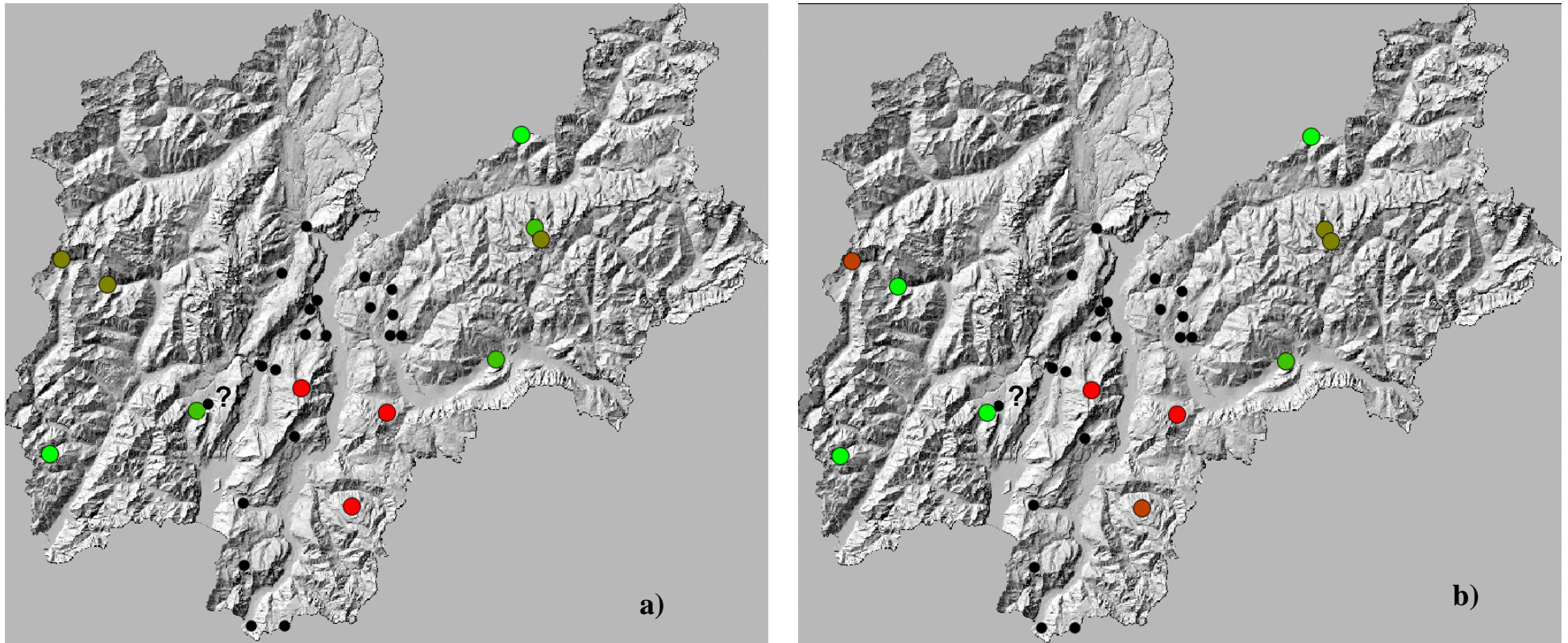


Figura 4.5.1: **a)** Eterozigosità attesa (H_e) e **b)** Ricchezza allelica (AR) nelle popolazioni di *Rana temporaria* sul modello di elevazione DTM, in relazione alla distribuzione di *Rana dalmatina*. I livelli dei due indici di variabilità genetica (range H_e : 0,47-0,65; range AR: 3,34-6,25) sono raffigurati con una scala cromatica che va dal verde al rosso, dal valore maggiore al minore. I punti neri corrispondono alla distribuzione di *Rana dalmatina*. Con il punto interrogativo è indicata una segnalazione dubbia per *Rana dalmatina* nel sito Torbiera di Fiavè. Nonostante Caldonazzi et al. (2002) ne riporti la presenza sintopica con *Rana temporaria*, in una serie di censimenti effettuata nel periodo 2000-2005 ne sono stati avvistati solo 2 esemplari (relativi anno 2000), segnalati tra l'altro dagli stessi autori come possibili casi di confusione (Cisaro Martinoli & Bronzini, 2006), contro i complessivi 936 di *Rana temporaria*. Dati genetici raccolti nel corso del presente studio non hanno evidenziato nessun caso di *Rana dalmatina* per i campioni provenienti da 37 ovature deposte in questo sito.

L'esiguo numero dei casi analizzati impone ancora una volta estrema cautela nell'interpretazione dei pattern di riduzione della variabilità genetica riscontrati in alcune popolazioni. Si sottolinea quindi il carattere puramente speculativo delle considerazioni qui esposte. Ulteriori informazioni genetiche provenienti da altre popolazioni sono infatti strettamente necessarie al fine di ricostruire un quadro più completo della diversità intrapopolazione.

Anche i valori relativamente bassi di ricchezza allelica della popolazione RMa (Fig. 4.5.1b), che pure ricade nell'estrema parte occidentale del territorio, ben lontana dalla valle dell'Adige, potrebbero venir spiegati in termini di isolamento relativo di tale popolazione, e quindi di un ridotto flusso genico. La clusterizzazione bayesiana inferita dal software GENELAND, separandola dalla vicina popolazione PoM, come già discusso, confermerebbe tale ipotesi. Le ragioni dell'isolamento potrebbero risiedere in questo caso nell'elevata quota del sito (2425 m s.l.m.). È noto che gli anfibi mostrano una riduzione della dispersione ed una struttura genetica più fine in regioni caratterizzate da una maggior complessità topografica, come dimostrato in studi su *Rana sylvatica* e *Rana luteiventris* (Newman & Squire 2001; Squire & Newman 2002; Funk et al., 2005). Le popolazioni Ce1 e Ce2, anch'esse provenienti da siti caratterizzati da una quota molto elevata (circa 2270 m s.l.m.), non presentano però livelli di variabilità genetica particolarmente bassi (sebbene nemmeno tra i più alti), contraddicendo quindi l'ipotesi avanzata.

Si evidenzia tra l'altro come i valori bassi di ricchezza allelica riscontrati nella popolazione RMa, siano in contrasto con la dimensione effettiva della popolazione stimata da dati genetici (400), che si rivela invece essere nettamente la più alta tra tutte le popolazioni indagate. Si potrebbe pensare ad una popolazione comunque geneticamente variabile ma con piccole differenze fra i suoi componenti.

Concludendo, si vuole sottolineare come l'esiguo numero dei casi analizzati imponga ancora una volta estrema cautela nell'interpretazione dei pattern di riduzione della variabilità genetica riscontrati in alcune popolazioni; le considerazioni esposte in questo capitolo sono debitamente da considerare preliminari e di carattere quasi esclusivamente qualitativo. Ulteriori informazioni genetiche provenienti da altre popolazioni sono infatti necessarie al fine di ricostruire un quadro più completo della variabilità genetica intrapopolazione e dei fattori in grado di influenzarla.

4.5.2 Parametri ecologico-ambientali e struttura genetica delle popolazioni

L'analisi di ridondanza (RDA), condotta al fine di mettere in luce eventuali relazioni tra la struttura genetica delle popolazioni ed i parametri ecologico-ambientali, ha prodotto un grafico (Figura 3.6.2) che, come già evidenziato, non si presta ad una spiegazione facile ed univoca.

In generale non si registra discordanza tra il posizionamento relativo dei vari cluster inferiti su base genetica e le modalità di raggruppamento dei siti prodotte dalla combinazione dei fattori ambientali. Sebbene in alcuni specifici casi sembra essere stata riscontrata una certa correlazione tra la struttura genetica ed alcuni dei predittori considerati, nessuno di essi sembra poter fornire spiegazioni di carattere generale, estendibili all'intero data set.

Ad esempio, l'elevata differenziazione genetica riscontrata tra RMa e le popolazioni PoM, Bon e Fia (queste ultime incluse nello stesso cluster) sembra trovare riscontro in un'elevata diversità nelle caratteristiche ambientali, in primis per quanto riguarda la quota, fattore che invece accomuna RMa a Ce1, Ce2 ed in misura minore a PLa (come si evince dalla vicinanza nel grafico).

Tuttavia, appare subito evidente come questo fattore non possa da solo spiegare in maniera estesa i pattern di clusterizzazione riscontrati; anche limitandoci alle popolazioni citate, si noti infatti come PLa e Bon, proiettate in zone ben distanti del grafico, condividano la stessa quota (circa 1800 m s.l.m). Ron e ViT vengono invece proiettati in punti relativamente vicini del grafico, pur collocandosi in fasce altimetriche ben diverse (fondovalle il primo, 1500 m circa il secondo).

Si ricorda come nei modelli ecologici sia molto diffusa la condizione in cui non tutti i fattori potenzialmente in grado di influenzare un determinato processo/organismo vengono riconosciuti e inclusi nell'analisi (Cade & Richards, 2006). Inoltre, se le variabili ecologiche agiscono come fattori limitanti, la risposta dell'organismo non può variare oltre ad un determinato limite superiore imposto dai fattori misurati, ma può essere minore rispetto al valore atteso dal modello, nei casi in cui vi siano altri fattori, non misurati, in grado di influenzarla (Cade & Noon, 2003).

La mancata corrispondenza tra la distanza genetica riscontrata per alcuni cluster ed il relativo posizionamento sugli assi dell'RDA delle popolazioni che vi appartengono (sulla base della combinazione dei fattori ambientali) potrebbe essere inoltre dovuta, oltre che alla mancata

considerazione di altre variabili in grado di influenzare i processi genetici in gioco, anche a specifiche vicende storiche delle popolazioni considerate. Quest'ultima ipotesi sembra poter rivestire particolare importanza soprattutto per il cluster K4, rappresentato dalla popolazione ViT, per la quale sono stati rilevati segnali di un possibile evento di bottleneck (vedi paragrafo 3.5). Una forte riduzione della dimensione della popolazione, avvenuta in epoca recente, potrebbe potenzialmente essere il principale fattore responsabile di un differenziamento genetico maggiore rispetto a quello previsto sulla base delle sole differenze nelle condizioni ambientali. In definitiva, su questa popolazione avrebbe avuto un forte effetto la deriva genetica.

Al di là delle possibili spiegazioni fin qui ipotizzate, nelle situazioni in cui le caratteristiche ecologiche meno si adattano a spiegare i pattern di struttura genetica riscontrati, considerazioni riguardo alla disposizione relativa delle popolazioni sul territorio indagato (struttura spaziale) sembrerebbero assumere decisamente un'importanza prioritaria. Nel complesso, il contributo delle distanze spaziali tra le popolazioni alla struttura genetica appare infatti piuttosto alto, con l'unica importante eccezione, già discussa, rappresentata da RMa. Sembra quindi delinearsi una situazione in cui la diversità di condizioni ecologiche si presta a spiegare in maniera soddisfacente il differenziamento genetico solo su scala locale e solo nei casi di condizioni ambientali estreme (come per RMa, 2400 m s.l.m. di quota), in un contesto generalmente dominato da fattori spaziali.

Il riconoscimento di associazioni tra i parametri ambientali misurati e la risposta di un determinato organismo, anche se limitate ad alcune parti della distribuzione della variabile di risposta (ad esempio gli estremi), può comunque fornire informazioni molto importanti, soprattutto a livello applicativo e conservazionistico. In ambito ecologico, modelli focalizzati su un determinato aspetto di un fenomeno, sebbene non lo descrivano nella sua universalità, sono spesso preferibili rispetto a teorie più generali ma troppo astratte per risultare applicabili con efficacia a casi reali (Ginzburg et al., 2007).

Come ultima considerazione, si pone in evidenza il fatto che ai bassi valori di precipitazione caratteristici della porzione centrale del territorio, sembra corrispondere una struttura genetica caratterizzata da elevata differenziazione anche tra popolazioni relativamente vicine. Ad esempio ViT e DDB, distanti meno di 14 km, si dimostrano geneticamente ben differenziate, andando a ricadere in due diversi cluster. Come riferimento si considerino le popolazioni Fia e PoM, poste ad una distanza ben maggiore (circa 23,5 km) ma caratterizzate da elevati valori di precipitazione e appartenenti allo stesso cluster. Anche la popolazione Ron, situata più a

oriente ma caratterizzata da un valore di precipitazione annuale tra i più bassi, si dimostra geneticamente ben differenziata rispetto alle popolazioni circostanti, costituendo da sola un cluster a sé.

Viene quindi suggerita l'ipotesi, ecologicamente sensata, che valori più elevati di precipitazione possano favorire una maggior densità dei siti riproduttivi, garantendo quindi maggior continuità al flusso genico e che al contrario, un regime pluviometrico ridotto favorisca l'isolamento tra popolazioni anche relativamente vicine tra loro, oltre che agendo sulla densità dei siti, imponendo una maggior "resistenza" della matrice ambientale alla dispersione.

Tale concetto presenta tuttavia numerose riserve. Si cita innanzitutto il caso di Bon, tra le popolazioni caratterizzate dai valori più bassi di precipitazione, che tuttavia ricade nello stesso cluster di PoM e Fia, dalle quali è geograficamente piuttosto distante (si veda il paragrafo 4.2).

Bon, pur collocandosi a circa 1800 m di quota, è situato su un altopiano a circa 6 km dal fondovalle, con il quale potrebbe quindi mantenere un certo grado di continuità ecologica: il raggruppamento con le popolazioni PoM e Fia potrebbe quindi risultare da considerazioni puramente spaziali, non dipendenti dalle precipitazioni. La popolazione RMa, vicina a PoM e caratterizzata dagli stessi alti valori di precipitazione, con i suoi 2400 m di altitudine, si pone invece in una condizione estrema, che potrebbe essere responsabile del suo isolamento. Come nel caso di Bon, anche la popolazione PLa, con il valore più basso di precipitazioni, non mostra particolare differenziamento rispetto alle popolazioni circostanti (viene raggruppata con Ce1 e Ce2).

Inoltre, in riferimento alla fascia centrale del territorio, attraversata dalla Valle dell'Adige, si ricorda come altri potrebbero essere (in modo forse più plausibile) i fattori responsabili di un eventuale maggior isolamento tra popolazioni, come già discusso nel paragrafo precedente.

La complessità delle relazioni tra fattori ecologico-ambientali e struttura genetica delle popolazioni di *Rana temporaria* emersa dal presente lavoro trova diversi riscontri in bibliografia.

Si cita come esempio uno studio di Johansson et al. (2005) sugli effetti dell'alterazione ambientale dovuta all'agricoltura in popolazioni svedesi di *Rana temporaria*. Gli autori hanno riscontrato chiari effetti negativi dell'agricoltura intensiva sulla presenza, abbondanza e

diversità genetica di questo anfibio nel sud della Svezia e, sorprendentemente, una tendenza opposta nel nord del Paese. In linea con questi diversi pattern, è stato inoltre osservato un aumento del grado di differenziamento tra popolazioni con l'aumentare del disturbo connesso all'agricoltura intensiva nel Sud, e una tendenza opposta nel Nord. Come interpretazione di tale apparente paradosso è stata proposta la distribuzione inversa dei livelli di diversità del paesaggio nelle due regioni indagate. Nel nord della Svezia, l'agricoltura porterebbe ad un aumento di diversità degli habitat rispetto alla più naturale ma meno ospitale foresta continua di conifere. *Rana temporaria* potrebbe beneficiare in particolare del più veloce scioglimento del ghiaccio nei siti riproduttivi degli habitat agricoli, più aperti rispetto alla foresta e quindi più caldi, che garantirebbe un più lungo periodo disponibile per riproduzione e sviluppo larvale. Nella parte sud del Paese, con caratteristiche ecologiche diverse e già intensamente interessata da alterazioni ambientali di natura antropica, l'agricoltura intensiva, portando ad un'ulteriore frammentazione degli habitat, comporterebbe invece solo conseguenze negative per la specie.

In uno scenario già intricato, un ulteriore aumento della complessità può derivare da fenomeni di adattamento locale, ampiamente documentati per questa specie anche su scala geografica ridotta e di cui è difficile tener conto nei modelli, senza una conoscenza dettagliata delle caratteristiche specifiche di ogni singolo habitat. Rimanendo nell'area scandinava, ad esempio, da studi di laboratorio condotti su larve provenienti dal nord della Svezia, è emerso un tasso di crescita superiore per temperature di incubazione elevate (Olsson & Uller, 2003). Le larve del nord del paese sembrano quindi manifestare, contrariamente a quanto ci si potrebbe aspettare, una specializzazione per le alte temperature. I siti riproduttivi di tale regione sono costituiti prevalentemente da pozze derivate da scioglimento nivale, poco profonde e quindi caratterizzate da un più veloce riscaldamento dell'acqua rispetto a quelle, più profonde, del sud del Paese. È quindi plausibile che la selezione abbia portato ad un innalzamento dell'optimum termico di sviluppo verso temperature dell'acqua più elevate, perché queste rappresentano le condizioni più diffuse negli habitat del nord.

Infine, si ricorda come l'importanza di includere nei modelli non solo le variabili che agiscono a livello locale, ma anche i fattori in grado di esplicitare la loro azione ad una scala più ampia (composizione del paesaggio circostante, grado di urbanizzazione, densità della rete stradale, ecc...), parametri puramente spaziali e le proprietà strutturali della rete degli habitat (densità dei siti riproduttivi, presenza di barriere geografiche o ecologiche al flusso genico, ecc...) sia già stata sottolineata da numerosi studi sulla diversità degli anfibi a livello specifico (Van Buskirk, 2005; Ribeiro et al., 2011; Ernst & Rödel, 2008; Stevens et al., 2004).

5. CONCLUSIONI

“Là dove la scienza ci aveva mostrato una stabilità immutabile e pacificata, comprendiamo invece che nessuna organizzazione, nessuna stabilità è, in quanto tale, legittima o garantita, nessuna si impone, sono tutte prodotte dalle circostanze e sono tutte alla mercè delle circostanze...La natura non è fatta per noi, essa non è abbandonata alla nostra volontà...è ormai tempo che ci assumiamo i rischi dell'avventura umana...”

(da *“La nuova alleanza. Metamorfosi della scienza”*- Ilya Prigogine & Isabelle Stengers)

In un contesto di crisi globale della biodiversità, gli anfibi, colpiti da un drammatico declino su scala planetaria, rappresentano il gruppo di vertebrati maggiormente a rischio. Secondo una recente valutazione dello stato di salute dell'intero gruppo, circa un terzo delle specie mondiali sono minacciate e almeno il 43% mostra una tendenza al declino delle popolazioni (IUCN, 2008). Numerosi studi hanno cercato di individuarne le cause, ma l'importanza relativa dei vari fattori coinvolti non è stata ancora chiarita. La previsione delle potenzialità evolutive degli anfibi a fronte dei cambiamenti globali può trarre informazioni cruciali dallo studio di quali possano essere gli elementi che agiscono sulla distribuzione della variabilità genetica.

Rana temporaria è un anfibio molto comune nel territorio della provincia di Trento; grazie alla sua estrema adattabilità, la si può rinvenire in una grande varietà di habitat, dal fondovalle fino alle quote più elevate. Lo stato generale della specie nell'area indagata sembra essere di buona salute.

I livelli di diversità genetica emersi dai nostri dati possono essere globalmente considerati in linea con quelli riscontrati in popolazioni di altre aree europee.

Le stime della dimensione effettiva delle popolazioni, tuttavia, così come la variabilità genetica riscontrata al loro interno, non si sono rivelate costanti, mettendo in luce un panorama eterogeneo tra i vari siti.

Per quanto riguarda la struttura genetica, una prima suddivisione di carattere generale è emersa tra le popolazioni appartenenti alla destra e alla sinistra orografica del fiume Adige, con la popolazione del sito Viote del Monte Bondone (ViT) che pare distinguersi da entrambi i gruppi, collocandosi in una posizione intermedia.

Pur astenendoci da considerazioni che non rientrano tra gli obiettivi di questo studio, potrebbe risultare di grande importanza, nel caso si voglia proseguire l'indagine in maniera più estesa, chiarire se tale scenario corrisponda al solo effetto della forte barriera geografica imposta dal fiume Adige o se, unitamente a ciò, tale suddivisione possa avere una spiegazione su base filogeografica.

In ogni caso, questa prima suddivisione evidenziata assume una grande rilevanza dal punto di vista conservazionistico, caratterizzando le popolazioni occidentali e orientali come due gruppi ben distinti e imponendo una maggior attenzione alle popolazioni della parte centrale del territorio, che potrebbero presentare alte peculiarità (come ad es. ViT).

Il grado di differenziamento evidenziato tra le popolazioni su scala più fine, come la variabilità genetica intrapopolazione, si è dimostrato seguire pattern irregolari, risultando solo parzialmente correlato alle distanze geografiche ed individuando sottoaree caratterizzate da una maggior suddivisione ed altre geneticamente più omogenee.

Lo scenario emerso per le popolazioni di *Rana temporaria* della provincia di Trento non deve stupire. Gli anfibi sono infatti comunemente caratterizzati da una distribuzione a mosaico, con popolazioni piccole e grandi, che differiscono tra loro per livelli di variabilità genetica e sono spesso caratterizzate da un flusso genico limitato, talvolta anche su brevi distanze (Hitchings & Beebee 1997; Newman & Squire 2001; Lampert et al. 2003; Brede & Beebee 2004).

La geomorfologia irregolare del territorio indagato, imponendo barriere geografiche ed ecologiche, con ogni probabilità non fa che amplificare la tendenza di questi animali a dare luogo a strutture delle popolazioni complesse, la cui causa prima va ricercata direttamente nella loro biologia. Si ricorda, infatti, come gli anfibi, oltre ad essere caratterizzati da una scarsa capacità di dispersione, siano vincolati per la riproduzione alle zone umide, che generalmente non sono distribuite nel territorio in maniera ordinata.

Da rilevare, inoltre, l'elevato grado di differenziamento genetico riscontrato nelle popolazioni della ristretta porzione centrale dell'area di studio. Sulla base dei dati genetici sono stati infatti inferiti per questa sottozona due cluster, divisi dalla Valle dell'Adige, che sembra costituire una barriera al flusso genico di considerevole importanza. Le popolazioni che appartengono a questi due gruppi geneticamente distinti, ViT (Torbiera delle Viote) e DDB-Pas (Dos del Bue e Monte Pasubio), si distinguono inoltre per i bassi livelli di variabilità genetica. L'ipotesi è che si tratti di nuclei isolati, distribuiti in un'area complessivamente poco ospitale per la specie: i siti in questione si collocano sulla sommità o alle pendici di massicci montuosi caratterizzati da una scarsa continuità, che circondano l'ampio fondovalle solcato dal fiume Adige. Quest'ultima striscia di territorio è caratterizzata da quote molto basse, che *Rana*

temporaria, sebbene pressoché ubiquitaria, non predilige; si sottolinea come i suoi margini corrispondano peraltro ai confini della distribuzione provinciale di *Rana dalmatina*, specie affine ma con esigenze ecologiche diverse.

Questa parte di territorio è infine caratterizzata da un forte disturbo antropico: elevata urbanizzazione, una fitta rete stradale e agricoltura intensiva.

L'isolamento ipotizzato per queste popolazioni potrebbe costituire un'ulteriore motivo per una maggior attenzione dal punto di vista conservazionistico, insieme alle già discusse peculiarità genetiche riscontrate in alcune di esse (ViT). Si auspica l'acquisizione di dati genetici relativi ad altre popolazioni di quest'area, per poter disegnare un quadro più chiaro.

Nessuna delle variabili ecologico-ambientali considerate è riuscita a spiegare le differenze riscontrate nei livelli di variabilità genetica tra le varie popolazioni, rafforzando quindi l'ipotesi di una forte influenza di fattori spaziali e strutturali. Si noti come i parametri climatici ed ambientali presi in esame nelle analisi si riferiscano a una scala ridotta per tener conto delle condizioni locali. La particolare struttura delle popolazioni della specie in questione, meglio espressa con il concetto di metapopolazione, potrebbe imporre, invece, una scala di osservazione più ampia. In questo caso anche la raccolta dei vari dati dovrebbe procedere con modalità diverse, relativamente più complesse.

L'assenza di correlazione tra i parametri climatici e ambientali ed i livelli di variabilità genetica potrebbe inoltre essere considerata una conferma dell'elevata adattabilità della specie. Questa considerazione tuttavia ha carattere preliminare e parziale: alcuni fattori, potenzialmente importanti per i livelli di variabilità genetica, potrebbero non essere stati presi in considerazione. Inoltre la combinazione tra le diverse variabili può dar luogo ad interazioni complesse, rendendo inefficaci i semplici modelli utilizzati in questa analisi.

Altri esempi di forte differenziamento genetico riscontrati su scala geografica ridotta, oltre a quelli già discussi per la parte centrale del territorio, potrebbero venir ricondotti a differenze nelle condizioni ecologiche. Ciononostante, i parametri ecologico-ambientali considerati non hanno fornito un'interpretazione di carattere generale nemmeno per i pattern di struttura genetica riscontrati, limitandosi a offrire potenziali spiegazioni solo in specifici casi, relativi a discontinuità di carattere locale. Anche in questo caso va considerato il probabile basso potere descrittivo del nostro modello. Questa discontinuità locale, tuttavia, se confermata da indagini più ampie, non sarebbe in contrasto con le indicazioni finora giunte dagli altri aspetti evidenziati da questo studio.

Da questo studio nel suo complesso affiorerebbe quindi con insistenza l'importanza cruciale, per questa specie, della struttura spaziale delle popolazioni/metapopolazioni, sulla quale

comunque le caratteristiche ecologiche potrebbero esercitare una più o meno forte influenza, conferendo un maggior grado di complessità al sistema.

L'emergenza di una simile ipotesi offre lo spunto per alcune considerazioni sul tipo di approccio più opportuno per l'analisi di un sistema con tali caratteristiche.

Diversi autori, ad esempio, hanno suggerito l'utilizzo in studi di ecologia spaziale della teoria delle reti, che trae le sue origini da quella branca della matematica nota come teoria dei grafi (Cantwell & Forman, 1993; Urban & Keitt, 2001; Minor & Urban, 2007). Basata sui concetti di "nodo" e "link", la teoria delle reti fornisce un nuovo e potente mezzo per quantificare la robustezza di un modello di distribuzione discontinua alle perturbazioni (rappresentate ad esempio dalla perdita di habitat) e per l'identificazione di zone chiave per la connettività del paesaggio (e quindi per la persistenza delle popolazioni). Organismi come gli anfibi, la cui distribuzione è tipicamente rappresentata da un insieme di habitat frammentati, ben si prestano a testare tale tipo di approccio, e gli esempi di applicazione a questo specifico gruppo di animali stanno aumentando (Fortuna et al., 2010; Ribeiro et al., 2010). Recentemente la teoria delle reti e altri approcci derivati sono stati proposti anche per studi di landscape genetics (McRae & Beier, 2007; Garroway et al., 2008, Rozenfeld et al., 2008).

Considerata da questa nuova prospettiva, la gestione di una specie caratterizzata da una distribuzione discontinua in una determinata area, andrebbe incentrata sulla conservazione di quelle che vengono riconosciute come aree di cruciale importanza per il mantenimento della connettività tra le diverse parti della rete, e sul mantenimento di una topologia strutturale ottimale. I maggiori sforzi conservazionistici andrebbero quindi indirizzate verso i cosiddetti nodi "hub", ovvero i nodi della rete caratterizzati da un numero elevato di link.

È chiaro che questi elementi di elevata criticità, per essere tutelati, vanno prima identificati: una corretta conoscenza della struttura delle popolazioni assume in quest'ottica un carattere prioritario.

Si intende comunque sottolineare che le informazioni genetiche a nostra disposizione rappresentano solo un campione parziale e molto limitato del pool genico di *Rana temporaria* nel territorio indagato, dove la specie è nel complesso ampiamente diffusa. Le considerazioni qui esposte vanno quindi viste come indicazioni preliminari, da testare estendendo lo studio ad altre popolazioni. Tale prerogativa rientra tra gli obiettivi di ACE-SAP, un progetto di ricerca incentrato su vari aspetti della biodiversità animale e vegetale in Trentino. Il presente lavoro va quindi considerato uno studio pilota, da ampliare e perfezionare mediante l'impiego di modelli più complessi (come quelli della teoria delle reti), che, unitamente ad un dataset più vasto, possono conferire potere di risoluzione maggiore.

In tutti i casi in cui l'elemento spaziale così come i fattori ecologici considerati non sembrano giustificare i pattern di differenziamento, sarebbe utile approfondire l'indagine includendo altri fattori e le loro interazioni, anche in funzione dei diversi habitat.

Per quanto riguarda lo stato di salute delle singole popolazioni analizzate, quanto emerso impone particolare attenzione allo stato di criticità in cui versa la popolazione del sito Viote del Monte Bondone. I bassi livelli di variabilità genetica riscontrati, il basso valore ottenuto dalla stima della dimensione effettiva della popolazione e le tracce di un recente episodio di bottleneck, rappresentano segnali concordi nell'evidenziare una situazione di forte declino, che pone questa popolazione ad alto rischio. I fattori di rischio aumentano se si considera la condizione di isolamento del massiccio montuoso che la ospita, circondato peraltro da un'area caratterizzata da un alto grado di disturbo antropico (è situato immediatamente a sud-ovest della città di Trento). L'isolamento dedotto su basi geografiche trova conferma nell'elevato grado di differenziamento genetico riscontrato anche nei confronti delle popolazioni più vicine tra quelle incluse nello studio.

Il recente episodio di introduzione effettuato in uno stagno artificiale, a meno di un chilometro di distanza dalla torbiera, habitat della popolazione originaria, potrebbe a prima vista apparire come un'azione utile per aumentarne numerosità e variabilità genetica. Le traslocazioni di animali da popolazioni numerose a popolazioni isolate in declino comportano però il rischio di un'ulteriore riduzione della fitness in seguito a depressione da esoincrocio (outbreeding depression). La depressione da esoincrocio, sebbene generalmente sia un fenomeno piuttosto raro nelle popolazioni animali, potrebbe presentarsi invece con frequenza elevata in taxa come gli anfibi. Questi ultimi, a causa del forte differenziamento genetico tra popolazioni che spesso li caratterizza, potrebbero infatti risultare particolarmente sensibili a conseguenze dell'esoincrocio come il disfacimento di complessi genici co-adattati o la produzione di fenotipi intermedi caratterizzati da un minor adattamento locale. Uno studio su *Rana temporaria*, ad esempio, ha dimostrato effetti negativi dell'esoincrocio anche per popolazioni distanziate non più di 130 km (Sagvik et al., 2005). Estrema cautela andrebbe quindi posta nell'intraprendere azioni di traslocazione negli anfibi, soprattutto se tra popolazioni geneticamente distanti tra loro. Nello specifico caso qui discusso, l'elevata diversità genetica riscontrata tra la popolazione originaria della torbiera e gli animali introdotti nel vicino stagno, pone seri dubbi sull'opportunità di tale azione. Un monitoraggio genetico continuo dei due nuclei riproduttivi sarebbe importante anche per ottenere precise informazioni sulle dinamiche di flusso genico di questa specie.

Una delle più comuni cause del declino di una popolazione di anfibi è rappresentata dal degrado ambientale; per il sito in questione, l'evoluzione naturale della torbiera delle Viote è indirizzata ad un lento ma progressivo interrimento (Tomasi, 2003). Pertanto, anche l'eventuale suggerimento di azioni di miglioramento dell'habitat, volte all'ottenimento di condizioni più favorevoli alla vita degli anfibi, non sembra poter essere di grande aiuto: la popolazione di *Rana temporaria* presente in questo sito sembra quindi destinata ad andare incontro, in un futuro più o meno lontano, ad un naturale processo di estinzione.

Concludendo, la genetica costituisce oggi uno strumento indispensabile per fornire un quadro più chiaro della biologia ed ecologia di una specie. L'acquisizione di informazioni riguardo ai livelli di variabilità genetica nelle varie popolazioni, alla loro struttura genetica e alle dinamiche responsabili dei pattern riscontrati, rappresenta quindi un aspetto di fondamentale importanza, da abbinare alle conoscenze già conseguite con altri approcci.

Come già ricordato, *Rana temporaria* non è una specie attualmente minacciata, tuttavia le considerazioni derivanti da studi di landscape genetics come questo, possono rappresentare importanti punti di partenza anche per lo studio di anfibi a maggior rischio. Si ricorda inoltre come questo gruppo di animali sia soggetto con sempre maggior frequenza ad epidemie in grado di portare all'estinzione intere popolazioni; la conoscenza dei fattori di criticità anche delle specie che godono al momento di buona salute può in quest'ottica risultare determinante.

A causa della loro elevata sensibilità alle perturbazioni ecosistemiche, gli anfibi sono considerati inoltre degli indicatori della qualità degli ambienti.

In un'epoca di cambiamenti climatici e di crescente impatto antropico, monitorare le condizioni ambientali ed identificare eventuali situazioni di degrado va considerato condizione imprescindibile di qualsiasi strategia conservazionistica, oltre che un incentivo allo sviluppo di una sempre più indispensabile coscienza ambientale globale.

5.1 Importanza di *Rana temporaria* negli ecosistemi forestali e considerazioni legate alla gestione selvicolturale

Nel territorio della provincia di Trento, tra gli habitat più frequentati dagli individui adulti di *Rana temporaria*, al di fuori del periodo riproduttivo, assumono particolare importanza gli ambienti forestali, in particolare le peccete, i boschi misti di conifere e i boschi misti di conifere e latifoglie (Caldonazzi et al., 2002). Nel vicino Veneto, la rana di montagna viene indicata come specie tipica dei seguenti habitat forestali della Rete Natura 2000: faggete del Luzulo-Fagetum (codice 9110), faggete dell'Asperulo-Fagetum (codice 9130), faggete medioeuropee subalpine con *Acer* e *Rumex arifolius* (codice 9140), faggete calcicole dell'Europa Centrale del Cephalanthero-Fagion (codice 9150), foreste acidofile montane e alpine di *Picea* (Vaccinio-Piceetea; codice 9410) e foreste alpine di larice e/o pino cembro (codice 9420) (Lasen et al., 2007).

In questo paragrafo conclusivo verrà discussa l'importanza di *Rana temporaria* nell'ecosistema bosco e verranno proposti dei suggerimenti per una gestione forestale compatibile con la conservazione delle popolazioni di questo anfibio.

Gli anfibi, oltre a costituire degli indicatori biologici della salute generale degli ecosistemi, rivestono un ruolo di fondamentale importanza in molte catene trofiche, sia nel loro stadio larvale che in quello adulto. L'estinzione o il declino delle loro popolazioni può quindi avere un impatto significativo su altri organismi che dipendono da essi (Mohneke & Rödel, 2009).

Nello specifico, *Rana temporaria* costituisce un'importante componente della dieta di molti vertebrati: serpenti del genere *Natrix*, in alcuni casi il marasso, *Vipera berus* Linnaeus 1758 (i cui giovani, in ambiente alpino, trovano nei neometamorfosati di *Rana temporaria* un'importante risorsa nutritiva; Luiselli et al., 1995), vari Uccelli e Mammiferi. Si suppone che la dinamica di alcune specie di mustelidi possa essere, in alcuni ambienti, strettamente legata alle dinamiche di popolazione di questo anuro (AmphibiaWeb, 2011). In particolare, la puzzola (*Mustela putorius* Linnaeus, 1758), pur avendo una dieta varia a seconda degli habitat e del periodo dell'anno, in molti ambienti si rivela un predatore specializzato di anuri (Weber, 1989; Jedrzejewski et al., 1993; Sidorovich, 1992), in special modo rane rosse (Lodé, 1996). La disponibilità di prede assume un ruolo fondamentale nella selezione stagionale degli habitat di questo carnivoro, che in molte parti del suo areale risulta, in primavera, strettamente legato alle aree umide, dove gli anuri che accorrono in massa per la riproduzione rappresentano, durante questo periodo, la principale fonte di cibo (Lodé, 1994). L'importanza delle zone umide per la puzzola sembra quindi spiegata dalle sue abitudini alimentari. A

conferma di questa ipotesi, in Svizzera, ad esempio, questo mustelide risulta diffuso principalmente nel nord delle Prealpi e nelle aree montuose adiacenti, dove gli anfibi sono più comuni (Weber, 1989).

La puzzola ha un'ampia distribuzione europea ma il trend delle popolazioni in molti casi non è ben chiaro ed in alcune aree sembra sia andata incontro, negli ultimi decenni, ad un netto declino (Blandford, 1987; Birks & Kitchener, 1999). È indicata tra le specie dell'Appendice III della Convenzione di Berna e nell'Allegato V della Direttiva "Habitat" 21 maggio 1992 n. 92/43/CEE. Nel territorio italiano, lo status di questo mammifero è assai poco conosciuto; negli ultimi decenni si è registrata tuttavia una generale diminuzione delle segnalazioni, che sembra poter indicare un sensibile declino delle popolazioni, da imputare probabilmente al degrado a cui sono state soggette molte zone umide (Spagnesi & De Marinis, 2002). In Italia la specie è particolarmente protetta ai sensi dell'Art. 2 della Legge 11 Febbraio 1992, n. 157.

I dati relativi alla presenza di *Mustela putorius* nella provincia di Trento sono molto scarsi, tanto che Pedrini et al., in uno studio condotto nel 1995, indicano questa specie come probabilmente scomparsa dall'intero territorio provinciale, con le ultime segnalazioni che risalgono agli anni '60.

La ricerca di relazioni tra la presunta scomparsa della puzzola in molte aree e il declino delle popolazioni di anfibi esula dagli obiettivi del presente lavoro, lo specifico esempio riportato vuole tuttavia sottolineare il ruolo fondamentale degli anfibi, e nello specifico di *Rana temporaria*, nelle dinamiche degli ecosistemi forestali. È presumibile che, laddove costituisce l'anfibio più abbondante, *Rana temporaria* rappresenti una specie chiave all'interno delle reti trofiche, considerazione che aumenta l'importanza della conservazione delle popolazioni locali in declino, anche se la specie, come più volte ricordato, nel complesso del suo areale risulta allo stato attuale molto comune.

Recentemente, la conservazione della diversità biologica e degli habitat in Europa ha visto la nascita di una nuova fase. Con la sottoscrizione, nel 1995, della *Pan-European Biological and Landscape Diversity Strategy* da parte di 54 Paesi dell'area europea (CE, 1996), le precedenti strategie conservazionistiche, rappresentate principalmente da misure isolate a livello locale, hanno lasciato il posto ad un nuovo approccio internazionale, basato su reti di conservazione degli ecosistemi su ampia scala geografica. Un interesse crescente è andato sviluppandosi per la definizione e l'analisi delle reti ecologiche, e tra gli indicatori per il monitoraggio della salute degli habitat sono stati proposti parametri specifici per la connettività e la frammentazione.

Questo nuovo approccio è particolarmente indicato per il caso degli anfibi, che, caratterizzati spesso da un modello distributivo a metapopolazioni, necessitano decisamente, oltre che di interventi di tutela a livello locale, di una strategia di conservazione ad una scala più ampia.

Per lungo tempo gli sforzi di conservazione degli anfibi sono stati indirizzati quasi esclusivamente nel preservare l'integrità degli ambienti acquatici utilizzati per la riproduzione, recentemente tuttavia un sempre maggior numero di studi ha riconosciuto il ruolo altrettanto fondamentale degli habitat terrestri, sfruttati per l'alimentazione degli adulti, come siti invernali di rifugio e come corridoi ecologici di dispersione (Semlitsch & Bodie, 2003; Rothermel & Semlitsch, 2002; Ficetola et al., 2011). In particolare, per *Rana temporaria* il contributo fornito dai sistemi forestali sembra essere di grande rilevanza. In uno studio sull'importanza dei fattori legati al paesaggio sulla presenza e densità delle larve di alcune specie di anfibi in siti riproduttivi della Svizzera, Van Buskirk (2005) ha rilevato come *Rana temporaria* sia più frequente ed abbondante in pozze d'acqua situate all'interno di aree caratterizzate da un paesaggio forestale.

I boschi, come già ricordato, nel territorio della provincia di Trento sono tra gli habitat più frequentati dagli adulti di questo anuro al di fuori del periodo riproduttivo.

La conservazione delle specie negli ecosistemi forestali si trova spesso a dover coesistere con le esigenze legate al loro sfruttamento a fini commerciali.

La gestione selvicolturale può influenzare la vita degli anfibi sotto vari aspetti: l'argomento è stato oggetto di numerose ricerche e sono state proposte delle linee guida per uno sfruttamento delle risorse forestali compatibile con la conservazione di questo gruppo di animali (Calhoun & de Maynadier, 2004; de Maynadier & Houlahan, 2008; PARC (Partners in Amphibian and Reptile Conservation, <http://www.parcplace.org/publications/habitat-management-guidelines.html>).

In generale, le operazioni di taglio dovrebbero considerare delle zone di protezione attorno ai siti riproduttivi e agli habitat terrestri adiacenti, in modo da non danneggiare le popolazioni locali e garantire un certo grado di connettività. Il taglio a raso ed i tagli che rimuovono più del 40 % o 50 % della copertura arborea andrebbero evitati nelle aree con elevata diversità ed abbondanza di anfibi, o dove siano presenti specie/popolazioni di particolare interesse conservazionistico.

I tagli troppo intensi alterano la struttura della cenosi eliminando la copertura ed esponendo il suolo alla radiazione solare diretta e al vento. Viene quindi a crearsi un microclima più caldo e secco, che causa elevate mortalità per disseccamento negli anfibi (Semlitsch et al., 2009). Essi necessitano infatti di un clima fresco e umido per mantenere la pelle, dalla quale

respirano, sempre ben idratata.

Andrebbero evitati, inoltre, i tagli troppo estesi, che rischiano di isolare le popolazioni di anfibi lasciando troppa poca superficie boscata inalterata attorno alle zone umide sfruttate per la riproduzione e introducendo così barriere ecologiche alla dispersione (Bennet & Gibson, 1980).

Le utilizzazioni forestali, inoltre, comportano in generale influenze sul suolo come compattazione, erosione e rimescolamento degli orizzonti organici e sulle risorse idriche, come aumento della torbidità delle acque superficiali, incremento della quantità di sedimento e inquinamento con oli. Come risultato di queste alterazioni dei corpi idrici, sono stati registrati effetti negativi su larve e adulti di anfibi, come ad esempio *Triturus carnifex*, *Bombina variegata* e *Rana latastei*; nella loro fase terricola questi animali risentono inoltre particolarmente anche delle conseguenze delle utilizzazioni sul suolo (Cavalli, 2007). Per limitare l'inquinamento delle acque provocato dalle operazioni di abbattimento, è buona norma utilizzare oli di origine vegetale, caratterizzati da minor ecotossicità e maggior biodegradabilità rispetto agli oli di origine minerale. Evitare le modalità di esbosco più impattanti per il suolo può inoltre costituire un importante accorgimento in presenza di popolazioni di anfibi di particolare rilevanza, come già indicato nella regione Veneto per la salamandra di Aurora, giudicata a rischio a causa del suo ristretto areale (Cavalli, 2007).

Per quanto riguarda la porzione centrale della provincia di Trento, dove per *Rana temporaria* sono stati registrati i livelli più bassi di variabilità genetica, risulta di fondamentale importanza tutelare i boschi ripariali di fondovalle e le altre aree forestali di bassa quota in prossimità dei siti di riproduzione. Questi ambienti hanno subito infatti un forte degrado a causa degli elevati livelli di antropizzazione caratteristici di quest'area. Garantire una rete ecologica di habitat idonei è condizione imprescindibile per la conservazione nel lungo periodo di questa specie, oltre che di altri anfibi caratteristici di questi ambienti, come ad esempio *Rana dalmatina* (inserita nell'allegato IV della direttiva "Habitat").

Per questa specifica situazione si può fare riferimento alle indicazioni gestionali suggerite per la conservazione della rana di Lataste (*Rana latastei* Boulenger, 1879; una rana rossa endemica della Pianura Padana e di aree collinari limitrofe, inserita negli Allegati II e IV della Direttiva "Habitat") nei siti della Rete Natura 2000 in Veneto (Tami, 2007).

Oltre alla particolare attenzione da riservare ai boschi igrofilo e le altre aree forestali di bassa quota, si consiglia di:

- tutelare le pozze d'acqua esistenti e crearne di artificiali dove ritenuto necessario, come è stato fatto ad esempio per il biotopo Palude di Roncegno (PAT, 1997);
- creare ambienti di rifugio vicino ai siti riproduttivi (boschetti, sistemi di siepi, ecc...);
- prestare particolare attenzione alle zone umide e ai corpi idrici durante le eventuali utilizzazioni forestali;
- non introdurre pesci negli specchi d'acqua.

Appare infine consigliabile l'acquisizione di maggiori conoscenze sull'impatto delle attività umane, come ad esempio l'agricoltura di tipo intensivo.

6. RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare tutto il personale della Fondazione Edmund Mach-Centro di Ecologia Alpina, in particolare il dott. Cristiano Vernesi per l'opportunità datami, la dott.ssa Barbara Crestanello, il dott. Duccio Rocchini, il dott. Luca Cornetti e il dott. Ing. Matteo Girardi per le conoscenze che mi hanno trasmesso e la disponibilità mostratami, il dott. Alessio Bertoldi, la dott.ssa Margherita Collini, la dott.ssa Elisa Gatto e il dott. Enrico Savonuzzi per aver sopportato e supportato l'estrema serietà che mi contraddistingue, e la dott.ssa Chiara Rossi per avermi aiutato a scrivere le pagine più belle e imprevedibili.

Un ringraziamento speciale infine va a *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 e *Rana dalmatina* Bonaparte 1840.

BIBLIOGRAFIA

Alford R.A. and Richards S.J., 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30:133-165.

AmphibiaWeb, 2011. Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California. <http://amphibiaweb.org/>

Arnold E.N., Burton J.A., 1985. Guida dei Rettili e degli Anfibi d'Europa, Muzzio, Padova, 244 pp.

Beebee T.J.C., 1995. Amphibian breeding and climate. *Nature* 374: 219-220.

Beebee T.J.C., 1996. Ecology and conservation of amphibians. Chapman and Hall.

Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L, Bonhomme F., 1999. GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Bennett S. H. and Gibbons J.W., 1980. Terrestrial activity, abundance and diversity of amphibians in differently managed forest types. *American Midland Naturalist* 103:412-416.

Benzécri J.P., 1973. L'Analyse des Données: T. 2, L'Analyse des correspondances. Paris: Dunod.

Berry O., 2001. Genetic evidence for wide dispersal by the sand frog, *Heleioporus psammophilus* (Anura: Myobatrachidae), in western Australia. *J. Herpetol.* 35: 136-141.

Birks J., Kitchener A.C., 1999. The distribution and status of the polecat (*Mustela putorius*) in Britain in the 1990's. Vincent Wildlife Trust, Herefordshire.

Blandford P.R.S., 1987. Biology of the polecat *Mustela putorius*: a literature review. *Mammal Rev* 17:155-198

Blaustein A.R., Wake D.B. and Sousa W.P., 1994. Amphibian declines: judging stability, persistence and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* 8: 60-71.

- Blaustein A.R. and Kiesecker J.M., 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters* 5: 597- 608.
- Blaustein A.R. Hatch A.C., Belden L.K., Scheessele E., Kiesecker J.M., 2003. Global change challenges facing amphibians. In: Semlitsch, R.D. (Ed.): *Amphibian Conservation*. Smithsonian Institution, Washington, pp. 187-198.
- Blaustein A.R., Walls S.C., Bancroft B.A., Lawler J.J., Searle C.L. and Gervasi S.S., 2010. Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. *Diversity* 2: 281-313.
- Bonin A., Taberlet P., Miaud C., Pompanon F., 2006. Explorative Genome Scan to Detect Candidate Loci for Adaptation Along a Gradient of Altitude in the Common Frog (*Rana temporaria*). *Molecular biology and evolution* 23 (4): 773-783.
- Brede E.G. and Beebee T.J.C., 2004. Contrasting population structures in two sympatric anurans: implications for species conservation. *Heredity* 92: 110–117.
- Brede E.G., Beebee T.J.C., 2006. Consistently different levels of genetic variation across the European ranges of two anurans, *Bufo bufo* and *Rana temporaria*. *Herpet. J.* 16: 265-271.
- Cade B.S. and Noon B.R., 2003. A gentle introduction to quantile regression for ecologists. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1(8): 412-420.
- Cade B.S. and Richards J.D., 2006. A permutation test for quantile regression. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 11(1): 106-126.
- Caldonazzi M., Pedrini P. and Zanghellini S., 2002. Atlante degli Anfibi e Rettili della provincia di Trento 1987-1996 con aggiornamenti 2001. Museo Trid. Sc. Nat., Trento, 173 pp
- Calhoun A.J.K. and de Maynadier P., 2004. Forestry habitat management guidelines for vernal pool wildlife. Metropolitan Conservation Alliance, Wildlife Conservation Society. MCA Technical Paper Series n. 6.
- Cantwell M.D. and Forman R.T., 1993. Landscape graphs. *Ecological modeling with graph*. *Landscape Ecology* 8:239–255.
- Cavalli R., 2007. Le utilizzazioni forestali. In: Masutti L., Battisti A. (a cura di), 2007. *La gestione forestale per la conservazione degli habitat della Rete Natura 2000*. Regione del Veneto, Accademia Italiana di Scienze Forestali, Venezia.

CE, 1996. The Pan-European Biological and Landscape Diversity Strategy. Council of Europe, UNEP, ECNC.

Cisaro Martinoli G. and Bronzini L., 2006. Tornate e moltiplicatevi...La migrazione primaverile degli anfibi nel Biotopo di Fiavè. *Natura Alpina* 2: 48-54.

Collins J. P. and Storfer A., 2003. Amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9: 89-98.

Comps B., Gomory D., Letouzey J., Thiebaut B., Petit R.J., 2001. Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics* 157: 389-97.

Cornuet J.M. and Luikart G., 1996. Description and power analysis of two tests for inferring recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.

Crow J. F. and Kimura M. 1970. An introduction to population genetics theory. New York: Harper and Row.

Daszak P., Cunningham A.A. and Hyatt A.D., 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9: 141-150.

de Maynadier P.G. Houlahan J.E., 2008. Conserving vernal pool amphibians in managed forests. In: Calhoun A.J.K. and de Maynadier P.G. *Science and Conservation of Vernal Pools in Northeastern North America*. CRC Press.

Diaz-Paniagua C., 1992. Variability in timing of larval season in an amphibian community in SW Spain. *Ecography* 15: 267-272.

Dieckmann U., O'Hara B., Weisser W., 1999. The evolutionary ecology of dispersal. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 88-90.

Duellman W. E. & Trueb L., 1986. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York 670 pp.

Ehrlich P.R. and Ehrlich A.H., 1981. *Extinction: the causes and consequences of the disappearance of species*. Random House, New York, 305 pp.

- El Mousadik A. and Petit R.J., 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92: 832-839.
- Ellegren H., 1992. Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites- a new approach to studies of genetic relationship in birds. *The Auk* 109: 886-895.
- Ernst R., Rödel M.O., 2008. Patterns of community composition in two tropical tree frog assemblages: separating spatial structure and environmental effects in disturbed and undisturbed forests. *Journal of Tropical Ecology* 24: 111-120.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier L., Laval L. G., Schneider S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Felsenstein J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368-376.
- Ficetola G.F., Marziali L., Rossaro B., De Bernardi F., Padoa-Schioppa E., 2011. Landscape-stream interactions and habitat conservation for amphibians. *Ecological Applications* 21, 1272-1282
- Fisher R.A., 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford, Oxford University Press.
- Foll M. and Gaggiotti O.E., 2006. Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of Populations. *Genetics* 174: 875-891.
- Fortuna M.A., Gomez-Rodriguez C. and Bascompte J., 2006. Spatial network structure and amphibian persistence in stochastic environments. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 273:1429-1434.
- Frankham R., 1995a Effective population-size adult-population size ratios in wildlife: a review. *Genet. Res.* 66: 95-107

Frankham R., 1995b. Inbreeding depression: a threshold effect. *Conservation biology* 9: 792-799.

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, 617 pp.

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A., 2006. *Fondamenti di genetica della conservazione*. Zanichelli, Bologna, 257 pp.

Frantz A.C., Cellina S., Krier A., Schley L., Burke T., 2009. Using spatial Bayesian methods to determine the genetic structure of a continuously distributed population: clusters or isolation by distance? *Journal of Applied Ecology* 46: 493-505.

Funk W.C., Blouin M.S., Corn P.S., Maxell B.A., Pilliod D.S., Amish S. and Allendorf F., 2005. Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology* 14: 483-496.

Garroway C.J., Bowman J., Carr D., Wilson P.J., 2008. Applications of graph theory to landscape genetics. *Evolutionary Applications*. 1: 620-630.

Gaston K.J. and Spicer J.I., 2004. *Biodiversity: an Introduction (Second Edition)*. Blackwell Publishing, Oxford, 191 pp.

Ginzburg L.R. and Jensen C.X.J., 2004. Rules of thumb for judging ecological theories. *Trends in Ecology & Evolution* 19:121-126.

Ginzburg L.R., Jensen C.X.J. and Yule J.V., 2007. Aiming the “unreasonable effectiveness of mathematics” at ecological theory. *Ecological Modelling* 207:356-362.

Goudet J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). www.unil.ch/izea/software/fstat.html.

Grossenbacher K., 1997. *Rana temporaria* Linnaeus, 1758. In: Gasc J., Cabela A., Crnobrnja-Isilovic J., Dolmen D., Grossenbacher K., Haffner P., Lescure J., Martens H., Oliveira M., Sofianidou T., Veith M. & Zuiderwijk A. *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*. Societas Europaea Herpetologica and Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris (pp. 158-159).

Guillot G., Estoup A., Mortier F. and Cosson J.F., 2005a. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261-1280.

- Guillot G., Mortier F., Estoup A., 2005b. Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5 (3): 708–711.
- Guo S.W. and Thompson E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Haag T., Santos A.S., Sana D.A., Morato R.G., Cullen L. Jr, Crawshaw P.G. Jr, De Angelo C., Di Bitetti M.S., Salzano F.M., Eizirik E., 2010. The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). *Molecular Ecology* 19(22): 4906-21.
- Hancock J.M., 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In *Microsatellites: Evolution and applications*. Edited by Goldstein D, Schlötterer C. New York , Oxford University Press; 1999:1-9.
- Harrison S., 1991. Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation. *Biol. J. Linn. Soc.* 42: 73-88.
- Hartel T. and Nemes S.Z., 2006. Assessing the effect of toe clipping in on the yellow bellied toads. In: *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 52 (4): 359-366.
- Hartl D.L. and Clark A.G., 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates Inc.
- Hedrick P.W., Brussard P.F, Allendorf F.W., Beardmore J. and Orzack S.H., 1986. Protein variation, fitness, and captive propagation. *Zoological Biology* 5: 91-99.
- Henle K., Dick D., Harpke A., Kühn I., Schweiger O. and Settele J., 2008. Climate Change Impacts on European Amphibians and Reptiles. In: *Biodiversity and Climate Change: Reports and Guidance developed under the Bern Convention (2009)*, Vol. 01.
- Higgins K., and Lynch M., 2001. Metapopulation extinction caused by mutation accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 98: 2928–2933.
- Hill W. G., 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet. Res.* 38: 209–216.
- Hitchings S.P. and Beebee T.J.C., 1997. Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) population: implications for biodiversity conservation. *Heredity* 79:117-127.

Hotelling H., 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. J. Educ. Psychol. 24: 417–441, 498–520.

IUCN, Conservation International, and NatureServe. 2008. An Analysis of Amphibians on the 2008 IUCN Red List . www.iucnredlist.org/amphibians

Jedrzejska B., Brzezinski M., Jedrzejski W., 2003. Seasonal dynamics and breeding of amphibians in pristine forests (BNP, E Poland) in dry years. Folia Zool. 52(1): 77-86.

Jedrzejski W., Jedrzejska B. & Brzezinski M., 1993. Winter habitat selection and feeding habits of polecat (*Mustela putorius*) in the Bialowieza National Park, Poland. Z. Säugetierkunde, 58: 75-83.

Johansson M., Primmer C.R. and Merilä J., 2006. History vs. current demography: explaining the genetic population structure of the common frog (*Rana temporaria*). Molecular Ecology 15: 975 -983.

Johansson M., Primmer C.R. and Merilä J., 2007. Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). Molecular Ecology 16: 2693 -2700.

Johansson M., Primmer C.R., Sahlsten J. and Merilä J., 2005. The influence of landscape structure on occurrence, abundance and genetic diversity of the common frog, *Rana temporaria*. Global Change Biology 11: 1664-1679.

Jolliffe I.T., 2002. Principal Component Analysis. Second edition, New York. Springer-Verlag New York, Inc.

Kuzmin S., Ishchenko V., Tuniyev B., Beebee T., Andreone F., Nyström P., Anthony B., Schmidt B., Ogrodowczyk A., Ogielska M., Bosch J., Miaud M., Loman J., Cogalniceanu D., Kovács T., Kiss I., 2008. *Rana temporaria*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. <http://www.iucnredlist.org/>

Lampert K.P., Rand A.S., Mueller U.G., Ryan M.J., 2003. Finescale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the tungara frog. Molecular Ecology 12: 3325–3334.

Lande R., 1994. Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. Evolution 48: 1460-1469.

Lanka V., Vit Z., Knotek J., 1986, Rettili e Anfibi. Istituto geografico De Agostini, Novara. 224 pp.

Lanza B., Nistri A. & Vanni S., 2009. Anfibi d'Italia. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, I.S.P.R.A. Grandi and Grandi Editori, Savignano sul Panaro (Mo).

Lapini L., 2005. Si fa presto a dire rana. Guida al riconoscimento degli anfibi anuri nel Friuli Venezia Giulia. Provincia di Pordenone-Comando di Vigilanza Ittico-Venatoria & Comune di Udine-Museo Friulano di Storia Naturale ed., Udine, 48 pp.

Lasen C., Tami F., Masutti L., 2007. Schede degli habitat silvopastorali del Veneto. In: Masutti L., Battisti A. (a cura di), 2007. La gestione forestale per la conservazione degli habitat della Rete Natura 2000. Regione del Veneto, Accademia Italiana di Scienze Forestali, Venezia.

Laurila A., 1998. Breeding habitat selection and larval performance of two anurans in freshwater rock-pools. *Ecography* 21: 484-494.

Leakey R. and Lewin R., 1995. The sixth extinction: biodiversity and its survival. Weidenfeld & Nicolson, London, 193 pp.

Leberg P.L., 1990. Influence of genetic variability on population growth: implications for conservation. *Journal of fish biology* 37:193-195.

Legendre P. and Legendre L., 1998. Numerical ecology. Second English edition. Elsevier Science BV, Amsterdam, 853 pages.

Lenormand T., 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 17, 183–189.

Lesbarreres D., Primmer C.R., Laurila A. and Merilä J., 2005. Environmental and population dependency of genetic variability-fitness correlations in *Rana temporaria* populations. *Molecular Ecology* 14: 311-323.

Levins R., 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America* 15: 237–240.

Li Y-C., Korol A.B., Fahima T. and Nevo E., 2004. Microsatellites within genes: structure, function and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21(6): 991-1007.

Lodé T., 1994. Environmental factors influencing habitat exploitation by the polecat *Mustela putorius* in western France. *Journal of Zoology* 234 (1): 75–88.

Lodé T., 1996. Polecat predation on frogs and toads at breeding sites in western France. *Ethology Ecology and Evolution* 8 (2): 115-124.

Luikart G., Allendorf F.W., Cornuet J.M., Sherwin W.B., 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test of recent population bottlenecks. *The American Genetic Association* 89: 238-247.

Luiselli L., Anibaldi C. & Capula M., 1995. The diet of juvenile adders, *Vipera berus*, in an alpine habitat. *Amphibia-Reptilia* 16: 404-407.

Manel S., Schwartz M., Luikart G. and Taberlet P., 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 136-142.

Marsh D.M. and Trenham P.C., 2001. Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conserv. Biol.* 15: 40-49.

Matsuba C. and Merilä J., 2009. Isolation and characterization of 145 polymorphic microsatellite loci for the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology Resources*. 9 (2): 555-562.

McRae B.H. and Beier P., 2007. Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 104(50): 19885–19890.

Mendelson J.R. , Lips K.R., Gagliardo R.W., Rabb G.B., Collins J.P., Diffendorfer J.E., Daszak P., Ibáñez D.R., Zippel K.C., Lawson D.P., Wright K.M., Stuart S.N., Gascon C., da Silva H.R., Burrowes P.A., Joglar R.L., La Marca E., Lötters S., du Preez L.H., Weldon C., Hyatt A., Rodriguez-Mahecha J.V., Hunt S., Robertson H., Lock B., Raxworthy C.J., Frost D.R., Lacy R.C., Alford R.A., Campbell J.A., Parra-Olea G., Bolaños F., Domingo J.J., Halliday T., Murphy J.B., Wake M.H., Coloma L.A., Kuzmin S.L., Price M.S., Howell K.M., Lau M., Pethiyagoda R., Boone M., Lannoo M.J., Blaustein A.R., Dobson A., Griffiths R.A., Crump M.L., Wake D.B., Brodie E.D, 2006. Mitigating global amphibian extinctions: a call for fundamental changes in policy and actions. *Science* 313:48.

- Miaud C., Guyétant R., Elmberg J., 1999. Variations in lifehistory traits in the common frog *Rana temporaria* (Amphibia: Anura): a literature review and new data from the French Alps. *Journal of Zoology* 249: 61–73.
- Mills S.L. and Smouse P.E., 1994. Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. *American Naturalist* 144: 412-431.
- Minor E.S. and Urban D.L., 2007. Graph theory as a proxy for spatially explicit population models in conservation planning. *Ecological Applications* 17 (6): 1771-1782.
- Mohneke M. & Rödel M.O., 2009. Declining amphibian populations and possible ecological consequences– a review. *Salamandra* 45: 203-210.
- Neteler M. and Mitasova H., 2008. *Open Source GIS: A GRASS GIS Approach*; Springer: New York, NY, USA.
- Neteler M., 2010. Estimating daily land surface temperatures in mountainous environments by reconstructed MODIS LST data. *Remote Sens.* 2: 333-351.
- Newman R.A. and Squire T., 2001. Microsatellite variation and finescale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology* 10: 1087–1100.
- Olsson M., Uller T., 2003. Thermal environment, survival and local adaptation in the common frog, *Rana temporaria*. *Evolutionary Ecology Research* 5: 431–437.
- Palo J.U., Schmeller D.S. Laurila A., Primmer C.R., Kuzmin S.L., Merilä J., 2004. High degree of population subdivision in a widespread Amphibian. *Molecular Ecology* 13: 2631–2644.
- PAT, 1997. I biotopi tutelati. Provincia Autonoma di Trento- Servizio parchi e foreste demaniali – Ufficio biotopi.
- Peakall R. and Smouse P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pearson K., 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Phil. Mag.* (6), 2: 559–572.

Pechmann J.H.K., Scott D.E., Gibbons J.W., Semlitsch R.D., 1989. Influence of wetland hydroperiod on diversity and abundance of metamorphosing juvenile amphibians. *Wetlands Ecol. Manage.* 1: 3-11.

Pedrini P., Prigioni C., Volcan G., 1995. Distribution of mustelids in Adamello-Brenta Park and surroundings areas (Central Italian Alps). *Hystrix* 7(1-2): 39-44.

Phillimore A.B., Hadfield J.D., Jones O.R., Smithers R.J., 2010. Differences in spawning date between populations of common frog reveal local adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 107: 8292-8297.

Piertney S.B., Mac Coll A.D.C., Bacon P.J., Dallas J.F., 1998. Local genetic structure in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 7, 1645–1654.

Piha H., Luoto M., Piha M. and Merilä J., 2007. Anuran abundance and persistence in agricultural landscapes during a climatic extreme. *Global Change Biology* 13: 300-311.

Piry S., Luikart G., Cornuet J.M., 1999. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90:502-503.

Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N., La Marca, E., Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sánchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J. and Young, B.E., 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439: 161-167.

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

Pritchard J.K., Wen X., Falush D., 2010. Documentation for structure software: Version 2.3. http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure_v.2.3.1/documentation.pdf.

R Development Core Team 2009. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Wien, Austria. <http://www.R-project.org>.

Raymond M. and Rousset F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86:248-249.

Reeve H.K. and Sherman P.W., 1993. Adaptation and the goals of evolutionary research. *Quarterly Review of Biology* 68: 1-32.

Ribeiro R., Carretero M.A, Sillero N., Alarcos G., Ortiz-Santaliestra M., Lizana M., Llorente G.A., 2011. The pond network: can structural connectivity reflect on (amphibian) biodiversity patterns. *Landscape Ecology* 26 (5): 673-682.

Rolando B., Marzona E., Colombo L., Fiorito S., Castellano S. and Giacoma C., 1994. Deposizione e accrescimento delle ovature in *Rana temporaria*. *Studi trent. Sci. nat., Acta biol.* 71: 191-196.

Rossetto M., Kooyman R., Sherwin W. and Jones R., 2008. Dispersal limitation, rather than bottlenecks or habitat specificity, can restrict the distribution of rare and endangered rainforest trees. *American Journal of Botany* 95: 321-329.

Rothermel B.B. and Semlitsch R.D., 2002. An experimental investigation of landscape resistance of forest versus old-field habitats to emigrating juvenile amphibians. *Conservation Biology* 16(5):1324-1332.

Rousset F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.

Rousset F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.

Rozenfeld A.F., Arnaud-Haond S., Hernandez-Garcia E., Eguiluz E.M., Serrao E.A., Duarte C.M., 2008. Network analysis identifies weak and strong links in a metapopulation system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 105: 18824-18829.

Sagvik J., Uller T., Olsson M., 2005: Outbreeding depression in the common frog, *Rana temporaria*. *Conservation Genetics*, 6:205-211.

Saitou N., Nei M., 1987. The neighbour-joining method, A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.

Savage R.M., 1961. The ecology and life history of the common frog. Sir Isaac Pitman and Sons, London.

Selkoe K.A and Toonen R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.

Semlitsch R.D., 2003. Conservation of pond breeding amphibians. In: Semlitsch, R.D. (Ed.): *Amphibian Conservation*. Smithsonian Institution, Washington, pp. 8-23.

Semlitsch R.D. and Bodie J.R., 2003. Biological criteria for buffer zones around wetlands and riparian habitats for amphibians and reptiles. *Conservation Biology* 17:1219-1228

Semlitsch R.D., Todd B.D., Blomquist S.M., Calhoun A.J.K., Gibbons J.W., Gibbs J.P., Graeter G.J., Harper E.B., Hocking D.J., Hunter M.L., Patrick D.A., Rittenhouse T.A.G., Rothermel B.B., 2009. Effects of timber harvest on amphibian populations: understanding mechanisms from forest experiments. *Bioscience* 59:853-862.

Seppa P. and Laurila A., 1999. Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity* 82: 309-317.

Shannon C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27: 379- 423, 623-656.

Sherwin W.B., 2010. Entropy and information approaches to genetic diversity and its expression: genomic geography. *Entropy* 12: 1765-1798.

Sherwin W.B., Jobot F., Rush R. and Rossetto M., 2006. Measurement of biological information with applications from genes to landscapes. *Molecular Ecology* 15: 2857-2869.

Sidorovich V.E. 1992. Comparative analysis of the diets of European mink (*Mustela lutreola*), American mink (*M. vison*) and polecat (*M. putorius*) in Byelorussia. *Small Carnivore Conservation* 6: 2-4.

Sinsch U., 1990. Migration and orientation in anuran amphibians. *Ethol. Ecol. Evol.* 2: 65-79.

Slatkin M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462

Smith M.A. and Green D.M., 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28: 110-128.

Sotelo G., Morán P., Fernández L., Posada D., 2008. Genetic variation of the spiny spider crab *Maja brachydactyla* in the northeastern Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 362:211-223.

Spagnesi M., De Marinis A.M. (a cura di), 2002. Mammiferi d'Italia. Quad. Cons. Natura, 14. Ministero dell'Ambiente- Ist. Naz. Fauna Selvatica.

Speare R. and Steering Committee of Getting the Jump on Amphibian Disease, 2001. Developing management strategies to control amphibian diseases: decreasing the risks due to communicable diseases. James Cook University, Townsville.

Squire T. and Newman R.A., 2002. Fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*) in a northern woodland. *Herpetologica* 58: 119-130.

Stevens V.M., Polus E., Wesselingh R.A., Schtickzelle N., Baguette M., 2004. Quantifying functional connectivity: experimental evidence for patch-specific resistance in the Natterjack toad (*Bufo calamita*). *Landscape Ecology* 19: 829-842.

Tallmon D.A., Koyuk A, Luikart G.H., Beaumont M.A., 2008. ONeSAMP: a program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology Resources*, 8: 299–301.

Tami F., 2007. Schede delle specie animali. In: Masutti L., Battisti A. (a cura di), 2007. La gestione forestale per la conservazione degli habitat della Rete Natura 2000. Regione del Veneto, Accademia Italiana di Scienze Forestali, Venezia.

Thomas C.D., Cameron A., Green R.E., Bakkenes M., Beaumont L.J., Collingham Y.C., Erasmus B.F.N., Siqueira M.F.D., Grainger A., Hannah L., 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427: 145-148.

Tomasi M., 2003. Piano di gestione del sito Natura 2000/Biotopo di Interesse Provinciale "IT3120050 - Torbiera delle Viote" (TN). Servizio Parchi e Conservazione della Natura - P.A.T.

Uller T., Savgik J. and Olsson M., 2006. Crosses between frog populations reveal genetic divergence in larval life history at short geographical distance. *Biological Journal of the Linnean Society* 89: 189–195.

UNEP, 1992. Convention on Biological Diversity. Rio de Janeiro <http://www.cdb.int/>

Urban D.L. and Keitt T.H., 2001. Landscape connectivity: a graph-theoretic perspective. *Ecology*, 82: 1205-1218.

Van Buskirk J., 2005. Local and landscape influence on amphibian occurrence and abundance. *Ecology* 86:1936–1947.

Van Dyck H. and Matthysen E., 1999. Habitat fragmentation and insect flight: a changing ‘design’ in a challenging landscape? *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 172–174.

Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.

Veith M., Kosuch J., Vences M., 2003. Climatic oscillations triggered post-Messinian speciation of Western Palearctic brown frogs (Amphibia, Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 310–327.

Veith M., Vences M., Vieites D.R., Nieto-Roman S., Palanca A., 2002. Genetic differentiation and population structure within Spanish common frogs (*Rana temporaria* complex, Ranidae, Amphibia). *Folia Zoologica* 51:307-318.

Vitt L. J., Caldwell J. P., Wilbur H. M. and Smith D. C., 1990. Amphibians as harbingers of decay. *Bioscience* 40:418.

Waples R.S., 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics* 7: 167–184.

Waples R.S., Do C., 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8: 753–756.

Watts P.C., Rouquette J.R., Saccheri I.J., Kemp S.J., Thompson K.J., 2004. Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. *Molecular Ecology* 13: 2931–2945.

Weber D., 1989. The diet of polecats (*Mustela putorius*) in Switzerland. *Z. Säugetierkunde*, 54: 157-171.

Weir B.S. and Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Wiens J.A., 2001. The landscape context of dispersal. In: Dispersal (eds Clobert J, Danchin E, Dhondt AA, Nichols JD), pp. 98–109. Oxford University Press, New York, NY.

Wollenberg A. L. van den., 1977. Redundancy analysis. An alternative for canonical correlation analysis. *Psychometrika* 42: 207-219.

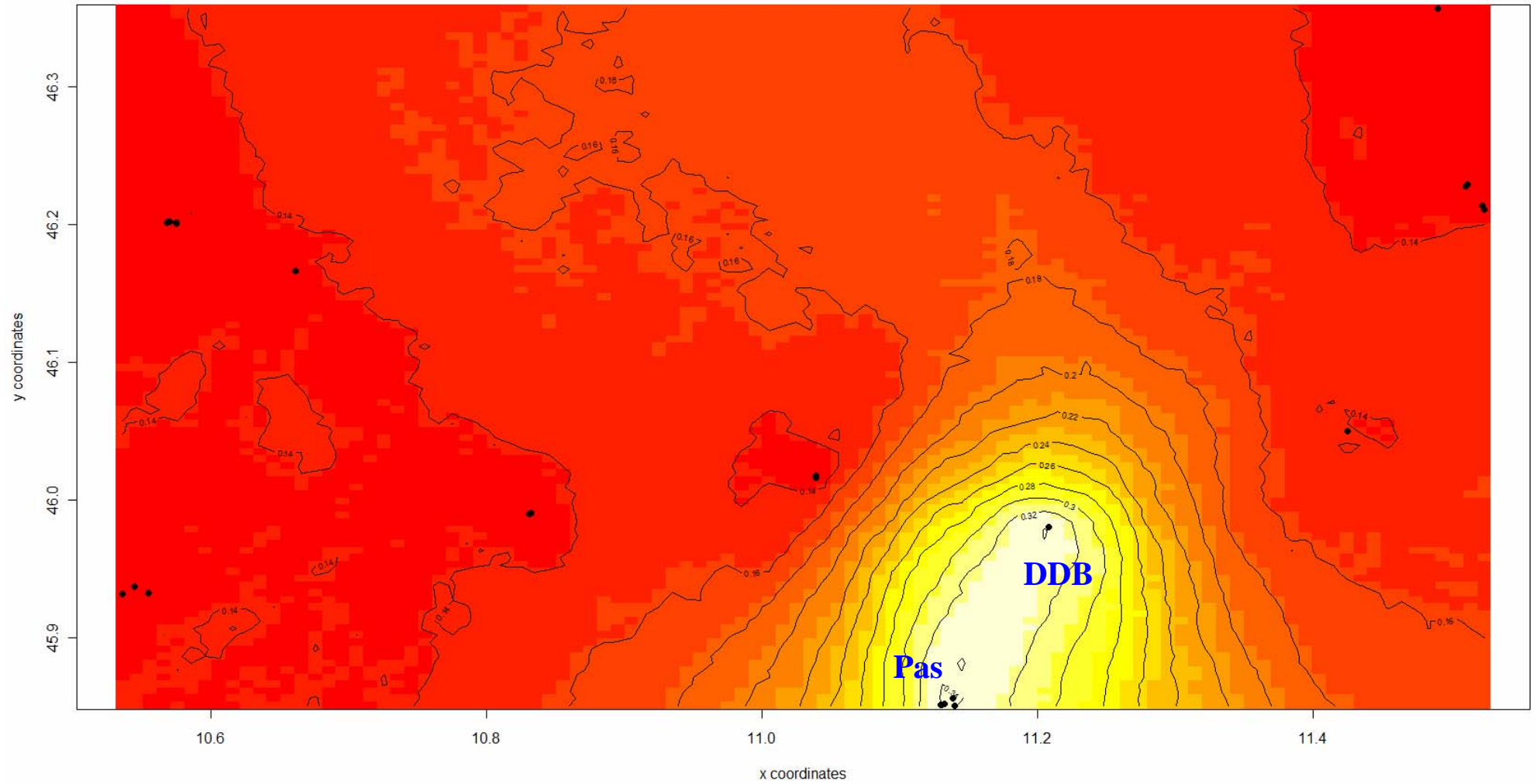
Wright S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97–159.

Wright S., 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138.

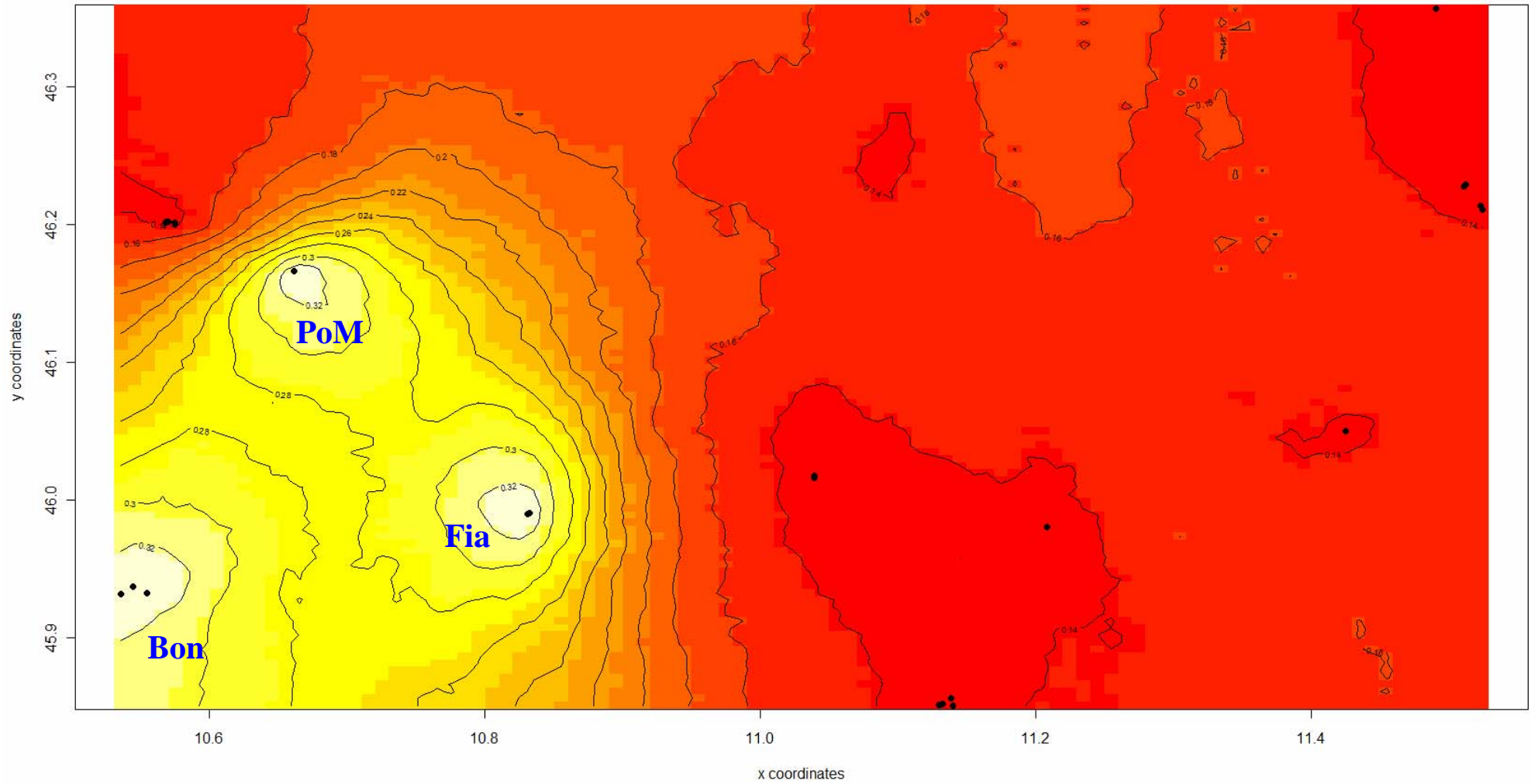
ALLEGATO 1

Viene di seguito presentata la rappresentazione spaziale di ciascun cluster inferito secondo il metodo di clusterizzazione bayesiano implementato dal software GENELAND. Sono messe in risalto le discontinuità genetiche tra le popolazioni sul territorio oggetto dello studio.

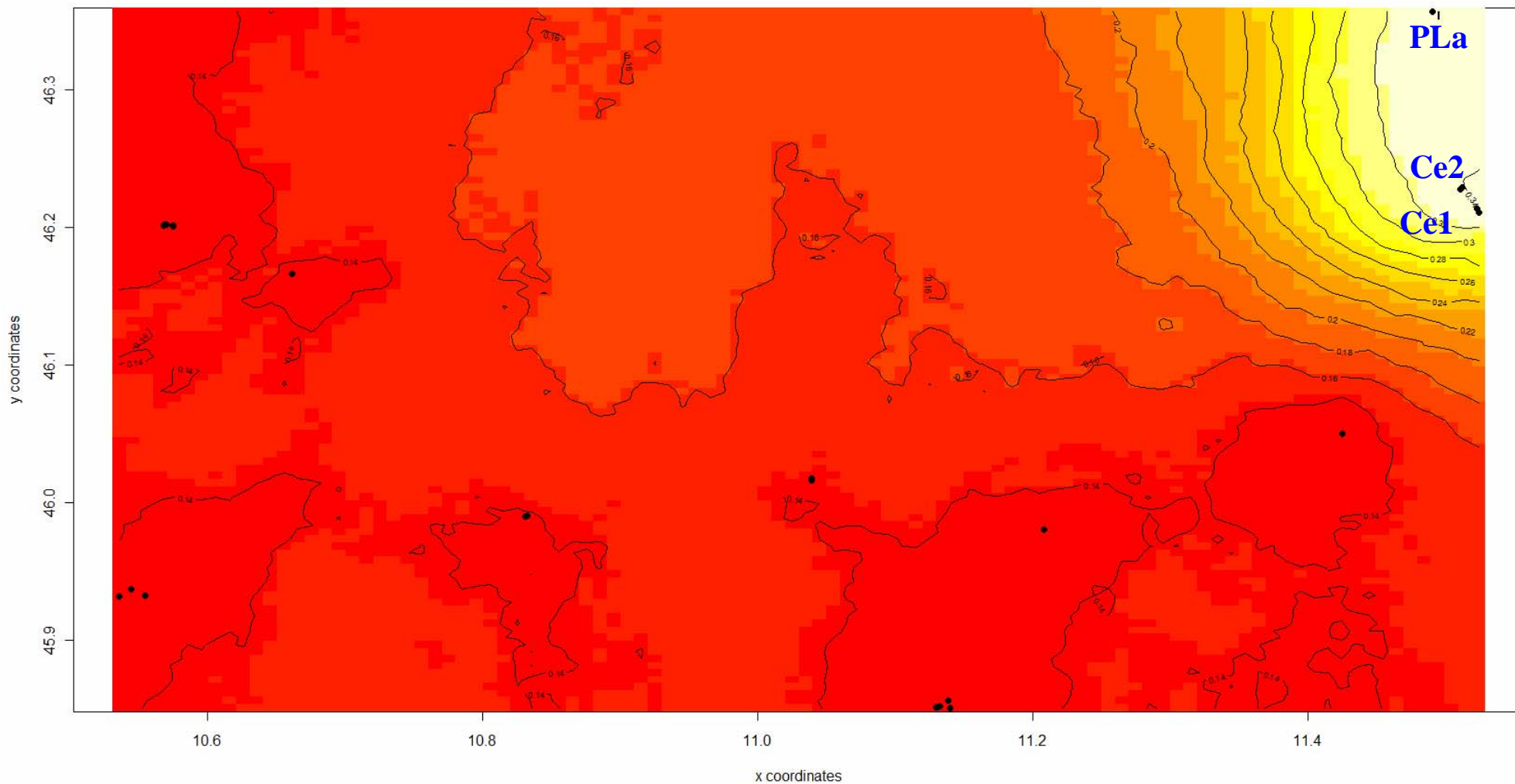
Map of posterior probability to belong to cluster 1



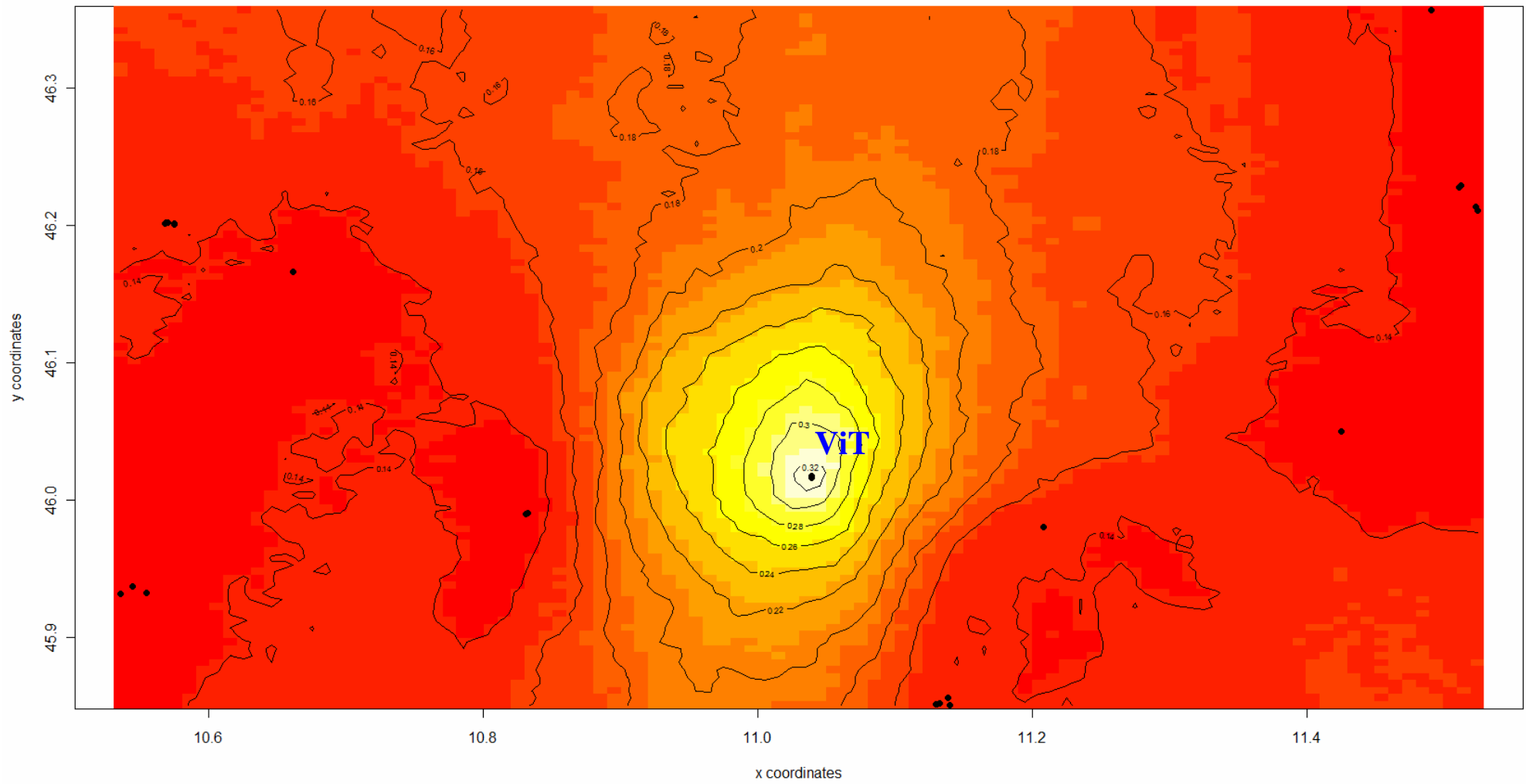
Map of posterior probability to belong to cluster 2



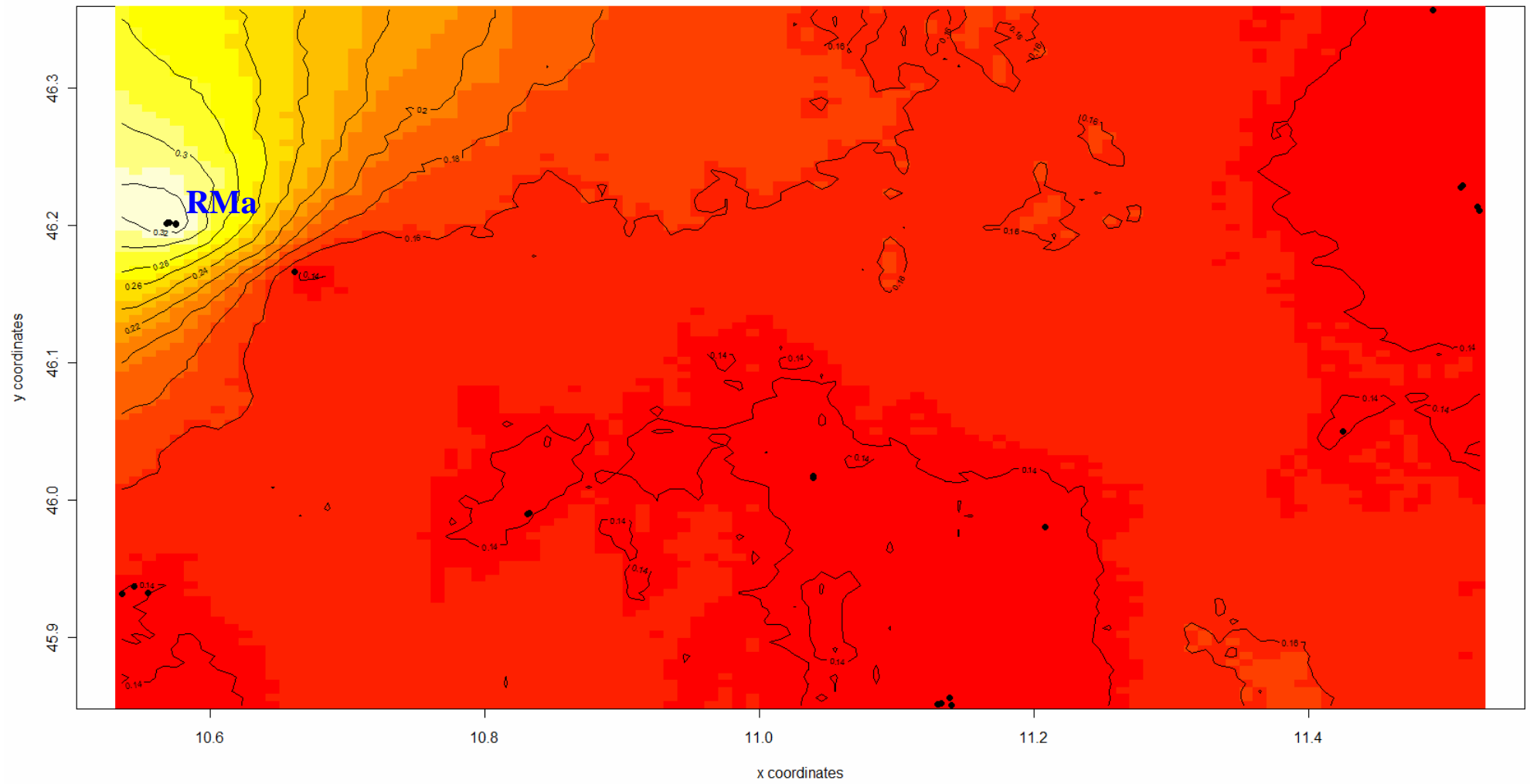
Map of posterior probability to belong to cluster 3



Map of posterior probability to belong to cluster 4



Map of posterior probability to belong to cluster 5



Map of posterior probability to belong to cluster 6

