

Nota breve - Short note

Caratterizzazione meristica e genetica di Ciprinidi atipici presenti nel bacino spezzino del Magra-Vara

Luca CIUFFARDI^{1*}, Milena MALDINI², Andrea BALDUZZI¹ & Attilio ARILLO¹

¹ Dip. Te. Ris., Università degli Studi di Genova, Corso Europa n. 26, 16132 Genova, Italia

² Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma, Viale G.P. Usberti n. 11, 43100 Parma, Italia

* E-mail dell'Autore per la corrispondenza: luca.ciuffardi@unige.it

SUMMARY - *Meristic and genetic characterization in atypical Cyprinids from the Magra-Vara basin (Province of La Spezia, Italy)* - A mitochondrial gene and eight meristic features were investigated in five taxa of Cyprinids belonging to *Leuciscinae* subfamily. Research was carried out on: 1) atypical specimens collected from Magra-Vara basin; 2) specimens of *Leuciscus cephalus*, *Leuciscus souffia* and *Rutilus rubilio* collected from Magra-Vara basin; 3) specimens of the controversial taxon *Leuciscus lucumonis* collected from River Nestore, Province of Perugia, Italy. Results show that meristic features of the atypical cyprinid specimens are statistically similar to those found in "*lucumonis*" specimens. Genetic analysis seems to support morphological investigations but additional molecular data will be necessary to define levels of population variability and appropriate identification of the "*lucumonis*" taxon.

Parole chiave: caratteri meristici, citocromo b, Ciprinidi, bacino del Magra-Vara, La Spezia

Key words: meristic features, cytochrome b, Cyprinids, Magra-Vara basin, La Spezia

1. INTRODUZIONE E AREA DI STUDIO

La ricerca, realizzata in collaborazione con la Polizia Provinciale della Spezia Sez. Faunistica, è stata condotta su Ciprinidi appartenenti alla sottofamiglia *Leuciscinae*, ed ha riguardato lo studio di otto diversi caratteri meristici (numero di scaglie lungo, sopra e sotto la linea laterale, numero di raggi divisi delle pinne dorsale, ventrali e anale, numero di denti e tipo di superficie masticatoria) e l'analisi di sequenze dirette del gene mitocondriale citocromo b (Briolay *et al.* 1998).

Lo studio dei caratteri meristici è stato effettuato su animali del bacino del Magra-Vara (SP), sia su esemplari atipici, con fenotipo non totalmente riconducibile a quello delle altre specie note di Ciprinidi (Fig. 1), sia su individui di cavedano *Leuciscus cephalus* (L., 1758), vairone *Leuciscus souffia muticellus* Bonaparte, 1837 e rovella *Rutilus rubilio* (Bonaparte, 1837). Sono stati inoltre presi in considerazione esemplari appartenenti al taxon controverso *Leuciscus lucumonis* Bianco, 1982 (cfr. Gandolfi *et al.* 1991; Manaresi *et al.* 1997; Ketmaier *et al.* 1998; Zerunian 2002) provenienti dal Fiume Nestore (PG). La ricerca è scaturita dall'esigenza di pervenire ad un migliore inquadramento sistematico dei Ciprinidi atipici spezzini nell'ambito della sottofamiglia *Leuciscinae*.

2. METODI

La cattura degli esemplari da esaminare è stata ef-

fettuata mediante pesca elettrica, attraverso l'impiego di un elettrostorditore spallabile a batteria. Gli animali spezzini destinati alla ricerca sono stati soppressi mediante immersione per 20 minuti in acqua trattata con 200 p.p.m. di anestetico MS222 (Argent Chemical Laboratories), quindi conservati in soluzione di etanolo al 70 %. I pesci provenienti dal Fiume Nestore, invece, sono stati conservati in soluzione di formaldeide.

La comparazione tra gli individui esaminati sulla base dei caratteri meristici (rispettivamente 12 esemplari atipici, 9 cavedani, 9 vaironi, 13 rovelle e 13 esemplari appartenenti al taxon controverso *Leuciscus lucumonis*) è stata condotta mediante la costruzione di un dendrogramma, elaborato a partire da una matrice di distanze euclidee, per mezzo del software *BioDiversity Professional* versione 2 (<http://www.sams.ac.uk/research/software>). La significatività delle differenze tra i vari taxa per i singoli caratteri meristici è stata inoltre stimata utilizzando una ANOVA a una via e il successivo test di *Student-Newman-Keuls*, mediante l'impiego del software *Primer 1.0* (Glantz 1988).

Nell'ambito delle analisi genetiche (che hanno interessato in particolare 7 esemplari atipici spezzini) il gene mitocondriale citocromo b è stato amplificato utilizzando primer specifici per ciprinidi (L15267 e H15891) (Briolay *et al.* 1998). Un quantitativo pari ad 1 µl di DNA (100 ng µl⁻¹) è stato sottoposto a 30 cicli di amplificazione PCR in un volume di reazione di 25 µl, impiegando 1U di *Taq Polymerase* (Roche Molecular Biochemical, Mannheim Ger-



Fig. 1 - Esemplare atipico del bacino del Magra-Vara.
Fig. 1 - Atypical specimen from the Magra-Vara River basin.

many), Mg^{2+} 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM e 10 μ M di ogni specifico primer. In seguito ad una iniziale denaturazione a 94 °C per 1 min, i successivi cicli PCR hanno previsto una denaturazione a 94 °C per 30 s, annealing a 55 °C per 30 s ed una estensione della catena a 72 °C per 1 min. Il prodotto dell'amplificazione, valutato mediante elettroforesi su gel d'agarosio (2%), è stato purificato da banda di gel, utilizzando il GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham-Biosciences) (Briolay *et al.* 1998). Il sequenziamento diretto è stato effettuato impiegando il CEQ DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter); il prodotto ottenuto è stato quindi precipitato e reidratato per il caricamento sul sequenziatore automatico CEQ 8000 DNA Analysis System (Beckman Coulter) (Maldini *et al.* 2007). Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante allineamenti multipli effettuati con CLUSTALX (Thompson *et al.* 1997) e GENEDOC (Free Software

Foundation 1991), che hanno permesso la visualizzazione di alberi filogenetici (TreeView) (Maldini *et al.* 2007) e la determinazione di indici di distanze genetiche secondo l'indice di Kimura a 2 parametri disponibile nel software Phylip (Felsenstein *et al.* 2004).

3. RISULTATI

Il dendrogramma costruito sui caratteri meristici mostra una stretta vicinanza e commistione tra il gruppo dei "lucumonis" del Fiume Nestore (LUC) e quello degli atipici spezzini (ASP), con l'esclusione di tre soli esemplari: il n. 9 (LUC), che mostra affinità con i vaironi, i nn. 13 e 17 (ASP) che si collocano nel gruppo dei cavedani (Fig. 2). L'insieme LUC + ASP, caratterizzato dall'assenza di differenze statisticamente significative nei caratteri meristici (Tab. 1), appare inoltre particolarmente affine al nucleo dei cavedani (CAV), mentre risulta assai più "lontano" rispetto ai gruppi delle rovelle (ROV) e dei vaironi (VAI). L'entità LUC + ASP appare caratterizzata dai seguenti valori: 41-47 scaglie lungo la linea laterale, con 7-10 file al di sopra di questa e 3-4 al di sotto; 7-8 raggi divisi nella pinna dorsale, 6-7 nelle pinne ventrali e 7-9 nella pinna anale; strutture dentarie tipiche del genere *Leuciscus* composte da 6-7 denti lunghi e uncinati all'apice, disposti su due file (1 o 2 denti nella fila anteriore, 5 in quella posteriore), talvolta seghettati e raramente caratterizzati da un principio di superficie tronca pseudo-molariforme.

L'analisi degli aplotipi mitocondriali del gene citocromo b ha evidenziato un'alta omogeneità intrapopolazione tra i 7 esemplari di Ciprinidi atipici presi in considerazione, definita da una distanza genetica media (Kimura 2 parametri) pari a 0.009 (Tab.2).

La distanza genetica tra questi esemplari ed individui appartenenti a popolazioni italiane degli altri taxa considerati (Tab. 2) ha rivelato una minore distanza degli atipici con il taxon controverso *L. lucumonis* (0.084) rispetto alla specie *L. cephalus* (0.182). A differenza di fenomeni

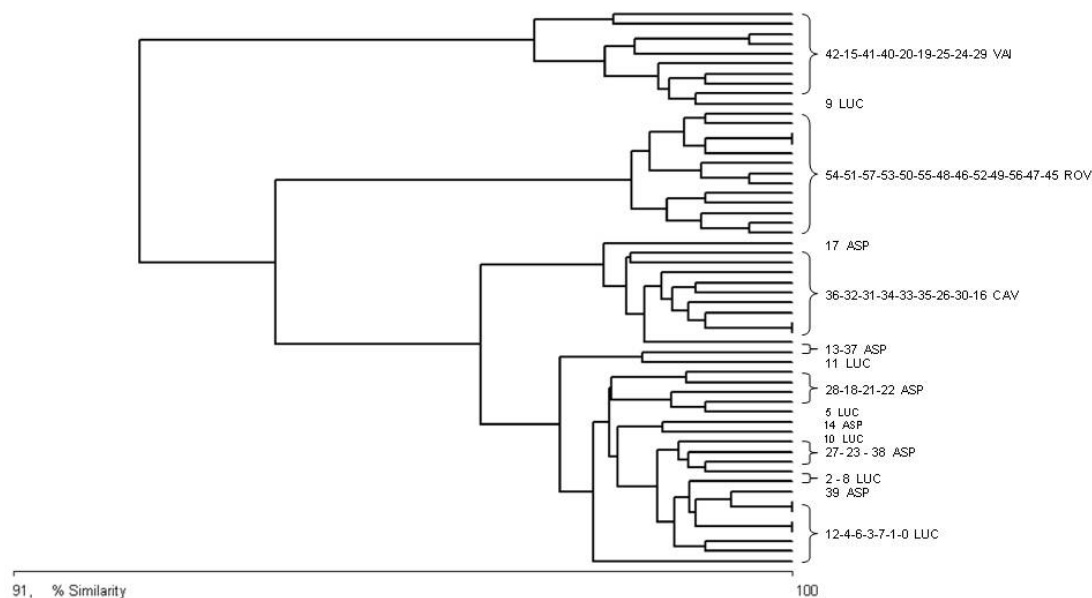


Fig. 2 - Dendrogramma delle differenze tra gli individui sulla base dei caratteri meristici (ciascun numero identifica un esemplare esaminato).

Fig. 2 - Dendrogram of differences among specimens carried out on meristic features (numbers represent the specimens examined).

Tab. 1 - Significatività delle differenze ($P < 0.05, *$) tra i taxa in base ai diversi caratteri meristici (ANOVA a una via e test di Student-Newman-Keuls).

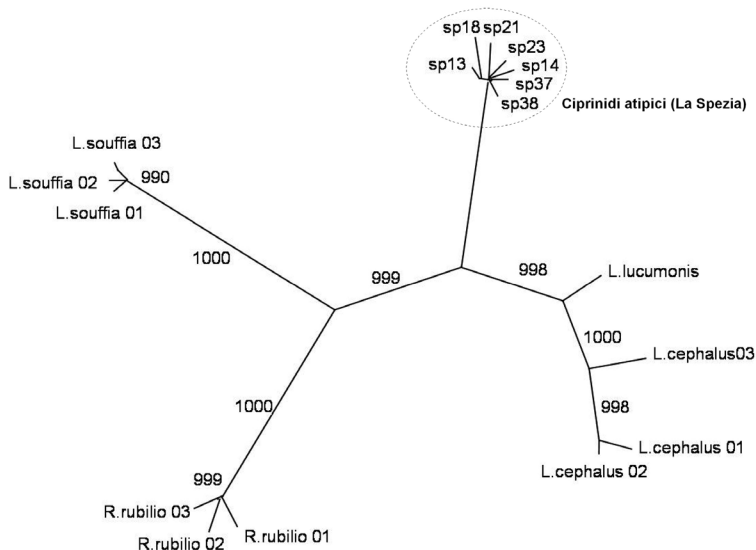
Tab. 1 - Significant statistically differences ($P < 0.05, *$) of the meristic features among the considered taxa (one-way ANOVA and Student-Newman-Keuls test).

| TAXA | SCAGLIE L.L. | SOPRA L.L. | SOTTO L.L. | RAGGI DIVISI P.D. | RAGGI DIVISI P.V. | RAGGI DIVISI P.A. | N. DENTI | TIPO SUPERFICIE MASTICATORIA |
|------------------------|-----------------|---------------|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------------------------------|
| VAIRONE - ROVELLA | * | * | * | | | * | * | * |
| VAIRONE - LUCUMONIS | * | * | * | * | | | * | |
| VAIRONE - ATIPICI SP | * | * | * | * | | | * | |
| VAIRONE - CAVEDANO | * | * | * | | * | * | * | |
| CAVEDANO - ROVELLA | * | | | | * | * | * | * |
| CAVEDANO - LUCUMONIS | * | | | * | * | * | | |
| CAVEDANO - ATIPICI SP | * | * | | * | * | * | | |
| ATIPICI SP - ROVELLA | * | | | * | | * | * | * |
| ATIPICI SP - LUCUMONIS | | | | | | | | |
| LUCUMONIS - ROVELLA | * | | | * | | * | * | * |

Tab. 2 - Indici di distanze genetiche medie (Kimura 2 parametri) entro i Ciprinidi atipici e tra questi ed esemplari appartenenti ad altri quattro taxa di leuciscini.

Tab. 2 - Kimura – two – parameter distances among atypical Cyprinid specimens and the other considered taxa.

| | La Spezia (Ciprinidi atipici) |
|---|-------------------------------|
| La Spezia (Ciprinidi atipici) | 0,009181 |
| <i>L. cephalus</i> (esemplari 01 e 02 Calabria; esemplare 03 Toscana) | 0,181924 |
| <i>L. souffia muticellus</i> (Toscana) | 0,150755 |
| <i>L. lucumonis</i> (Provincia di Perugia) | 0,084401 |
| <i>R. rubilio</i> (Toscana e Calabria) | 0,247641 |



0.01

Fig. 3 - Albero radiale Neighbor Joining relativo all'analisi del citocromo b.

Fig. 3 - Neighbor Joining radial tree based on cytochrome b analysis.

evidenziati nell'ambito della sottofamiglia *Leuciscinae* in popolamenti ittici dell'Italia meridionale (Bianco & Taraborelli 1985; Maldini *et al.* 2007), nel caso in questione si può inoltre escludere la possibilità che il "lucumonis" e gli atipici spezzini possano derivare da recenti eventi di ibridazione con vairone e rovela, ben più distanti nell'albero filogenetico (Fig. 3).

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli esemplari atipici spezzini e quelli appartenenti al taxon controverso "*Leuciscus lucumonis*" sembrerebbero costituire, sotto il profilo dei caratteri meristici diagnostici nell'ambito della sottofamiglia *Leuciscinae*, la medesima entità faunistica. Va sottolineato che alcuni valori meristici degli esemplari di "lucumonis" esaminati (numero di scaglie lungo la linea laterale e numero di denti) si discostano da quelli riportati nella descrizione del taxon (Bianco 1983). Sotto il profilo dei caratteri meristici, tra le specie autoctone appartenenti alla sottofamiglia *Leuciscinae*, l'entità ASP + LUC risulta particolarmente affine al cavedano, da cui tuttavia si discosta significativamente per un numero di scaglie lungo la linea laterale mediamente minore nonché per un numero mediamente inferiore di raggi divisi nelle pinne dorsale, ventrali ed anale.

Le analisi genetiche complessivamente confermano i risultati ottenuti dall'esame dei caratteri meristici, però non permettono di chiarire completamente il rapporto tra Ciprinidi atipici e "lucumonis"; gli elevati valori di *bootstrap* ottenuti attestano chiaramente, tuttavia, la separazione dell'entità composta da atipici spezzini e *Leuciscus lucumonis* rispetto a tutte le altre specie di leuciscini.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano sentitamente Ivano Bassani, Eleonora Landini, Massimo Lorenzoni, Mario Mori, Francesco Nonnis Marzano, Fernando Pacciolla, Davide Pini e Aldo Sani per la preziosa collaborazione prestata, a vario titolo, nella realizzazione della ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- Bianco P.G., 1983 - *Leuciscus lucumonis* n. sp. from Italy. *Senckenbergiana biol.*, 64: 81-87.
- Bianco P.G. & Taraborelli T., 1985 - Contributo alla conoscenza del genere *Rutilus* Rafinesque in Italia e nei Balcani occidentali (Pisces, Cyprinidae). *Boll. Mus. reg. Sci. nat. Torino*, 3: 131-172.
- Briolay J., Galtier N., Brito R.M. & Bouvet Y., 1998 - Molecular phylogeny of Ciprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, 9: 100-108.
- Felsenstein J., Fuseki A., Lamont S., Keeffe A. & Fineman D., 2004 - Phylip, version 3.6. *University of Washington*.
- Free Software Foundation, Inc., 1991 - GenDoc version 2. *Free Software Foundation*, Boston, MA 02111-1307 USA.
- Gandolfi G., Zerunian S., Torricelli P. & Marconato A., 1991 - *I pesci delle acque interne italiane*. Ist. Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 617 pp.
- Glantz S.A., 1988 - *Statistica per discipline bio-mediche*. II edizione. McGraw-Hill Libri Editore, 347 pp.
- Ketmaier V., Cobolli M., De Matthaes E. & Bianco P.G., 1998 - Allozymic variability and biogeographic relationships in two *Leuciscus* species complexes (Cyprinidae) from southern Europe, with the rehabilitation of the genus *Telestes* Bonaparte. *Ital. Journ. Zool.*, 65, suppl.: 41-48.
- Maldini M., Vaghi M., Nonnis Marzano F., Gandolfi G., Prigioni C. & Percudani R., 2007 - Ibridazione intergenerica tra i Ciprinidi *Rutilus rubilio* (Bonaparte 1837) e *Leuciscus cephalus* L. 1758 valutata mediante l'analisi di aplotipi mitocondriali. In: Specchi M. (a cura di), Atti XI Convegno Nazionale A.I.I.A.D. *Quad. ETP*, 34/2006: 63-67.
- Manaresi S., Mantovani B. & Zaccanti F., 1997 - Comparison of isozymic and muscle protein in three taxa of *Leuciscus* from northern Italy. *Ital. Journ. Zool.*, 64: 215-220.
- Thompson J., Gibson T. & Higgins D., 1997 - Clustal W, version 1.7. *European Molecular Biology Laboratory*, Germany and *University of County Cork*, Ireland.
- Zerunian S., 2002 - *Condannati all'estinzione? Biodiversità, biologia, minacce e strategie di conservazione dei Pesci d'acqua dolce indigeni in Italia*. Edagricole, Bologna, X + 220 pp.