

# Caratterizzazione di lamprede di bacini dei versanti tirrenico e adriatico dell'Italia centrale con analisi del DNA mitocondriale

James Tagliavini<sup>1\*</sup>, Gilberto Gandolfi<sup>1</sup>, Isabella La Fata<sup>1</sup>, Sergio Zerunian<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università di Parma. Parco Area delle Scienze 11/a - 43100 Parma

<sup>2</sup> Laboratorio di Ittiologia delle Acque Dolci - 04010 Maenza (LT)

\* Referente per la corrispondenza: james.tagliavini@unipr.it

## Riassunto

Vengono riportati dati preliminari sulla caratterizzazione di aplotipi mitocondriali di lamprede stanziali di due popolazioni dell'Italia centrale, desunti dall'analisi di sequenze parziali dei geni citocromo ossidasi I (COI) e citocromo B (Cyt b). I campioni provengono da due popolazioni dei versanti adriatico e tirrenico: fiume Aterno-Pescara in Abruzzo e fiume Fibreno in Lazio; quest'ultimo corso d'acqua ospita la specie *Lampetra planeri*. L'assenza di variabilità mitocondriale osservata suggerisce una molto probabile conspecificità tra gli individui delle due popolazioni ed un loro probabile recente isolamento riproduttivo.

PAROLE CHIAVE: *Lampetra planeri* / DNA mitocondriale / tassonomia molecolare / Fiumi Fibreno ed Aterno

## Mitochondrial DNA characterization of lampreys resident in Tirrenic and Adriatic basins of Central Italy

Preliminary results about characterization of mitochondrial haplotypes of non-parasitic lampreys resident in Central Italy, based on partial sequences of genes cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome B (Cyt b), are shown. Samples come from two populations of Adriatic and Tirrenic basins: Aterno-Pescara River (Abruzzi) and Fibreno River (Lazio), respectively. Sequences alignments and phylogenetic tree highlight identity between Aterno lampreys, Fibreno lampreys and the ones from Tirrenic basins (belonging to *Lampetra planeri*), and only one mitochondrial haplotype for all samples. Therefore, we can reasonably suppose that individuals of two population are conspecific, and that reproductive isolation among analyzed *L. planeri* individuals occurred recently.

KEY WORDS: *Lampetra planeri* / mitochondrial DNA / molecular taxonomy / Fibreno and Aterno Rivers

## INTRODUZIONE

Nelle acque interne italiane sono presenti due specie di lamprede stanziali, non parassite: *Lampetra planeri* (BLOCH, 1784) e *Lethenteron zanandreaei* (VLADYKOV, 1955). La loro prevalente distribuzione geografica attuale è identificabile in bacini a Sud della catena appenninica per *Lampetra planeri* ed a Nord del fiume Po per *Lethenteron zanandreaei*. L'isolamento riproduttivo fra le due specie è assicurato dallo spartiacque Appenninico, dall'assenza di forme "sorelle" migratrici parassite di *L. zanandreaei* e dall'assenza, in Adriatico, della specie sorella parassita, migratrice di *L. planeri*, *Lampetra fluviatilis*; l'isolamento ha fissato alcune

differenze genetiche che consentono di caratterizzare popolazioni di diversa origine, ma rimane discutibile l'assegnazione al genere *Lethenteron* della Lampreda padana. Tale assegnazione, che era basata principalmente su modeste differenze del pattern di dentizione e sul numero medio di miomeri (VLADYKOV e FOLLETT, 1967; VLADYKOV e KOTT, 1979; BIANCO, 1986 e, con riserve, HOLCIK, 1986), è stata messa in discussione da BAILEY (1980), POTTER (1980), NELSON (1994) e, recentemente, da ZERUNIAN (2002) sia sulla base di dati genetici (TAGLIAVINI *et al.*, 1994, 1996) che su considerazioni zoogeografiche.

Sono attualmente note due popolazioni del versante adriatico dell'Appennino, quella del Fiume Potenza nelle Marche e quella del Fiume Aterno-Pescara in Abruzzo (vedi ZERUNIAN, 2004).

Vista la sua collocazione geografica, la popolazione marchigiana potrebbe costituire un plausibile relitto post-glaciale di *L. zanandrei* (va ricordato che il fiume Potenza è stato affluente appenninico del Po anche durante l'ultima glaciazione pleistocenica). Meno immediata invece risulta essere un'assegnazione di specie su base paleogeografica per la popolazione abruzzese. Su base morfomeristica la specie rappresentata sarebbe *L. planeri* e, nel caso, la popolazione dell'Aterno-Pescara costituirebbe l'unica rappresentante nota di Lampreda di ruscello nel versante adriatico della penisola italiana (vedi ZERUNIAN, 2004).

In questa nota vengono riportati i primi risultati dell'analisi genetica mitocondriale di due popolazioni dell'Italia centrale (Fig. 1): quella del Fiume Fibreno (Lazio, versante tirrenico), già attribuita a *L. planeri* (ZERUNIAN, 1988), e quella del Fiume Aterno (Abruzzo, versante Adriatico), con lo scopo di contribuire alla soluzione dei seguenti problemi:

1. la popolazione del Fiume Aterno-Pescara è realmente classificabile come *L. planeri*, o si tratta della popolazione più meridionale di *L. zanandrei*?
2. se si tratta di *L. planeri*, qual è il grado di somiglianza genetica con la popolazione più prossima del versante tirrenico, cioè quella del Fiume Fibreno? Il risultato di questa comparazione potrebbe chiarire se la popolazione ha un'origine recente (naturale, da una popolazione del versante tirrenico, attraverso fenomeni di captazione di acque da un versante all'altro dell'Appennino in zone carsiche, o artificiale, per introduzioni antropiche databili a partire dall'Epoca Romana e legate all'interesse alimentare che la specie rivestiva in passato), oppure relativamente antica; in quest'ultimo caso potrebbe costituire anch'essa relitto di popolazioni residenti durante il periodo di crisi di salinità del Mediterraneo, per esempio.

## MATERIALI E METODI

### Campioni ed estrazione del DNA totale

I campioni erano costituiti da frammenti di tessuto (pinna caudale o frammenti di pelle e muscolo dorsale conservati in etanolo >70%) di soggetti catturati in tempi diversi, provenienti dal Fiume Fibreno (4 individui) e Fiume Aterno (4 individui). Questi sono stati confrontati con alcuni esemplari già classificati con certezza, provenienti: dall'alto corso del Fiume Tevere, loc. Sigillo - Umbria (2 individui, *L. planeri*); dalla Roggia Lama, loc. Carmignano - Padova (1 individuo, *L. zanandrei*).

Il DNA totale è stato estratto da ciascun campione attraverso solubilizzazione dei tessuti con SDS-ProteinasiK ed estrazione con fenolo-cloroformio, secondo protocolli convenzionali (MANIATIS *et al.*, 1982).

### Amplificazione con PCR e sequenziamento di sequenze mitocondriali

I DNA totali sono stati impiegati come templati per reazioni di amplificazione con PCR di due regioni mitocondriali: la prima, compresa fra il gene tRNA<sup>THR</sup> e parte del gene citocromo b (Cytb) (vedi Fig. 2), la seconda, interna al gene citocromo ossidasi I (COI). Le reazioni, condotte in un volume di 15 µL ciascuna, impiegavano rispettivamente i primers 15926(*forward*)/15149(*reverse*), disegnati da KOCHER *et al.* (1989) ed L6860 (5'-ggc tt(ct) gg(gc) aac tga ctt gta cc 3') e H7993 (5'-cat gta gtg ta(ag) gca tct ggg tag tc-3'), primers degenerati, disegnati da allineamenti di COI di pesci disponibili in banche dati di DNA (YAMAZAKI *et al.*, 2003). I sequenziamenti sono stati realizzati impiegando il primer 15149 per la regione Cyt b e H7993 per quanto riguarda la regione COI ed utilizzando il servizio di sequenziamento della ditta MWG Biotech (Germania).



**Fig. 1.** Stazioni di campionamento (freccie) nel Fiume Fibreno (Lazio, versante tirrenico) e nel Fiume Aterno (Abruzzo, versante adriatico).

### Allineamenti delle sequenze ed analisi fenetiche

Gli allineamenti sono stati condotti con CLUSTALW (THOMPSON *et al.*, 1994), verificando manualmente eventuali incertezze, mentre le analisi fenetiche sono state condotte impiegando programmi contenuti in MEGA 3.0 (KUMAR *et al.*, 2004). In particolare, sono state calcolate le distanze genetiche impiegando l'algoritmo di Kimura 2D, mentre gli alberi filogenetici sono stati realizzati impiegando l'opzione Neighbor-Joining. Nelle analisi sono state utilizzate sequenze di altri petromizontiformi disponibili in banche dati di DNA, i riferimenti dei quali sono riportati nella didascalia della figura 3.

### RISULTATI E DISCUSSIONE

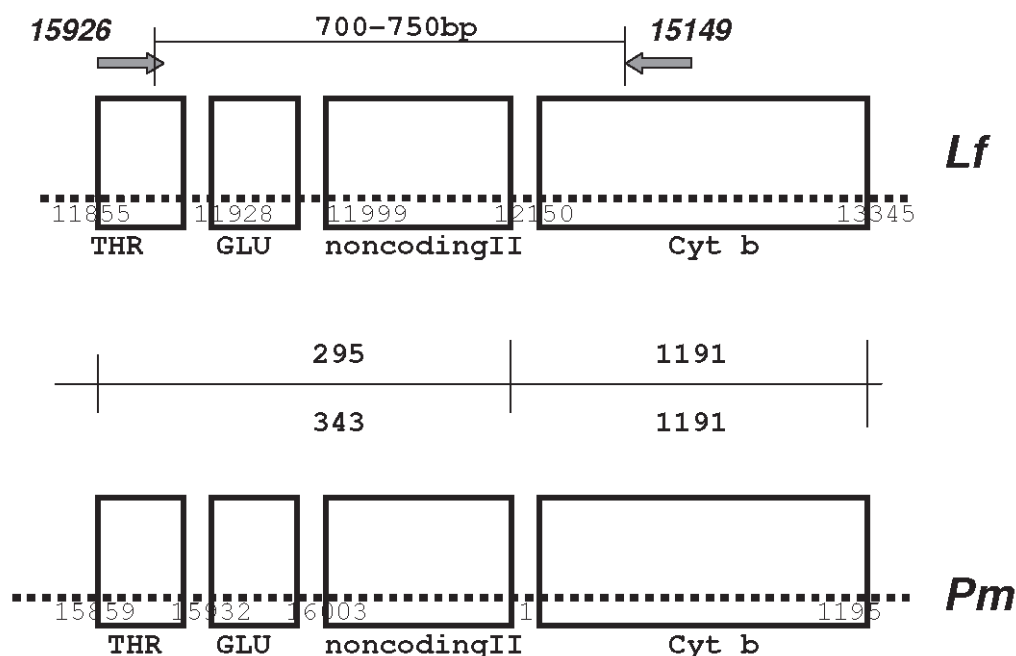
Tutti i campioni analizzati hanno prodotto frammenti PCR di dimensioni corrispondenti alle attese: circa 700 paia basi (bp) per gli amplificati contenenti parte del gene Cyt b e circa 1100 bp per quelli relativi al gene COI; stime dell'efficienza di amplificazione e delle dimensioni degli amplificati sono state condotte con elettroforesi su gel di agarosio prima di procedere con il sequenziamento.

Gli allineamenti delle sequenze hanno evidenziato i seguenti risultati.

1) **Cyt b**. Sono state considerate 384 bp del gene, sia delle 11 sequenze originali prodotte con campioni italiani, sia con sequenze di *Petromyzon marinus*, *L.*

*fluviatilis*, *Lethenteron japonicum*, *Lethenteron kessleri* recuperate in banche dati di DNA. Non sono state impiegate sequenze relative alla regione non codificante II ed a tRNA poiché gli allineamenti mostrano alcune ambiguità in corrispondenza di sequenze molto ripetute. Il confronto a coppie delle sequenze prodotte da campioni di *L. fluviatilis*, lamprede dei fiumi Aterno, Fibreno, Tevere, ha mostrato il 100% di identità. La regione considerata evidenzia il solo aplotipo mitocondriale e non esclude una molto probabile cospecificità fra i soggetti dell'Aterno e quelli del Fibreno. Confronti a coppie con soggetti di specie diversa hanno evidenziato il 97,7% di identità (9 sostituzioni di base su 384 bp) con *L. zanandreae* di Roggia Lama (PD), 93,7% di identità con *L. japonicum* e *L. kessleri* (stessa identità, ma diversi aplotipi) e 86,5% di identità con *P. marinus*.

2) **COI**. Sono state considerate 740 bp del gene, sia di 10 sequenze originali prodotte con campioni italiani, sia con sequenze di *P. marinus*, *L. fluviatilis*, *L. japonicum*, *L. kessleri*, recuperate in banche dati di DNA. Il confronto a coppie delle sequenze prodotte da campioni di lamprede dei fiumi Aterno, Fibreno, Tevere, ha mostrato il 100% di identità. Anche in questo caso si ha il solo aplotipo mitocondriale e ciò rafforza l'ipotesi di cospecificità fra i soggetti dell'Aterno e quelli del Fibreno. Confronti a coppie con soggetti di specie diversa hanno evidenziato il 99,6%

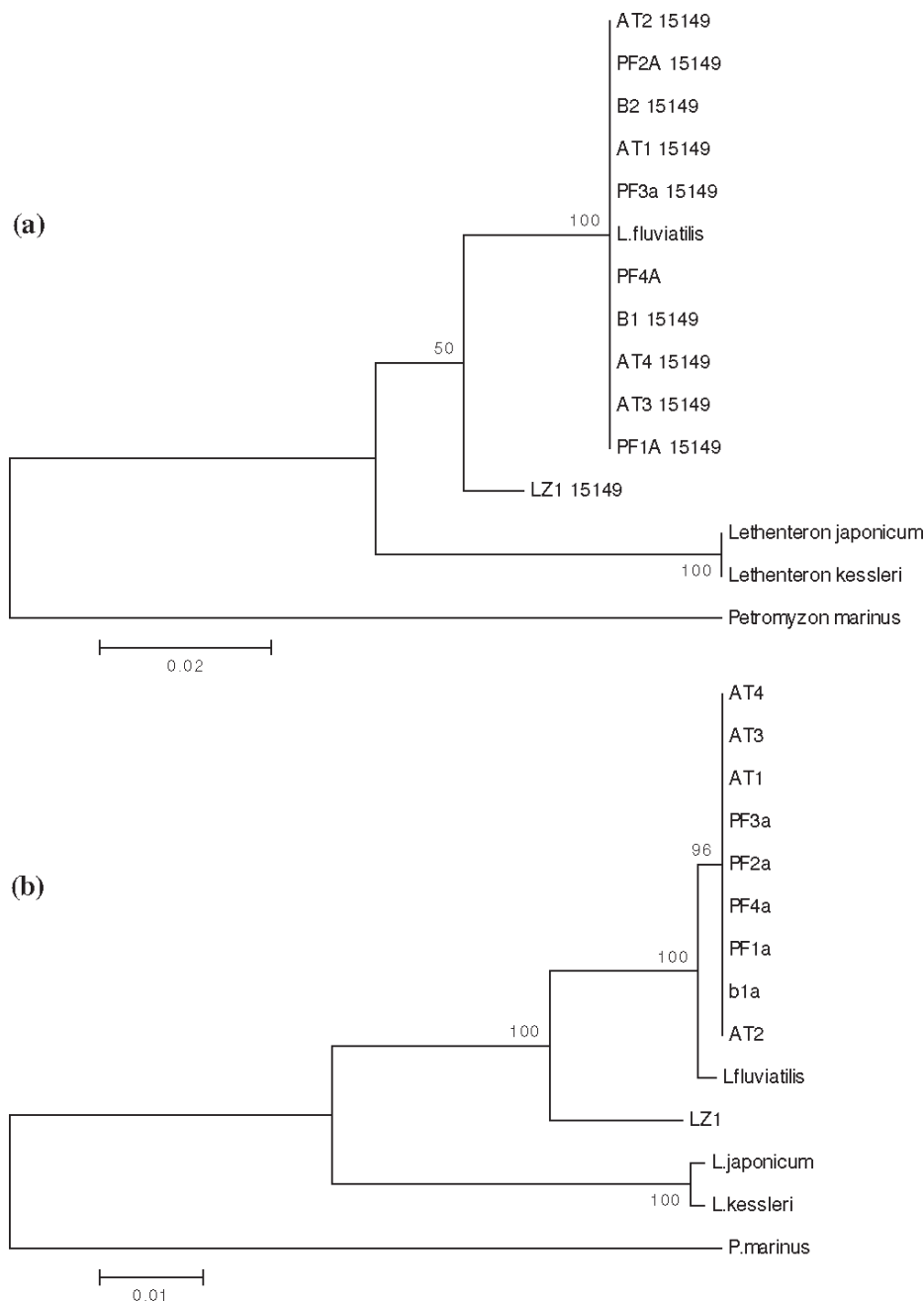


**Fig. 2.** Regione mitocondriale amplificata con la coppia di primer 15926-15149 in *L. fluviatilis* (*Lf*) (accession number Y18683) ed in *Petromyzon marinus* (*Pm*) (accession number NC 001626). La lunghezza variabile del frammento amplificato è dovuta alla presenza di sequenze ripetute presenti nella regione non codificante II. THR e GLU sono geni codificanti tRNA, mentre i numeri evidenziati sotto le strutture geniche corrispondono alla numerazione delle basi riportate in banca dati di DNA.

di identità (3 sostituzioni su 740 bp) con *L. fluviatilis*, 97,2% di identità (21 sostituzioni di base su 740 bp) con *L. zanandreaei* di Roggia Lama (PD), 93,1% di identità (51 sostituzioni su 740 bp) con *L. japoni-*

*cum*, 93,1% di identità con *L. kessleri* (51 sostituzioni su 740 bp) e 87,7% di identità con *P. marinus* (91 sostituzioni su 740 bp).

Le distanze genetiche secondo Kimura 2 D, desunte



**Fig. 3.** Alberi di consenso costruiti con *Neighbor-Joining* da matrici di distanza genetica ottenute con Kimura 2D da dati relativi a 15 sequenze parziali dei geni Citocromo b (a), e 14 sequenze parziali di Citocromo ossidasi I (b). I numeri ai nodi sono valori di *bootstrap* per 100 replicazioni.

AT—campioni del fiume Aterno, B—campioni dell'alto Tevere, PF—campioni del fiume Fibreno, LZ1 è un campione di lampreda padana (*L. zanandreaei*). *P. marinus* (NC 001626), *L. fluviatilis* (Y18683), *L. japonicum* (*Cyt b* AB220174, *COI* AB198747), *L. kessleri* (*Cyt b* AB220175, *COI* AB198752) sono acquisite da banche dati di DNA; le sigle a lato della denominazione della specie costituiscono i numeri d'accesso alle banche dati.

sia dai confronti fra sequenze di Cyt b che da confronti di sequenze COI, sono state impiegate per la costruzione di alberi filogenetici. La figura 3 riporta gli alberi di consenso generati con MEGA 3 impiegando l'opzione Neighbor-Joining. Le tipologie d'albero sono concordanti e confermano quanto intuibile attraverso la valutazione di identità di sequenze con i confronti a coppie.

## CONCLUSIONI

Rispetto alle ipotesi formulate nell'introduzione di tale lavoro, nonostante il limitato numero di soggetti analizzati, in via preliminare possiamo concludere che: 1. i soggetti analizzati del Fiume Aterno presentano

sequenze mitocondriali identiche a quelle di altre *L. planeri* di bacini tirrenici;

2. la presenza di un unico aplotipo mitocondriale caratteristico di tutti i soggetti di *L. planeri* analizzati depone a favore di un recente isolamento riproduttivo non sostenuto da specie sorelle migratrici.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano le Direzioni delle Riserve Naturali Regionali Lago di Posta Fibreno (Regione Lazio) e Gole di San Venanzio (Regione Abruzzo) per aver autorizzato i campionamenti, il Dr. Lino Ruggieri e il Sig. Antonio Lecce per aver collaborato nel lavoro sul campo; la sig.ra Francesca Davoli (Università di Parma) per aver collaborato nelle attività di laboratorio.

## BIBLIOGRAFIA

- BAILEY R.M., 1980. Comments on the classification and nomenclature of lampreys- an alternative view. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**:1626-1629.
- BIANCO P.G., 1986. *Lethenteron zanandreaei* (Vladikov, 1955). In: Holcik J. (ed.). *The freshwater fishes of Europe*, vol. 1, pt. 1. AULA-Verlag, Wiesbaden: 237-246.
- BLOCH M.E., 1784. *Oeconomische Naturgeschichte der Fische Deutschlands*. Dritter Theil, Berlin, pp 73-108.
- HOLCIK J., 1986. *Petromyzontiformes. The freshwater fishes of Europe*. AULA-Verlag, Wiesbaden. Vol.1, Part I.
- KOCHER T.D., THOMAS W.K., MEYER A., EDWARDS S.V., PAABO V., VILLABLANCA, F. X., WILSON A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6196-6200.
- KUMAR S., TAMURA K., NEI M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**: 150-163.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J., 1982. *Molecular cloning- a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- NELSON J.S., 1984. *Fishes of the world*. Wiley, New York, XV + 523pp.
- POTTER I.C., 1980. The Petromyzontiformes with particular reference to paired species. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**: 1595-1615.
- TAGLIAVINI J., TIZZI R., CONTERIO F., MARIOTTINI P., GANDOLFI G., 1994. Mitochondrial DNA sequences in three genera of Italian lampreys. *Boll. Zool.*, **61**: 331-333.
- TAGLIAVINI J., CONTERIO F., MARIOTTINI P., GANDOLFI G., 1996. Variabilità mitocondriale di lamprede non parassite italiane. *Ateneo Parmense, Acta Nat.*, **29**: 47-55.
- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673-4680.
- VLADYKOV V., 1955. *Lampetra zanandreaei*, a new specie of lamprey from Northern Italy. *Copeia*, **3**: 215-223.
- VLADYKOV V.D., FOLLETT W.I., 1967. The teeth of lampreys (Petromyzontidae) their terminology and use in a key to the Holarctic genera. *J. Fish. Res. Board Can.*, **24**: 1067-1075.
- VLADYKOV V.D., KOTT E., 1979. Satellite species among the Holarctic lampreys. *Can. J. Zool.*, **57**: 860-870.
- YAMAZAKI Y., GOTO A., NISHIDA M., 2003. Mitochondrial DNA sequence divergence between two cryptic species of *Lethenteron*, with reference to an improved identification technique. *J. Fish Biol.*, **62**: 591-609.
- ZERUNIAN S., 1988. *I Pesci del Lago di Posta Fibreno: ecologia, faunistica, biologia e pesca*. Comune di Posta Fibreno (Lazio), 93 + IX pp. + 3 tavv.
- 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.
- ZERUNIAN S., 2004. *Pesci delle acque interne d'Italia*. Ministero dell'Ambiente e Istituto Nazionale Fauna Selvatica, Quaderni Conservazione Natura, 20, 257 pp. + CD.