

# Le rane verdi del complesso *Rana esculenta* come bioindicatori della qualità degli ambienti fluviali italiani

Paolo Andreani<sup>1\*</sup>, Fiammetta Santucci<sup>2</sup>, Giuseppe Nascetti<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi della Tuscia, Via S.C. de Lellis - 01100 Viterbo

<sup>2</sup> Smithsonian Tropical Research Institute. APO 2072 Aucon, Balboa, Panama, Republic of Panama

\* Autore referente per la corrispondenza: fax 0761 357123; e-mail andreani@unitus.it

Pervenuto il 15.4.2002; accettato l'8.9.2002

## Riassunto

Lo studio si propone di verificare le capacità bioindicatrici delle due specie di rane verdi (*Rana lessonae* e *Rana esculenta*) appartenenti al complesso *Rana esculenta* negli ambienti fluviali italiani. Tali capacità, avvalorate da varie evidenze sperimentali, trovano riscontro nella risposta fornita da popolazioni di anfibi alle variazioni della qualità degli ambienti colonizzati. In particolare, per le due specie di rane verdi, si evidenzia come in habitat integri prevalga *R. lessonae*, in quelli disturbati compete meglio *R. esculenta* grazie al vantaggio eterotico derivante dalla sua origine ibrida. L'elevato grado di eterozigosi fornisce a *R. esculenta* una più ampia capacità di risposta alle variazioni dei parametri ecologici.

Le frequenze relative delle due specie sono state messe a confronto con le risposte di indici biotici e di naturalità ambientale (I.B.E., BMWP' e I.F.F.) in quattro transetti: Oasi di Punte Alberete (RA), Riserva Naturale del Lago di Penne (PE), Tenuta Presidenziale di Castelporziano (RM), Riserva Naturale Orientata Bosco Pantano di Policoro (MT).

I risultati mostrano come ad una buona qualità delle acque e ad una elevata funzionalità fluviale corrispondano una dominanza di *R. lessonae* e viceversa.

Le capacità bioindicatrici delle rane verdi del complesso *Rana esculenta* sembrano confermate e, grazie alle loro caratteristiche complementari alla comunità dei macroinvertebrati, dovrebbero permettere di valutare il disturbo antropico anche in habitat ove non sono applicabili gli indici biotici maggiormente usati: i tratti potamali dei fiumi, i laghi, gli stagni e gli ambienti di transizione.

PAROLE CHIAVE: complesso *Rana esculenta* / bioindicatori / specie ibride / eterozigosi / competizione.

## Abstract

### Frogs of *Rana esculenta* complex as Italian river quality bioindicators

In this paper we tested as bioindicators two species of pond frogs belonging to the *Rana esculenta* complex. Their value as bioindicators, confirmed by several studies, is based on the particular physiological and ecological adaptations of amphibians, which are generally highly sensitive to the presence of pollutants. In particular the two species of pond frogs considered here respond differently to variations of environmental parameters: *Rana lessonae* prevails in natural habitats, while the hybrid species *Rana esculenta* competes better in polluted habitats. The latter prevails in polluted habitats thanks to the heterotic advantage deriving by its hybrid origin: the high level of heterozygosity seems to confer to this species the ability to respond to a wider spectrum of environmental parameters.

The relative frequencies of these two species were compared with biotic indexes and indexes of environmental integrity in four areas: Oasi di Punte Alberete (RA), Riserva Naturale del Lago di Penne (PE); Tenuta Presidenziale di Castelporziano (RM), Riserva Naturale Orientata Bosco Pantano di Policoro (MT).

Our results show a prevalence of *R. lessonae* in natural habitats and viceversa.

The importance as bioindicators of the pond frogs belonging to the *Rana esculenta* complex appears to be confirmed, and thanks to their characteristics complementary to the macrobenthos community, their relative frequencies should prove useful in evaluating the anthropic pollution in habitats where it is not possible to use the biotic indexes most widely used: river ponds, lakes, marshes, and transitional habitats.

KEY WORDS: *Rana esculenta* complex / bioindicators / hybrid species / heterozygosity / competition

## INTRODUZIONE

L'uso dei bioindicatori, oramai sancito anche nella normativa nazionale ed internazionale, si basa sulle caratteristiche intrinseche delle specie indicatrici. Tra gli organismi scelti come indicatori gli anfibi rivestono un ruolo di rilievo, rafforzato dall'ampio utilizzo che essi hanno anche in ambiti di analisi diversi: ecotossicologico, biomolecolare, istologico, fisiologico, ecc.

Le caratteristiche che esaltano la capacità bioindicatrice degli anfibi sono diverse: citiamo ad esempio la sensibilità nei confronti di fenomeni di bioaccumulo (BURY, 1988; VITT *et al.*, 1990; DUNSON *et al.*, 1992; WALLAS *et al.*, 1992; COHN, 1994; NCER, 1998) o in risposta agli impatti antropici responsabili del declino generalizzato delle popolazioni (BARINAGA, 1990; WAKE, 1991; HALL e HENRY, 1992).

Tra le diverse linee di ricerca numerose sono quelle che hanno considerato specificatamente gli anuri, per evidenziare la sensibilità all'inquinamento da metalli pesanti (LEFCORT *et al.*, 1998; LEONTYEVA *et al.*, 1997), da sostanze azotate (OLDHAM *et al.*, 1997) e da pesticidi (SCHUYTEMA *et al.*, 1991, 1993).

In modo particolare, le rane del complesso *Rana esculenta* sono state utilizzate come biosensori (KISELEVA, 1997) o come indicatori, correlando i cambiamenti nella loro distribuzione geografica con la presenza di stress antropici (CHUBINISHVILI, 1998a), di specifiche sostanze chimiche (MISYURA *et al.*, 1996; TOKTAMYSOVA e KAIDAULOVA, 1996; CHUBINISHVILI, 1998b) o di isotopi radioattivi (CHERNYSHOVA e STAROSTIN, 1994).

Nel campo della bioindicazione un ruolo di un certo interesse lo rivestono quindi le specie appartenenti al complesso *Rana esculenta*, geneticamente affini tra loro ma con evidenti elementi discriminanti (il genotipo eterozigote di *R. esculenta* ai loci differenziati tra *R. lessonae* e *Rana ridibunda*). La specie ibrida *R. esculenta* si origina dall'incrocio tra i due parentali *R. ridibunda* e *R. lessonae* ed, essendo autosterile, riesce a riprodursi solo sfruttando dal punto di vista sessuale la specie parentale con la quale convive. Il particolare meccanismo che permette la formazione di *R. esculenta* viene definito ibridogenesi (HOTZ *et al.*, 1992.)

Questa caratteristica ha fatto sì che tali specie siano state oggetto di numerosi studi scientifici di natura molto diversa, come l'analisi del meccanismo di esclusione del genoma parentale sintopico da parte di *R. esculenta* (GUERRINI *et al.*, 1997), la riduzione della diversità genomica in aree contaminate da radiazioni (VINOGRADOV e CHUBINISHVILI, 1999) o l'influenza del maggiore grado di eterosi del genoma ibrido sulla capacità di adattamento (TUNNER e NOPP, 1979).

In particolare, diversi sono i lavori che prendono in considerazione la capacità di adattamento delle larve

delle specie parentali *R. lessonae* e *R. ridibunda*, e dell'ibrido *R. esculenta*. In questi studi si evidenzia il fenomeno della competizione asimmetrica che permette a *R. esculenta* di prevalere in presenza di parametri ambientali mutevoli, in contrasto con la migliore capacità adattativa delle specie parentali in condizioni di sviluppo stabili (SEMLITSCH e REYER, 1992; HOTZ *et al.*, 1993; SEMLITSCH, 1993a, 1993b; SEMLITSCH *et al.*, 1993; FIORAMONTI *et al.*, 1997; RIST *et al.*, 1997; SEMLITSCH *et al.*, 1997; HOTZ *et al.*, 1999; PLENET *et al.*, 2000).

La maggiore capacità competitiva mostrata dalle specie ibride in determinate condizioni ambientali, rispetto alle specie parentali, è stata ampiamente studiata e viene riassunta dalla teoria del vantaggio eterotico. Questa ipotizza l'esistenza di una stretta correlazione tra tale capacità e l'elevato grado di eterozigosi presente nelle specie ibride (BULLINI, 1985). Tale caratteristica genetica fornirebbe un più ampio spettro di adattamenti fisiologici ad ambienti con parametri ecologici mutevoli. Vari autori, confrontando coppie di specie affini ma con valori di variabilità genetica differenti, osservano come la maggiore capacità competitiva in ambienti con un'ampia oscillazione dei fattori di disturbo venga proprio influenzata da un alto valore di eterozigosi (UZZEL e DAREWSKY, 1973, 1975; NEVO, 1976; NASCETTI e BULLINI, 1980; LAVIE e NEVO, 1986; NEWMAN, 1988; BULLINI e NASCETTI, 1990; MCALPINE, 1993).

Sulla base di questa teoria e per identificare i fattori ambientali che influenzano la distribuzione delle specie del complesso *Rana esculenta*, nel presente lavoro la percentuale delle due specie *R. lessonae* e *R. esculenta* è stata comparata con le risultanze di indici biotici e di naturalità ambientale.

La necessità di avere questi parametri di riscontro, pur costruiti su dati di origine differenti, nasce dall'evidenza che le rane sono selezionate sia dalla qualità delle acque, poiché la mortalità differenziale dovrebbe avvenire soprattutto nella fase larvale trascorsa interamente in acqua, sia dall'integrità dell'ambiente terrestre, poiché gli adulti trascorrono parte della loro vita fuori dall'acqua.

## MATERIALI E METODI

### Le stazioni di campionamento

Le rilevazioni effettuate nell'ambito di questo lavoro riguardano alcune località dell'Italia peninsulare (Fig. 1) caratterizzate dall'essere diverse dal punto di vista geografico ed ecologico, al fine di saggiare le risposte delle due specie di rane in condizioni il più possibile differenziate.

Sono stati analizzati transetti nelle seguenti aree:



**Fig. 1.** Distribuzione geografica delle aree investigate (1 = Oasi di Punte Alberete; 2 = Bacino idrografico del Lago di Penne; 3 = Tenuta Presidenziale di Castelporziano; 4 = Oasi del Bosco Pantano di Policoro).

l'Oasi di Punte Alberete (RA) e le aree circostanti; il territorio del bacino idrografico del Fiume Tavo e del Torrente Gallero e la Riserva Naturale del Lago di Penne (PE); la Tenuta Presidenziale di Castelporziano (RM) e la Riserva Naturale Orientata Bosco Pantano di Policoro con gli immediati dintorni (MT).

La distribuzione delle stazioni è stata effettuata in modo da ottenere dei transetti ecologicamente differenziati all'interno delle singole aree considerate.

I vari siti di indagine differiscono anche per l'estensione dell'area investigata: dalle varie decine di chilometri per quello in Abruzzo, alle poche centinaia di metri per quello in provincia di Ravenna.

### Distribuzione delle stazioni

L'Oasi di Punte Alberete, sita sulla costa adriatica in provincia di Ravenna, è costituita da una foresta planiziale percorsa da un fitto reticolo di canali oramai naturalizzati ricchi di vegetazione che permette un sensibile abbattimento della sostanza organica. L'area protetta è circondata da una zona dove si svolge attività agricola intensiva; l'oasi e i suoi dintorni sono stati studiati con cinque siti di monitoraggio.

Nei bacini idrografici del Fiume Tavo e del Torrente Gallero e all'interno dell'Oasi del Lago di Penne (pro-

vincia di Pescara) sono state considerate dieci stazioni di campionamento. L'intero bacino idrografico è caratterizzato dalla presenza di uno stress antropico crescente da monte a valle. L'inquinamento presente nell'area è prevalentemente di tipo agricolo-zootecnico, anche se non mancano insediamenti urbani. In otto stazioni di rilevamento è stato possibile utilizzare tutti gli indici; altre due sono state considerate con gli indicatori non riferiti alle rane verdi.

All'interno della Tenuta Presidenziale di Castelporziano (RM), dichiarata riserva naturale fin dal secondo dopoguerra, sono stati scelti quattro siti di studio: due delle stazioni di campionamento sono poste in pozze perenni situate nella zona di riserva integrale e in un'area a stress antropico medio (taglio boschi, pascolo brado, viabilità interna). Gli altri due siti di studio sono stati individuati in altrettanti corsi d'acqua che attraversano coltivazioni semi intensive di cereali.

L'area della Riserva Naturale Orientata Bosco Pantano di Policoro (MT) è stata studiata attraverso cinque stazioni di rilevamento. Anche in questo caso la zona a più alta naturalità è caratterizzata da un bosco planiziale litoraneo percorso da canali artificiali in parte rinaturalizzati. L'acqua defluisce all'interno della riserva entrando da una zona utilizzata per l'agricoltura intensiva dove sono state poste tre stazioni, e ne fuoriesce dopo aver attraversato la parte più interna dell'area protetta, studiata con due siti di rilevamento.

### Il complesso *Rana esculenta*

Le rane verdi presenti in Italia sono rappresentate da due delle specie che compongono il complesso *Rana esculenta*: *R. lessonae* e *R. esculenta*, (SANTUCCI *et al.*, 1996; SANTUCCI *et al.*, 2000).

Il metodo analitico che ha permesso il riconoscimento tra le due specie è stato l'analisi elettroforetica dei sistemi gene-enzima. Tale strumento di indagine, come confermato da PAGANO e JOLY (1998), è l'unico che consenta un'attribuzione certa degli individui all'una o all'altra specie.

Nel complesso sono stati analizzati circa 1100 individui, la cattura è stata effettuata a mano o con l'ausilio di un retino principalmente nelle ore notturne; gli individui catturati sono stati rilasciati dopo avere prelevato da ognuno di essi, previa anestesia, porzioni di falange del secondo dito dell'arto posteriore. I campioni sono stati conservati a - 80 °C sino al momento delle analisi elettroforetiche.

Il riconoscimento degli individui di rana verde è stato condotto attraverso lo studio dei loci genici diagnostici, mediante elettroforesi dei sistemi gene-enzima su gel d'amido.

Per la nomenclatura dei loci e degli alleli sono stati adottati i seguenti criteri:

- gli isozimi (enzimi codificati da loci diversi, ma che presentano stessa funzione enzimatica) sono stati numerati in ordine di mobilità decrescente a partire da quello più anodico (per esempio *Ldh-1*, *Ldh-2*, ecc.);
- gli allozimi (forme enzimatiche prodotte dagli alleli di ciascun locus) sono stati invece indicati con un numero che esprime la loro mobilità in mm (per esempio *Ldh-1*<sup>100</sup>, *Ldh-1*<sup>106</sup>, ecc.). Il valore 100 è stato attribuito all'allele più frequente nella popolazione di *R. lessonae* di Morozzo, Piemonte (regione tipica di *R. lessonae*), presa come riferimento (alleli > 100 = mobilità maggiore, alleli < 100 = mobilità minore) (SANTUCCI, 1993).

I loci analizzati geneticamente sono i seguenti: *G3pdh*, *Ldh-1*, *6Pgdh*, *Pep-2*, *Pgi-2*. Tali loci (UZZELL e BERGER 1975) sono differenziati nelle specie parentali di *R. esculenta*, *R. lessonae* e *R. ridibunda* e sono stati usati su vasta scala per il riconoscimento di queste tre specie (BERGER, 1983; SEMLITSCH *et al.*, 1996, SEMLITSCH *et al.*, 1997, PAGANO *et al.*, 1997).

Sulla base del genotipo ai loci diagnostici tutti gli individui saggiati sono stati attribuiti a *R. lessonae* o a *R. esculenta*.

La qualità delle acque è stata definita attraverso lo studio dei macroinvertebrati delle acque dolci, analizzati secondo le disposizioni date dalle metodiche di applicazione dell'I.B.E. (GHETTI, 1997) e del BMWP' (ALBA TERCEDOR e SANCHEZ-ORTEGA, 1988).

Inoltre è stato utilizzato l'Indice di Funzionalità Fluviale (I.F.F.) (SILIGARDI *et al.*, 2000) per verificare se un disturbo ambientale generalizzato possa essere responsabile della variazione della frequenza relativa delle rane verdi. L'indice I.F.F. è stato applicato e calcolato attraverso l'apposita scheda di rilevamento (SILIGARDI *et al.*, 2000).

## RISULTATI

I risultati che illustrano le frequenze relative delle due specie di rane verdi, e i valori dei diversi indici sono riassunti nella tabella I. Le stazioni di monitoraggio sono ordinate come di seguito descritto: nei transesti dell'Oasi di Punta Alberete, della Tenuta Presidenziale di Castel Porziano e dell'Oasi del Bosco Pantano di Policoro, da quelle caratterizzate da un sensibile stress antropico a quelle poste nelle zone più interne delle diverse aree protette; per quanto riguarda il transetto del bacino idrografico del Lago di Penne, queste sono ordinate da monte a valle. Il valore dell'I.F.F. è stato mediato tra le due sponde.

Tutti i dati ottenuti riguardanti la frequenza delle due specie nei popolamenti di rana verde sono stati sottoposti al test del  $\chi^2$  che ne ha confermato la significatività statistica ( $p < 0,005$ ).

Il livello di eterozigosi media osservata in *R. escu-*

*lenta* è notevolmente superiore ai valori misurati in *R. lessonae* ( $H_0$  rispettivamente 0,45 e 0,09).

### L'oasi di Punta Alberete

La frequenza relativa delle specie appartenenti al complesso *Rana esculenta* si differenzia sensibilmente nelle tre stazioni all'esterno dell'oasi, rispetto a quelle poste all'interno. Nella zona agricola la specie ibrida infatti è sempre preponderante con una presenza media del 70%; la comunità macrobentonica (IV CQ) e l'analisi dei parametri che influenzano la funzionalità dei corsi d'acqua, presentano valori relativamente bassi (IV/V LF).

All'interno dell'oasi dal lato Sud (PFA-2), la percentuale della specie sensibile *R. lessonae* è del 90%, la comunità macrobentonica mostra una lieve alterazione (II CQ) con l'I.F.F. tra il I ed il II LF. Nella zona più interna (PFA-1) della riserva la comunità macrobentonica presenta una struttura relativamente integra (I/II CQ) mentre l'I.F.F. e la percentuale di *R. lessonae* (86%) non mostrano significative variazioni.

### Il bacino idrografico del Lago di Penne (fiume Tavo e torrente Gallero)

L'analisi del bacino idrografico del Fiume Tavo è stata effettuata con quattro stazioni di campionamento, determinando sia i valori degli indici biotici che le frequenze relative di *R. lessonae* e *R. esculenta*; inoltre sono state aggiunte altre due stazioni monitorate esclusivamente attraverso la comunità del macrobenthos e l'I.F.F.

Nella prima stazione del Fiume Tavo *R. esculenta* è completamente assente, mentre I.B.E. e BMWP' mostrano una I CQ; l'I.F.F. presenta un II LF e valore pari a 212.

Nella stazione TVA l'I.B.E. ed il BMWP' sono ad una II CQ, anche l'I.F.F. presenta un II LF. Nel successivo sito, dove sono presenti le rane verdi (TVO), la specie ibrida più resistente è al 57%. Gli altri indici mostrano valori che vanno da una III CQ dell'I.B.E. (valore 6), ad una II CQ per il BMWP' ad un II LF per l'I.F.F.

Scendendo l'ungo l'asta fluviale, in prossimità di un centro abitato (TFA), gli indicatori mostrano l'I.B.E. in III CQ, il BMWP' in II CQ, e l'I.F.F. in II/III LF, la frequenza relativa di *R. esculenta* arriva all'84%.

Nella stazione successiva, dove il corso d'acqua riemerge dopo aver percorso diversi chilometri in subalveo (TMA), la percentuale di *R. lessonae* sale al 31%, le CQ e il LF sono rispettivamente II, I e II/III.

Nella stazione a chiusura di bacino (TCA) investigata con gli indici di riferimento, l'I.B.E. presenta una IV CQ, il BMWP' una II CQ e l'I.F.F. un III Livello di Funzionalità.

Per effettuare l'analisi dell'asta fluviale del Torrente Gallero sono state utilizzate tre stazioni. La prima (GMF), situata nella parte sommitale del bacino idrografico, presenta un uso del suolo caratterizzato da attività di coltivazione e di allevamento, *R. lessonae* è al 61%, con l'I.B.E. in III CQ, il BMWP' in II CQ e

l'I.F.F. al II LF.

La stazione intermedia (GOP), presenta un'inversione delle frequenze delle rane verdi, con la specie ibrida che arriva al 58%. L'I.B.E. presenta una III CQ, il BMWP' una I CQ e l'I.F.F. un II LF. La stazione che chiude il corso del Torrente Gallero (GLP) mostra una

**Tab. I.** Frequenza relativa di *R. lessonae* e *R. esculenta* nelle località studiate e valore, Classe di Qualità (CQ) e Livello di Funzionalità (LF) degli indici applicati. N. indica il numero di individui saggiati.

ZCE= zona coltiva est; COV= confine ovest; CSU= confine sud; PFA-2= fossa aldeidi staz. 2; PFA-1= fossa aldeidi staz. 1; TLS= Fiume Tavo lago sfondo; TVA= Fiume Tavo valle d'Angri; TVO= Fiume Tavo sorgente Vitello d'oro; TFA= Fiume Tavo abitato di Farindola; TMA= Fiume Tavo loc. Mulino Aliprandi; TCA= Fiume Tavo loc. cascatelle; GMF= Torrente Gallero loc. Madonna di Fatima; GOP= Torrente Gallero confine Oasi di Penne; GLP= Torrente Gallero confluenza nel Lago di Penne; FVO= Fosso Vitello d'oro; FGT= Fosso Grotte trafusa; PPO= Piscina Pontoni; PPI= Piscina Pignocco; ZOO= zona orticola ovest; ZOE= zona orticola est; COE= confine est; CES= canale esterno; CIN= canale interno.

Numero stazione	Sigla stazione	N.	% <i>R. esculenta</i>	% <i>R. lessonae</i>	Valore I.B.E.	CQ I.B.E.	Valore BMWP'	CQ BMWP'	Valore I.F.F.	LF I.F.F.
<b>OASI DI PUNTE ALBERETE</b>										
1	ZCE	86	86	14	2	V	9	V	57	IV/V
2	COV	69	69	31	5	IV	35	IV	99	IV
3	CSU	67	51	49	6	III	52	III	112	III/IV
4	PFA-2	68	10	90	8/9	II	88,5	II	260	I/II
5	PFA-1	35	14	86	10/9	I/II	112	I	255	I/II
<b>BACINO IDROGRAFICO DEL LAGO DI PENNE</b>										
Fiume Tavo										
6	TLS	62	0	100	10	I	112	I	212	II
7	TVA				9	II	94	II	240	II
8	TVO	28	57	43	6	III	61	II	220	II
9	TFA	32	84	16	6/7	III	86	II	185	II/III
10	TMA	26	69	31	9	II	116	I	145	II/III
11	TCA				5	IV	69	II	150	III
Torrente Gallero										
12	GMF	77	39	61	7	III	68	II	223	II
13	GOP	37	58	42	7	III	102	I	220	II
14	GLP	10	70	30	5	IV	61	II	210	II
Lago di Penne										
15	LPE	39	97	3	2	V	45	III	69	IV
<b>TENUTA PRESIDENZIALE DI CASTEL PORZIANO</b>										
16	FVO	29	93	7	4/5	IV	38	III	166	III
17	FGT	102	80	20	6/5	III/IV	65	II	161	III
18	PPO	12	67	33						
19	PPI	60	34	66						
<b>RISERVA NATURALE ORIENTATA BOSCO PANTANO DI POLICORO</b>										
20	ZOO	66	97	3	6/5	III/IV	46	III	61	IV
21	ZOE	71	54	46	6	III	46	III	61	IV
22	COE	15	67	33	5	IV	34	IV	61	IV
23	CES	67	36	64	7	III	47	III	196	II/III
24	CIN	41	26	74	8/7	II/III	52	III	186	II/III



frequenza di *R. esculenta* pari al 70%. Tra gli altri indicatori l'I.B.E. arriva ad una IV CQ, mentre il BMWP' ed l'I.F.F. presentano una II CQ ed un II LF.

Per quanto concerne l'analisi del Lago di Penne (LPE), poiché l'applicazione degli indici di confronto non è possibile in ambienti lentic, si è evitato effettuando i campionamenti nel rio che si origina da un bacino artificiale alimentato dall'acqua del lago. In questo piccolo corso d'acqua si è potuta stabilire una comunità bentonica stabile viste le caratteristiche di regime idrologico costante.

La percentuale di *R. esculenta*, campionata nel medesimo rio, raggiunge valori pari al 97%. Gli altri indici presentano i seguenti valori: I.B.E. V CQ, BMWP' III CQ e I.F.F. IV LF.

### La tenuta presidenziale di Castel Porziano

Nella Tenuta Presidenziale di Castel Porziano il primo sito di campionamento è posto su un piccolo fosso che corre in una zona adibita a coltivazione di cereali. In questa stazione (FVO) *R. esculenta* è dominante (93%), con i seguenti valori per gli indici di confronto: I.B.E. valore 4/5, IV CQ; BMWP' valore 38, III CQ; I.F.F. valore 166, III LF. Anche nel secondo sito (FGT) *R. lessonae* è presente in basse percentuali (20%); il valore di I.B.E. è 6/5, (III/IV CQ), valore 65 e II CQ per il BMWP'; valore 161 e III LF per l'I.F.F..

Procedendo verso la parte più interna della riserva, sono localizzati due siti di rilevamento in piccoli specchi d'acqua perenni e quindi monitorabili esclusivamente con le rane verdi. La terza stazione (PPO), si trova in un'area sensibilmente influenzata dall'uomo; la frequenza di *R. lessonae* si attesta al 33%. Nella zona a protezione integrale (PPI), la frequenza relativa di *R. lessonae* diviene maggioritaria ma non dominante (66%).

### Riserva naturale orientata

#### Bosco Pantano di Policoro

Le aree esterne alla zona protetta presentano frequenze di *R. esculenta* sempre superiori a quelle della specie più sensibile con frequenze che vanno dal 97% (ZOO), al 67% (ZOE) al 54% (COE) i valori medi degli indici di riferimento sono i seguenti: I.B.E. III/IV CQ; BMWP' III/IV CQ; I.F.F. IV LF.

All'interno dell'area protetta le frequenze si invertono e diventa preponderante *R. lessonae*: 64% nella stazione CES; 74% in quella situata nella zona più interna della riserva (CIN). I valori degli altri indici mostrano rispettivamente una III CQ per quelli basati sulla comunità macrobentonica ed un II/III LF per l'I.F.F. nella prima stazione; il valore dell'I.B.E. (8/7, II/III CQ) nella stazione più interna; presenta un lieve recupero, il BMWP' e I.F.F. confermano i valori della stazione precedente.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le evidenze sperimentali fin qui raccolte confermano che alla base delle capacità bioindicatrici delle rane verdi esiste una mortalità differenziale tra le due specie appartenenti al complesso *Rana esculenta*. Infatti *R. lessonae*, tende a prevalere in ambienti non disturbati fino ad escludere del tutto *R. esculenta*. Per contro, in ambienti molto stressati, la specie ibrida *R. esculenta* presenta frequenze crescenti, mentre *R. lessonae* si riduce notevolmente.

Le capacità adattative di *R. esculenta* sono presumibilmente attribuibili all'elevato grado di eterozigosi del suo genoma, che ne aumenta la fitness potenziale ampliando gli intervalli di variazione dei parametri ambientali che questa specie può tollerare.

Che la diversa distribuzione non sia influenzata da fattori di tipo strettamente ecologico (altitudine, morfologia dell'alveo, velocità della corrente, ecc.) viene confermato dal fatto che stazioni di rilevamento che condividono le stesse caratteristiche ambientali mostrano frequenze differenziate a causa proprio dei fattori di alterazione esterna.

Questa distribuzione viene ben evidenziata nel caso di stazioni di campionamento che presentano frequenze relative molto differenziate anche se con parametri ecologici paragonabili, come nel caso delle stazioni del transetto di Punte Alberete o quello della Riserva di Policoro. I risultati ottenuti in questi transetti rivestono un particolare interesse poiché la drastica inversione delle frequenze delle due specie avviene nel breve spazio di alcune centinaia di metri, rafforzando l'ipotesi che responsabili della distribuzione delle rane verdi siano proprio le variazioni della qualità dell'ambiente.

Ulteriori indicazioni si hanno dallo studio di altri popolamenti del centro Italia, che mostrano come la frequenza relativa di *R. esculenta* decresca con il diminuire dell'altitudine se questo corrisponde anche ad una diminuzione delle attività antropiche (bacino idrografico del Lago di Mezzano-Fosso Olpeta), oppure presentino frequenze simili pur trovandosi a quote molto diverse (bacino idrografico del Lago di Bolsena-Fiume Marta) (ANDREANI *et al.* 1997; ANDREANI 1999a; 1999b).

La competizione differenziale tra una specie di origine ibrida e le parentali evidenziata in questo lavoro è anche supportata da numerose evidenze sperimentali (UZZEL e DAREVSKY, 1975; NEVO, 1987; QUATTRO *et al.*, 1992). La possibilità delle specie di origine ibrida di adattarsi meglio delle parentali agli ambienti variabili è stata recentemente confermata nei pesci del genere *Poeciliopsis*, confrontando l'ibridogeno *P. monachalucida* con le specie parentali *P. monacha* e *P. lucida* (VRIJENHOEK e PFEILER, 1997). L'analisi di questo sistema a tre specie conferma come al successo delle

forme ibridogenetiche concorrano sia l'eterosi che la variabilità clonale.

Queste caratteristiche, che consentono di ampliare l'intervallo di condizioni tollerabili dagli ibridogeni (mediante l'elevato grado di eterozigosi) e di diversificare le nicchie ottimali dei vari emiclioni (mediante la diversità clonale) (BULGER e SCHULTZ, 1979), sono state evidenziate anche nei popolamenti italiani di rane verdi e possono concorrere sensibilmente alla variazione delle frequenze relative nei popolamenti naturali delle due specie di rane (SANTUCCI, 1993).

L'analisi dei fattori determinanti la distribuzione differenziale delle due specie facenti parte del complesso *Rana esculenta*, formulata nel presente lavoro, viene rafforzata anche da precedenti studi che mostrano come le attività umane in genere, o più specificatamente quelle agricole, tendano a selezionare le popolazioni di anfibi (SEMLITSCH e REYER, 1992; BAUER DIAL e DIAL, 1995; NORRIS e QUEVEDO, 1996; FIORAMONTI *et al.*, 1997; OLDHAM *et al.*, 1997; CHUBINISVILI, 1998a, 1998b; LEFCORT *et al.*, 1998).

A questo scopo è importante notare come sia rilevante la somiglianza nelle risposte delle rane verdi con la comunità del macrobentos investigata attraverso l'I.B.E. Questa similarità riveste una certa importanza poiché evidenzia come l'insieme delle caratteristiche qualitative e quantitative delle sostanze disciolte nell'acqua e bioaccumulabili influenzino le risposte fisiologiche ed adattative delle due specie di anfibi.

Per contro la concordanza alle risposte dell'indice I.F.F., che considera sia l'alveo bagnato che le caratteristiche dell'ambiente di contorno ad una determinata sezione fluviale, indica come tali anfibi anuri possano in qualche modo risentire dell'insieme dei fattori che influenzano negativamente la funzionalità del corso d'acqua. È inoltre di rilievo notare come non ci siano le stesse relazioni con l'indice BMWP' che d'altronde, come osservato in studi precedenti, sembra avere risposte meno concordanti anche rispetto all'I.B.E. e agli indicatori chimico-fisici (ANDREANI, 1999a).

Le corrispondenze evidenziate si possono spiegare pensando proprio alla natura anfibia di questi organismi, che trascorrono parte del ciclo vitale in acqua (tutta la fase larvale e quella riproduttiva) e parte sul terreno, specificatamente nella fascia riparia (da adulti). In base ai dati raccolti la distribuzione di *R. lessonae* e *R. esculenta* appare quindi influenzata in modo determinante dai parametri ecologici che generalmente vengono utilizzati per la valutazione dello stress di origine antropica.

I dati ottenuti su un transetto studiato nel centro Italia (Fiume Marta – VT), confermano i risultati derivanti dal presente lavoro. Attraverso l'analisi dei parametri chimico-fisici, microbiologici e della composi-

zione della comunità del macrobentos, infatti, si è evidenziato come la presenza di *R. esculenta* sia statisticamente correlata con le alte quantità di nutrienti disciolti, con le cariche batteriche di coliformi e di clostridi e con la presenza di quelle Unità Sistematiche di macroinvertebrati che notoriamente sono ritenute maggiormente resistenti all'inquinamento (oligocheti, chironomidi, ecc.). Inoltre si è anche potuta verificare una relativa sensibilità del sistema che, in presenza di lievi incrementi dei parametri di confronto, vede una marcata crescita di *R. esculenta* rispetto a *R. lessonae* (ANDREANI, 1999a).

Inoltre, analisi ecotossicologiche, come la determinazione della LC<sub>50</sub><sup>96h</sup> per il CuSO<sub>4</sub>, sembrano confermare una maggiore resistenza di *R. esculenta* rispetto a *R. lessonae*, almeno per quanto concerne l'esposizione a questo inquinante (SANTUCCI, 1993).

A scopo riepilogativo, si riportano i risultati delle diverse stazioni di campionamento ordinati in base alla percentuale crescente della specie ibrida (Tab. II).

Da questa tabella si rileva una discreta correlazione tra gli intervalli di variazione delle frequenze relative delle due specie e i valori di I.B.E. Naturalmente esistono delle discrepanze che, in alcuni casi andranno ulte-

**Tab. II.** Intervallo di variazione della frequenza relativa di *R. esculenta* –ordinata in modo crescente– e del valore dell'indice I.B.E. (Con l'asterisco sono evidenziate le stazioni nelle quali le risposte dei due indici si discostano maggiormente dall'intervallo di riferimento). Per il significato delle sigle delle stazioni si veda la Tab. I.

Intervallo % <i>R. esculenta</i>	Intervallo del valore I.B.E.	% di <i>R. esculenta</i>	Valore I.B.E.	Sigla stazione
0 - 20 %	9/8-10	1	10	TLS
		10	9/8	PFA-2
		14	10/9	PFA-1
20 - 40 %	7 - 7/8	26	8/7	CIN
		36	7	CES
		39	7	GMF
		51	6	CSU
		54	6	FRA
40 - 60 %	6	57	6	TVO
		58	7 *	GOP
		67	5	COE
		69	5	COV
		69	9 *	TMA
		70	5	GLP
60 - 80 %	5 - 5/6	80	5/6	FGT
		84	6/7 *	TFA
		86	2	FRU
		86	2	FRU
		93	2	FVO
		97	2	LPE
80 - 100 %	2 - 5/6	97	5/6 *	AGR

riormente indagate (stazioni TFA e GOP), mentre in altri possono ben evidenziare come tali anfibi siano anche sensibili ad uno stress generalizzato come mostrato dai Livelli di Funzionalità dell'I.F.F. nelle stazioni TMA e AGR. Inoltre è interessante notare come, nei casi di discrepanza, sia sempre la frequenza degli anfibi a mostrare una qualità dell'ambiente peggiore rispetto a quella evidenziata dall'I.B.E. Questo dato potrebbe essere a possibile conferma della sensibilità del bioindicatore rana verde già evidenziata in precedenti studi (ANDREANI, 1999a).

A conforto dell'ipotesi formulata nel presente lavoro per spiegare la distribuzione differenziale delle due specie di rane verdi, un recente studio (NEGOVETIC *et al.*, 2001) evidenzia come esistano specifiche risposte alla temperatura ambientale da parte di *R. esculenta* e *R. lessonae*. In questo studio viene dimostrato che, a parità di condizioni di sviluppo, le larve di *R. esculenta* competono meglio di quelle di *R. lessonae* quando le temperature sono più basse e viceversa.

Questo dato potrebbe confermare come le più alte frequenze di *R. esculenta* da noi rilevate nelle stazioni poste a quote più basse (dove la temperatura è maggiore), siano quindi proprio da imputare al grado di stress, che generalmente tende ad aumentare nelle zone di pianura maggiormente antropizzate.

L'associazione tra le frequenze delle due specie di rane e specifici livelli di inquinamento è stata ampiamente studiata ma, al fine di costruire un vero e proprio indice biotico è necessario correlare, con ulteriori studi, i valori delle frequenze relative con le Classi di Qualità ambientali. La possibilità di utilizzare le ri-

sposte del complesso *Rana esculenta* per piani di monitoraggio ambientale a larga scala appare comunque non distante dagli altri modelli costruiti su specie di anfibi (NCER, 1998). Inoltre la possibilità di studiare questi bioindicatori in ambienti lentic, già comprovata in precedenti studi (ANDREANI *et al.*, 1997; ANDREANI, 1999a, 1999b; SCIALANCA *et al.*, 1999) li rende particolarmente adatti ad essere affiancati ai sistemi più tradizionali, potendo produrre dati alternativi e complementari a questi, anche ribadendo che le rane in quanto vertebrati sono relativamente sensibili ai preoccupanti fenomeni di bioaccumulo.

Questo lavoro rappresenta un primo contributo per validare la capacità bioindicatrice delle rane verdi. Benché i dati analizzati rappresentino diverse condizioni geografiche ed ambientali, sarebbe comunque auspicabile aumentare il numero dei transetti da studiare, per verificare le risposte del complesso *Rana esculenta* in ambienti diversi. Inoltre incrementare i dati di confronto permetterebbe di ampliare la base statistica, per associare le risposte di questi anfibi ai diversi stress ambientali e costruire una scala delle frequenze relative rispetto all'entità ed alla tipologia degli impatti antropici.

#### RINGRAZIAMENTI

Gli autori desiderano ringraziare Laura Mancini, per la preziosa collaborazione alla revisione del testo, Maurizio Battezzatore, per le preziose informazioni sugli indici biotici e Gaetano Aloise, Fabrizio Baldini, Osvaldo Locasciulli, il personale dell'Oasi del Lago di Penne (WWF) e della Tenuta Presidenziale di Castel Porziano per la collaborazione alla raccolta dei campioni.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALBA TERCEDOR J., SANCHEZ-ORTEGA A., 1988. Un metodo rapido y simple para evaluar la calidad biologica de las aguas corrientes basado en el de Hellawell (1978). *Limnetica*, **4**: 51-56.
- ANDREANI P., MOTAWI A., NASCETTI G., 1997. Valutazione della qualità delle acque del bacino idrografico del fiume Marta (Alto Lazio): applicazione dell'Indice Biotico Esteso e analisi della frequenza relativa di rane verdi del complesso *Rana esculenta*. In: Atti Conv. Scient. "VIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia", Parma, 10-12 settembre 1997.
- ANDREANI P., 1999a. Le rane verdi del complesso *Rana esculenta* come indicatori di disturbo ambientale: analisi delle frequenze relative e confronto con indici biotici e parametri ecologici. *Tesi di Dottorato in Scienze Ambientali (XII ciclo)*, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo.
- ANDREANI P., 1999b. *Rana lessonae* e *Rana esculenta*: un test per il valore adattivo dell'eterozigosi. In: Atti Conv. Scient. "IX Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia", Lecce, 14-17 settembre 1999.
- BARINAGA M., 1990. Where have all the frogs is gone? *Sciences*, **247**: 1033-1034.
- BAUER DIAL C.A., DIAL N.A., 1995. Lethal effects of the consumption of fields level of paraquat-contaminated plants of frog tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **55**, **6**: 870-877.
- BERGER L., 1983. Western Palearctic water frogs (Amphibia, Ranidae): Systematic, genetic and population composition. *Experientia*, **39**: 127-130.
- BULGER A.J., SCHULTZ R.J., 1979. Heterosis and interclonal variation in thermal tolerance in unisexual fishes. *Evolution*, **33**: 848-859.
- BULLINI L., 1985. Speciation by hybridization in animals. *Bol. Zool.*, **52**: 121-137.
- BULLINI L., NASCETTI G. 1990. Speciation by hybridization in phasmids and other insects. *Can. J. Zool.*, **68**: 1747-1760.
- BURY R.B., 1988. Habitat relationship and ecological importance of amphibians and reptiles in streamside management. In:



- Raedeke K.J., (ed.). *Riparian wildlife and forestry interactions*. Seattle, University of Washington Press, 61-76.
- CHERNYSHOVA E.V., STAROSTIN V.I., 1994. The peripheral blood of frogs in the genus *Rana* as a test system for assessing environmental pollution. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.*, **4**: 656-660.
- CHON J.P., 1994. Salamanders slip-sliding away or too surreptitious in count? *Biosciences*, **44**: 219-223.
- CHUBINISHVILI A.T., 1998a. The status of the natural population of the *Rana esculenta* complex in response to anthropogenic influences: a morphological approach. In: Pensoft Publishers (ed.). *Advance in amphibian research in the former Soviet Union*. Sofia, **2**: 45-70.
- CHUBINISHVILI A.T., 1998b. Development in omeostasis in population of the marsh Frog (*Rana ridibunda* Pall.) living under the condition of chemical pollution in the middle Volga region. *Russian J. Ecol.*, **29**, **1**: 63-65.
- DUNSON W.A., WYMAN R.L., CORBETT E.S., 1992. A symposium on amphibian declines and habitat acidification. *J. Herpetol.*, **26**: 349-342.
- FIORAMONTI E., SEMLITSCH R.D., REYER H.U., FENT K., 1997. Effects of triphenyltin and pH on the growth and development of *R. lessonae* e *R. esculenta* tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, **9**: 1940-1947.
- GHETTI P.F., 1997. *Manuale di applicazione. Indice Biotico Esteso (I.B.E.). Imacroinvertebrati nell'analisi dei corsi d'acqua*. Ed. Provincia autonoma di Trento, Agenzia Provinciale per la protezione dell'ambiente.
- GUERRINI F., BUCCI S., RAGGHIANI M., MANCINI G., HOTZ H., UZZELL T., BERGER L., 1997: Genomes of two water frog species resist germ line exclusion in interspecies hybrids. *J. Exp. Zool.*, **279**, **2**: 163-176.
- HALL R.J., HENRY P.F.P., 1992. Review: assessing effects of pesticides on amphibian and reptiles: status and needs. *J. Herpetol.*, **2**: 65-71.
- HOTZ H., BEERLI P., SPOLSKY C., 1992. Mitodrial DNA reveals formation of nonhybrid frogs by natural mating bet hemiclinal hybrids. *Molecular Biology Evolutuion*, **9**, **4**: 610-620.
- HOTZ H., SEMLITSCH R.D., SCHMIEDEHAUSEN S., BEERLI P., GUEX G.D., 1993. Differential performance of LDH-B genotypes in water frogs tadpoles. In: Catzeflis, Gautier (ed). *Evolution 93. Fourth Congress of the European Society for Evolutionary Biology*. Montpellier, August, **182**: 22-28.
- HOTZ H., SEMLITSCH R.D., GUTMANN E., GUEX G.D., BEERLI P., 1999. Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclinal frog hybrids. *Proceeding of National Academy of Sciences U.S.A.*, **96**: 2171-2176.
- KISELEVA E.I., 1997. Aspect of the chemical ecology and chemosensory guided behavioral reaction in anuran tadpole. In: Pensoft Publishers (ed.). *Advance in amphibian research in the former Soviet Union*. Sofia, **2**: 95-101.
- LAVIE B., NEVO E., 1986. Genetic diversity of marine gastropods: contrasting strategies of *Cerithium rupestre* and *C. scabridum* in the Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **28**: 99-103.
- LEFCORT H., MEGUIRE R.A., WILSON L.H., ETTINGER W.F., 1998. Heavy metals alter the survival, growth metamorphosis and antipredatory behaviour of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, **3**: 447-456.
- LEONTYEVA O.A., SEMENOV D.V., ESENIN A.V., 1997. Brown frogs as bioindicator of haevy metal contamination: preliminary results on the common frog (*Rana temporaria*) in Moscow Province. In: Pensoft Publishers (ed.). *Advance in amphibian research in the former Soviet Union*. Sofia, **2**: 125-131.
- MCALPINE S., 1993. Genetic Heterozygosity and reproductive success in the green treefrog, *Hyla cinerea*. *Heredity*, **70**: 553-558.
- MISYURA A.N., GASSO V.Y., SUKHAHOVA V.N., 1996. Comparative ecology and biochemistry of amphibian and reptiles of polluted habitats. In: Pensoft Publishers (ed.). *Advance in amphibian research in the former Soviet Union*. Sofia, **1**: 111-116.
- NASCETTI G., BULLINI L., 1980. Differenziamento genetico e speciazione in fasmidi dei generi *Bacillus* e *Clonopsis* (Cheleutoptera, Bacillidae). In: Atti Con. Scient. "XII Congr. Naz. ital. Ent." (Roma, 1980), 215-223.
- NCER (NACIONAL CENTER FOR ENVIRONMENTAL RESEARCH) Research Project, 1998. Environmental factors that influence amphibian community structure and health as indicators of ecosystems. Investigator: Val Beasley, Carl Richards, Rebecca Cole, Roger Brannian, Lucinda Johnson, Pat Schoff, Jack Cochran, Christopher Phillips, and Martin Ouellet. Institution: University of Illinois, University of Minnesota-Duluth, United States Geological Survey; Illinois Natural History Survey; and McGill University. EPA Project Officer: Amanda Senft. Project Period: June 1, 1998 - May 31, 2001. Research Category: Ecosystem Indicators.
- NEGOVETIC S., ANHOLT B., SEMLITSCH R.D., REYER H.U., 2001. Specific response of sexual and hybridogenetic european waterfrog tadpoles to temperature. *Ecology*, **82**, **3**: 766-774.
- NEVO E., 1976. Adaptive strategies of genetic systems in constant and varying environments. In: Karlin S., Nevo E. (ed.). *Population genetics and ecology*. Academic Press, New York, 141-158.
- NEWMAN R.A., 1988. Genetic variation for larval anuran (*Scaphiopus couchii*) development time in uncertain environment. *Evolution*, **42**, **4**: 763-773.
- NORRIS B., QUEVEDO L., 1996. Adverse effects of polluted continental water bodies in Chile on frog adrenergic synapse. *Bulletin of Enviromental Contamination and Toxicology*, **57**, **4**: 640-647.
- OLDHAM R.S., LATHAM D.M., HILTON-BROWN D., TOWNS M., COOKE A.S., BURN A., 1997. The effect of ammonium nitrate fertiliser on frog (*Rana temporaria*) survival. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **61**: 69-74.
- PAGANO A., JOLY P., HOTZ H., 1997. Taxon competition and genetic variation of water frogs in the Mid-Rhone floodplain. *Ecology/Ecologie*, **320**: 759-766.
- PAGANO A., JOLY P., 1998. Limits of the morphometric method for taxonomic field identification of water frogs. *Alytes*, **16**: 3-4.
- PLENET S., HERVANT F., JOLY P., 2000. Ecology of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: differential oxygen requirements of tadpoles. *Evolutionary Ecology*, **14**: 13-23.
- QUATTRO J.M., AVISE J.C., VRIJENHOEK, R.G., 1992. An ancient clonal lineage in the fish genus *Poeciliopsis* (Atheriniformes: Poeciliidae). *Proceeding of National Academy of Sciences U.S.A.*, **89**: 348-352.

- RIST L., SEMLITSCH R.D., HOTZ H., REYER H.U., 1997. Feeding behaviour, food consumption, and growth efficiency of hemiclinal and parental tadpoles of the *Rana esculenta* complex. *Functional Ecology*, **11**: 735-742.
- SANTUCCI F., 1993. Ricerche di genetica ecologica su una specie di origine ibrida: *Rana esculenta*. *Tesi di Dottorato*, Università "La Sapienza" di Roma.
- SANTUCCI F., NASCETTI G., BULLINI L., 1996. Hybrid zones between two genetically differentiated forms of the pond frog *Rana lessonae* in southern Italy. *Journal of Evolutionary Biology*, **9**: 429-450.
- SANTUCCI F., ANDREANI P., NASCETTI G., BULLINI L., 2000. Genetic identification and geographic distribution of the water frogs *Rana lessonae* and *Rana esculenta* in Italy, Sicily and Corsica (amphibia, anura). *Mus. Reg. Sci. Nat.*. Torino, 359-367.
- SCHUYTEMA G.S., NEBEKER A.V., GRIFFIS W.L., WILSON K.L., 1991. Teratogenesis, toxicity, and bioconcentration in frogs exposed to dieldrin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, **3**: 332-350.
- SCHUYTEMA G.S., NEBEKER A.V., PETERSON J.A., GRIFFIS W.L., 1993. Effects of pentachlorophenol - contaminated food organisms on toxicity and bioaccumulation in the frog *Xenopus leavis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **24**, **3**: 359-364.
- SCIALANCA F., ANDREANI P., MUCCIOLO L., NASCETTI G., 1999. Valutazione della qualità delle acque litorali del Lago di Vico (Centro Italia.): analisi chimica, studio della comunità macrobenthonica e analisi delle rane verdi del complesso *Rana esculenta*. In: Atti Conv. Scient. "IX Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia", Lecce, 14-17 settembre 1999.
- SEMLITSCH R., REYER H.U., 1992. Performance of tadpoles from the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: interaction with pond drying and interspecific competition. *Evolution*, **46**: 665-676.
- SEMLITSCH R.D., 1993a. Asymmetric competition in mixed population of tadpoles of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Evolution* **47**: 510-519.
- SEMLITSCH R.D., 1993b. Effects of different predators on the survival and development of tadpoles from hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Oikos*, **67**: 4-46.
- SEMLITSCH R.D., SCHMIEDEHAUSEN S., HOTZ H., BEERLI P., GUEx G.D., 1993. Differences in larval performance among coexisting hemiclones of hybridogenetic water frogs are of similar magnitude as those between hybrids and parental species. In: Atti Conv. Scient. "Fourth Congress of the European Society for Evolutionary Biology". Montpellier, August, 22-28: 409.
- SEMLITSCH R.D., SCHMIEDEHAUSEN S., HOTZ H., BEERLI P., 1996. Genetic compatibility between sexual and clonal genomes in local populations of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Evolutionary Ecology*, **10**: 531-543.
- SEMLITSCH R.D., HOTZ H., GUEx G.D., 1997. Competition among tadpoles of coexisting hemiclones of hybridogenetic *Rana esculenta*: support for the frozen niche variation model. *Evolution*, **51**, **4**: 1249-1261.
- SILIGARDI *et al.*, 2000. *I.F.F. Indice di Funzionalità Fluviale*. ANPA (Agenzia Nazionale per la Protezione dell' Ambiente), Roma, 224 pp.
- TUNNER H.G., NOPP H., 1979. Heterosis in the common European waterfrog. *Naturwissenschaften*, **66**: 268-269.
- TOKTAMYSOVA Z.S., KAIDAULOVA E.V., 1996. Growth, development, and respiration rate of *Rana ridibunda* Pall. larvae exposed to chemicals. *Russian Journal of Ecology*, **27**, **6**: 450-451.
- UZZELL T., DAREVSKY I.S., 1973. The relationships of *Lacerta portschinskii* and *Lacerta raddei* (Sauria, Lacertidae). *Herpetologica*, **29**: 1-6.
- UZZELL T., BERGER L., 1975. Electrophoretic phenotypes of *R. rididunba*, *R. lessonae* and their hybridogenetic associate, *R. esculenta*. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia*, **127**: 13-24.
- UZZELL T., DAREVSKY I.S., 1975. Biochemical evidence for the hybrid origin of the parthenogenetic species of the *Lacerta saxicola* complex (Sauria: Lacertidae), with a discussion of some ecological and evolutionary implications. *Copeia*, 204-222.
- VINOGRADOV A.E., CHUBINISHVILI A.T., 1999. Genome reduction in a hemiclinal frog *Rana esculenta* from radioactively contaminated areas. *Genetics*, **151**, **3**: 1123-1125.
- VITT L.J., CALDWELL J.P., WLBUR H.M., SMITH D.C., 1990. Amphibian as Harbingers of decay. *Biosciences*, **40**: 418.
- VRIJENHOEK R.C., PFEILER E., 1997. Differential survival of sexual and asexual poeciliopsis during environmental stress. *Evolution*, **51**, **5**: 1593-1600.
- WAKE D.B., 1991. Declining amphibian populations. *Sciences*, **253**: 860.
- WALLAS S.C., BLAUSTAIN A.R. BEATTY J.J., 1992. Amphibian biodiversity of the Pacific Northwest with special reference to old-growth stands. *Northwest Environ. J.*, **8**: 53-69.