UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

LAUREA MAGISTRALE IN
CONSERVAZIONE E BIODIVERSITA' ANIMALE

TESI DI LAUREA

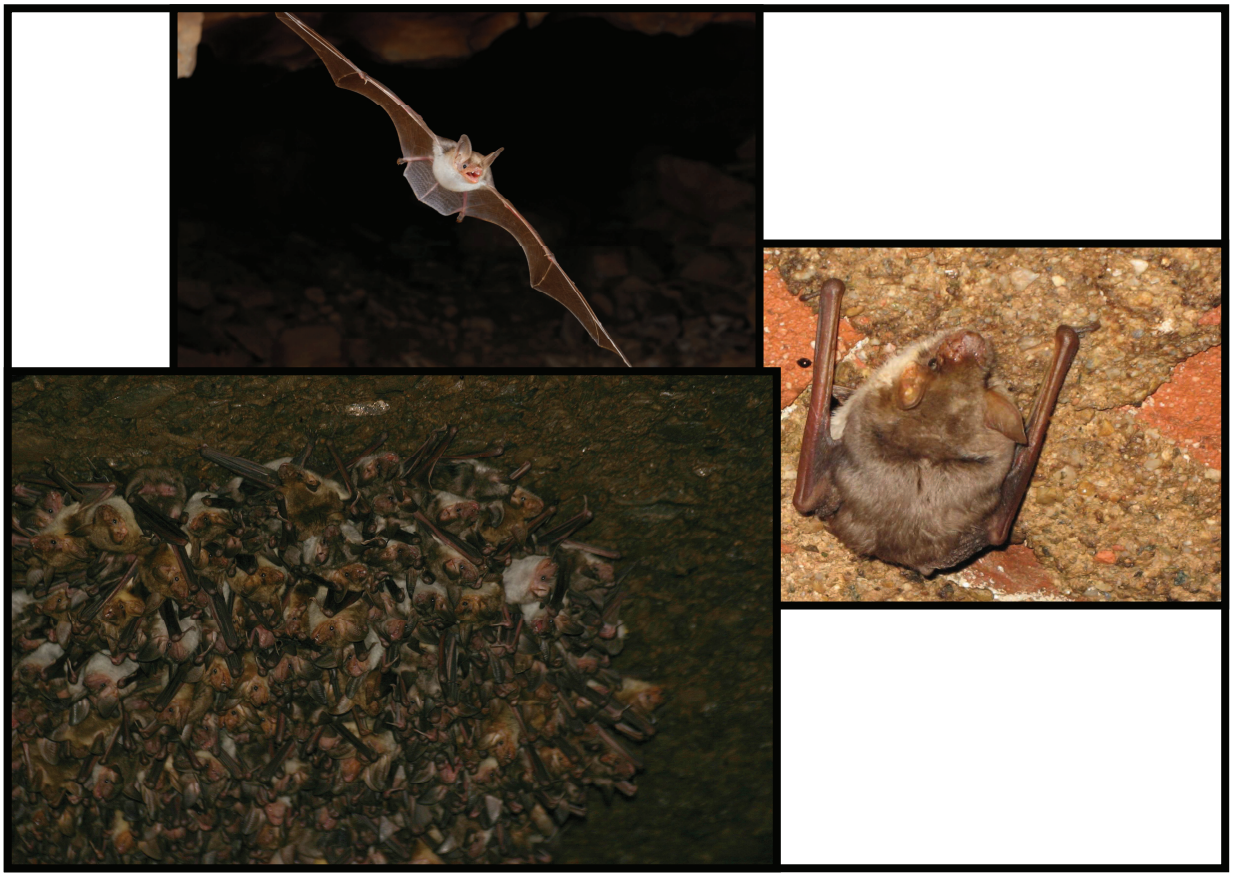
Variabilità genetica e ibridazione in colonie italiane di *Myotis myotis* e *Myotis blythii* (Chiroptera: Vespertilionidae)

Candidato: Relatore:

Paola CULASSO Massimiliano DEL PERO

Anno Accademico 2006 - 2007

A mia mamma…



1. INTRODUZIONE 6

1.1 PREMESSA: SCOPI DELLA RICERCA 6

1.2 L'IBRIDAZIONE 6

1.2.1 Il fenomeno dell'ibridazione in natura 6

1.2.2 La speciazione secondo il Modello BDM e il Concetto Genetico di Specie 10

1.3 LE SPECIE 15

1.3.1 Sistematica e morfologia 15

1.3.2 Ecologia 19

1.3.3 La conservazione dei Chirotteri in Europa 23

1.4 LA SISTEMATICA DEI "GROSSI *Myotis*" 26

1.5 APPROCCIO MOLECOLARE NELLA DETERMINAZIONE DI INTROGRESSIONE GENETICA TRA DUE SPECIE 30

1.5.1 I loci microsatellitari 31

1.5.2 Errori di genotyping associati ai loci microsatellitari 33

1.5.3 La genetica non invasiva 34

2. MATERIALI E METODI 38

2.1 CAMPIONAMENTI E DESCRIZIONE DELLE COLONIE STUDIATE 38

2.1.1 Le colonie oggetto di studio 38

2.1.2 Campionamenti di tessuto 41

2.1.3 Campionamenti di guano 44

2.2 ESTRAZIONE DEL DNA 44

2.3 AMPLIFICAZIONE DEI LOCI MICROSATELLITARI 45

2.4 ANALISI DEGLI ELETTROFEROGRAMMI 47

2.5 ANALISI DEI DATI MICROSATELLITARI E DEL TASSO DI IBRIDAZIONE 47

2.5.1 Linkage Disequilibrium, Equilibrio di Hardy-Weinberg e Frequenze alleliche 48

2.5.2 Indice di fissazione di Wright o F_{ST} e AMOVA 49

2.5.3 GENETIX e STRUCTURE: due software per valutare la presenza di differenti frequenze alleliche nelle due specie 51

2.5.4 Misura dell'ibridazione tramite il software NEWHYBRIDS 52

3. RISULTATI 55

3.1 CAMPIONAMENTI DI TESSUTO 55

Fig. 18 – Discriminazione degli esemplari morfologicamente identificati secondo le misure di AV e LOr. Per la legenda fare riferimento a Tab. 13 56

3.2 SUCCESSO DI ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE E SUCCESSO DI AMPLIFICAZIONE 56

3.3 ANALISI DEI DATI MICROSATELLITARI 57

3.3.1 Analisi della struttura genetica per le singole specie 57

3.3.1a Test del Linkage Disequilibrium e dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg 57

3.3.1b Frequenze alleliche, numerosità allelica (N_a) e ricchezza allelica (k) 58

3.3.1c Eterozigosità osservata (H_o) e attesa (H_e) 61

3.3.1d FCA (*Factorial Component Analysis*) 61

3.3.1e Differenziamento tra popolazioni e F_{ST} 63

3.3.1f AMOVA 64

3.3.1g Determinazione della presenza di clusters tramite il software STRUCTURE 65

3.3.2 Analisi della struttura genetica tra colonie 67

3.3.2a Test del Linkage Disequilibrium e dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg 67

3.3.2b Frequenze alleliche, numerosità allelica (N_a) e ricchezza allelica (k) 68

3.3.2c Eterozigosità attesa (H_e) e osservata (H_o) 68

3.3.2d Differenziamento tra colonie e F_{ST} 69

3.3.3 Attribuzione degli individui alle classi di frequenza genotipiche 70

3.3.4 Analisi della struttura genetica negli individui assegnati alla classe pura Myotis myotis 76

3.3.4a Test del Linkage Disequilibrium e dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg 76

3.3.4b Frequenze alleliche, numerosità allelica (N_a) e ricchezza allelica (k) 76

3.3.4c Eterozigosità attesa (H_e) e osservata (H_o) 77

3.3.4d Differenziamento tra popolazioni e F_{ST} 77

3.4 CORRELAZIONE TRA I PARAMETRI BIOMETRICI E L'IDENTITÀ GENETICA 78

4. DISCUSSIONE 79

4.1. DISCUSSIONE SUI RISULTATI OTTENUTI DALLE ANALISI DEI MARKER MICROSATELLITARI 79

4.2 LE CONSEGUENZE DELL'IBRIDAZIONE SULL'ECOLOGIA E LA MORFOLOGIA DELLE SPECIE 90

4.3 IPOTESI DI REVISIONE DELLA CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA DEI GROSSI *Myotis* IN EUROPA 94

4.4 IMPLICAZIONI NELLA CONSERVAZIONE DI *Myotis myotis* E *Myotis blythii* DERIVANTI DALL'IBRIDAZIONE DELLE SPECIE 97

APPENDICI 101

APPENDICE 1 – Protocollo di estrazione DNA totale da tessuti conservati in alcool 99% 102

APPENDICE 2 – Misure morfometriche degli individui da cui sono stati estratti campioni di tessuto 103

APPENDICE 3 – Tipologia di ogni campione tipizzato e genotipi ottenuti su 5 loci microsatellitari 106

BIBLIOGRAFIA *111*

RINGRAZIAMENTI *121*

1. INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA: SCOPI DELLA RICERCA

Myotis myotis e *Myotis blythii* sono due specie appartenenti all'ordine dei Chirotteri. Entrambe sono presenti in Europa ed entrambe sono sottoposte al pesante impatto antropico nella loro area di distribuzione, con importanti implicazioni per la conservazione delle stesse. Le popolazioni sono fortemente diminuite a partire soprattutto dalla seconda metà del secolo scorso a causa degli impatti diretti sulle colonie e dell'impatto indiretto sugli habitat utilizzati per la caccia nonché sulle prede che costituiscono la loro nicchia trofica. Un primo scopo di questo lavoro è quindi quello di valutare, per parte del territorio italiano, lo stato di salute delle popolazioni mediante un approccio molecolare e la genetica di popolazione. Alla luce della individuazione recente del fenomeno di ibridazione tra le due specie in esame, si è inoltre cercato di quantificare tale fenomeno e descrivere la sua espansione in relazione alla presenza e distribuzione reciproca delle specie. Scopo finale è quindi quello di fornire indicazioni, sulla base dei dati ottenuti, per la conservazione di un'inaspettata fonte di biodiversità.

1.2 L'IBRIDAZIONE

1.2.1 Il fenomeno dell'ibridazione in natura

Il fenomeno dell'ibridazione si verifica quando tra due specie vengono superate, a causa di concomitanti fattori, le barriere riproduttive. Ossia, vengono a mancare quei meccanismi propri dell'isolamento riproduttivo che impediscono l'accoppiamento e la generazione di prole fertile tra individui di specie diverse. Tali meccanismi sono distinti in "prezigotici" (ecologici, temporali, etologici, meccanici – impedimento della copula, gametici – impedimento della fecondazione) e "postzigotici" (mortalità, sterilità, ridotta vitalità o ridotta fertilità degli ibridi). In questi casi le due specie si possono accoppiare e dare origine ad una prole ibrida in grado a sua volta di riprodursi. I pool genici prima distinti poiché protetti da meccanismi di isolamento riproduttivo potrebbero a questo punto mescolarsi. Le aree di ibridazione sono terreno di studio per i biologi evoluzionisti ed ecologi in quanto le specie coinvolte possono diventare modello per l'analisi di fenomeni quali la speciazione, i meccanismi selettivi o le interazioni ospite-parassita (Howard et al., 2003). Per quanto

concerne invece gli aspetti applicativi, l'indagine dei pattern di ibridazione può essere fondamentale in ambito conservazionistico in quanto non sono rari i casi di introgressione genetica tra specie selvatiche e specie domestiche. Il cane domestico *Canis familiaris* è infatti spesso responsabile di quello che viene definito "inquinamento genetico" di molte altre specie di canidi. In Europa ci si riferisce all'ibridazione con il lupo *Canis lupus* (Verardi et al., 2006), una specie citata nella Lista Rossa della IUCN come LC (Least Concerned) e in allegato II e IV della Direttiva 92/43/CEE ("Habitat") in quanto sta lentamente riespandendo il suo areale dopo averne visto, almeno in alcune aree tra cui l'Italia, la forte contrazione per cause prettamente antropiche. Il ruolo di grande predatore carnivoro che il lupo ricopre è fondamentale per la stabilità delle comunità di ungulati ed è quindi importante conservare l'integrità delle popolazioni anche dal punto di vista genetico. In questo caso l'ibridazione è favorita da diversi fattori tra cui la limitata distanza genetica tra le due specie e le sempre più frequenti occasioni di incontro tra individui della specie selvatica e quella domestica causate da un avvicinamento del lupo verso gli ambienti antropizzati e la diffusione dei cani inselvatichiti in ambienti naturali. Un discorso del tutto analogo può essere fatto per l'ibridazione tra il gatto domestico *Felis silvestris catus* e il gatto selvatico *Felis silvestris silvestris* a livello di sottospecie. In questi casi sono stati chiariti i pattern evolutivi delle varietà domestiche le quali sembrano essersi originate dalle rispettive specie selvatiche nel caso del cane domestico (Vilà, 1997) o dalla sottospecie *Felis silvestris libica* -distribuita nel continente africano- nel caso del gatto (Driscoll, 2007) attraverso processi di domesticazione nel corso di migliaia di anni. La distanza evolutiva e genetica ridotta è quindi alla base della inclinazione all'ibridazione.

Il caso dell'ibridazione tra cornacchia grigia *Corvus coronae cornix* e cornacchia nera *Corvus coronae coronae* è il risultato di un recente contatto tra gli areali delle due sottospecie lungo una linea che approssimativamente passa dalle Alpi e taglia l'Europa attraversando Austria, Repubblica Ceca e Germania. Tale contatto è conseguente allo scioglimento dei ghiacci dall'ultima glaciazione pleistocenica che aveva isolato le popolazioni nelle aree identificate come rifugi glaciali. In questo caso la separazione tra le popolazioni durante l'espansione dei ghiacci ha avviato un processo di speciazione tale da scindere la specie in due sottospecie, che al ricongiungimento dei due areali non presentavano differenze tali da non essere interfeconde (Haas e Brodin, 2005). In molte aree prealpine è quindi possibile notare oggi individui morfologicamente intermedi tra le due sottospecie.

Esistono casi di ibridazione attraverso i quali originano nuove specie e questo è particolarmente vero per anfibi e pesci. Uno dei casi più noti è studiati è quello della rana verde *Rana esculenta* i cui individui sono prodotti esclusivamente per ibridogenesi, ossia

dall'incrocio di un individuo di *Rana lessonae* e uno di *Rana ridibunda*. La linea germinale contiene però il genoma di una sola specie parentale in quanto l'altro viene eliminato in una fase precoce dello sviluppo embrionale dalle cellule che daranno origine ai gameti. L'accoppiamento avverrà poi con individui della specie il cui genoma era stato eliminato. (Graf e Polls Pelaz, 1989).
Il caso delle rane verdi è un caso di "speciazione per ibridazione", ossia la linea ibrida che si origina si isola riproduttivamente dalle due linee parentali costituendo una nuova specie. E' questo un fenomeno molto diffuso nelle piante (Grant, 1981) e alcuni animali, come pesci e anfibi, nei quali si riscontra il fenomeno della allopoliploidia cioè la duplicazione di uno dei due set cromosomici a causa della incompatibilità degli stessi durante la duplicazione cellulare e la creazione di una linea bisessuata che si riproduce sessualmente.

Esistono in natura molti più casi di ibridazione di quanti non ci si potrebbe aspettare. Solo per citare alcuni numeri(Mallet, 2005), sono stati riscontrati casi di ibridazione tra il 25% delle piante vascolari del Regno Unito, oltre il 28% dell'avifauna appartenente alla famiglia Paridae e il 6% delle specie di mammiferi europei. Tra i Chirotteri sono descritti in bibliografia 3 casi di ibridazione: tra *Pteropus alecto* e *P. poliocephalus* (Megachiroptera: Pteropodidae) in Australia (Webb e Tidemann, 2003), un caso di ibridazione intraspecifica in *Uroderma bilobatum* (Microchiroptera: Phyllostomidae) in Sud America (Hoffmann et al., 2003). Inoltre solo recentemente è stata riscontrata ibridazione tra *Myotis myotis* e *Myotis blythii* (Microchiroptera: Vespertilionidae) in Europa (Berthier et al, 2006).

Sono state descritte sei tipologie di ibridazione, riferite ad altrettanti livelli di introgressione dei genomi e alle quali seguono diverse tipologie di intervento nella gestione delle specie coinvolte (Allendorf et al., 2001):

- **Taxon ibrido naturale**: equivalente alla speciazione per ibridazione
- **Introgressione naturale**: due specie che in simpatria ibridano senza originare nuove specie, ma rendendo indistinguibili i pool genici originari
- **Zona naturale di ibridazione**: l'ibridazione si mantiene esclusivamente nella fascia di contatto tra gli areali delle specie coinvolte (gen. *Corvus*)
- **Ibridazione senza introgressione**: la prole ibrida generata non è vitale o fertile
- **Introgressione diffusa**: permangono popolazioni parentali con assenza di individui ibridi
- **Introgressione completa**: non è possibile individuare popolazioni delle specie parentali

Queste possono essere parte integrante di un processo evolutivo naturale o conseguenze di interventi antropici.
Il fenomeno dell'ibridazione può coinvolgere due specie e viene quindi definita **ibridazione interspecifica,** oppure coinvolgere entità distinte (sottospecie, ecotipi, popolazioni, razze domestiche) appartenenti ad una stessa specie e viene definita **ibridazione intraspecifica**.

Spesso il fenomeno viene associato alla scomparsa di pool genici indigeni di specie magari a rischio di conservazione per introgressione di genotipi esogeni, tanto che un buon numero delle 100 problematiche ecologiche sollevate da Sutherland et al. (2006) come elementi di interesse per gli organismi politici riguardano proprio l'ibridazione tra specie (o forme distinte di una stessa specie) selvatiche e domestiche. In realtà i biologi evoluzionisti si sono resi conto di come l'ibridazione possa essere anche fonte di variabilità (Dowling e Secor, 1997). Essa può infatti essere associata alla radiazione adattativa soprattutto quando, come emerge da Seehausen (2004), in presenza di specie idonee all'ibridazione si presentano condizioni quali:

- bassa densità di popolazione, ad esempio ai margini degli areali di distribuzione dove si verificano condizioni di simpatria, in cui i contatti tra individui della stessa specie parentale sono scarsi e la competizione degli eventuali ibridi con le specie parentali non è forte
- presenza di nicchie ecologiche nuove o non esplorate in cui la combinazione di tratti genetici della specie ibrida ha un vantaggio ecologico rispetto alle specie parentali e rispetto a quanto non avviene nelle nicchie occupate dalle specie parentali stesse.

Questo viene riassunto dall'autore in quella che è la *syngameon hypotesis* dove con il termine *syngameon* si intendono due specie ecologicamente distinte, ma in grado di scambiare materiale genetico. Il numero di specie che si genera durante un processo di radiazione adattativa non dipende quindi solo dalla disponibilità di nicchie ecologiche non occupate e dalla variabilità genetica, ma anche dalla inclinazione (per compatibilità genetica) propria delle specie coinvolte nella radiazione al processo di ibridazione in quanto questo può fornire nuove opportunità speciative (Seehausen, 2004). Inoltre l'eventuale presenza di fenomeni di ibridazione in atto durante un processo speciativo non è limitante nel momento in cui entrano in gioco e si rafforzano meccanismi di isolamento riproduttivo delle specie coinvolte e di selezione degli ibridi (Mallet, 2005).
La compatibilità tra due specie all'ibridazione e la sua frequenza nelle popolazioni è regolata da tre aspetti:

- l'esistenza e l'efficacia di barriere riproduttive: una volta superate e una volte prodotta prole ibrida vitale e non sterile, la frequenza di ibridazione aumenta se la progenie si riproduce anche con individui delle specie parentali (reincroci). Questo meccanismo è noto con il nome di *reinforcement* (Servedio e Noor, 2003).
- il tempo di divergenza tra due specie: in studi di laboratorio l'inclinazione all'ibridazione è negativamente correlata con la distanza genetica (Edmands, 2002) e nel genere *Heliconius* (Mallet et al., 1998) essa aumenta progressivamente in specie che mostrano percentuali di divergenza genetica maggiori del 10%, del 5-6% o minori del 2%
- il taxon di appartenenza delle specie coinvolte (Mallet, 2005).

Non sono assenti le implicazioni conservazionistiche del fenomeno di ibridazione dal momento in cui si ha a che fare con specie la cui definizione diventa problematica. Se il fenomeno può essere considerato naturale allora deve essere mantenuto e non ostacolato in quanto componente naturale di un processo evolutivo in atto e potenziale fonte di nuova diversità. Se la base del processo è invece antropica la sua limitazione può essere contemplata, ma l'eliminazione degli individui ibridi presuppone il riconoscimento certo di questi per non produrre l'effetto opposto di eliminare individui della specie di interesse. Non esiste un limite nella frequenza di ibridazione che possa essere ritenuto accettabile; esso dipende dallo status conservazionistico delle specie coinvolte e dalla distribuzione e estensione dell'area di ibridazione nonché dalla frequenza del fenomeno. Spesso accettare e conservare specie indigene che abbiano subito una completa introgressione è l'unica speranza di salvare una varietà che altrimenti scomparirebbe (si pensi al caso dell'*Anas superciliosa* in Nuova Zelanda, completamente ibridata con il germano reale *Anas platyrhynchos* (Rhymer et al., 1994).

1.2.2 La speciazione secondo il Modello BDM e il Concetto Genetico di Specie

Il modello di speciazione BDM è stato proposto per la prima volta da Bateson nel 1909 e successivamente è stato ripreso da Dodzhansky nel 1934 e da Muller nel 1939 ed è stato così denominato dai nomi degli autori stessi. Questo modello, ampiamente discusso e revisionato nel lavoro di Baker e Bradley (2006), descrive il processo di speciazione attraverso l'accumulo di divergenza genetica in popolazioni allopatriche derivate da una singola specie. Esso si attua quindi come un classico processo di speciazione allopatrica, ma se ne differenzia nell'esito finale. Immaginiamo due popolazioni appartenenti ad una singola specie che si trovano separate nello spazio per una qualsiasi causa (ambientale, climatica ecc.). Tra le cause

climatiche maggiormente note che abbiano generato tale situazione si possono ricordare le glaciazioni, periodi geologici in cui le basse temperature e l'espansione delle calotte polari erano tali da rendere inospitali ampie zone per specie prima paneuropee e permettere viceversa la diffusione di quelle adatte alle basse temperature. Le glaciazioni si sono verificate ciclicamente nella storia della terra in particolare nel Pleistocene tra i 2 milioni e i 10.000 anni fa alternando periodi glaciali a periodi interglaciali caratterizzati da incremento della temperatura. L'ultima glaciazione pleistocenica, denominata Glaciazione Wurm, si è verificata in un periodo che va dagli 80.000 anni fa ai 10.000 anni fa. I ghiacci si estendevano (Fig. 1) in buona parte del Nord America e del Nord Europa e in un'area molto più ampia di quelli che sono gli attuali massicci delle Alpi e dei Pirenei.

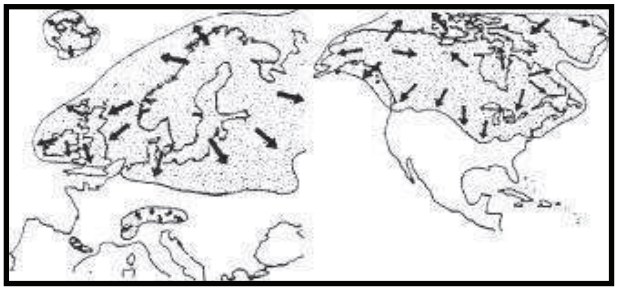


Fig. 1 – Espansione della calotta polare durante l'ultima glaciazione pleistocenica

In queste condizioni le popolazioni di molte specie europee si sono trovate isolate per decine di migliaia di anni da coltri di ghiaccio inattraversabili andando ad occupare aree chiamate "rifugi glaciali" dove le specie non adattate al rigido clima freddo potevano sopravvivere. In questo modo si sono definite le condizioni di allopatria tra popolazioni geograficamente isolate. Il ritiro dei ghiacci durante i periodi interglaciali permetteva invece di nuovo l'espansione degli areali di queste popolazioni fino ad un nuovo contatto degli stessi ridefinendo le condizioni di simpatria. E' plausibile che nel corso degli anni di separazione geografica delle popolazioni la selezione naturale e la deriva genetica abbiano agito indipendentemente e quindi in direzioni differenti risultando nell'accumulo di divergenze genetiche tali da permettere l'isolamento riproduttivo e genetico. Ciò che si aggiunge però nel modello BDM rispetto ad altri modelli di speciazione proposti è il fatto che l'isolamento genetico non si attua con un meccanismo "on/off" per cui è presente oppure non lo è, ma le differenze genetiche si accumulano lentamente in molto tempo e coinvolgono diversi aspetti (loci) del genoma che sommati generano l'isolamento stesso. È quindi possibile che la condizione di simpatria si reinstauri precocemente, cioè quando le divergenze morfologiche, ecologiche e genetiche non sono tali da generare anche isolamento riproduttivo. Si potranno allora verificare fenomeni di ibridazione tra le due specie coinvolte e si potranno riconoscere quelle aree definite *hybrid zones* in genere in corrispondenza dei fronti di ricongiungimento degli areali. Sono proprio queste le aree di cui si parlava nel paragrafo precedente che forniscono ottima materia di studio dei fenomeni evolutivi.

In sostanza se le popolazioni erano conspecifiche prima della fase allopatrica e se vengono rispettati i vincoli di:

- selezione di tipo stabilizzante operante in entrambe le popolazioni
- assenza di deriva genetica

ci si potranno attendere, a seguito di una fase allopatica non troppo prolungata, due specie con scarse divergenze a livello morfologico e una differenziazione genetica tale da non precludere l'accoppiamento e la riproduzione. E' il caso di quelle specie definite "sorelle" per la loro forte somiglianza morfologica che permette in genere una distinzione solo sulla base di dati biometrici. Viceversa in presenza di deriva genetica o selezione direzionale in almeno una delle popolazioni ci possiamo attendere anche divergenze morfologiche significative.

Nell'immagine seguente (Fig. 2) sono riprodotte le tappe del processo:

- areale della specie originaria
- isolamento degli areali tramite barriera fisica
- differenziamento delle due specie in presenza di areali separati
- riespansione degli areali e generazione dell'area di ibridazione

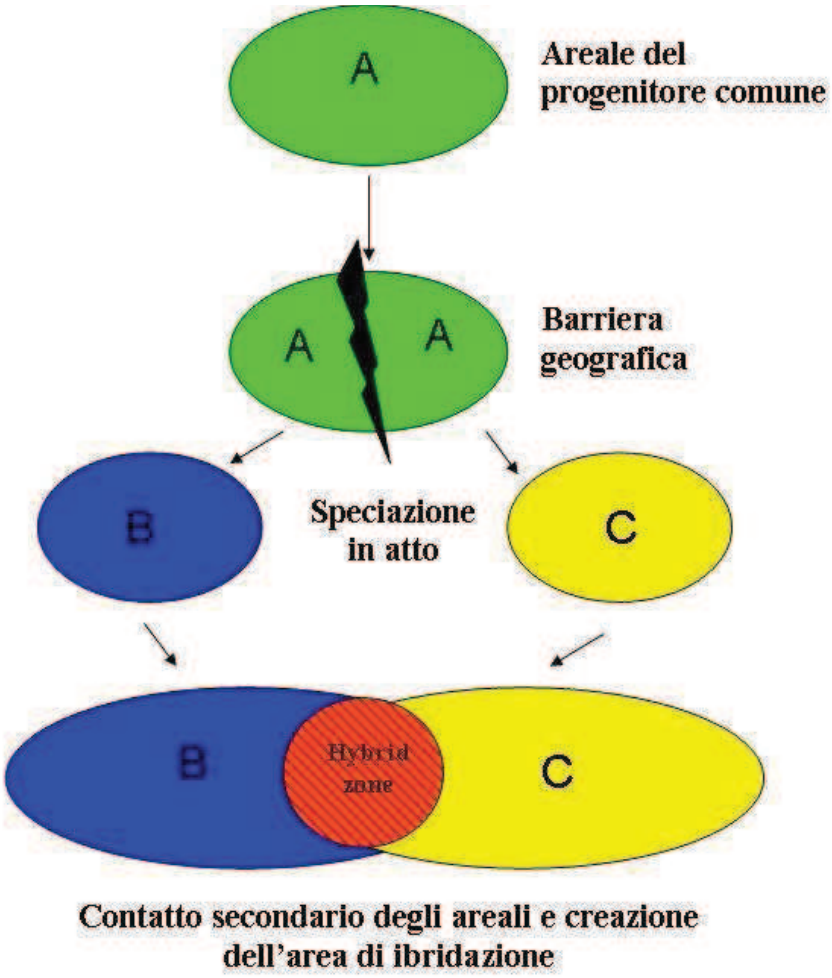


Fig. 2 – Rappresentazione del modello di speciazione BDM

E' a questo punto che la definizione di Concetto Genetico di Specie interviene a colmare i punti deboli del Concetto Biologico di Specie che è stato proprio degli studiosi di sistematica – in particolare dei mammiferi - per decenni. Il Concetto Genetico di Specie è stato ripreso in momenti diversi di tutto il secolo scorso, ma il lavoro di Baker e Bradley (2006) ne fornisce una visione complessiva nella sua applicazione allo studio dei processi di speciazione nei mammiferi e alla valutazione della loro biodiversità in termini conservazionistici. La seconda delle due definizioni di "specie" si serve della presenza/assenza di isolamento riproduttivo tra popolazioni e considera la specie come (Mayr, 1942) un gruppo di popolazioni naturali effettivamente o potenzialmente interfeconde e riproduttivamente isolata da altre popolazioni. La "popolazione" è quindi l'unità minima strutturale della specie e "l'isolamento riproduttivo" diventa lo strumento diagnostico. Quest'ultimo garantisce anche la conservazione del patrimonio genetico proprio della specie. Nel primo caso invece la specie viene definita sulla base della presenza/assenza di flusso genico tra differenti popolazioni e quindi l'isolamento è genetico piuttosto che riproduttivo. Per citare la definizione di Baker e Bradley (2006) la specie è definita secondo il Concetto Genetico come "a group of genetically compatible interbreeding natural populations that is genetically isolated from other such groups" (trad: un gruppo di popolazioni naturali geneticamente compatibili e interfeconde e geneticamente isolate da altri gruppi analoghi). Per alcune situazioni riscontrabili in natura le due definizioni sono interscambiabili e volendo indagare la presenza di specie distinte o popolazioni conspecifiche entrambi i metodi seguiti conducono alla stesso risultato. Per esempio se c'è isolamento genetico e riproduttivo sia secondo il Concetto Biologico che il Concetto Genetico si riconoscono due specie e viceversa una sola specie se non si riscontra né isolamento genetico, né riproduttivo. Nel caso però sia presente solo isolamento genetico e non riproduttivo allora solo il Concetto Genetico di Specie riconosce due taxa distinti, ma ciò non è vero per il Concetto Biologico. Tali situazioni si presentano nei casi di ibridazione (e quindi in assenza di isolamento riproduttivo) tra specie differenti nel momento in cui vengano preservati i pool genici delle specie coinvolte (isolamento genetico) attraverso meccanismi quali nulla o bassa sterilità della prole ibrida o costituzione di *hybrid zones* (citate già in precedenza) limitate nello spazio, che consentano al loro esterno un'evoluzione indipendente dei genomi riscontrabile attraverso dati derivati da analisi genetiche di marker nucleari e mitocondriali. Riconoscere il mantenimento di pool genici distinti richiede anche di quantificare da quanto tempo gli areali delle due specie siano rientrati in contatto, perché un basso tasso di ibridazione e scambio genico potrebbe essere dovuto non all'isolamento genetico, ma a un tempo non sufficiente per permettere la commistione dei pool genici.

Il Concetto Genetico di Specie ha un valore pratico rilevante in quanto, a differenza del Concetto Biologico di Specie, è applicabile non solo a organismi a riproduzione sessuata (dei quali si possa verificare l'interfecondità), ma anche a tutti quegli organismi a riproduzione agamica (partenogenesi, scissione, gemmazione ecc.), in quanto anche in questi casi è possibile verificare l'integrità dei pool genici. Inoltre tale definizione di specie assume rilevanza in ambito conservazionistico poiché permette di definire pool genici isolati che contribuiscono all'incremento della biodiversità e potrebbero meritare attenzione e protezione. In sostanza, viene riconosciuto un numero di specie molto maggiore. E' stata proprio la possibilità di valutare la biodiversità a livello molecolare che ha permesso negli ultimi anni di scindere in più specie quelle che in precedenza erano considerate come una unica. Solo per citare alcuni casi tra i Chirotteri europei, si fa riferimento al genere *Plecotus* in Europa per il quale grazie ai marcatori molecolari sono state identificate recentemente nuove specie morfologicamente molto simili a quelle già note, in particolare *Plecotus macrobullaris* e *P. kolombatovici* (Kiefer e Veiht, 2001) e l'unico endemismo della chirotterofauna italiana, *P. sardus* (Mucedda et. al, 2002). Oppure il genere *Pipistrellus* all'interno del quale sono sempre stati riconosciuti due ecotipi di *Pipistrellus pipistrellus*, caratterizzati da segnali di ecolocalizzazione con picchi di frequenza su valori differenti, ma riconosciuti oggi come specie sorelle dalla separazione di *Pipisrellus pygmaeus*, discriminata sulla base di dati molecolari (Hulva et al., 2004).
Un'ulteriore estensione dell'applicabilità del Concetto Genetico di Specie deriva dalla necessità di valutare la posizione sistematica di specie allopatriche per le quali secondo la definizione biologica si deve fare riferimento alla "potenziale interfecondità", impresa ovviamente non semplice. La genetica ci permette invece in questo caso di giustificare la presenza di pool genici distinti e quindi l'esistenza di due entità distinte.

Riconoscendo la presenza di zone di ibridazione si completa il quadro presentato dal modello BDM di speciazione poiché questa situazione viene infatti associata ad una non completa divergenza genica che permette la riproduzione tra individui appartenenti a due specie diverse che vengono considerate tali in virtù di meccanismi di conservazione dei pool genici originali. Le divergenze a livello genetico devono avere il tempo di accumularsi nelle due popolazioni durante la fase di allopatria per poter andare ad intervenire su quegli aspetti del genoma che garantiscono l'isolamento riproduttivo; ma fino a quando non sono coinvolti loci che influiscono su aspetti fisiologici, morfologici o ecologici che impediscano l'atto riproduttivo o non entrano in gioco meccanismi di annullamento delle speranze di vita o di fitness negli ibridi, allora può mancare isolamento riproduttivo in presenza di isolamento genetico. E' a

questo punto compito dei biologi molecolari definire l'esistenza di due pool genici o considerare le due entità come una unica.

Il mantenimento delle *hybrid zones*, e quindi la mancata mescolanza ed espansione dei genotipi ibridi nello spazio geografico, può seguire due modelli distinti:

- modello della **zona di tensione** (Barton e Hewitt, 1985) che prevede la presenza di un equilibrio tra la tendenza all'espansione geografica degli ibridi e la selezione contro gli stessi. In questo caso si nota una sorta di cline della distribuzione degli ibridi che vanno a diminuire dalla zona di ibridazione verso l'esterno
- modello della **superiorità degli ibridi** (Moore, 1977) la cui distribuzione è quindi limitata alle aree che presentano caratteristiche ambientali per le quali gli individui ibridi abbiano un vantaggio adattativo rispetto agli individui appartenenti a specie parentali. In questo caso le zone di ibridazione presentano una caratteristica distribuzione a *patches*.

Dai paragrafi precedenti, e in particolare dal confronto tra Concetto Genetico di Specie e Concetto Biologico di Specie, si percepisce come la conservazione della natura, che ha tra i suoi obiettivi quello di proteggere la biodiversità dovrebbe individuare e agire su quelli che sono tutti gli aspetti della biodiversità. A fini pratici non è quindi fondamentale riconoscere se due entità con caratteristiche genetiche differenti si possano classificare come specie o sottospecie, ma se le differenze in atto siano tali da giustificare l'attenzione da parte di chi si occupa di conservazione. Naturalmente, non si possono considerare solo le divergenze genetiche. La diversità può essere genetica o molecolare, ma anche morfologica od ecologica e tutti questi aspetti devono essere considerati come distinte componenti della biodiversità (Convenzione sulla diversità biologica, Rio de Janeiro 1992).

1.3 LE SPECIE

1.3.1 Sistematica e morfologia

Myotis myotis e *Myotis blyhtii* sono considerate specie sorelle e condividono il seguente inquadramento sistematico:

Classe	Mammalia
Ordine	Chiroptera
Sottordine	Microchiroptera

Famiglia	Vespertilionidae		
Genere	*Myotis*		
Sottogenere	*Myotis*		
Specie	*Myotis myotis*	**Nome comune**	Vespertilio maggiore
Specie	*Myotis blythii*	**Nome comune**	Vespertilio minore

Esse costituiscono poi, insieme a *Myotis punicus,* il gruppo dei "grossi *Myotis*" non riconosciuto dal punto di vista sistematico.

Morfologicamente l'aspetto esterno delle due specie è molto simile ed esse si differenziano quasi esclusivamente per le dimensioni, minori in *M. blythii.* Nel dettaglio le misure biometriche sono:

	Myotis myotis	***Myotis blythii***
Avambraccio (**AV**) mm	55-66.9	50.5 – 62.1
V Dito (**D5**) mm	67 – 84	63 – 81
Lunghezza Orecchio (**LOr**) mm	> 24.5 (24.4 – 27.8)	< 24.5 (21.0 – 24.3)
Canino- III°molare (**C-M^3**) mm	> 9.4 (9.2 – 10.6)	< 9.4 (8.1 – 9.4)
Apertura alare (**AA**) mm	350-450	350-408
PESO gr	28-40,7	15-28,5

Tab. 1 – Misure biometriche delle specie *Myotis myotis* e *Myotis blythii* (Dietz e von Helversen, 2004).

Inoltre, almeno in Europa occidentale, la maggior parte degli individui appartenenti alla specie *M. blythii*, presentano uno spot bianco sul capo, mai riscontrato nella specie sorella (Fig. 3). Solo circa il 5% dei *M. blythii* dell'Europa orientale (ad. esempio Bulgaria e Turchia) condividono questa caratteristica (Dietz e von Helversen, 2004).

La distinzione può però avvenire solo mettendo in relazione le misure di AV e LOr utilizzando la seguente funzione discriminante (Arlettaz et al., 1991):

$$Z = (0{,}1084058 \times AV) + (1{,}416606 \times LOr) - 40{,}59077$$

Se Z > 0	*Myotis myotis*
Se Z > 0	*Myotis blythiii*

Fig. 3 – Esemplare di *Myotis blythii* (sinistra) catturato nella colonia di Vezzano (TN) nel luglio 2007 e esemplare di *Myotis myotis* (destra) catturaro in Valle Stura (CN) nel luglio 2007

Secondo Dietz e von Helversen (2004) un altro parametro discriminante è la distanza tra il canino e il III molare (CM^3) sulla mascella, minore di 9,4 mm in *M. blythii.*
Non è però raro ritrovare in natura esemplari di cui risulta incerta l'identificazione a causa di qualche incongruenza tra i parametri considerati.

Le due specie sembrano essere suddivise nel loro intero areale in numerose sottospecie poche delle quali sono pienamente accettate dal mondo scientifico e sulle quali insistono studi per meglio comprendere la classificazione sistematica delle singole varietà. Delle diverse sottospecie si parlerà ampiamente nel paragrafo successivo.
Lanza e Finotello (1985) riferendosi alle specie nel loro intero presunto areale, considerano *M. myotis* una specie prevalentemente europea a corologia medioeuropea-nordmediterranea e *M. blythii* una specie eurasiatica a corologia mediterraneo-centroasiatica.

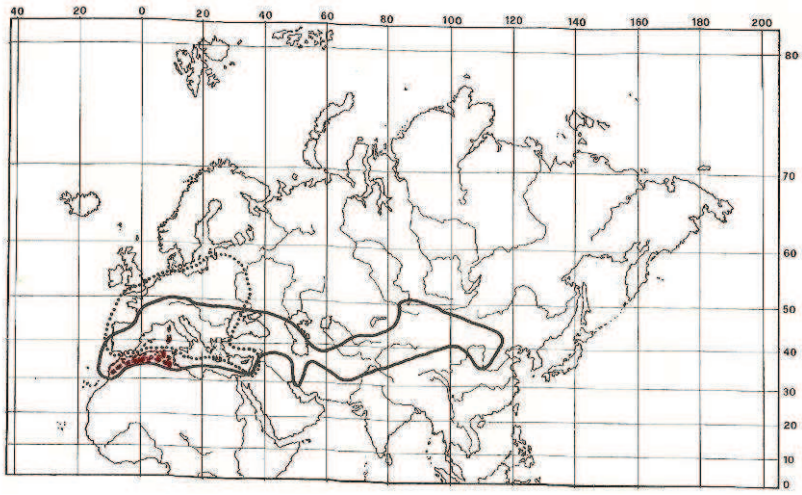


Fig. 4 - Areale presunto delle specie *Myotis myotis* (linea tratteggiata) e *Myotis blythii* (linea continua).
Tratto da Lanza e Finotello (1985)

Nella Fig. 4 le parti in rosso corrispondono all'areale di *Myotis punicus* solo recentemente identificata come specie a sè.

Dalla carta della presenza delle due specie in Europa in Fig. 9 si può notare come *M. myotis* occupi anche le regioni a maggior latitudine di quanto non faccia *M. blyhtii.* Il seguente

prospetto fornisce un quadro della presenza delle specie negli stati firmatari del *Bat Agreement* o di quelli che forniscono comunque relazioni periodiche. I dati sono stati tratti dai "National Reports" di Eurobat (www.eurobats.org).

Stato	**Firmatario**	***Myotis myotis***	***Myotis blythii***	**Anno aggiornamento**
Albania	si	X	X	2006
Armenia	no		X	2006
Azerbaijan	no		X	2007
Belgio	si	X		2006
Bielorussia	no	X		2006
Bosnia	no	X	X	2006
Bulgaria	si	X	X	2003
Croazia	si	X	X	2006
Danimarca	Si			2006
Estonia	si			2007
Finlandia	Si			2006
France	si	X	X	2006
Georgia	si	X	X	2006
Germania	si	X		2006
Irlanda	si	X		2007
Italia	si	X	X	2006
Lituania	si			2007
Lussemburgo	si	X		2006
Macedonia	si	X	X	2006
Moldavia	si	X	X	2006
Norvegia	si			2006
Paesi bassi	si	X		2006
Polonia	si	X		2007
Portogallo	si	X	X	2006
Regno Unito	si	X*		2006
Repubblica ceca	si	X	X	2006
Romania	si	X	X	2006
Russia	no		X**	2006
Serbia e Montenegro	no	X	X	2007
Slovacchia	si	X	X	2006
Slovenia	si	X	X	2006
Svezia	si	X***		2006
Ucraina	si	X	X	2006
Ungheria	si	X	X	2006

Tab. 2 – Elenco degli stati europei e relativa presenza delle specie secondo i rapporti forniti dagli stati ad Eurobat. (*=solo estremo sud; **=solo Russia caucasica;***=solo dati antecedenti 1985). Si noti che probabilmente i dati dell'Azerbaijan e quelli russi fanno riferimento a esemplari di *Myotis blythii omari.*

Già Arlettaz et al.(1994) ponevano il limite di distribuzione di *M. blyhtii* al nord della Svizzera, incitando gli studiosi di Chirotteri a nuove indagini sulla costituzione delle colonie dell'Europa centrale, indagini che sembrano confermare l'areale già delineato dagli autori.

1.3.2 Ecologia

Come tutti i microchirotteri, anche *Myotis myotis* e *Myotis blyhii* sono animali strettamente notturni e la loro attività giornaliera prende avvio subito dopo il tramonto per raggiungere un picco nelle tre ore successive, calare e riprendere alcune ore prima dell'alba. Il ritmo di attività annuale prevede un periodo di svernamento nei mesi più freddi, variabile a seconda del clima locale. Indicativamente alle nostre latitudini, lo svernamento dura da novembre a marzo. In estate si costituiscono quelle che sono chiamate colonie riproduttive o *roost* costituite interamente da femmine adulte che partoriscono e allevano la prole simultaneamente. I roost sono composti da poche decine fino a migliaia di femmine; una delle colonie italiane più consistenti è stata individuata a Verrua Savoia ed è costituita da 1800-2000 animali (Toffoli, comm. pers).

Fig. 5- Particolare della nursery al Castello di Agliè (TO) in cui si notano individui adulti (marroni di maggiori dimensioni ai lati) e giovani (al centro grigi e di piccole dimensioni).
Foto: M. Del Pero

I maschi adulti invece si collocano in rifugi satelliti costituiti generalmente da poche decine di animali e gravitano attorno alle colonie in attesa del periodo degli accoppiamenti che avvengono a fine estate-inizio autunno (Zahn e Dippel, 1997). Le femmine sembrano essere estremamente filopatriche, per cui si riproducono nella stessa colonia in cui sono nate. Il flusso genico apportato da parte femminile è quindi molto ridotto al contrario di quanto avviene da parte maschile, in quanto i maschi non presentano questo atteggiamento di spiccata filopatria (Castella et al., 2001). In questo senso assumono particolare importanza in termini conservazionistici i siti di *swarming,* in genere rifugi quali ampie grotte o ambienti ipogei in cui si trovano contemporaneamente in periodo autunnale sia maschi che femmine e che tra le altre funzioni (ad esempio la trasmissione di informazioni circa idonei ambienti di

caccia o rifugio ai giovani della colonia), sembrano assolvere quella di luogo di accoppiamento. La loro importanza conservazionistica risiede nel fatto che, essendo riutilizzati negli anni, sono i luoghi dove si attua il flusso genetico mediato dai maschi (Parson et al, 2003).

Ogni femmina partorisce un piccolo all'anno, raramente due, e lo accudisce fino allo svezzamento e quando il giovane è ormai in grado di volare e alimentarsi autonomamente. I parti avvengono a fine giugno per *M. myotis* e circa due settiamane dopo per *M. blythii* (Arlettaz, 2001).

Fig. 6 – Femmina di *Myotis blyhtii* che accudisce eccezionalmente due giovani.
Foto: J.M. Bompar

Per i luoghi di rifugio estivi dove si trovano le grosse colonie o *nurseries* sono prediletti ambienti ampi con soffitti elevati, luoghi caldi senza correnti d'aria che spesso corrispondono ad ambienti ipogei (grotte e cavità, edifici) o sottotetti con le stesse caratteristiche. Tra le colonie oggetto di studio del presente lavoro, alla prima tipologia corrispondono le colonie di S. Vittoria d'Alba (CN) situata in una miniera abbandonata oppure Agliè (TO) dove gli animali hanno trovato ospitalità nei sotterranei del castello ducale. Le colonie trentine sono invece collocate nei sottotetti di due chiese di paese.

I rifugi utilizzati per lo svernamento sono invece luoghi a temperatura bassa e costante, senza correnti d'aria e elevata umidità necessaria a mantenere una adeguata idratazione del patagio. In genere luoghi con tali caratteristiche sono le grotte e le cavità ipogee dove gli animali si rifugiano nelle aree più profonde. Non sono però frequenti grandi aggregazioni e gli esemplari si trovano più spesso isolati.

Fig. 7 – Esemplare di *Myotis myotis/blythii* in ibernazione fotografato alla Grotta del Pugnetto (TO) nel febbraio 2007.

La maggior parte delle colonie note sono miste, composte cioè da femmine di entrambe le specie dove queste hanno areali sovrapposti. In Piemonte ad esempio, delle 5 colonie note, solo una – nel dettaglio Verrua Savoia (TO) dove sono sempre stati catturati solo esemplari di *M. blythii* (Toffoli com. pers) – sembra essere monospecifica mentre nelle altre sono state catturate entrambe le specie (De Bernardi e Patriarca, com. pers.; Toffoli, com.pers.).

Sembra esserci una buona distinzione per quanto riguarda l'ecologia trofica che è stata oggetto di studi approfonditi. Come la maggior parte dei Microchirotteri europei lo spettro trofico è interamente costituito da Insetti, ma c'è una spiccata differenziazione in termini di percentuale dei differenti taxa predati. Arlettaz et al. (1993), analizzando campioni di guano appartenenti ad entrambe le specie, hanno trovato che il taxon maggiormente rappresentato era quello dei Coleotteri Carabidi per *M. myotis* (paragonabile ai risultati di precenti lavori come confermato dagli autori stessi) e quello degli Ortotteri per *M. blythii.* Tali differenze vengono attribuite ai diversi ambienti di caccia utilizzati dalle due specie, in particolare zone boscate con radure per la prima e aree aperte con densa vegetazione erbacea per la seconda. Questa segregazione di nicchia trofica e di habitat permetterebbe la condizione di simpatria che, come abbiamo visto, è comune tra le specie in esame. In realtà uno studio del 1996 di Arlettaz mostra come la specializzazione non sia così ristretta e le specie si adattino a condividere lo stesso specchio trofico in condizioni di abbondanza delle prede. In particolare ciò avviene quando si verificano le invasioni di Coleotteri Scarabeidi del genere *Melolontha* che per fenologia degli stessi si presentano ogni 3-4 anni. Negli anni di assenza di questa risorsa, poiché le prede che costituiscono la maggior parte della dieta di *M. blyhtii* (i Tettigonidi) non sono disponibili a inizio della stagione riproduttiva, la specie è costretta a ripiegare su prede meno nutrienti e a ritardare i parti. A questo sarebbe dovuto lo sfasamento delle nascite tra *M. myotis* e *M. blyhtii*, che comunque non avviene negli anni di esplosione degli Scarabeidi del genere *Melolontha* (Arlettaz et al., 2001).

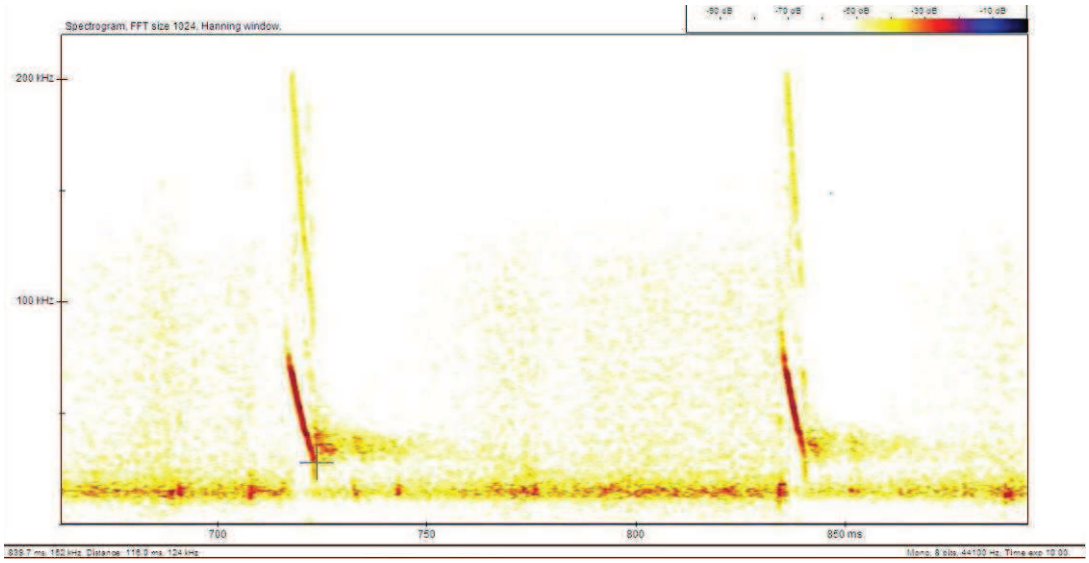
Entrambe le specie condividono una tecnica di caccia definita *gleaning* che prevede la cattura di prede posate su un substato. La preda viene catturata in genere con le ali o con gli arti posteriori poi "preparata" – ossia vengono scartati gli elementi non assimilabili ad esempio le elitre – e ingerita. Tutto il processo avviene mentre l'animale è in volo (Arlettaz, 1996).

I segnali di ecolocalizzazione – gli ultrasuoni emessi durante il volo per captare ostacoli e prede - sono indistinguibili tra le due specie. Recentemente Russo et al. (2007) hanno sperimentato in condizioni di cattività l'assenza del *feeding buzz* (la sequenza di segnali ravvicinati emessa appena prima della fase di cattura della preda) in *M. blyhii*, attribuendola al fatto che, a differenza della specie sorella, questa si nutre spesso di prede in grado di rilevare gli ultrasuoni (Tettigonidi) e quindi di evitare l'attacco. Entrambe le specie utilizzano però per

cacciare un tecnica di ascolto passivo dei suoni emessi dalla preda coadiuvata, a differenza di ciò che si pensava precedentemente, da quella che gli autori definiscono *whispering echolocation mode* cioè segnali di ecolocalizzazione a intensità ridotta, ma che permettono comunque all'animale di orientarsi e percepire eventuali repentini spostamenti della preda.

I segnali di ecolocalizzazione sono al momento indistinguibili tra le due specie e si determinano come appartenenti a un esemplare di "grosso *Myotis*". Si tratta di segnali in FM (frequenza modulata) tipici di tutto il genere *Myotis*.

In Fig. 8 si riporta nel sonogramma superiore una sequenza di segnali registrata nei pressi della colonia di Verrua Savoia (TO) nel giugno 2007, appartenente presumibilmente a un esemplare di *M. blythii* e a nel sonogramma inferiore una registrazione di un presunto *M. myotis* captata presso la colonia di Santa Vittoria d'Alba (CN) nel settembre 2004.



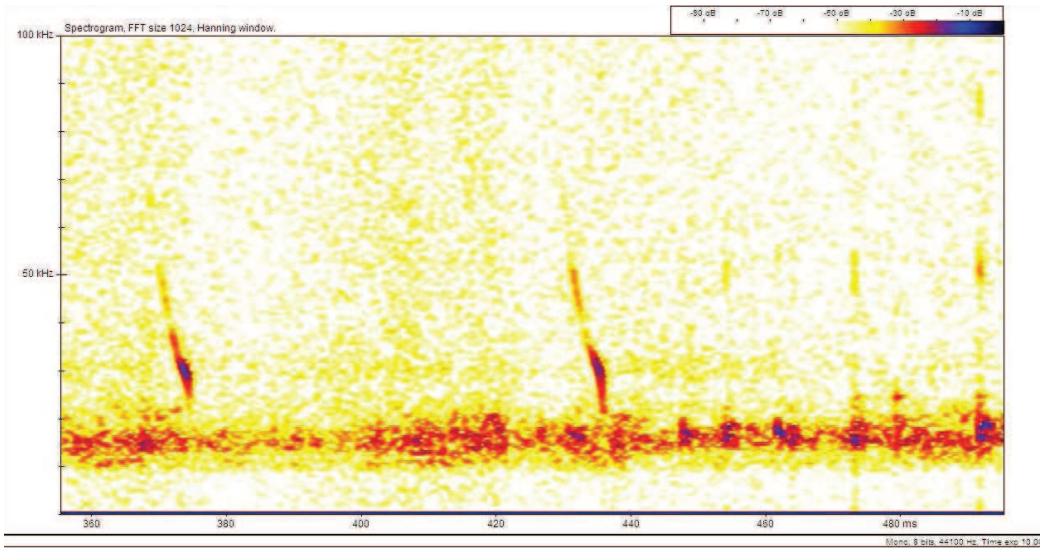


Fig. 8 – Sonogrammi delle specie *Myotis blythii* (in alto) e *Myotis myotis* (in basso) (registrazioni di R. Toffoli)

In Tab. 3 si riportano i parametri dei segnali della figura precedente, che permettono di capire come il primo sia di un animale nei pressi di un ostacolo e il secondo in uno spazio più aperto. I valori ottenuti sono infatti confrontabili con quelli specificati da Barataud (non pubblicato).

	Myotis blythii	*Myotis myotis*
Freq. Iniziale (kHz)	90	52,2
Freq. Finale (kHz)	21	23,9
Banda (kHz)	69	31,2
Durata (ms)	9,3	5,8
Distanza tra i segnali (ms)	110,9	55

Tab. 3 - Parametri dei segnali di ecolocalizzizone della figura precedente

1.3.3 La conservazione dei Chirotteri in Europa

I Chirotteri costituiscono nel loro complesso un gruppo che ha ottenuto nella sua storia evolutiva un ampio successo essendo presenti su tutto il globo ad esclusione delle calotte polari (Simmons, 2005) con oltre 1000 specie. Solo i Roditori, all'interno della classe dei Mammiferi, contano un numero più alto di specie.

Nonostante il ruolo consistente che rivestono nella composizione della biodiversità globale, il loro status conservazionistico non è in molti casi favorevole. Tra le principali cause una è sicuramente legata a fattori culturali. Infatti, il "pipistrello" è spesso connesso al mondo di vampiri e diavoli e per questo motivo tali animali sono stati spesso perseguitati. Anche l'ignoranza gioca un ruolo importante: infatti spesso si pensa che i Chirotteri siano "topi con le ali" e proprio per questo si può assistere a esilaranti scene di panico collettivo alla presenza di un pipistrello in un locale chiuso. Ancora troppo frequentemente è necessario sfatare miti con frasi come "…i pipistrelli non si attaccano ai capelli…", "…solo tre specie su oltre 1000 presenti al mondo si nutrono di sangue, quasi mai umano…" e così via.

In realtà ci sono fattori che a livello globale minacciano queste specie con impatti molto più devastanti. Tra questi uno dei principali, soprattutto in Europa, è l'intervento antropico nella gestione degli habitat naturali e semi-naturali. Interventi troppo massicci di gestione forestale possono ridurre la biodiversità tra le prede dei Chirotteri (soprattutto Insetti) e di conseguenza tra i Chirotteri stessi, così come un troppo intenso sfruttamento agricolo (Entwistle et al., 2001). Altre trasformazioni degli habitat sono fortemente impattanti sulla chirotterofauna tra cui la frammentazione e ad essa affiancata la perdita di elementi lineari con funzione di corridoi ecologici (quali ad esempio siepi e filari di alberi). Se la frammentazione può essere

in alcuni casi fonte di aumento di biodiversità nelle aree ecotonali, per i Chirotteri bisogna fare molta attenzione al mantenimento di collegamenti tra i *patches.* Molte specie infatti tendono a spostarsi seguendo traiettorie lineari piuttosto che attraversare spazi aperti, probabilmente a scopo antipredatorio. Questo è stato riscontrato in alcune specie come *Pipistrellus pipistrellus* e *Eptesicus serotinus* (Verboom, Huitema, 1997), ma sembra sia una caratteristica più ampia (Limpens, 1989).

L'uso di fitofarmaci e prodotti chimici nella lavorazioni agricole può aver ampiamente contribuito al decremento demografico della chirotterofauna europea tramite il bioaccumulo dei prodotti tossici nelle prede e l'inquinamento delle acque. Per testare l'ipotesi Wickramasinghe et al. (2003) hanno effettuato un confronto tra aziende agricole tradizionali e non (*organic farm*, dove è vietato l'uso di prodotti chimici) in Inghilterra e Scozia, ottenendo come risultato un numero di specie ed una densità decisamente maggiore nelle seconde e sui relativi corsi d'acqua.

Rachwald et al. (2004) ipotizzano che la contaminazione dell'aria con solfuri e metalli pesanti possa diminuire lo sviluppo arboreo penalizzando soprattutto le specie forestali.

Una recente fonte di impatto diretto sono le strutture per la produzione di energia tramite lo sfruttamento dell'energia eolica, a discapito del valore dell'utilizzo di tale energia rinnovabile e non inquinante (Ahlèn et al., 2007).

Inoltre non si dimentichi che molto spesso è l'impatto diretto, volontario e involontario, generato dall'uomo che apporta grande disturbo alle popolazioni di Chirotteri. Ad esempio l'utilizzo di grotte e cavità soprattutto in periodo riproduttivo o di svernamento, oppure sport come l'arrampicata sportiva per le specie fessuricole. O ancora il rinnovo di locali come sottotetti o sotterranei che ospitano ingenti colonie delle quali non si tiene conto. O più semplicemente azioni di vandalismo; è di soli pochi anni fa il ritrovamento di centinaia di animali bruciati vivi in una colonia del cuneese dove ancora oggi gli animali superstiti presentano comportamenti assolutamente inusuali di terrore all'ingresso di persone per lo shock subito. Sempre per riferirsi all'area piemontese si segnala inoltre l'abbandono di due siti riproduttivi frequentati un tempo regolarmente, utilizzate soprattutto da *M. myotis* e *M. blythii* e che oggi sono state adibite a scopi turistici: si tratta della Grotta dei Dossi di Villanova Mondovì (CN) e della Grotta del Caudano di Frabosa Sottana (CN) (Sindaco et al., 2003).

I Chirotteri sono rappresentati in Europa da 45 specie, 35 delle quali presenti anche in Italia.

Tutti i Chirotteri europei sono inseriti in Allegato IV- Specie animali e vegetali di interesse comunitario che richiedono una protezione rigorosa- della Direttiva 92/43/CEE ("Habitat") e

di queste 13, tra cui *M. myotis* e *M. blythii*, sono anche inseriti in Allegato II - Specie animali e vegetali d'interesse comunitario la cui conservazione richiede la designazione di zone speciali di conservazione.

Inoltre il *Bat Agreement* ("Accordo sulla conservazione delle popolazioni di Chirotteri europei". Bristol, 2000), nato come emanazione della Convenzione di Bonn per la protezione delle specie migratrici (Bonn, 23 giugno 1979), si occupa di coordinare e promuovere la conservazione delle specie europee di Chirotteri tramite azioni comuni tra gli stati firmatari e costituisce il più attivo strumento in questo senso.

Si ricorda ancora la Direttiva 2004/35/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 Aprile 2004 sulla responsabilità ambientale in materia di prevenzione e riparazione del danno ambientale, nella quale i Chirotteri rientrano come componente naturale.

A livello nazionale essi sono protetti dalla L. 11/02/97, n° 157 "Norme per la protezione della fauna selvatica omeoterma e per il prelievo venatorio" che decreta il divieto di abbattimento, cattura, detenzione e commercio facendo riferimento non direttamente alle specie di Chirotteri, ma intendendole incluse nella fauna selvatica oggetto di protezione o facendo riferimento a normative internazionali.

Tutte le specie di Chirotteri si trovano inoltre elencate nella IUCN Red List, segnalate con diversi livelli di minaccia. *M. myotis* e *M, blythii* sono considerate come segue:

	IUCN (The World Conservation Union)	**EMA** (European Mammal Assessment)	**GIRC** (Gruppo Italiano Ricerca Chirotteri)
Myotis myotis	Lower Risk/Near Treatened (LR/nt)	Least Concern (LC)	Vulnerable (VU)
Myotis blythii	Lower Risk/Least Concern (LR/lc)	Near Treatened (NT)	Vulnerable (VU)

Tab. 4– Classificazione secondo i criteri IUCN delle specie in esame a differenti scale. Scala mondiale(IUCN), scala europea (EMA=European Mammal Assessment) e nazionale (GIRC=Gruppo Italiano ricerca Chirotteri)

Si noti in Tab. 4 come sono differenti le valutazioni a diversa scala di indagine. A livello mondiale entrambe le specie sono considerate a basso rischio (LR), ma solo *M. myotis* prossimo alla minaccia. Si inverte la classificazione a scala europea (anche giustificato dal fatto che la valutazione IUCN non è aggiornata) e le motivazioni sono legate ad una stabilità e consistenza delle popolazioni attuali di *M. myotis* e al decremento di molte popolazioni europee per *M. blythii*. A livello nazionale italiano lo status di Vulnerabile (VU) è motivato

nuovamente dal consistente decremento delle popolazioni, a cui si aggiungono fattori come il disturbo diretto delle colonie che spesso è stato causa di scomparsa delle stesse, la perdita di habitat idoneo alle specie e la riduzione della disponibilità di prede in seguito all'utilizzo massiccio di fitofarmaci.

Da quanto detto scaturisce l'importanza di programmi di conservazione e degli studi finalizzati a tale scopo. Prima di tutto indagini sulla distribuzione delle specie, tramite ricerca di rifugi e colonie, catture e monitoraggi bioacustici; poi indagini sull'utilizzo di habitat per attuarne una opportuna gestione; inoltre studi di dinamica di popolazione tramite metodi di cattura-marcatura-ricattura o analisi genetiche. Tutto questo permette di elaborare un chiaro quadro sullo stato di conservazione delle specie per attuare le strategie necessarie al raggiungimento o mantenimento di uno status favorevole, ma attualmente in molti casi mancano ancora troppi tasselli.

1.4 LA SISTEMATICA DEI "GROSSI *Myotis*"

Con la dicitura "grossi *Myotis*" si intende un complesso di tre specie di Vespertilionidi (*Myotis myotis*, *Myotis blythii* e *Myotis punicus*) appartenenti al genere *Myotis* e all'omonimo sottogenere. I sottogeneri sono stati descritti da Findley (1972) sulla base di caratteristiche morfologiche esterne e del cranio. Il sottogenere *Myotis* comprende specie di dimensioni relativamente grandi, con grosse orecchie, ali larghe e dentatura più complessa rispetto agli altri appartenenti al genere. Dal punto di vista ecologico e di strategie di foraggiamento le specie del sottogenere *Myotis* sono dette *gleaners* ossia sono in grado di prelevare e cibarsi di prede posate su un substrato. I "grossi *Myotis*" sono identificabili dalle dimensioni dell'avambraccio che supera i 50 mm (Dietz e von Helversen, 2004).
La sistematica dell'intero genere è estremamente complessa, ma l'avanzamento delle tecnologie nel campo delle analisi genetiche permette un dettaglio sempre maggiore. Uno degli ultimi lavori filogenetici sul genere *Myotis* (Ruedi e Mayer, 2001) ha chiarito, sulla base dell'analisi di sequenze dei loci *cytb* e *nd1* del genoma mitocondriale, come i sottogeneri siano cladi parafiletici e le specie vi rientrino per una somiglianza morfologica ed ecologica dovuta a fenomeni di convergenza evolutiva piuttosto che strette relazioni di parentela. Una divergenza genetica del 5% nei loci analizzati è stata considerata sufficiente dagli autori per la distinzione in specie.
Attualmente per le due specie in esame in questo lavoro (*M. myotis* e *M. blythii*) sono riconosciute le seguenti sottospecie:

Myotis myotis	Località classica
alpinus Koch, 1863	Uri (Svizzera)
latipennis Crespon, 1844	Gard (Francia)
macrocephalicus Harrison *et* Lewis, 1961	2 km E di Amchite (Libano)
myotis Borkhausen, 1797	Turingia (Germania)
omari Thomas, 1906	50 miglia a W di Isfahan (Iran)
punicus Felten, 1977	Capo Bon (Tunisia)
risorius Cheesman, 1921	Shiraz (Iran)
spelaeus Bielz, 1886; *submurinus* Brehm, 1827	Turingia (Germania)
typus Koch, 1863	Nassau (Germania)

Myotis blythii	Località classica
africanus Dobson, 1875	Kashmir (India)
ancilla Thomas, 1910	Cina N
blythii Tomes, 1857	(India NW)
dobsoni Trouessart, 1878	(Himalaya NW)
lesviacus Iliopoulou-Georgudaki, 1984	Isola di Lesbo (Anatolia)
oxygnathus Monticelli, 1885	Basilicata (Italia)

Tab. 5 – Le sottospecie di *Myotis myotis* e *Myotis blythii* (fonte: Ministero dell'Ambiente del Territorio e del Mare)

Di queste però, quelle di cui si hanno maggiori dati, informazioni genetiche e di distribuzione sono *blythii*, *oxygnathus* tra le sottospecie di *M. blythii* e *macrocephallicus*, *myotis*, *omari* tra le sottospecie di *M. myotis*. E' da notare come la sottospecie *omari* non abbia ancora una posizione sistematica definita essendo stata inizialmente riconosciuta come sottospecie di *M. myotis* da Thomas (1905) sulla base delle dimensioni del cranio paragonabili, mentre Harrison e Lewis (1961), sulla base della morfologia complessiva del cranio, e successivamente Strelkov (1972) ne propongono l'appartenenza alla specie *M. blythii* suggerendo un incremento delle dimensioni della specie stessa da ovest verso est.

La distribuzione delle sottospecie è ritenuta essere la seguente (secondo Horáček et al., 2001):

Myotis myotis myotis – Europa e Turchia

Myotis myotis macrocephalicus – Libano e Siria

Myotis blythii oxygnathus – Europa

Myotis blythii omari – W Asia

Myotis blythii blythii – regione himalayana

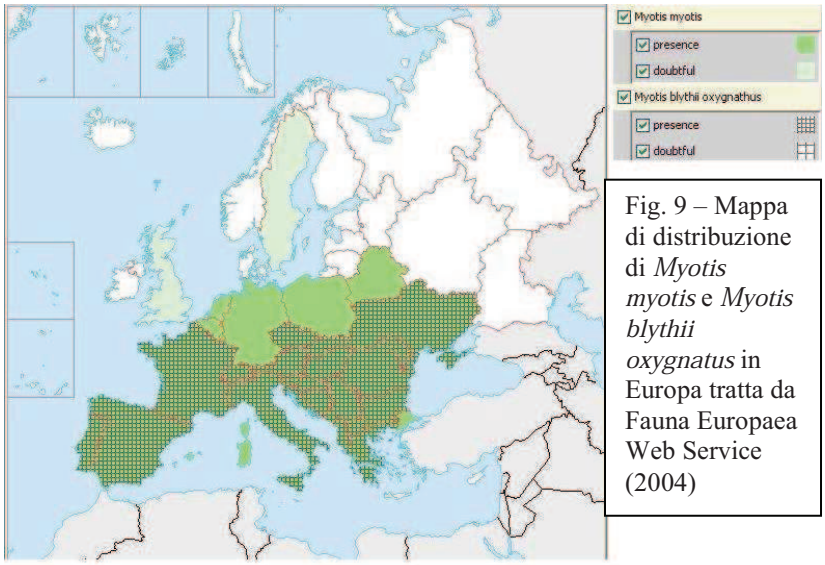


Fig. 9 – Mappa di distribuzione di *Myotis myotis* e *Myotis blythii oxygnatus* in Europa tratta da Fauna Europaea Web Service (2004)

In particolare in Europa si riscontra quindi la presenza di *Myotis myotis* sottosp. *myotis* e di *Myotis blythii* sottosp. *oxygnathus* che si trovano in condizioni di simpatria in molte aree (vedere la mappa di distribuzione in Fig. 9).

Attualmente è ormai accettata dalla comunità scientifica la separazione della specie *Myotis punicus* (proposta per la prima volta da Castella et al., 2000), il cui areale comprende il Nord Africa (Tunisia, Marocco, Libia, Algeria) e alcune isole Mediterranee (Sardegna, Corsica, Malta). Ancora incerta sarebbe invece la posizione sistematica della sottospecie *Myotis blythii oxygnathus* per la quale i dati di Ruedi e Mayer (2001) giustificherebbero l'elevazione a specie. Tale distinzione non è però ancora stata del tutto accettata e gli enti che si occupano di conservazione a livello europeo o mondiale prendono posizioni differenti: *Eurobat* per esempio (l'ente di gestione dell'Accordo per la conservazione delle popolazioni di pipistrelli in Europa nato nel 1994 come emanazione della Convenzione di Bonn) considera la specie *Myotis oxygnathus* sulla base della classificazione di Simmons (2005), ma continua a riferirsi alle popolazioni europee con il nome di *Myotis blythii* (fonte: THE AGREEMENT ON THE CONSERVATION OF POPULATIONS OF EUROPEAN BATS -Record of the 5th Session of the Meeting of Parties jubljana, Slovenia, 4 – 6 September 2006), mentre IUCN (The World Conservation Union) e in particolare EMA (European Mammal Assessment) non considerano affatto la distinzione. Per le rimanenti sottospecie, invece, non sembrano essere attualmente presenti lavori che propongano un più aggiornato e dettagliato inquadramento tassonomico.

Analizzando i lavori di sistematica che si basano su analisi genetiche si possono fare le seguenti osservazioni:

- Ruedi e Mayer (2001) sequenziando i geni *cytb* e *nd1* sul DNA mitocondriale riconoscono che gli individui di *M. b. blythii* e *M. b. oxignathus* sono ben discriminati a livello sottospecifico, ma la percentuale di divergenza genetica (2,5%) riscontrabile tra gli

esemplari di *M. myotis* e i *M. blythii* provenienti entrambi dall'Europa non è paragonabile alla divergenza genetica in altre coppie di specie così strettamente imparentate (in media circa 15%). Inoltre la ricostruzione dell'albero filogenetico (Fig. 10) riconosce *M. blythii* come taxa parafiletico dal momento che *M. myotis* e *M. b. oxygnathus* costituirebbero un clade monofiletico.

Fig. 10 –Ricostruzione dell'albero filogenetico del genere *Myotis* in (Ruedi e Mayer, 2001)

- Un pattern identico si riscontra anche in Bickham et al. (2004) che hanno utilizzato per la ricostruzione dell'albero filogenetico le sequenze di *cytb* del lavoro precedente aggiungendo dati provenienti da individui di specie sud-africane, sud-asiatiche e australiane.
- Stadelmann et al. (2007) riscontrano una divergenza genetica minore del 2.5% tra *M. myotis* e *M. blythii* sequenziando il gene *nd1* e il gene che codifica per l'rRNA 16S del DNA mitocondriale.
- In Mayer e von Helversen (2001) dove è stato sequenziato il gene *nd1* di individui europei di entrambe le specie, la ricostruzione dell'albero filogenetico genera un clade monofiletico solo considerando tutti gli aplotipi di *M. myotis* e *M. blythii* insieme, mentre *M. myotis* costituirebbe un gruppo parafiletico che comprende anche individui di *M. blythii* (Fig.

11). La diversità interspecifica tra queste varia tra 0.25 e 2.6% rispetto ad un minimo del 5.7% tra altre coppie di specie.

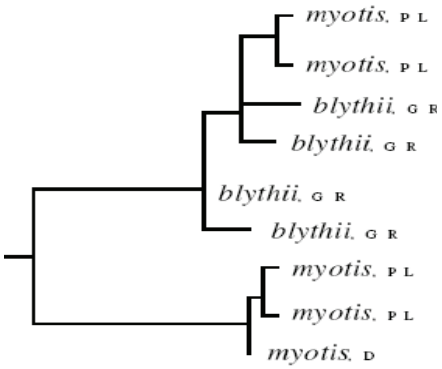


Fig. 11 - Ricostruzione dell'albero filogenetico tra aplotipi di *Myotis myotis* e *Myotis blythii* provenienti da Polonia (PL), Grecia (GR) e Germania (D). Immagine tratta da Mayer e von Helversen (2001)

Gli autori suggeriscono che la bassa percentuale di divergenza (e la totale assenza di divergenza nel gene del *cytb* secondo Castella et al., 2000) si possa attribuire ad una separazione recente delle specie facendola risalire alle glaciazioni plioceniche, escludendo la presenza di flusso genico come già dichiarato da Ruedi et al. (1990) e Arlettaz et al. (2001) sulla base di dati morfologici, ecologici e biochimici.

1.5 APPROCCIO MOLECOLARE NELLA DETERMINAZIONE DI INTROGRESSIONE GENETICA TRA DUE SPECIE

Fino agli anni '60 l'unico approccio disponibile per la determinazione della presenza di ibridazione tra specie era quello morfologico, supponendo che l'ibridazione generasse individui con caratteristiche morfologiche intermedie tra quelle delle due specie pure. In realtà non è quello che avviene sempre in natura e spesso gli ibridi assumono aspetti del tutto indistinguibili dalle specie da cui hanno avuto origine (Leary et al., 1996). L'elettroforesi delle proteine e lo sviluppo di tecniche di PCR hanno in seguito permesso analisi sempre più sofisticate. In questo modo è possibile discriminare se un individuo è un ibrido di prima generazione (F1), un backcross (o reincrocio di un F1 con una specie parentale) o un ibrido di generazioni successive grazie all'analisi contemporanea di molti loci nucleari e mitocondriali.
In realtà anche utilizzando un elevato numero di loci non è sempre possibile discriminare tra F1 e specie parentali ed è inoltre quasi impossibile riconoscere generazioni di ibridazione posteriori a F2 e reincroci (Boecklen e Howard,1997).
Ciò che permette di individuare l'ibridazione in una popolazione non è la semplice misura delle frequenze alleliche, quanto piuttosto la frequenza dei genotipi. Se in una popolazione si trovano genotipi costituiti da alleli propri di una specie e altri propri di un'altra questo è conseguenza di un fenomeno di ibridazione. Il grado di mescolamento dei genomi (ossia

quale proporzione del genoma di un individuo può essere considerato originario di una specie e quale proporzione dell'altra specie) è indicativo della diffusione dell'ibridazione. Un'introgressione limitata (intesa come grado di "inquinamento" dei pool genici), ma diffusa tra gli individui è segno di ibridazione prolungata nel tempo (Allendorf, 2001).

Molto spesso può essere difficile identificare in una popolazione ibrida la prima generazione di ibridi. Se tra le due specie è in atto (o terminato) un processo speciativo si saranno sviluppati meccanismi di isolamento riproduttivo che diminuiranno le probabilità di un incrocio tra esse; ma una volta che questo avviene la prole erediterà un corredo genetico in cui saranno sommate le due componenti nella scelta del partner riproduttivo. In sostanza, la prole ibrida avrà alte probabilità, se vitale e fertile, di scegliere e di accoppiarsi con un partner appartenente a ciascuna delle specie parentali (Mallet et al., 1998).

Due indicatori di ibridazione possono essere le deviazioni dall'Equilibrio di Hardy-Weinberg e dal Linkage Equilibrium (Mallet, 2005 online appendix 2). Nelle popolazioni naturali a riproduzione sessuata e accoppiamenti casuali i genotipi multilocus tendono a raggiungere l'Equilibrio di Hardy-Weinberg e di Linkage. Utilizzando informazioni genotipiche multilocus (derivanti da allozimi, microsatelliti, AFLP, SNP) è possibile separare il campione contenente ibridi in sottogruppi (corrispondenti alle specie geneticamente pure) in cui i disequilibri siano minimizzati. L'approccio disponibile consiste in simulazioni tramite catene di Markov (MCMC – Monte Carlo Markov Chain) che restituiscono la massima probabilità di verosimiglianza, sulla base di metodi statistici bayesiani, per i dati a disposizione (Pritchard et al., 2000; Anderson e Thompson, 2002). Le potenzialità di questi approcci non sono state ancora del tutto sviluppate e richiedono di essere adattate alla realtà delle popolazioni naturali in cui la teoria non sempre può essere applicata "alla lettera" (Mallet, 2005).

1.5.1 I loci microsatellitari

Con il termine "microsatelliti" ci si riferisce a sequenze di mono-, di-, tri-, tetranucleotidi ripetute *n* volte in tandem e ampiamente diffuse nel genoma di tutti gli eucarioti. Si tratta di DNA non codificante classificato come "ripetitivo" insieme a minisatelliti e satelliti (le cui unità di ripetizione sono costituite da un numero maggiore di nucleotidi) e le sequenze ripetute nel genoma non in tandem (LINE e SINE). Essi sono meglio definiti come Short Tandem Repeats (STRs) o Simple Sequenze Repeats (SSRs da Tautz, 1989). Il 3% del genoma umano sembra essere composto da queste sequenze e in generale, almeno nel regno animale la quantità di sequenze microsatellitari sembra crescere con la dimensione in lunghezza del genoma (Katti et al., 2001).

Il polimorfismo non consiste tanto in variazioni della sequenza primaria, quanto nel numero di ripetizioni. Le mutazioni, intese quindi come numero differente di ripetizioni sullo stesso locus, sono dovute ad errori durante la duplicazione del DNA. In particolare un aumento del numero di ripetizioni avviene attraverso la formazione di loop sul nuovo filamento in crescita causate dal distacco di alcune ripetizioni dallo stampo e il successivo riappaiamento in sfasatura. Allo stesso modo una diminuzione delle ripetizioni si verifica se il loop si forma sul filamento stampo come da schema in Fig. 12 . Tale meccanismo di mutazione è noto con il nome di *replication slippage* favorito dalla ripetitività delle sequenze coinvolte.

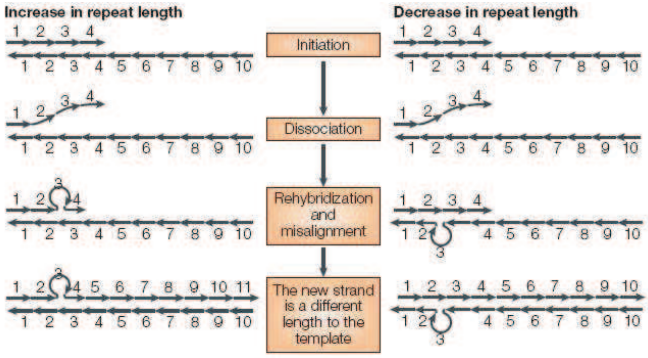


Fig. 12 – Meccanismo del replication slippage attraverso il quale si verificano aumenti o diminuzioni del numero di ripetizioni nei microsatelliti. (tratto da Ellegren, 2004).

Il limite nella lunghezza dei loci microsatellitari sembra essere invece posto dalle mutazioni puntiformi (causate da errori di replicazione) che riducono la frequenza nella formazione di loop. La dimensione dei microsatelliti sarebbe quindi opera di un equilibrio tra gli errori di *replication slippage* e il tasso di mutazioni puntiformi (Kruglyak, 1998). L'evoluzione dei microsatelliti è in realtà dinamica e non statica; nel momento in cui un nuovo errore di *replication slippage* elimina la ripetizione che contiene la mutazione puntiforme, si può generare nuova variabilità nel numero di ripetizioni (Harr, 2000).

La variabilità dei loci microsatellitari è dipendente dal locus stesso (loci diversi hanno diversi tassi di mutazione) oltre che dall'allele, dall'organismo e dal tipo di basi nucleotidiche all'interno della ripetizione (Ellegren, 2004). La maggior parte dei loci sono associati a DNA non codificante intergenico o intronico. In particolare sono di questo tipo i loci utilizzati come marker molecolari in quanto le mutazioni subite risultano neutre. Nel caso di loci in aree codificanti del genoma le mutazioni sarebbero invece maggiormente soggette a selezione non rispecchiando i tassi di mutazione (Ellegren, 2004).

La filogeografia, la genetica di popolazione e le sue applicazioni in ambito conservazionistico, l'ecologia molecolare e la sistematica sono tutte discipline che necessitano di valutare la variabilità inter- o intraspecifica e lo fanno utilizzando marker molecolari che permettano di misurare il flusso genico a diverse scale di spazio e tempo. E' quindi possibile ripercorrere processi di speciazione e colonizzazione e misurare il flusso

genico attuale tra popolazioni e specie. Tratti del genoma diverso hanno utilità differenti per le informazioni che contengono. In generale il DNA mitocondriale è più spesso utilizzato per indagini di pattern storici che coinvolgono processi di speciazione e migrazioni e colonizzazioni passate. Questo è dovuto alle caratteristiche stesse dell'mtDNA tra cui il tasso di mutazione elevato e ben noto per alcuni tratti e la mancanza di ricombinazione durante la duplicazione cellulare (Avise, 2000). Un limite è dovuto alla trasmissione esclusivamente per via femminile di tale parte di genoma. I marker nucleari invece, tra cui quelli microsatellitari, si adattano invece molto bene alla misurazione del flusso genico attuale mediato da entrambi i sessi; infatti il DNA nucleare è ereditato da parte femminile per una delle due copie e per parte maschile dall'altra.

Dalla combinazione dei dati derivanti dall'analisi delle diverse componenti genomiche (nucleare e mitocondriale) si possono pertanto indagare nel dettaglio le dinamiche di popolazione e metapopolazione utilizzando modelli matematici che misurano la variabilità genetica. La vasta applicabilità dei loci microsatellitari alla genetica di popolazione deriva anche dal fatto che si tratta di loci biallelici e codominanti.

Coinvolgendo entrambe le tipologie di marker molecolari sono quindi molteplici i campi di applicazione: dalla sistematica e la filogeografia, alla genetica di popolazione, dall'analisi della variabilità in ambito conservazionistico alla definizione dei confini delle specie fino a studi più prettamente ecologici. Un esempio di applicazione ecologica dell'analisi di marker microsatelliti sono infatti gli studi di cattura-marcatura-ricattura effettuati caratterizzando geneticamente (spesso con tecniche non invasive) i singoli individui (Broquet et al., 2007). Un elevato numero di loci fornirà infatti un pattern di alleli che solo con basse probabilità si potrà trovare in altri individui. Lo stesso principio è sfruttato per le indagini di paternità (anche in campo umano) e per la genetica forense (Ellegren, 2004).

1.5.2 Errori di genotyping *associati ai loci microsatellitari*

Genotyping è il termine inglese con cui ci si riferisce alla caratterizzazione di un certo numero di loci nucleari di un individuo, ossia alla definizione degli alleli presenti ad ogni locus.

Questo permette di ottenere un *fingerprint*, una sorta di "impronta digitale", caratteristica di ogni individuo, poiché all'aumentare del numero di loci e della variabilità degli stessi, sarà minore la probabilità di osservare lo stesso pattern in individui differenti (Paetkau et Strobeck, 1994). Attraverso questa metodologia si può quindi, come già anticipato, effettuare una sorta di marcatura genetica degli individui, risalire alla paternità della prole e, conoscendo le

frequenze alleliche in una popolazione, associare un individuo alla popolazione di appartenenza.

La probabilità di avere un genotipo identico tra due individui (cioè la presenza degli stessi alleli) è definita da:

$PI_1 * PI_2 * \ldots PI_n$ PI = probabilità di identità ad ogni locus = $\Sigma\, p_i^4 + \Sigma\, (2p_ip_j)^2$

dove p_i = frequenza dell'allele i
p_j = frequenza dell'allele j

Gli errori di amplificazione che possono portare a errori nella determinazione del genotipo sono di due tipi e sono maggiormente frequenti quando si utilizzano approcci genetici non invasivi (Taberlet e Luikart, 1999):

- Allelic drop out (ADO)

  Si tratta della mancata amplificazione di uno dei due alleli facendo apparire l'individuo come omozigote in presenza di un eterozigote. E' un errore frequente se il DNA target è particolarmente degradato o se in quantità molto limitate; la spiegazione viene fornita in termini di stocasticità poiché nell'aliquotare il DNA target nella mix di amplificazione si può casualmente aliquotare in maggiore misura un solo allele
- Falsi alleli (FA)

  Si tratta in questo caso dell'amplificazione di tratti di DNA che generano bande che possono essere confuse con contaminazioni o con alleli differenti facendo apparire l'individuo eterozigote in presenza di un omozigote oppure, ma in questo caso si tratta di un errore facilmente individuabile, l'apparenza di tre alleli. Questo tipo di errore è maggiormente frequente nelle ripetizioni di dinucleotidi per la maggiore frequenza di errori di *replication slippage*.

1.5.3 La genetica non invasiva

Quando un approccio genetico è finalizzato alla conoscenza e allo studio di specie a rischio di conservazione o minacciate, è obbligo del ricercatore ridurre al minimo l'impatto sulle popolazioni coinvolte. Questo vale anche per altre metodologie che apparentemente possono sembrare meno invasive, ma che spesso invece disturbano allo stesso modo gli equilibri delle specie viventi. Si pensi alla raccolta a scopo scientifico per specie vegetali o alle catture per specie animali e tutti i metodi di marcatura.

La genetica, però, per la necessità di reperire il DNA presente all'interno delle cellule, prevede il prelievo di parti di tessuto (generalmente sangue o epidermide). Se si tratta di animali vivi questo può significare la morte dell'individuo o la provocazione di ferite o comunque il disturbo e lo stress generato dalla cattura e la manipolazione. Si è quindi presentata la necessità, soprattutto per le specie minacciate, o anche solo per dovere morale, di ricorrere a metodi genetici definiti "non invasivi" che prevedono l'estrazione del DNA da tessuti reperiti in natura senza coinvolgere direttamente individui vivi. Più in generale è una tecnica applicabile a specie rare o elusive per cui sia difficile il contatto con gli animali (Piggott and Taylor, 2003). Sono molti gli esempi di studio nei quali il DNA viene estratto dalle cellule epiteliali intestinali di esfoliazione presenti negli escrementi tra cui il caso della lontra *Lutra lutra* (Mucci et al, 2007) o del lupo *Canis lupus* (Marucco et al., 2007). In alternativa si possono sfruttare i peli prelevando il DNA dal bulbo ove presente. I peli vengono strappati utilizzando stratagemmi che sfruttano sostanze incollanti in aree naturalmente utilizzate dagli animali. Alcuni esempi sono i lavori sull'orso italico *Ursus arctos marsicanus* di Davoli et al. (2007) o sul gatto selvatico *Felis silvestris silvestris* (Stoeckle et al., 2007) o ancora su un marsupiale australiano a rischio d'estinzione, il *Dasyurus maculatus* (Ruibal e Peakall, 2007). Pochi sono gli esempi di genetica non invasiva invece sui Chirotteri, nonostante il loro precario stato di conservazione. Attualmente in Europa, per quanto mi è noto, questo approccio è utilizzato sistematicamente solo dall'equipe di Eric Petit presso l'Université de Rennes che utilizza come modello di studio il Rinolofo minore *Rhinolophus hipposideros* (Puechmaille et Petit, 2007) oltre che da pochi altri gruppi di lavoro statunitensi (Zinck et al., 2004; Vege e McCracken, 2001).

La genetica non invasiva, rispetto alla genetica tradizionale, richiede maggiori accortezze e va incontro a maggiori difficoltà elencate di seguito:

- <u>minore quantità di DNA estratto</u>

  questo è causa del minor numero di cellule presenti nel materiale biologico da cui si estrae il DNA; il quantitativo è poi in genere ancora minore per le estrazioni da peli; la quantità di DNA influenza il risultato delle amplificazioni tramite PCR (Moorin et al., 2001); la quantità di DNA estratto si aggira sull'ordine dei picogrammi o pochi nanogrammi richiedendo un maggior numero di cicli di PCR (Taberlet e Luikart, 1999).

- degradazione del DNA estratto

il DNA è maggiormente sottoposto ad agenti esterni che ne compromettono l'integrità; l'umidità, soprattutto per il DNA estratto da feci, degrada la molecola diminuendo il successo di amplificazione (Puechmaille et al, 2007); inoltre, la dieta della specie influenza molto la riuscita dell'amplificazione tramite PCR per la possibile presenza di inibitori che non tutti i protocolli di amplificazione sono in grado di abbattere (Puechmaille et al., 2007)

- contaminazione del DNA estratto

questo dipende dal contatto con DNA non appartenente all'individuo di interesse a causa delle condizioni di raccolta; ciò si può limitare attuando protocolli mirati di campionamento; inoltre, durante il processo di amplificazione per PCR, la scarsa quantità di DNA fa sì che eventuale DNA estraneo, ma più abbondante, venga coinvolto nell'amplificazione.

A tutti questi limiti si può ovviare seguendo rigorosi protocolli di igiene sia in fase di raccolta del materiale, sia nel lavoro di laboratorio per limitare le contaminazioni e utilizzando efficaci sistemi di estrazione del DNA. In riferimento a questo ultimo punto si rimanda alla review di Puechmaille et al. (2007), che fornisce una valida discussione sui metodi di estrazione che garantiscono le maggiori percentuali di successo e consigli sulla conservazione del materiale biologico campionato, oltre che al capitolo Materiali e Metodi.
Inoltre è bene prestare attenzione alla scelta dei loci da amplificare. Infatti in Broquet et al. (2007) si evidenzia come tratti di mtDNA di dimensioni differenti possano avere percentuali di successo di amplificazione sensibilmente diverse e solo i tratti compresi tra 200 e 400 bp superano in tutti i lavori presi in esame l'80% di successo di amplificazione. Nel caso dei microsatelliti invece gli stessi autori suggeriscono di utilizzare ripetizioni di dinucleotidi in quanto si generano meno errori di ADO. Infatti i frammenti sono in media di dimensioni minori e più facilmente amplificabili da DNA degradato (Taberlet e Luikart, 1999), nonostante gli stessi rendano la lettura del pattern di amplificazione meno chiaro per la generazione di falsi alleli. Ovviamente la scelta deve considerare anche la variabilità del locus che deve essere tale da fornire le informazioni necessarie sulla variabilità genetica dell'entità di studio.

Nonostante le maggiori difficoltà rispetto alle analisi genetiche effettuate su materiale biologico reperito invasivamente è opportuno sottolineare ancora una volta la necessità di

scegliere l'approccio non invasivo almeno nei casi in cui le specie oggetto di studio siano tutelate per il loro precario stato di conservazione, oltre che l'esigenza di identificare nuove metodologie e protocolli che ottimizzino l'estrazione di DNA da tali fonti e il successo di amplificazione.

2. MATERIALI E METODI

2.1 CAMPIONAMENTI E DESCRIZIONE DELLE COLONIE STUDIATE

Il materiale biologico da cui è stato estratto il DNA per le analisi genetiche è stato campionato in parte in modo tradizionale e in parte mediante metodiche non invasive. Del primo tipo sono i tessuti prelevati tramite biopsia su animali vivi, mentre gli escrementi sono stati reperiti in modo non invasivo. Tale duplice fonte di DNA è servita per avere una base di dati di individui che attraverso dati morfologici potessero essere identificati come appartenenti ad una specie piuttosto che all'altra.

2.1.1 Le colonie oggetto di studio

Per questo lavoro sono state studiate 8 colonie di cui 5 in Piemonte, 2 in Trentino-Alto Adige e 1 in Emilia Romagna. In particolare si tratta delle colonie sotto elencate:

Sito	Sigla	Coordinate WGS84	Regione	Provincia
Agliè	AG	42°22'05,43''N – 7°46'05,24''E	Piemonte	TO
Santa Vittoria d'Alba	SV	44°41'58,95''N – 7°56'18,40''E	Piemonte	CN
Staffarda	STA	44°43'20,47''N – 7°26'13,33''E	Piemonte	CN
Venaria Reale	VN	45°08'43,17''N – 7°36'47,38'' E	Piemonte	TO
Verrua Savoia	VS	45°09'28,44''N – 8°05'36,29''E	Piemonte	TO
Onferno	ON	43°52'21,70''N – 12°32'46,42''E	Emilia Romagna	RN
Egna	EG	46°19'04,26''N – 11°16'25,60''E	Trentino-Alto Adige	BZ
Vezzano	VZ	46° 04'48,0''N - 11° 00'02,3''E	Trentino-Alto Adige	TN

Tab. 6 – Elenco e coordinate geografiche delle colonie oggetto di studio

Nella Fig. 13 alla pagina seguente si può visionare la loro disposizione e composizione in specie.

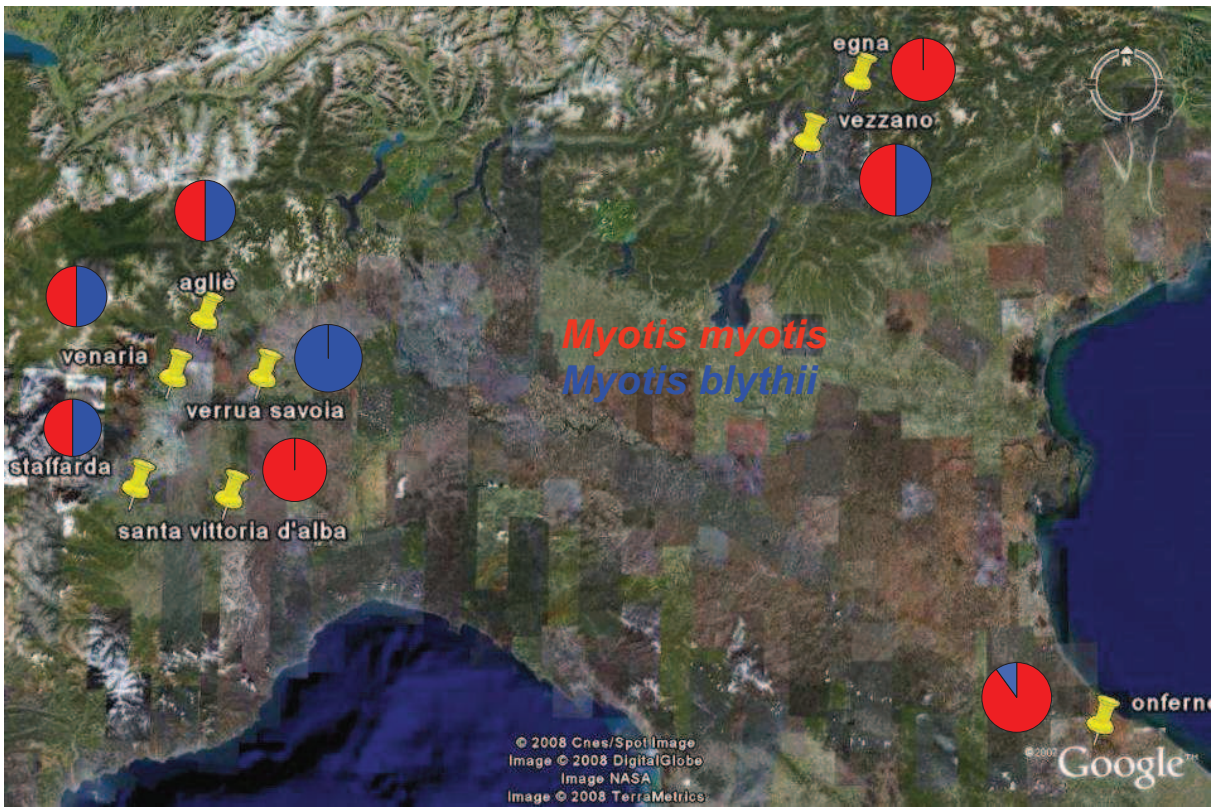


Fig. 13 –Dislocazione delle colonie in cui sono stati effettuati i campionamenti. (tratto da Google Earth – disponibile on line). I grafici a torta rapprendano la proporzione approssimativa della composizione in specie (su una base morfologica di determinazione)

Nelle tabelle seguenti sono riportate le distanze in km tra le varie colonie e la distanza media, minima e massima tra tutte le colonie oppure tra le sole colonie piemontesi o ancora tra le colonie piemontesi e trentine.

	AG	SV	STA	VN	VS	ON	EG	VZ
AG	-							
SV	75	-						
STA	77	39	-					
VN	28	57	48	-				
VS	36	53	69	38	-			
ON	413	378	418	416	318	-		
EG	293	318	346	313	278	293	-	
VZ	264	289	318	284	247	273	34	-

Tab. 7 - – Distanze in km tra le colonie oggetto di studio (sopra) e resoconto delle distanze medie, minime e massime (sotto)

Distanza media	214	Km	tra tutte le colonie
Distanza massima	418	Km	
Distanza minima	28	Km	
Distanza media	52	Km	solo tra le colonie piemontesi
Distanza massima	77	Km	
Distanza minima	28	Km	
Distanza media	295	Km	tra le colonie piemontesi e trentine
Distanza massima	346	Km	
Distanza minima	247	Km	

Si tratta esclusivamente di colonie riproduttive (i cosiddetti *roosts* o *nurseries*) composte da animali adulti di sesso prevalentemente femminile e dalla prole dell'anno di entrambi i sessi.

Gli ambienti che ospitano le colonie sono in buona parte di origine antropica. Si tratta di chiese nel caso delle colonie trentine, di castelli attualmente sfruttati nel caso delle colonie di Agliè (Castello Ducale), Venaria Reale (Residenza sabauda) e Staffarda (Residenza sabauda) o fortezze diroccate, ma purtroppo in via di restauro nel caso di Verrua Savoia (Fortezza sabauda sulle rive del fiume Po). In tutti i casi gli animali si trovano in ambienti sotterranei. A Santa Vittoria d'Alba la colonia ha invece trovato rifugio in una miniera abbandonata. La colonia di Onferno è l'unica che sfrutta invece il sistema carsico di ambienti sotterranei che condivide con numerose altre specie in particolare il Miniottero *Miniopterus schreibersi.* Alcune delle colonie ricadono all'interno di Siti di Importanza Comunitaria spesso proposti proprio per la presenza di queste specie di Allegato II della Direttiva 92/43/CEE. In particolare Agliè (codice sito IT1110047), Santa Vittoria d'Alba (codice sito IT1160029), Venaria (codice sito IT1110079 - coincidente con l'area del Parco Naturale Regionale La Mandria), Onferno (codice sito IT4090001 - coincidente con l'area della Riserva Orientata di Onferno).

Gli studiosi che si occupano del monitoraggio delle colonie in esame (De Bernardi, Patriarca, Toffoli per la regione Piemonte, Drescher per il Trentino, Martinoli per la colonia emiliana, com. pers.) hanno riportato le seguenti informazioni di numerosità delle colonie, presunta composizione in termini di specie e periodo di aggregazione, ove disponibili:

	Num. approssimativo di individui	**Composizione**	**Periodo di aggregazione della colonia**
AG	800	mista al 50%	da Maggio a inizio Ottobre
SV	800	Solo *M. myotis*, solo nell'ultimo anno trovati maschi di *M. blythii*	da Maggio a inizio Ottobre
STA	800	mista 50%	da Maggio a inizio Ottobre
VN	50	mista 50%	
VS	1800	solo *M. blythii*	da inizio Giugno a fine Agosto
ON		mista; prevalente *M. myotis*	
EG		*M. blythii* raramente individuati	
VZ		mista, ma *M. myotis* prevalente	

Tab. 8 – Informazioni di numerosità, composizione in specie e durata di aggregazione delle colonie oggetto di studio

I campionamenti sono stati svolti in periodo post-riproduttivo indicativamente da fine Agosto in avanti (Agnelli et al., 2004). Si è cercato quindi di escludere qualsiasi tipo di stress e disturbo ad animali in procinto di partorire o con i giovani nati da poco. Infatti si tratta di periodi molto delicati e lo stress derivante dalla manipolazione può comportare danni ad una femmina gravida impedendo il compimento dello sviluppo del feto, mentre anche solo entrare in una colonia dove i giovani sono troppo piccoli per restare autonomamente aggrappati ad un appiglio potrebbe comportare la caduta e la morte degli stessi una volta che le femmine si siano involate. I campionamenti effettuati nei mesi di Aprile e Maggio sono stati svolti quando le colonie si erano appena formate e le femmine non erano ancora in avanzato stato di gravidanza producendo in questo modo solo un minimo disturbo.
Le date di campionamento e la tipologia di campioni biologici prelevati sono riportati nella seguente tabella:

	Data campionamento	Escrementi	Tessuti
AG	23/08/2005		20
SV	28/04/2007		4
	13/07/2007		26
STA	28/08/2007	X	
VN	10/05/07	X	
VS	26/07/2007	X	18
ON	24-27/05/2007		11
	26/07/2007		16
EG	23/07/2007	X	14
VZ	23/07/2007	X	9

Tab. 9 – Vengono riportate le date di campionamento per ogni sito, se sono stati campionati escrementi e il numero di campioni di tessuto prelevati

2.1.2 Campionamenti di tessuto

I campionamenti di tessuto sono stati effettuati catturando gli animali (Fig. 14) tramite guadini che venivano collocati vicino agli individui in riposo, attendendo il loro involo causato dal contatto con il guadino stesso. In altri casi, quando le strutture lo permettevano, gli individui sono stati prelevati direttamente con le mani. Solo ad Onferno, dove la tipologia della grotta rendeva impossibile l'operazione, si è provveduto alla cattura degli animali in uscita serale tramite *harp-trap*.

Fig. 14 – Differenti metodi di cattura degli animali: a destra (foto di M. Del Pero) per mezzo di un guadino e a sinistra (Foto Federica Borghese) per mezzo di *harp-trap*

In seguito gli animali sono stati collocati singolarmente in sacchetti di stoffa (immagine a destra), nei quali rimanevano per qualche minuto in modo da ridurre lo stress.

Successivamente si è proceduto alla manipolazione di ogni singolo animale valutando in primo luogo lo stato di salute, per cui animali evidentemente stressati sono stati immediatamente rilasciati, e in secondo luogo l'età sulla base dell'analisi del livello di ossificazione delle falangi (Dietz e von Helversen, 2004). Gli animali giovani (vengono così classificati i giovani dell'anno) sono stati scartati e rilasciati quanto prima in quanto le misure biometriche non permettono di discriminare le due specie. Per gli adulti si sono invece valutati e misurati i seguenti parametri:

- **SESSO**
- **AV** (avambraccio)
- **V° DITO**
- **LOr** (lunghezza orecchio)
- **Tib** (tibia)
- **PESO**
- **C-M^3** (distanza canino – 3° molare)
- **STATUS RIPRODUTTIVO**
- Presenza/assenza dello **SPOT BIANCO**

Le misure sono state prese tramite l'ausilio di un calibro, di un righello di precisione e di una pesola seguendo le indicazioni fornite da (Dietz e von Helversen, 2004). I dati sono stati inseriti in una scheda di campo.

Per ogni animale è stato prelevato un frammento di tessuto dell'uropatagio tramite un piccolo bisturi (*biopsy – punch*) di 4 mm di diametro. L'operazione è stata condotta distendendo la pelle dell'animale e adagiandola su un supporto semirigido. L'incisione è stata effettuata prestando attenzione a non recidere vasi sanguigni per limitare il sanguinamento e, ove questo dovesse comunque presentarsi, si è disinfettata immediatamente la ferita. Il frammento di tessuto prelevato è stato immediatamente posto in una provetta numerata contenente alcool etilico 99% e una volta in laboratorio è stato messo a -30°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

Fig. 15 – Un *Myotis myotis* da cui è stato prelevato un frammento di uropatagio.

Tutti gli strumenti utilizzati per un animale sono stati cambiati o ben sterilizzati per il successivo e il frammento non è stato mai toccato a mani nude per evitare quanto possibile ogni contaminazione.

In seguito, valutato il buono stato di salute, ogni individuo è stato quanto prima rilasciato ove possibile all'interno del sito ospitante la colonia in quanto i campionamenti sono stati condotti (eccetto a Onferno) durante le ore di luce.
La specie di appartenenza di ogni individuo è stata valutata sulla base dell'aspetto esterno (presenza/assenza dello spot bianco sul capo), e delle misure biometriche in particolare il rapporto tra LOr e AV (secondo Arlettaz et al., 1991) e la misura C-M^3 (secondo Dietz e von Helversen, 2004). Gli individui per cui qualcuno di questi parametri dovesse discordare sono stati classificati come INC. (=incerti).

2.1.3 Campionamenti di guano

I campionamenti di guano sono stati invece condotti quasi del tutto non invasivamente seguendo il protocollo secondo Puechmaille et al. (2007). Ci si è recati all'interno dei siti ospitanti le colonie e si sono collocati dei fogli di giornale al di sotto del gruppo di animali.

Dopo aver atteso circa 30 minuti sono stati raccolti gli escrementi selezionando solo quelli di maggiori dimensioni e quelli non a contatto con altri escrementi. Il protocollo è stato in questa fase modificato in quanto gli autori procedevano alla raccolta del guano 15 giorni dopo il posizionamento dei fogli di giornale. Si è infatti preferito raccogliere dopo pochi minuti i campioni per evitare il contatto tra fatte di individui diversi e quindi possibili contaminazioni interindividuali. E' da considerare che la specie presa in esame da Puechmaillle (*Rhinolophus hipposideros*) non costituisce raggruppamenti folti come nel caso dei grossi *Myotis* diminuendo questa eventualità.

Ogni escremento singolo è stato fatto scivolare dal giornale direttamente nella provetta evitando qualsiasi contatto con le mani. Una volta in laboratorio è stato posto al suo interno un frammento di silica-gel e la provetta è stata lasciata aperta per 24h eliminando in questo modo l'acqua e riducendo il processo di degradazione del DNA. I campioni sono stati conservati in freezer a -30°C fino all'estrazione del DNA.

2.2 ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA è stato estratto dai tessuti seguendo un protocollo standard di estrazione (Appendice 1) con cloroformio e isopropanolo (modificato da Laird et al., 1991).

Per l'estrazione da guano si è invece utilizzato il QIAamp DNA Stool Mini Kit della QIAGEN apportando alcune modifiche (seguendo in parte Puechmaille et al., 2007) rispetto al protocollo, soprattutto per i volumi di reagenti utilizzati, in quanto la quantità di materiale biologico di partenza non corrispondeva a quella raccomandata. Il peso medio di ogni singolo escremento era infatti di circa 10 mg. I volumi consigliati di reagenti sono stati dimezzati e si sono eliminati gli step 3 e 4.

2.3 AMPLIFICAZIONE DEI LOCI MICROSATELLITARI

Per ogni individuo sono stati amplificati 5 loci microsatellitari individuati su *Myotis myotis* da Castella e Ruedi (2000). I loci sono stati scelti in quanto gli unici che si amplificano su DNA estratto da campioni di individui di entrambe le specie (Ruedi, comm. pers).

Nella tabella sottostante sono riportate le caratteristiche dei loci in esame:

Nome Locus	T°C annelling	Sequenza primer (5'-3')	Sequenza ripetuta	Dimensioni frammento (bp)	Fluorocromo
C113	60	F: ACCTCCCTGCCCTGCAC R: GCAATGCTTCCTCCAAGTCC	$(ACC)_7$	101	6FAM
D9	60	F: TCTTTCCTCCCCTGTGCTC R: TCTGGACCCAAAATGCAGG	$(CT)_{29}$	148	VIC
E24	60	F: GCAGGTTCAATCCCTGACC R: AAAGCCAGACTCCAAATTCTG	$(TC)_{32}$	236	VIC
H19	55	F: GGAATCCGAATCCCTGGC R: GACATCCCCTCACCCCAAC	$(GT)_{18}CT(GT)_2$	100	NED
H29	55	F: TCAGGTGAGGATTGAAAACAC R: GCTTTATTTAGCATTGGAGAGC	$(CA)_{21}$	182	6FAM

Tab. 10 – Elenco e caratteristiche dei loci microsatellitari analizzati e dei corrispettivi primers (F= primer forward; R= primer reverse)

Sono state condotte amplificazioni tramite PCR separate per ogni locus. I primers forward (complementari al filamento 5'-3') sono stati marcati all'estremo 5' con differenti fluorocromi specificati in tabella indispensabili per la lettura della corsa su sequenziatore capillare.

Per ogni campione di DNA estratto da tessuti è stata preparata la seguente mix in un $V_f = 25$ µL:

- 1 µL DNA totale
- 1x reaction buffer senza $MgCl_2$
- 2mM $MgCl_2$
- 0,2 mM dntps
- primer forward e reverse 0,5 µM
- H_2O sterile deionizzata con un volume tale da raggiungere $V_F = 25$µL
- Taq DNA polimerasi 0,5U/µL

Il pattern di amplificazione, effettuata utilizzando un termociclatore Biorad, è il seguente:

-1 ciclo di **denaturazione iniziale** a 95°C per 3 minuti
-30 cicli ognuno composto da: -**denaturazione** 94°C per 45 secondi
-**annealing** 55°C o 60°C per 45 secondi
-**estensione** 72°C per 45 secondi
-1 ciclo di **estensione finale** a 72°C per 7 minuti
-4°C fino al termine

Per gli escrementi, al fine di ottenere un alto successo di amplificazione e un ridotto numero di errori, si è utilizzata la HotStarTaq Master Mix Kit della QIAGEN in un V_f = 25 µL per ogni campione, utilizzando le stesse concentrazioni di primers e 1 µL di DNA totale. L'utilizzo di tale mix garantisce una maggiore specificità della reazione, necessaria visto il ridotto quantitativo di DNA totale estraibile dagli escrementi. Il pattern di amplificazione è stato modificato nel numero di cicli arrivando fino a 45 e nella durata della denaturazione iniziale e dell'estensione finale portate rispettivamente a 15 e 30 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati separati su gel di agaroso a cui è stato aggiunto bromuro di etidio (30 minuti, 100V) e la presenza dell'amplificato è stata valutata a seconda dell'intensità della banda visibile ai raggi UV.
Una quantità non superiore a 10 µg di amplificato (misurata a seconda dell'intensità della banda su gel di agaroso) è stata utilizzata per preparare una mix per ogni individuo contenente gli amplificati di tutti i loci in un V_f = 10 µL. Nel caso degli escrementi sono state preparate due differenti mix, di cui una contenente gli amplificati dei loci C113 e E24 e l'altra gli amplificati dei loci D9, H19 e H29. Nel caso il volume della mix dovesse superare i 10 µL si è proceduto ad una precipitazione e risospensione in acqua sterile in V_f = 10 µL.
Tali volumi sono stati inviati alla ditta Genelab di Roma che ha provveduto all'analisi dei frammenti su gel denaturante utilizzando il sequenziatore capillare ABI 3100. E' stato utilizzato il marcatore LIZ-500 che copre il range da 50 a 500 bp con 16 picchi. Dalla corsa su sequenziatore è stato prodotto un file in formato .abi inviato al responsabile del progetto in oggetto e si è provveduto all'analisi degli elettroferogrammi.

2.4 ANALISI DEGLI ELETTROFEROGRAMMI

Gli elettroferogrammi sono stati analizzati con il software Peak Scanner Software 1.0 che determina la dimensione di frammenti di acidi nucleici attraverso la lettura di picchi di assorbanza derivati dalla corsa elettroforetica dei frammenti stessi su sequenziatore capillare. La determinazione della taglia del frammento avviene attraverso la corsa parallela di un marcatore di taglia LIZ-500.

Un esempio di elettroferogramma è il seguente:

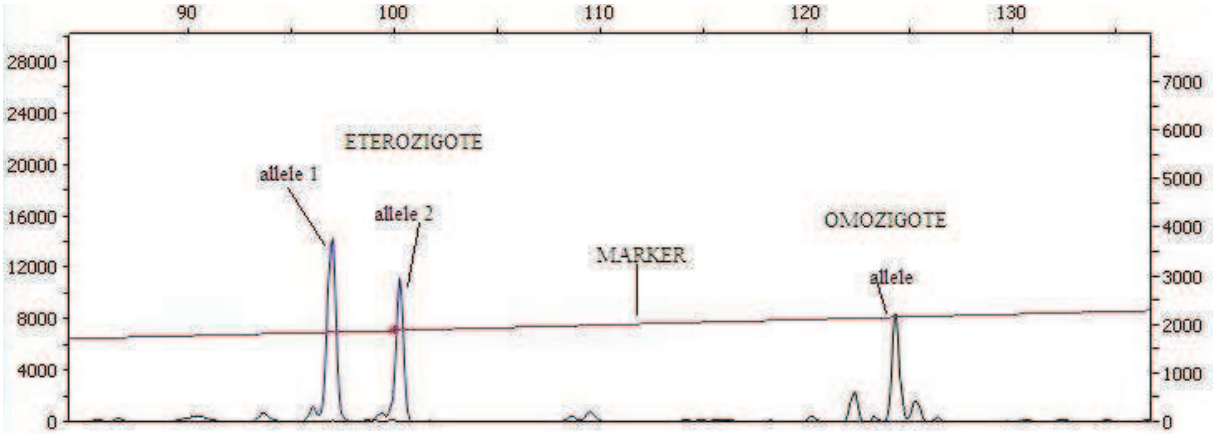


Fig. 16 – Esempio di elettroferogramma relativo a due differenti loci di uno stesso individuo

I picchi più alti si generano in presenza del frammento a cui corrisponde una taglia in termini di numero di basi, desunta dal marker. I picchi più bassi che si osservano nel grafico sono dovuti o a errori di lettura o alla presenza di *stutter bands*.

Una volta conosciuta la taglia del frammento è stato sufficiente dividere il numero di bp costituenti lo stesso per il numero di bp componenti la sequenza ripetuta del microsatellite ed è stato così possibile determinare per ogni individuo gli alleli presenti ad ogni locus. Ad ogni allele è stato assegnato un nome corrispondente al numero di ripetizioni della sequenza nucleotidica.

2.5 ANALISI DEI DATI MICROSATELLITARI E DEL TASSO DI IBRIDAZIONE

Le analisi dei dati microsatellitari sono state condotte a tre diversi livelli che comprendevano di volta in volta porzioni differenti del campione globale. I tre livelli individuati sono:

- il campione di individui identificati sulla base di dati morfologici come *Myotis myotis*, *Myotis blythii* o "incerti"
- il campione globale di tutti gli individui disponibili

- il campione di *Myotis myotis* per cui coincideva la classificazione specifica sia su base morfologica che genetica.

Il primo livello di analisi ha permesso un confronto con i dati bibliografici basati sempre esclusivamente su un'identificazione morfologica. Ogni colonia è stata quindi suddivisa nella sua componente *myotis* e *blythii* considerate separatamente per ottenere informazioni separatamente per le due specie. Il secondo campione considera ogni colonia come composta da una unica entità. In questo modo si è potuto osservare se fossero presenti differenze significative rispetto al primo livello e se quindi considerare le due specie come unica entità potesse influenzare i risultati delle analisi. Il terzo campione, ottenuto soddisfacendo criteri sia morfologici che genetici di appartenenza alla specie, è stato utilizzato nuovamente per identificare l'esistenza di pool genici riconducibili alle due entità considerate.
Per ognuno di questi campioni la metodologia seguita è riportata nei seguenti paragrafi.

2.5.1 Linkage Disequilibrium, Equilibrio di Hardy-Weinberg e Frequenze alleliche

Il parametro del Linkage Disequilibrium (LD) misura l'associazione statistica tra alleli di due o più loci non necessariamente disposti sullo stesso cromosoma. Se l'associazione è positiva ci sarà un numero di gameti superiore all'attesa che presentano per tali loci una specifica combinazione allelica. Le frequenze alleliche per ogni singolo locus nella popolazione saranno quindi influenzate da questa associazione. Il test del Linkage Disequilibrium è stato condotto per ogni coppia di loci utilizzando il software GENEPOP 4.0 (Raymond e Rousset, 1995). Il test di associazione viene condotto sotto l'ipotesi nulla che il genotipo osservabile per un locus sia indipendente dal genotipo osservabile per un altro, cioè che non ci sia LD.

La misura di eventuali deviazioni dall'Equilibrio di Hardy-Weinberg in ogni popolazione permette di verificare la presenza di una qualche forma di pressione selettiva che contribuisce ad osservare nel campione un numero maggiore o minore di eterozigoti rispetto alla proporzione prevista dal modello. In presenza di accoppiamento casuale (e quindi casuale assortimento dei gameti), assenza di migrazione e selezione, le frequenze attese di omozigoti e eterozigoti nella popolazione per un locus biallelico sono rispettivamente:

- $p^2 + q^2$
- $2pq$

dove p e q sono le frequenze dei due alleli. Tali proporzioni si mantengono di generazione in generazione. Tra i fattori che possono alterare tale equilibrio si elencano fattori casuali quali mutazioni genetiche che introducono nuovi alleli, fenomeni di deriva genetica e colli di

bottiglia, fattori selettivi verso alcuni alleli o loro combinazioni nell'ereditarietà, un consistente flusso migratorio con l'allontanamento o l'ingresso di alleli estranei alla popolazione e fenomeni di ibridazione tra pool genici distinti (Mallet, 2005).
L'Equilibrio di Hardy-Weinberg è stato valutato con GENEPOP 4.0 tramite un test di probabilità secondo la modalità di Guo e Thompson (1992) comprendendo prima i singoli loci in ogni popolazione, poi tutti i loci di una stessa popolazione e poi tutte le popolazioni per un singolo locus.

Entrambi i test sono stati condotti tramite il metodo della catena di Markov (MCMC – Markov Monte Carlo Chain) impostando i seguenti parametri:

-10000 cicli di *burn-in (dememorization)*

-20 sequenze di elaborazione (*batches*)

-10000 cicli di elaborazione per ogni *batch* (*iteration per batch*)

GENEPOP 4.0 ha permesso anche di calcolare le frequenze alleliche per ogni locus e per ogni popolazione da cui sono stati desunti: il numero di alleli per ogni locus (N_a), la ricchezza allelica per ogni popolazione per ogni locus (k-locus) e complessiva (k).
Lo stesso software fornisce anche il numero osservato e atteso di individui eterozigoti sotto l'ipotesi di Equilibrio di Hardy-Weinberg. Conoscendo il numero di campioni si è potuta calcolare l'eterozigosità attesa (He) e osservata (Ho) come:

$$H_e = \frac{\text{n° atteso di eterozigoti}}{N} \qquad H_o = \frac{\text{n° osservato di eterozigoti}}{N}$$

dove N = numero di individui tipizzati

Inoltre si sono calcolati i valori medi di eterozigosità osservata e attesa per ogni popolazione e per ogni locus.

2.5.2 Indice di fissazione di Wright o F_{ST} e AMOVA

Uno dei motivi per cui è possibile osservare in una popolazione una minore proporzione di eterozigoti rispetto all'attesa è il fatto che tale popolazione sia frammentata per motivi geografico/ecologici, il che si rispecchia in un ridotto flusso migratorio tra le sottopopolazioni. Questo comporta una riduzione dell'eterozigosità nella popolazione globale.

L'indice di fissazione di Wright (1951) o F_{ST} misura la riduzione dell'eterozigosità in una sottopopolazione dovuto alla deriva genetica casuale. Esso esprime la correlazione genetica tra coppie di geni campionati all'interno di una popolazione e coppie di geni campionati all'interno del set di tutte le popolazioni e si calcola nel modo seguente:

$$F_{ST} = \frac{H_T - \overline{H}_S}{H_T}$$

dove H_T = eterozigosità attesa di un individuo in una equivalente popolazione complessiva con accoppiamento casuale

H_S = eterozigosità attesa di un individuo in una equivalente sottopopolazione con accoppiamento casuale

Tale valore è maggiore o uguale a zero. Se tutte le popolazioni sono in equilibrio di Hardy-Weinberg e condividono le stesse frequenze alleliche allora $F_{ST} = 0$. Ciò significa che valori bassi di F_{ST} si riscontrano tra popolazioni poco differenziate.

L'indice di fissazione è stato di volta in volta calcolato con il software ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al., 2005). Il software calcola i valori di F_{ST} come segue:

(Slatkin, 1991)

$$F_{ST} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1}$$

dove f_0 = probabilità di identità per discendenza di due geni campionati dalla stessa popolazione

f_1 = probabilità di identità per discendenza di due geni campionati da due differenti popolazioni

La significatività dell'indice di fissazione è testata dal software utilizzando una permutazione non parametrica secondo Excoffier et al. (1992).

Esso è stato calcolato per coppie di popolazioni e globalmente per tutte le popolazioni coinvolte.

Con lo stesso software è stata anche condotta l'Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA) secondo Excoffier et al. (1992). Tale analisi ha lo scopo di testare la struttura di popolazione ipotizzata attraverso una analisi gerarchica che scompone la varianza totale in componenti di covarianza generati da:

- differenze intra-individuali

- differenze inter-individuali
- differenze inter-popolazionali

In sostanza il metodo quantifica quanto ognuno di questi aspetti contribuisca alla variabilità complessiva.

2.5.3 GENETIX e STRUCTURE: due software per valutare la presenza di differenti frequenze alleliche nelle due specie

Allo scopo di verificare se le frequenze alleliche nelle due specie costituissero due gruppi distinti e non sovrapposti sono stati utilizzati due software.
GENETIX 4.03 è prodotto dal Laboratoire Génome, Populations, Interactions del CNRS dell'Università di Montpellier (France) ed è stato utilizzato per effettuare l'Analisi Fattoriale delle Corrispondenze (FCA) (Benzècri, 1973). Essa si basa sull'analisi di una matrice in cui ad ogni individuo è assegnato per ogni allele di ogni locus un valore di 0 per l'assenza, di 1 per la presenza in stato omozigote e di 2 per la presenza in stato eterozigote. Ogni individuo si colloca in un punto di un iperspazio costituito da un numero di dimensioni definito dal numero di loci e alleli. L'algoritmo cerca le direzioni per le quali l'inerzia è massima, dove con inerzia si definisce una grandezza ottenuta dall'integrale della massa in un punto (ossia il numero di individui) moltiplicato per il quadrato della distanza del punto dall'origine. Queste direzioni definiscono degli assi che contribuiscono in percentuali differenti all'inerzia totale.
Graficamente si osserva se, confrontando i primi due assi che contribuiscono in maggiore misura all'inerzia totale, gli individui si separano in gruppi distinti sulla base delle frequenze alleliche.

STUCTURE 2.2 si basa su un metodo implementato da Pritchard et al. (2000) e poi arricchito da Falush et al. (2003) che permette di dimostrare la presenza di struttura genetica all'interno di una popolazione assegnando gli individui alle rispettive sottopopolazioni e identificando i migranti e gli individui geneticamente misti. Si assume che le sottopopolazioni siano in equilibrio di Hardy-Weinberg e Linkage Equilibrium e gli individui vengono raggruppati nel tentativo di raggiungere tali condizioni o comunque minimizzare le deviazioni dalle corrispettive condizioni di equilibrio. Il metodo identifica un numero K di cluster che rispecchiano con massima probabilità i dati e assegna ogni individuo ad un cluster sulla base dei dati genetici a disposizione. Le simulazioni vengono effettuate tramite una catena di Markov (MCMC – Markov Chain Monte Carlo) protratta per 10000 cicli di *burn-in* e 20000 di simulazione. Sono stati utilizzati "l'*admixture model*", che considera che ogni individuo

può essere di origine mista tra i gruppi, e il modello delle "*correlated frequencies*" che permette di individuare una struttura di popolazione anche dove le frequenze tra i gruppi non siano del tutto distinte (Falush et al., 2003). Per ogni individuo viene fornita la probabilità che esso appartenga ad ognuna delle sottopopolazioni individuate. Ogni individuo è ritenuto essere significativamente appartenente ad una sottopopolazione se tale valore di probabilità (q_i= probabilità di appartenenza al cluster *i*) è superiore a 0,8 (Randi, 2007). Nel caso contrario l'individuo è considerato essere geneticamente "misto".

2.5.4 Misura dell'ibridazione tramite il software NEWHYBRIDS

Il fenomeno dell'ibridazione tra *M. myotis* e *M. blythii* è stato indagato tramite l'utilizzo dell'apposito software NEWHYBRIDS che sviluppa il modello proposto da Anderson e Thomson (2002). Si tratta di un modello bayesiano che restituisce per ogni individuo la probabilità a posteriori di appartenenza ad ognuna delle seguenti classi di frequenze genotipiche sulla base di dati genetici multilocus:

Classe di frequenza genotipica		**q – value**	**Frequenze genotipiche attese**		
			(*myotis,myotis*)	**(*myotis,blythii*) o (*blythii,myotis*)**	**(*blythii,blythii*)**
Myotis myotis puro	***Myomyo***	1	1,0000	0,0000	0,0000
Myotis blythii puro	***Myobly***	0	0,0000	0,0000	1,0000
Ibrido di I° generazione	**F1**	0,5	0,0000	1,0000	0,0000
Ibrido di II° generazione	**F2**	0,5	0,2500	0,5000	0,2500
Reincrocio F1 x *Myomyo*	**Bx_*Myomyo***	0,75	0,5000	0,5000	0,0000
Reincrocio F1 x *Myobly*	**Bx_*Myobly***	0,25	0,0000	0,5000	0,5000

Tab. 11– Sono indicate le possibili classi di frequenza genotipiche prodotte dopo due generazioni di ibridazione e per ognuna la frequenza attesa di ogni genotipo e il q-*value* (vedere oltre). Le ultime tre colonne indicano la proporzione di genotipi monolocus che abbiano entrambi gli alleli originari di una specie o un allele di una specie e l'altro di un'altra.

Ognuno dei valori in tabella indica la proporzione attesa di loci per un singolo individuo che abbiano entrambi gli alleli originari di una delle due specie pure o uno originario di una specie e l'altro dall'altra. Il numero e la tipologia di classi scelte è obbligato dalle limitazioni nella individuazione di ibridi di generazioni successive alla seconda.

Come riportato dagli autori stessi i vantaggi nell'utilizzare questo modello sono numerosi e sono elencati di seguito:

- non richiede la conoscenza a priori delle frequenze alleliche nelle specie pure

- non è necessaria la presenza di alleli fissati nelle specie pure, ma il modello si basa sulle frequenze alleliche nelle stesse
- assume che le frequenze alleliche non siano certe ma stimate

In sostanza il modello stima le frequenze genotipiche nelle specie parentali e calcola la probabilità che ogni genotipo appartenga ad ognuna delle classi considerate.

La funzione di probabilità su cui lavora il modello è la seguente:

$$P(\mathbf{Y}|\mathbf{\Theta}_A,\mathbf{\Theta}_B,\boldsymbol{\pi}) = \prod_{i=1}^{M}\left(\sum_{g=1}^{\mathcal{G}_n}\pi_g P(\mathbf{Y}_i|Z_i = g,\mathbf{\Theta}_A,\mathbf{\Theta}_B)\right)$$

ossia, la probabilità di osservare un determinato pattern di dati (di genotipi nel complesso degli individui in esame) è una probabilità condizionale dipendente dal numero di generazioni di ibridazione (n), dalle frequenze alleliche nelle specie parentali (Θ_A e Θ_B) e dalla *mixing proportion* (π) cioè il vettore che descrive per il complesso dei campioni la probabilità di appartenenza di ogni individuo ad una classe genotipica.

Si assume a priori che le variabili π, Θ_A e Θ_B seguano la distribuzione di Dirichlet.

Altre assunzioni di questo modello sono:

- i loci utilizzati devono essere indipendenti e codominanti e non connessi a loci soggetti a selezione
- nelle specie parentali deve essere rispettato l'equilibrio di Hardy-Weinberg e non deve esserci Linkage Disequilibrium tra alleli.

La sequenza di simulazioni si basa su una procedura MCMC (Markov Chain Monte Carlo) protratta per 10000 cicli di *burn-in* e 10000 cicli di simulazione seguendo le indicazioni di Berthier et al. (2006).

La bontà del risultato è stata verificata tramite il controllo costante della finestra grafica che riporta durante il susseguirsi delle simulazioni il valore del parametro ln $P(Y/ \Theta_A, \Theta_B,\pi)$.

Al termine delle simulazioni viene fornita per ogni individuo la probabilità di appartenere ad ognuna delle classi di frequenze genotipiche, sulla base della quale si è proceduto alla classificazione come individuo di specie pura, ibrido di F1 o F2 o backcross.

Per ognuno è stato inoltre calcolato il valore di Q (Berthier et al., 2006), cioè la proporzione di genoma appartenente alla specie *M. myotis* definendo Q come:

$$Q = \Sigma\, q_k \times P(C_k)$$

dove C_k = probabilità di appartenenza alla categoria k

q_k = q-*value* della categoria k

Il sofware NEWHYBRIDS è stato quindi creato seguendo il modello di Anderson e Thompson (2002) allo scopo di discriminare in un campione la presenza di specie parentali e gli eventuali ibridi. A differenza di STRUCTURE però, tale software è più potente nel determinare la generazione di ibridazione poiché assegna gli individui sulla base della porzione di genoma originario delle due specie parentali, essendo l'algoritmo in grado di calcolare per queste le frequenze alleliche anche non avendo a disposizione informazioni a priori su esse. Si determinano così 6 classi di frequenze genotipiche che si riferiscono alle due specie parentali pure, alla prima e seconda generazione di ibridazione (F1 e F2) e al backcross tra specie parentali e ibridi F1. Il numero di classi ipotizzate non è esaustivo, almeno per i casi di ibridazione in cui gli individui ibridi siano fertili e si riproducano originando a loro volta prole fertile, per cui il numero di classi aumenterebbe inserendo un numero maggiore di successive generazioni di ibridazione (F3, F4…Fn). Il numero di 6 classi utilizzate si riferisce ad un modello in cui ci sia stata ibridazione per n=2 generazioni, ma nel caso di loci non associati nel pattern di ereditarietà (cioè loci che siano in equilibrio di linkage) non è possibile discriminare tra un numero maggiore di classi (Anderson e Thompson, 2002).

3. RISULTATI

3.1 CAMPIONAMENTI DI TESSUTO

Sono stati prelevati campioni di tessuto da 114 grossi *Myotis*. Di questi, sulla base di dati morfologici e morfometrici, 62 (54,4%) individui sono stati classificati come *Myotis myotis*, 32 (28,1%) come *Myotis blythii* e 20 (17,5%) sono risultati essere morfologicamente "incerti".

Nella tabella sottostante sono riportati il numero totale di individui campionati per ogni colonia e la suddivisione in specie.

	Tot	*Myotis myotis*	*Myotis blythii*	Incerti
AG	16 (14%)	10 (62,5%)	6 (37,5%)	-
EG	14 (12,3%)	11 (78,6%)	1 (7,1%)	2 (14,2%)
ON	27 (23,7%)	13 (48,1%)	-	14 (51,8%)
SV	30 (26,3%)	27 (90,0%)	1 (3,3)%)	2 (6,6%)
VS	18 (15,8%)	-	17 (94,4%)	1 (5,5%)
VZ	9 (7,89%)	2 (22,2%)	6 (66,6%)	1 (11,1%)

Tab. 12 – Sono riportati per ogni colonia il numero e la percentuale (in parentesi) di individui morfologicamente attribuiti alle due specie o classificati come "incerti" per la discordanza dei parametri valutati

Gli individui identificati morfologicamente presentano i seguenti valori medi e valori di deviazione standard per ognuno dei parametri biometrici considerati:

	AV(mm)	**LOr(mm)**	**V DITO(mm)**	**Tib(mm)**	**CM^3 (mm)**	
media	**58,92**	**21,67**	**77,14**	**26,75**	**8,60**	*Myotis blythii*
ds	1,60	1,15	3,50	1,17	0,31	n = 25
media	**62,19**	**26,35**	**78,31**	**26,03**	**9,82**	*Myotis myotis*
ds	1,84	1,57	4,15	1,14	0,28	n = 52
media	**61,05**	**24,26**	**77,33**	**25,97**	**9,65**	"incerti"
ds	2,46	1,84	5,84	1,12	0,69	n = 21

Tab. 13 – Media e deviazione standard (ds) delle misure biometriche riscontrate per gli individui morfologicamente determinati. (AV = avambraccio; LOr = lunghezza orecchio; Tib = tibia; CM^3 = distanza canino-III° molare

Le misure biometriche per ogni individuo campionato sono riportate in Appendice 2.

Ovviamente le misure per esemplari di *M. blythii* sono minori come si nota anche dal grafico in Fig. 17 . Le dimensioni relative dell'orecchio e dell'avambraccio sono considerate essere

discriminanti nell'identificazione specifica in natura oltre alla distanza tra canino e terzo molare (Arlettaz et al., ; Dietz e vonHelversen, 2004) come si osserva in Fig. 18.

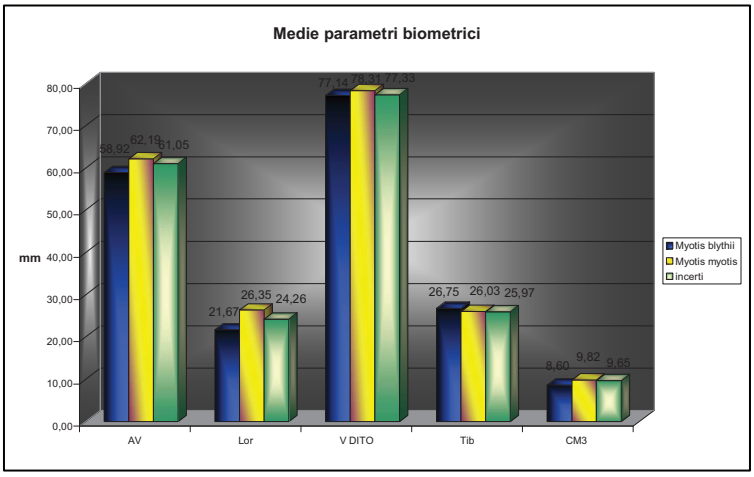


Fig. 17 – Valori medi dei parametri biometrici riscontrati in individui morfologicamente determinati come *Myotis myotis*, *Myotis blythii* o "incerti". Per la legenda fare riferimento a Tab. 13

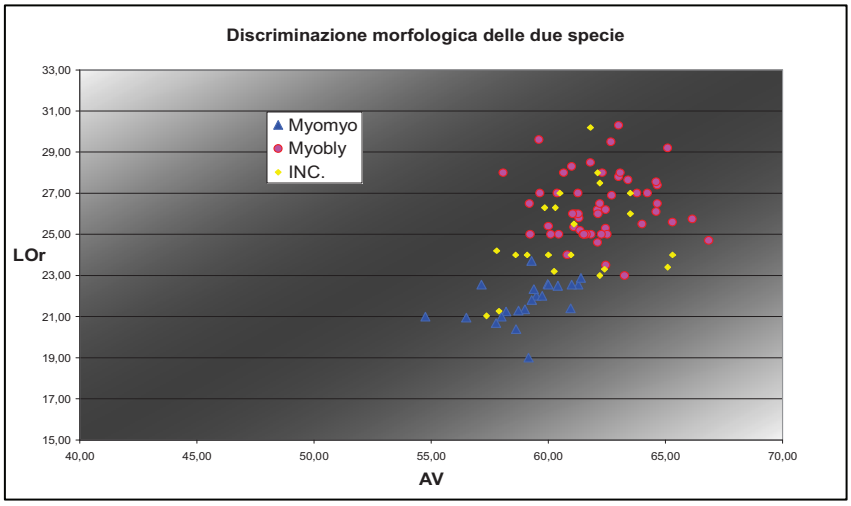


Fig. 18 – Discriminazione degli esemplari morfologicamente identificati secondo le misure di AV e LOr. Per la legenda fare riferimento a Tab. 13

3.2 SUCCESSO DI ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE E SUCCESSO DI AMPLIFICAZIONE

Il successo di estrazione del DNA è stato molto elevato, nel dettaglio del 99,8% per il DNA estratto da tessuti e di oltre il 70% per il DNA estratto da escrementi.

Il successo di amplificazione è risultato essere complessivamente del 94,5% e in particolare del 93,4% per gli escrementi e del 95,4% per i tessuti. Il locus con il minor successo di amplificazione è H29 con una percentuale di successo di solo 74,8%, mentre per gli altri loci varia dal 95,9% per il locus C113 al 90% per i loci E24 e D9.

Su un totale di 171 individui tipizzati, per 96 (56,1%) è stato possibile ottenere il genotipo completo, per il 35,1% il genotipo per 4 loci e solo l'8,7% degli individui sono stati tipizzati per meno di 4 loci.

I genotipi ottenuti sono riportati in Appendice 3. Il nome dell'allele si riferisce sempre al numero di ripetizioni della sequenza microsatellitare.

3.3 ANALISI DEI DATI MICROSATELLITARI

Le analisi sui dati microsatellitari sono state condotte a tre livelli differenti, ovvero considerando:

- il campione di individui determinati morfologicamente come *Myotis myotis*, *Myotis blythii* o "incerti"
- il campione globale di tutti gli individui
- il campione di *Myotis myotis* determinati in quanto tali in seguito a discriminazione genetica oltre che morfologica

3.3.1 Analisi della struttura genetica per le singole specie

La composizione delle colonie in termini di specie sulla base della identificazione morfologica è riportata nella tabella a destra (Tab. 14).

	Myotis myotis	*Myotis blyhtii*
AG	10	6
EG	10	1
ON	10	-
SV	17	1
VS	-	12
VZ	2	6

Tab. 14 – Numero di campioni appartenenti alle due specie (secondo discriminazione morfologica) tipizzati per ogni colonia

3.3.1a Test del Linkage Disequilibrium e dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg

Il test dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg, sotto l'ipotesi nulla di aggregazione casuale dei gameti, non è risultato significativo (p-*value*>0,001) per tutte le popolazioni di *M. blythii*, eccetto la popolazione di Verrua Savoia. L'equilibrio non è rispettato per la specie nel suo complesso. Per le popolazioni di *M. myotis* l'equilibrio è rispettato per tutte le popolazioni (p-*value*>0,001) eccetto che per Egna, oltre che per la specie nel suo complesso.

I test del Linkage Disequilibrium, sotto l'ipotesi nulla che il genotipo ad un locus sia indipendente dai genotipi agli altri loci, non è risultato significativo in nessuna coppia di loci e per nessuna popolazione in entrambe le specie.

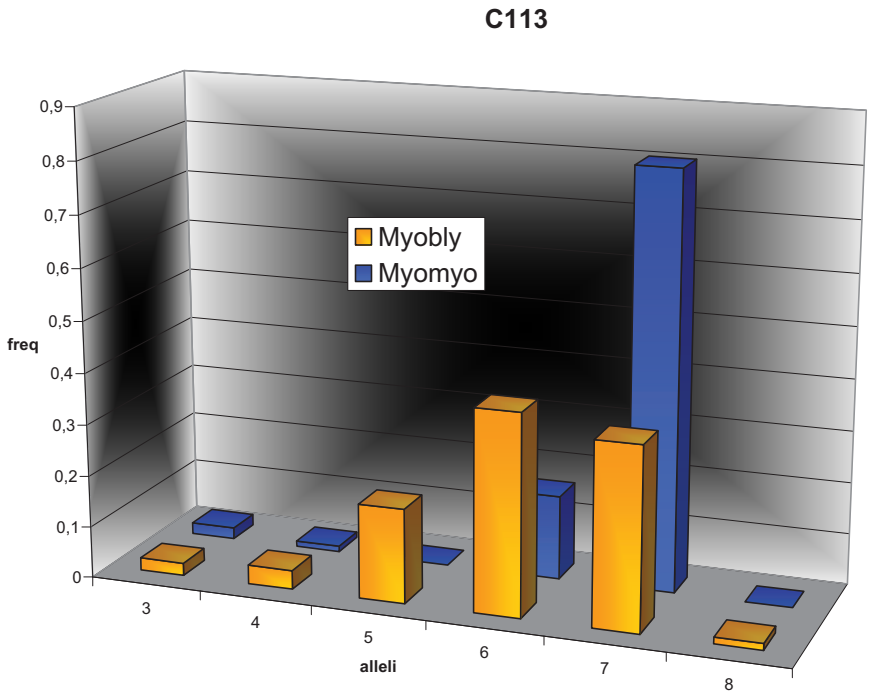
3.3.1b Frequenze alleliche, numerosità allelica (N_a) e ricchezza allelica (k)

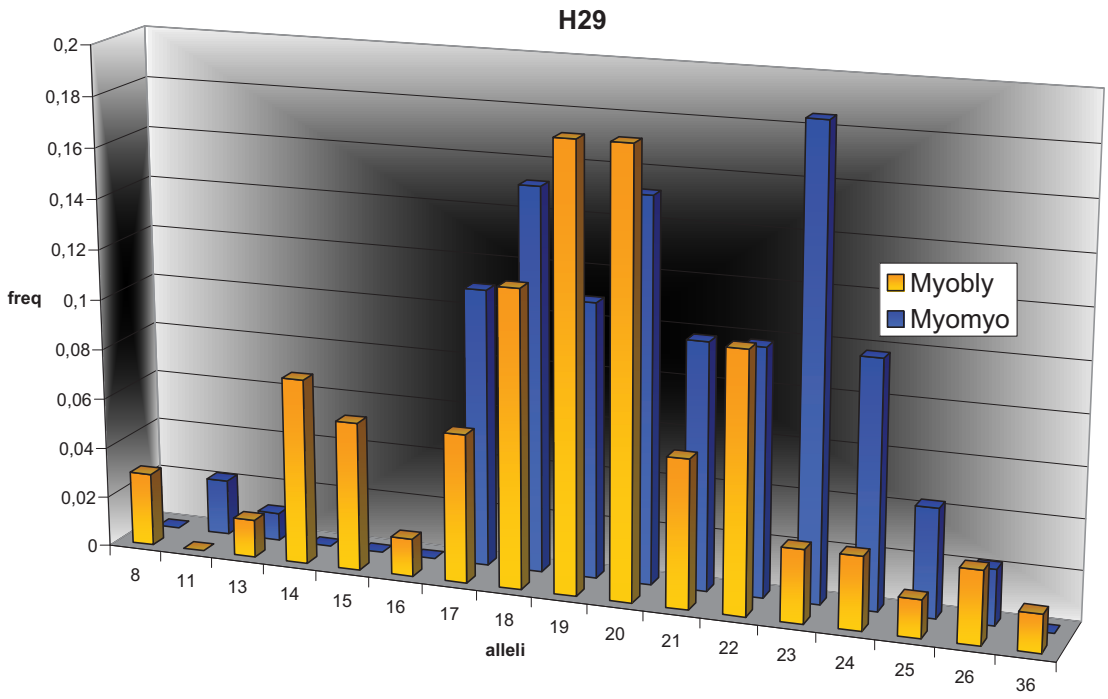
Sono stati calcolati per ogni specie la numerosità allelica per locus (N_a) e per ogni popolazione la ricchezza allelica (k) come media del numero di alleli per locus.

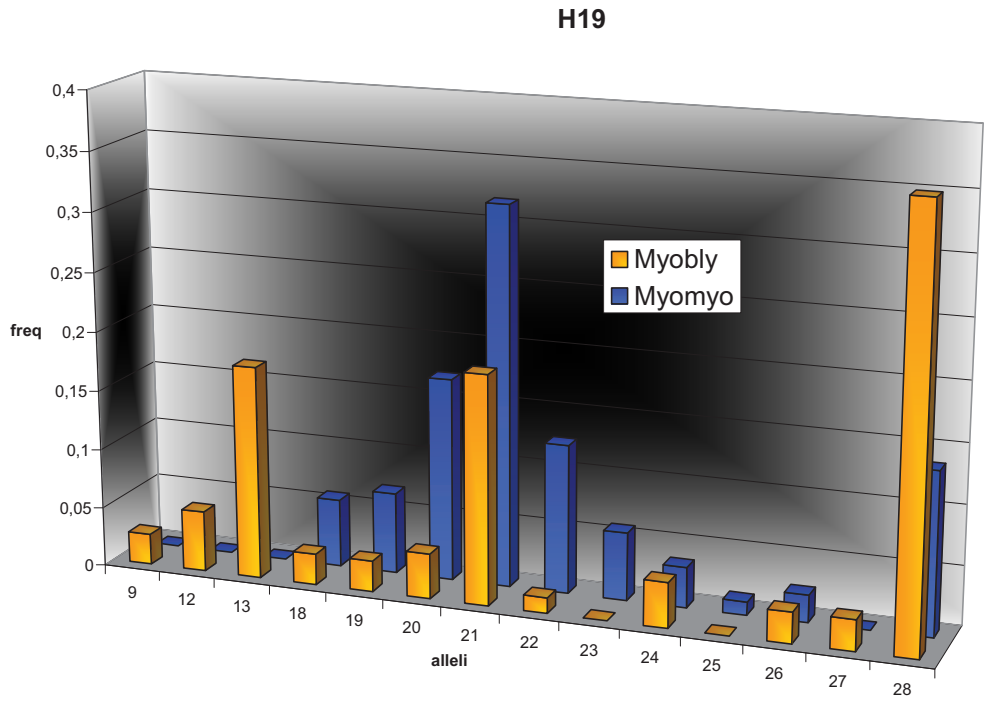
Myotis blythii							*Myotis myotis*						
	C113	H29	H19	E24	D9	k		C113	H29	H19	E24	D9	K
AG	3	4	6	7	7	5	AG	3	8	6	10	10	7
EG	2	-	2	1	1	1,667	EG	1	8	5	10	10	6,8
SV	1	2	1	2	1	1,5	ON	2	8	6	9	9	6
VS	4	14	11	20	14	12,25	SV	3	10	7	11	14	9
VZ	3	4	2	7	5	4	VZ	1	3	4	4	3	3
Na	6	16	12	22	16		**Na**	4	12	10	19	16	

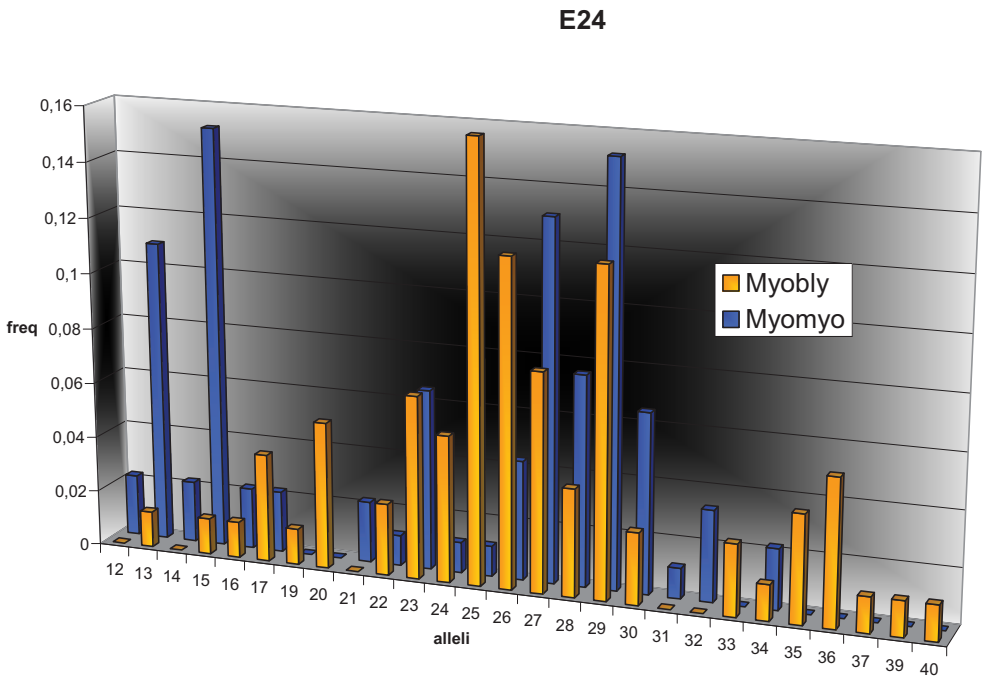
Tab. 15 – Si riporta, separatamente per le due specie identificate tramite misure biometriche, la ricchezza allelica per ogni locus in ogni popolazione (k) e la numerosità allelica per ogni locus.

Di seguito (Fig. 19) sono riportati i grafici delle frequenze alleliche riscontrati nelle specie.




H29
freq
0,2
0,18
0,16
0,14
0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
8
11
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
36
alleli
Myobly
Myomyo


H19
freq
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
9
12
13
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
alleli
Myobly
Myomyo



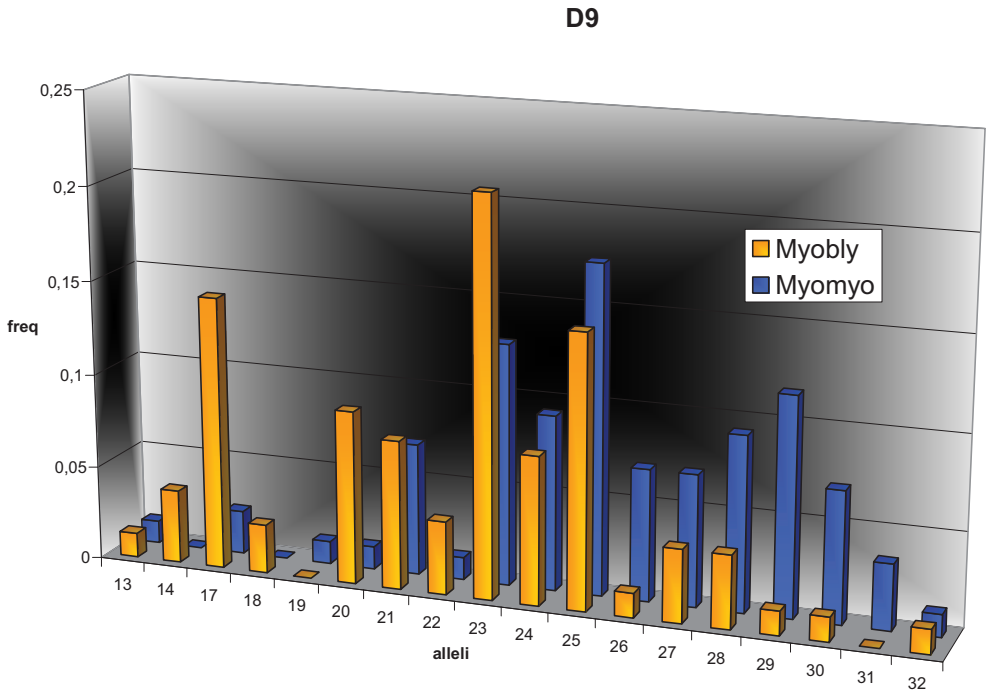


Fig. 19 – I grafici mostrano le frequenze alleliche nelle due specie discriminate su base morfologica.

Nessun locus permette la discriminazione delle specie in quanto tutti risultano essere polimorfici (ossia nessun allele ha una frequenza superiore al 95%) e gli alleli privati delle singole specie (cioè presenti solo in una o nell'altra) hanno frequenze troppo basse per essere totalmente informativi.

3.3.1c Eterozigosità osservata (H_o) e attesa (H_e)

I valori di eterozigosità sono stati confrontati, per ogni specie, a livello di locus e di popolazione.

Myotis blyhtii						*Myotis myotis*					
Per locus			per popolazione			Per locus			per popolazione		
	H_o	H_e		H_o	H_e		H_o	H_e		H_o	H_e
C113	0,673	0,672	AG	0,727	0,842	C113	0,274	0,242	AG	0,712	0,827
H29	0,363	0,871	EG	-	-	H29	0,828	0,869	EG	0,553	0,680
H19	0,573	0,761	SV	-	-	H19	0,782	0,835	ON	0,800	0,779
E24	0,809	0,922	VS	0,618	0,837	E24	0,840	0,926	SV	0,685	0,753
D9	0,767	0,877	VZ	0,567	0,783	D9	0,826	0,900	VZ	0,800	0,733
Tutti i loci	**0,637**	**0,821**				**Tutti i loci**	**0,710**	**0,754**			

Tab. 16 – Sono riportati i valori di eterozigosità attesa (H_e) e osservata (H_o) suddivisi per locus o per popolazione distintamente nelle due specie .

Si noti in Tab. 16 come i valori di H_o siano in genere minori rispetto ai valori di H_e indicando un maggior numero di omozigoti rispetto all'attesa. Tale tendenza si osserva soprattutto confrontando i valori medi ottenuti per le due specie per il totale dei loci.

3.3.1d FCA (*Factorial Component Analysis*)

L'Analisi delle componenti Fattoriali non è in grado di definire gruppi distinti corrispondenti alle due specie e agli individui classificati come incerti (Fig. 20). Gli esemplari di *M. myotis* (blu) si collocano in un'area dello spazio più ristretta rispetto agli esemplari di *M. blythii* (giallo) che invece si distribuiscono in un'area più ampia. Inoltre i primi risultano totalmente sovrapposti a parte degli individui della seconda specie. Gli individui "incerti" (bianco) si posizionano prevalentemente in corrispondenza degli individui classificati come *M. myotis.* Come si può osservare gli assi rappresentano percentuali molto basse dell'inerzia totale (nel dettaglio 6,65% Fattore1; 4,97% Fattore2; 4,57% Fattore3; 4,47% Fattore4).

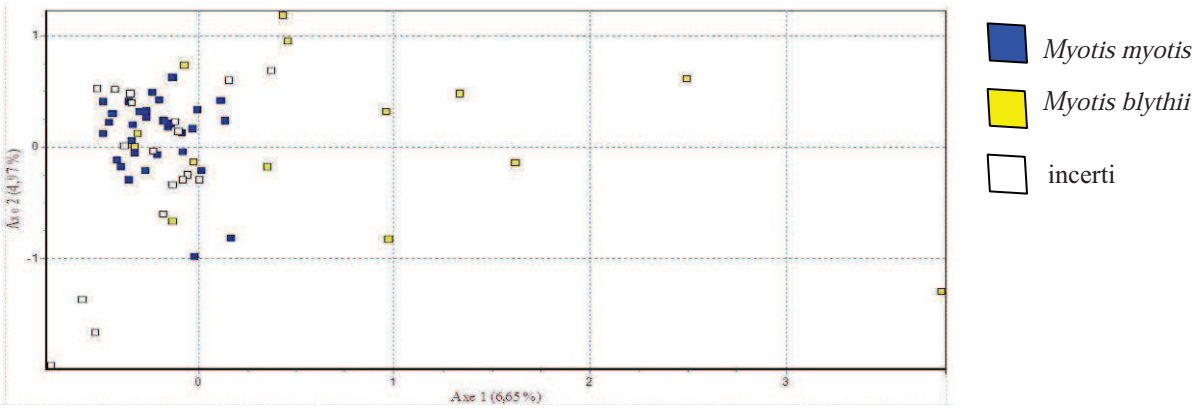


Fig. 20 – Grafico risultate dall'analisi FCA comprendente individui morfologicamente assegnati alle due specie e gli individui "incerti". Lo spazio del grafo è delimitato dai primi due assi che definiscono in maggior misura la variabilità dei dati.

Eliminando dall'analisi gli individui classificati come "incerti" sulla base della morfologia, l'analisi non è nuovamente in grado di discriminare totalmente tra i due gruppi corrispondenti alle due specie e ancora una volta i *M. blythii* occupano un'area dello spazio più estesa e i *M. myotis* una più ridotta, ma completamente sovrapposta alla prima(Fig. 21). Anche in questo caso gli assi rappresentano percentuali basse, e paragonabili alle precedenti, dell'inerzia totale (5,83% Fattore1, 4,95% Fattore2, 4,27% Fattore3, 4,02% Fattore4).

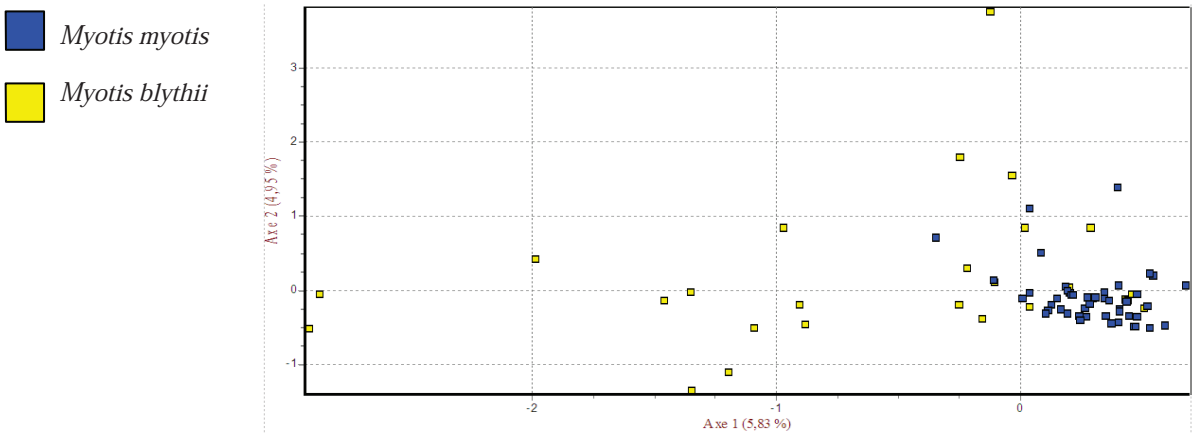


Fig. 21 – Grafico risultate dall'analisi FCA comprendente individui morfologicamente assegnati alle due specie ed escludendo gli individui "incerti". Lo spazio del grafo è delimitato dai primi due assi che definiscono in maggior misura la variabilità dei dati.

3.3.1e Differenziamento tra popolazioni e F_{ST}

Nelle tabelle sottostanti sono riportati i valori di F_{ST} per coppie di colonie suddividendo la componente *myotis* dalla componente *blythii* in base alla discriminazione morfologica

Myotis blythii			
	AG_*bly*	VS_*bly*	VZ_*bly*
AG_*bly*	-		
VS_*bly*	0,03710	-	
VZ_*bly*	0,10175*	0	-
F_{ST}=0,02 (p-*value*<0,05)			

Myotis myotis				
	AG_ *myo*	EG_ *myo*	ON_ *myo*	SV_*myo*
AG_*myo*	-			
EG_ *myo*	0,06699*	-		
ON_ *myo*	0,00682	0,07738	-	
SV_ *myo*	0,00594	0,01324	0,00055	-
F_{ST}= 0,02 (p-*value*<0,05)				

	AG_ *bly*	VS_ *bly*	VZ_ *bly*
AG_*myo*	0,02540	0,04381*	0,05628*
EG_ *myo*	0,12745*	0,11406*	0,09127*
ON_*myo*	0,02256*	0,05475*	0,07978*
SV_ *myo*	0,05879*	0,08563*	0,05187*
F_{ST}= 0,09 (p-*value*<0,05)			

Tab. 17 – Si riportano i valori di F_{ST} intraspecifici (sopra) e interspecifici (sotto) per coppie di colonie e globali (in grassetto). Le diciture *myo* e *bly* si riferiscono rispettivamente alla componente *blythii* e *myotis* di ogni colonia. Il simbolo * contrassegna valori di F_{ST} significativi (p-*value*<0,05).

I valori di F_{ST} tra differenti colonie di *M. myotis* variano da 0,00055 a 0,13, ma solo i valori più elevati sono significativi. Nel caso di *M. blythii* i valori significativi si aggirano intorno a F_{ST} ~ 0,1. I valori di F_{ST} globali sono uguali nelle due specie e corrispondenti al valore di 0,02. Per entrambe le specie non si notano pattern geografici nella distribuzione dei valori di F_{ST} (coeff. correlazione rispettivamente di -0,35 e -0,03 tra distanza delle colonie in km e $F_{ST}/(1- F_{ST})$) indicando assenza del fenomeno di Isolamento da Distanza (IBD) per cui la divergenza genetica non è correlata alla distanza geografica.

Confrontando invece i valori di F_{ST} tra le due specie nella stessa colonia o in colonie diverse si ottengono valori nel range di 0,03 e 0,19. Il valore più basso si riscontra confrontando le due specie nella colonia di Agliè. L'F_{ST} globale tra le due specie è di 0,09; ciò significa che le differenze interspecifiche sono circa 4,5 volte maggiori rispetto alla differenza tra popolazioni di una stessa specie. Si tratta sempre di valori molto bassi come sarà poi sottolineato nel capitolo Discussione.

I valori di F_{ST} sono stati calcolati (Tab. 18) per ogni specie anche considerando le tre distinte aree geografiche (ove il campione fosse significativo): Piemonte, Trentino, Onferno. I risultati sono riportati in Tab. 18 (pagina seguente).

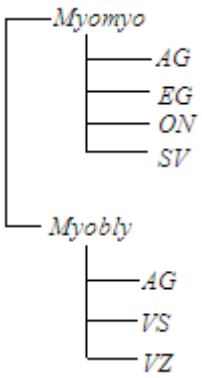
Myotis myotis				*Myotis blythii*		
	PIEMONTE	ONFERNO	TRENTINO		PIEMONTE	TRENTINO
PIEMONTE	-			PIEMONTE	-	
ONFERNO	0,01971*	-		TRENTINO	0,04	-
TRENTINO	0,02372*	0,04822*	-			
F_{ST} = 0,02 (p-*value*<0,05)				**F_{ST} = 0,04**		

Tab. 18 – Sono riportati i valori di F_{ST} confrontando per ogni specie le tre aree geografiche individuate e sono inoltre riportati i valori globali. Il simbolo * indica valori di F_{ST} significativi (p-*value*<0,05)

I valori si ripetono sostanzialmente simili a quelli ottenuti confrontando distintamente le colonie. Il valore di F_{ST} globale è di poco maggiore per la specie *M. blythii*, ma comunque molto basso e non significativo.

3.3.1f AMOVA

E' stata condotta una statistica AMOVA per analizzare quali componenti della variabilità avessero maggiore peso nel differenziamento dei popolamenti analizzati. L'immagine riporta come sono state raggruppate le popolazioni per implementare tale analisi in ARLEQUIN.



I risultati, riportati in tabella, mostrano come la quasi totalità delle differenze (93,04%) si riscontrano a livello di singoli individui piuttosto che tra le due specie o tra le popolazioni.

Fonte di variazione	g.l.	Somma dei quadrati	Componenti della varianza	% di variazione
Tra gruppi	1	7,245	0,07825	4,75
Tra popolazioni nel gruppo	5	11,250	0,03630	2,21
Tra individui nella popolazione	135	35,521	1,53170	93,04

Tab. 19 – La tabella riporta i dati dell'AMOVA. Con "gruppi" si intendono le due specie (secondo identificazione morfologica) e con "popolazioni" le colonie suddivise nelle loro componenti *myotis* e *blythii.*

3.3.1g Determinazione della presenza di clusters tramite il software STRUCTURE

Osservando, attraverso le analisi precedenti, la presenza di una, seppur limitata, suddivisione degli individui appartenenti alle due specie, è stata condotta un'analisi con il software STRUCTURE 2.2 allo scopo di verificare l'esistenza di tale suddivisione.
I risultati mostrano chiaramente come l'evento più probabile sia l'esistenza di un solo cluster, ossia non si suddividono gli individui in due gruppi distinti (P(k=1)=1).
Le simulazioni effettuate ipotizzando 2 clusters – ossia K=2 - (che corrisponderebbero alla suddivisione nelle due specie) mostrano anche graficamente come tale risultato non sia corroborato dall'analisi.

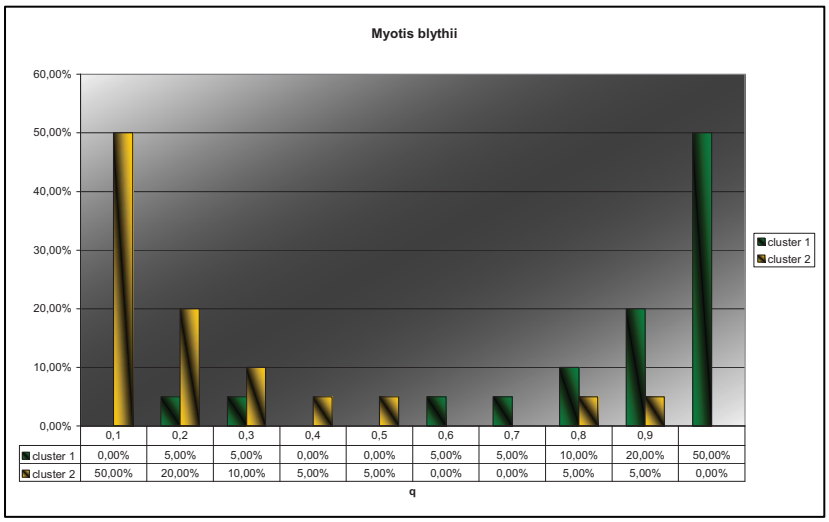
Fig. 22 – Bar-plotting dei risultati ottenuti con STRUCTURE ponendo K=2, dove ogni individuo è rappresentato da una barra verticale suddivisa in K segmenti colorati diversamente la cui lunghezza è proporzionale alla probabilità di appartenenza ad uno dei k cluster. I due raggruppamenti in specie e individui "incerti" fanno riferimento alla identificazione morfologica.

In Fig. 22 ogni individuo è rappresentato da una barra verticale e ogni colore corrisponde alla probabilità che ognuno appartenga ad un cluster (rosso) piuttosto che all'altro (verde). Gli individui sono raggruppati in specie e individui incerti sulla base della identificazione morfologica. Anche graficamente si nota la mancanza di omogeneità all'interno della stessa specie. Se infatti la distinzione fosse reale, ci aspetteremmo che gli individui identificati come *M. myotis* fossero tutti di uno stesso colore e quelli identificati come *M. blythii* dell'opposto, mentre solo per gli individui incerti ci si aspetterebbe una situazione intermedia.

Poiché viene normalmente considerata come significativa una probabilità (q_i) di appartenenza ad uno dei cluster pari almeno al 80%, notiamo subito come solo pochi individui superino tale soglia risultando assegnati ad uno dei clusters (Fig. 23).

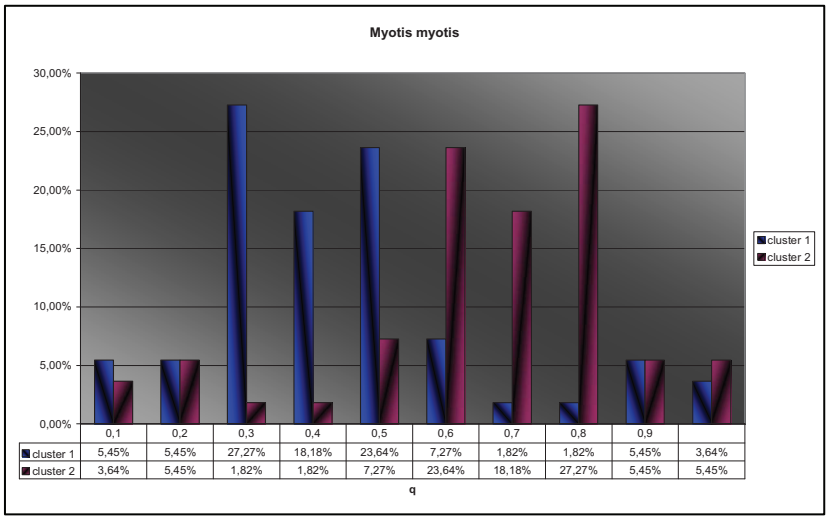
Nel dettaglio:

-tra i *M. myotis* solo il 9,9% degli individui è attribuito al cluster 1 e il 10,9% al cluster 2



	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	
cluster 1	0,00%	5,00%	5,00%	0,00%	0,00%	5,00%	5,00%	10,00%	20,00%	50,00%
cluster 2	50,00%	20,00%	10,00%	5,00%	5,00%	0,00%	0,00%	5,00%	5,00%	0,00%

Fig. 23(a)

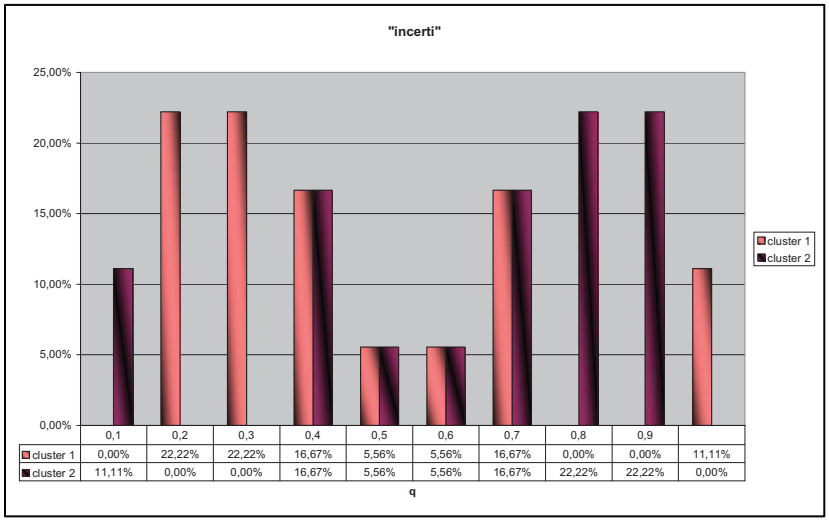


	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	
cluster 1	5,45%	5,45%	27,27%	18,18%	23,64%	7,27%	1,82%	1,82%	5,45%	3,64%
cluster 2	3,64%	5,45%	1,82%	1,82%	7,27%	23,64%	18,18%	27,27%	5,45%	5,45%

-tra i *M. blyhtii* il 70% è attribuito al cluster 1

Fig. 23(b)

-tra gli individui incerti l'11,11% degli individui sono attribuiti al cluster 1 e il 22,2% al cluster 2



	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	
cluster 1	0,00%	22,22%	22,22%	16,67%	5,56%	5,56%	16,67%	0,00%	0,00%	11,11%
cluster 2	11,11%	0,00%	0,00%	16,67%	5,56%	5,56%	16,67%	22,22%	22,22%	0,00%

Fig. 23 (c)

Fig. 23 – I grafici riportano per gli individui morfologicamente assegnati alle specie *M. myotis* (a) o *M. blythii* (b) o classificati come "incerti" (c) le percentuali (in ordinata) di individui assegnati ai due cluster con crescenti valori di *q* (in ascissa).

Poiché alla luce del lavoro di Berthier et al. (2006) non esistono elementi morfologici per attribuire con certezza un esemplare ad una delle due specie, non abbiamo elementi per indicare quale dei due clusters dovrebbe raggruppare gli individui di una specie e quale gli individui di un'altra. Notiamo però che circa il 50% degli individui identificati morfologicamente come *M. blyhtii* ricadono nel cluster 1 e se tale identificazione corrispondesse all'esistenza di corrispettivi pool genici attribuibili alle specie ci aspetteremmo di trovare una corrispondenza tra l'identificazione morfologica e l'assegnazione ai clusters.

Come si osserva dal grafico in Fig. 24 il 65% di individui non sono stati classificati come appartenenti ad uno dei due clusters con una probabilità significativa.

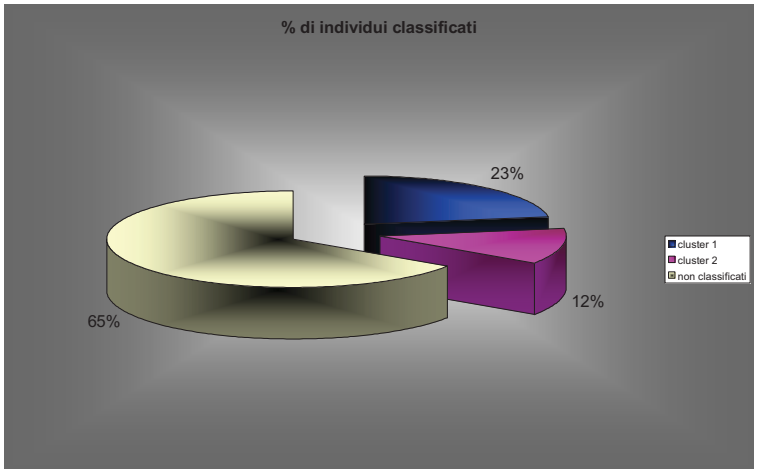


Fig. 24 – Percentuale di individui assegnati ai due clusters o non classificati in quanto non sono stati raggiunti significativi valori di q_i.

3.3.2 Analisi della struttura genetica tra colonie

3.3.2a Test del Linkage Disequilibrium e dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg

Il test del LD, sotto l'ipotesi nulla che il genotipo di un locus sia indipendente dal genotipo degli altri loci, non è risultato essere significativo per nessuna coppia di loci; questo significa che tutti i loci sono ereditati indipendentemente uno dall'altro. La significatività del test è stata raggiunta solo per la coppia di loci C113 e H19 nelle colonie di Agliè e Onferno, ma non se ne è avuta conferma conducendo il test su tutte le colonie nel complesso.

L'Equilibrio di Hardy-Weinberg è rispettato solo per alcuni loci e per alcune popolazioni. La significatività del test che è stato condotto è riportata nella seguente tabella (Tab. 20 pagina seguente):

	C113	H29	H19	E24	D9	**Tutti i loci**
AG	0,3490	0,0164	0,0007*	0,3904	0,0196	**0,0001***
EG	-	0,0355	0,2872	0,0000*	0,0033	**0,0000***
ON	0,2891	0,1864	0,5738	0,0054	0,6419	0,0504
STA	0,0409	0,0003*	0,0000*	0,2259	0,0033	**0,0000***
SV	0,0343	0,9294	0,3342	0,5459	0,4656	0,2972
VN	0,0024	0,0211	0,2171	0,0932	0,0189	**0,0001***
VS	0,0043	0,0000*	0,0010	0,0000*	0,0124	**0,0000***
VZ	0,0859	0,0024	0,2534	1,0000	0,7495	0,2670

Tab. 20 – Sono riportati i p-*value* del test di deviazione dall'Equilibrio di Hardy-Weinberg. Il simbolo * contrassegna i p-value significativi, ossia deviazioni statisticamente significative dalle condizioni di equilibrio.

Lo stesso test condotto comprendendo insieme tutti i loci e tutte le popolazioni è risultato significativo ($p<0,001$).

3.3.2b Frequenze alleliche, numerosità allelica (N_a) e ricchezza allelica (k)

Nella tabella sottostante (Tab. 21) si riportano i valori riscontrati di numerosità allelica (N_a) e ricchezza allelica (k).

	C113	**H29**	**H19**	**E24**	**D9**	***k***
AG	3	9	8	12	12	8,8
EG	2	9	7	12	12	8,4
ON	2	9	9	15	12	9,4
STA	3	19	12	19	15	13,6
SV	3	10	7	11	14	9
VN	5	12	6	14	8	9
VS	4	14	10	20	14	12,4
VZ	3	8	5	10	8	6,8
N_a	6	33	14	29	20	

Tab.21 - Sono riportati il numero di alleli per ogni locus (N_a), e la ricchezza allelica in ogni popolazione .

Di seguito si evidenziano alcuni risultati di rilievo:

- la colonia di Staffarda presenta un numero di alleli per il locus H29 molto elevato rispetto alla media. 14 alleli sono presenti esclusivamente nella stessa colonia e in particolare l'allele 31 è presente con una frequenza del 27,8%

-l'allele 7 ha i valori di frequenza più elevati per quanto riguarda il locus C113. Nelle colonie di Santa Vittoria d'Alba e Egna i valori di frequenza superano 0,90.

3.3.2c Eterozigosità attesa (H_e) e osservata (H_o)

I valori medi di eterozigosità attesa e osservata (Tab. 22) non sono risultati mai essere significativamente differenti né considerando i singoli loci, né considerando le singole

colonie. Non si riscontrano quindi frequenze di eterozigoti significativamente superiori o inferiori rispetto all'attesa.

per popolazione		
	H_o media	**H_e media**
AG	0,715	0,843
EG	0,595	0,709
ON	0,724	0,768
STA	0,622	0,776
SV	0,666	0,745
VN	0,752	0,829
VS	0,631	0,836
VZ	0,652	0,814

Per locus		
	H_o media	**He media**
C113	0,441	0,437
H29	0,669	0,893
H19	0,666	0,797
E24	0,817	0,928
D9	0,756	0,895
Tutti i loci	**0,670**	**0,790**

Tab. 22 – Le tabelle mostrano i valori medi di eterozigosità attesa (H_e) e osservata (H_o) per ogni popolazione a sinistra e per ogni locus a destra.

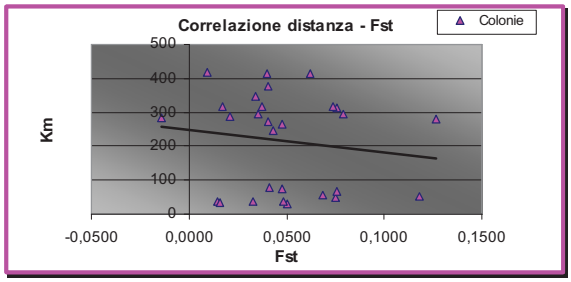
3.3.2d Differenziamento tra colonie e F_{ST}

I valori di F_{ST} per coppie di colonie sono riportati nella tabella sottostante (Tab. 23); nella parte superiore si può vedere quali di questi valori siano significativi (p-*value* < 0,05) ovvero quali colonie siano effettivamente tra loro differenziate.

	AG	**EG**	**ON**	**STA**	**SV**	**VN**	**VS**	**VZ**
AG	-							
EG	0,0788*	-						
ON	0,0398*	0,0354*	-					
STA	0,0415*	0,0338*	0,0090	-				
SV	0,0474*	0,0174*	0,0406*	0,0325*	-			
VN	0,0503*	0,0760*	0,0621*	0,0750*	0,0687*	-		
VS	0,0143	0,1267	0,0739*	0,0757*	0,1180*	0,0486*	-	
VZ	0,0480*	0,0160	0,0408*	0,0375*	0,0213*	0,0000	0,0430	
Fst=0,04 (p-*value* < 0,05)								

Tab. 23 – Valori di F_{ST} per coppie di colonie considerate senza suddividere nelle due componenti specifiche. E' riportato in grassetto anche il valore globale. Il simbolo * indica valori di F_{ST} significativi (p-*value*<0,05)

Non risultano differenziate tra loro le due colonie trentine, cosi come anche le colonie piemontesi di Agliè e Verrua Savoia che distano tra loro rispettivamente 34 e 36 km. In altri casi la mancata significatività nella differenza tra colonie non sembra essere giustificato dalla vicinanza. Non è infatti evidenziabile nessuna correlazione tra la distanza geografica (km) e la distanza genetica (F_{ST} /(1- F_{ST})) tra le colonie suggerendo che non è presente il fenomeno

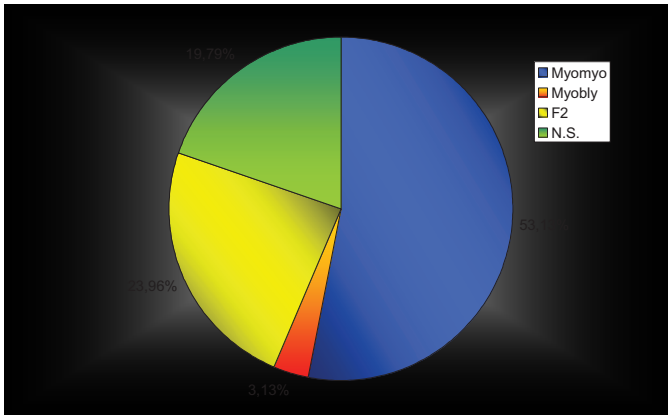


dell'Isolamento da Distanza (IBD).

3.3.3 Attribuzione degli individui alle classi di frequenza genotipiche

Il software NEWHYBRIDS restituisce la probabilità che ogni individuo appartenga ad una delle classi di frequenza genotipiche individuate.

Considerando che ogni individuo è stato attribuito ad una determinata classe per valori di probabilità superiori a 0,8, è stato possibile classificare come appartenente ad una di esse il 78,95% degli individui pari a 135 su un totale di 171 animali tipizzati. Nel grafico (Fig. 25a) si riporta la suddivisione degli individui per classe di appartenenza considerando solo i 96 campioni di cui non si avevano informazioni biometriche o le cui caratteristiche morfologiche non permettevano la discriminazione:



Oltre il 53% degli individui sono stati classificati come puri *M. myotis* e solo una minima parte come puri *M. blythii.* Il 23,96% di animali sono classificati come F2, cioè ibridi di seconda generazione originati dall'incrocio tra due individui ibridi di prima generazione.

Fig. 25(a) – Percentuale di individui di assegnati alle differenti classi di frequenza di frequenze genotipiche. Si fa riferimento a campioni di cui non si avevano informazioni morfologiche per l'identificazione specifica o per i quali tale determinazione sia risultata inconclusiva Myomyo = *Myotis myotis* puro; Myobly = *Myotis blythii* puro; N.S. = campioni per cui la probabilità di assegnazione alle classi è <0,8.

Considerando solo gli individui identificati a livello specifico sulla base di dati morfologici, le proporzioni rimangono pressoché invariate (Fig. 25b). Il campione è in questo caso di 75 individui di cui 3 (4,0 %) identificati come *Myotis blythii* e 42 (60,0%) come *Myotis myotis.*

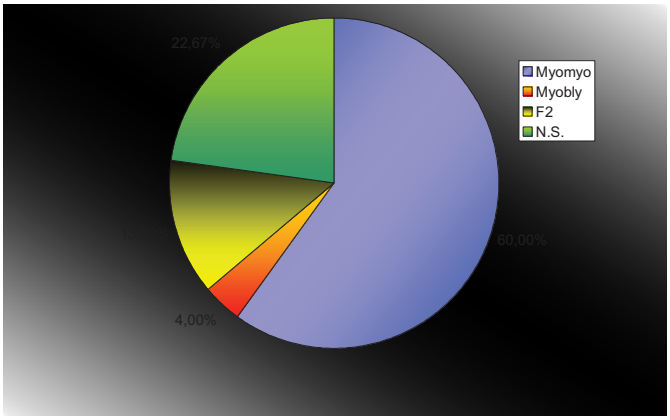


Fig. 25(b) (pagina precedente) – Percentuale di individui di assegnati alle differenti classi di frequenzae genotipiche. Si fa riferimento a individui identificati morfologicamente. Myomyo = *Myotis myotis* puro; Myobly = *Myotis blythii* puro; N.S. = campioni per cui la probabilità di assegnazione alle classi è <0,8.

Confrontate con un test del χ^2 le proporzioni nei due campioni risultano non essere statisticamente differenti (χ^2 = 3,07; g.l. 3; p=0,38).

Considerando invece il campione complessivo di individui (Fig. 25c) la proporzione delle diverse classi di frequenze genotipiche individuate è la seguente:

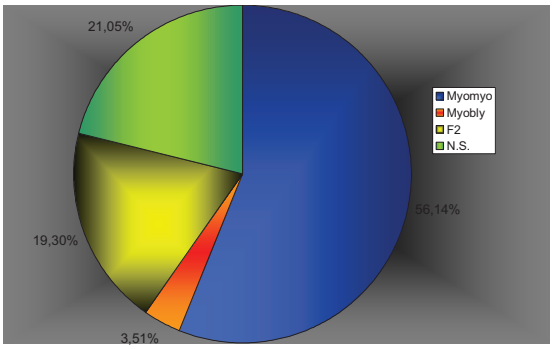


Fig. 25(c) – Percentuale di individui di assegnati alle differenti classi di frequenze genotipiche. Si fa riferimento a tutti i 171 campioni tipizzati. Myomyo = *Myotis myotis* puro; Myobly = *Myotis blythii* puro; N.S. = campioni per cui la probabilità di assegnazione alle classi è <0,8.

La discriminazione su base genetica (ossia l'assegnazione alle classi di frequenze genotipiche) non è risultata spesso concorde con la determinazione morfologica. Tale discordanza è risultata nel 18,36% degli individui identificati come *M. myotis*, l'88,46% di quelli classificati come *M. blythii*. Solo l'11,12 % di individui morfologicamente incerti è risultato essere geneticamente ibrido.

Nel grafico seguente (Fig 26a - pagina successiva) si possono osservare i valori di probabilità di appartenenza ad ognuna delle classi di frequenze genotipice per individui determinati morfologicamente a livello specifico:

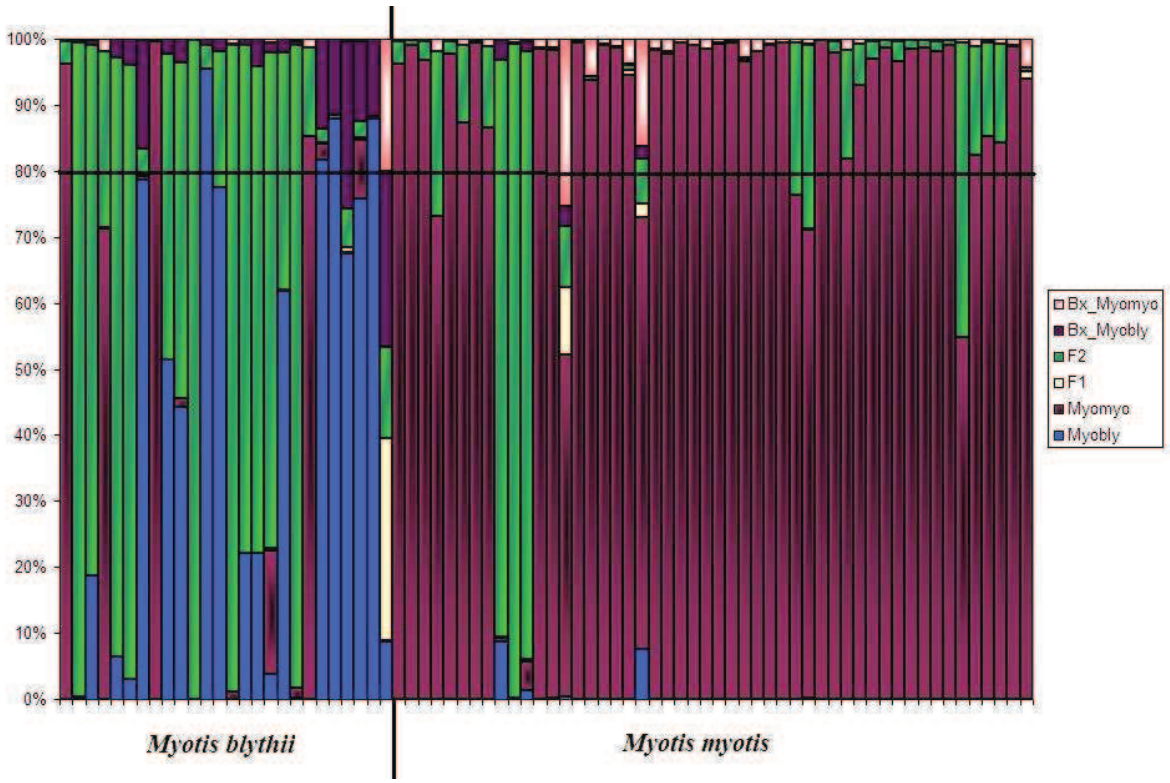


Fig. 26(a) - Grafico dei risultati forniti da NEWHYBRIDS per gli individui determinati morfologicamente. Ogni barra verticale rappresenta un individuo e i differenti segmenti rappresentano il valore della probabilità riferita all'appartenenza a ciascuna classe. Myomyo = *Myotis myotis* puro; Myobly = *Myotis blythii* puro; Bx = reicrocio.

Gli individui determinati morfologicamente come *M. myotis* rispettano in gran parte la discriminazione anche su base genetica, mentre questo non vale per i *M. blythii* ai quali vengono assegnate più alte probabilità di appartenere alla classe di ibridi di seconda generazione. Si noti come compaia solo raramente la porzione di segmento assegnato alla classe di ibridi di prima generazione e come i segmenti assegnati ai backcross tra F1 e *M. myotis* compaiano quasi esclusivamente negli individui classificati come *M. myotis* e viceversa per i backcross tra F1 e *M. blythii.*

Il pattern per il campione di tutti i 171 animali tipizzati è invece il seguente (Fig. 26b):

Fig. 26(b) - Grafico dei risultati forniti da NEWHYBRIDS per tutti gli individui tipizzati. Ogni barra verticale rappresenta un individuo e i differenti segmenti rappresentano il valore della probabilità riferita all'appartenenza a ciascuna classe. Myomyo = *Myotis myotis* puro; Myobly = *Myotis blythii* puro; Bx = reicrocio.

Si può osservare in Fig. 26b la prevalenza dei segmenti corrispondenti alla probabilità di appartenenze alle classi *M. myotis* e F2 e sporadicamente quelli della classe *M. blythii*. Gli individui assegnati alla prima classe hanno valori di probabilità decisamente più elevati con una media di 0,96 rispetto alla media di 0,89 per la probabilità di assegnazione alla classe *M. blythii* e 0,94 alla classe F2.

Considerando separatamente i due campioni comprendenti gli individui delle due specie è evidente come solo per *M. myotis* la determinazione morfologica rispecchia in buona parte la discriminazione su base genetica (Fig. 27). Solo il 19,23% di *M. blyhtii* rispetto all'81,63% dei *M. myotis* sono stati classificati come appartenenti alla corrispondente classe pura.

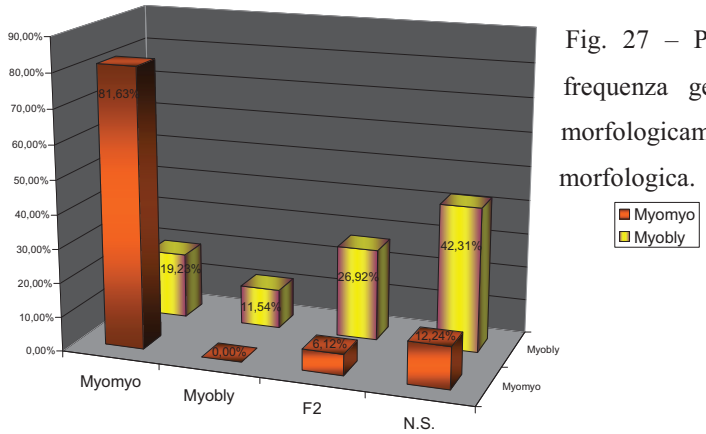


Fig. 27 – Percentuali di assegnazione alle classi di frequenza genotipiche individuate per gli individui morfologicamente assegnati alle due specie su base morfologica.

Myomyo
Myobly

Inoltre si nota anche come la specie *M. blythii* (così morfologicamente determinata) raccolga al suo interno individui geneticamente misti, in misura maggiore rispetto alla specie *M. myotis*. Nel primo caso è molto più elevata la percentuale di animali classificati come F2 o per i quali non è stato possibile giungere con elevata probabilità alla determinazione della classe di appartenenza. Le proporzioni delle diverse classi nelle due specie risultano statisticamente differenti (χ^2 = 28,96; g.l. 3; p=0,00).

La quasi totalità degli individui che non è stato possibile attribuire ad una delle due specie su base morfologica (gli "incerti) sono stati inseriti nella classe *M. myotis* puri.

Un altro parametro di grande significato è il Q-*value*, cioè la proporzione per ogni individuo di genoma attribuibile a *M. myotis*. È inoltre particolarmente interessante calcolare questo valore negli individui morfologicamente determinati, per avere un riferimento. Il pattern di distribuzione del Q-*value* è riportato nel grafico sottostante (Fig. 28) dove si osservano, separatamente per le due specie, le frequenze di individui per valori di *Q-value* differenti.

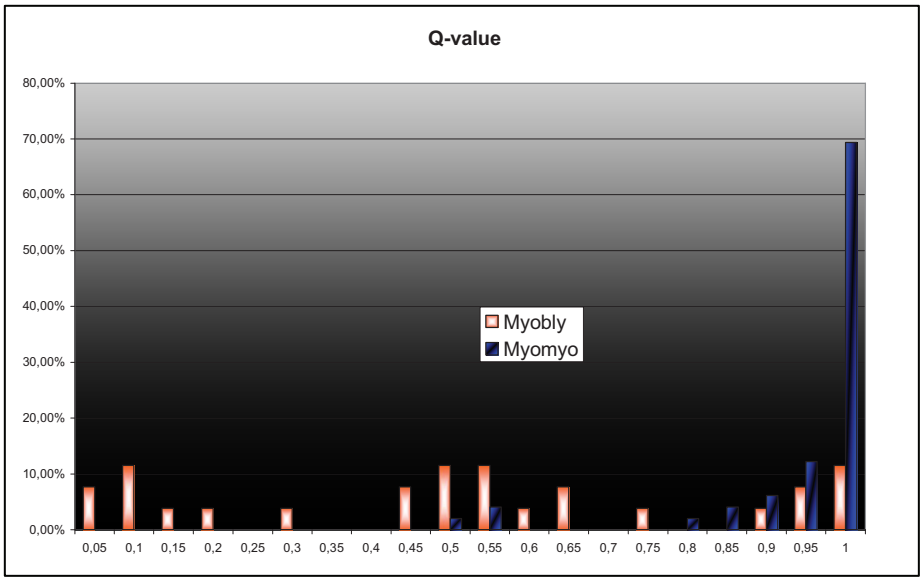
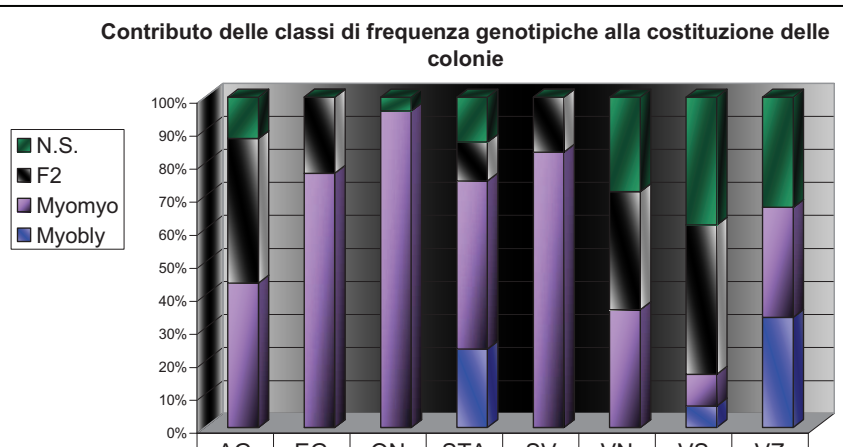


Fig. 28 – Distribuzione dei Q-*value* (in ascissa) negli individui morfologicamente determinati come *Myotis myotis* (=Myomyo) o *Myotis blythii* (=Myobly)

Quasi il 70% degli individui assegnati alla classe pura come *M. myotis* ha un Q-*value* superiore a 0,95. La rimanente porzione di individui ha un valore di Q-*value* superiore a 0,8 eccetto per individui che sono stati geneticamente identificati come ibridi di F2. Per quanto riguarda invece gli individui classificati come *M. blythii*, i valori di Q ad essi attribuiti si ripartiscono lungo tutto il range con valori molto bassi, medi e molto alti. Questi ultimi si riferiscono ovviamente a quegli animali che, a discapito della classificazione morfologica,

sono stati geneticamente attribuiti alla classe *M. myotis*. I valori più bassi corrispondono a individui dove c'è corrispondenza tra classificazione morfologica e genetica, mentre i valori medi sono caratteristici di individui ibridi o di cui non si è ottenuta una elevata probabilità di corretta identificazione.

L'assegnazione di ogni individuo alla classe genotipica di appartenenza ha permesso quindi anche di determinare quale sia la presenza di individui ibridi in ogni colonia. I risultati sono riportati (Fig. 29) in forma di percentuale di ogni classe per ogni colonia.



	AG	EG	ON	STA	SV	VN	VS	VZ
N.S.	12,50	0,00%	4,17%	17,39	0,00%	28,57	38,71	33,33
F2	43,75	18,75	0,00%	15,22	16,67	35,71	45,16	0,00%
Myomyo	43,75	62,50	95,83	65,22	83,33	35,71	9,68%	33,33
Myobly	0,00%	0,00%	0,00%	30,43	0,00%	0,00%	6,45%	33,33

Fig. 29 - Per ogni colonia oggetto di studio è riportato il valore percentuale di individui assegnati alle classi di frequenza genotipica. Myomyo = *Myotis myotis* puro; Myobly = *Myotis blythii* puro; N.S. = campioni per cui la probabilità di assegnazione alle classi è <0,8.

Come si può osservare in Fig. 29 la presenza della classe *M. myotis* è distribuita, seppur in proporzioni differenti, in tutte le colonie. E' interessante notarne la presenza anche per la colonia di Verrua Savoia dove non sono stati campionati individui morfologicamente attribuibili a questa specie e dove non ne sono mai stati catturati in precedenza (Toffoli, comm. pers.). Anche gli individui ibridi di F2 e quelli che non è stato possibile attribuire ad una classe genotipica sono distribuiti in quasi tutte le colonie, in misura minore ad Onferno dove quasi tutti gli individui morfologicamente "incerti" sono stati geneticamente attribuiti alla classe parentale *Myotis myotis*. Molto asimmetrica invece la distribuzione della specie *M. blythii* presente solo nelle colonie di Vezzano e Staffarda e in minima parte a Verrua Savoia sebbene questa fosse l'unica delle colonie considerate monospecifica in riferimento a questa specie. Nelle colonie considerate miste solo Staffarda e Vezzano ospitano individui delle due

classi parentali, mentre Agliè e Onferno ospitano (solo la prima in proporzioni elevate) individui ibridi o non classificabili oltre che la classe parentale *M. myotis*.

3.3.4 Analisi della struttura genetica negli individui assegnati alla classe pura Myotis myotis

In questo terzo livello di analisi si fa riferimento al campione di animali che, oltre ad essere stati determinati morfologicamente come *M. myotis* risultano assegnati alla relativa classe pura dalle analisi genetiche e dai risultati forniti dal software NEWHYBRIDS. Sarebbe stato di grande interesse effettuare le seguenti statistiche per tutti gli individui che sono risultati essere geneticamente puri *M. myotis* e puri *M. blythii*, ma poiché il campione di individui della seconda classe di frequenze genotipiche sarebbe risultato troppo esiguo tali statistiche sono state condotte solo per la prima.

Il campione in questione si compone di 40 individui così ripartiti nelle colonie:

AG	EG	ON	VN	VZ	
n=6	n=8	n=10	n=14		n=2

3.3.4a Test del Linkage Disequilibrium e dell'Equilibrio di Hardy-Weinberg

Il test del LD, sotto l'ipotesi nulla che il genotipo di un locus sia indipendente dal genotipo degli altri loci, non è risultato essere significativo per nessuna coppia di loci; questo significa che tutti i loci sono ereditati indipendentemente uno dall'altro.
L'equilibrio di Hardy-Weinberg non è rispettato solo nella colonia di Egna.

3.3.4b Frequenze alleliche, numerosità allelica (N_a) e ricchezza allelica (k)

Nella seguente tabella sono riportati i valori di numerosità allelica (N_a) per ogni locus e ricchezza allelica (k) per ogni popolazione:

	C113	H29	H19	E24	D9	**K**
AG	2	6	4	6	8	**5,2**
EG	1	8	5	10	10	**6,8**
ON	2	8	6	9	9	**6,8**
SV	2	5	5	6	8	**5,2**
N_a	**2**	**9**	**12**	**18**	**13**	

Tab. 24 – Valori di numerosità allelica (N_a) per ogni locus e ricchezza allelica (k) per ogni popolazione riscontrati per individui geneticamente puri di *Myotis myotis*.

Come si osserva confrontando la Tab. 24 con le tabelle analoghe circa le due specie discriminate su base morfologica, i valori ottenuti sono del tutto simili ai precedenti considerando che la numerosità del campione è diversa.

Negli individui geneticamente puri non si riscontra quindi un minor numero di alleli per locus.

3.3.4c Eterozigosità attesa (H_e) e osservata (H_o)

Nella tabella sottostante (Tab. 25) sono stati riportati i valori di eterozigosità attesa (H_e) e osservata (H_o). Nuovamente i valori di Ho risultano essere leggermente inferiori a H_e, tendenza osservabile soprattutto nei valori calcolati come media tra i loci. In ogni caso si osserva un buon grado di eterozigosità essendo H_o sempre maggiore di 0,5. I risultati sono analoghi a quanto ottenuto nei livelli di analisi precedenti.

per locus			per popolazione		
	Ho	He		Ho	He
C113	0,3583	0,2734	AG	0,7600	0,7739
H29	0,8083	0,8243	EG	0,5533	0,6797
H19	0,7083	0,7671	ON	0,8000	0,7788
E24	0,7500	0,8931	SV	0,6200	0,7174
D9	0,7917	0,9293			
Tutti i loci	**0,6833**	**0,7374**			

Tab. 25 - Valori di eterozigosità attesa (H_e) e osservata (H_o) per gli individui assegnati alla classe *Myotis myotis*

3.3.4d Differenziamento tra popolazioni e F_{ST}

La tabella sottostante (Tab. 26) riporta i valori di F_{ST} per coppie di colonie.

	AG	EG	ON	SV	VZ
AG	-				
EG	0,03696	-			
ON	**0,04881***	**0,07261***	-		
SV	0,05455	**0,08956***	**0,07761***	-	
VZ	0,03926	0,02471	0,00000	0,0463	
F_{ST} = 0,03 (p-*value* < 0,05)					

Tab. 26 – Si riportano i valori di F_{ST} considerando per ogni colonia solo gli individui assegnati alla classe di frequenza genotipica *Myotis myotis*
Il simbolo * identifica valori significativi di F_{ST} (p-*value*<0,05)

I valori di F_{ST} per coppie di colonie non sono sempre significativi e il valore di F_{ST} globale è nuovamente paragonabile ai precedenti e indica una scarsissima differenziazione e struttura all'interno della specie.

3.4 CORRELAZIONE TRA I PARAMETRI BIOMETRICI E L'IDENTITÀ GENETICA

Il grafico sottostante (Fig. 30) mostra come la determinazione morfologica delle specie sulla base delle misure di AV (avambraccio) e LOr (lunghezza orecchio) non sia che scarsamente riconducibile alla discriminazione genetica. Infatti individui che presentano misure tipiche della specie *M. blythii* risultano essere geneticamente assegnati alla classe *M. myotis*; inoltre gli ibridi presentano di volta in volta misure tipiche di una o dell'altra specie così come gli individui non assegnati a nessuna delle classi di frequenze genotipiche.

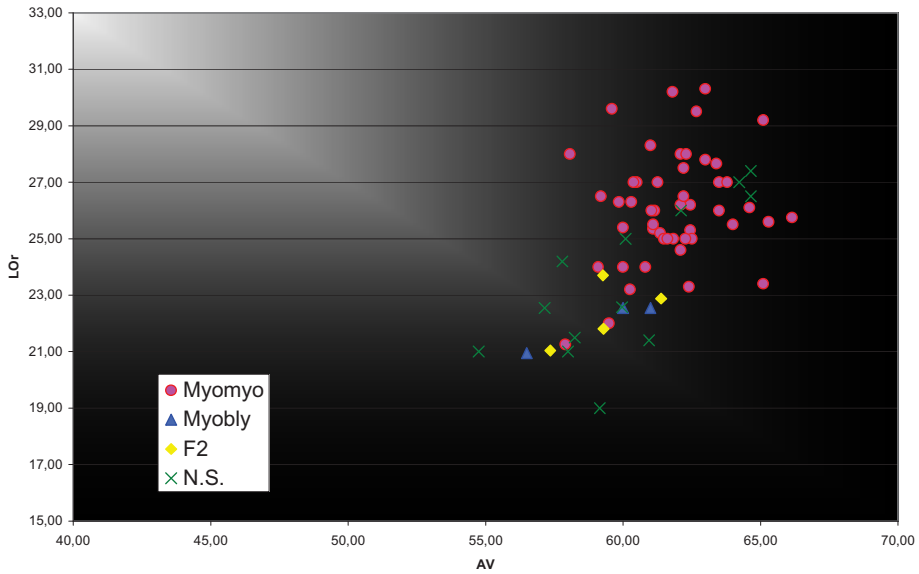


Fig. 30 – Il grafico riporta la distribuzione degli individui secondo le misure di avambraccio (AV) e lunghezza orecchio (LOr). La simbologia assegnata ad ogni individuo fa riferimento alla discriminazione genetica. Myomyo = *Myotis myotis* puro; Myobly = *Myotis blythii* puro; N.S. = campioni per cui la probabilità di assegnazione alle classi è <0,8.

4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro, nato con lo scopo di effettuare un'indagine sulla genetica di popolazione di due specie di Chirotteri europei sottoposti ad attenzione da parte di organismi che si occupano di conservazione della biodiversità, ha permesso tra l'altro di confermare un aspetto dell'evoluzione dei Mammiferi - l'ibridazione - che finora è stato poco considerato o inteso solo in termini di perdita di variabilità.
Lo scopo dei prossimi sottocapitoli è quello di discutere i risultati ottenuti e riconsiderare le conoscenze ecologiche, genetiche e morfologiche attualmente disponibili sulle specie in oggetto. Segue infine un sottocapitolo sulle implicazioni conservazionistiche derivanti da questo lavoro.

4.1. DISCUSSIONE SUI RISULTATI OTTENUTI DALLE ANALISI DEI MARKER MICROSATELLITARI

L'utilizzo di tre diversi livelli di analisi dei dati derivanti dalla tipizzazione di individui appartenenti alle specie *M. myotis* e *M. blythii* è stato necessario per individuare evidenze che potessero far pensare alla presenza di flusso genico tra le due entità.
Il primo livello di indagine, relativo ai campioni appartenenti alle due specie così come sono stati determinati su base morfologica, permette inoltre un confronto con quelli che sono i dati disponibili in letteratura alla luce del fatto che si è finora ricorso all'analisi biometrica anche per studi di filogenesi e struttura genetica delle popolazioni.

La numerosità allelica calcolata per ogni locus risulta maggiore in *M. blythii*, sia considerando il valore assoluto di numero di alleli identificati nelle due specie a livello di ogni singolo locus, sia considerando il fatto che il campione di animali appartenente a questa specie è minore rispetto a quello della specie sorella. Il fatto che alcuni alleli siano esclusivi di una delle due specie, ma che questi siano presenti nella stessa con frequenze basse non risulta essere discriminante per l'identificazione specifica. Non si riscontrano ingenti differenze nel numero di alleli identificato per ogni locus rispetto a Berthier et al. (2006) eccetto che per il locus C113 che nel loro campione di *M. myotis* risulta essere monoallelico per la variante a 7 ripetizioni della sequenza microsatellitare, mentre nel presente lavoro è polimorfico, con un massimo di 6 alleli.
Il test del Linkage Disequilibrium, che ha permesso di determinare l'assenza del fenomeno, indica come le frequenze alleliche osservate non siano influenzate dall'associazione

nell'eredità di coppie di alleli di differenti loci e conferma l'idoneità degli stessi a svolgere la funzione di marker molecolari in questa indagine.

Come si può osservare nel capitolo Risultati, l'Equilibrio di Hardy-Weinberg non è sempre rispettato nelle colonie, in ciascuno dei tre livelli di analisi. Questo avviene per molte colonie non considerando la suddivisione all'interno delle stesse tra componente *myotis* e *blythii* (secondo discriminazione morfologica). I risultati sono conformi all'attesa assumendo l'esistenza di due entità distinte (con frequenze alleliche presumibilmente differenziate), ma considerate in un campione unico. Nei rimanenti livelli invece accade solo per la colonia di Egna per la specie *M. myotis* (così considerata prima a livello di determinazione morfologica e poi a livello di discriminazione genetica) e per la colonia di Verrua Savoia per la specie *M. blythii* (determinata su base morfologica). Rimane comunque inspiegabile, a questo punto dell'analisi, la deviazione rispetto l'equilibrio per la colonia di Verrua Savoia, considerata essere monospecifica per la specie *M. blythii*.

Osservando e confrontando l'eterozigosità attesa e quella osservata si notano sempre valori leggermente inferiori della seconda rispetto alla prima, indicando una carenza di eterozigoti. Tali valori sono comunque elevati e del tutto comparabili con quanto ottenuto da Ruedi et al. (in press.) per la specie *M. myotis* nel territorio italiano (range H_O 0,59-0,74) e in linea con la media europea (media H_O 0,73) tratta dallo stesso lavoro. Tali valori sono inoltre simili a quanto riportato in Berthier et al. (2006) per le due specie separatamente.

L'effetto Wahlund, ovvero la riduzione osservata di eterozigoti rispetto ai valori attesi, dovuta alla suddivisione di una popolazione in sottopopolazioni, potrebbe essere alla base dei minori valori di eterozigosità osservati rispetto a quelli attesi.

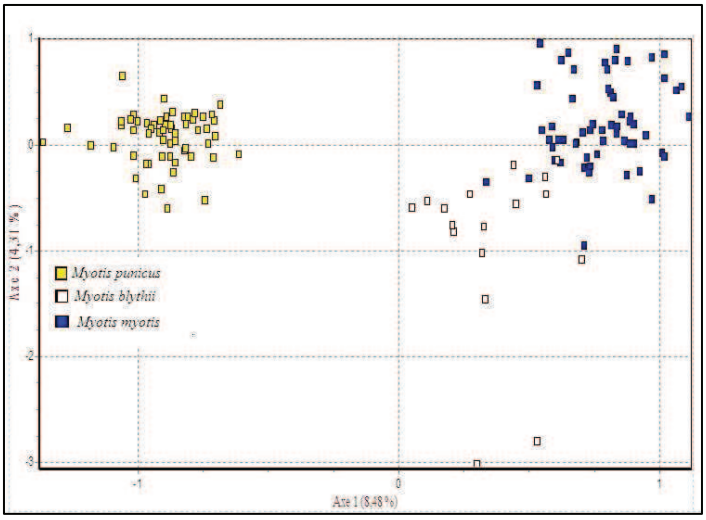
Allo stesso tempo sembra poco plausibile una struttura genetica marcata tra le colonie studiate. I valori di F_{ST} sono infatti molto bassi e variano nei tre livelli di analisi da 0,02 a 0,09. Si ricorda che il valore di F_{ST} (Wright, 1951) può variare tra 0 (per popolazioni tra loro indifferenziate) e 1 (per popolazioni totalmente differenti).

I valori più bassi sono stati ottenuti confrontando le popolazioni all'interno della stessa specie (sia considerando la discriminazione a livello morfologico che a livello genetico). Quindi possiamo dire che almeno per il territorio italiano le popolazioni delle due specie sono sostanzialmente omogenee e il risultato è del tutto analogo a quello ottenuto da Ruedi et al. (in press.) dove il range di F_{ST} per coppie di colonie di *M. myotis* in Italia varia da 0,013 a 0,067 e dove non è stato ugualmente identificato un pattern di Isolamento da Distanza. I risultati sono analoghi anche confrontando per ogni specie le tre aree geografiche indagate identificate come: Piemonte, Trentino ed Emilia Romagna.

Il valore di F_{ST} più elevato è stato invece trovato a livello interspecifico confrontando quindi le colonie considerando separatamente la componente *myotis* e la componente *blythii* (secondo determinazione morfologica). Tale valore è comunque di molto inferiore ai valori che si riscontrano per esempio tra popolazioni geograficamente distanti in *Rhinolophus ferrumequinum* (F_{ST} >0,2) (Rossiter et al., 2000) o in *Pipistrellus pipistrellus* e *Pipistrellus pygmaeus* (Racey et al., 2007). Confrontando i valori di F_{ST} tra *M. myotis* e *M. blythii* e tra colonie all'interno delle specie possiamo dire che le differenze interspecifiche sono circa 4,5 volte maggiori delle differenze intraspecifiche. In ogni caso anche il valore di F_{ST} intespecifico è molto ridotto considerato il livello tassonomico a cui avviene il confronto e considerato che tale valore, minore di 0,1, rientra tra i valori che per altre specie sono stati riscontrati tra popolazioni. Tali risultati non concordano con quanto ottenuto in Berthier et al. (2006) dove le differenze tra le specie risultano essere 10 volte maggiori rispetto alle differenze intraspecifiche, con valori di F_{ST} rispettivamente di circa 0,2 e 0,02. Si consideri però che per tale lavoro è stata considerata solo la colonia di Agliè e un numero molto più elevato di individui. E' stato possibile ottenere un ulteriore valore di F_{ST} interspecifico di confronto utilizzando i genotipi scaricabili al link http://www.unil.ch/webdav/site/dee/shared/datasets/Myotis_Gibraltar.xls relativi a Castella et al. (2000), prendendo un campione casuale di 18 esemplari europei di ogni specie. E' stato ottenuto un risultato di F_{ST} = 0,18, cioè paragonabile ai valori intraspecifici riscontrati in altre specie.

Estremamente interessanti anche i risultati dell'AMOVA, che dimostrano come la componente più significativa di variabilità genetica nel campione costituito da animali morfologicamente determinati sia da attribuire alle differenze tra singoli individui. Le differenze genetiche tra le due specie contribuiscono solo in minima parte alla variabilità complessiva e un contributo ancora minore deriva dalle differenze tra popolazioni di una stessa specie. In Castella et al. (2000), studio che ha condotto alla determinazione grazie ad analisi genetiche della nuova specie *Myotis punicus*, la percentuale di variabilità attribuibile alla differenza tra le specie è pari al 33,3% rispetto al nostro valore di 4,75%. Poiché tali valori sono molto diversi, possiamo affermare che le differenze tra le due specie *M. myotis* e *M. blyhtii* (secondo determinazione morfologica) sono decisamente minori delle differenze interspecifiche riscontabili tra *M. myotis* e *M. punicus*. Inoltre i valori di F_{ST} riscontrati per coppie di popolazioni di specie differenti si attestano intorno a 0,3 rispetto al valore qui trovato di 0,09 (Castella et al., 2000).

Dalle prime analisi dei dati microsatellitari sembra quindi che non esista una netta distinzione tra le entità *M. myotis* e *M. blythii* per quanto riguarda le frequenze alleliche. L'Analisi Fattoriale delle Componenti, che distribuisce gli individui in uno spazio delimitato da assi che descrivono la variabilità dei dati, conferma le evidenze precedenti. Nel grafico si può osservare come gli individui morfologicamente determinati come *M. myotis* sembrano essere più omogenei rispetto a quelli determinati come *M. blythii* i quali si distribuiscono in un'area più diffusa. Inoltre è interessante notare la sovrapposizione che si riscontra tra le due specie la quale non permette la definizione di due gruppi distinti. Prendendo nuovamente in considerazione i genotipi di Castella et al. (2000) il pattern per i due grossi *Myotis* europei è lo stesso, ma la specie *Myotis punicus* si colloca invece in un'area totalmente distaccata (Fig. 31).



Quindi, seppur si confrontano entità allo stesso livello tassonomico, la distinzione tra *M. myotis* e *M. blythii* è molto meno marcata di quanto avviene confrontando le stesse con un'altra specie.

Fig. 31 – Grafico FCA comprendente individui di *Myotis myotis, Myotis blyhtii e Myotis punicus*

Anche con il modello statistico bayesiano sviluppato con il software STRUCTURE si ripropone la stessa situazione di impossibilità di discriminare chiaramente due gruppi corrispondenti alla suddivisione in specie su base morfologica. Nuovamente, come per l'analisi FCA, manca quindi la corrispondenza tra l'identificazione di campo e l'identificazione genetica. Ci si aspetterebbe che tutti gli individui biometricamente identificati come *M. myotis* fossero assegnati con alta probabilità ad uno dei cluster e tutti quelli identificati come *M. blythii* ad un altro. Invece parte degli individui determinati morfologicamente come appartenenti ad una specie risultano assegnati con elevate probabilità assegnati ad un cluster ed un'altra parte all'altro. Inoltre molti individui non raggiungono valori di probabilità che permettano di assegnarli ad uno o all'altro cluster.

Il più elevato valore di massima verosimiglianza dei dati è stato sempre ottenuto, in tutte le prove effettuate, per K=1, cioè per la discriminazione di un unico cluster. Escludiamo in questo modo la possibilità che la difficoltà di identificare due cluster sia attribuibile

all'esistenza di un numero maggiore di gruppi (quindi di una suddivisione del pool genico in sottopopolazioni distinte).

In Randi (2007) questo stesso approccio metodologico è in grado di discriminare due clusters distinti identificati come *Felis silvestris silvestris* e *Felis silvestris catus* nel caso studio dell'ibridazione tra gatto selvatico e gatto domestico o come *Canis lupus* e cane domestico nel caso studio dell'ibridazione tra lupo e cani ferali. Si noti come in Lecis et al. (2006) il gatto selvatico italiano si collochi separatamente rispetto al gatto domestico in un grafico di FCA con un valore significativo di F_{ST} di 0,14. Il gatto selvatico ungherese si colloca invece in una posizione intermedia andandosi in parte a sovrapporre con il gatto domestico con il quale risulta essere fortemente ibridato e il valore di F_{ST} tra questi due gruppi scende a 0,04. Lo stesso valore tra lupo e cane domestico risultano invece essere di 0,24 (Verardi, 2006) e la commistione dei due pool genici risulta limitata. La situazione è quindi simile a quella qui indagata dove le due specie in parte si sovrappongono e presentano un valore di F_{ST} intermedio tra quello riscontrato nei casi precedentemente evidenziati tra specie (o sottospecie) o specie ibridate. Si tenga comunque in considerazione il fatto che nel caso del genere *Felis* si fa riferimento ad entità tassonomiche sottospecifiche, mentre nel caso del genere *Myotis* facciamo riferimento a entità tassonomiche a livello di specie quindi ci saremmo aspettati di trovare valori di F_{ST} più alti e soprattutto una maggior separazione delle due specie nell'Analisi delle Componenti Fattoriali.

Uno dei limiti di questa analisi risiede nel fatto che le frequenze alleliche delle specie pure devono essere in Equilibrio di Hardy-Weinberg e non si sa quanta influenza abbia il non rispetto di questa condizione nell'assegnazione di un individuo ad un cluster (Verardi, 2006). Considerando significativo un p-*value*<0,001 il gruppo di individui morfologicamente identificati come *M. blythii* non rispetta l'equilibrio per 2 loci su 5.

Con il software STRUCTURE è stato possibile attribuire con buona probabilità ad uno dei clusters solo il 35% degli individui determinati morfologicamente. In particolare i *M. blythii* presentano una percentuale di assegnazione al cluster 1 decisamente maggiore rispetto a quanto avviene per *M. myotis* nell'assegnazione all'altro cluster. Il risultato è esattamente opposto a quanto ottenuto con il software NEWHYBRIDS come vedremo in seguito. Questo si può però spiegare con il fatto che i *M. myotis* si collocano nel grafico FCA in modo del tutto sovrapposto a parte dei *M. blythii,* sebbene i primi siano più compatti nella distribuzione. In sostanza, nel tentativo di identificare due gruppi distinti, l'algoritmo di STRUCTURE separa i *M. blythii* che occupano un'area dello spazio non condivisa con *M. myotis* il che permette di classificare parte degli individui in un primo ipotetico cluster. Il secondo cluster invece è composto dagli individui identificati come *M. myotis* che si collocano all'estremo

opposto (rispetto al primo cluster) dello spazio. Sebbene quindi molti *M. myotis* si trovino in un'area ristretta (costituendo apparentemente un gruppo con frequenze alleliche proprie), la classificazione di molti individui in posizione intermedia tra i gruppi individuati risulta incerta. In conclusione i due possibili cluster identificati sono quelli approssimativamente evidenziati in Fig. 32 e la gran parte dei *M. myotis* ricade un'area di incertezza.

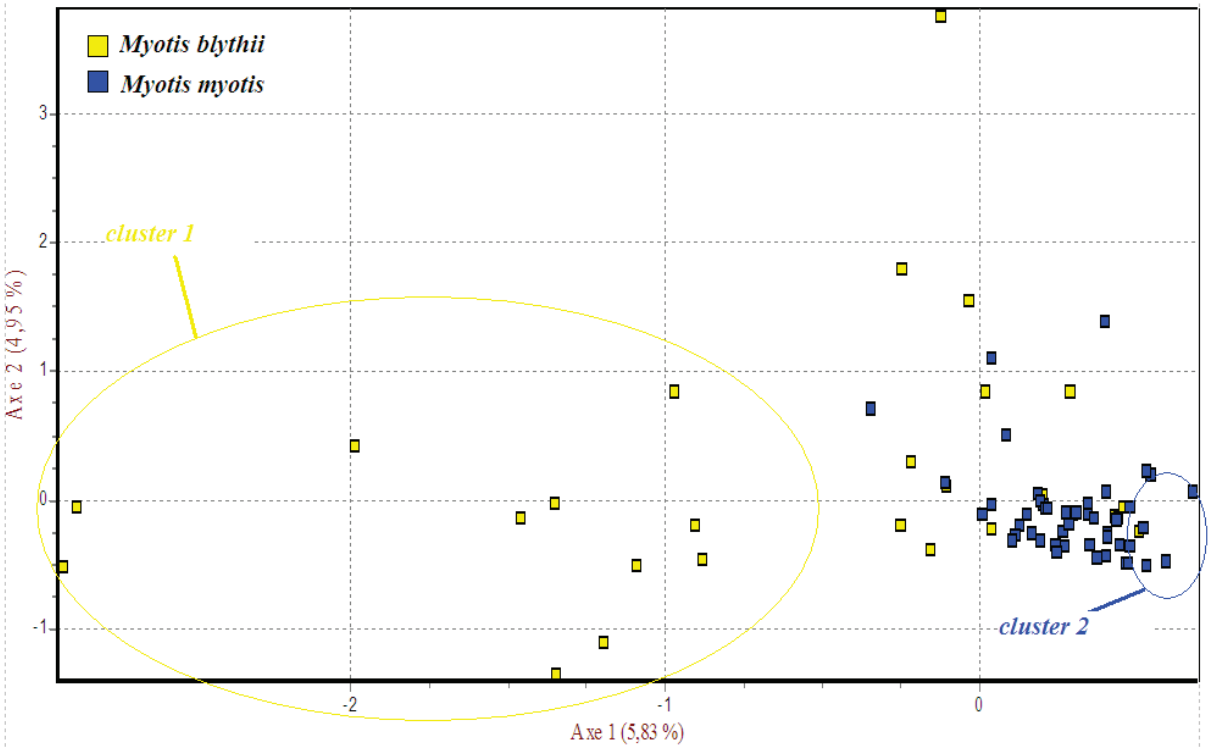


Fig. 32 – Clusters identintificati con il software STRUCTURE nell'ipotesi di K=2

Rimane il fatto che l'evento maggiormente probabile è l'esistenza di un unico cluster.

Il metodo di Anderson e Thompson (2002) sviluppato nel software NEWHYBRIDS ha permesso di individuare la presenza, nel campione complessivo dei 171 individui tipizzati, di una percentuale di ibridazione di quasi il 20%. Tale valore si discosta da quanto osservato da Berthier et al. (2006) dove il tasso di ibridazione individuato è stato solo del 10%. Bisogna però fare due considerazioni: la prima è che quest'ultimo valore è probabilmente sottostimato dal momento che sono stati tipizzati solo individui identificati a livello di specie sulla base di informazioni morfologiche per cui potenziali ibridi potrebbero essere stati esclusi dall'analisi. Inoltre il valore soglia di probabilità considerato significativo per determinare un individuo come appartenente ad uno delle classi era 0,5 invece che 0,8. Se anche noi avessimo utilizzato 0,5 (risultati non mostrati) la percentuale di ibridazione sarebbe salita al 28% e si sarebbe quasi del tutto annullata la percentuale di individui non classificati. Questi, anche nel caso del valore soglia di probabilità pari a 0,8, sebbene non classificati sono comunque individui il cui genoma non è chiaramente attribuibile ad una delle due classi parentali e avendo ipotizzato

solo l'esistenza di 6 classi di frequenze genotipiche non è stato possibile inserirli in nessuna di quelle individuate, ma possono essere considerati come ibridi di generazioni successive (Wallace, 2006) portando ad una percentuale di possibili ibridi di oltre il 30%. Nuovamente la differenza tra i valori osservati nel presente lavoro e quelli di Berthier et al. (2006) può essere influenzata dal fatto che in quest'ultimo lavoro il tasso di ibridazione per il territorio italiano è stato valutato solo nella colonia di Agliè in un numero di individui molto maggiore di quello qui disponibile per la stessa colonia ed escludendo gli individui morfologicamente non identificabili. Per confrontare comunque le analisi di Berthier et al. (2006) con i risultati qui presentati si è calcolata la percentuale di ibridazione considerando solo animali morfologicamente determinati e una soglia di probabilità di 0,5 escludendo gli individui di incerta determinazione morfologica. Tale percentuale è risultata in un valore del 18%.

Osservando il pattern di assegnazione degli individui alle classi di frequenze genotipiche si notano subito alcune tendenze:

- l'unica classe di ibridi che si riscontra nel campione è la F2 cioè degli ibridi di seconda generazione; tutte le altre classi non state mai ritrovate e ricoprono, se presenti, porzioni minime della probabilità complessiva assegnata ad ogni individuo
- gli individui assegnati alla classe *M. myotis* assumono valori di probabilità per questa classe in media superiori rispetto a quanto accade per l'assegnazione alle altre classi rilevate
- una proporzione maggiore di individui morfologicamente determinati come *M. myotis* sono assegnati alla relativa classe parentale rispetto a quanto non avvenga per la specie sorella i cui individui sono in buona parte classificati come ibridi F2
- la distribuzione delle classi di frequenza genotipica non è omogenea nelle colonie

Tutti questi punti (eccetto l'ultimo di cui non si hanno le informazioni necessarie) sono concordi con i risultati di Berthier et al. (2006).

Il genoma della specie *M. myotis* è meno "inquinato" rispetto al genoma di *M. blythii*, il quale sembra a sua volta contenere importanti porzioni del genoma della prima specie. Questo è osservabile attraverso i valori di Q che indicano la proporzione di genoma, per ogni individuo, derivante dalla specie *M. myotis*. Essi sono distribuiti lungo il range da 0 a 1 abbastanza omogeneamente per gli individui morfologicamente classificati come *M. blyhii*. Ciò indica che animali con le caratteristiche morfologiche di un *M. blythii* possono essere geneticamente classificati come *M. myotis* o comunque contenere nel loro genoma porzioni significative originarie di questa. Viceversa il genoma di *M. myotis* è quasi interamente originario della stessa e lo si può definire "puro". Inoltre gli individui ibridi riscontrati tra quelli identificati

morfologicamente ricadono in gran parte tra i *M. blythii*, i quali tra l'altro solo in pochi casi sono classificati nella classe omonima pura. In conclusione, nell'ipotesi di ibridazione tra le due specie, il pool genico assegnabile alla classe *M. myotis* tende a mantenersi intatto, mentre sono rari genomi totalmente originari della specie sorella. Il meccanismo è probabilmente regolato da una qualche forma di selezione di ibridi. Per esempio si potrebbe ipotizzare una parziale incompatibilità riproduttiva (ma non per forza genetica) tra gli ibridi e i *M. myotis* puri, che contribuirebbe al mantenimento del pool genico di questa specie. Al contrario ciò potrebbe non avvenire per gli individui della specie *M. blyhtii.* Il reincrocio di individui ibridi con individui geneticamente puri di questa specie potrebbe risultare quindi in animali geneticamente misti, ma assimilabili morfologicamente a *M. blythii.*

Il valore medio del Q-*value* per gli individui morfologicamente determinati *M. blythii*, ma geneticamente ibridi o "non significativi" è di 0,44 (range 0,06-0,86; dev.st. 0,21) raggiungendo valori di circa 0,5 per gli animali classificati come F2, facendo pensare che questi siano ibridi effettivi di seconda generazione. Al contrario il Q-value medio degli individui morfologicamente assegnati alla specie *M. myotis,* ma geneticamente ibridi o non classificati, è 0,72 (range 0,45-0,88; dev.st. 0,177). Ossia gli ibridi morfologicamente assimilabili a *M. blythii* posseggono una maggior proporzione di genoma di questa specie e viceversa.

L'assenza di individui assegnati a classi ibride diverse da F2 può avere diverse spiegazioni. In Barilani et al. (2007) l'assenza di F1 tra gli ibridi del genere *Alectoris* viene spiegata con il modello della "zona di tensione" (Barton e Hewitt, 1985) secondo il quale ci sarebbe un equilibrio tra l'espansione degli ibridi e la selezione contro gli ibridi che solo raramente riuscirebbero a riprodursi. Questo assume però che il tasso di ibridazione riscontrato sia molto ridotto, aspetto che non concorda con i risultati ottenuti.

Un'altra spiegazione viene fornita in parte in Anderson e Thompson (2002) e in parte in Wallace (2006) nell'indagine sull'ibridazione tra specie della famiglia Orchidaceae. Nella descrizione del modello sulla base del quale è stato costruito il software NEWHYBRIDS si sottolinea come non si possa discriminare tra ibridi di seconda generazione (F2) e ibridi di generazioni successive. In Wallace (2006) gli individui per cui non si giunga ad una classificazione certa sono trattati come potenziali ibridi di generazioni successive alla seconda, considerando che allo stesso modo potrebbero esserlo anche quelli classificati come F2 soprattutto per Q-*value* lontani da 0,5. Alla luce di queste considerazioni e considerato l'elevato numero di individui "non classificati" nel nostro campione è elevato il tasso di individui ibridi per generazioni successive alla prima e alla seconda. Essi corrispondono al

21,05% di tutti i campioni considerati e ad una percentuale pari al 42,31% tra gli individui morfologicamente determinati come *M. blythii* e solo del 12,24% tra quelli determinati come *M. myotis*. Possiamo quindi pensare che sia consistente la presenza di ibridi di generazioni successive alla seconda e che non sia possibile (o almeno raro) trovare prime generazioni di ibridazione dal momento che la loro produzione è ridotta dell'esistenza di una qualche forma non troppo sofisticata di barriera riproduttiva (Mallet et al., 1998).

Ovviamente lo stesso pattern è osservabile anche a livello di singole colonie. Il campionamento ha previsto il prelievo di campioni (tra tessuti e escrementi) in colonie miste e monospecifiche. Risulta evidente come le colonie monospecifiche per la specie *M. myotis* siano composte principalmente da animali classificati come appartenenti alla corrispettiva classe parentale. Si tratta nello specifico delle colonie di Egna, Onferno, e Santa Vittoria d'Alba dove la percentuale di ibridazione è molto ridotta o comunque limitata se rapportata alle altre colonie. Tra le colonie considerate miste (Agliè, Staffarda, Venaria Reale e Vezzano) si registrano percentuali di ibridazione sempre superiori al 30%. L'unica colonia considerata monospecifica per la specie *M. blythii* è anch'essa caratterizzata da un'elevata percentuale di individui ibridi, superiore al 70%. Si sottolinea in questa colonia la presenza di individui identificati geneticamente come *M. myotis*, a dispetto di quella che era stata la determinazione biometrica. Uno di essi era stato infatti classificato come appartenente alla specie sorella e l'altro mostrava caratteristiche morfologiche tra loro discordanti. Considerando eventuali errori di assegnazione alla classe di frequenza genotipica, magari dovuta alla elevata proporzione di genoma originario della specie *M. myotis*, si osserva la presenza di ibridi in corrispondenza di un sito ove è presente apparentemente (o almeno in grande proporzione) una sola specie parentale, il che è un'ulteriore prova a favore di un fenomeno di ibridazione passato e prolungato nel tempo e non solo legato alla esistenza di colonie miste. Anche l'assenza di individui identificati geneticamente come puri *M. blythii* nelle colonie di Venaria Reale e Agliè è prova dell'esistenza di ibridazione anche in assenza di individui puri delle due specie parentali.

Alla luce delle analisi effettuate è possibile quindi concludere l'esistenza di flusso genico, seppur sbilanciato, tra le due specie e quindi assenza di isolamento riproduttivo e genetico dal momento che la prole ibrida prodotta è ampiamente feconda.
Tale fenomeno è stato attualmente dimostrato per parte del territorio italiano (in questo lavoro) e in Berthier et al. (2006) per una colonia nel sud della Svizzera (Valais). Poiché in tutte queste aree le due specie sono simpatriche, sarebbe estremamente interessante verificare

l'andamento del fenomeno nello spazio per determinare se è attualmente presente una fascia di ibridazione, quale sia il suo sviluppo e se il suo stato possa essere descritto da un modello a "zona di tensione" o a "superiorità degli ibridi". Tale ipotesi si potrebbe però già escludere visto l'alto tasso di ibridazione riscontrato. Ci si può chiedere se esiste da qualche parte in Europa un pool genico "non inquinato" della specie *M. blythii*. Osservando la distribuzione delle specie questo sembrerebbe alquanto improbabile: in Europa ci sono infatti diffuse evidenze di condivisione delle *nurseries* (Roesli et al, 2004 in Svizzera; Albayrak 2002 in Turchia; Borda et al, 2004 in Romania; Binari e Géczi, 2000 in Ungheria; Cosson, com.pers. in Francia per citarne solo alcuni oltre ai numerosi esempi per l'Italia) oltre al fatto che le specie sono in simpatria in Europa in tutte le aree di presenza di *M. blythii*. Sebbene l'areale della specie *M. blythii*, considerato in tutte le sue sottospecie, si estenda dall'estremo sud-ovest dell'Europa fino alla regione himalayana, sembra poco attendibile includere nella specie nominale la sottospecie *blythii* dal momento che gli aplotipi mitocondriali sono chiaramente distinti (Ruedi e Mayer, 2001; Berthier et al., 2006 sebbene gli autori non abbiano mai considerato in alcuna misura tale ipotesi). In questo modo l'areale di *M. blythii*, e nel dettaglio della sottospecie *oxygnathus*, sarebbe completamente sovrapposto a parte dell'areale della sottospecie *M. m. myotis* in un territorio che comprende l'Europa del sud (Fig. 9).

In letteratura esistono informazioni che potrebbero far pensare alla presenza di flusso genico tra le specie anche in altre aree di simpatria non ancora indagate. Per esempio in Dietz e Von Helversen (2004) viene riportato come solo una minima parte degli esemplari di *M. blythii* osservabili sia caratterizzato dalla presenza dello spot bianco sul capo, rispetto a quanto osservato nel resto d'Europa.

Ovviamente si tratta solo di ipotesi preliminari poiché gli studi dettagliati sulla struttura genetica delle due specie di grossi *Myotis* europei ritrovati in bibliografia fanno riferimento a un'area che comprende la Svizzera, l'Italia, la Francia e la Spagna (Ruedi et al., in press; Berthier et al., 2006; Ruedi e Castella, 2003).

Possiamo quindi concludere che, almeno per le aree indagate in questo lavoro e in Berthier et al. (2006), tra *M. myotis* e *M. blythii* intercorre flusso genico attraverso il fenomeno dell'ibridazione; poiché questi dati forniscono l'evidenza di un processo attualmente in atto e datato nel tempo oltre che frequente, è opportuno verificare se questo comporta anche l'omogenizzazione dei pool genici originariamente corrispondenti alla suddivisione in specie o se invece sia ancora possibile identificare pool genici distinti. Abbiamo visto che il genoma degli individui geneticamente discriminati come *M. myotis* è puro cioè sembra non esserci mescolamento con il genoma originario della specie sorella. Si può trattare quindi di ibridazione asimmetrica la quale tende a preservare il pool genico attribuibile all'entità *M.*

myotis come si osserva dal grafico FCA e come dimostrano i risultati di NEWHYBRIDS. Sarebbe quindi più corretto definire il fenomeno con il termine di "**introgressione**" o "**introgressione diffusa**", nel caso si potesse dimostrare la presenza di aree in cui i pool genici delle specie rimangono distinti. Queste definizioni sono corrispondenti rispettivamente alle tipologie 6 e 5 individuate in Allendorf (2001).

Il quesito a cui trovare risposta è quindi se sia o meno possibile definire la presenza di una struttura genetica derivante dai dati microsatellitari che permetta di discriminare due componenti corrispondenti alle due specie o se al contrario non esista alcuna struttura genetica significativa a questo livello tassonomico. Alcuni punti di questa discussione sono concordi con l'affermazione che il pool genico di *M. myotis* sia stato conservato intatto e relativamente puro. Essi sono:

- il collocamento degli individui *M. myotis* nel grafico FCA i quali costituiscono un gruppo decisamente più omogeneo di quanto non accada per i *M. blythii* (secondo determinazione morfologica)
- la presenza di un pattern di ibridazione decisamente asimmetrico che permette di riconoscere un marcato processo di introgressione della specie *M. myotis* in *M. blythii.*

Viceversa ci sono altre evidenze derivanti da quelle elencate che tendono a diminuire la sostenibilità dell'ipotesi di pool genici distinti:

- l'assenza di alleli microsatellitari discriminanti per l'identificazione specifica
- l'assenza di un pattern dei valori di F_{ST} ai tre livelli di analisi che possa sostenere l'ipotesi. Infatti tali valori, sebbene la maggior parte significativi, si collocano in un range tipico della struttura genetica intraspecifica piuttosto che interpecifica. Valori del tutto simili sono stati riscontrati anche in Ruedi e Castella (2003) per la sola specie *M. myotis* sostenendo l'argomentazione che lo stesso pattern di struttura genica si trova a livello sia inter- che intraspecifico. I valori da noi ottenuti per il confronto di popolazioni di specie distinte avrebbero dovuto essere decisamente più elevati.
- l'assenza dell'identificazione di due clusters corrispondenti alle due specie morfologicamente determinate in quanto la sovrapposizione dei genotipi è ampia e quasi del tutto priva di una struttura ben determinata (non si riscontrano ad esempio due gruppi distinti con la presenza di individui intermedi, che è la condizione tipica di altri fenomeni noti di ibridazione es. Randi, 2007).
- la presenza di ibridi sia tra individui morfologicamente assegnati alla specie *M. myotis* che per quelli assegnati alla specie *M. blyhtii* e quindi l'assenza di una corrispondenza tra la morfologia e lo status genetico.

Attualmente le aree di simpatria e di ibridazione individuate corrispondono al nord Italia, alla Svizzera e, sebbene con pochissimi dati, il centro Italia e apparentemente anche il resto dell'Europa (Fig. 31). Sarebbe fondamentale un'indagine genetica sulle popolazioni di *M. myotis* che occupano le regioni a maggior latitudine dell'area di distribuzione della specie, in quanto questo permetterebbe di definire la distribuzione spaziale del fenomeno dell'ibridazione e di quantificare l'influenza di questo nella compromissione del pool genico di *M. myotis* nel resto d'Europa. Le informazioni note attualmente ci permettono però di affermare che non è possibile considerare due pool genici distinti per i grossi *Myotis* europei nelle aree finora indagate.

4.2 LE CONSEGUENZE DELL'IBRIDAZIONE SULL'ECOLOGIA E LA MORFOLOGIA DELLE SPECIE

In letteratura esistono numerosi studi, facenti capo in buona parte allo stesso gruppo di lavoro, sull'ecologia e la morfologia di *M. myotis* e *M. blythii*. La discriminazione su base morfologica in campo, e quindi su animali vivi, è stata resa possibile solo dopo il lavoro di Arlettaz et al. del 2001 attraverso una funzione discriminante che coinvolge le misure della lunghezza dell'orecchio, avambraccio e, per animali in cui queste non fossero sufficienti, anche la larghezza dell'orecchio. Altri due fattori che sembrano essere discriminanti sono la distanza tra canino e terzo molare sulla mascella e la presenza di uno spot bianco sul capo che permette di determinare con certezza gli individui della specie *M. blythii* (ma solo in Europa centrale) (Dietz e vonHelversen, 2004). Non è necessaria una grande esperienza di campo per dire che non sono rari i casi in cui la determinazione, nonostante un buon numero di criteri discriminanti, non è possibile con certezza assoluta. Solo tra i campionamenti effettuati per questo studio la percentuale di individui morfologicamente intermedi è stata del 17,5% e del 5% in Berthier et al. (2006). E' chiaro che tra specie sorelle la ridotta divergenza morfologica rende difficoltosa la classificazione. Tra i Chirotteri europei esistono però altri casi di specie geneticamente e morfologicamente simili, ad esempio *Pipistrellus pipistrellus* e la *syster species Pipistrellus pygmaeus*, le quali presentano comunque caratteri morfologici chiaramente distinti (Dietz e vonHelversen, 2004) oltre che segnali di ecolocalizzazione, habitat di caccia, siti riproduttivi e caratteristiche genetiche totalmente diverse (Jones e Barrat, 1999; Kalko e Schnitzler, 1993; Racey et al., 2007). Lo stesso dicasi per specie che a livello genetico non hanno un'alta percentuale di divergenza (pari a meno del 2% per i geni del *cytb* e *nd1* in Ruedi e Mayer, 2001) come nel caso di *Eptesicus serotinus* e *Eptesicus nilssonii* che

però sono impossibili da confondere su base morfologica, oltre che attraverso l'analisi dei sonogrammi e l'ecologia.

Le divergenze morfologiche tra *M. myotis* e *M. blythii* si sono probabilmente evolute come adattamenti a differenti habitat di caccia e a differenti prede (Arlettaz et al., 1993; Arlettaz, 1996), ma esse si riducono notevolmente in presenza di fonti trofiche non limitanti (Arlettaz et al., 2001). Non è possibile inoltre notare alcuna differenza nell'utilizzo di siti riproduttivi (spesso totalmente condivisi) e nella struttura delle emissioni ultrasonore. Eppure queste sembrano nei Chirotteri essersi evolute come adattamenti alla nicchia trofica e all'habitat di caccia (Jones e Holderied, 2007) tanto che non sono rari fenomeni di convergenza nell'evoluzione dei segnali di ecolocalizzazione anche tra specie non strettamente imparentate; ciò avviene ad esempio tra la famiglia dei Rhinolophidae e la specie *Pteronotus parnellii* della famiglia Mormoopidae o tra la famiglia Megadermatidae e la famiglia Nycteridae o ancora tra il Chirottero insettivoro neotropicale *Myotis nigricans* e il genere *Pipistrellus*. E allora è interessante chiedersi perché un'ecologia così apparentemente diversa, quale quella tra i due grossi *Myotis* europei non coincida con evidenti differenze a livello di segnali di ecolocalizzazione. Come è stato osservato in questo lavoro la classificazione morfologica non coincide con la discriminazione su base genetica e questo è maggiormente evidente in *M. blythii*, ma osservabile anche in *M. myotis*. Sono infatti presenti alte proporzioni di ibridi che in quanto tali potrebbero occupare una nicchia ecologica intermedia a quella delle specie parentali oppure totalmente distinta oppure ancora essere in grado di esplorare entrambe le nicchie parentali. Non sono attualmente noti studi sull'ecologia delle due specie che considerino la presenza di ibridi. Arlettaz (1996) riporta però come entrambe possano essere considerate opportuniste andando ad esplorare habitat che non sono quelli considerati tipici della specie e come la segregazione di nicchia tenda a diminuire fino talvolta a scomparire se le condizioni lo consentono. Si noti però che in questo caso, in confronto ad altre specie di Chirotteri, la flessibilità delle specie è ristretta ad un range limitato di habitat. Gli habitat utilizzati per la caccia risultano infatti essere limitati a (Arlettaz, 1996) ambienti forestali con radure, ambienti prativi con folta e alta vegetazione erbosa o ambienti aperti con vegetazione erbosa bassa. Le prime due tipologie sono considerate tipiche rispettivamente del Vespertilio Maggiore e del Vespertilio Minore, mentre la terza è un ambiente di caccia considerato transitorio e condiviso. Specie considerate opportuniste come *Pipistrellus pipistrellus* (Lustrat, 2001) sono associate ad un elevato numero di differenti tipologie di habitat trofici e molto spesso si trovano in ambienti fortemente antropizzati. Sembrerebbe quindi più plausibile che l'ampliamento della nicchia trofica e ecologica per le due specie in

esame si possa attribuire, piuttosto che all'opportunismo delle specie, all'occupazione di una nicchia intermedia spiegabile in due modi:

- le differenze ecologiche sviluppate durante la fase allopatrica (si veda il prossimo paragrafo) non sono state tali da precludere l'utilizzazione di quella che era la nicchia originaria
- l'ibridazione favorisce l'occupazione di una nicchia intermedia date le caratteristiche genetiche miste degli individui (Seehausen, 2004).

Qualsiasi delle ipotesi possa essere quella corretta e nonostante una elevata frequenza del fenomeno di ibridazione tra *M. myotis* e *M. blythii* probabilmente da migliaia di anni, il mantenimento di nicchie separate permette il supporto di popolazioni con un maggior numero di individui. Inoltre dal momento che la maggior parte degli individui ibridi conservano una morfologia del tutto analoga a quella di *M. blythii*, è chiaro che siano preferite prede adatte alle dimensioni e alla forza muscolare dell'apparato masticatore.
In conclusione, sebbene sia accettata la differenziazione delle specie dal punto di vista morfologico e di nicchia trofica e habitat di foraggiamento, esistono numerose evidenze che permettono, soprattutto ora che l'ibridazione tra le specie è confermata, di meglio cominciare a comprendere aspetti incongruenti in questi ambiti di studio.

Purtroppo, anche se il ridotto numero di campioni rende queste osservazioni prevalentemente qualitative, i risultati ottenuti nel presente lavoro non mostrano alcuna correlazione tra la morfologia e la caratterizzazione genetica degli individui. Sebbene infatti agli individui identificati morfologicamente *M. myotis* corrisponda l'assegnazione alla stessa classe parentale, non sono assenti individui di questa taglia che vengono classificati come ibridi. Inoltre non è neanche possibile riconoscere tra gli ibridi delle caratteristiche morfologiche comuni, tanto che la maggior parte di individui morfologicamente incerti sono stati classificati come *M. myotis*.
Un'altra importante questione che sarebbe interessante da chiarire è se esiste negli ibridi una forma di selezione sessuale e se questa favorisca accoppiamenti tra ibridi o tra ibridi e specie parentali. Sembrerebbe, vista l'elevata percentuale di ibridi rilevati tra individui morfologicamente assimilabili a *M. blythii*, che ci debbano essere state alte frequenze di reincroci fino alla drastica diminuzione di individui geneticamente puri di questa specie.

Considerando l'ecologia delle specie bisogna tenere in considerazione alcuni aspetti quali:

- il flusso genico è prevalentemente mediato dai maschi in quanto le femmine risultano essere fortemente filopatriche (Castella et al., 2001)
- non sono noti studi significativi sulla dispersione giovanile o sul sistema riproduttivo
- seppure la specie non sia considerata migratrice, come nel caso ad esempio del genere *Nyctalus* in cui sono ben riconoscibili rotte migratorie costantemente ripercorse (Petit e Mayer, 2000), sono noti spostamenti di centinaia di chilometri effettuati sia da maschi che da femmine (Hutterer et al., 2005).

I valori di F_{ST} ottenuti confermano la presenza di flusso genico mediato dal sesso maschile soprattutto confrontando i risultati con il lavoro parallelo di Viglino (2008) che ha riscontrato al contrario una netta distinzione tra le colonie a livello di DNA mitocondriale e quindi la spiccata filopatria femminile. La presenza di aplotipi "italici" in Svizzera conferma però la presenza di flusso genico anche per parte femminile così come la conferma viene anche dalla presenza di aplotipi centro europei in area balcanica (Ruedi et al., in press). E' interessante notare come la presenza contemporanea delle due specie (in base ad una discriminazione morfologica) si possa spesso riscontrare nello stesso sito durante il periodo degli accoppiamenti o quello appena precedente anche in colonie apparentemente monospecifiche. La composizione delle colonie (sempre considerando l'identificazione a livello morfologico) non sembra influenzare profondamente la composizione genetica in quanto una percentuale di ibridi è stata trovata anche dove sembra apparentemente esserci una unica specie (ad esempio Verrua Savoia o Onferno). Questo si spiega con il fatto che gli accoppiamenti avvengono spesso in siti diversi da quelli riproduttivi – ovvero nei siti di *swarming* – dove non è raro trovare entrambe le specie senza contare che non si può escludere che anche i siti di svernamento dove le specie si trovano frequentemente insieme (Borda et al., 2004; Albayrak 2003) possano compiere in parte una funzione di scambi genetici.

Tutte queste osservazioni pongono importanti interrogativi per ulteriori analisi alla luce del fenomeno dell'ibridazione. Cosa limita per esempio la distribuzione di individui morfologicamente attribuibili alla specie *M. blythii*? La flessibilità ecologica degli ibridi è tale da permettere l'espansione di questi anche in aree (ad esempio il nord Europa) dove l'habitat sembra poter accogliere solo la specie *M. myotis* o il fatto che, nell'area studiata, gli ibridi siano morfologicamente identificabili come *M. blythii* è anche un limite alla loro distribuzione? Quale fattore influenza la composizione delle colonie?

4.3 IPOTESI DI REVISIONE DELLA CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA DEI GROSSI *Myotis* IN EUROPA

Nei paragrafi precedenti è stata dimostrata la presenza di flusso genico tra le specie *Myotis myotis* e *Myotis blythii* già precedentemente introdotta da Berthier et al. (2006). E' stato anche ipotizzato come la specie nominale *M. blythii* potrebbe avere un areale ridotto rispetto a quello attualmente considerato e coincidente a quello ora riconosciuto per la sottospecie *Myotis blythii oxygnathus*. E' quindi necessario escludere l'attuale areale della sottospecie *Myotis blythii blythii*. Entrambe le sottospecie potrebbero così essere elevate a rango di specie alle quali si assegnano, per la stesura di questo elaborato, i nomi di *Myotis oxygnathus* per la specie europea e *Myotis blythii* per la specie asiatica. Tale ipotesi non è stata mai discussa sebbene alcuni autori (Ruedi e Mayer, 2001; Berthier et al., 2006) abbiano sempre messo in evidenza l'esistenza dei dati molecolari che possano sostenerla. In bibliografia si trova riferimento alla specie *Myotis oxygnathus* in Simmons (2005).

In Ruedi e Mayer (2001) oltre ad osservare una spiccata divergenza degli aplotipi mitocondriali tra le sottospecie di *M. blythii* si osserva anche come l'unico gruppo monofiletico tra i grossi *Myotis* si costituisca, nella ricostruzione dell'albero filogenetico, tra *M. myotis* e *Myotis* (*blythii*) *oxygnathus*. Inoltre la divergenza genetica tra questi due gruppi a livello dei geni mitocondriali *cyt b* e *nd1* non rientra tra valori tipici di divergenza genetica tra specie. I valori medi si attestano infatti sul 16% per specie chiaramente distinte come *Myotis mystacinus* e *Myotis brandtii*, mentre tra *Myotis myotis* e *Myotis* (*blythii*) *oxygnathus* il valore ottenuto è pari al 2.5%.
Di seguito si riporta una frase tratta da Berthier et al. (2006) riferita ai due grossi *Myotis* europei"… in Europe, both species share mitochondrial lineages as if they were a single species…" e i risultati riscontrati da Viglino (2008), nell'indagine sul DNA mitocondriale parallelamente svolta alla presente, sono concordi con quanto precedentemente osservato. Poiché la divergenza tra le due specie viene fatta risalire alle glaciazioni plioceniche da Mayer e vonHelversen (2001), diventa inconsistente l'ipotesi di un'invasione della specie nominale *M. blythii* dall'Asia e della sostituzione completa degli aplotipi di questa da parte degli aplotipi della specie residente secondo il modello di Hubbs (1955). Questo prevede che durante l'espansione di una specie in cui il flusso genico sia mediato prevalentemente per via maschile, in caso di ibridazione con una specie residente il genoma mitocondriale di quest'ultima si sostituisce a quello della specie in espansione. Questo però prevedrebbe anche che, se viene riscontrata la presenza di individui della specie in espansione geneticamente puri

(sulla base di dati derivanti da DNA nucleare), essi condividano l'aplotipo mitocondriale della specie nel suo nucleo di origine. Inoltre dovrebbe in qualche modo essere riconosciuto un cline geografico di distribuzione di questo aplotipo che dovrebbe diminuire in frequenza allontanandosi dal fronte di espansione. Se, come ipotizzato da Berthier et al. (2006) *M. blythii* fosse la specie in espansione e *M. myotis* la residente, dovremmo osservare la presenza seppur limitata di aplotipi mitocondriali asiatici, che alla luce delle conoscenze attuali sono limitati a tale continente.

Un'altra ipotesi affascinante è invece quella della divergenza recente tra le specie come gli stessi autori avevano in precedenza evidenziato. La divergenza risalirebbe alle glaciazioni plioceniche o pleistoceniche che avrebbero diviso l'areale del progenitore comune in due distinte frazioni di cui quella corrispondente all'Europa dell'ovest occupata dall'ancestrale *M. myotis* e quella corrispondente all'Europa dell'est occupata dalla primitiva forma di *M. blythii*. I progenitori si sarebbero adattati alle differenti nicchie trofiche disponibili (Arlettaz et al, 1997), ossia rispettivamente l'ambiente forestato dell'Europa occidentale e quello steppico dell'Europa orientale. La fine delle glaciazioni avrebbe poi permesso un secondario contatto tra gli areali nell'Olocene (Piksa, Woloszyn, 2001) fino alla loro completa sovrapposizione. Osservando questi dati possiamo quindi spiegare l'esistenza di aplogruppi dell'est in espansione verso ovest (dove si riscontra in pratica un unico aplogruppo) separatisi dagli aplogruppi occidentali proprio durante le glaciazioni (Petit et al., 1999; Ruedi et al., in press). E si spiega anche perché, gli aplotipi che sembrano essere presenti solo in *M. blythii* sembrano essere derivati rispetto a quelli esclusivi di *M. myotis* (Viglino, 2008), aggiungendo un ulteriore punto a sfavore della espansione di *M. blythii* dall'Asia e del modello di Hubbs.

I ritrovamenti fossili costituiscono poi un altro supporto a questa ipotesi. Fossili di *M. myotis* sono stati ritrovati in estrema Europa occidentale (penisola iberica) risalenti al primo Pleistocene (Sevilla, 1989) e solo pochi sono presenti in Europa centrale risalenti al medio Pleistocene. Essi sono invece del tutto assenti dagli assembramenti fossili tardo pleistocenici dell'Europa sud-orientale dove sono al contrario abbondanti, fin dal Pleistocene medio, i fossili di *M. blythii* i quali compaiono poi in Europa sud-occidentale solo durante l'Olocene medio. La presenza contemporanea delle specie in Europa centrale viene fatta risalire al tardo Pleistocene o all'Olocene. A questo punto quindi, se *M. myotis* è stato assente dall'Europa sud-occidentale (Horàček, 1982) per un periodo che va dall'inizio delle glaciazioni quaternarie fino all'Olocene (quindi da circa 2 milioni di anni fa ad almeno 10.000 anni fa) come si può attribuire la variabilità di aplogruppi mitocondriali in sud-est Europa a questa specie e non alla specie sorella? Infatti la divergenza tra gli aplogruppi individuati per le specie viene fatta risalire al primo-medio Pleistocene, mentre le divergenze tra aplotipi

all'interno degli aplogruppi vengono fatte risalire al tardo Pleistocene (Petit et al., 1999; Ruedi et al, in press) e considerando l'assenza di *M. myotis* dell'Europa sud-orientale fino a dopo l'Olocene questi aplogruppi (o almeno gli aplotipi derivati) dovrebbero appartenere a *M. blythii*. Se anche la penisola italica avesse potuto rappresentare un rifugio glaciale (così come la penisola iberica secondo Ibàñez et al., 2006) l'abbassamento del livello del Mare Adriatico (Shacklethon et al., 1984) avrebbe potuto funzionare da ponte rendendo omogenea la componente genetica tra popolazioni balcaniche e italiche, facendo riferimento alla specie *M. blythii* e non a *M. myotis*. I frequenti eventi riproduttivi tra questi due taxa avrebbe poi portato alla condizione attuale che non permette una distinzione specie-specifica degli aplotipi mitocondriali (Viglino, 2008).
A questo punto rimane da chiarire quali siano state le rispettive aree di distribuzione durante la fase allopatrica e questo richiede di ampliare l'area di studio all'Europa dell'est e di concentrarsi sulla specie *M. blythii* così come è stato fatto finora solo per *M. myotis* (Ruedi e Castella, 2003), oltre che di chiarire come gli aplotipi ancestrali degli aplogruppi orientali si trovino tutt'ora in *M. myotis* o al massimo in individui ibridi (sebbene questa specie-specificità venga già in parte confutata da Viglino, 2008).

Se si accetta questo scenario ci troviamo di fronte a quello che nel primo capitolo è stato introdotto come Modello di Speciazione BDM secondo il quale l'isolamento geografico e riproduttivo tra due popolazioni di una stessa specie può condurre ad una parziale divergenza genetica la quale, al contatto secondario degli areali, si traduce in un parziale isolamento riproduttivo e genetico se il processo selettivo avvenuto non ha coinvolto aspetti legati alla riproduzione (dai meccanismi di riconoscimento al periodo degli accoppiamenti, fino ad aspetti di incompatibilità genetica). Insomma le specie possono ibridare e scambiarsi materiale genetico fino alla mescolanza dei pool genici originari se la prole ibrida è feconda.

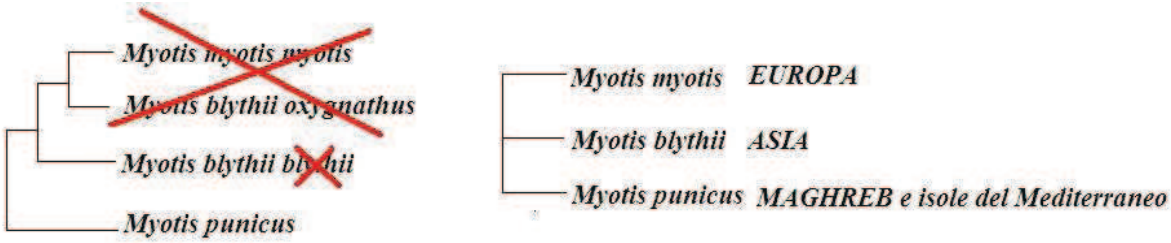
L'ibridazione è un aspetto che è stato dimostrato nei paragrafi precedenti così come la commistione seppur parziale e asimmetrica dei pool genici. A questo punto qualsiasi concetto di specie venga preso in considerazione la risposta è univoca: si potrebbe trattare della stessa specie! Di seguito ne vengono fornite le motivazioni:

- le due specie possono tra loro accoppiarsi e generare prole fertile; secondo il Concetto Biologico di Specie si possono considerare una specie unica
- le due specie si scambiano materiale genetico tanto che i pool genici non si possono considerare completamente distinti; il Concetto Genetico di Specie le considera una specie unica

- le due specie costituiscono un clade monofiletico e condividono caratteri derivati comuni (Castella et al, 2000); secondo il Concetto Filogenetico di specie sono una specie unica

A questo punto dovendo assegnare un nome a questa entità tassonomica ridefinita essa dovrebbe assumere il nome di *Myotis myotis*, considerando che il nome *Myotis blythii* viene assegnato alla sottospecie *blyhtii* dell'Asia centrale.

Un ipotetico albero filogenetico, basato quasi esclusivamente su dati qualitativi e molto semplificato, potrebbe essere quindi il seguente:



Se si potesse allora accettare l'unione delle due specie in una unica entità specifica potremmo ipotizzare una suddivisone in **ecotipi** sulla base della morfologia esterna e della segregazione di nicchia. Infatti un approccio genetico non deve escludere in alcun modo l'approccio ecologico e viceversa. In questo modo tutte le componenti della variabilità biologica vengono prese in considerazione, come non sarebbe invece possibile fare accontentandosi di un'unica metodologia di indagine.

E' chiaro che si tratta di ipotesi tratte da un limitato spettro di analisi. Sarebbe opportuno ampliare lo studio in termini di area geografica nell'ambito di simpatria dei due gruppi, oltre che di marker molecolari utilizzati ed è fondamentale chiarire definitivamente la posizione sistematica di quelle che sono attualmente considerate le sottospecie *omari* e *blythii*.

4.4 IMPLICAZIONI NELLA CONSERVAZIONE DI *Myotis myotis* E *Myotis blythii* DERIVANTI DALL'IBRIDAZIONE DELLE SPECIE

La Conservazione della Biodiversità è ormai un obiettivo comune a gran parte delle politiche mondiali, ma ancora non esiste una definizione pratica di cosa sia la biodiversità.
L'articolo 2 della Convenzione sulla Biodiversità (Rio de Janeiro,1992) definisce la variabilità biologica come "*la variabilità tra organismi viventi di qualsiasi tipo compresi, tra gli altri, quelli terrestri, marini e di altri ecosistemi acquatici e i complessi ecologici dei quali*

questi sono parte; questo include la diversità all'interno delle specie, tra le specie e degli ecosistemi" e le risorse biologiche come "*le risorse genetiche, gli organismi o parti di essi, le popolazioni, o ogni altra componente biotica degli ecosistemi con uso o valore reale o potenziale per l'umanità*".

Quindi la biodiversità si articola in livelli l'uno incluso nell'altro dalla diversità molecolare fino alla diversità ecosistemica. In questo senso la pianificazione di politiche di conservazione deve prevederne l'integrazione con le politiche sociali ed economiche e deve allargare il raggio d'azione da interventi puntiformi a interventi integrati per il raggiungimento dello scopo della Convenzione di Rio de Janeiro di conservazione della biodiversità in tutti i suoi aspetti e livelli di complessità. Il Target 2010 è l'obiettivo che il Summit della Terra (Johannesburg, 2002) ha posto alla convenzione riguardo la riduzione della perdita di biodiversità entro tale anno.

A livello legislativo in Europa tale scopo è affidato in buona parte a due direttive comunitarie, la Direttiva "Habitat" 92/43/CEE e la Direttiva "Uccelli" 79/409/CEE, oltre che numerose convenzioni. Per quanto riguarda i Chirotteri, sempre riferendosi all'Europa, il documento di riferimento è il *Bat Agreement* (Accordo sulla conservazione delle popolazioni di pipistrelli in Europa) entrato in vigore nel 1994 come emanazione della Convenzione di Bonn sulla conservazione delle specie migratrici (1979). Se un aspetto innovativo rispetto alle politiche conservazionistiche del passato è la gestione, conservazione e ripristino di habitat minacciati o ospitanti specie minacciate, un forte limite deriva dal fatto gli allegati di queste direttive e convenzioni contengono lunghi elenchi di specie. E' altrettanto chiaro quanto la tendenza a classificare il mondo che ci circonda derivi dalla necessità di chiarezza e comprensione durante la comunicazione e questo vale ancor di più in ambito legislativo.

Myotis myotis e *Myotis blythii* sono attualmente elencate nelle Red List of Endagered Species della IUCN come LR (lower risk), ma in molti paesi europei si è registrato un declino consistente delle popolazioni e i Report Annuali delle nazioni aderenti al *Bat Agreement* lo confermano (www.eurobats.org). Alla luce dei dati disponibili in letteratura e quelli riportati in questo lavoro non sembra errato considerare le due specie come una unica, basandosi esclusivamente su rilevanze genetiche. Ci si trova quindi di fronte ad un'entità il cui areale si espande in tutta Europa e che conta un numero di individui rilevante. Gli esperti potrebbero quindi dover riconsiderare lo status conservazionistico di questo taxon non includendolo più tra le specie a rischio (sebbene il declino delle popolazioni sarebbe comunque un fattore rilevante).

Sono però disponibili dati di letteratura che confermano l'esistenza di un elevato grado di differenziamento ecologico nella scelta dell'habitat di foraggiamento e quindi delle prede selezionate (Arlettaz, 1999; Arlettaz et al., 1993) oltre che nel periodo dei parti (Arlettaz et al., 2001). Sono presenti anche differenze morfologiche marcate sebbene non sia sempre possibile definire con certezza l'attribuzione di un individuo ad una specie e sebbene l'identificazione morfologica non corrisponda spesso all'identificazione genetica. In ogni caso sono presenti nella stessa entità tassonomica vari gradi e ambiti di variabilità che sono comunque una componente, anche se minima, della biodiversità globale. Conservare questa ipotetica specie (paragrafo 4.3) richiede quindi grande attenzione da parte dei pianificatori che devono considerarla in tutti i suoi aspetti. Non è sufficiente conservare un sito riproduttivo, ma è necessario anche sapere se nella colonia è presente un unico ecotipo o entrambi per gestire gli habitat circostanti nell'ottimizzazione dell'ambiente di caccia degli individui presenti. E alla luce dell'ibridazione, a questo punto intraspecifica, il tutto è complicato dall'esigenza e il dovere di conoscere dal punto di vista ecologico gli ibridi che potrebbero essere ulteriori emergenze naturalistiche degne di conservazione. Si ricorda infatti che spesso l'ibridazione è associata alla scomparsa di specie indigene causate dall'introduzione di specie esotiche e il successivo inquinamento genetico, ma in un'ottica evoluzionistica è uno dei meccanismi noti di speciazione (Stone, 2000) e radiazione adattativa (Seehausen, 2004). Inoltre se il modello che si viene a descrivere è quello che prevede la "superiorità degli ibridi" questi, occuperanno una terza nicchia ecologica distinta e costituiranno un terzo ecotipo all'interno della specie che sarà a sua volta un'ulteriore componente della diversità globale.
Nel caso specifico dei grossi *Myotis* europei considerare due specie o una unica non è una grande differenza. Ci sono comunque tre ambiti di diversità da conservare siano queste a livello di specie e dei loro ibridi o di ecotipi e forme intermedie.
La grossa differenza risiede nell'importanza che si attribuisce alla classificazione: se è necessaria una classificazione tassonomica per poter conservare si può rischiare di escludere alcune componenti della biodiversità considerando una unica specie!

L'importanza del lavoro qui presentato risulta anche dall'utilizzo di tecniche non invasive di campionamento. La possibilità di estrarre il DNA necessario alle analisi genetiche da campioni biologici reperibili in natura senza agire in vivo sugli animali per il prelievo di tessuti è fondamentale soprattutto per specie il cui status conservazionistico non sia favorevole. Si riduce infatti lo stress e la possibilità di compromettere maggiormente le popolazioni studiate. In questo lavoro parte dei campioni consistevano in escrementi. Ovviamente questi non sono stati utilizzati per analisi di base sulla ibridazione in quanto non

è possibile attribuire ogni escremento alla specie di appartenenza, ma questi sono stati fondamentali per aumentare il numero di campioni disponibile per ogni colonia. Uno studio dettagliato sul fenomeno di ibridazione tra queste specie dovrebbe basarsi essenzialmente su campionamenti non invasivi per ottenere un risultato consistente che permetta di collocare il fenomeno dell'ibridazione nello spazio e spiegare quale sia il ruolo che ricopre nell'ecologia delle specie.

APPENDICI

APPENDICE 1 – Protocollo di estrazione DNA totale da tessuti conservati in alcool 99%

modificato da Laird et al., 1991

- reidratare i tessuti rimuovendo l'alcool e ponendoli in una soluzione 100mM Tris-HClc pH8.5, 5mM EDTA, 200mM NaCl in un tubo da microcentrifuga da 1,5 ml
- sminuzzare i frammenti
- portare la soluzione a 0,2% SDS e 100 µg/ml proteinasi K e quindi incubare per tutta la notte a 56° C per lisare le membrane cellulari, nucleari e mitocondriali
- aggiungere un ugual volume di cloroformio ed emulsionare accuratamente le due fasi
- centrifugare per 20' a 14000 rpm per separare la fase acquosa da quella organica
- trasferire la fase superiore acquosa in un nuovo tubo e aggiungere a questa un ugual volume di isopropanolo; mescolare fino a risospendere il DNA precipitato
- centrifugare per 15' a 14000 rpm
- rimuovere il surnatante e conservare il pellet
- lavare per 2 volte il pellet con Et-OH 75%
- risospendere in un volume di 50 µl di Tris EDTA 5 mM
- aggiungere 0,1 mg/ml di RNAsi e incubare a 55°C per 15'

APPENDICE 2 – Misure morfometriche degli individui da cui sono stati estratti campioni di tessuto

CAMPIONE	POPOLAZIONE	DATA	LUOGO	SPECIE	SEX	ETA''	AV(mm)	LOr(mm)	V DITO(mm)	Tib(mm)	PESO(gr)	STATUS RIPR.	BIOPSIA	SPOT	CM^3	Z	SP	NOTE
1	EG	23/07/2007	EGNA	Myobly	F	ad	58,25	21,50	76,00				X	X		-3,82	Myobly	
2	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	65,30	25,60	80,00	28,30			X	No	10,20	2,75	Myomyo	
3	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	64,00	25,50	84,00	27,15			X	No	10,00	2,47	Myomyo	
4	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	64,65	26,50	82,00	26,00			X	No	9,65	3,96	Myomyo	
5	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	62,45	26,20	80,00	27,50			X	No	9,45	3,29	Myomyo	
6	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	62,45	25,30	82,00	27,85			X	No	10,00	2,02	Myomyo	
7	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	65,10	29,20	86,00	27,00			X	No	10,20	7,83	Myomyo	
8	EG	23/07/2007	EGNA	INC.	F	ad	65,10	23,40	82,00	24,95			X	No	11,00	-0,38	Myobly	
9	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	66,15	25,75	85,00	27,40			X	No	9,90	3,06	Myomyo	
10	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	64,60	26,10	81,00	26,30			X	No	10,00	3,39	Myomyo	
11	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	66,85	24,70	82,00	27,70			X	No	10,30	1,65	Myomyo	
12	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	64,65	27,40	83,00	27,27			X	No	9,85	5,23	Myomyo	
13	EG	23/07/2007	EGNA	Myomyo	F	ad	64,60	27,55	81,00	26,65			X	No	10,00	5,44	Myomyo	
14	EG	23/07/2007	EGNA	INC.	F	ad	65,30	24,00	85,00	28,45			X	No	10,25	0,49	Myomyo	
1	ON	24/05/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	61,10	25,35	73,60	25,00			X	No	9,50	1,94	Myomyo	
2	ON	25/05/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	61,35	25,20	74,20	26,50	27,00	Allattante	X	No	9,75	1,76	Myomyo	
3	ON	26/05/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	61,15	26,00	75,50	25,70	26,00	normale	X	No	9,70	2,87	Myomyo	
4	ON	27/05/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	62,10	26,20	77,00	26,00	25,50	normale	X	No	9,76	3,26	Myomyo	
5	ON	27/05/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	62,20	26,50	77,20	26,00	31,00	normale	X	No	9,70	3,69	Myomyo	
6	ON	27/05/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	62,40	23,30	75,90	26,20	25,00	normale	X	No	10,10	-0,82	Myobly	
7	ON	27/05/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	63,00	27,80	77,00	26,80	25,50	normale	X	No	10,00	5,62	Myomyo	
8	ON	27/05/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	60,00	25,40	72,40	25,30	25,50	gravida	X	No	9,80	1,90	Myomyo	
10	ON	27/05/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	60,00	24,00	73,10	25,90	31,30	gravida	X	No	9,90	-0,09	Myobly	
11	ON	27/05/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	59,10	24,00	70,80	23,70	27,80	gravida	X	No	9,50	-0,19	Myobly	
12	ON	27/05/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	62,20	23,00	71,10	25,10	28,20	normale	X	No	9,90	-1,27	Myobly	
13	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	63,50	26,00	89,00	25,90	28,20		X	X	9,70	3,12	Myomyo	
14	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	60,50	27,00	65,50	25,70	28,00		X	X	9,60	4,22	Myomyo	
15	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	M	j	59,85	26,30	77,20	25,50	23,00		X	X	9,20	3,15	Myomyo	
16	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	F	j	62,10	28,00	81,10	25,40	22,50		X	X	9,40	5,81	Myomyo	
17	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	61,10	25,50	78,80	24,50			X	X	9,50	2,16	Myomyo	
18	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	63,50	27,00	82,60	26,50	26,00		X	X	10,00	4,54	Myomyo	

CAMPIONE	POPOLAZIONE	DATA	LUOGO	SPECIE	SEX	ETA"	AV(mm)	LOr(mm)	V DITO(mm)	Tib(mm)	PESO(gr)	STATUS RIPR.	BIOPSIA	SPOT	CM^3	Z	SP	NOTE
19	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	62,20	27,50	82,30	27,20	27,00		X	X	9,80	5,11	Myomyo	
20	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	F	j	61,80	30,20	79,90	26,30	22,60		X	X	9,80	8,89	Myomyo	
21	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	F	j	60,30	26,30	77,80	27,10	22,10		X	X	9,80	3,20	Myomyo	
22	ON	26/07/2007	ONFERNO	INC.	F	ad	57,80	24,20	78,50	26,70	22,50		X	No	8,40	-0,04	Myobly	
23	ON	26/07/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	62,70	26,90	83,60	25,80	23,90		X	No	9,60	4,31	Myomyo	
24	ON	26/07/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	61,00	28,30	77,30	26,20	27,20		X	No	9,30	6,11	Myomyo	
25	ON	26/07/2007	ONFERNO	Myomyo	F	j	63,00	30,30	82,80	27,40	23,00		X	No	10,00	9,16	Myomyo	
26	ON	26/07/2007	ONFERNO	Myomyo	F	j	59,60	29,60	76,10	24,20	21,30		X	No	9,30	7,80	Myomyo	
27	ON	26/07/2007	ONFERNO	Myomyo	F	ad	61,30	25,80	80,40	26,80	24,40		X	No	9,40	2,60	Myomyo	
28	ON	26/07/2007	ONFERNO	Myomyo	F	j	61,80	28,50	78,40	25,70	22,60		X	No	9,70	6,48	Myomyo	
1	SV	28/04/2007	S.VITTORIA	Myobly	M	ad	57,55	19,00	72,00	23,79	22,50		X	X		-7,44	Myobly	isolato dal gruppo
2	SV	28/04/2007	S.VITTORIA	INC.	M	ad	58,60	24,00	78,00	27,37	24,50		X	X		-0,24	Myobly	isolato dal gruppo, spot poco evidente
3	SV	28/04/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	64,23	27,00	81,00	25,64	30,00	gravida	X	No		4,62	Myomyo	
4	SV	28/04/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	60,10	25,00	79,00	25,13	27,00	gravida	X	No		1,34	Myomyo	
50	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	61,27	26,00	75,00	25,26	27,50		X	No		2,88	Myomyo	
51	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	59,20	26,50	70,00	24,75	14,50		X	No		3,37	Myomyo	
53	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myobly	F	j	57,07	23,00	67,00	24,14	15,00		X	No		-1,82	Myobly	
54	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	62,67	29,50	81,00	25,36	29,00		X	No		7,99	Myomyo	
55	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	M	j	61,26	27,00	75,00	27,23	18,00		X	No		4,30	Myomyo	
56	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	60,65	28,00	76,00	25,28	22,00		X	No		5,65	Myomyo	
57	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	63,79	27,00	77,00	25,86	24,50		X	No		4,57	Myomyo	
58	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	62,51	25,00	80,00	27,09	28,50		X	No		1,60	Myomyo	
59	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	60,81	24,00	76,00	27,08	25,50		X	No		0,00	Myobly	
60	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	62,27	25,00	80,00	26,21	29,00		X	No		1,57	Myomyo	
61	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo?	F	j	63,25	23,00	80,00	26,20	29,00		X	No		-1,15	Myobly	
62	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	61,49	25,00	79,00	25,47	28,00		X	No		1,49	Myomyo	
63	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	61,83	25,00	74,00	26,96	20,00		X	No		1,53	Myomyo	
64	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	M	ad	60,38	27,00	78,00	25,49	29,00		X	No		4,20	Myomyo	
65	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	M	ad	61,04	26,00	85,00	26,89	27,00		X	No		2,86	Myomyo	
66	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	60,45	25,00	80,00	24,63	27,00		X	No		1,38	Myomyo	
67	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	62,12	26,00	81,00	25,47	26,50		X	No		2,98	Myomyo	
68	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	INC.	F	ad	60,97	24,00	79,00	25,87	29,00		X	X	9,80	0,02	Myomyo	accenno spot
69	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	M	j	59,23	25,00	76,00	24,95	24,00		X	No		1,25	Myomyo	
70	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	59,64	27,00	76,00	24,35	21,00		X	No		4,12	Myomyo	

CAMPIONE	POPOLAZIONE	DATA	LUOGO	SPECIE	SEX	ETA"	AV(mm)	LOr(mm)	V DITO(mm)	Tib(mm)	PESO(gr)	STATUS RIPR.	BIOPSIA	SPOT	CM^3	Z	SP	NOTE
71	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	62,46	23,50	77,00	25,20	24,00		X	No		-0,53	Myobly	
72	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	j	61,62	25,00	76,00	25,82	27,00		X	No		1,50	Myomyo	
73	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	M	j	58,07	28,00	71,00	23,95	21,00		X	No	10,20	5,37	Myomyo	
74	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	62,30	28,00	79,00	25,98	30,00		X	No		5,83	Myomyo	
75	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	61,52	25,00	79,00	25,70	27,50		X	No		1,49	Myomyo	
76	SV	13/07/2007	S.VITTORIA	Myomyo	F	ad	63,07	28,00	78,00	25,62	30,00		X	No		5,91	Myomyo	
1	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	59,16	19,00	76,00	25,83	22,50	allattante	X	X	8,08	-7,26	Myobly	
2	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	59,49	22,00	81,00	25,89	25,00	allattante	X	X	9,04	-2,98	Myobly	
3	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	59,74	22,00	77,00	25,98	24,50	allattante	X	X	8,46	-2,95	Myobly	
4	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	59,97	22,58	80,50	28,38	25,00	allattante	X	X	8,62	-2,10	Myobly	
5	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	60,95	21,40	79,00	28,09	24,00	allattante	X	X	8,86	-3,67	Myobly	
6	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	59,00	21,36	78,00	26,05	22,00	allattante	X	X	8,70	-3,94	Myobly	
7	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	58,72	21,29	79,00	26,46	24,00	allattante	X	X	8,37	-4,07	Myobly	
8	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	58,62	20,38	76,00	27,33	24,00	allattante	X	X	8,24	-5,37	Myobly	
9	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	59,38	22,33	77,00	26,98	25,00	allattante	X	X	8,25	-2,52	Myobly	
10	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	61,28	22,55	82,00	26,78	25,50	allattante	X	X	8,72	-2,00	Myobly	
11	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	59,29	21,81	75,00	26,50	23,50	allattante	X	X		-3,27	Myobly	
12	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	INC.	F	ad	57,36	21,04	74,00	25,85	24,50	allattante	X	X	8,58	-4,57	Myobly	spot poco evidente;ind. vecchio
13	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	61,39	22,88	82,00	27,22	25,50	allattante	X	X	8,92	-1,52	Myobly	
14	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	60,41	22,50	76,00	28,29	22,50	allattante	X	X	8,43	-2,17	Myobly	
15	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	57,90	21,26	75,00	25,52	23,50	allattante	X	No	8,41	-4,20	Myobly	ind. vecchio
16	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	58,20	21,24	81,00	26,47	24,50	allattante	X	X	8,35	-4,19	Myobly	
17	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	57,77	20,68	76,00	27,56	24,00	allattante	X	X	8,48	-5,03	Myobly	
18	VS	26/07/2007	VERRUA SAVOIA	Myobly	F	ad	59,28	23,70	76,00	27,27	24,00	allattante	X	X	8,63	-0,59	Myobly	
1	VZ	23/07/2007	VEZZANO	Myomyo	M	ad	62,10	24,60	62,80	22,20			X	No	10,00	0,99	Myomyo	
2	VZ	23/07/2007	VEZZANO	INC.	M	ad	60,25	23,20	74,00	26,15			X	No	10,00	-1,19	Myobly	
3	VZ	23/07/2007	VEZZANO	Myomyo	M	ad	63,40	27,65	79,00	27,15			X	No	10,00	5,45	Myomyo	
4	VZ	23/07/2007	VEZZANO	Myobly	M	ad	56,50	20,95	76,00	28,00			X	X	8,00	-4,79	Myobly	
5	VZ	23/07/2007	VEZZANO	Myobly	F	ad	60,00	22,55	79,00	27,90			X	X	9,00	-2,14	Myobly	
6	VZ	23/07/2007	VEZZANO	Myobly	M	ad	58,00	21,00	76,00	27,00			X	X	8,55	-4,55	Myobly	
7	VZ	23/07/2007	VEZZANO	Myobly	F	ad	54,75	21,00	77,00	25,88			X	X	8,80	-4,91	Myobly	
8	VZ	23/07/2007	VEZZANO	Myobly	F	ad	61,00	22,55	82,00	27,60			X	X	9,00	-2,03	Myobly	
9	VZ	23/07/2007	VEZZANO	Myobly	F	ad	57,15	22,55	72,00	26,60			X	X	9,00	-2,45	Myobly	

Nota: Z e SP fanno riferimento al valore Z e alla specie determinata secondo Arlettaz et al. (1991)

APPENDICE 3 – Tipologia di ogni campione tipizzato e genotipi ottenuti su 5 loci microsatellitari

CAMPIONE	POPOLAZIONE	TIPOLOGIA	C113	C113	H29	H29	H19	H19	E24	E24	D9	D9
1	AG	tessuto	6	7	0	0	26	26	29	30	25	25
2	AG	tessuto	6	7	11	23	19	21	15	29	27	27
3	AG	tessuto	6	7	0	0	19	21	16	29	29	29
4	AG	tessuto	6	7	17	23	19	21	23	34	19	25
5	AG	tessuto	6	7	20	20	21	21	15	16	28	30
7	AG	tessuto	4	6	0	0	18	19	17	22	23	27
10	AG	tessuto	4	6	20	20	13	28	27	27	23	32
11	AG	tessuto	6	7	19	19	18	18	15	29	21	28
12	AG	tessuto	6	7	18	24	21	28	16	27	25	25
13	AG	tessuto	4	6	0	0	13	28	25	29	22	22
14	AG	tessuto	7	7	21	23	20	20	28	29	24	25
15	AG	tessuto	7	7	18	23	21	22	0	0	23	28
16	AG	tessuto	6	6	0	0	28	28	22	34	21	25
17	AG	tessuto	4	7	0	0	20	20	17	23	17	23
18	AG	tessuto	6	7	18	22	0	0	13	27	23	23
19	AG	tessuto	6	7	18	22	0	0	25	25	17	30
1	EG	tessuto	6	7	0	0	21	27	26	26	17	17
2	EG	tessuto	7	7	18	22	21	28	12	14	0	0
3	EG	tessuto	7	7	23	23	21	28	17	30	28	28
4	EG	tessuto	7	7	20	26	20	21	13	29	30	31
5	EG	tessuto	7	7	18	22	20	28	12	28	24	24
6	EG	tessuto	7	7	20	23	0	0	27	27	23	29
7	EG	tessuto	7	7	22	23	21	28	23	23	29	29
8	EG	tessuto	7	7	19	21	21	28	15	23	29	32
9	EG	tessuto	7	7	24	25	21	21	24	30	25	25
10	EG	tessuto	7	7	20	23	21	22	13	29	21	24
12	EG	tessuto	7	7	23	23	21	21	13	29	17	27
13	EG	tessuto	7	7	19	22	24	24	13	29	0	0
14	EG	tessuto	7	7	18	22	22	25	15	29	22	24
1	ON	tessuto	6	7	19	24	21	28	15	15	25	31
2	ON	tessuto	7	7	21	25	26	28	27	27	25	30
3	ON	tessuto	6	7	19	20	21	28	27	28	26	27
4	ON	tessuto	6	7	18	23	20	28	13	29	25	29
5	ON	tessuto	6	7	18	24	20	28	15	21	24	26

CAMPIONE	POPOLAZIONE	TIPOLOGIA	C113	C113	H29	H29	H19	H19	E24	E24	D9	D9
6	ON	tessuto	7	7	20	24	24	28	27	28	24	29
7	ON	tessuto	6	7	18	20	20	28	28	28	28	29
8	ON	tessuto	7	7	21	21	19	28	26	27	0	0
9	ON	tessuto	6	7	20	20	20	28	26	26	25	25
10	ON	tessuto	6	7	19	23	20	28	27	33	26	27
11	ON	tessuto	6	7	20	22	20	23	0	0	25	30
13	ON	tessuto	7	7	19	22	19	26	0	0	23	29
14	ON	tessuto	7	7	19	19	21	25	28	29	24	24
15	ON	tessuto	7	7	21	21	22	26	14	14	24	26
16	ON	tessuto	7	7	19	23	21	28	23	33	19	25
17	ON	tessuto	7	7	18	18	26	28	23	29	24	24
18	ON	tessuto	6	7	21	21	20	26	26	26	25	26
19	ON	tessuto	7	7	10	19	20	21	29	32	19	24
20	ON	tessuto	6	7	18	20	20	28	28	28	0	0
21	ON	tessuto	7	7	19	21	19	24	14	31	26	29
22	ON	tessuto	6	7	20	20	28	28	25	34	17	24
24	ON	tessuto	7	7	18	22	21	23	15	28	21	29
25	ON	tessuto	7	7	24	24	20	24	25	30	0	0
26	ON	tessuto	7	7	18	21	0	0	15	27	25	28
1	STA	guano	7	7	0	0	22	28	16	29	14	25
2	STA	guano	7	7	0	0	22	27	21	31	21	30
3	STA	guano	7	7	31	40	19	21	15	24	15	25
4	STA	guano	7	7	0	0	28	28	0	0	0	0
5	STA	guano	6	6	0	0	28	28	0	0	14	25
6	STA	guano	0	0	0	0	28	28	0	0	14	24
7	STA	guano	7	7	31	31	23	23	15	29	28	28
8	STA	guano	6	8	0	0	28	28	25	26	15	21
9	STA	guano	7	7	20	32	20	24	16	29	18	28
10	STA	guano	7	7	0	0	20	20	15	26	0	0
11	STA	guano	7	7	31	46	20	24	15	29	23	28
12	STA	guano	7	7	0	0	20	20	31	31	27	28
13	STA	guano	6	7	28	41	21	21	11	25	35	35
14	STA	guano	7	7	29	40	21	24	12	23	25	28
15	STA	guano	7	7	31	31	21	21	15	23	15	26
16	STA	guano	7	7	19	23	20	22	28	29	25	28
17	STA	guano	7	7	19	44	20	21	28	32	24	26

CAMPIONE	POPOLAZIONE	TIPOLOGIA	C113	C113	H29	H29	H19	H19	E24	E24	D9	D9
18	STA	guano	7	7	31	31	21	28	15	32	25	26
19	STA	guano	7	8	38	43	21	25	22	27	25	28
20	STA	guano	7	7	0	0	22	22	24	24	14	27
21	STA	guano	7	7	0	0	20	20	15	15	14	22
22	STA	guano	6	7	22	23	20	20	0	0	25	25
23	STA	guano	7	7	33	39	22	24	17	23	26	26
24	STA	guano	6	6	43	50	0	0	25	32	15	15
25	STA	guano	6	7	0	0	21	21	0	0	14	25
26	STA	guano	7	7	0	0	28	28	0	0	14	24
27	STA	guano	7	7	0	0	18	20	15	31	28	29
28	STA	guano	7	7	0	0	20	28	27	27	14	25
29	STA	guano	7	7	0	0	20	20	29	29	14	25
30	STA	guano	7	7	0	0	20	22	23	29	18	25
31	STA	guano	7	7	0	0	20	28	15	29	15	25
32	STA	guano	6	6	0	0	28	28	24	30	15	25
33	STA	guano	7	7	0	0	21	25	16	27	25	25
34	STA	guano	7	7	0	0	22	28	15	26	14	26
35	STA	guano	7	7	39	46	20	23	22	29	26	26
36	STA	guano	7	7	19	23	28	28	29	29	25	30
37	STA	guano	6	7	0	0	23	28	15	29	27	28
38	STA	guano	7	7	42	48	22	24	26	31	28	28
39	STA	guano	6	6	0	0	28	28	24	35	17	23
40	STA	guano	6	7	0	0	20	28	24	32	29	29
41	STA	guano	6	7	31	31	24	24	15	30	25	25
42	STA	guano	6	7	0	0	28	28	25	29	18	18
43	STA	guano	7	7	0	0	21	26	28	29	14	18
44	STA	guano	6	7	0	0	28	28	15	27	21	29
45	STA	guano	7	7	0	0	21	28	27	43	24	25
6b	STA	guano	6	7	0	0	20	20	15	32	27	27
3	SV	tessuto	7	7	21	25	21	23	27	27	13	23
4	SV	tessuto	0	0	19	23	0	0	0	0	0	0
51	SV	tessuto	7	7	20	26	23	23	15	15	28	29
53	SV	tessuto	7	7	20	25	21	21	23	28	25	25
54	SV	tessuto	7	7	22	23	21	25	13	32	25	29
55	SV	tessuto	7	7	20	20	22	22	23	32	20	30
57	SV	tessuto	7	7	22	25	20	21	27	32	24	30

CAMPIONE	POPOLAZIONE	TIPOLOGIA	C113	C113	H29	H29	H19	H19	E24	E24	D9	D9
58	SV	tessuto	7	7	23	23	18	22	15	27	23	31
59	SV	tessuto	7	7	19	20	19	21	0	0	25	26
60	SV	tessuto	7	7	21	24	21	22	13	30	21	23
62	SV	tessuto	7	7	18	19	22	23	15	30	25	26
63	SV	tessuto	6	7	20	23	21	22	15	26	26	27
64	SV	tessuto	7	7	19	21	18	22	29	29	23	25
65	SV	tessuto	7	7	20	21	19	19	21	26	0	0
67	SV	tessuto	7	7	18	18	21	22	29	30	23	23
72	SV	tessuto	0	0	11	22	20	21	14	29	27	30
73	SV	tessuto	3	3	19	24	0	0	27	28	0	0
74	SV	tessuto	0	0	20	24	20	21	13	23	22	32
1	VN	guano	5	7	0	0	20	21	16	27	24	25
2	VN	guano	6	7	18	18	0	0	17	28	24	25
3	VN	guano	5	7	43	22	20	21	13	15	23	24
13	VN	guano	5	7	18	21	21	28	14	25	23	24
16	VN	guano	5	7	23	26	18	21	23	28	21	29
18	VN	guano	5	7	18	17	20	21	14	14	24	24
36	VN	guano	5	7	16	14	20	20	25	26	0	0
38	VN	guano	5	7	17	25	21	21	15	15	25	25
40	VN	guano	4	5	0	0	21	27	17	24	23	23
41	VN	guano	4	7	22	22	28	28	22	22	24	24
42	VN	guano	6	8	18	20	28	28	29	31	13	17
43	VN	guano	5	7	20	20	18	21	24	29	21	29
46	VN	guano	5	7	20	20	24	28	14	26	23	23
47	VN	guano	5	7	21	19	21	27	26	27	24	27
1	VS	tessuto	5	5	18	18	28	28	0	0	0	0
4	VS	tessuto	5	7	21	21	28	28	0	0	0	0
5	VS	tessuto	5	7	19	20	20	28	20	29	14	20
6	VS	tessuto	5	7	0	0	28	28	0	0	0	0
7	VS	tessuto	5	5	15	15	28	28	27	39	23	23
10	VS	tessuto	5	5	19	36	21	28	20	27	28	29
13	VS	tessuto	6	7	17	17	28	28	22	29	23	23
27	VS	tessuto	5	7	18	24	21	28	26	30	27	28
2	VS	guano	0	0	18	19	13	13	0	0	23	24
4	VS	guano	6	6	8	8	9	9	20	23	23	24
5	VS	guano	7	8	0	0	12	13	23	26	14	25

CAMPIONE	POPOLAZIONE	TIPOLOGIA	C113	C113	H29	H29	H19	H19	E24	E24	D9	D9
6	VS	guano	6	6	22	22	13	28	24	25	17	17
7	VS	guano	6	6	18	19	12	13	25	25	0	0
8	VS	guano	7	7	0	0	13	28	27	29	22	23
9	VS	guano	0	0	20	20	12	13	0	0	17	21
10	VS	guano	6	7	19	19	13	28	33	33	17	21
11	VS	guano	6	7	19	19	18	24	25	26	14	20
12	VS	guano	0	0	20	20	28	28	34	36	21	25
13	VS	guano	6	6	23	23	28	28	25	26	0	0
23	VS	guano	6	7	14	14	20	24	25	25	26	27
24	VS	guano	6	7	14	20	0	0	29	35	13	25
25	VS	guano	6	6	19	20	13	24	28	37	20	24
27	VS	guano	6	6	22	22	13	13	35	40	23	23
31	VS	guano	6	7	0	0	13	21	17	17	21	24
36	VS	guano	6	6	22	22	12	19	28	29	18	18
39	VS	guano	6	6	13	16	28	28	15	36	21	25
2	VS	tessuto	7	7	21	21	21	21	23	26	23	28
11	VS	tessuto	6	7	19	20	21	22	24	24	17	20
12	VS	tessuto	6	7	19	20	20	21	22	23	17	20
15	VS	tessuto	6	7	19	20	20	21	19	23	24	25
18	VS	tessuto	6	7	18	19	21	27	25	25	17	23
1	VZ	tessuto	7	7	18	24	18	22	13	15	24	25
2	VZ	tessuto	7	7	18	22	21	21	24	28	22	29
3	VZ	tessuto	7	7	13	18	20	21	29	31	21	24
4	VZ	tessuto	7	7	26	26	21	28	29	35	17	23
5	VZ	tessuto	5	5	17	17	28	28	29	36	17	23
6	VZ	tessuto	5	7	14	14	0	0	13	26	20	21
7	VZ	tessuto	3	3	0	0	21	21	0	0	0	0
8	VZ	tessuto	5	7	15	15	0	0	26	36	20	23
9	VZ	tessuto	5	7	0	0	0	0	20	24	20	24

Nota: il nome di ogni allele è definito come il numero di ripetizioni della sequenza nucleotica

BIBLIOGRAFIA

-Agnelli P., A. Martinoli, E. Patriarca, D. Russo, D. Scaravelli e P. Genovesi (a cura di), 2004. Linee guida per il monitoraggio dei Chirotteri: indicazioni metodologiche per lo studio e la conservazione dei pipistrelli in Italia. Quad. Cons. Natura, 19, Min. Ambiente - Ist. Naz. Fauna Selvatica.

-Ahlén I. Bach L. Baagøe H. J. Pettersson J. 2007. Bats and offshore wind turbines studied in southern Scandinavia. Swedish environmental protection agency

-Albayrak I. 2003. The Bats of the Eastern Black Sea Region in Turkey (Mammalia: Chiroptera). Turk J Zool 27, 269-273

- Allendorf F. W.,. Leary R. F, Spruell P. e Wenburg J. K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation
Guidelines. TRENDS in Ecology & Evolution 16(11), 613-622

-Anderson E.C. e Thompson E.A. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. Genetics 160,1217-229

-Arlettaz R., Ruedi M. e Hausser J., 1991. Field morphologica identification of *Myotis myotis* e *Myotis blythii* (Chiroptera: Vespertilionidae): a multivariate approach. Myotis 29, 7-16

-Arlettaz R., Ruedi, M. & Hausser, J. 1993. Ecologie trophique de deux espèces jumelles et sympatriques de chauves-souris: *Myotis myotis* et *Myotis blythii* (Chiroptera: Vespertilionidae). Premiers résultats. Mammalia, 57, 519–531

-Arlettaz R., Beck A., Guttinger R., Lutz M., Ruedi M., Zingg P. 1994. Où se situe la limite nord de repartition gèographique de *Myotis blythii* (Chiroptera: Vespertilionidae) en Europe centrale? Z. Saugetierkunde. 59, 181-188

-Arlettaz R. 1996. Feeding behaviour and foraging strategy of free-living mouse-eared bats, *Myotis myotis* and *Myotis blythii.* Anin. Behav.51, 1-11

-Arlettaz R., Ruedi M., Ibanez C., Palmeirin J., Hausser J. 1997. A new perspective on the zoogeography of the sibling mouse-eared bat species *Myotis myotis* and *Myotis blythii* : morphological, genetical and ecological evidence. J. Zool. Lond 242, 45-62

- Arlettaz R. 1999. Habitat Selection as a Major Resource Partitioning Mechanism between the two Sympatric Sibling Bat Species *Myotis myotis* and *Myotis blythii.* The Journal of Animal Ecology. 68(3), 460-471

- Arlettaz R., Christe, P., Lugon, A., Perrin, N. and Vogel, P. 2001. Food availability dictates the timing of parturition in insectivorous mouse-eared bats. Oikos 95: 105–111

-Avise J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.

-Baker R.J. e Bradley R.D. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. Journal of Mammalogy, 87(4):643–662

-Barataud M. 1996. Ballades dans l'inaudible. Ed. Sittelle

-Barilani M., Bernard-Laurent A., Mucci N. et al. 2007. Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. graeca*) and red-legged (*A. rufa*) partridge populations. Conservation Biology. DOI: 10.1016/j.biocon.2007.01.014

- Barton N.H. and Hewitt, G.M. 1985. Analysis of hybrid zones. Annu.Rev. Ecol. Syst. 16, 113–148

-Bateson W. 1909. Heredity and variation in modern lights. Pp. 85– 101 in Darwin and modern science (A. C. Seward, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

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

-Bickham J. W., Patton J. C. , Schlitter D. A., Rautenbach I. L., Honeycutt R.L. 2004.Molecular phylogenetics, karyotypic diversity, and partition of the genus *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 33, 333–338

- Bihari Z. e Géczi I. 2000. Monitoring of church-dwelling bats in the territory of Zemplén Mts (Hungary) between 1989 and 1998. Vespertilio 4: 13–17

-Boecklen W.J. and Howard D.J. 1997. Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markersand power of resolution. Ecology 78, 2611–2616

-Borda D., Borda C. e Tămaş T. 2004 Bats, climate, and air microorganisms in a Romanian cave. Mammalia, 68(4), 337-343

-Broquet T., Ménard N. e Petit E. 2007. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. Conservation Genetics. 8, 249-260

- Castella V. e Ruedi M. 2000. Characterization of highly variable microsatellite loci in the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae). Molecular Ecology, 9, 993–1011

- Castella V., Ruedi M., Excoffier L., Ibáñez C., Arlettaz R. e Hausser J. 2000. Is the Gibraltar Strait a barrier to gene flow for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae)?. Molecular Ecology 9, 1761–1772

- Castella V., Ruedi M. e Excoffier L. 2001.Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. J. Evol. Biol. 14, 708-720

-Davoli F., Potena G., Sammarone L., Posillico M., Boitani L., Sulli C., Latini R., Randi E. 2007. Non-invasive genetic sampling of the Abruzzo brown bear (*Ursus arctos marsicanus*) population in: Prigioni C. and Sforzi A. (eds) 2007. Abstracts V European Congress of Mammalogy, Hystrix It. J. Mamm., (n.s.) Vol. I-2, Supp. (2007): 1-576

-Dietz C, Von Helversen O., 2004. Illustrated identification key to the bats of Europe. Elettronic Pubblication

-Dobzhansky T. 1934. Studies on hybrid sterility. I. Spermatogenesis in pure and hybrid *Drosophila pseudoobscura* hybrids. Proceedings of the National Academy of Sciences. 19, 397–403

-Dowling T.E. e Secor C.L. 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. Annu. Rev. Ecol. Syst. 28, 593–619

- Driscoll C.A. et al. 2007. The near eastern origin of cat domestication. Science 317, 519

-Edmands S. 2002. Does parental divergence predict reproductive compatibility? Trends Ecol. Evol. 17, 520–527

-Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews. 5, 435-445

-Entwistle A. et al, 2001. Habitat managemet for bats. Jin Natura Conservation Committee

-Excoffier L., Smouse P., and Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479-491

-Excoffier L. G. Laval, and S. Schneider 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50

-Falush D., Stephens M., and Pritchard J. K. 2003. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, 164:1567-1587

-Findley J. S. (1972). Phenetic relationships among bats of the genus *Myotis*. Syst. Zool. 21: 31–52

- Graf J-D e Polls Pelaz M (1989) Evolutionary genetics of the Rana esculenta complex. In: Dawley RM, Bogart JP, eds. Evolution and ecology of Unisexual Vertebrates. Albany, NY: New York State Mus Bull, 466, 289-302.

- Grant V. 1981. Plant Speciation. Columbia University Press

-Guo S. W. e Thompson E. A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 48, 361-372

-Haas F. e Brodin A. 2005. The Crow *Corvus corone* hybrid zone in southern Denmark and northern Germany Ibis 147, 649–656

-Harr B., Zangerl B. e Schlotterer, C. 2000. Removal of microsatellite interruptions by DNA replication slippage: phylogenetic evidence from *Drosophila*. Mol. Biol. Evol. 17, 1001–1009

-Harrison D.L. e Lewis R.E. 1961. The large mouse-eared bats of the middle east, with description of a new subspecies. Journal of mammalogy 42(3)-372-380

-Hoffmann F. G., Owen J. G. e Baker R. J. 2003. mtDNA perspective of chromosomal diversification and hybridization in Peters' tent-making bat (*Uroderma bilobatum*: Phyllostomidae) Molecular Ecology. 12, 2981-2993

-Horàček I. 1982. Note of glacial time environment in Northern Bulgaria. Praha 32, 95-103

-Horáček I., Hanák V., Gaisler J., 2001. Bats of the palearctic region: a taxonomic and biogeographic review. Proceedings of theVIIIth EBRS 1, 11-157

-Howard D. J., Britch S. C., Braswell W. E Marshall J. L. Evolution in hybrid zones. Cambridge University Press. 3-28

-Hubbs C. L. 1955 Hybridization between fish species in nature. Syst. Zool. 4, 1–20

-Hulva P., Horáček I., Strelkov P. e Benda P. 2004. Molecular architecture of *Pipistrellus pipistrellus*/*Pipistrellus pygmaeus* complex (Chiroptera: Vespertilionidae): further cryptic species and Mediterranean origin of the divergence Molecular Phylogenetics and Evolution, 32(3), 1023-1035

-Hutterer R., Ivanova T., Meyer-Cords C. e Rodrigues L. 2005. Bat Migrations in Europe. Federal Agency for Nature Conservation in Germany 180 p.

-Ibáñez C., Mudarra J.G., Ruedi M., Stadelmann B. e Juste J. 2006. The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. Acta Chiropterologica, 8(2), 277–297

-Jones K. E., Barrat E. M., 1999. *Vespertilio pipistrellus* Schreber, 1774 and *V. pygmaeus* Leach, 1825 (currently *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*; Mammalia, Chiroptera): Proposed designation. Bulletin of Zoological Nomenclature, 56(3): 182-186

- Jones G. e Holderied M. W. 2007. Bat echolocation calls: adaptation and convergent evolution. Proc. R. Soc. B 274, 905–912

-Kalko E., Schnitzler H., 1993. Plasticity in echolocation signals of European pipistrelle bats in search flight: implications for habitat use and prey detection. Behav. Ecol. Sociobiol. 33: 414–428

-Katti M. V., Ranjekar P. K. e Gupta V. S. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. Mol. Biol. Evol. 18, 1161–1167

- Kiefer A. and Veith M. 2001. A new species of long-eared bat from Europe (Chiroptera: Vespertilionidae). Myotis, 39: 5-16

-Kruglyak S., Durrett R. T. Schug, M. D. e Aquadro, C. F. 1998. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 10774–10778

-Laird PW, Zijderveld A., Linders K., Rudnicki M.A., Jaenish R., Berns A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. Nucleic Acid Research 19(15)-.4293.

-Lanza B. e Finotello P.L. 1985. Biogeografia dei Chirotteri italiani. Boll. Mus. Reg. Sc. Nat. Torino. 3(2), 389-420

-Leary, R.F. et al. 1996. Success of basibranchial teeth in indicating pure populations of rainbow trout and failure to indicate pure populations of westslope cutthroat trout. N. Am. J. Fish. Manage. 16, 210–213

- Lecis R., Pierpaoli M., Birò Z. S., Szemethy L., Ragni B., Vercillo F. e Randi E . 2006. Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. Molecular Ecology. 15, 119–131

-Limpens H., Kapteyn, K. 1991. Bats, their behaviour and linear landscape elements. Myotis. 29: 39-48

-Lustrat P., 2001. Rapport d'etude 1995-2001- Milieux exploites par le chiropteres en activite de chasse

-Mallet, J. et al. 1998. Mimicry and warning color at the boundary between races and species. In Endless Forms: Species and Speciation (Howard, D.J. and Berlocher, S.H., eds), pp. 390–403, Oxford University Press

- Mallet J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. Trends in Ecology and Evolution. 2(5), 229-235

- Marucco F., Boitani L., Pletscher D., Fabbri E., Randi E., Schwartz M. 2007. Monitoring wolf population size and survival by non-invasive CMR techniques in the western Alps in: Prigioni C. and Sforzi A. (eds) 2007. Abstracts V European Congress of Mammalogy, Hystrix It. J. Mamm., (n.s.) Vol. I-2, Supp. (2007): 1-576

- Mayer F. e von Helversen O. 2001. Cryptic diversity in European bats. Proc. R. Soc. Lond. B 268, 1825-1832

-Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York

- Moore W.S.1977. An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. Q. Rev. Biol. 52, 263–277

-Morin PA, Chambers KE, Boesch C, Vigilant L 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from non-invasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). Mol Ecol 10:1835–1844

- Mucci N., Randi E. 2007. Non-invasive genetics of otter (*Lutra lutra*) populations in Italy in: Prigioni C. and Sforzi A. (eds) 2007. Abstracts V European Congress of Mammalogy, Hystrix It. J. Mamm., (n.s.) Vol. I-2, Supp. (2007): 1-576

- Mucedda M., Kiefer A., Pidinchedda E. and Veith M. 2002. A new species of longeared bat (Chiroptera, Vespertilionidae) from Sardinia (Italy). Acta Chiropterologica. 4(2): 121-135

-Muller H. J. 1939. Reversibility in evolution considered from the standpoint of genetics. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 14,261–280

-Paetkau D. e Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. Molecular Ecology, 3, 489-495

-Parsons K. N., Jones G., Davidson-Wattsb I., Greenaway F. 2003. Swarming of bats at underground sites in Britain - implications for conservation. Biological Conservation 111, 63–70

- Petit E., Excoffier L, Mayer F. 1999. No evidence of bottleneck in the postglacial recolonization of Europe by the noctule bat (*Nyctalus noctula*). Evolution 53, 1247-1258

-Petit E. and Mayer F. 2000. A population genetic analysis of migration: the case of the noctule bat (*Nyctalus noctula*) Molecular Ecology (2000) 9, 683–690

-Piggott MP, Taylor A.C.2003. Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species.
Wildlife Research, 30, 1–13

- Piksa K. e Woloszyn B. W. 2001 Postglacial bat remains from the Polish Tatra caves. Lynx 32, 301–311

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

-Puechmaille, S. 2005. Estimation de la taille des populations par une méthode de capture-marquage-recapture non invasive: exemple des colonies de Petit rhinolophe (*Rhinolophus hipposideros*)., pp. 37p. Rennes: Université Rennes 1, UMR CNRS 6552 Ethologie-Evolution-Ecologie, équipe comportement, environnement et processus évolutifs

-Puechmaille S., Mathy G. e Petit E. J. 2007. Good DNA from bat droppings. Acta Chiropterologica, 9, 269-276

-Puechmaille S. J. e Petit E. J. 2007. Empirical evaluation of noninvasive capture-mark-recapture estimate of population size based on a single sampling session. Journal of Applied Ecology. 44, 843-852

-Racey P.A., Barratt E. M., Burland T. M., Deaville R., Gotelli D., Jones G. e S.B. Piertney. 2007. Microsatellite DNA polymorphism confirms reproductive isolation and reveals differences in population genetic structure of cryptic pipistrelle bat species. Biological Journal of the Linnean Society. 90, 539–550

-Rachwald A., Wodecka K., Malzahn E., Kluziński L., 2004. Bat activity in coniferous forest areas and the impact of air pollution. Mammalia 68(4):445-453

-Randi E., 2007. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. Molecular Ecology 17(1), 285-293

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

-Rhymer J.M. et al. 1994. Mitochondrial analysis of gene flow between New Zealand mallards (*Anas platyrhynchos*) and grey ducks (*A. superciliosa*). Auk 111, 970–978

-Roesli, M.; Bontadina, F.; Maddalena, T.; Moretti, M., 2004: Studio sulla colonia di riproduzione di *Myotis myotis* (Vespertilio maggiore) e di *Myotis blythi* (Vespertilio di Blyth) della Collegiata di Sant'Antonio a Locarno (oggetto d'importanza nazionale n. 728). - Dipartimento del territorio - Ufficio protezione della natura. Rapporto non pubblicato, pp. 44

-Rossiter S. J., Jones G., Ransome R. D. e Barratt E. M. 2000. Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum.* Molecular Ecology 9, 1131–1135

-Ruedi M., Arlettaz R. e Maddalena T. 1990. Distinction morphologique et biochimique de deux espe©ces jumelles de chauves-souris: *Myotis myotis* (Bork.) et *Myotis blythi* (Tomes)(Mammalia;Vespertilionidae). Mammalia 54, 415-429

-Ruedi M. e Mayer F. 2001. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. Molecular Phylogenetics and Evolution. 21(3), 436–448

-Ruedi M., Castella V. 2003. Genetic consequences of the ice ages on nurseries of the bat *Myotis myotis* a mitochondrial and nuclear survey. Molecular Ecology. 12, 1527–1540

- Ruedi M., Walter S., Fischer M., Scaravelli D., Excoffier L. e Heckel G. Italy as a major ice age refuge area for the bat *Myotis myotis* (chiroptera : vespertilionidae) in Europe. In press.

- Ruibal M., Peakall R. 2007. An evaluation of the reliability of estimating population abundance with faecal and hair DNA for the Australian endangered species the spotted-tailed quoll (*Dasyurus maculatus*) in: Prigioni C. and Sforzi A. (eds) 2007. Abstracts V European Congress of Mammalogy, Hystrix It. J. Mamm., (n.s.) Vol. I-2, Supp. (2007): 1-576

-Russo D., Jones G. e Arlettaz R. 2007. Echolocation and passive listening by foraging mouse-eared bats *Myotis myotis* and *M. blythii* The Journal of Experimental Biology 210, 166-176

- Seehausen O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. TRENDS in Ecology and Evolution 19(4), 198-207

-Servedio M.R. e Noor M.A.F. 2003. The role of reinforcement in speciation: theory and data. Annu. Rev. Ecol. Syst. 34, 339–364

-Sevilla P. 1989. Quaternary fauna of bats in Spain- Paleoecologic and biogeographic interest. p. 349-355 in Hanàk V., Horàček I. Gaisler J. European Bat Research 1987. Charles. Univ. Press.

-Shackleton JC, Vanandel TH e Runnels CN. 1984. Coastal paleogeography of the central and western Mediterranean during the last 125,000 years and its archaeological implications. Journal of Field Archaeology 11, 307-314

-Simmons, N. B. 2005. Order Chiroptera. in: Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference, Third Edition, Volume 1, 312-529 (D.E. Wilson and D.M Reeder, eds.). Johns Hopkins University Press

-Sindaco R., Baratti N., Boano G., 1992.I Chirotteri del Piemonte e della Valle d'Aosta. Hystrix, 4(1):1-40

-Slatkin, M., 1991 Inbreeding coefficients and coalescence times. Genet. Res. Camb. 58: 167-175

-Stadelmann B., Lin L.-K., Kunz T.H., Ruedi M. 2001. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 43, 32–48

- Stoeckle T.M., Weber D., Hefti-gautschi B. 2007. Estimation of wildcat (*Felis silvestris silvestris*) population size with non-invasive genetic methods and camera trapping in: Prigioni C. and Sforzi A. (eds) 2007. Abstracts V European Congress of Mammalogy, Hystrix It. J. Mamm., (n.s.) Vol. I-2, Supp. (2007): 1-576

-Stone G. 2000. Phylogeography, hybridization and speciation. Trends Ecol. Evol. 15, 354–355

-Strelkov P. P. 1972. *Myotis blythi* (Tomes, 1857): distribution, geographical variability and differences from *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797) Acta Theriologica 17 (21-31): 355-380

-Sutherland VJ et al. 2006. The identification of 100 ecological questions of high policy relevance in the UK. Journal of Applied Ecology. 43, 617–627

- Taberlet P. e Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification Biological Journal of the Linnean Society . 68, 41–55

-Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acid Research. 17, 6463-6471

-Thomas 0. 1905. On a collection of mammals from Persia and Armenia presented to the British Museum by Col. A. C. Bailward. Proc. Zool. Soc. London (2): 521

-Turelli, M. et al. 2001. Theory and speciation. Trends Ecol. Evol. 16, 330–343

- Verardi A., Lucchini V. e Randi E., 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. Molecular Ecology 15, 2845–2855

-Vege, S. e MCCracken G. F.. 2001. Microsatellite genotypes of big brown bats (*Eptesicus fuscus*: Vespertilionidae, Chiroptera) obtained from their faeces. Acta Chiropterologica. 3, 237–244

-Verboom, Huitema, 1997. The importance of linear landscape elements for the pipistrelle *Pipistrellus pipistrellus* and the serotine bat *Eptesicus serotinus*. Landscape Ecology, 12(2): 117-125

-Viglino A. 2008. Studio della variabilità genetica mitocondriale in popolazioni dell'Italia settentrionale di Chirotteri. Tesi di laurea.

- Vilà C. et al. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. Science 276, 1687

-Wallace L.E. 2006. Spatial genetic structure and frequency of interspecific hybridization in *Platanthera aquilonis* and *P. dilatata* (orchidaceae) occurring in sympatry. American Journal of Botany 93(7): 1001–1009

-Webb N.J. e Tidemann C.R. 1995. Hybridisation between black (*Pteropus alecto*) and grey-headed (*P. poliocephalus*) flying-foxes (Megachiroptera: Pteropodidae). Australian Mammalogy. 18, 19-26.

-Wickramasinghe L. P., Harris S., Jones G.,Vaughan N., 2003. Bat activity and species richness on organic and conventional farms: impact on agricultural intensification. Journal of applied ecology.
40, 984-993

-Wright S., 1951. The genetical structure of populations. Ann. Eugen. 15:323-354

- Zahn A. e Dippel B., 1997. Male roosting habits and mating behaviour of *Myotis myotis* . J. Zool. 243: 659-674

-Zinck, J., Duffield D. A. e Ormsbee P. C.. 2004. Primers for identification and polymorphism assessment of Vespertilionid bats in the Pacific Northwest. Molecular Ecology Notes. 4, 239–242