

**WP5 - Valutazione degli effetti delle variazioni dei livelli sul sistema fiume attraverso nuovi indicatori**

REPORT ATTIVITÀ 5.4

**ANALISI GENETICA  
DI SPECIE ITTICHE TARGET**

A cura di:

*Dott.ssa Serena Zaccara*

*Dott.ssa Caterina Maria Antognazza*

*Dott.ssa Silvia Quadroni*

*Prof. Giuseppe Crosa*



## **SCOPO DELL'ATTIVITÀ**

Scopo dell'attività 5.4 è stato quello di caratterizzare geneticamente la popolazione della specie ittica target, il barbo comune o barbo del Po (*Barbus plebejus* Bonaparte, 1839), nel tratto di Fiume Ticino oggetto del presente progetto INTERREG “Parchi Verbano Ticino”. Tale specie è stata scelta in quanto di rilevante interesse conservazionistico; è infatti presente negli Allegati II e V della Direttiva Habitat (92/43/CEE).

In questo report viene fornito il risultato dell'analisi molecolare di individui campionati in diverse zone del fiume per valutare la variabilità e l'integrità genetica della popolazione di barbi, raccogliere informazioni sulla presenza della specie esotica barbo europeo (*Barbus barbus* Linnaeus, 1758) e dare supporto genetico alla tassonomia per la distinzione delle due specie.

## **PREMESSA**

Il generale progressivo degrado degli ecosistemi acquatici degli ultimi anni ha portato ad un impoverimento della fauna ittica autoctona, ove l'introduzione di specie alloctone invasive risulta uno tra i più importanti fattori di perturbazione di origine antropica, andando, infatti, a favorire un'alterazione degli equilibri ecosistemici a danno delle specie native (Cucherousset & Olden, 2011; Didham et al., 2005; Gozlan et al., 2010; Hermoso & Clavero, 2011). Questo impatto è incrementato nel caso in cui la nicchia ecologica della specie invasiva si sovrappone a quella della specie nativa (Strayer, 2006) e se le due specie sono tassonomicamente simili, quindi con la possibilità di formare individui ibridi (Hanfling et al., 2005). Generalmente la presenza di specie alloctone è più marcata nei tratti di pianura in quanto questi tratti presentano caratteristiche, sia biologiche che fisiche, favorevoli a molte specie esotiche (McKinney & Lockwood, 1999).

È questo il caso del Fiume Ticino che possiede caratteristiche potamali tipiche dei fiumi di bassa pianura, conseguentemente con una vocazione ittica a Ciprinidi limnofili. Oltre alla pressione biologica derivante dalla presenza di specie alloctone invasive, il Ticino è uno dei fiumi italiani il cui regime idrico è maggiormente regolamentato: a partire dagli inizi degli anni '40 con la costruzione della Diga della Miorina all'ingresso del Lago Maggiore e soprattutto con la significativa riduzione delle portate a valle di questa diga, ad opera di ulteriori strutture idrauliche tra cui la Diga del Panperduto, per la produzione di energia idroelettrica e l'irrigazione dei terreni agricoli (Salmaso et al., 2016). Questa generale compromissione degli habitat può accentuare i processi di invasione delle specie alloctone (Hobbs & Huenneke, 1992), che a loro volta possono risultare favoriti anche dalle opere di deframmentazione messe in atto nella scorsa decade; opere ingegneristiche costruite lungo sia il Fiume Ticino che il Fiume Po hanno infatti ricreato la connettività longitudinale a valle del Lago Maggiore fino al Mar Adriatico (Puzzi et al., 2017).

I monitoraggi effettuati in passato della comunità ittica del Ticino indicano un'alta ricchezza in specie, ma solo poco più del 50% delle specie censite risultano autoctone (Salmaso et al., 2016). Una delle specie autoctone maggiormente presente è il barbo del Po *Barbus plebejus* Bonaparte, 1839.

Il genere *Barbus* è definito come un set polifiletico, comprendente almeno 800 specie diffuse in Asia, Africa e Europa, e costituisce il genere dominante della famiglia dei Ciprinidi (Tsigenopoulos & Berrebi, 2000). Ampiamente diffuso in Europa, in termini di numerosità di specie è più rappresentato nella zona meridionale che settentrionale e le sue caratteristiche biologiche lo rendono un eccellente modello per lo studio dei pattern filogeografici nella regione mediterranea. Infatti, questo genere include specie a diversa ploidia, è soggetto a ibridazione e le diverse specie possono essere raggruppate in base alle preferenze ecologiche (Tsigenopoulos & Berrebi, 2000).

Il barbo del Po risulta endemico dei bacini idrografici della parte settentrionale del Mar Adriatico, in particolare del distretto ittiogeografico Padano-Veneto, ed è stato introdotto in diversi bacini idrografici del Mar Tirreno (Bianco, 2003). Presenta un ecofenotipo di tipo lacustre, preferendo habitat dei corsi d'acqua di bassa collina, aventi una corrente regolare oltre che una modesta profondità, dove il letto del fiume è principalmente costituito da ghiaia funzionale alla deposizione delle uova. È caratterizzato da una taglia corporea relativamente grande (lunghezza totale fino a 60 cm) (Kottelat & Freyhof, 2007; Tsigenopoulos et al., 1999). Viene considerata come specie con moderata flessibilità di adattamento, tuttavia risente notevolmente degli impatti antropogenici, quali l'alterazione dell'habitat dovuta a canalizzazioni, costruzione di sbarramenti, prelievi di ghiaia e fluitazioni di sedimento, nonché inquinamento genetico dovuto a introduzioni di specie alloctone. Nella Direttiva Habitat 92/43/CEE (Allegati II e V) (Communities, 1992) viene elencato tra le “specie animali di interesse la cui conservazione richiede la designazione di zone speciali di conservazione”. Nella Lista Rossa dei Pesci d'Acqua Dolce Indigeni in Italia il *B. plebejus* viene definito specie “a basso rischio” (Zerunian, 2003); tuttavia, l'integrità di questa specie è messa a rischio dalla presenza di *Barbus barbus* Linnaeus, 1758, specie alloctona introdotta in Italia a metà degli anni '90 a fini alieutici (Bianco, 1995). Per il barbo del Po, infatti, la minaccia principale è rappresentata dalla competizione e dalla predazione ad opera del barbo europeo. Come il barbo del Po, questa specie appartiene all'ecofenotipo lacustre, prediligendo fiumi larghi e calmi ma con corrente regolare, arrivando ad una lunghezza totale anche di 90 cm (Kottelat & Freyhof, 2007; Tsigenopoulos et al., 1999). Si è rapidamente espansa come popolazione invasiva, in particolare in pianura, nei bacini fluviali adriatici caratterizzati da habitat idonei; la sovrapposizione di nicchia con il barbo del Po e la plasticità del genere, hanno contribuito a fenomeni di ibridazione ampiamente diffusa nel nord Italia (Buonerba et al., 2015; Meraner et al., 2013). Nel Fiume Adda, ad esempio, il livello di ibridazione tra il barbo del Po e l'invasivo *B. barbus*, già una decina di anni fa, rappresentava quasi il 50% degli

esemplari analizzati (Zaccara et al., 2014), mentre, più recentemente, nessun individuo di barbo del Po è stato trovato nel Fiume Oglio (Quadroni et al., 2016).

Morfologicamente sarebbe possibile discriminare le due specie di barbo dal numero di scaglie lungo la linea laterale e dalla forma e microstruttura della pinna dorsale ma questa discriminazione risulta inaffidabile per la variabilità di questi tratti all'interno della stessa specie (Bianco, 2003; Kottelat & Freyhof, 2007) e ancor più ostacolata dai frequenti fenomeni di ibridazione all'interno del genere *Barbus* (Buonerba et al., 2015; Gante et al., 2008; Tsigenopoulos et al., 2002), rendendo necessario l'utilizzo di tecniche molecolari.

## CAMPIONAMENTO

Mediante l'utilizzo di un elettroscorditore sono stati catturati 58 esemplari appartenenti al genere *Barbus* durante cinque campagne di campionamento condotte tra il 2020 e il 2022. Il campionamento è stato effettuato in due stazioni all'interno del tratto d'indagine del presente progetto, in corrispondenza del passaggio per pesci della Diga del Panperduto (PAN) e in località Somma Lombardo (SL, stazione T1). Per confrontare lo stato della popolazione di barbo di questo tratto con quello di una popolazione campionata molto più a valle, sono stati catturati alcuni individui nei pressi di Pavia (PV), vicino alla confluenza con il Fiume Po (Tabella 1; Figura 1).

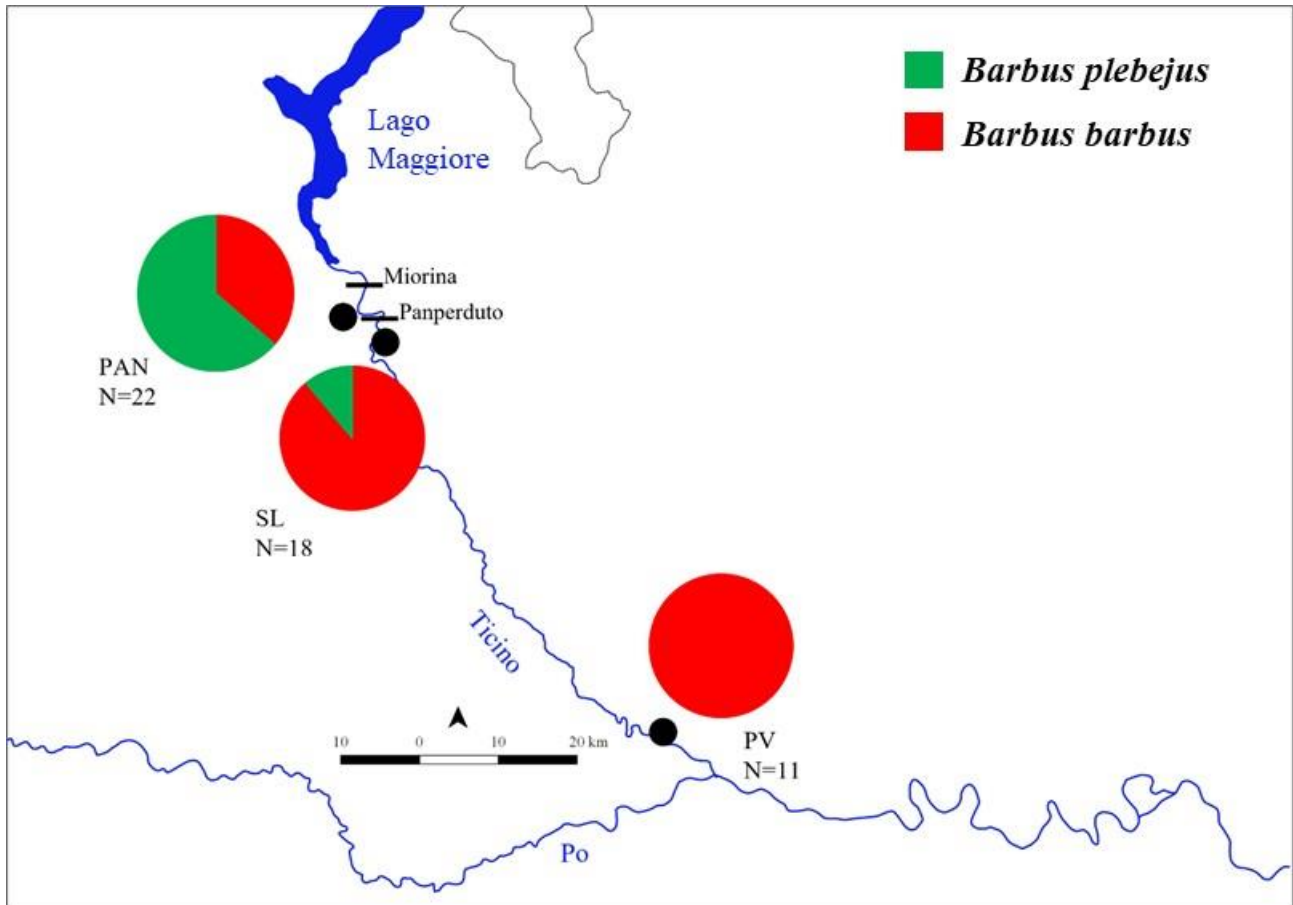
**Tabella 1.** *I tre siti di campionamento dei barbi con il relativo codice utilizzato nelle analisi genetiche (ID), l'anno di campionamento e il numero di esemplari catturati (N).*

Località	ID	Anno	N
Panperduto	PAN	2021	25
Somma Lombardo	SL	2022	20
Pavia	PV	2020-21	13
			<b>58</b>

È ormai dimostrato che il prelievo mediante l'utilizzo di un elettroscorditore non provoca eccessivi danni alla fauna ittica e quindi permette una restituzione all'ambiente acquatico di tutti i pesci catturati senza alterare le caratteristiche della comunità ittica campionata (Beaumont et al., 2005; Reynolds, 1996). Tutti i barbi catturati sono stati anestetizzati (MS-222) e quindi liberati dopo che per ognuno di essi sono state effettuate, direttamente in campo, le seguenti operazioni:

- misura della lunghezza totale, dall'apice del muso fino al lobo superiore della pinna caudale, mediante una tavoletta ittiometrica graduata (precisione:  $\pm 0,1$  cm) (Tabella 2);

- determinazione del peso mediante bilancia elettronica (precisione:  $\pm 1$  g) (Tabella 2);
- prelievo di una parte della pinna anale, conservata in etanolo, per le analisi genetiche;
- fotografia mediante fotocamera Nikon D300 (24-85 mm) posizionata su un apposito supporto (Figura 2).



**Figura 1.** I tre siti di campionamento dei barbi lungo il tratto di Fiume Ticino sublacuale (PAN, SL, PV). Per ogni sito è indicato il numero dei campioni analizzati con successo (N) (Tabella 2). I grafici a torta mostrano la frequenza relativa degli aplotipi di *Barbus plebejus* (verde) e di *Barbus barbus* (rosso).

**Tabella 2.** Dettaglio degli individui di barbo campionati presso il passaggio per pesci della Diga del Panperduto (PAN) e a Somma Lombardo (SL), con indicazione della lunghezza totale e del peso.

<b>ID Campione</b>	<b>Lunghezza (mm)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>ID Campione</b>	<b>Lunghezza (mm)</b>	<b>Peso (g)</b>
PAN1	387	437	SL01	129	20,4
PAN2	391	510,3	SL02	124	19,8
PAN3	380	496,8	SL03	102	9,5
PAN4	431	583,3	SL04	94	7,5
PAN5	393	560,2	SL05	103	10,4
PAN6	462	1048,8	SL06	99	9,6
PAN7	305	223,2	SL07	96	7,5
PAN8	302	213,7	SL08	97	7,6
PAN9	217	92	SL09	97	8,6
PAN10	272	108	SL10	82	5,4
PAN11	171	45,4	SL11	89	6,0
PAN12	335	304,7	SL12	86	5,3
PAN13	353	397,4	SL13	282	199,3
PAN14	283	197	SL14	186	60,5
PAN15	306	229,8	SL15	180	53,0
PAN16	242	99,7	SL16	177	56,3
PAN17	179	46,8	SL17	178	60,1
PAN18	352	361,2	SL18	158	38,2
PAN19	370	390,8	SL19	148	32,3
PAN20	298	227,6	SL20	157	27,6
PAN21	295	218,1			
PAN22	299	242,9			
PAN23	321	283,1			
PAN24	342	316,1			
PAN25	309	250,9			



**Figura 2.** Fotografia di un individuo caratterizzato geneticamente come *B. plebejus* (PAN4, lunghezza = 431 cm, foto in alto) e di un individuo caratterizzato come *B. barbus* (PAN3, lunghezza = 380 cm, foto in basso).

## ANALISI GENETICHE

### Metodi

Il DNA è stato estratto tramite metodo salting out (Aljanabi & Martinez, 1997), a partire da un frammento della pinna anale.

La caratterizzazione molecolare degli individui è stata ottenuta mediante l'uso della Polymerase Chain Reaction (PCR) e di una coppia di primer sito-specifici L15267 e H1646 (Briolay et al., 1998) disegnati per il citocromo b (*cyt b*) dei Ciprinidi. Le reazioni di amplificazione sono state condotte utilizzando il Multiplex PCR kit (Qiagen), seguendo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice, in un volume di reazione finale pari a 10 $\mu$ l, contenente circa 10 ng di DNA e 0.25  $\mu$ M di ciascun primer. Il profilo di amplificazione utilizzato è il seguente: denaturazione iniziale per 15 minuti a 95 °C, seguita da 35 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 secondi, annealing a 55 °C per 90 secondi e una fase di estensione a 72 °C per 90 secondi, il tutto seguito da un passaggio di allungamento finale di

10 minuti a 72 °C. I prodotti di PCR ottenuti sono quindi stati purificati con un kit a base enzimatica (EuroSAP PCR Enzymatic clean-up kit-Euroclone) e inviati a una ditta esterna (Macrogen Inc.) per il sequenziamento in entrambe le direzioni (forward e reverse). Per ogni sequenza è stato ottenuto un elettroferogramma; le sequenze ottenute sono state allineate manualmente mediante il software BioEdit ver. 7.1.3.0 (Hall, 1999) per eliminare le ambiguità e per controllare i siti polimorfici. È stato costruito quindi un allineamento multiplo completo di tutte le sequenze ottenute, alle quali sono state aggiunte sequenze pubblicate in banca genetica e selezionate per attinenza genetica mediante la tecnica del BLASTn.

I dati genetici così ottenuti sono stati suddivisi per specie e processati con il software DNAsp ver. 5.1 (Librado & Rozas, 2009) (diversità aplotipica - H e diversità nucleotidica -  $\pi$ ).

La ricostruzione delle relazioni filogenetiche tra gli aplotipi individuati è stata eseguita utilizzando il software PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) e ricorrendo a due diversi approcci:

- la massima verosimiglianza (ML), implementata nel software Garli ver. 1.0 (Zwickl, 2006); l'analisi è stata condotta utilizzando il modello evolutivo GTR (Lanave et al., 1984), stimato mediante il software jModeltest 2.1.10 (Darriba et al., 2012) mentre il supporto statistico di ciascun nodo è stato realizzato mediante 1000 repliche di bootstrap;
- il metodo di inferenza bayesiana (BI), implementato da Mr Bayes ver. 3.2 (Ronquist et al., 2012); sono state condotte quattro simulazioni di catene di Markov (MCMC) indipendenti, per  $20^6$  generazioni ciascuna con un burn-in iniziale di  $5 \times 10^5$  generazioni (5000 alberi) per  $p < 0.01$ .

Quindi sono stati creati 2 alberi filogenetici grazie al software FigTree ver. 1.4.3 (Rambaut, 2016) successivamente riuniti in un unico albero di consenso, rappresentativo delle due metodiche.

Nelle analisi filogenetiche sono state inserite le sequenze del *cyt b* scaricate dalla banca genetica (GenBank) rappresentative di diverse specie di *Barbus*, definite come ecofenotipi fluvio-lacustri e reofili: *B. barbus* (Linnaeus, 1758), *B. plebejus* (Bonaparte, 1839), *B. tyberinus* (Bonaparte, 1839), *B. caninus* (Bonaparte, 1839) e *B. meridionalis* (Risso, 1826) (Tabella S1). In particolare, sono state usate tutte le sequenze depositate in banca dati appartenenti a barbi provenienti dal nord Italia. Per radicare gli alberi filogenetici è stata utilizzata una sequenza di *B. comizo* (Steindachner, 1864). Inoltre, sono stati aggiunti dati precedentemente raccolti e analizzati relativi a barbi catturati nel Fiume Oglio per un confronto sul territorio (Quadroni et al., 2016).

I rapporti reciproci tra i vari aplotipi individuati sono stati indagati utilizzando il criterio della parsimonia statistica, implementato dal software TCS ver. 1.18 (Clement et al., 2000). L'analisi è stata condotta utilizzando un livello di confidenza  $> 95\%$  portando alla costruzione di un network in



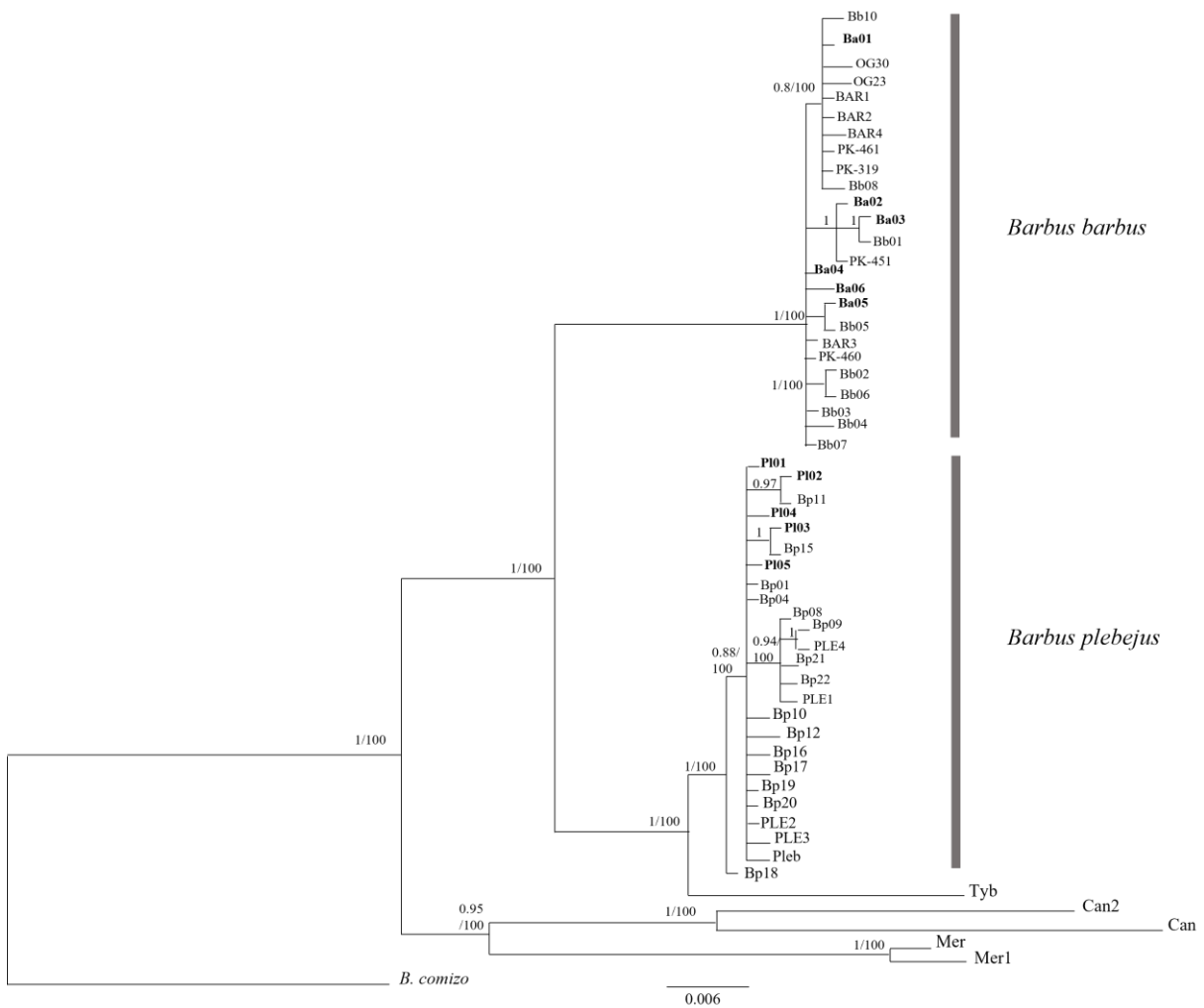
cui i vari aplotipi risultano collegati tra di loro fino a un numero massimo di step di mutazione pari a 14.

Infine, l'analisi demografica, tramite mismatch distribution è stata eseguita con Arlequin ver. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

## **Risultati**

Su un totale di 58 individui, l'amplificazione è fallita solo per 8 campioni: tre campioni di Pavia (PV4, PV9 e PV13), tre di Panperduto (PAN1, PAN13, PAN21) e due di Somma Lombardo (SL5, SL7). È stato quindi prodotto un allineamento multiplo di 86 sequenze lunghe 844 bp, contraddistinto da 12 aplotipi. Gli alberi evolutivi ottenuti tramite i due metodi precedentemente descritti sono stati uniti e visualizzati radicalizzandoli sulla sequenza outgroup di *B. comizo*. Ogni analisi è stata validata da un valore di probabilità a posteriori e di permutazione (bootstrap) utile a validare la significatività della struttura ad albero. Nella Figura 3 è visibile la netta separazione tra le diverse specie di barbo. Tutti gli individui campionati in questo studio ricadono nella clade di *B. barbuis* e di *B. plebejus*. Nello specifico, dei 12 aplotipi trovati, 3 sono risultati unici, ovvero non ancora descritti in banca dati, di cui uno appartenente alla specie *B. barbuis* (Ba06) e 2 appartenenti alla specie *B. plebejus* (Tabella 3). I restanti 9 aplotipi (5 appartenenti a *B. barbuis* e 4 a *B. plebejus*) risultano già presenti in banca dati e precedentemente descritti nel nord Italia (Tabelle 3 e S1).

Considerando il gradiente monte-valle, si può osservare una differente composizione dei siti di campionamento; più a monte (PAN) la maggior parte dei campioni sono risultati appartenenti alla specie *B. plebejus* (64%), percentuale che diminuisce sensibilmente nel secondo sito di campionamento (SL) (11% di *B. plebejus*) con totale perdita di questa specie più a valle (Figura 1; Tabella 3). Situazione contrapposta nel vicino Fiume Adda, in cui da monte a valle la percentuale di *B. barbuis* diminuisce, con una presenza sempre preponderante ( $\geq 50\%$ ) di *B. plebejus* (Zaccara et al., 2014).



**Figura 3.** Albero filogenetico di *Barbus* sp. basato sul frammento di 844 bp del marcatore mitocondriale *cyt b*. L'albero è il risultato dell'integrazione dei metodi di Inferenza Bayesiana (BI) e Maximum Likelihood (ML). Ai nodi significativi ( $\geq 70\%$ ) vengono riportati i valori di probabilità a posteriori e bootstrap.

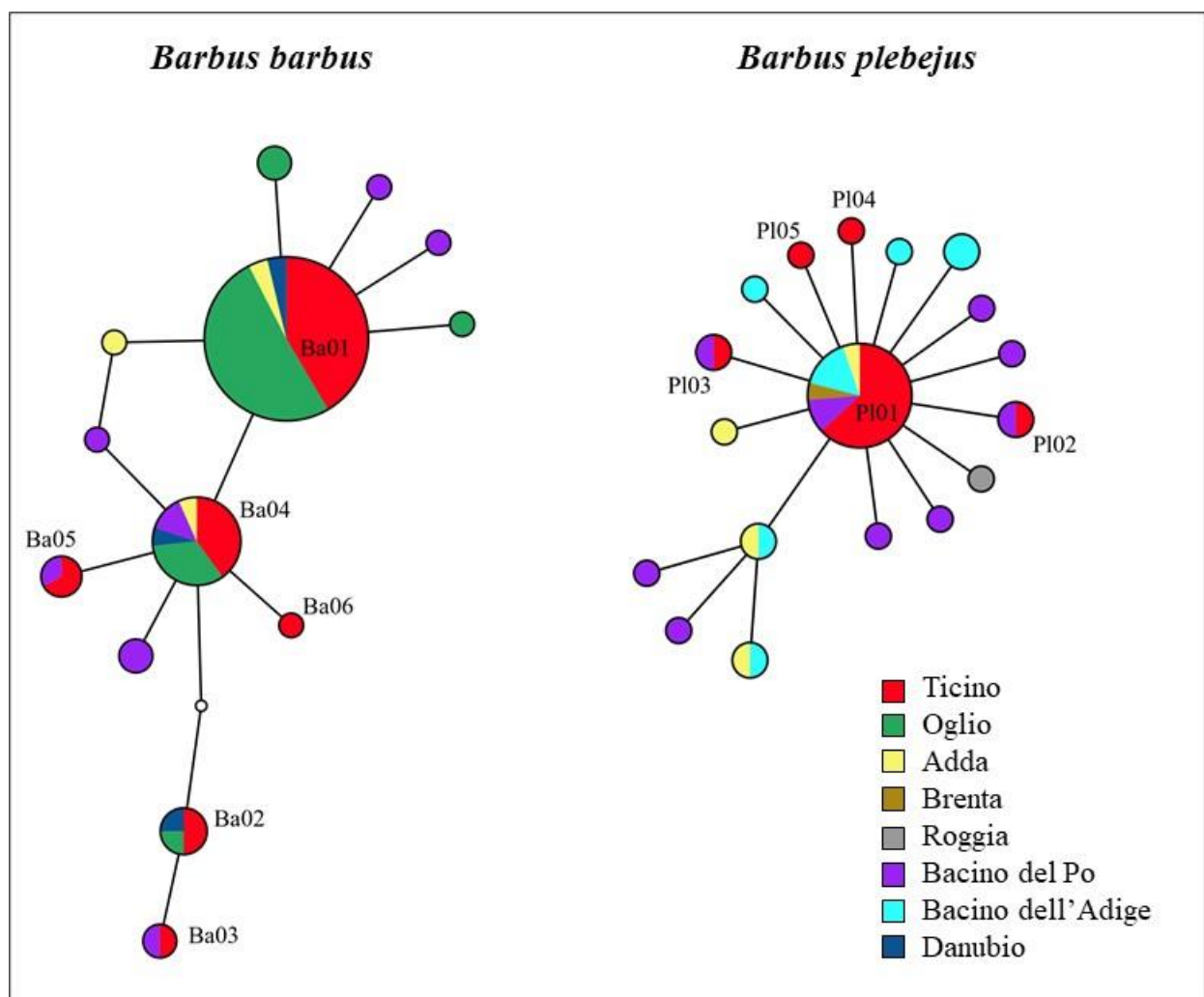
**Tabella 3.** Distribuzione aplotipica basata sulle sequenze del marcatore mitocondriale *cyt b* (844 bp) e indici di diversità genetica (diversità aplotipica, *H*, e nucleotidica,  $\pi$ , con relativa deviazione standard). Sono indicati anche il codice della popolazione (ID) e il numero di campioni amplificati con successo (*N*).

<i>Barbus barbus</i>											<i>Barbus plebejus</i>							
ID	N	Ba01	Ba02	Ba03	Ba04	Ba05	Ba06*	<i>h</i>	<i>H</i> ± ds	$\pi$ ± ds	PI01	PI02	PI03	PI04*	PI05*	<i>h</i>	<i>H</i> ± ds	$\pi$ ± ds
PAN	22	5		1	1		1	4	0.64 ± 0.18	0.002 ± 0.0001	11	1	1	1	4	0.40 ± 0.16	0.001 ± 0.001	
SL	18	9			5	2		3	0.61 ± 0.008	0.001 ± 0.0001	1				1	2	1 ± 0.25	0.0012 ± 0.001
PV	11	8	2					2	0.36 ± 0.16	0.001 ± 0.0001							-	-
Tot	50	22	2	1	6	2	1	6	0.56 ± 0.09	0.001 ± 0.0002	12	1	1	1	1	5	0.45 ± 0.151	0.001 ± 0.002

\*Aplotipi unici

Entrambe le specie mostrano in Ticino valori medio-alti di diversità aplotipica e valori medi di diversità nucleotidica (Tabella 3), maggiori di quanto riscontrato in precedenza nel Fiume Adda ( $H = 0.38$ ;  $\pi = 0.001$ ) per il *B. plebejus* e minori per il *B. barbuis* ( $H = 0.71$ ;  $\pi = 0.001$ ) (Zaccara et al., 2014). I valori di diversità aplotipica del *B. barbuis* sono invece comparabili a quanto descritto per il Fiume Oglio (Quadroni et al., 2016).

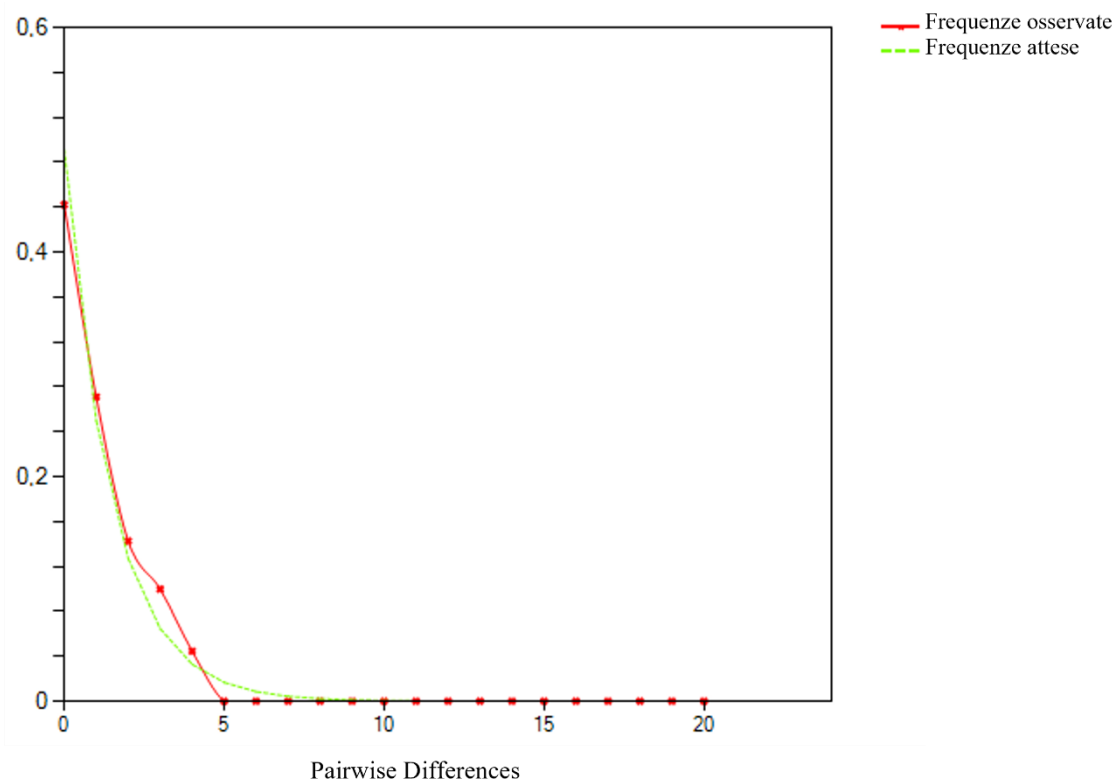
Nella Figura 4 è possibile osservare le relazioni evolutive che intercorrono tra gli aplotipi rinvenuti in questo studio e quelli precedentemente descritti nel nord Italia (Tabella S1). Per un diretto confronto con fiumi comparabili con il Ticino sono stati evidenziati gli aplotipi descritti nel Fiume Oglio e nel Fiume Adda.



**Figura 4.** Network parsimoniosi ottenuti dell'allineamento multiplo del frammento di 844 bp di *cyt b* mtDNA unitamente alle sequenze della banca dati di *B. barbuis* e *B. plebejus* rinvenuti nel nord Italia (Tabella S1). Ogni cerchio rappresenta un aplotipo la cui dimensione è proporzionata alla sua frequenza (Tabella 2). Il cerchio più piccolo non colorato rappresenta un ipotetico aplotipo mancante (passaggio mutazionale).

Gli aplotipi di *B. barbuis* più frequenti (Ba01, Ba02, Ba04) corrispondono agli aplotipi già evidenziati nell'Oglio e in Adda (Tabella S1), originari del Fiume Danubio (Kotlík et al., 2004). Strettamente connessi a questi sono gli aplotipi Ba05 e Ba03, già descritti nel bacino del Po (Meraner et al., 2013), e il nuovo aplotipo qui trovato (Ba06) dista una mutazione dal secondo aplotipo più frequente Ba04 (Figura 4). Il network del *B. plebejus* presenta una forma radiale attorno all'aplotipo più frequente (PI01), largamente presente nel nord Italia, essendo già stato descritto in precedenza nei bacini di Brenta, Adige, Adda e in generale nel bacino del Po (Meraner et al., 2013; Zaccara et al., 2014) (Figura 4).

La combinazione di valori di  $H$  e  $\pi$  rilevati supportano l'ipotesi di un'espansione recente del barbo europeo a partire da un modesto numero di fondatori (Grant & Bowen, 1998). Questa ipotesi sembra essere ulteriormente confermata anche dalla mismatch distribution. Infatti, l'analisi demografica della popolazione basata sulla distribuzione delle differenze aplotipiche mostra un andamento unimodale perfettamente in linea con quanto ipotizzato dal modello di partenza, corrispondente a una popolazione in espansione (Figura 5). Lo stesso tipo di andamento è stato descritto nel vicino Fiume Oglio (Quadroni et al., 2016).



**Figura 5.** Analisi demografica basata sulle differenze nucleotidiche tra gli aplotipi del mtDNA *cytb* (844 bp) e sulle loro frequenze nell'ambito della popolazione di *B. barbuis* campionata (siti di campionamento raggruppati nella popolazione Ticino).

## CONCLUSIONI

Dalle analisi genetiche è emerso come la popolazione di barbo presente nel tratto di Fiume Ticino oggetto del presente progetto sia compromessa dalla colonizzazione del fiume da parte della specie alloctona *B. barbus*. Anche se nel passaggio per pesci presso la Diga del Panperduto il 64% degli individui analizzati è risultato appartenere alla specie barbo del Po, con discreti valori di variabilità genetica, il fenomeno di ibridazione con il barbo alloctono è probabilmente già in atto. Occorre ricordare infatti che l'analisi del frammento di DNA mitocondriale (citocromo b) utilizzata in questa indagine non esclude la possibilità che l'individuo analizzato sia un ibrido. Inoltre, a Somma Lombardo l'89% degli esemplari sono risultati appartenere alla specie alloctona e nel basso corso del Ticino tale percentuale ha già raggiunto il 100%.

La situazione registrata nel Ticino è analoga a quella già rilevata nei grandi fiumi limitrofi, ossia nell'Adda e nell'Oglio, anche se l'espansione della specie alloctona sta avvenendo con tempistiche diverse, probabilmente favorita dalle operazioni di deframmentazione dei corridoi ecologici.

Alla luce dei risultati e in relazione alla tutela delle specie autoctone, in futuro sarebbe opportuno ricercare nel bacino del Ticino popolazioni pure di barbo del Po in modo da mettere in atto misure di conservazione di questa specie autoctona ai fini della salvaguardia della biodiversità e degli endemismi.

## Bibliografia

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25(22), 4692-4693. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Bianco, P. (2003). *Barbus plebejus* Bonaparte, 1939. In P. Banareescu & N. Bogutskaya (Eds.), *The freshwater fishes of Europe* (Vol. 5, pp. 339-364). AULA-Verlag, Wiesbaden.
- Bianco, P. G. (1995). A revision of the Italian *Barbus* species (Cypriniforms: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 6, 305-324.
- Briolay, J., Galtier, N., Brito, R. M. i., & Bouvet, Y. (1998). Molecular Phylogeny of Cyprinidae Inferred from cytochrome bDNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9(1), 100-108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0441>
- Buonerba, L., Zaccara, S., Delmastro, G. B., Lorenzoni, M., Salzburger, W., & Gante, H. F. (2015). Intrinsic and extrinsic factors act at different spatial and temporal scales to shape population structure, distribution and speciation in Italian *Barbus* (Osteichthyes: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 89, 115-129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.03.024>
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10), 1657-1660.
- Communities, C. o. t. E. (1992). *Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora*. Official Journal of the European Communities
- Cucherousset, J., & Olden, J. D. (2011). Ecological impacts of non-native freshwater fishes *Fisheries* 36, 215-230.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9(8), 772-772.
- Didham, R. K., Tylianakis, J. M., Hutchison, M. A., Ewers, R. M., & Gemmill, N. J. (2005). Are invasive species the drivers of ecological change?. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 470-474. <https://doi.org/doi:10.1016/j.tree.2005.07.006>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.
- Gante, H. F., Alves, M. J., & Dowling, T. E. (2008). Development of cytochrome b primers for mitotyping of barbels (*Barbus* spp.). *Molecular Ecology Resources*, 8(4), 786-789. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2007.02064.x>
- Gozlan, R. E., Britton, J. R., Cowx, I., & Copp, G. H. (2010). Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. *Journal of Fish Biology*, 76(4), 751-786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02566.x>
- Grant, W., & Bowen, B. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5), 415-426. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41, 95-98.
- Hanfling, B., Bolton, P., Harley, M., & Carvalho, G. (2005). A molecular approach to detect hybridisation between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species

- (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*). *Freshwater Biology*, 50(3), 403-417. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01330.x>
- Hermoso, V., & Clavero, M. (2011). Threatening processes and conservation management of endemic freshwater fish in the Mediterranean basin: a review. In: CSIRO Publishing.
- Hobbs, R. J., & Huenneke, L. F. (1992). Disturbance diversity invasion: Implications for conservation *Conservation Biology* 6, 324-337. <https://doi.org/doi.org/10.1046/j.1523-1739.1992.06030324.x>
- Kotlík, P., Bogutskaya, N., & G. Ekmekci, F. G. (2004). Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. *Molecular Ecology*, 13(1), 87-95.
- Kottelat, M., & Freyhof, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.
- Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C., & Serio, G. (1984). A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of molecular evolution*, 20(1), 86-93.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452
- McKinney, M. L., & Lockwood, J. L. (1999). Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(11), 450-453. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01679-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01679-1)
- Meraner, A., Venturi, A., Ficetola, G. F., Rossi, S., Candiotti, A., & Gandolfi, A. (2013). Massive invasion of exotic *Barbus barbus* and introgressive hybridization with endemic *Barbus plebejus* in Northern Italy: where, how and why? *Molecular ecology*, 22(21), 5295-5312. <https://doi.org/10.1111/mec.12470>
- Puzzi, C. M., Trasforini, S., Sartorelli, M., & Tamborini, D. (2017). Ticino River ecological corridor restoring and monitoring. *Italian Journal of Freshwater Ichthyology*.
- Quadroni, S., Vanetti, I., Zaccara, S., & Crosa, G. (2016). *Migliorare la biodiversità attraverso interventi di riqualificazione ecologica e fluviale e la progettazione partecipata di pagamenti per i servizi ecosistemici nel Parco Regionale Oglia Sud*. Università degli Studi dell'Insubria.
- Rambaut. (2016). <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D. L., Aaron, Darling, A., . . . Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61(3), 539-542.
- Salmaso, F., Quadroni, S., Gentili, G., & Crosa, G. (2016). Thermal regime of a highly regulated Italian river (Ticino River) and implications for aquatic communities. *Journal of Limnology*, 76(1). <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1437>
- Strayer, D. L. (2006). Challenges for freshwater invertebrate conservation. *Journal of the North American Benthological Society*, 25(2), 271-287. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2006\)25\[271:CFFIC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2006)25[271:CFFIC]2.0.CO;2)
- Swofford, D. L. (2003). *PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10*.
- Tsigenopoulos, C., Kotlik, P., & Berrebi, P. (2002). Biogeography and pattern of gene flow among *Barbus* species (Teleostei: Cyprinidae) inhabiting the Italian Peninsula and neighbouring Adriatic drainages as revealed by allozyme and mitochondrial sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75(1), 83-99. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00007.x>



- Tsigenopoulos, C. S., & Berrebi, P. (2000). Molecular Phylogeny of North Mediterranean Freshwater Barbs (Genus *Barbus*: Cyprinidae) Inferred from Cytochrome b Sequences: Biogeographic and Systematic Implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(2), 165-179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0702>
- Tsigenopoulos, C. S., Karakousis, Y., & Berrebi, P. (1999). The North Mediterranean *Barbus* lineage: phylogenetic hypotheses and taxonomic implications based on allozyme data. *Journal of Fish Biology*, 54(2), 267-286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00829.x>
- Zaccara, S., Antognazza, C. M., Buonerba, L., Britton, R. J., & Crosa, G. (2014). Human-mediated contact zone between endemic and invasive *Barbus* species (Osteichthyes: Cyprinidae) in a regulated lowland river: genetic inferences and conservation implications. *Italian Journal of Zoology*, 81(4), 571-583 , year = 2014. <https://doi.org/10.1080/11250003.2014.944225>
- Zerunian, S. (2003). *Piano d'azione generale per la conservazione dei Pesci d'acqua dolce italiani*. Quaderni di Conservazione della Natura
- Zwickl, D. J. (2006). *Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion* The University of Texas at Austin.

## MATERIALE SUPPLEMENTARE

**Tabella S1.** Sequenze appartenenti a esemplari di barbo selezionate da banca dati. Sono indicati: la specie, il numero di accesso alla banca dati, l'aplotipo, il riferimento bibliografico e il nome dell'aplotipo utilizzato per questo studio (basato su 844 bp).

<b>Specie</b>	<b>Acc. N.</b>	<b>Aplotipo</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>Questo studio</b>	<b>Geografia</b>
<i>Barbus barbus</i>	KF923535	BAR1	(Zaccara et al., 2014)	Ba01	Adda
	KF923536	BAR2	(Zaccara et al., 2014)	Ba01	Adda
	KF923537	BAR3	(Zaccara et al., 2014)	Ba04	Adda
	KF923538	BAR4	(Zaccara et al., 2014)		Adda
	AY331020	PK-461	(Kotlík et al., 2004)	Ba01	Black Sea area
	AY331017	PK-319	(Kotlík et al., 2004)	Ba01	Black Sea area
	AY331019	PK-460	(Kotlík et al., 2004)	Ba04	Black Sea area
	AY331021	PK-451	(Kotlík et al., 2004)	Ba02	Black Sea area
	KC465918	Bb01	(Meraner et al., 2013)	Ba03	Po basin
	KC465919	Bb02	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KC465920	Bb03	(Meraner et al., 2013)	Ba04	Po basin
	KC465921	Bb04	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KC465922	Bb05	(Meraner et al., 2013)	Ba05	Po basin
	KC465923	Bb06	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KC465924	Bb07	(Meraner et al., 2013)	Ba04	Po basin
	KC465926	Bb09	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KC465927	Bb10	(Meraner et al., 2013)		Po basin

	KC818252	Bb17*	(Buonerba et al., 2015)		Bormida/Terdoppio
	KC818253	Bb18*	(Buonerba et al., 2015)		Terdoppio
	-	-	(Quadroni et al., 2016)	Ba01	Oglio
	-	-	Quadroni et al., 2016)	Ba02	Oglio
	-	-	Quadroni et al., 2016)	Ba04	Oglio
	-	-	Quadroni et al., 2016)	OG23 <sup>¥</sup>	Oglio
	-	-	Quadroni et al., 2016)	OG30 <sup>¥</sup>	Oglio
<i>Barbus plebejus</i>	KC465928	Bp01	(Meraner et al., 2013)	PI01	Po/Adige/Brenta
	KC465929	Bp02	(Meraner et al., 2013)		Adige basin
	KC465930	Bp03	(Meraner et al., 2013)	PI01	Adige basin
	KC465931	Bp04	(Meraner et al., 2013)	PI01	Po/Adige
	KC465932	Bp05	(Meraner et al., 2013)	PI01	Adige basin
	KC465933	Bp06	(Meraner et al., 2013)		Adige basin
	KC465934	Bp07	(Meraner et al., 2013)		Adige basin
	KC465935	Bp08	(Meraner et al., 2013)		Po/Adige
	KC465936	Bp09	(Meraner et al., 2013)		Po/Adige
	KC465937	Bp10	(Meraner et al., 2013)		Po/Adige
	KC465938	Bp11	(Meraner et al., 2013)	PI02	Po basin
	KC465939	Bp12	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KC818247	Bp12*	(Buonerba et al., 2015)		Po/Terdoppio
	KC818248	Bp13*	(Buonerba et al., 2015)		Po/Terdoppio/Maira/Ceronda
	KC465942	Bp15	(Meraner et al., 2013)		Po basin

	KC465943	Bp16	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KC465944	Bp17	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KC465945	Bp18	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KC465946	Bp19	(Meraner et al., 2013)	PI01	Po basin
	KC465947	Bp20	(Meraner et al., 2013)	PI01	Po basin
	KC465948	Bp21	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KC465949	Bp22	(Meraner et al., 2013)		Po basin
	KF923539	PLE1	(Zaccara et al., 2014)		Adda
	KF923540	PLE2	(Zaccara et al., 2014)	PI01	Adda
	KF923541	PLE3	(Zaccara et al., 2014)		Adda
	KF923542	PLE4	(Zaccara et al., 2014)	PI03	Adda
	AY004750	-	(Machordom & Doadrio, 2001a)	Pleb	Roggia (Udine)
<i>Barbus tyberinus</i>	AF397300	Tyb	(Bianco & Ketmaier, 2001)		
<i>Barbus caninus</i>	AF287425	Bcanin2	(Machordom & Doadrio, 2001b)	Can2	
	AF112124	-	(Tsigenopoulos & Berrebi, 2000)	Can	
<i>Barbus meridionalis</i>	AF112130	-	(Tsigenopoulos & Berrebi, 2000)	Mer	
	AF045977	-	(Zardoya & Doadrio, 1998)	Mer1	
<i>Barbus comizo</i>	AF334050	115AT	(Doadrio et al., 2002)		Outgroup filogenesi

\*Sequenze di Buonerba et al., 2015 che sono state escluse da filogenesi perché il frammento disponibile è più corto (713 bp). Questi aplotipi vengono così inclusi in questo studio: Bb17 in Ba04; Bb18 in Ba05; Bp12 non trovato in questo studio (corrispondente a Bp09, Bp10, Bp12 e Bp15 (Meraner et al., 2013)); Bp13 in PI01. †Dati non pubblicati e non depositati in banca dati.

## Bibliografia

- Bianco, P. G., & Ketmaier, V. (2001). Anthropogenic changes in the freshwater fish fauna of Italy, with reference to the central region and *Barbus graellsii*, a newly established alien species of Iberian origin. *Journal of Fish Biology*, 59(sA), 190-208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb01386.x>
- Buonerba, L., Zaccara, S., Delmastro, G. B., Lorenzoni, M., Salzburger, W., & Gante, H. F. (2015). Intrinsic and extrinsic factors act at different spatial and temporal scales to shape population structure, distribution and speciation in Italian *Barbus* (Osteichthyes: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 89, 115-129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.03.024>
- Doadrio, I., Carmona Ja Fau - Machordom, A., & Machordom, A. (2002). Haplotype diversity and phylogenetic relationships among the Iberian barbels (*Barbus*, Cyprinidae) reveal two evolutionary lineages. *Journal of Heredity*, 93, 140-147. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.2.140>
- Kotlík, P., Bogutskaya, N., & G. Ekmekci, F. G. (2004). Circum Black Sea phylogeography of *Barbus* freshwater fishes: divergence in the Pontic glacial refugium. *Molecular Ecology*, 13(1), 87-95.
- Machordom, A., & Doadrio, I. (2001a). Evidence of a Cenozoic Betic–Kabilian Connection Based on Freshwater Fish Phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2), 252-263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0876>
- Machordom, A., & Doadrio, I. (2001b). Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1473), 1297-1306. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1654>
- Meraner, A., Venturi, A., Ficetola, G. F., Rossi, S., Candiotta, A., & Gandolfi, A. (2013). Massive invasion of exotic *Barbus barbus* and introgressive hybridization with endemic *Barbus plebejus* in Northern Italy: where, how and why? *Molecular ecology*, 22(21), 5295-5312. <https://doi.org/10.1111/mec.12470>
- Quadroni, S., Vanetti, I., Zaccara, S., & Crosa, G. (2016). *Migliorare la biodiversità attraverso interventi di riqualificazione ecologica e fluviale e la progettazione partecipata di pagamenti per i servizi ecosistemici nel Parco Regionale Oglio Sud*. Università degli Studi dell'Insubria.
- Tsigenopoulos, C. S., & Berrebi, P. (2000). Molecular Phylogeny of North Mediterranean Freshwater Barbs (Genus *Barbus*: Cyprinidae) Inferred from Cytochrome b Sequences: Biogeographic and Systematic Implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14(2), 165-179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0702>
- Zaccara, S., Antognazza, C. M., Buonerba, L., Britton, R. J., & Crosa, G. (2014). Human-mediated contact zone between endemic and invasive *Barbus* species (Osteichthyes: Cyprinidae) in a regulated lowland river: genetic inferences and conservation implications. *Italian Journal of Zoology*, 81(4), 571-583. <https://doi.org/10.1080/11250003.2014.944225>
- Zardoya, R., & Doadrio, I. (1998). Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications. *Proceedings Biological sciences*, 265, 1365-1372. <https://doi.org/doi/10.1098/rspb.1998.0443>