

# SAVE THE DATE

CONVEGNO FINALE  
LIFE BARBIE



Dr Claudio Ferrari



UNIVERSITÀ  
DI PARMA

WEBINAR

29 SET  
ORE 09:00

GENETICA DELLA CONSERVAZIONE DEI BARBI  
MEDITERRANEI ALL'INTERNO DEI SITI RETE

NATURA 2000

# Cosa sappiamo dei barbi?



**BROOK BARBEL**  
(*Barbus caninus*)

**ENDANGERED**  
Endemic species  
of Padano-Veneto  
district



**PADANIAN BARBEL**  
(*Barbus plebejus*)

**VULNERABLE**  
North of Italy



**DANUBE BARBEL**  
(*Barbus balcanicus*)

**LEAST CONCERN**  
East Europe  
(North-East of Italy)

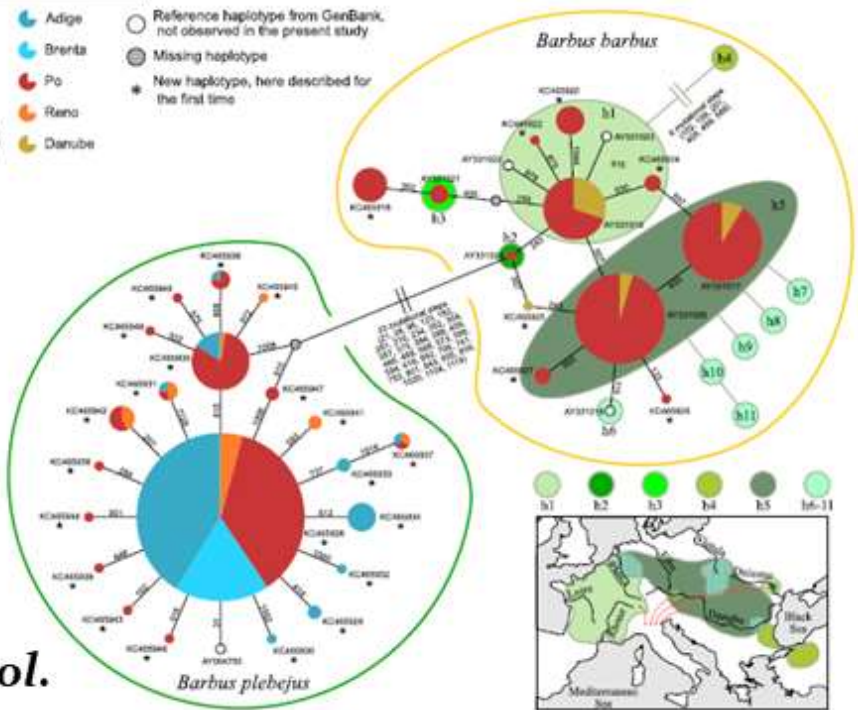
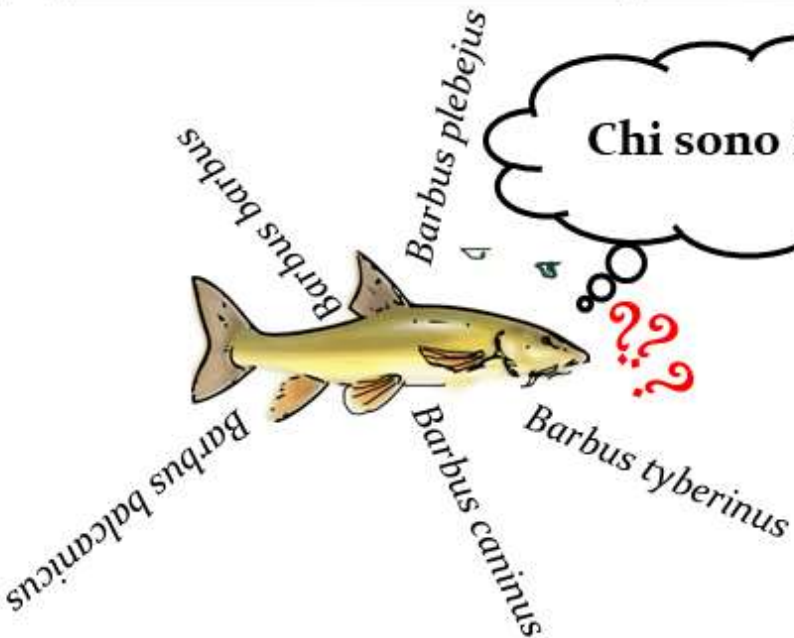
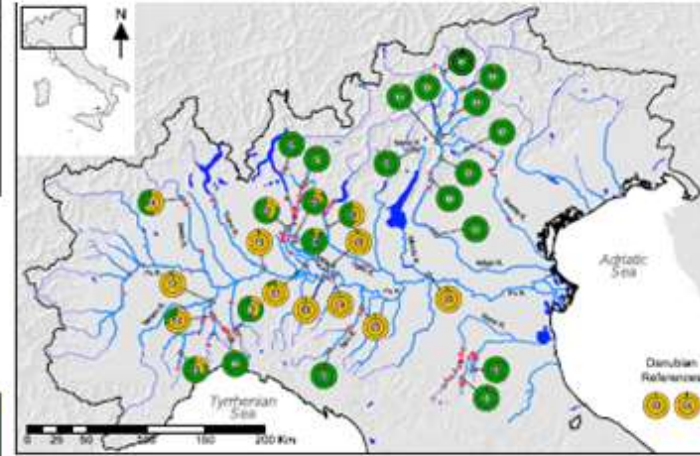
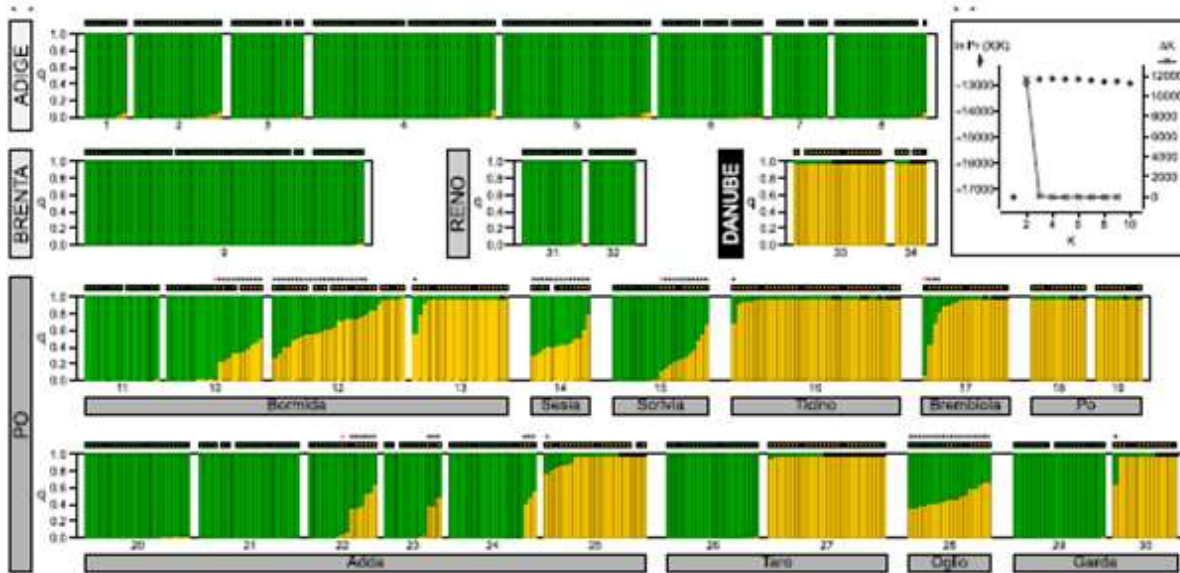


**HORSE BARBEL**  
(*Barbus tyberinus*)

**NEAR THREATENED**  
Endemic species of  
Tyrrhenian Sea basin

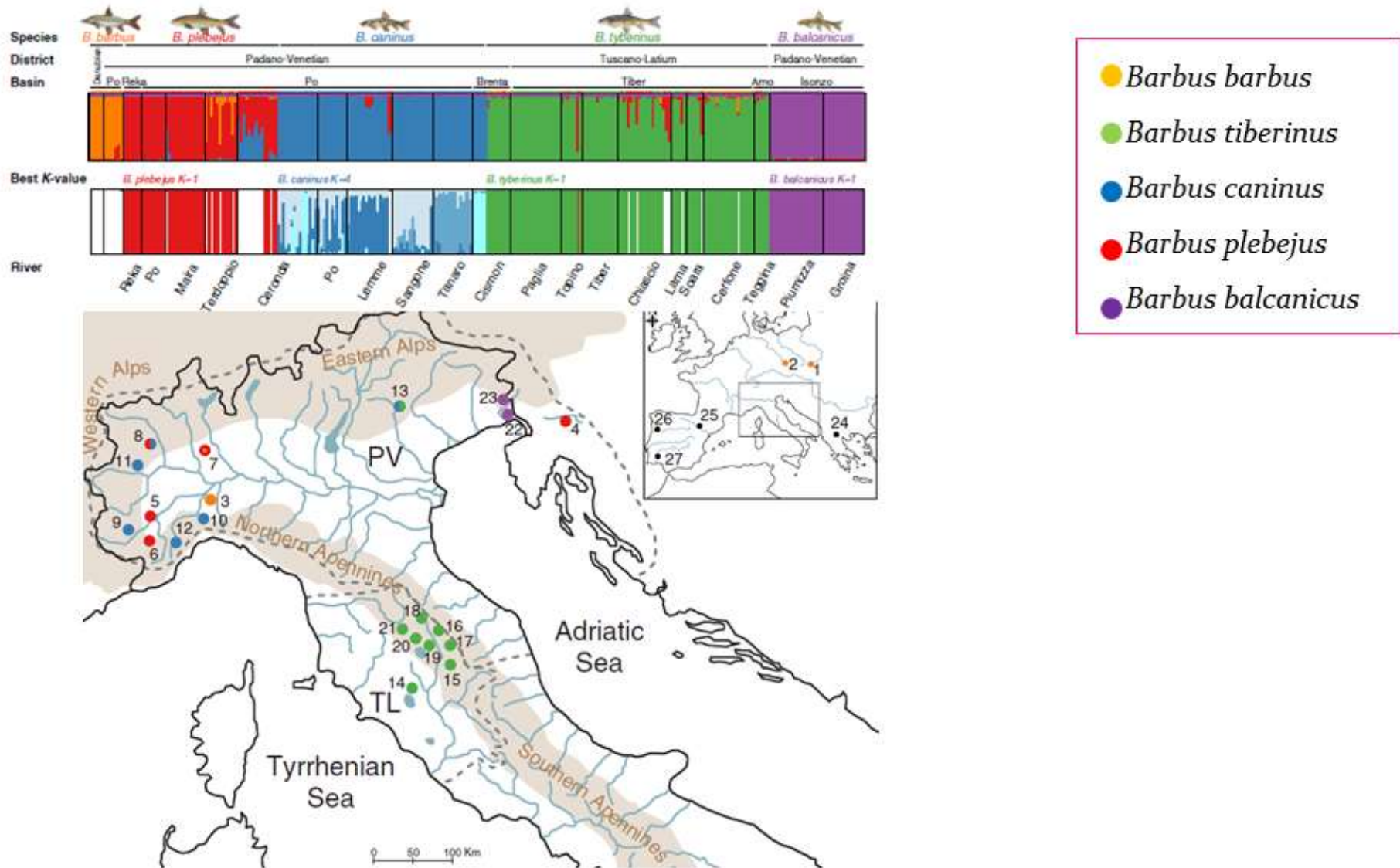


# Cosa sappiamo dei barbi?



Meraner et al., 2013. *Molec. Ecol.*

# Cosa sappiamo dei barbi?



# Minacce

- Perdita di habitat
- Frammentazione dei fiumi
- Ripopolamenti senza conoscenze genetiche
- Effetti cambiamenti climatici
- Inquinamento dovuto ad attività agricole e industriali
- Deprivazione di acqua e mancato rispetto dei livelli di DMV



# Obiettivi

- ① Evidenziare, se presente, una significativa struttura di popolazione nelle specie autoctone di barbo
- ② Determinare il livello di introgressione ed ibridazione tra le specie native e tra altre specie alloctone
- ③ Studio delle relazioni filogenetiche tra le specie nei diversi distretti ittiogeografici
- ④ Studiare la relazione della distribuzione spaziale del genoma delle specie analizzate
- ⑤ Selezione dei riproduttori per le azioni ittiogeniche.

# 1. TASSONOMIA MOLECOLARE E DISTRIBUZIONE DEI BARBI NEI SITI RETE

NATURA 2000 STUDIATI DAL LIFE BARBIE



*Barbus caninus*



*Barbus plebejus*

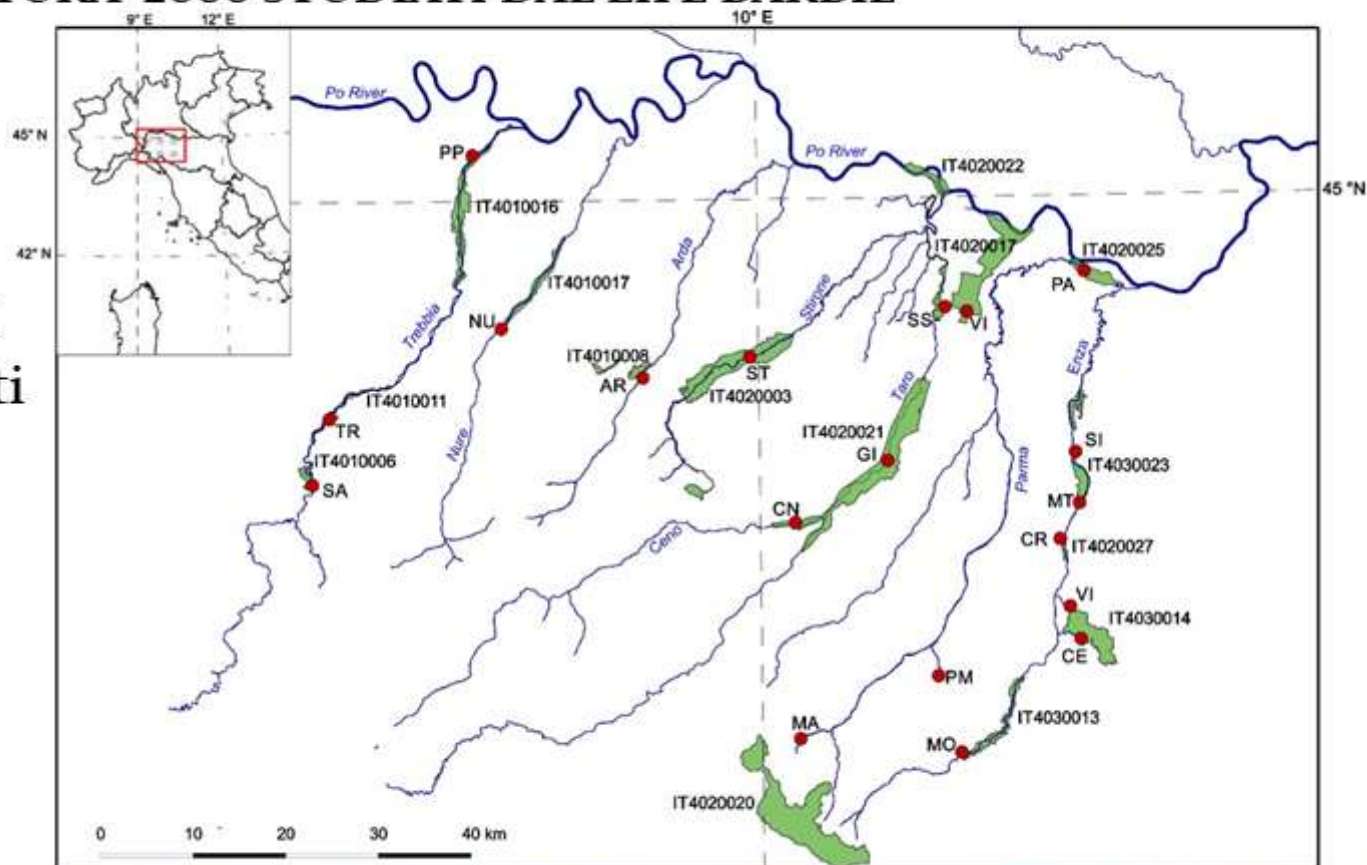


Kottelat & Freyhof (2007)

# 1. TASSONOMIA MOLECOLARE E DISTRIBUZIONE DEI BARBI NEI SITI RETE

## NATURA 2000 STUDIATI DAL LIFE BARBIE

- 15 SIC
- 2 Siti esterni SIC
- 27 siti campionati



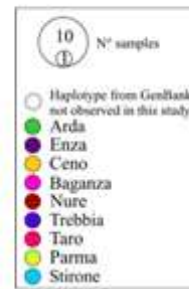


# 1. TASSONOMIA MOLECOLARE E DISTRIBUZIONE DEI BARBI NEI SITI RETE

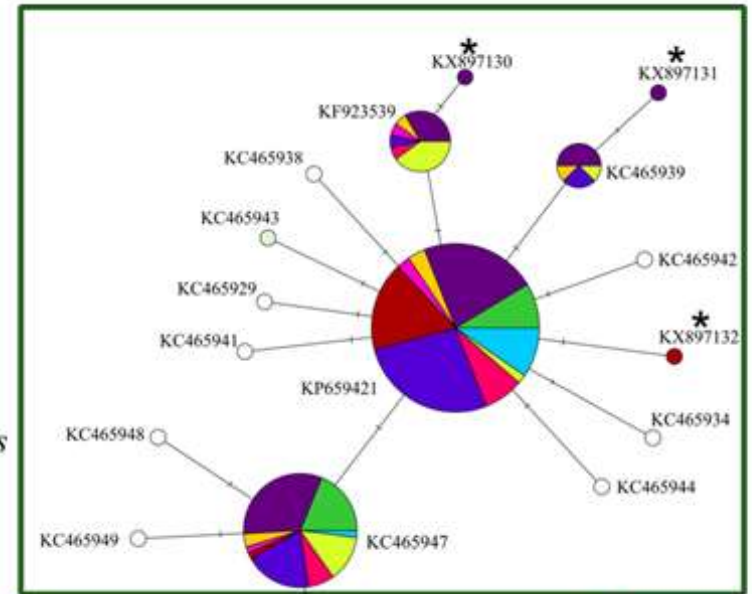
## NATURA 2000 STUDIATI DAL LIFE BARBIE

728 pb di Cytb mtDNA  
255 campioni:  
192 *B. plebejus*,  
43 *B. caninus*,  
20 *B. barbuis*

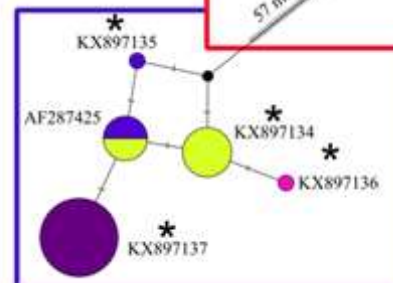
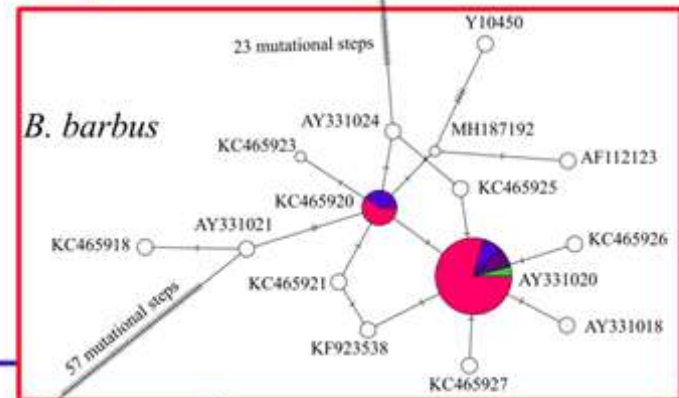
- ✓ 3 diversi aplogruppi
- ✓ 7 nuovi aplotipi



*B. plebejus*



*B. barbuis*

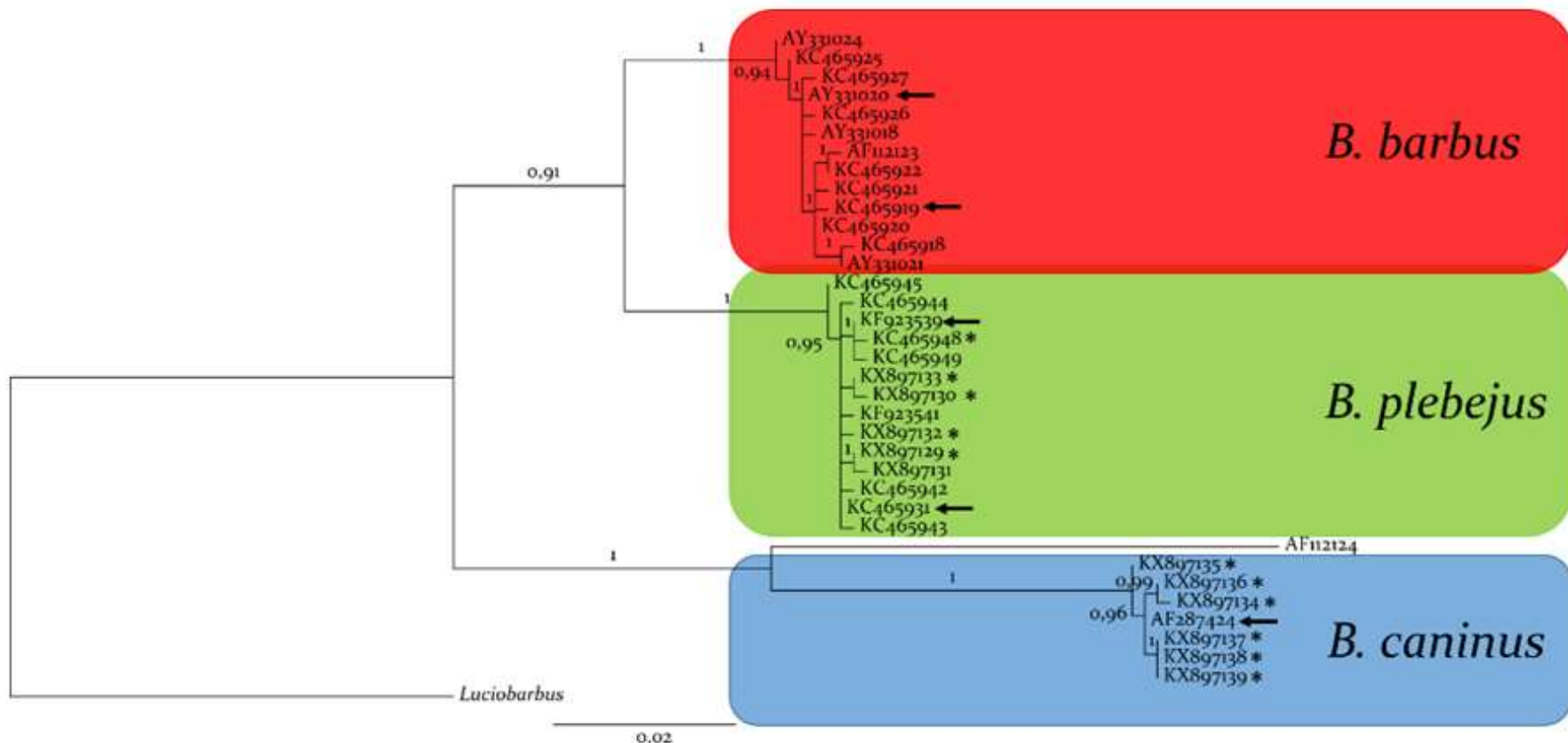


*B. caninus*

Network analysis TCS 1.21.

# TASSONOMIA MOLECOLARE E DISTRIBUZIONE DEI BARBI NEI SITI RETE

## NATURA 2000 STUDIATI DAL LIFE BARBIE



- PhyML 3.0 (Guindon, et al. 2010); Smart Model Sostitution SMS v1.8.1 (Lefort, et al. 2017)
- Chi-square (Anisimova and Gascuel, 2006)

## **RISULTATI. TASSONOMIA MOLECOLARE E DISTRIBUZIONE DEI BARBI NEI SITI RETE NATURA 2000 STUDIATI DAL LIFE BARBIE**

- I corsi d'acqua: Trebbia, Taro, Arda and Enza evidnziano la presenza della specie *B. barbus*, in 4 SIC: IT4010016, IT4020022, IT4020021, IT4030023;
- Non è stata evidenziata la presenza di barbi in 2 SIC;
- All'interno dei siti di campionamento sono stati evidenziate la presenza contemporanea delle specie native oltre a quelle alloctone.

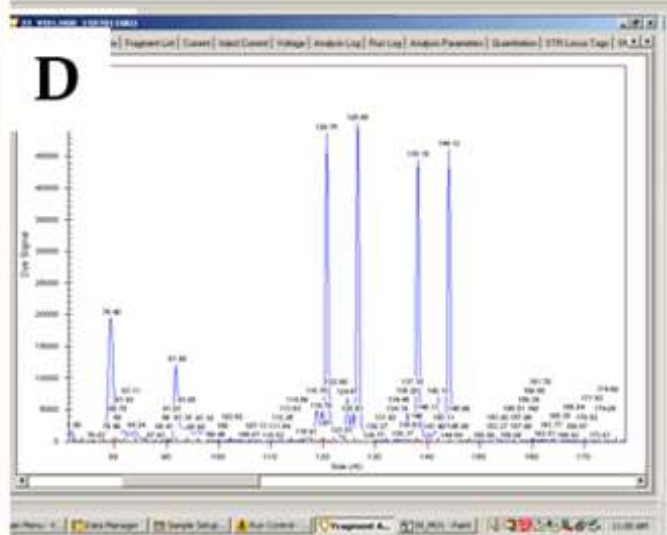
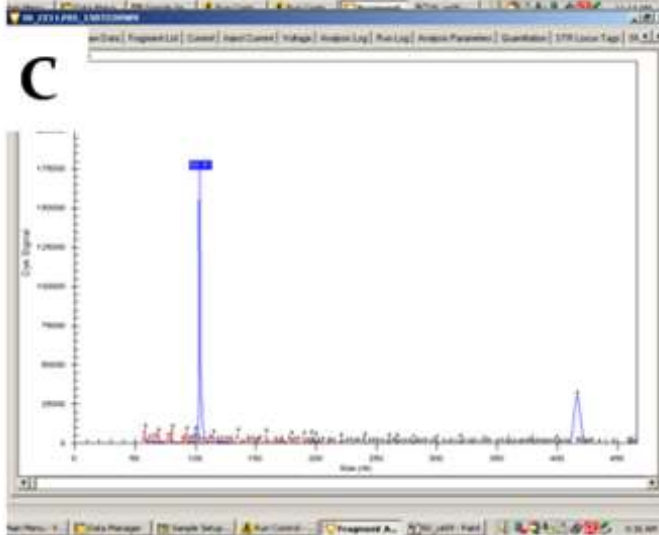
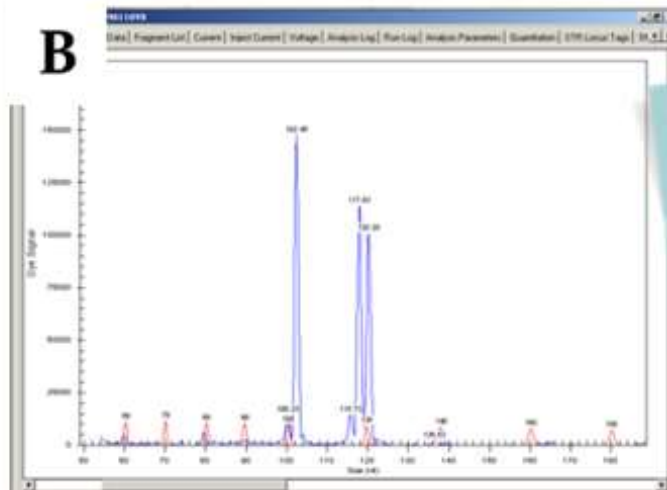
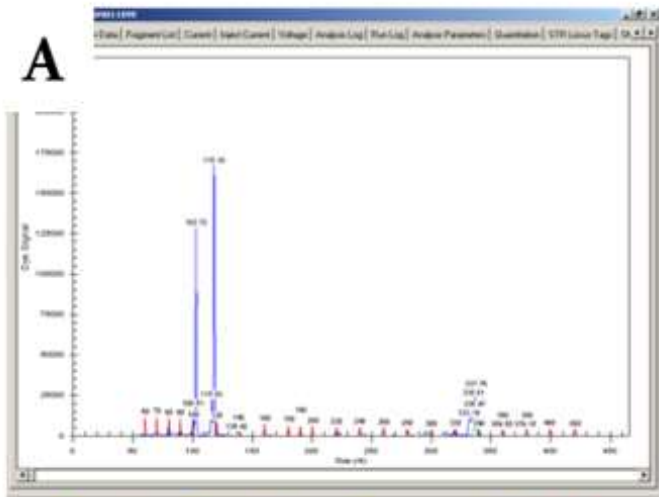
# IBRIDAZIONE E INTROGRESSIONE ATTRAVERSO UN GRADIENTE ALTITUDINALE

10 loci microsatelliti



Locus	Primer	Reference	Ta( °C)
Barbus33	F: TGAATGCATCATGGGCTAGA R: CAGAGCGAATCAAACATGGA	Gettová et al. (2013)	50.5
Barbus39	F: CTGCTGAGACGAGAAAAGCAA R: AAAAGGTGCTGGTGTGGAAC	Gettová et al. (2013)	54.5
Barbus50	F: GTTACAGGCCAACGTCAAGG R: GTTAGTCTGCAATCCGCCAT	Gettová et al. (2013)	54.5
Barb59	F: CTGTATCCATCACATAGGCT R: CATGATTTAATAGAACACACAC	Chenuil et al. (1997)	50.5
Barb79	F: GAGTGAATCATTACATCCCT R: GCTTTTCTTGTATTAGTATTT	Chenuil et al. (1997)	48
MFW1	GTCCAGACTGTCATCAGGAG CA R: GAGGTGTACACTGAGTCACGC	Crooijmans et al. 1997	56
Lid-2	]CCACTCCTCAGCCGACAGA R: AAATGCTGGCGGGGAAATA	Barinova et al. 2004	57.5
LC293	F:TTGCCCTCACCACTAACA R: CACAGATGCAGATCGAGGAG	Vyskocilova et al. 2007	57.5
Lco4	F:ATCAGGTCAGGGGTGTCACG R: TGTTTATTGGGGTCTGTGT	Turner et al. 2004	58.5
CypG24	F:CTGCCGCATCAGAGATAAACACTI R:TGGCGGTAAGGGTAGACCAC	Baerwald & May 2004	58.5

# PROBLEMI

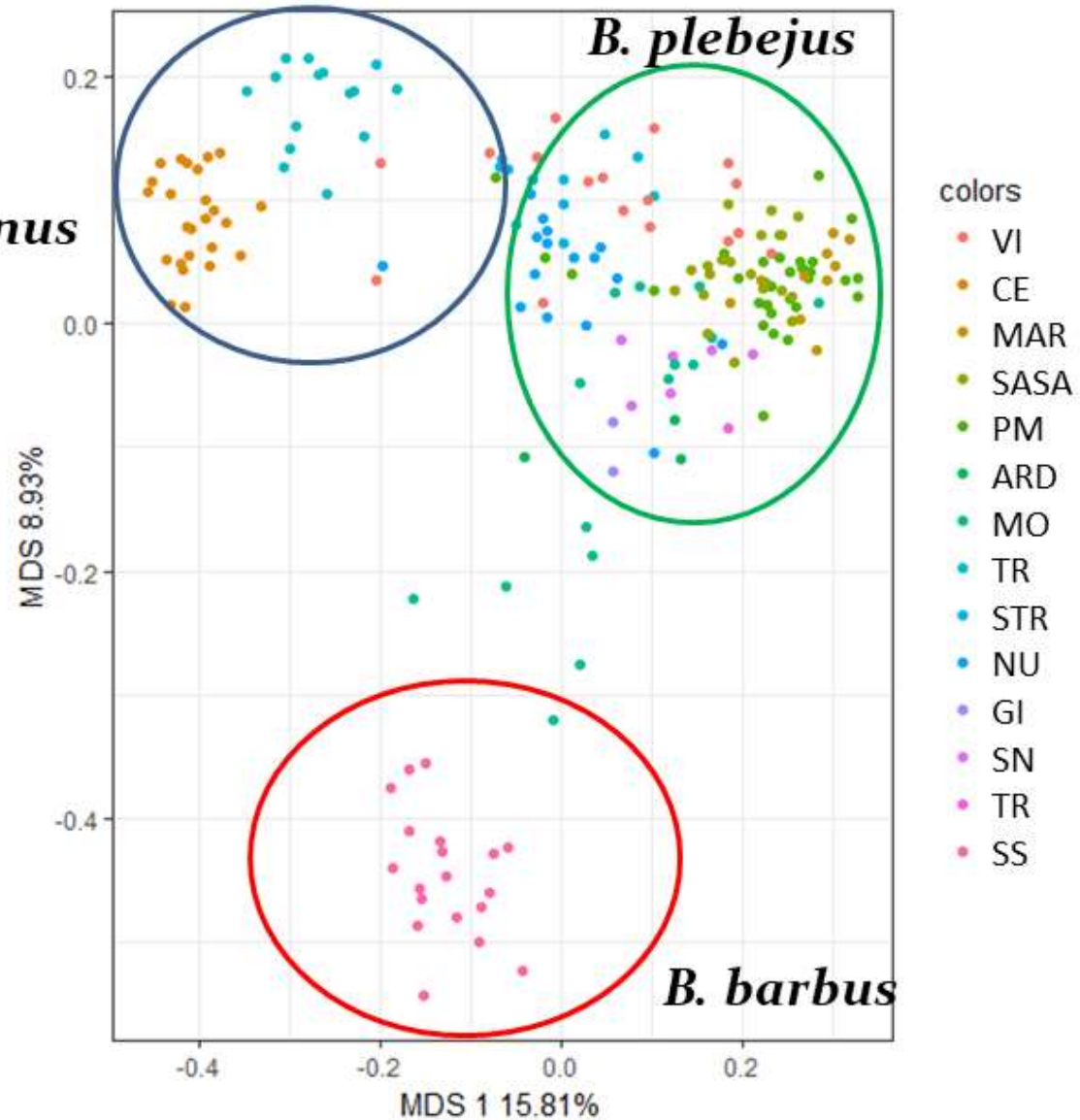


**PROBLEMI...**  
GENOMA TETRAPLOIDE  
SCARSITÀ DI MARCATORI  
MOLECOLARI BIALLELICI  
(Lajbner et al.2009; Gante  
et al. 2011)

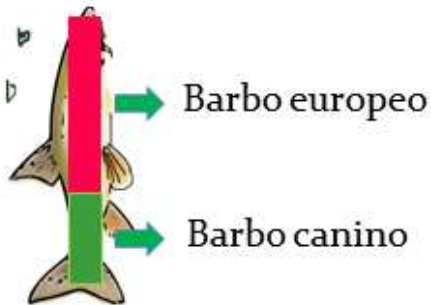
# RISULTATI: ANALISI DEI MICROSATELLITI ATTRAVERSO MDS

- 191 Campioni:
- 10 microsatelliti

*B. caninus*



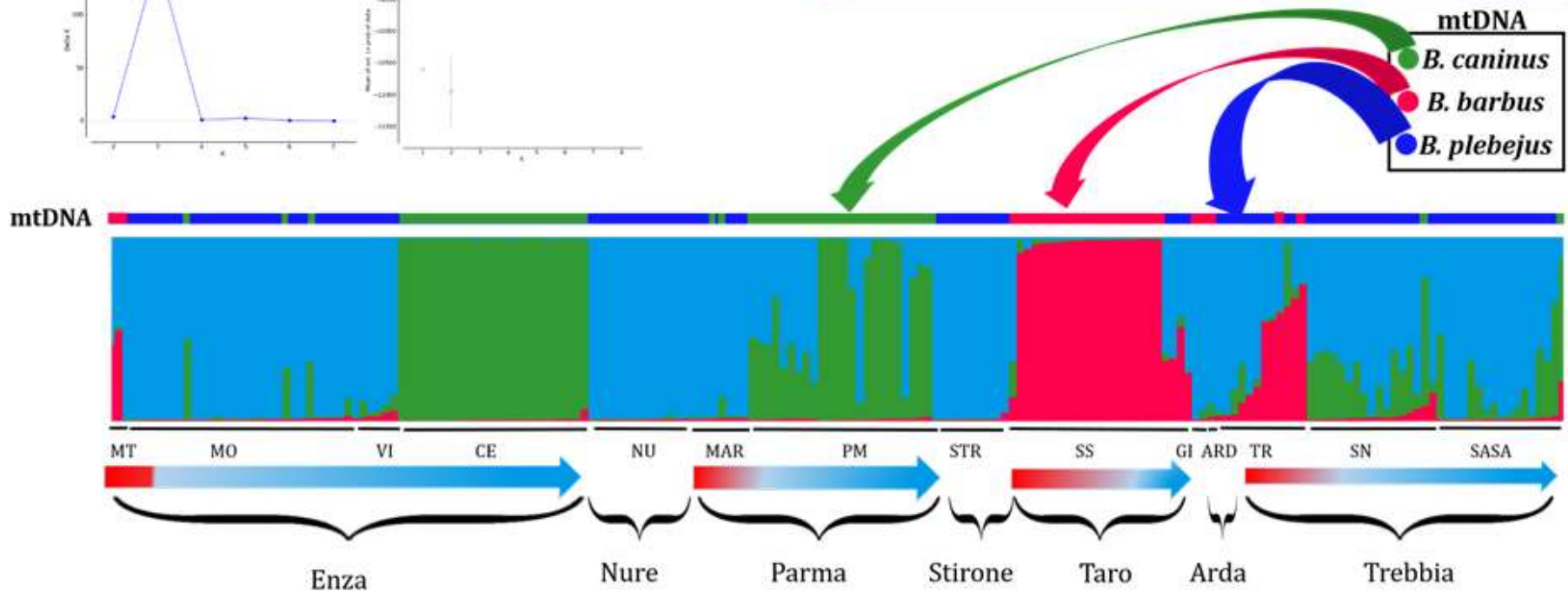
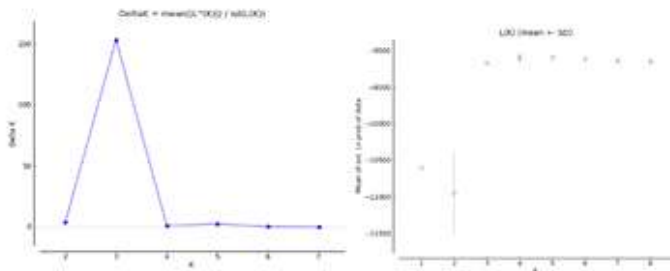
# RISULTATI: marcatori microsatelliti analizzati attraverso STRUCTURE



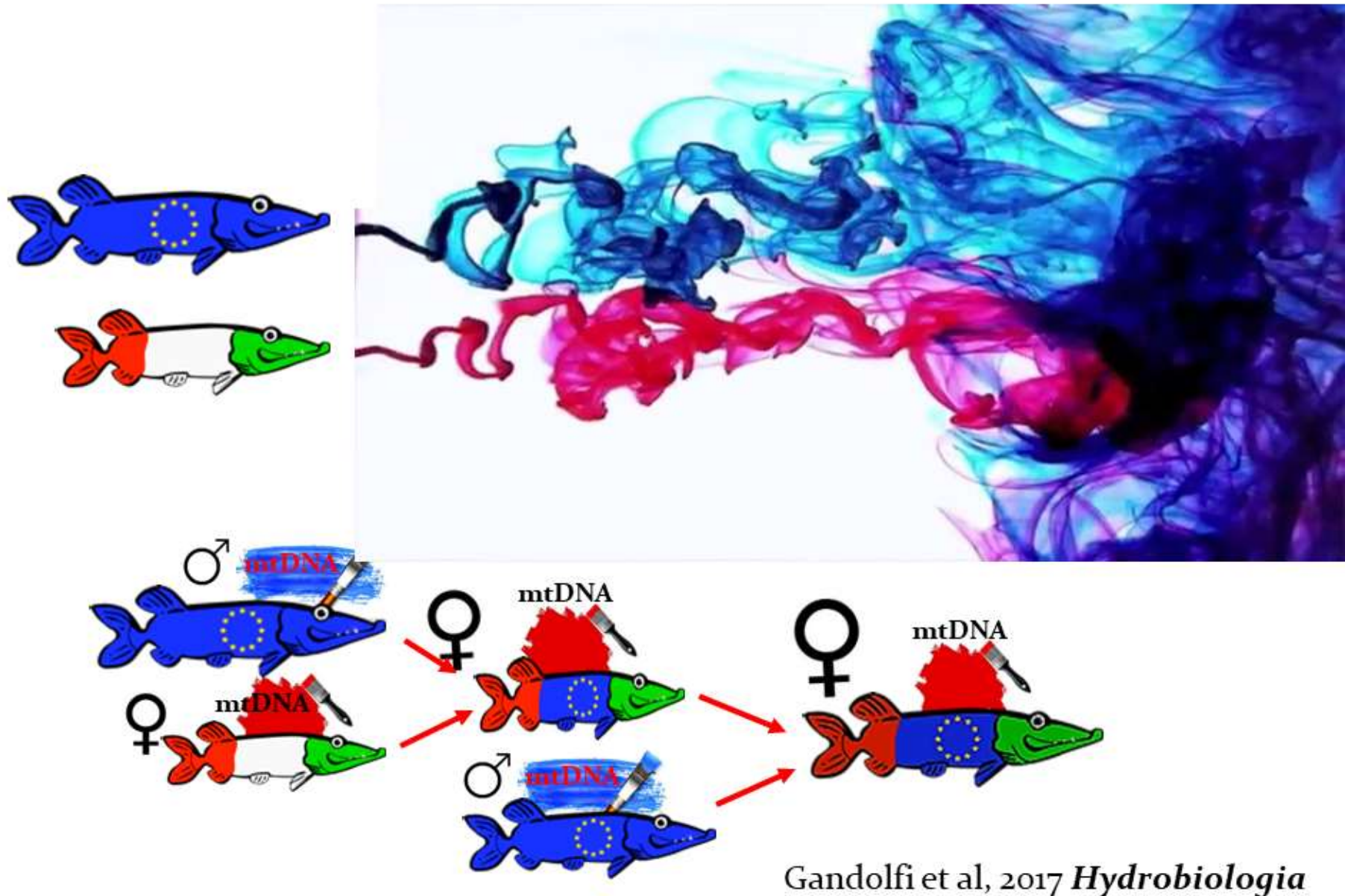
- Cluster *B. caninus*
- Cluster *B. barbuis*
- Cluster *B. plebejus*

- 191 campioni
- 10 microsatelliti

- ✓  $K = 3$  (Evanno et al., 2005)
- ✓ 62 ibridi (q value < 0.90)
- ✓ Ibridazione asimmetrica per 7 barbi



# EFFETTO DI DILUIZIONE DEGLI IBRIDI

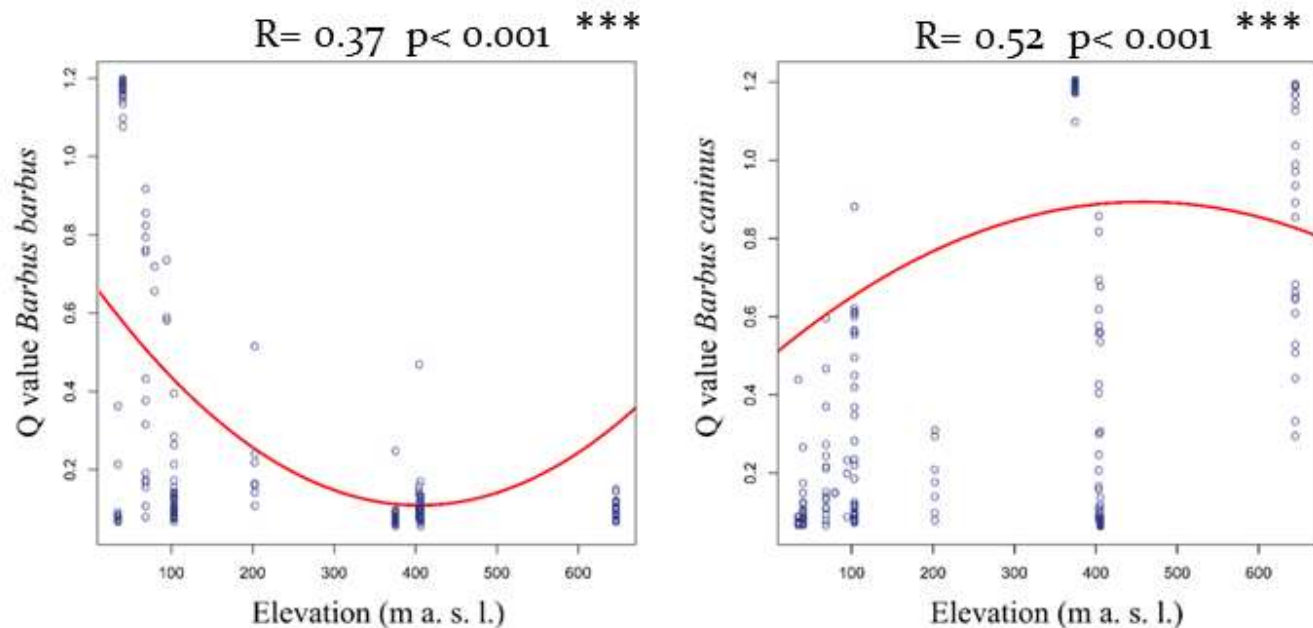


Gandolfi et al, 2017 *Hydrobiologia*

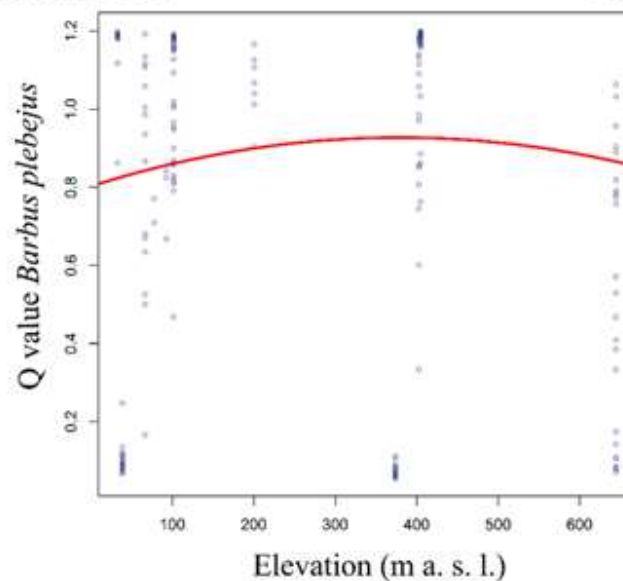




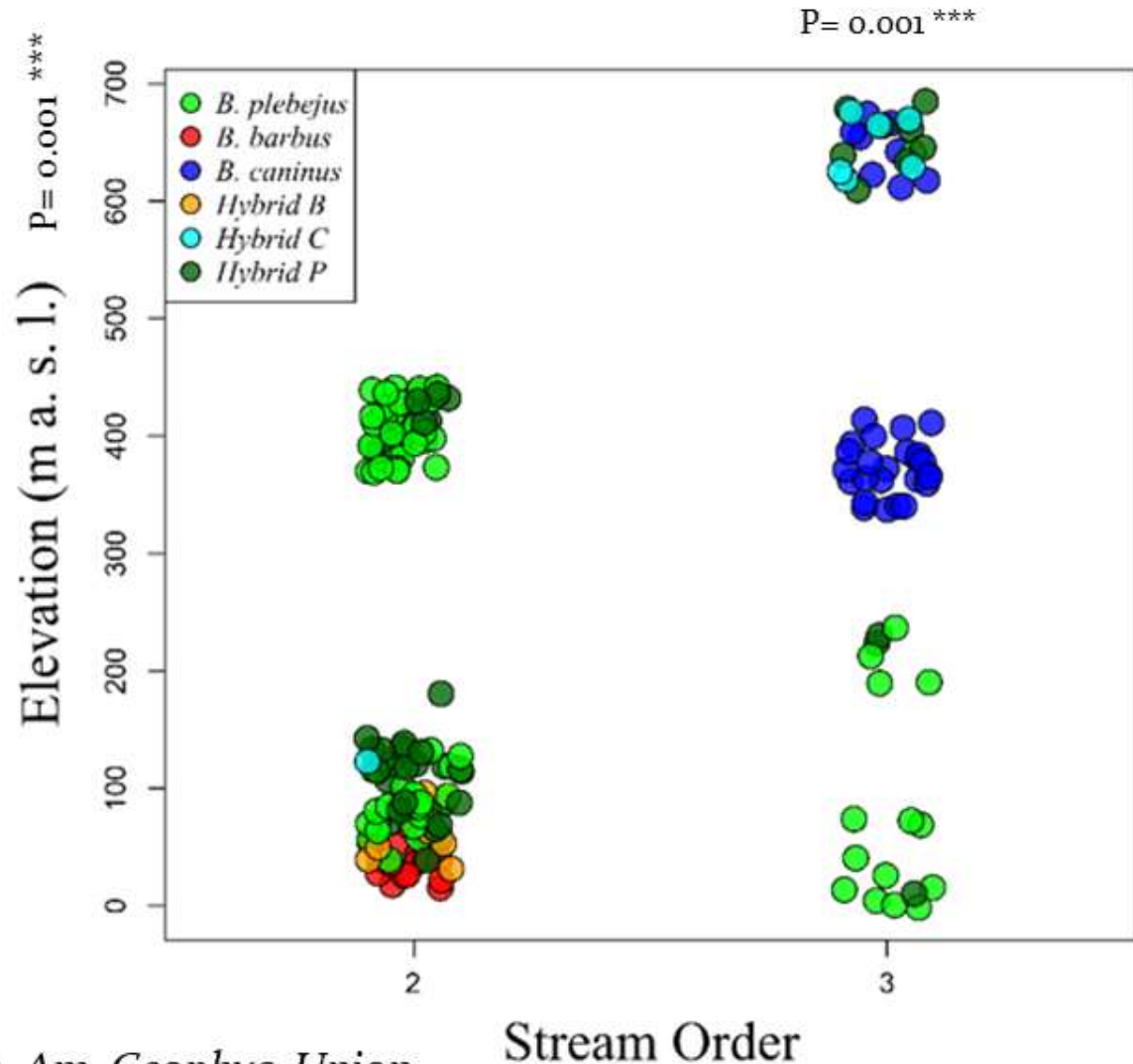
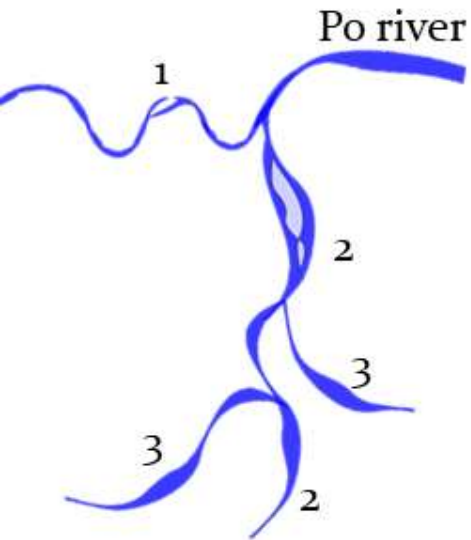
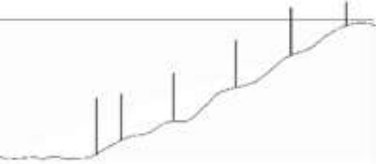
# IBRIDAZIONE E INTROGRESSIONE ATTRAVERSO UN GRADIENTE ALTITUDINALE



$p < 0.05$  \*  
 $R = 0.15$

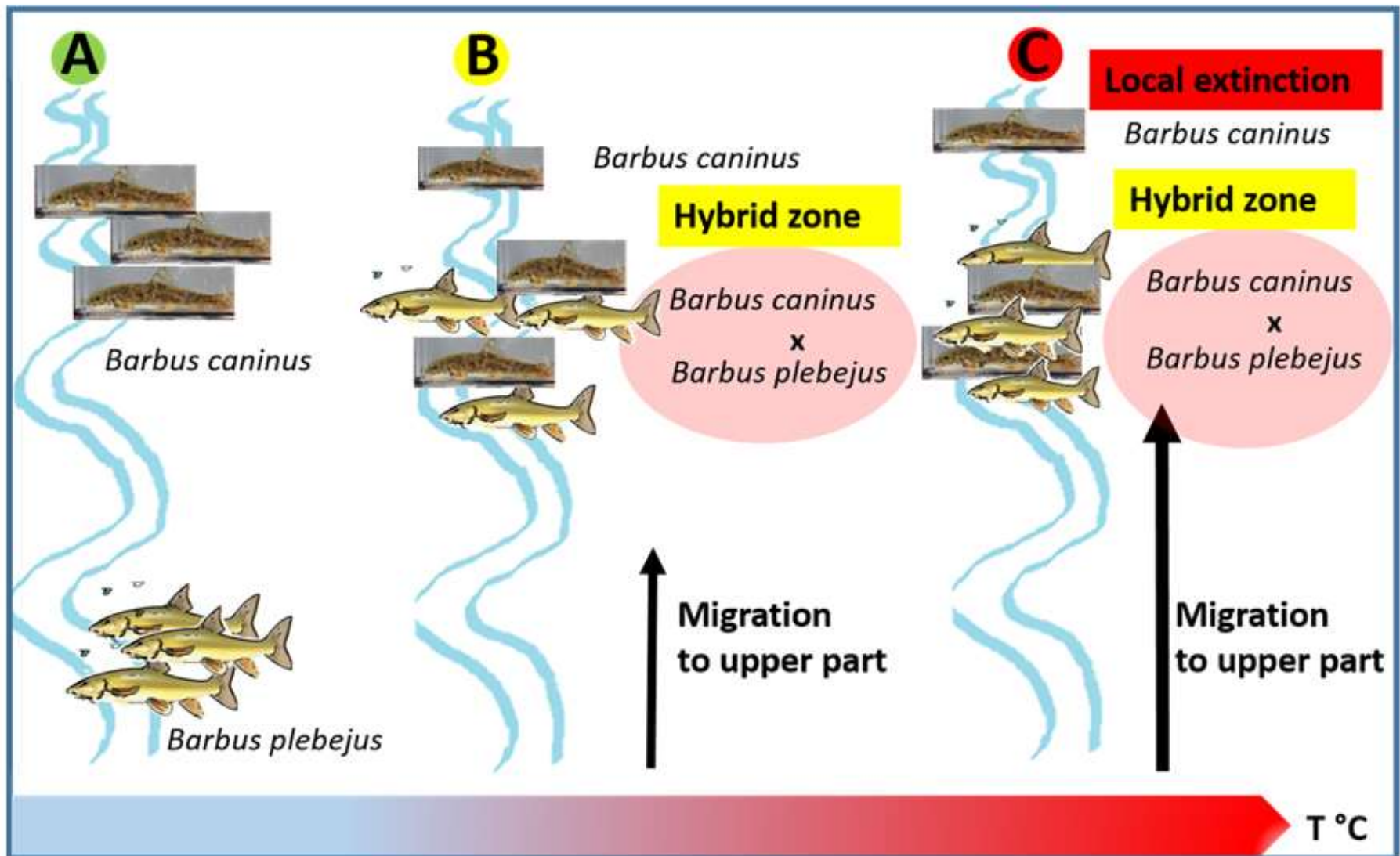


# IBRIDAZIONE E INTROGRESSIONE ATTRAVERSO UN GRADIENTE ALTITUDINALE



Strahler (1957). *Trans. Am. Geophys. Union*

# IBRIDAZIONE E INTROGRESSIONE ATTRAVERSO UN GRADIENTE ALTITUDINALE

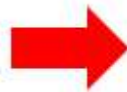
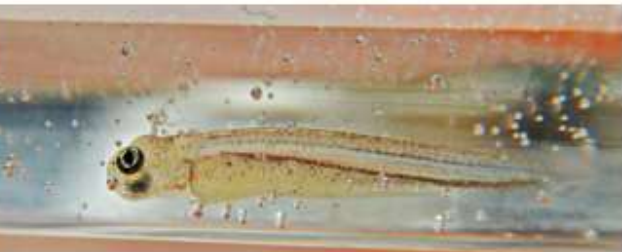
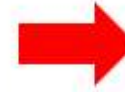


# SELEZIONE DEI RIPRODUTTORI



mtDNA	STRUCTURE Q VALUE	VALUE	RESULTS
<i>B. caninus</i>	0-0,10	Different species	114
	0,10-0,75	High Hybrid	38
	0,75-0,90	Low hybrids	6
	0,90-1	Pure	33
<i>B. plebejus</i>	0-0,10	Different species	55
	0,10-0,75	High hybrid	43
	0,75-0,90	Low hybrids	16
	0,90-1	Pure	77

# SELEZIONE DEI RIPRODUTTORI



# RISULTATI E CONCLUSIONI

- Introggressione tra le specie autoctone con la specie *B. barbus*.
- Ibridazione asimmetrica tra *B.caninus* ♀ X *B.plebejus* ♂
- Migrazione del genoma alloctono attraverso il gradiente altitudinale attraverso il fenomeno dell'introggressione
- Selezione degli individui “geneticamente puri” è stato possibile attraverso le analisi dei marcatori mitocondriali e nucleari

## PUBBLICAZIONI SU RIVISTE SCIENTIFICHE

1. Ferrari C., Filonzi L., Piccoli F., Voccia A., Rontani P., Leonardi S., Francesco Nonnis Marzano. Conservation genetics of barbel species (Teleostei, Cyprinidae) inside protected areas: hybridization and introgression along an elevational gradient. submitted.
2. Piccoli F. , Burgazzi G., Iaini A., Ferrari C., Voccia A., Filonzi L., Bolpagni R., Nonnis Marzano F. 2017. Barbel species arrangement in a regional Natura 2000 network (Emilia Romagna, Northern Italy): an altitudinal perspective. *Journal of Limnology*. 10.4081/jlimnol.2017.1693.

# RINGRAZIAMENTI



Prof. Francesco Nonnis Marzano



Dr. Laura Filonzi

Dott. Andrea Voccia

Dott. Pietro Rontani

Dr. Giulia Zuccon

Dott.ssa Marina Vaghi

Dr. Federica Piccoli

Dott.ssa Cinzia Azzoni



Agli amici,  
come l'acqua nei fiumi danno vita e significato al paesaggio della vita



## REFERENCES

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.

Gante HF, Alves MJ, Dowling TE (2011) Paralog-specific primers for the amplification of nuclear loci in tetraploid barbels (Barbus: Cypriniformes). *Journal of Heredity*, 102, 617–621.

Konopinski MK, Amirowicz A, Kukula K (2007) Probable direction of the postglacial colonization of rivers on northern slopes of the Carpathian Ridge by *Barbus carpathicus* (Teleostei: Cyprinidae) evidenced by cline of genetic variation. *Journal of Fish Biology*, 70, 406–415.

Lajbner, Z., V. Šlechtová, V. Šlechta, M. Švátora, P. Berrebi, and P. Kotlík. (2009). Rare and Asymmetrical Hybridization of the Endemic *Barbus carpathicus* with Its Widespread Congener *Barbus barbus*. *Journal of Fish Biology* 74: 418–36.

Meraner A., Venturi A., Ficetola G. F., Rossi S., Candiotto A., Gandolfi A. (2013). Massive invasion of exotic *Barbus barbus* and introgressive hybridization with endemic *Barbus plebejus* in Northern Italy: Where, how and why? *Mol. Ecol.* 22, 5295–5312.

## REFERENCES

Rondinini C., Battietoni A., Peronace V., Teofili C (2013). Lista Rossa IUCN dei Vertebrati italiani. *Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Roma.*

Strahler, A.N. (1957). Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Trans. Am. Geophys. Union*, 38 (6), 913-920.

Tsigenopoulos CS, Berrebi P (2000). Molecular phylogeny of North Mediterranean freshwater Barbs (Genus *Barbus*: Cyprinidae) inferred from cytochrome b sequences: biogeographic and systematic implications. *Molecular Phylogenetics & Evolution*. 14, 165-179.