

Il biomonitoraggio delle rane verdi del lago Trasimeno

Ines Di Rosa, Anna Fagotti, Rita Pascolini, Francesca Simoncelli

Gli anfibii sono considerati eccellenti bioindicatori per la loro particolare sensibilità alla qualità dell'ambiente dovuta alla permeabilità della pelle e al ciclo di vita bifasico, che li espone a contaminazioni sia degli ambienti acquatici che terrestri

Numerose ricerche hanno dimostrato che molte popolazioni di anfibii sono scomparse o stanno subendo un drastico declino in tutto il mondo. Attualmente, come riferito dal Global Amphibian Assessment (GAA), gli anfibii sono al primo posto nella classifica dei vertebrati minacciati di estinzione, con circa il 32% di specie a rischio, seguiti dai mammiferi con il 22% e dagli uccelli con il 12%. Le cause del declino degli anfibii sono molteplici. Alcuni fattori, quali la distruzione degli habitat, l'introduzione di specie alloctone e lo sfruttamento a scopo commerciale, influenzano negativamente da più di un secolo le popolazioni di anfibii, ma non riescono oggi a spiegare un fenomeno di tale entità. Fattori più attuali e complessi, quali la contaminazione chimica e il riscaldamento globale, rappresentano le principali minacce per questi vertebrati, come testimoniano i risultati delle ricerche condotte prevalentemente in America e in Australia.

CONTAMINANTI CHIMICI

Molti inquinanti ambientali, come i pesticidi, gli erbicidi e altri composti chimici di origine industriale, agiscono da interferenti endocrini (IE), sono cioè in grado di alterare la funzionalità del sistema endocrino influenzando negativamente sulla biologia riproduttiva e sullo sviluppo e sono capaci di compromettere le funzioni immunitarie dell'uomo e degli animali a vita selvatica. A causa del dilavamento agricolo, industriale ed urbano, il ricettacolo di tali sostanze è rappresentato dagli ambienti acquatici a cui gli anfibii rimangono strettamente legati nell'arco della loro vita. Numerose anomalie dello sviluppo e della riproduzione di questi animali sono state recentemente messe in relazione alla presenza di IE. Similmente, è stata dimostrata una correlazione tra l'esplosione di infezioni e l'esposizione ai pesticidi.

Cambiamenti climatici

Il riscaldamento globale, che sta alterando la distribuzione e l'abbondanza di specie animali e piante su tutto il pianeta, colpisce particolarmente gli anfibii a causa della loro estrema sensibilità alle piccole modificazioni di temperatura e di umidità. Da numerosi esperimenti condotti sul campo emerge che l'aumento della temperatura

può interagire con altri fattori di stress, come quelli prodotti dalla contaminazione chimica, ampliandone gli effetti. È stato ad esempio dimostrato che la diminuita profondità delle acque in cui gli anfibii vivono e si riproducono, dovuta alla scarsa piovosità, determinando l'aumento della concentrazione di sostanze inquinanti, rende gli anfibii più vulnerabili ai patogeni, indebolendone le difese immunitarie.

Da otto anni il nostro gruppo di ricerca, mediante un approccio multidisciplinare e con il coinvolgimento di altri ricercatori italiani e stranieri, studia le rane verdi del sistema *Rana esculenta*. Tale sistema viene utilizzato come modello di bioindicazione della qualità delle acque basato sull'analisi della diversità genetica di questo peculiare sistema e sullo studio delle risposte biologiche agli stress ambientali. A tale sistema appartengono sia specie pure che ibridi interspecifici vitali e fecondi in cui si è affermata la riproduzione clonale. Nella linea germinale

Gli stress ambientali degli anfibii sono generalmente correlati all'incapacità dei girini a metamorfosare, agli insuccessi riproduttivi e alle esplosioni di epidemie che possono decimare intere popolazioni

di entrambi i sessi dell'ibrido *Rana esculenta*, prima della meiosi, in uno stadio precoce dello sviluppo embrionale, si verificano l'eliminazione dei cromosomi della specie parentale *Rana lessonae* e l'endoreduplicazione premeiotica o occasionalmente prediplotenica dei cromosomi dell'altra specie *Rana ridibunda*. La divisione meiotica porta alla formazione dei gameti aploidi identici contenenti il solo genoma di *Rana ridibunda* non ricombinato. L'ibridità della linea somatica è ristabilita a ciascuna generazione attraverso la fecondazione di questi gameti con quelli della specie sintopica *Rana lessonae*. La coesistenza in natura di specie parentali e di ibridi ibridogenetici, con differente sensibilità a stress ambientali, rende questo sistema un buon modello per analizzare l'impatto che le alterazioni dell'ecosistema hanno su popolazioni naturali.





Nella penisola italiana, la popolazione mista del sistema *Rana esculenta* è analoga ai ben noti sistemi *lessonae/esculenta* dell'Europa centrale e le frequenze differenti delle due specie, in una stessa area geografica, riflettono l'occupazione differenziale delle diverse tessere ambientali: *Rana lessonae* tende a prevalere in ambienti poco inquinati ed integri mentre *Rana esculenta* ha maggiore possibilità di successo in habitat disturbati. Per tali caratteristiche le popolazioni di rane verdi permettono la qualità delle acque sulla base della loro composizione in termini di rapporto tra la frequenza della specie parentale e di quella degli ibridi.

Per analizzare in che misura le condizioni ambientali disturbate interferiscono con la dinamica delle popolazioni di rane verdi sono stati eseguiti:

- lo screening molecolare mediante esperimenti di *Southern blot* e di ibridazione in situ utilizzando una sonda specifica per il satellite centromerico RrS1;
- la ricerca e la caratterizzazione di patogeni mediante analisi morfologiche, istopatologiche e molecolari;
- la misura dei livelli plasmatici di ormoni sessuali e tiroidei con il metodo RIA;
- la caratterizzazione di biomarker specifici.

LA COMPOSIZIONE DELLA POPOLAZIONE DELLE RANE VERDI NEL TRASIMENNO

Inizialmente è stato effettuato il monitoraggio della frequenza dei due coesistenti taxa, ibridi e non ibridi, in popolazioni di rane verdi prelevate da diverse stazioni del comprensorio del lago Trasimeno⁽¹⁾. I risultati di questo monitoraggio, relativo al biennio 1997-1998, hanno messo in evidenza una relazione fra fattori negativi della qualità delle acque e minore frequenza della specie parentale. Nelle zone agricole o urbanizzate la specie ibrida appariva preponderante con una presenza media del 70%. Nelle stazioni più integre la percentuale di *Rana lessonae* prevaleva con una presenza media del 75%. La drastica inversione delle frequenze avveniva nel breve spazio di alcune centinaia di metri, rafforzando l'ipotesi che il responsabile della distribuzione differenziale dei due taxa sia proprio l'integrità ambientale. Questi primi risultati rivestono un particolare interesse in

quanto hanno fornito la base di partenza per evidenziare eventuali future alterazioni della frequenza degli ibridi e non ibridi nelle varie popolazioni prese in esame.

Dal 1999 al 2002, in un'area agricola del comprensorio, è stata rilevata una brusca riduzione della frequenza della specie parentale. Per individuarne le cause è stato eseguito un accurato screening dello stato di salute di rane adulte e girini ed è stata analizzata la concentrazione di pesticidi organoclorurati (Ocp) nei loro tessuti e nell'acqua delle pozze usate per la riproduzione. Tali composti, comunemente usati in agricoltura, sono noti per la loro persistenza nell'ambiente e per la tendenza ad accumularsi nella catena alimentare e sono sospettati di agire da interferenti endocrini. Nelle rane adulte è stata rilevata un'infezione cutanea apparentemente non letale, molto diffusa soprattutto nella specie parentale. L'agente patogeno è stato caratterizzato e assegnato al nuovo genere *Amphibiocystidium* appartenente al clade dei Mesomicetozoi e strettamente correlato all'agente eziologico della rinosporidiosi nell'uomo^(2,3). Nei girini sono state riscontrate irregolarità nello sviluppo, difficoltà a metamorfosare e alterazioni dei livelli degli ormoni tiroidei⁽⁴⁾. Gli Organocloruranti sono stati evidenziati, anche se a basse concentrazioni, sia nelle acque che nei tessuti di rane e girini. Questi risultati suggeriscono che l'infezione cutanea da *Amphibiocystidium* e le anomalie dello sviluppo riscontrate potrebbero essere correlati alla presenza di tali composti⁽⁴⁾.

Un'ulteriore riduzione della frequenza della specie parentale è stata osservata in un'ampia area del lago Trasimeno nel 2003, anno caratterizzato da una forte siccità. In tale periodo, in esemplari raccolti da due zone agricole del comprensorio, è stata evidenziata un'altra e ben più temibile infezione cutanea causata da un fungo chitridio, il *Batrachochytrium dendrobatidis*, che negli anfibii causa la chitridiomicosi. Tale malattia è ritenuta la causa principale della mortalità di massa di popolazioni di anfibii in America e in Australia. Nel sistema di rane verdi preso in esame a tutt'oggi non è stato osservato un legame evidente tra presenza del *Batrachochytrium dendrobatidis* e mortalità delle rane che, pertanto, benché suscettibili al-

l'infezione, risultano resistenti alla malattia.

Nello stesso anno, in maschi adulti raccolti nell'area agricola precedentemente monitorata, in cui era sospettata la presenza di interferenti endocrini, e in un'area a maggiore naturalità, è stata effettuata una misurazione dei livelli plasmatici degli steroidi sessuali e di un marker di femminilizzazione, la vitellogenina, parallelamente ad un'analisi istologica degli organi riproduttivi⁽⁵⁾. Da tali indagini sono emersi cambiamenti significativi nel trend degli androgeni plasmatici e dell'estradiolo-17 β in maschi della specie parentale catturati nell'area agricola, in alcuni dei quali sono state osservate modificazioni morfologiche dei tratti riproduttivi. Questi dati confermano la presenza di interferenti endocrini nella suddetta area, anche se le concentrazioni e la durata di esposizione non hanno determinato processi di femminilizzazione più evidenti, come la presenza di vitellogenina plasmatica.

I risultati fin qui raggiunti, come dimostrato in altre ricerche condotte in America ed in Australia, indicano che i cambiamenti recentemente osservati nella composizione delle popolazioni di rane verdi del lago Trasimeno potrebbero essere il risultato di complesse interazioni fra differenti fattori di stress come la perdita di habitat, i cambiamenti climatici e la presenza di pesticidi il cui effetto sinergico sarebbe responsabile della diffusione di malattie, di insuccessi riproduttivi e delle irregolarità dello sviluppo embrionale e larvale. Queste ricerche confermano la validità dell'uso delle rane verdi come sistema di bioindicazione.

1 / Bucci S., Ragghianti M., Guerrini F., Cerrini V., Mancino G., Morosi A., Moscone M., Pascolini R. (2000) Negative environmental factors and biodiversity: the case of the hybridogenetic green frog system from Lake Trasimeno. Ital. J. Zool., 67:365-370.

2 / Pascolini R., Daszak P., Cunningham A., Fagotti A., Tei S., Vagnetti D., Bucci S., Di Rosa I. (2003) Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta* complex in Central Italy and description of *Amphibiocystidium* n. gen. Dis. Aquat. Org., 56:65-74.

3 / Pereira C.N., Di Rosa I., Fagotti A., Simoncelli F., Pascolini R., Mendoza L. (2005) The pathogen of frogs *Amphibiocystidium ranae* is a member of the Order Dermocystida in the class Mesomycetozoa. J. Clin. Microbiol., 43:192-198

4 / Fagotti A., Morosi L., Di Rosa I., Clarioni R., Simoncelli F., Pascolini R., Pellegrino R., Guex G-D., Hotz H. (2005) Bioaccumulation of organochlorine pesticides in frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. Amphibia-Reptilia, 26(1).

5 / Mosconi G., Di Rosa I., Bucci S., Morosi L., Franzoni M.F., Polzonetti-Magni A.M., Pascolini R. (2005) Plasma sex steroid and thyroid hormones profile in male water frogs of the *Rana esculenta* complex from agricultural and pristine areas. Gen. Comp. Endocrinol. (Accepted for publication).