

Commissione internazionale
per la protezione delle acque italo-svizzere



PROGRAMMA 2019-2021

RAPPORTO ANNUALE 2019

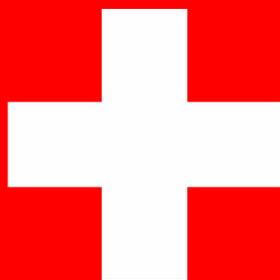
RICERCA ED INNOVAZIONE SUL LAGO MAGGIORE:

INDICATORI DI QUALITA' NEL CONTINUUM ACQUA - RIVE

a cura di

Boggero A., Minekus S., Garzoli L., Fontaneto D.

Verbania, 2020



Sommario

Summary	4
Premessa.....	5
Metodi di campionamento e di analisi	6
Particolarità delle analisi tassonomiche in vivo	10
Oligocheti - Risultati ottenuti.....	13
Bibliografia	24

Summary

With the aim of analysing benthic biodiversity, little studied so far, the project RESEARCH AND INNOVATION ON LAKE MAGGIORE: WATER QUALITY BIO-INDICATORS ALONG THE PELAGIC-LAKE SHORE BENTHIC COMMUNITIES CONTINUUM was launched in 2019. Its object was to integrate molecular and morphological taxonomy activities on benthic fauna and flora to improve basic knowledge of Lake Maggiore biodiversity.

Macroinvertebrates were sampled using 1) a 250 µm mesh aperture handle-net in the littorals, at a maximum depth of 0.5 m, to obtain qualitative samples, and 2) Surface-Floating Pupal Exuviae Field Collection. In the former case, two main habitats, muddy and sandy substrata, were sampled; in the latter, a drift-net was used while the boat was moving inside the Bolle di Magadino. A total of five natural sites were sampled in 2019, all of them included in Natura 2000 and Emerald area of nature conservation.

Samples were sorted into major taxa groups using a stereo-microscope (80x). Using the morpho-taxonomic approach, oligochaetes were identified to species level by preparing slides of sexually mature individuals, and chironomids (larvae, pupae or pupal exuviae) to species, or to genus or group of species level when the presence of juveniles did not allow the identification to species level. Slides were observed under a compound microscope (1000x).

To allow both morphological and molecular analyses on the same individuals, the sexually mature oligochaetes were halved, using the anterior part for morphological identification, and the posterior part for DNA extraction and amplification. Chironomids were separated into head for morphological taxonomy and body for molecular analyses. On the remaining taxa, the parts of the body that are useful for morphological taxonomy were observed under a microscope, whereas the other body parts were separated and kept in freezer for DNA extraction.

In total, 2 species of Micronecta (Heteroptera), 18 of chironomids, and 20 of oligochaetes were identified from morphology across the stations.

For the first year of the project the molecular analyses involved only oligochaetes. For a total of 42 animals belonging to nine species we obtained a fragment of a mitochondrial marker used for DNA barcoding. For at least two species (*Limnodrilus hoffmeisteri* and *Lumbriculus variegatus*) the analyses on DNA taxonomy revealed the presence of more evolutionary independent taxonomic entities under the same name: such cryptic species complexes will be the focus of more detailed analyses coupling morphological and genetic data.

Premessa

Questo progetto si prefigge di analizzare la componente bentonica della biodiversità (macrofite, diatomee e macroinvertebrati sia specie autoctone che specie alloctone), sino ad oggi poco studiata, per rendere più efficienti ed efficaci i piani di tutela e gestione delle aree protette, e gli sforzi di conservazione della flora e della fauna di questi ambienti. Un secondo obiettivo è quello di fungere da supporto alle attività di monitoraggio delle Agenzie Ambientali responsabili del monitoraggio a livello nazionale secondo le richieste della Direttiva Quadro sulle Acque proponendo una nuova metodologia di indagine più facile e più veloce risparmiando tempo.

Per rispondere al primo degli obiettivi, ossia promuovere attività integrative di tassonomia molecolare e morfologica sulla fauna e sulla flora bentoniche per migliorare le conoscenze di base sulla biodiversità lacustre litorale, nel 2019, nel periodo compreso fra aprile e luglio sono stati svolti i campionamenti dei macroinvertebrati. Tali attività sono state condotte con il supporto di uno studente proveniente dalla HAS University of Applied Sciences di Hertogenbosch (Paesi Bassi) che ha frequentato l'Istituto per uno stage di 6 mesi e con il supporto di un collaboratore volontario divenuto poi assegnista di ricerca presso l'Università di Pavia con competenze nel settore.

Metodi di campionamento e di analisi

Il monitoraggio della presenza di macroinvertebrati segue le linee guida prodotte a livello nazionale per l'implementazione della Direttiva Quadro sulle Acque in area litorale dove i sedimenti non sono soffici o dove la presenza di macrofite rende impossibile l'uso della draga (Boggero et al., 2011). In particolare, i campionamenti sono stati condotti su due diverse tipologie di substrati (sedimenti duri e base di sabbia e sedimenti soffici negli habitat a canneto con significativa presenza di detrito organico) negli ambienti della rete Natura 2000 (Italia) e della rete Smeraldo (Svizzera) presenti lungo il litorale del L. Maggiore (Fig. 1 e Tab 1).

Sino ad oggi, si è campionata l'intera fauna macroinvertebrata alla massima profondità di 0,5 m tramite retino immanicato con maglie di apertura pari a 250 μm operando sui primi 5-10 cm di sedimento in modo da raccogliere quanti più organismi possibile fra quelli che abitano tali habitat. Il sedimento è stato inserito in contenitori in plastica per facilità di trasporto e mantenuto vivo in frigorifero ad una temperatura di ca. 4-7°C a barattolo aperto per permettere agli organismi di respirare. Una seconda modalità di campionamento è stata adottata sino ad oggi solamente per la stazione Bolle di Magadino perché dal 1982 è considerata un'area importante per l'elevata biodiversità delle associazioni vegetali presenti e perché dal 2012 fa parte delle aree protette d'importanza transfrontaliera per la quali la Svizzera salvaguarda specie e habitat. In quest'area quindi si è proceduto anche ad un campionamento di exuviae pupali flottanti di chironomidi, concentrate sulla superficie dell'acqua dall'azione del vento e delle onde, tecnica che ha dimostrato di essere efficace nel rilevare le specie, nel determinare modelli fenologici ed altamente conveniente (Ferrington, 1987; Ferrington et al., 1991; Bouchard & Ferrington, 2011). Per questa metodica è stato utilizzato un retino da drift (Fig. 2) trascinato sulla superficie dell'acqua durante gli spostamenti in barca in diverse località dell'area delle Bolle.

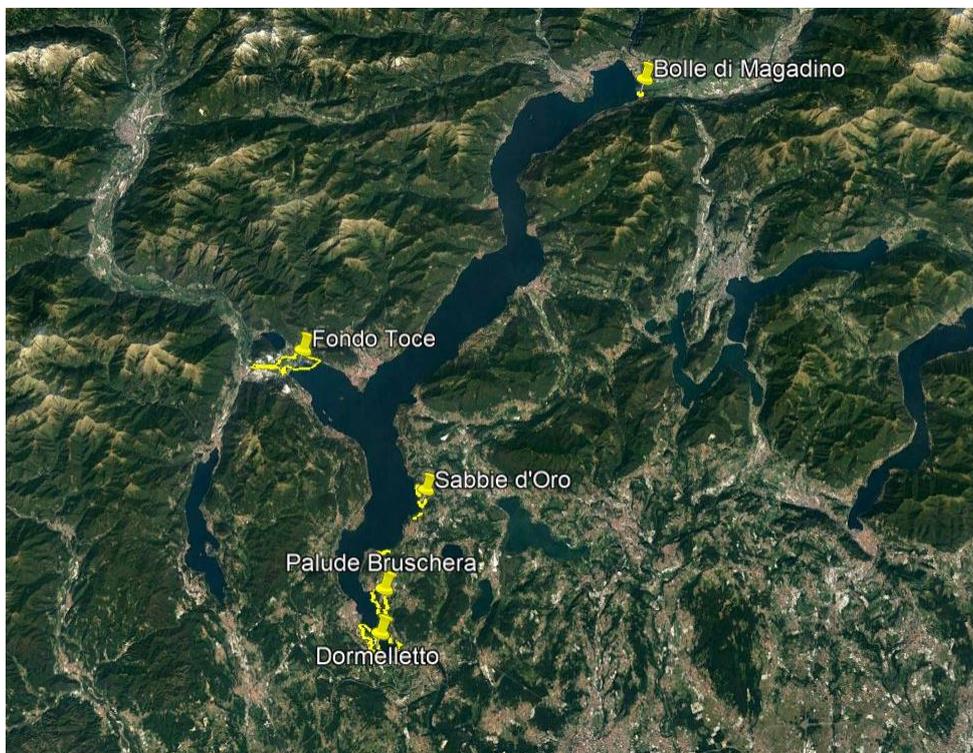


Fig. 1: Distribuzione dei siti di campionamento distribuiti fra rete Natura 2000 (Italia) e rete Smeraldo (Svizzera) sulle sponde del L. Maggiore.

Tab. 1: Informazioni rilevate sui siti di campionamento durante le attività svolte sui macroinvertebrati. Latitudine e Longitudine espresse come WGS84.

Data	Stato	Codici Reti Internazionali	Nome area	Habitat	Latitudine	Longitudine	Codice sito
10/04/2019	Italia	Natura 2000 - IT 1140001	Fondo Toce	Sabbia	45.93725	8.49477	9349
10/04/2019	Italia	Natura 2000 - IT 1140001	Fondo Toce	Canneto	45.94187	8.5015	9450
07/05/2019	Svizzera	Smeraldo - CH12	Bolle di Magadino	Sabbia	46.16013	8.85437	1685
07/05/2019	Svizzera	Smeraldo - CH12	Bolle di Magadino	Canneto	46.15005	8.85951	1585
07/05/2019	Svizzera	Smeraldo - CH12	Bolle di Magadino	Canneto	46.15254	8.86134	1586
13/06/2019	Italia	Natura 2000 - IT1150004	Dormelletto	Sabbia	45.7351	8.58063	7358
13/06/2019	Italia	Natura 2000 - IT1150004	Dormelletto	Sabbia	45.72503	8.5833	7258
13/06/2019	Italia	Natura 2000 - IT1150004	Dormelletto	Canneto	45.72503	8.5833	7258
03/07/2019	Italia	Natura 2000 - IT1150004	Sabbie d'Oro	Sabbia	45.83451	8.6239	8362
03/07/2019	Italia	Natura 2000 - IT2010502	Bruscherà	Canneto	45.76829	8.58011	7658

In laboratorio, nel caso di campionamento con retino immanicato, si è proceduto con lo smistamento degli organismi dal detrito grazie ad uno stereo-microscopio (Leica M125 80x), mentre, nel caso di campionamento con retino da drift si è provveduto al risciacquo del retino e all'inserimento del suo contenuto in provette Eppendorf separate per permettere l'identificazione tassonomica degli organismi raccolti grazie ad analisi al microscopio ottico (Zeiss Axiolab 1000x). Le chiavi utilizzate sono quelle comuni per i singoli taxa e presenti sia a livello nazionale che internazionale (Oligocheti: Timm, 2009; Schmelz & Collado, 2010; Chironomidi: Andersen et al., 2013; altri taxa: AA VV, 1977-1985).



Fig. 2: retino immanicato (sinistra) e retino da drift (destra) utilizzati per i campionamenti. Vedi testo per dettagli

Gli oligocheti, se sessualmente maturi (facilmente riconoscibili dalla presenza del clitello) vengono separati in due parti, la parte anteriore viene utilizzata per la caratterizzazione morfologica, mentre la parte posteriore, conservata in congelatore a -20°C.

I Ditteri Chironomidi hanno un ciclo vitale che comprende diversi stadi di sviluppo: larva, pupa ed adulto, ma solamente i primi due vivono in ambiente acquatico. Le forme più facili da trovare, con le metodiche di campionamento utilizzate, sono le larve, abitatrici dei sedimenti, e le pupe e le loro exuviae flottanti sulla superficie dell'acqua. Sulle larve si è incentrata la prima parte dell'analisi

tassonomica (sia morfologica che molecolare) che li ha considerati. La larva viene identificata per lo più grazie all'analisi della capsula cefalica, quindi questa viene osservata al microscopio, mentre il corpo o parte di esso viene conservata in congelatore a -20°C. Le pupe sino ad oggi sono state solamente identificate per via morfologica.

Altri taxa considerati in queste prime analisi sono stati: Idracarini, Isopoda-Asellidae, Heteroptera-Corixidae, Odonata-Lestidae, Odonata-Libellulidae, Coleoptera-Dytiscidae, Coleoptera-Hydrophilidae, Cnidaria-Hydridae, Mollusca-Pisidiidae, Diptera-Ceratopogonidae, Diptera-Chironomidae. A seconda del taxon considerato, si conserva in congelatore la parte del corpo non utile alla tassonomia morfologica (il capo, una zampa, una parte del corpo), mentre la rimanente parte utile viene osservata al microscopio.

Un minimo di 10 individui per specie è stato considerato sufficiente per ottenere risultati di elevata qualità su questa analisi: gli organismi sono stati preservati in una provetta Eppendorf della capacità di 1,5 ml, utilizzata successivamente per l'estrazione del DNA e per il sequenziamento.

I campioni contenuti nelle Eppendorf vengono codificati come segue:

9349 UU 01

dove:

9349= prima e seconda cifra decimale delle coordinate geografiche ottenute tramite GPS

uu= prime due lettere del nome scientifico in latino (es: *Uncinaiis uncinata*)

01= primo individuo della specie *i* trovata...fino a 10 ultimo individuo della specie *i* trovata

Per l'**analisi morfologica**, gli oligocheti sono stati montati su vetrino dopo passaggio in acqua addizionata di CO₂ per narcotizzarli e osservarli dal vivo, qualora avessero piccole dimensioni. Nel caso di grandi dimensioni (> 1 cm), si è proceduto passando l'organismo in una soluzione di alcool 96% per poi montarlo in Faure, mezzo di montaggio per vetrini temporanei, per schiarire la cute esterna e permettere la visione per trasparenza. Per i Ditteri Chironomidi si è separata la capsula cefalica dal corpo, successivamente è stata montata su vetrino usando il Faure come mezzo di montaggio. Per gli altri taxa: in alcuni casi (Idracarini) sono stati congelati integri direttamente dopo inserimento in provetta Eppendorf, in altri casi (Heteroptera-Corixidae) si è separato il capo dal corpo inserendo entrambi in provette separate (una da spedire all'esperto per analisi morfologica e l'altra conservata per l'analisi molecolare), i rimanenti organismi sono stati identificati al genere o alla specie al microscopio stereoscopico (Leica M125 80x). Per ogni organismo è stata scattata un'immagine per creare un archivio fotografico online accessibile agli interessati.

Per l'**analisi molecolare**, il campione preservato in freezer è stato trattato in laboratorio per estrarre il DNA da ogni singolo individuo raccolto seguendo protocolli messi a punto per piccoli organismi invertebrati (Tang et al., 2014). L'analisi ha riguardato un frammento della citocromo c ossidasi subunità 1 (i cui acronimi sono COX1, COI o CO1), che è un gene del DNA mitocondriale (mtDNA). La CO1 è generalmente usata in questo tipo di analisi di biodiversità negli eucarioti, ed esistono già librerie di sequenze CO1 liberamente accessibili online, quali Bold Systems (<http://www.boldsystems.org/>) o GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Relativamente ai macroinvertebrati, esistono già librerie piuttosto aggiornate su Efemerotteri (Ball et al., 2005), Tricotteri (Zhou et al., 2007, 2011) e numerosi generi di Chironomidi (Carew et al., 2007; Ekrem et al., 2007; Sharley et al., 2004; Sinclair & Gresens, 2008).

I primer HCOI (HCO2198) e LCOI (LCO1490) sono stati usati per amplificare la regione Folmer del gene CO1 (Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003). La reazione, in un volume di 25 µl, è stata preparata per ciascun campione con i reagenti necessari, contenenti 12 µl di GoTaq® Green Master Mix, 1 µl di Primer HCOI e 1 µl LCOI, 2,5 µl di DNA e 8,5 µl di acqua priva di nucleasi (Promega, 2016).

Per determinare il risultato della PCR, il DNA amplificato è stato visualizzato mediante elettroforesi aggiungendo un controllo positivo e uno negativo. Il controllo positivo utilizzato in questa ricerca è stato selezionato da un campione di zooplancton. Una volta amplificati con successo, i campioni sono stati conservati a una temperatura di -20°C fino a quando non sono stati inviati a una società esterna (Macrogen) per il sequenziamento Sanger.

I cromatogrammi ricevuti da Macrogen e relativi ai soli oligocheti, sono stati visualizzati, controllati e trascritti in sequenze utilizzando un software per visualizzare i nucleotidi del gene amplificato, FinchTV 1.5.0 (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>). Le sequenze ottenute nelle due direzioni sono state unite usando Mesquite 3.6 (<https://www.mesquiteproject.org/>), e per ogni sequenza si è proceduto al controllo dell'attendibilità confrontandola in GenBank con BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), un database online contenente sequenze genetiche di vari organismi. Questo approccio ha permesso di controllare che le sequenze fossero davvero dell'animale isolato e non dovute a contaminazioni umane, di alghe, o di altri organismi microscopici presenti nel campione.

Per tutte le specie per le quali sono state raccolte informazioni sul DNA da una quantità sufficiente di organismi, sono stati utilizzati approcci diversi di tassonomia molecolare (Fontaneto et al., 2015). L'approccio utilizzato in questa ricerca consisteva in un'ispezione visiva degli alberi filogenetici, ottenuti attraverso l'analisi della massima verosimiglianza. Le sequenze di DNA ottenute in questa ricerca sono state implementate con sequenze della stessa specie recuperate da GenBank. Questi set di dati sono stati allineati utilizzando Mafft 7 online (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), un software che allinea le composizioni in base alla loro somiglianza. Dopo l'allineamento, le sequenze sono state ricontrollate in Mesquite per potenziali problemi, come inserzioni e delezioni, codoni di arresto, e posizioni ambigue. Nessuno di questi problemi è stato riscontrato e le analisi di massima verosimiglianza sono state eseguite utilizzando PhyML-3.1 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) usando GTR+G+I come modello evolutivo. Gli alberi filogenetici ottenuti sono stati visualizzati usando FigTree v.1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), mostrando le somiglianze genetiche tra gli individui. Inoltre, le distanze genetiche non corrette all'interno e tra le specie sono state estratte dagli allineamenti utilizzando R 3.3.3 (<https://www.r-project.org/>).

Particolarità delle analisi tassonomiche in vivo

Il vantaggio di un'analisi del campione in vivo è quella di aver l'opportunità di osservare caratteri generalmente non visibili una volta che gli organismi sono fissati in alcool o formalina, modalità lavorativa solitamente utilizzata al CNR-IRSA di Verbania perché permette una lunga conservazione dei campioni ed una loro osservazione anche dopo lungo periodo. L'osservare il campione in vivo obbliga ad una rapida analisi perché gli organismi col passare del tempo tendono a morire o, una volta separati dal substrato, tendono a dar luogo ad atti di cannibalismo intraspecifico e/o interspecifico. Questo porta l'operatore a dover tenere ben separati i predatori, a qualsiasi taxon appartengano, dagli altri individui, ma anche così si avrà una rapida diminuzione di organismi per predazione intraspecifica.

Grazie a questa modalità lavorativa è stato possibile osservare catene temporanee di naididi (zoidi) che si riproducono asessualmente per divisione del corpo e rigenerazione delle parti mancanti. In tale tipo di riproduzione asessuata le parti mancanti si formano prima della divisione degli individui, dando luogo a catene che infine, si separano, liberandosi in acqua (Fig. 3).

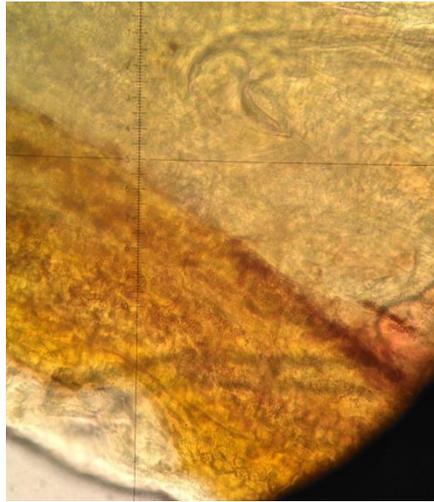


Fig. 3: Due individui in formazione. La freccia indica il dettaglio della zona dove avverrà la scissione dei due individui una volta completamente formati (<https://www.sciencedirect.com>).

All'osservazione al microscopio ottico altri caratteri aiutano nell'identificazione degli organismi. *Limnodrilus hoffmeisteri* è facilmente riconoscibile dalla presenza di una coppia di astucci peniali almeno 8 volte più lunghi della loro larghezza prossimale e dotati all'apice di un beccuccio (Fig. 4). Molto comune in acqua dolce.

Psammoryctides barbatus possiede caratteristici ciuffi anteriori dorsali con 1-2 setole capillari lisce e 3-8 setole pettinate a forma di ventaglio (palmate) (Fig. 5). Generalmente si trova in acque dolci, soprattutto in substrati sabbiosi.

Stylaria lacustris molto attiva, difficile seguirla sotto il microscopio stereoscopico. Distinguibile per la caratteristica ed estesa proboscide (Fig. 6) oltre che dalla presenza di occhi. Preferisce habitat a macrofite sommerse, ma è stata osservata anche su fondi duri a profondità 0,3 - 1,0 m.



Limnodrilus hoffmeisteri

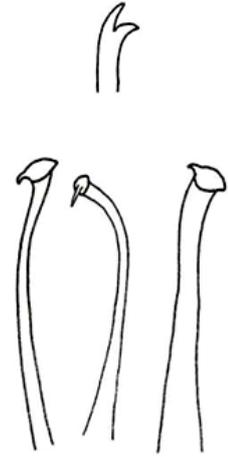


Fig. 4: Astuccio peniale di *Limnodrilus hoffmeisteri* (Lh) caratterizzato da un beccuccio all'apice (immagine a destra tratta da Timm, 2009).

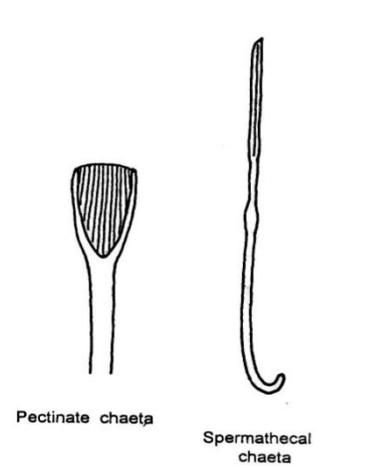


Fig. 5: *Psammoryctides barbatus* (pb) è caratterizzato da ciuffi di setole pettinate (immagine a destra tratta da Timm, 2009).

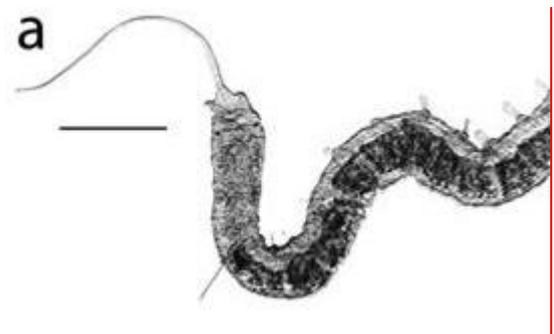


Fig. 6: *Stylaria lacustris* (Sl): tipica proboscide (cerchio) a livello di prostomio e presenza di occhi (immagine a destra tratta da Worsham et al., 2016 - CC BY 4.0).

In alcuni casi, per essere in grado di identificare le specie si è coinvolto lo specialista del settore (Eterotteri Corixidae - Dr. Fabio Cianferoni, Università di Firenze), in altri casi (Ditteri chironomidi – Prof. Bruno Rossaro), si è consultata la collezione personale depositata presso l'Università di Milano, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali.

Grazie a quanto specificato sopra, le analisi morfologiche sugli Eterotteri – Corixidae hanno permesso di evidenziare la presenza di due specie di *Micronecta* nel L. Maggiore. Si tratta di individui maschili e femminili di: *Micronecta (Dichaetonecta) scholtzi* (Fieber, 1860) e *Micronecta (Micronecta) griseola* Horváth, 1899, registrate in tre diversi siti FondoToce, Magadino e Dormelletto sempre in habitat a macrofite.

Infine, si propone un primo elenco di specie ottenuto dall'analisi morfologica delle pupe e delle exuviae di Ditteri Chironomidi raccolte tramite retino da drift. Sono state identificate 18 specie e 2 generi: *Procladius (Holotanypus) choreus* (Meigen, 1804), *Conchapelopia* sp., *Diamesa tonsa* (Walker, 1856), *Prodiamesa olivacea* (Meigen, 1818), *Propillocerus* sp., *Psectrocladius (Psectrocladius) oxyura* Langton, 1985, *Orthocladius (Orthocladius) oblidens* (Walker, 1856), *Paracladius conversus* (Walker, 1856), *Parakiefferiella bathophila* (Kieffer, 1912), *Tanytarsus curticornis* Kieffer, 1911, *Tanytarsus ejuncidus* (Walker, 1856), *Tanytarsus inaequalis* Goetghebuer, 1921, *Micropsectra apposita* (Walker, 1856), *Corynoneura lacustris* Edwards, 1924, *Paratendipes albimanus* (Meigen, 1818), *Glyptotendipes (Caulochironomus) foliicola* Kieffer, 1918, *Glyptotendipes (Glyptotendipes) pallens* (Meigen, 1804), *Chironomus (Chironomus) anthracinus* Zetterstedt, 1860, *Chironomus (Chironomus) plumosus* (Linnæus, 1758), *Cryptochironomus rostratus* Kieffer, 1921.

Oligocheti - Risultati ottenuti

Durante questa ricerca 184 Oligocheti sono stati raccolti con successo da otto località del lago e identificati morfologicamente a livello di specie o genere o identificati ad un livello tassonomico più elevato (famiglia). In via preliminare, attraverso l'analisi morfologica si sono identificate un numero totale di specie pari a 20 (Tab. 2). *Chaetogaster* sp. e *Nais* sp., sono due generi che possono contribuire ad ampliare il numero di specie riscontrate. Altri individui sono stati identificati sinora solo a livello di famiglia perché non maturi sessualmente, in tabella 2 compaiono come Enchytraeidae, Tubificidae e Lumbriculidae indet. (indeterminati).

Tutti gli Oligocheti trovati appartengono alle famiglie Enchytraeidae, Naididae (sia Tubificinae che Naidinae), Lumbricidae e Lumbriculidae. La famiglia Naididae ha fornito il maggior numero di specie e individui, rispettivamente 12 specie di Naidinae e 9 di Tubificinae, e 96 individui per le Naidinae e 69 per le Tubificinae (Tab. 2). Questi alti conteggi sono in parte dovuti all'abbondante presenza di *Limnodrilus hoffmeisteri*, Tubificinae non identificati perché non maturi sessualmente, *Nais* sp. e *Uncinaxis uncinata*. Dopo il sequenziamento, 11 di questi taxa sono stati confermati a livello di specie.

Confrontando il numero di specie trovate nei diversi tipi di habitat, è stato riscontrato un numero maggiore di individui su substrato duro (102 su sabbia) che su substrato soffice (82 in area canneto), sebbene nel sito Palude Bruschera sia stato prelevato un solo campione a causa dell'assenza di spiagge sabbiose. La stazione di Magadino ha fornito la maggior parte degli individui sia in habitat sabbiosi (45) che in presenza di canneto su substrati soffici (31), seguito dalla stazione Dormelletto con elevato numero di individui (25) su substrato duro e 19 su substrato soffice. Sebbene gli habitat duri sabbiosi abbiano fornito un numero di individui più elevato rispetto ai canneti, entrambi gli habitat hanno specie uniche caratterizzanti che non sono state trovate nell'altro tipo di habitat (Tab. 2). Naidinae e Tubificinae prevalgono nei substrati duri, mentre Lumbricidae e Lumbriculidae sono esclusivi dei substrati soffici.

Tab. 2: Numero di individui per specie, habitat (substrati duri e sabbiosi oppure soffici con detrito organico), e sito di campionamento. In parentesi è riportato il numero di campioni.

	substrato duro (sabbia)					substrato soffice					Totale
	Fondo Toce (2)	Magadino (3)	Dornelletto (2)	Sabbie d'Oro (1)	Bruschera (0)	Fondo Toce (1)	Magadino (2)	Dornelletto (2)	Sabbie d'Oro (1)	Bruschera (1)	
Enchytraeidae											6
Enchytraeidae indet.			3			1	1	1			6
Naidinae											96
<i>Uncinaiis uncinata</i> (Orsted, 1842)	1	10	10								21
<i>Ophidonais serpentina</i> (Muller, 1774)						10	1				11
<i>Stylaria lacustris</i> (Linnaeus, 1767)							4				4
<i>Chaetogaster</i> sp.		2									2
<i>Dero digitata</i> (Muller, 1774)						5			10		15
<i>Vejdovskyella intermedia</i> (Bretscher, 1896)		2									2
<i>Nais barbata</i> Muller, 1774								2			2
<i>Nais christinae</i> Kasprzak, 1973		1	1					2			4
<i>Nais pardalis</i> Piguët, 1906	2										2
<i>Nais variabilis</i> Piguët, 1906		2									2
<i>Nais communis</i> Piguët, 1906		1									1
<i>Nais</i> sp.	8	16	3					1	1	1	30
Tubificinae											69
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparede, 1862			1	17		9	1				28
<i>Limnodrilus claparedeanus</i> Ratzel, 1869			1								1
<i>Limnodrilus profundicola</i> (Verill, 1871)				1							1
<i>Tubifex tubifex</i> (Muller, 1774)						1					1
<i>Tubifex ignotus</i> (Stolc, 1886)							1				1
<i>Psammoryctides barbatus</i> (Grube, 1861)		11				1					12
<i>Spirosperma ferox</i> Eisen, 1879							2				2
<i>Bothrioneurum vej dovskyanum</i> Stolc, 1886						2					2
Tubificinae indet.			6	3		3	6	1	2		21
Lumbricidae											3
<i>Eiseniella tetraedra</i> (Savigny, 1826)								3			3
Lumbriculidae											10
<i>Lumbriculus variegatus</i> (Muller, 1774)							1				1
Lumbriculidae indet.							4	4	1		9

Durante questa ricerca il DNA di 42 Oligocheti è stato amplificato con successo e inviato a Macrogen. Di queste sequenze, 24 erano abbastanza lunghe (> 400 bp) per essere utilizzate nelle ricostruzioni filogenetiche della massima verosimiglianza (Fig. 7). Un confronto di distanza genetica tra tutte le 24 sequenze ha rivelato che la diversità genetica all'interno di ogni specie è bassa (fino a un massimo del 4,71% per *Bothrioneurum vej dovskyanum*) e che la diversità genetica tra le specie era compresa tra il 2,52% e il 30,71%.

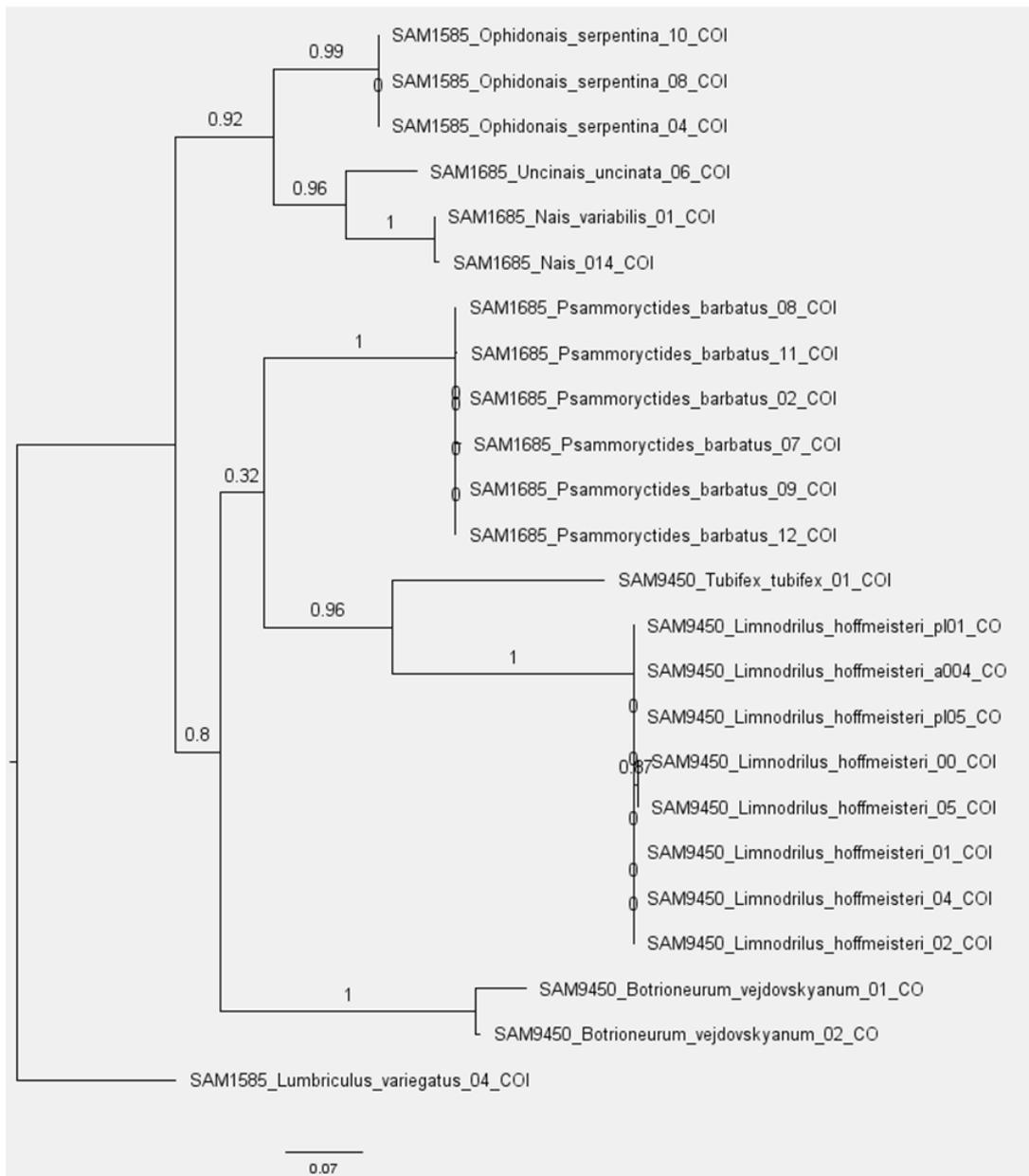


Fig. 7: Albero filogenetico di massima verosimiglianza per i 24 campioni di oligocheti con sequenze utilizzabili.

Per tutte le specie di Oligocheti, è stata eseguita un'ulteriore analisi per confrontare le loro somiglianze all'interno di altre sequenze della stessa specie o dello stesso genere, usando sequenze di GenBank. Per le Naidinae, all'interno dei generi *Paranais*, *Ophidonais* e *Uncinaiis*, l'analisi mostra una significativa somiglianza tra le sequenze di *Ophidonais serpentina* recuperate dagli individui presenti nel lago e da GenBank (distanza genetica massima 0,24%) e per *Uncinaiis uncinata* (distanza massima 2,49 %) (Fig. 8). Anche campioni provenienti da diversi continenti presentavano una bassa diversità genetica all'interno della stessa specie: ad esempio individui di *Ophidonais serpentina* appartenenti al Lago Maggiore, alla Svezia e agli Stati Uniti avevano una distanza massima tra loro di 0,24%. La specie *Psammoryctides barbatus* è stata utilizzata in questa analisi come outgroup.

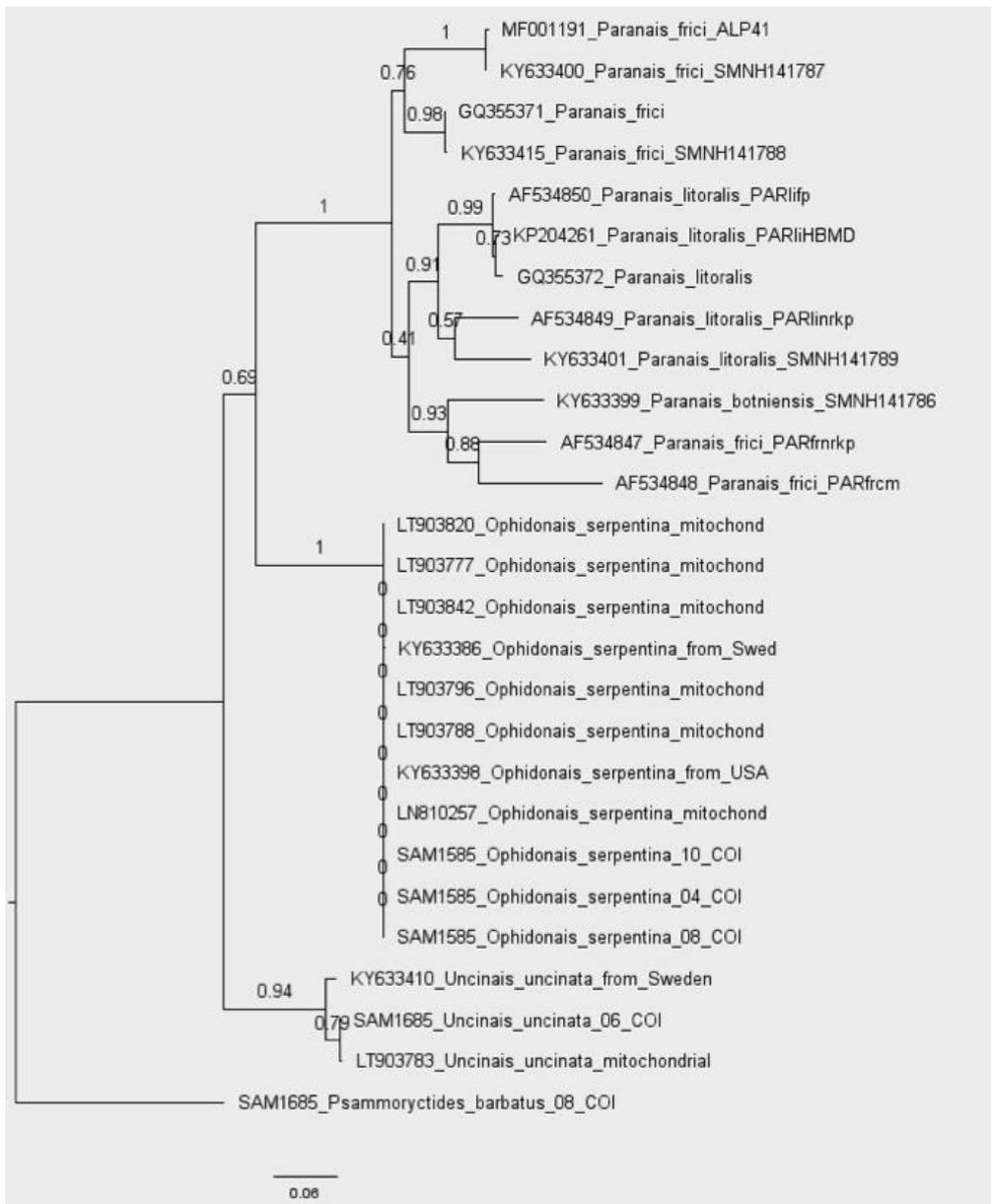


Fig. 8: Albero filogenetico di massima verosimiglianza per i generi *Paranaeis*, *Ophidonais* e *Uncinais*, includendo anche sequenze da GenBank.

L'analisi della massima verosimiglianza sul genere *Nais* mostra una somiglianza tra le due sequenze recuperate dal lago, che sono comunque diverse da qualsiasi altra sequenza recuperata da GenBank (Fig. 9).

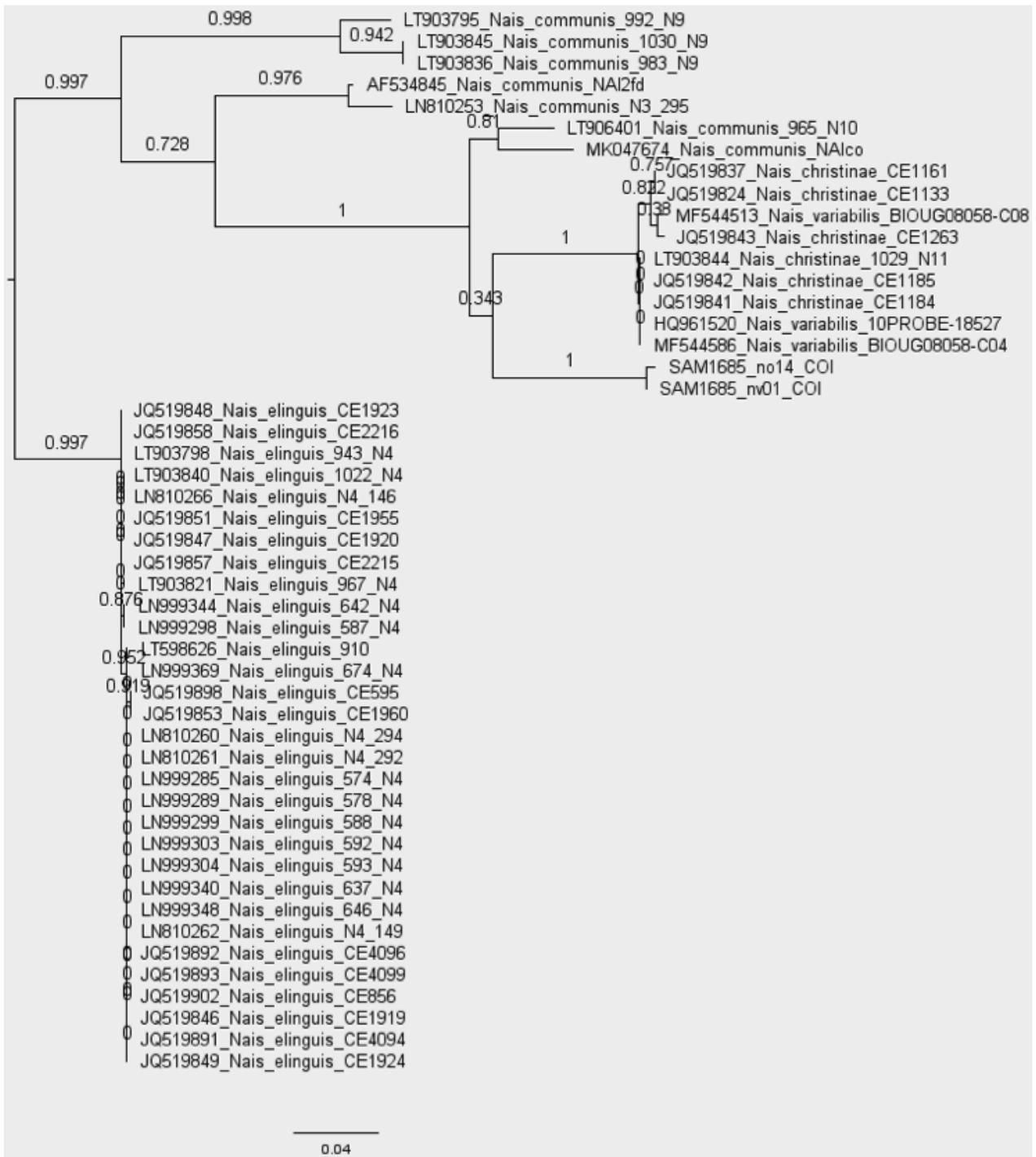


Fig. 9: Albero filogenetico di massima verosimiglianza per il genere *Nais*, includendo anche sequenze da GenBank.

L'analisi della massima verosimiglianza della specie *Psammoryctides barbatus* mostra che tutte le sequenze del Lago Maggiore si raggruppano nello stesso clade, annidate in una diversità leggermente più grande della specie con le sequenze recuperate da GenBank (Fig. 10). Tuttavia, la massima diversità genetica tra gli animali del Lago Maggiore e di altre parti del mondo era al massimo di 2,53%. In questa analisi la specie *Botrioneurum vej dovskyanum* è stata utilizzata come outgroup.

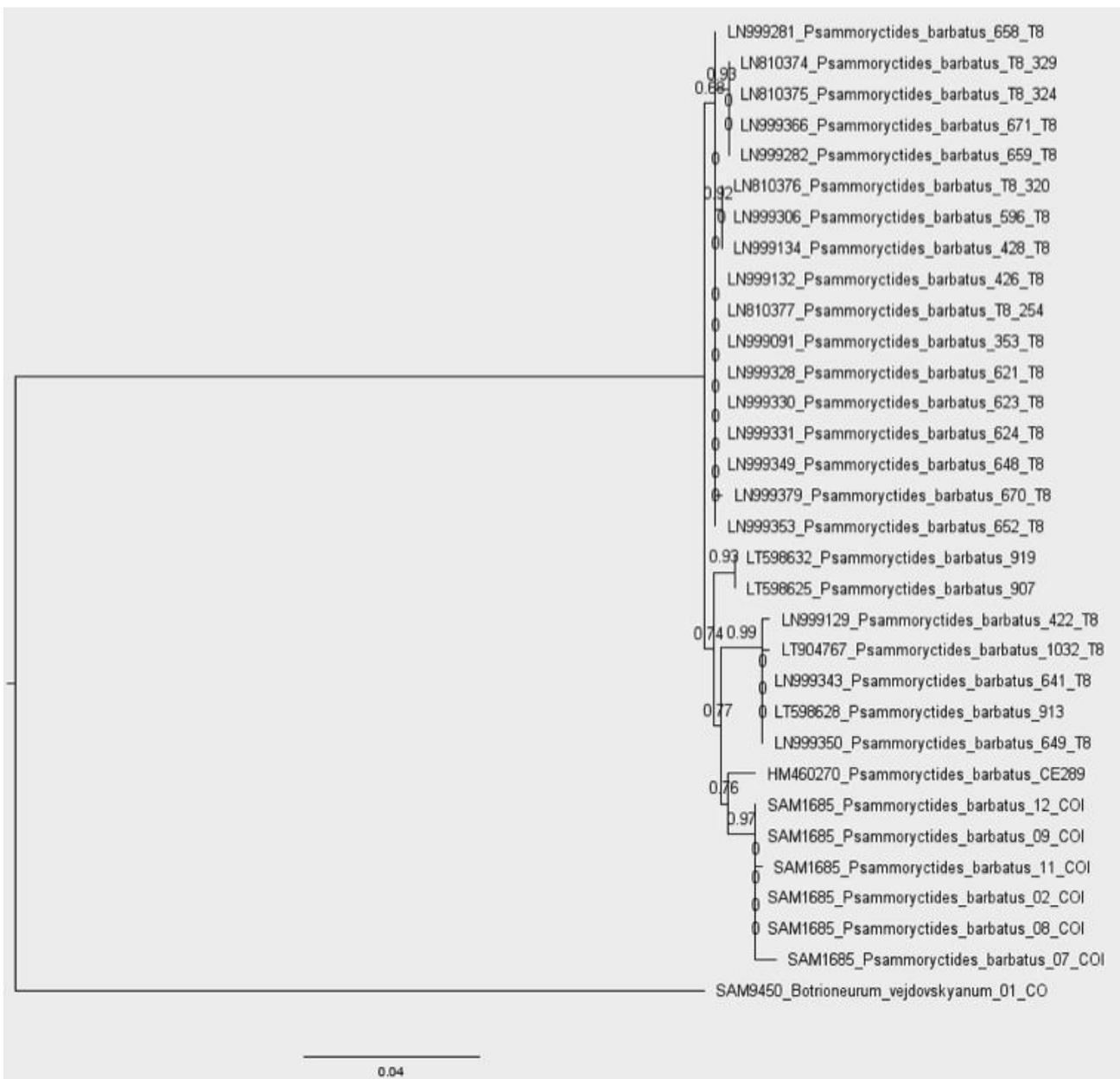


Fig. 10: Albero filogenetico di massima verosimiglianza per la specie *Psammoryctides barbatus*, includendo anche sequenze da GenBank.

Poiché è stato sequenziato un solo organismo per la specie *Tubifex tubifex*, non è stato possibile confrontare questa sequenza con altre sequenze provenienti dal lago. Tuttavia, l'analisi della massima verosimiglianza rivela che la sequenza del Lago Maggiore è annidata all'interno di altre sequenze della stessa specie da GenBank (Fig. 11). Anche in questo caso, la specie *Botrioneurum vej dovskyanum* è stata utilizzata come outgroup.

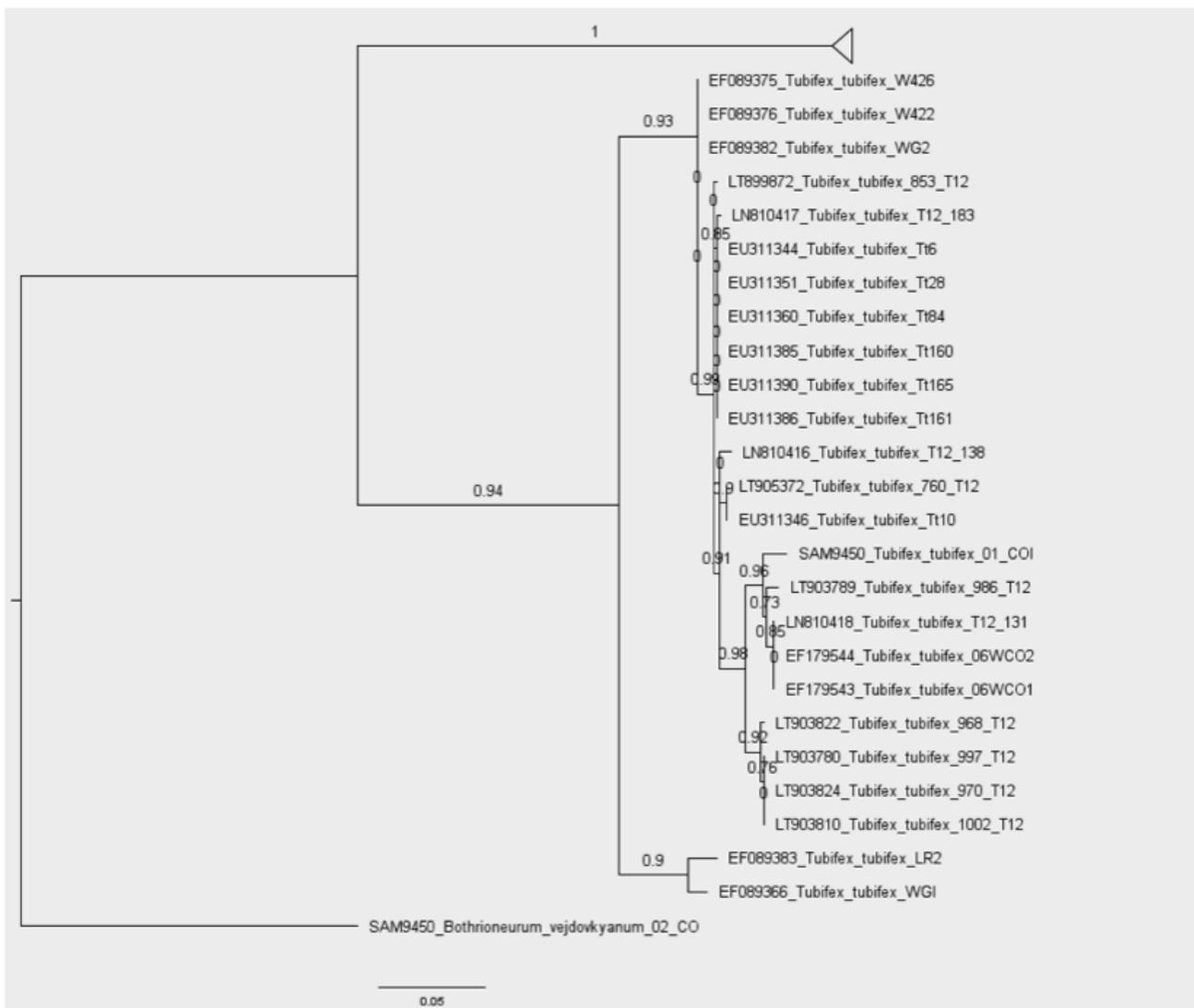


Fig. 11: Albero filogenetico di massima verosimiglianza per la specie *Tubifex tubifex*, includendo anche sequenze da GenBank.

L'analisi della massima verosimiglianza per la specie *Limnodrilus hoffmeisteri* mostra una separazione tra le specie *Limnodrilus claparedianus* e *Limnodrilus hoffmeisteri* (Fig. 12). Inoltre, si riscontrano somiglianze tra tutti i campioni prelevati dal lago e tutti i campioni recuperati da GenBank, malgrado una distanza genetica massima molto alta (25,43%) all'interno della specie. Questa elevata distanza genetica entro la stessa specie morfologica suggerisce la necessità di una revisione tassonomica della specie in quanto probabilmente nasconde potenziali specie criptiche. La specie *Botrianeurum vejdvskyanum* è stata utilizzata come outgroup.

L'analisi della massima verosimiglianza per la specie *Botrianeurum vejdvskyanum* ha rivelato che le due sequenze trovate nel Lago Maggiore erano separate in due cladi, insieme ad altre sequenze da GenBank (Fig. 13). La distanza genetica tra le due sequenze dal Lago Maggiore era del 4,71%, con una distanza massima all'interno della specie del 6,44%. La sequenza di *Limnodrilus hoffmeisteri* è stata utilizzata in questa analisi come outgroup.

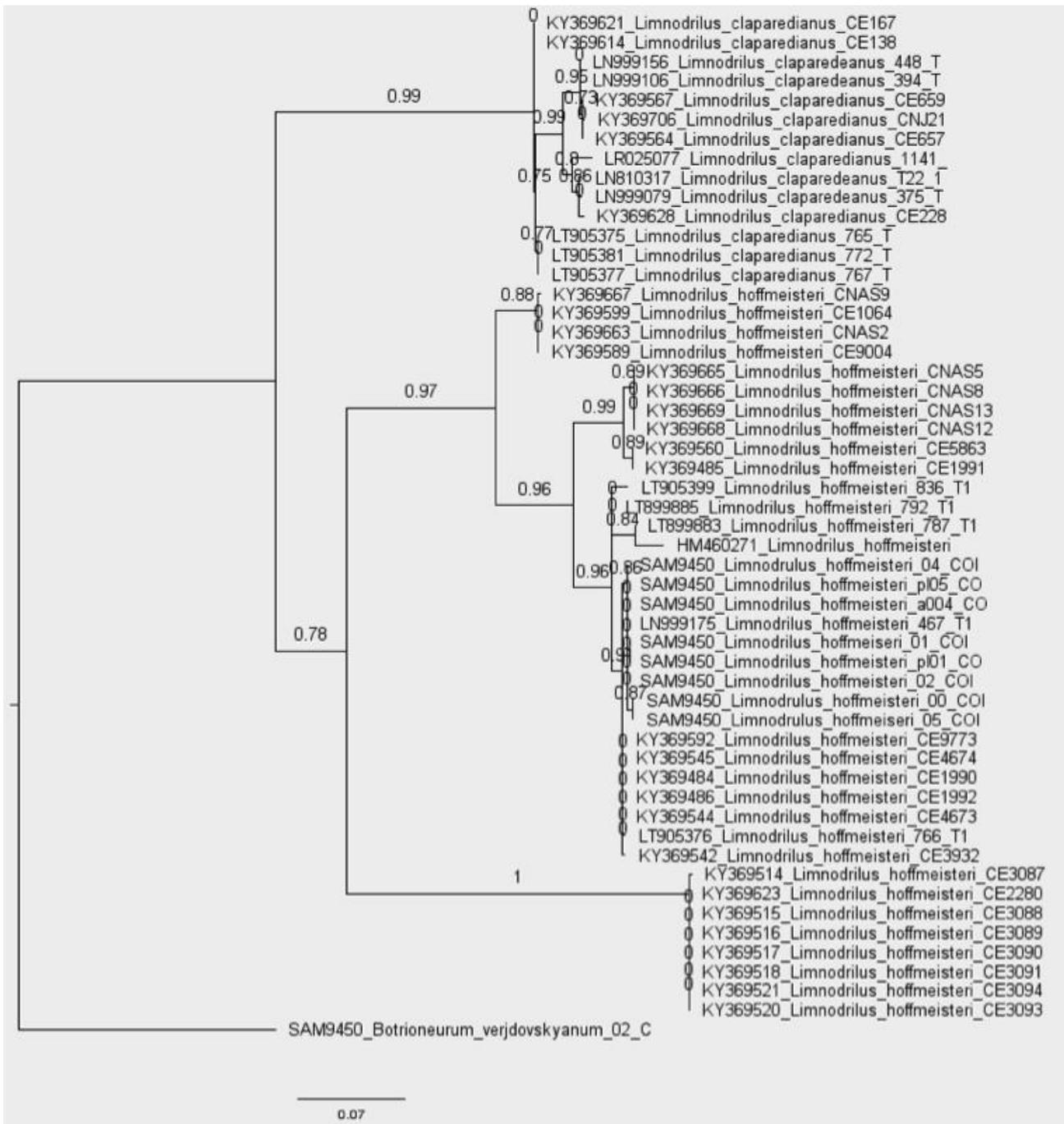


Fig. 12: Albero filogenetico di massima verosimiglianza per la specie *Limnodrilus hoffmeisteri*, incluse anche sequenze da GenBank.

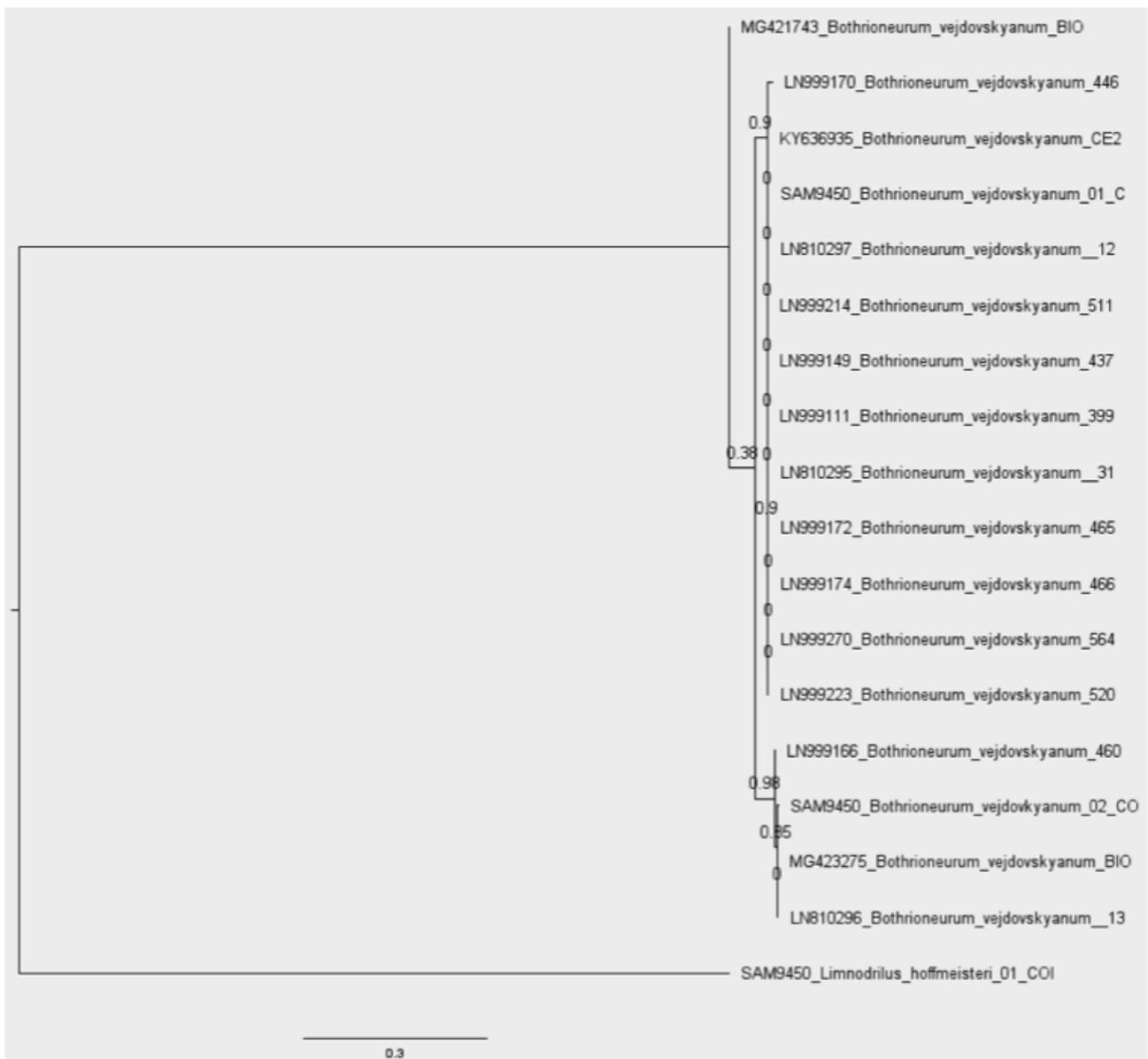


Fig. 13: Albero filogenetico di massima verosimiglianza per la specie *Botrioneurum vej dovskyanum*, includendo anche sequenze da GenBank.

L'analisi della massima verosimiglianza della specie *Lumbriculus variegatus* mostra una separazione significativa tra due gruppi di specie: la singola sequenza recuperata dal Lago Maggiore si raggruppa con solo alcune delle sequenze recuperate da GenBank (Fig. 14). La distanza genetica minima tra la sequenza del Lago Maggiore e quella della GenBank era del 3,34% e la massima del 20,73%. Analogamente alla specie *Limnodrilus hoffmeisteri*, anche per questa specie potrebbe essere necessaria una revisione tassonomica, a causa della grande diversità all'interno delle sequenze di *Lumbriculus variegatus*.

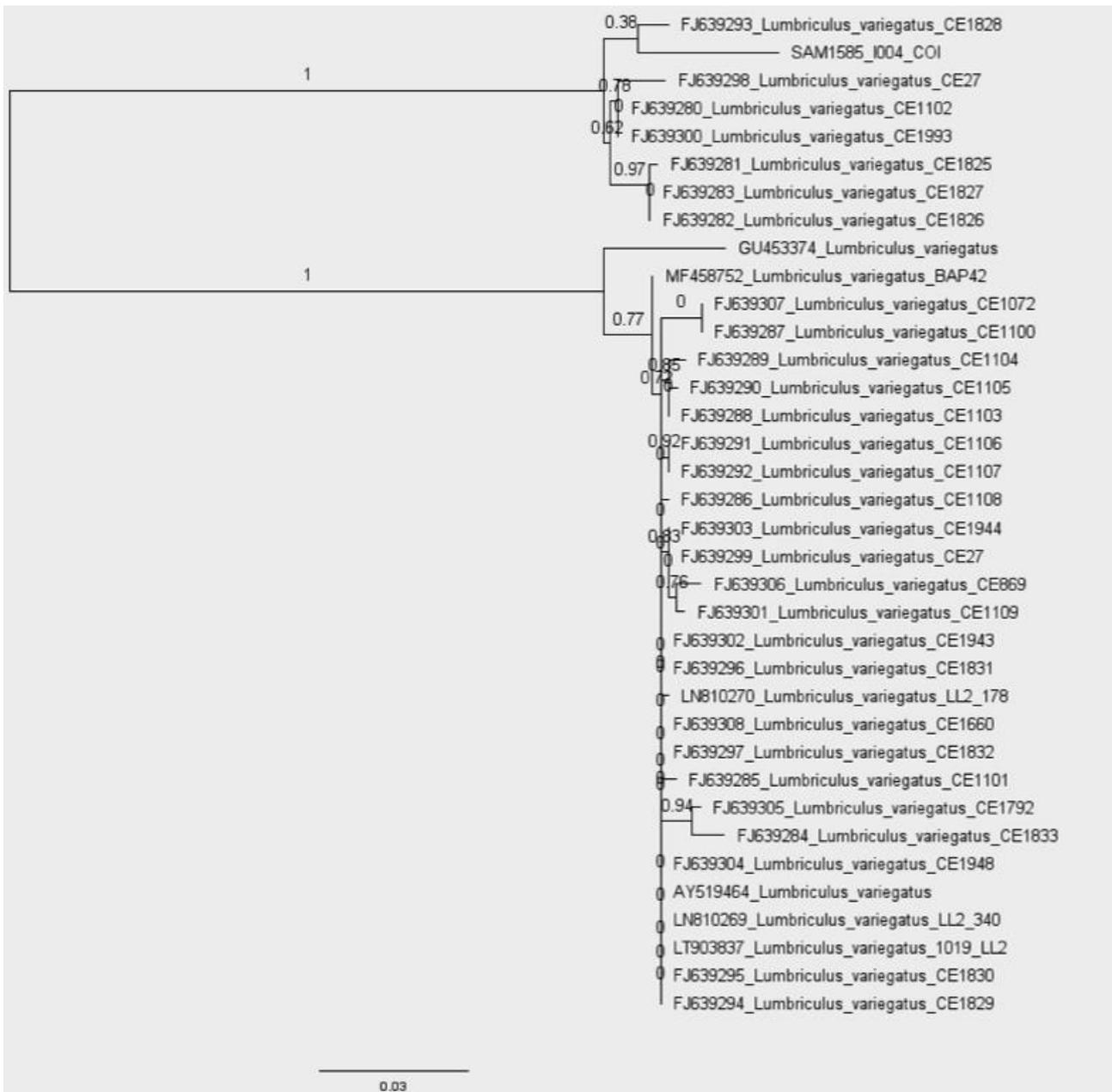


Fig. 14: Albero filogenetico di massima verosimiglianza per la specie *Lumbricus variegatus*, includendo anche sequenze da GenBank.

Nonostante i risultati ottenuti possano considerarsi soddisfacenti, il numero di individui per i quali è stato possibile ottenere un amplificato della regione COI, rispetto al totale degli individui da cui è stato estratto il DNA, risulta basso. Infatti, se per i geni nucleari, come ad esempio quelli codificanti gli RNA ribosomali (rRNA) 18S, il protocollo di estrazione Chelex utilizzato all'inizio del presente lavoro risulta una tecnica adeguata, per i *markers* mitocondriali risulta scarsamente efficiente. Questo protocollo era stato inizialmente selezionato in quanto trattasi di una tecnica standard e molto veloce; infatti, in meno di 1 ora, si può ottenere DNA di qualità da decine di esemplari. Anche modificando i parametri per l'amplificazione dei markers in PCR (e.s. variando la temperatura di *annealing*, o il tempo di allungamento) i risultati non sono stati soddisfacenti. Per ottimizzare quindi le procedure e ottenere sequenze da un maggior numero di esemplari, è in corso la rivalutazione del protocollo di estrazione, in particolare testando il metodo denominato HotSHOT (Montero-Pau et al., 2008). Questa tecnica consiste nell'utilizzo di un buffer di estrazione alcalino (pH 12), seguito

da un periodo di incubazione del campione da estrarre a 95°C per trenta minuti, seguito dall'aggiunta di una soluzione neutralizzante (pH 5) che ferma la lisi. Le soluzioni sono state preparate *ex novo* presso il laboratorio del CNR-IRSA e i risultati sperimentali sono attualmente in corso di valutazione.

In seguito alle problematiche verificatesi durante l'arco dell'anno (es. firma dell'accordo avvenuta solamente nel secondo semestre), visto che questa ricerca è una prima proposta all'interno di CIP AIS alla quale non erano associati fondi residui, e viste le questioni evidenziate in campo molecolare, si è ad un certo punto deciso di interrompere le uscite di campagna e ridurre il numero di analisi molecolari. Quindi, i risultati delle analisi molecolari relativi alle rimanenti specie di Oligocheti sono ancora da analizzare, mentre si deve ancora estrarre il DNA dagli altri taxa riscontrati nei campioni, sia derivati dal drift che derivati dal sedimento. Questo report è quindi il risultato di una prima indagine che doveva permetterci di mettere a punto il metodo di lavoro, sia in campo che in laboratorio, e di far comprendere l'utilità e la velocità con cui si sarebbe operato.

Bibliografia

AA VV, 1977-1985. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, Collana del progetto finalizzato 'Promozione della qualità dell'ambiente', 29 volumi, Verona.

Andersen T., Cranston P.S., Epler J.H. (Eds). Chironomidae of the Holarctic Region: Keys and diagnoses. Part 1 - Larvae. 2013. Insect systematics and evolution supplements (formerly Entomologica Scandinavica Supplement), 66: 573 pp.

Boggero A., Zaupa S., Rossaro B., Lencioni V., Gherardi F. 2011. Guida tecnica alla programmazione del campionamento e alla scelta della strumentazione idonea per lo studio della fauna macroinvertebrata lacustre. REPORT CNR-ISE, 02-11: 63 pp.

Carew M.E., Pettigrove V., Cox R.L., Hoffmann A.A. 2007. DNA identification of urban Tanytarsini chironomids (Diptera: Chironomidae). Journal of the North American Benthological Society, 26: 587-600.

Ball S.L., Hebert P.D.N., Burian S.K., Webb J.M. 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. Journal of the North American Benthological Society, 24: 508-524.

Ekrem T., Willassen E., Stur E. 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 43: 530-542.

Ferrington L.C. Jr. 1987. Collection and identification of floating pupal exuviae of chironomidae for use in studies of surface water quality. Prepared for US EPA, Region VII, Kansas City, KS as SOP, FW130A: 39 pp.

Ferrington L.C. Jr., Blackwood M.A., Wright C.A., Crisp N.H., Kavanaugh J.L., Schmidt F.J. 1991. A protocol for using surface-floating pupal exuviae of chironomidae for rapid bioassessment of changing water quality. In: Sediment and stream water quality in a changing environment: trends and explanations. IAHS Publication Number 203: 181-190.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 for diverse metazoan in invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3: 294-299.

Fontaneto D., Flot J.F., Tang C.Q. 2015. Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meiofauna. Marine Biodiversity, 45: 433-451.

Hebert P.D., Ratnasingham S., de Waard J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Biological Sciences, 270: 96-99.

Kranzfelder P., Anderson A.M., Egan A.T., Mazack J.E., Bouchard R.W. Jr., Rufer M.M., et al. 2015. Use of Chironomidae (Diptera) surface-floating pupal exuviae as a rapid bioassessment protocol for water bodies. Journal of Visualized Experiments, 101: e52558.

Montero-Pau, J., Gómez, A. & Muñoz, J. 2008. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. Limnology and Oceanography: Methods, 6: 218-222.

Promega 2016. Usage Information. <https://nld.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-m712-protocol/>. Accesso: 04-05-2019.

Retrieved at: 04-05-2019.

- Schmelz R.M., Collado R. 2010. A guide to European terrestrial and freshwater species of Enchytraeidae (Oligochaeta). *Soil Organisms*, 82(1): 176 pp.
- Sharley D.J., Pettigrove V., Parsons Y.M. 2004. Molecular identification of *Chironomus* spp. (Diptera) for biomonitoring of aquatic ecosystems. *Australian Journal of Entomology*, 43: 359-365.
- Sinclair C.S., Gresens S.E. 2008. Discrimination of *Cricotopus* species (Diptera: Chironomidae) by DNA barcoding. *Bulletin of Entomological Research*, 98: 555-563.
- Tang C.Q., Obertegger U., Fontaneto D., Barraclough T.G. 2014. Sexual species are separated by larger genetic gaps than asexual species in rotifers. *Evolution*, 68: 2901-2916.
- Timm T. 2009. A guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe. *Lauterbornia*, 66: 235 pp.
- Zhou X., Kjer K.M., Morse J.C. 2007. Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta: Trichoptera) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society*, 26: 719-742.
- Zhou X., Robinson J.L., Geraci C.J., Parker R., Flint O.S., et al. 2011. Accelerated construction of a regional DNA-barcode reference library: caddisflies (Trichoptera) in the Great Smoky Mountains National Park. *Journal of the North American Benthological Society*, 30: 131-162.
- Worsham M.L.D., Gibson R., Huffman D.G. 2016. The aquatic annelid fauna of the San Marcos River headsprings, Hays County, Texas. *ZooKeys*, 618: 1-14.