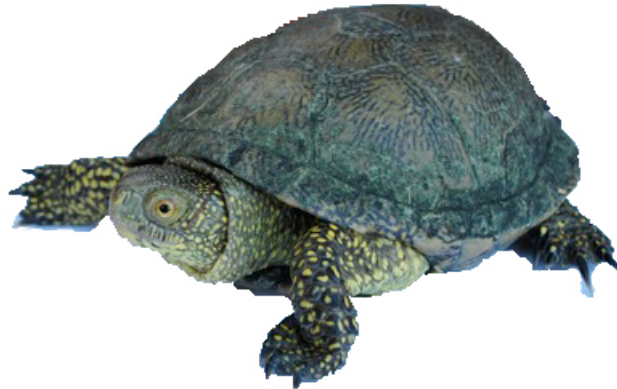




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO
Dottorato di Ricerca in Biologia Ambientale e Biodiversità
Indirizzo Biologia Animale - Ciclo XXV
Tesi di Dottorato

**FILOGEOGRAFIA DELLE TARTARUGHE PALUSTRI
PALEARTICO-OCCIDENTALI: *Mauremys leprosa* ED *Emys* spp.
(TESTUDINES: BATAGURIDAE, EMYDIDAE)**



Dottore
Francesco Sacco

Tutor:
Prof. Marco Arculeo

Co-Tutor:
Prof. Uwe Fritz
Director, Senckenberg Natural History Collections Dresden

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Biologia Ambientale e Biodiversità – Indirizzo Biologia Animale.
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche.
Settore Scientifico Disciplinare BIO/05.

FILOGEOGRAFIA DELLE TARTARUGHE PALUSTRI PALEARTICO-OCCIDENTALI: *Mauremys leprosa* ED *Emys* spp. (TESTUDINES: BATAGURIDAE, EMYDIDAE)

IL DOTTORE
FRANCESCO SACCO

IL COORDINATORE
PROF. MARCO ARCULEO

IL TUTOR
PROF. MARCO ARCULEO

CO TUTOR
PROF. UWE FRITZ

Director, Senckenberg Natural History Collections Dresden

CICLO XXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015.

INDICE

INDICE DELLE TABELLE	3
INDICE DELLE FIGURE	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Gli studi filogeografici	7
1.2 La Tartaruga palustre iberica, <i>Mauremys leprosa</i>	9
1.3 La Tartaruga palustre europea, <i>Emys spp.</i>	10
1.4 Obiettivi della ricerca	14
2. MATERIALI E METODI	15
2.1 <i>Mauremys leprosa</i>	15
2.2 <i>Emys orbicularis</i> s.l.	21
3. RISULTATI	34
3.1 <i>Mauremys leprosa</i>	34
3.2 <i>Emys orbicularis</i> s.l.	39
4. DISCUSSIONE	56
4.1 <i>Mauremys leprosa</i>	56
4.2 <i>Emys orbicularis</i> s.l.	58
5. CONCLUSIONI	64
5.1 RINGRAZIAMENTI	67
6. BIBLIOGRAFIA	68
ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE	74

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1 Campioni di <i>M. leprosa</i> analizzati, relative aree di provenienza e coordinate geografiche.....	16
Tabella 2 Primers utilizzati per l'amplificazione e il sequenziamento (*) dei marcatori mitocondriali di <i>Mauremys leprosa</i>	19
Tabella 3 Condizioni di amplificazione dei marcatori mitocondriali di <i>Mauremys leprosa</i> ...	19
Tabella 4 - Primers utilizzati per l'amplificazione e il sequenziamento (*) dei marcatori mitocondriali di <i>Emys orbicularis</i> ed <i>E. trinacris</i>	24
Tabella 5 Condizioni di amplificazione dei marcatori mitocondriali di <i>E. orbicularis</i> ed <i>E. trinacris</i>	24
Tabella 6 Migliori modelli evolutivi selezionati, sia senza partizione che per ciascun segmento. Nst: Number of substitution types, +G: gamma correction, +I: correction for points of invariance, Y: yes, N: no.....	25
Tabella 7 Loci microsatellite, multiplex utilizzate, numero e range di taglia degli alleli. I primer forward sono stati coniugati con sostanze fluorescenti.....	32
Tabella 8 Cicli termici utilizzati per l'amplificazione dei microsatelliti tramite reazioni multiplex.....	32
Tabella 9 Statistiche riassuntive per gli aplotipi delle sequenze <i>M. leprosa</i> (n = numero di campioni, nh = numero di aplotipi, h = diversità aplotipica e deviazione standard (SD _h), π = diversità nucleotidica e SD _π , S = numero di siti polimorfici, D = indice di Tajima), F _{ST} = indice di Fu).....	34
Tabella 10 Tabella degli aplotipi di <i>M. leprosa</i> condivisi. In tabella, il numero di individui è suddiviso per popolazione e per ciascun aplotipo. Tra parentesi il numero degli aplotipi della macro area di riferimento.....	35
Tabella 11 Tabella di AMOVA condotta tra gruppi.....	35
Tabella 12 Confronto a coppie della distanza genetica tra le macro aree, calcolata come pairwise F _{ST} . In grassetto i valori di F _{ST} significativi (P<0,05).....	36
Tabella 13 Tavola riassuntiva dei valori medi ± deviazione standard (SD) delle misure morfometriche e degli indici calcolati, suddivisi per sito di campionamento e per sesso. Tra parentesi il numero di individui compreso nelle analisi. (BM = peso; CL = lunghezza carapace; CW = larghezza carapace; PL = lunghezza piastrone; PW = larghezza piastrone; SH = altezza corazza; TL = lunghezza coda; CT = distanza cloaca-apice coda; tutte le misure sono espresse in cm ad eccezione del peso in g).....	43
Tabella 14 Tavola riassuntiva del Cochran's test e di one-way ANOVA sulle variabili morfometriche registrate effettuata tra i siti campionati. In grassetto i valori statisticamente significativi.....	44
Tabella 15 Tavola riassuntiva dei valori di p delle differenze riscontrate nei confronti a coppie tramite ANOVA e test SNK sulla base delle misure e degli indici morfometrici (BM = peso; CL = lunghezza carapace; CW = larghezza carapace; PL = lunghezza piastrone; PW = larghezza piastrone; SH = altezza corazza; TL = lunghezza coda; CT = distanza cloaca-apice coda). In grassetto i valori significativi per p<0,05.....	46
Tabella 16 Statistiche riassuntive per gli aplotipi delle sequenze di <i>E. trinacris</i> e <i>E. orbicularis</i> (nh = numero di aplotipi, h = diversità aplotipica e deviazione standard (SD _h), π = diversità nucleotidica e SD _π , S = numero di siti polimorfici, D = indice di Tajima), F _S = indice di Fu).....	47

Tabella 17 Tabella degli aplotipi di <i>E. trinacris</i> e <i>E. orbicularis</i> condivisi. In tabella il numero di individui è suddiviso per popolazione e per ciascun aplotipo. Tra parentesi il numero degli aplotipi totali per ciascuna area e per specie o sottospecie.	48
Tabella 18 Tabella riassuntiva di AMOVA condotta tra le specie <i>E. trinacris</i> e <i>E. orbicularis</i>	50
Tabella 19 Confronto a coppie della distanza genetica tra i siti e le specie, calcolata come <i>pairwise F_{ST}</i> . In grassetto i valori di <i>F_{ST}</i> significativi (P<0,05).....	50

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1 - Esemplare adulto di <i>Mauremys leprosa</i>	9
Figura 2 – Esemplare adulto di <i>Emys trinacris</i>	12
Figura 3 – Siti di campionamento europei e nord africani di <i>Mauremys leprosa</i>	15
Figura 4 - Le nasse sono state immerse in acqua con un sistema di galleggiamento e sono rimaste in pesca per un tempo variabile, tra le 3 e le 24 ore.....	18
Figura 5 – Siti di campionamento di <i>Emys orbicularis</i> in Tunisia (blu), Algeria (blu) e Marocco (arancio per i Monti Rif, rosso per la catena montuosa dell’Atlante) più i siti delle sequenze di confronto scelte. Il punto interrogativo indica una possibile popolazione estinta. In grigio l’areale di <i>E. orbicularis</i> incluso <i>E. trinacris</i>	22
Figura 6 - Siti di campionamento siciliani e calabri. Quattro siti in Sicilia, tra Palermo Messina, Agrigento e Ragusa, più due in Calabria a Vibo Valentia e nella Piana di Sant’Eufemia.....	26
Figura 7 – Codice univoco per l’identificazione degli individui campionati attraverso la scalfittura delle placche marginali: e.g. 3 sinistra – 4 sinistra, individuo 12343, Diga Gorgo (Montallegro, Ag).....	28
Figura 8 – Albero di ML costruito in seguito all’analisi di 83 sequenze concatenate di 1802 bp dei due geni mitocondriali <i>cytb</i> e d-loop di <i>Mauremys leprosa</i> . I numeri sopra i nodi sono relativi ai valori di <i>bootstrap</i> maggiori a 50; i numeri sotto i nodi sono presenti quando la probabilità <i>a posteriori</i> a supporto del nodo stesso è superiore a 0,95. Clade (i) rosso; Clade (ii) arancio; Clade (iii) toni del blu. →.....	37
Figura 9 – Network di parsimonia per gli aplotipi mitocondriali di <i>Emys orbicularis</i> e <i>E. trinacris</i> basato sul marcatore <i>cyt b</i> (1031 bp) di 1596 campioni. La dimensione dei cerchi è funzione della frequenza degli aplotipi. I cerchi neri indicano gli aplotipi mancanti e ciascuna linea di connessione tra gli aplotipi corrisponde a uno <i>step</i> mutazionale.....	39
Figura 10 – Albero di massima verosimiglianza basato sull’analisi di 3468 bp di DNA mitocondriale di <i>Emys orbicularis</i> e <i>E. trinacris</i> . I numeri sopra i nodi sono relativi ai valori di <i>bootstrap</i> maggiori a 50; i numeri sotto i nodi sono presenti quando la probabilità <i>a posteriori</i> a supporto del nodo stesso è superiore a 0,95. Gli <i>outgroups</i> sono stati rimossi per rendere l’immagine più chiara in quanto il pattern di ramificazione corrispondeva alle aspettative. La nomenclatura degli aplotipi segue Lenk et al. (1999) e Fritz et al. (2005b, 2007, 2009).....	41
Figura 11 – Plot degli <i>scores</i> delle variabili analizzate (misure e indici morfometrici) in relazione ai siti di campionamento sugli assi delle prime due componenti principali. L’ellisse rappresenta l’area della probabilità al 95% (N = Nebrodi; M = Montallegro; F = Ficuzza; I = Ispica; C = Calabria).....	44
Figura 12 – Plot degli <i>scores</i> dei siti di campionamento di <i>E. trinacris</i> e <i>E. orbicularis</i> sugli assi dei due primi fattori della <i>Discriminant Analysis</i> e le ellissi della probabilità al 95% (Blu = Nebrodi; Rosso = Montallegro; Verde = Ficuzza; Rosa = Ispica; Nero = Calabria).....	45
Figura 13 – Network di parsimonia per gli aplotipi mitocondriali di <i>Emys orbicularis</i> e <i>E. trinacris</i> basato sul marcatore <i>cyt b</i> . La dimensione dei cerchi è funzione della frequenza degli aplotipi. I cerchi neri indicano gli aplotipi mancanti, i bianchi gli aplotipi già conosciuti e ,in ultimo, quelli colorati sono gli aplotipi rappresentati nei siti campionati.....	49

- Figura 14 – Albero di massima verosimiglianza basato sull'analisi di *cytb* *Emys orbicularis* e *E. trinacris*. I numeri sopra i nodi sono relativi ai valori di *bootstrap* maggiori a 50; i numeri sotto i nodi sono presenti quando la probabilità *a posteriori* a supporto del nodo stesso è superiore a 0,70. 51
- Figura 15 – Grafico dei clusters ottenuti con STRUCTURE (K=5). Ciascun segmento è relativo ad un individuo analizzato. I colori verde, giallo, blu e rosa sono tipici di *E. trinacris* mentre il rosso di *E. orbicularis* → 52
- Figura 16 – Albero di massima verosimiglianza basato sull'analisi di COI delle sanguisughe trovate su *Emys orbicularis* e *E. trinacris*. I numeri sopra i nodi sono relativi ai valori di *bootstrap* maggiori a 70; i numeri sotto i nodi sono presenti quando la probabilità *a posteriori* a supporto del nodo stesso è superiore a 0,90..... 54

1. INTRODUZIONE

1.1 Gli studi filogeografici

La filogeografia ha lo scopo di indagare i rapporti filogenetici intercorrenti, nello spazio e nel tempo, tra taxa di basso rango tassonomico (Avice, 2000, 2004). Utilizzando metodologie molecolari, la filogeografia collega la genetica delle popolazioni alla biogeografia (Joger *et al.*, 2007).

I classici modelli biogeografici sulla differenziazione delle specie faunistiche in Europa hanno come postulato una relazione causale tra la speciazione e le fluttuazioni climatiche del Pleistocene. Secondo questa ipotesi, nei periodi freddi (le glaciazioni) le specie termofile sarebbero state confinate in aree di rifugio con temperature più miti, come, ad esempio, la Regione Mediterranea o la Regione Ponto-Caspica: piccoli ed isolati rifugi in cui le nuove mutazioni si sarebbero accumulate. Durante i periodi più caldi, definiti interglaciali, alcune delle specie differenziate avrebbero potuto ri-colonizzare le aree precedentemente inabitabili formando talvolta zone ibride o di contatto (Taberlet *et al.*, 1998).

Le metodologie molecolari forniscono gli strumenti in grado di verificare, ad esempio, l'ipotesi che i marcatori genetici, come le sequenze di geni mitocondriali, si siano apparentemente evoluti con un tasso medio più o meno costante su specie diverse, ma ecologicamente simili, occupanti una stessa area. In altre parole, il *pattern* di differenziazione filogeografica potrebbe essere simile in specie diverse, che appartengono allo stesso gruppo ecologico (Joger *et al.*, 2007).

In generale i rettili ed, in particolare, le tartarughe palustri sono dei buoni organismi indicatori dei *pattern* filogeografici: la loro moderata mobilità fa sì che le connessioni tra le popolazioni siano fortemente condizionate dalle barriere geografiche e, quindi, dalla storia paleogeografica delle aree abitate.

A questo proposito, lo studio parallelo di *Mauremys leprosa* e *Emys trinacris* è un'opportunità di confronto tra i *patterns* filogeografici e i *patterns* di diversità di due specie di tartarughe palustri, presenti in area mediterranea con popolazione autoctone.

Le zone di contatto tra taxa distinti sono di particolare interesse per la biologia evolutiva poiché rappresentano dei laboratori naturali per lo studio dei meccanismi di ibridazione o isolamento tra specie distinte (Barton e Hewitt, 1989).

Le zone ibride, quindi possono essere intese come finestre sul processo evolutivo (Harrison, 1990) che permettono di esplorare il funzionamento delle forze evolutive, la natura delle barriere geniche e le cause responsabili (Harrison, 1993).

Tra i vertebrati europei ci sono due casi considerati “modello” per lo studio delle zone di contatto: la zona ibrida dei topi domestici (*Mus m. musculus* x *M. m. domesticus*; e.g. Gyllensten e Wilson, 1987; Prager *et al.*, 1993; Božíková *et al.*, 2005; Ďureje *et al.*, 2012) e la zona ibrida dei rospi dal ventre di fuoco (*Bombina bombina* x *B. variegata*; e.g. Szymura e Barton 1986, 1991; Yanchukov *et al.*, 2006; Hofmann e Szymura, 2007).

La tartaruga palustre europea *Emys orbicularis* ha il potenziale per diventare un'altra specie modello per questa regione, poiché la sua filogeografia è stata ben studiata negli ultimi due decenni (Lenk, 1999; Fritz *et al.*, 2004, 2005b, 2006a, 2009; Sommer *et al.*, 2009; Pedall *et al.*, 2011; Velo-Antón *et al.*, 2007, 2008, 2011; Prusak *et al.*, 2013; Stuckas *et al.*, 2014).

Rispetto alle classiche specie modello, la tartaruga palustre europea ha il vantaggio di comprendere molte linee genetiche distinte che rappresentano diversi stadi di differenziazione. Nel suo vasto areale, *E. orbicularis* presenta nove linee genetiche distinte, la cui distribuzione, a grandi linee, trova un buon riscontro nei paradigmi biogeografici classici del Palearctico occidentale (Hewitt, 2000; Schmitt, 2007). Sono state individuate diverse zone di contatto tra le sue linee genetiche (Lenk *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 2005b, 2007, 2009; Pedall *et al.*, 2011): tra esse, l'area meridionale italiana è di particolare interesse.

L'Italia meridionale è una regione in cui due diverse linee genetiche di *E. orbicularis* si incontrano e si ibridano: le sottospecie *E. o. galloitalica* e *E. o. hellenica* (Fritz *et al.*, 2005b; Pedall *et al.*, 2011). Inoltre, nelle immediate vicinanze, è presente la specie congenerica *E. trinacris*, separata da *E. orbicularis* dai soli 3 km di larghezza dello stretto di Messina. Se si considera che lo Stretto di Gibilterra, ampio circa 15 km, non ostacola in nessun modo significativo il flusso genico tra le popolazioni marocchine e quelle spagnole di *E. o. occidentalis* (Stuckas *et al.*, 2014), ci si potrebbe aspettare che qualche scambio genetico si verifichi anche tra le popolazioni siciliane e calabre.

Contrariamente a questa aspettativa, Pedall *et al.* (2011) non hanno evidenziato alcuno scambio genetico tra le tartarughe palustri siciliane e quelle dell'adiacente Calabria. Tuttavia, questo studio è basato su un campione di piccole dimensioni e su informazioni provenienti da otto loci microsatelliti e un gene mitocondriale (citocromo b), ragion per cui per cui necessita di ulteriori approfondimenti.

1.2 La Tartaruga palustre iberica, *Mauremys leprosa*

La Tartaruga palustre iberica, *Mauremys leprosa* (Schweigger, 1812) (Figura 1), è una delle sette specie di tartarughe d'acqua dolce autoctone del Paleartico occidentale, largamente distribuita su entrambi i lati dello Stretto di Gibilterra: è presente su gran parte della Penisola Iberica e in Maghreb, dalla Tunisia al Marocco. La sua distribuzione, in quest'ultima regione, è fortemente influenzata dalla catena montuosa dell'Atlante, la quale presenta quote superiori ai 4165 m (Fritz *et al.*, 2006a).



Figura 1 - Esemplare adulto di *Mauremys leprosa*.

Lo stretto di Gibilterra è stato da sempre considerato un'importante barriera biogeografica tra l'erpetofauna nordafricana e quella iberica. Tuttavia, studi molecolari condotti da Fritz *et al.* (2005a) hanno mostrato come, per questa specie, la catena dell'Atlante sembri costituire una barriera biogeografica più importante dello stretto stesso.

Le sequenze del gene mitocondriale per il citocromo b (*cytb*), utilizzato come marcatore genetico, sono risultate identiche - o comunque molto simili - tra gli individui di *Mauremys* che vivono su entrambi i lati dello stretto di Gibilterra (*Mauremys leprosa leprosa*), mentre è stata riscontrata una forte differenziazione nei campioni di DNA provenienti dalle tartarughe presenti a sud dei monti Atlante. Per il solo Marocco, sono state descritte sette sottospecie: *M. l. atlantica*, *M. l. erhardi* e *M. l. wernerkaestlei* a nord dei monti Atlante; *M. l. marokkensis*

nella regione di Marrakech; mentre a sud *M. l. saharica* (Oued Noun), *M. l. zizi* (Oued Ziz) e *M. l. vanmeerhaghei* (Oued Drâa). Ad eccezione di quest'ultima, i cui individui presentano la colorazione blu dell'iride, tutte le altre sottospecie differiscono solo nel pattern di colorazione degli individui giovanili, per cui è impossibile distinguere gli adulti se non attraverso tecniche molecolari.

La vicinanza genetica delle popolazioni di *M. leprosa* presenti ai due lati dello stretto di Gibilterra (p-distance = 0,3%, Fritz *et al.*, 2005a) potrebbe essere attribuita alla crisi di salinità del Messiniano (tardo Miocene, circa 5 My, Duggen *et al.*, 2003) ed ai bassi tassi evolutivi del mtDNA che sembrano caratterizzare i testudinati (0,25%/Myr invece del 2%/Myr dei vertebrati in generale; Avise *et al.*, 1992).

I pochi campioni di *M. leprosa* provenienti dalla Tunisia e dall'Algeria orientale, analizzati fino a oggi (n=3, Fritz *et al.*, 2006a) presentano aplotipi vicini a quelli riscontrati a sud della catena montuosa dell'Atlante: ciò suggerirebbe un'origine delle popolazioni più orientali del Maghreb dalle regioni a sud della catena dell'Atlante.

È sembrato, quindi, opportuno incrementare il numero di campioni provenienti dalla Tunisia e dall'Algeria, al fine di ottenere un quadro più accurato della distribuzione dei diversi aplotipi di *Mauremys leprosa* in Maghreb e dei flussi genici storici ed attuali tra le sue popolazioni e delle barriere o dei filtri biogeografici che li sottendono.

Questa specie, infatti, potrebbe rappresentare un valido modello o “*case-study*” per lo studio dell'impatto degli stretti marini e delle catene montuose sulla struttura genetica delle tartarughe d'acqua dolce.

1.3 La Tartaruga palustre europea, *Emys spp.*

Emys orbicularis (Linnaeus, 1758), la tartaruga palustre europea, è una specie con una vasta distribuzione paleartica, essendo diffusa dalla penisola balcanica all'Anatolia, dal nord Africa alla Penisola Iberica ed inoltre, in Francia, Italia, Ungheria, Polonia e Lituania.

La filogeografia di questa tartaruga palustre europea è stata ampiamente studiata in tutto il suo areale (Fritz, 1998; Lenk *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 2005b, 2006b, 2007, 2009, 2011; Sommer *et al.*, 2007, 2009; Velo-Antón *et al.*, 2011; Pedall *et al.*, 2011).

Tuttavia rimangono delle aree di difficile accesso, in cui è riportata la presenza ma le conoscenze biologiche e tassonomiche sono scarsissime. Tale è, senza dubbio, il caso del Nord Africa, in cui la specie sembra essere in uno stato critico di conservazione con piccole e isolate popolazioni in Marocco, Tunisia e Algeria (Fahd *et al.*, 2009).

Le popolazioni dell'area orientale del Maghreb, infatti, risultano scarsamente esplorate, per cui, attualmente sono disponibili pochissimi dati filogenetici che necessitano di essere integrati.

In letteratura, sono presenti soltanto quattro sequenze del gene mitocondriale *cyt b*, relative ad altrettanti individui campionati in Nord Africa: di queste tre provengono dai monti del Rif e uno dalla catena montuosa dell'Atlante, dunque tutti dal solo Marocco (Lenk *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 2007). Gli aplotipi delle testuggini palustri marocchine sembrano essere simili a quelli considerati endemici di Spagna e Portogallo, mentre questi ultimi, secondo le analisi filogenetiche deriverebbero, invece, dagli aplotipi nord-africani: questo scenario prevede che *E. orbicularis* abbia colonizzato la Penisola Iberica dal nord Africa, entrando in contrasto con la teoria tradizionale secondo la quale la tartaruga palustre europea sarebbe un recente colonizzatore dell'area magrebina.

Una raccolta di campioni da quest'area che includa anche le popolazioni tunisine ed algerine ancora inesplorate rappresenta una delle priorità per sciogliere i nodi irrisolti della filogeografia della specie in questione.

Sino a tempi recenti, il genere *Emys* era considerato monospecifico; tuttavia, in Sicilia, è stata recentemente descritta (Fritz *et al.*, 2005b) una nuova specie, *Emys trinacris* (Figura 2): lo studio sulla distribuzione geografica delle linee evolutive individuate sulla base del DNA mitocondriale, all'interno di popolazioni del genere *Emys* rivela che il flusso genico tra le Tartarughe palustri siciliane e le popolazioni presenti sulla penisola italiana è del tutto assente (Fritz *et al.*, 2006b).

Emys trinacris è, talvolta, considerata una specie criptica poichè risulta difficile trovare caratteri morfologici che la distinguano dalla congenerica europea: rispetto alla sottospecie più meridionale di *Emys orbicularis* s.l., *Emys orbicularis galloitalica*, gli esemplari siciliani presentano gli stessi pattern di colorazione del carapace e del piastrone, raggiungono le stesse dimensioni ed i maschi, a volte, mostrano una colorazione dell'iride rossa o bianca. Tuttavia, l'isolamento riproduttivo da *E. trinacris* è stato confermato attraverso *fingerprinting* genomico (Fritz *et al.*, 2005b).

Una differenziazione fenotipica esiste esclusivamente per i giovanili che, in *E. trinacris*, presentano una colorazione ventrale più chiara e con motivi differenti (Fritz *et al.*, 2006b).

La specie siciliana è presente con una distribuzione non uniforme sul territorio regionale dell'isola. Fritz *et al.* (2006b) hanno riscontrato, per il gene mitocondriale *cytb*, 4 differenti aplotipi che la caratterizzano.

Due singoli individui, uno campionato a Mistretta (Me) e l'altro proveniente dal fiume Neto, in Calabria, hanno mostrato aplotipi simili rispettivamente ad *E. o. galloitalica* e ad *E. trinacris*, probabilmente in seguito ad immissione da parte dell'uomo (Fritz et al., 2005b, 2006b).



Figura 2 – Esemplare adulto di *Emys trinacris*.

Attualmente, i campioni di *E. trinacris* per i quali esistono dati pubblicati, provengono soprattutto dalle province di Agrigento e Trapani; per le province di Catania, Enna, Messina, Ragusa e Siracusa, invece, sono disponibili soltanto singoli individui. Non è presente alcun campione proveniente dalla provincia di Palermo.

Appare, quindi, opportuno definire la diversità genetica della specie in relazione alla sua distribuzione geografica, includendo nelle analisi individui provenienti da popolazioni naturali presenti in aree attualmente sottocampionate. Un altro aspetto da approfondire è quello legato alle variazioni morfologiche intraspecifiche: le uniche informazioni disponibili in letteratura si riferiscono alle popolazioni studiate anche in ambito molecolare.

Fritz *et al.* (2004, 2006b) e Zuffi *et al.* (2006) hanno riscontrato delle differenze significative nelle dimensioni tra gli adulti: in particolare, Fritz *et al.* (2006b) riportano che la popolazione di *E. trinacris* di Torre Salsa (Ag) è composta da individui con dimensioni più grandi rispetto a quelli del Lago Preola (Tp), benché entrambe siano geneticamente e

geograficamente vicine. Anche il pattern di colorazione del carapace è un carattere che presenta un elevato polimorfismo, persino all'interno della stessa popolazione (Fritz *et al.*, 2006b). È necessario, pertanto, integrare i dati già disponibili con nuovi record provenienti dalle altre popolazioni siciliane.

La IUCN, in assenza di dati certi sullo stato di conservazione, assegna alla testuggine palustre siciliana lo stesso grado di vulnerabilità della congenerica europea: in pericolo. La causa che potrebbe portare al declino delle popolazioni di *E. trinacris* è principalmente la distruzione degli habitat idonei. Corti *et al.* (2010) riportano dei dati di densità, appartenenti ad una sola località siciliana, che risultano avere una media di 23,8 ind/ha di superficie d'acqua. Per gli stessi autori, sebbene non siano presenti dati a lungo termine, la specie sarebbe in rarefazione.

La campagna di campionamento effettuata per approfondire le conoscenze della diversità genetica di questa specie ha rappresentato un'ottima opportunità per ottenere delle informazioni utili alla definizione dello stato di conservazione e, dunque, spendibili anche nell'elaborazione di corretti piani di gestione degli ambienti in cui la specie è presente.

Un ultimo aspetto che è stato preso in considerazione è la presenza o meno di parassiti ematofagi talvolta rinvenuti negli individui campionati di *E. trinacris* e *E. orbicularis*.

È noto che *Placobdella costata* (Hirudinida, Glossiphoniidae, Müller, 1846) si nutre del sangue delle tartarughe d'acqua dolce (Sket e Trontelj, 2008; Bielecki *et al.*, 2012), oltre che di quello di alcuni uccelli e mammiferi (Sapkarev 1964).

Ad oggi *P. costata* è considerata l'unica sanguisuga del Paleartico a nutrirsi del sangue di rettili e principalmente di quello di *E. orbicularis*.

Secondo Siddall *et al.* (2005) il genere *Placobdella* è considerato un clade dell'America settentrionale, con l'unica eccezione rappresentata da *P. costata*, del cui areale fa parte anche l'Europa. Allo stesso modo, il genere *Emys* è considerato di origine americana e probabilmente si è distribuito nella regione paleartica durante il terziario (Siddall *et al.*, 2005). Reperti fossili e dati genetici suggerirebbero che *P. costata* sarebbe arrivata in Europa insieme ad *Emys* nel Miocene inferiore (Fritz, 1998; Lenk *et al.*, 1999).

Sembra pertanto molto interessante verificare un eventuale parallelismo nella filogenesi tra ospite e parassita, quindi in questo caso tra individui di *P. costata* ritrovati su *E. trinacris* e su *E. orbicularis*.

Attualmente, *P. costata* è ampiamente distribuito nell'area mediterranea europea, dalla Penisola Iberica a quella Balcanica e lungo le coste del Mar Nero (Bielecki *et al.*, 2012). Inoltre è anche presente dal Marocco all'Iran e nel Caucaso settentrionale (Saglam, 2001).

Il ciclo vitale di questa sanguisuga non è stato studiato approfonditamente. Di *P. costata* è noto che si riproduce in estate (Sawyer 1986), e sembra avere cure parentali (Bielecki et al., 2012): gli individui adulti provvedono agli embrioni e ai giovanili direttamente sull'ospite.

Le sanguisughe si trovano generalmente nelle parti più superficiali della zona litorale, caratterizzata da fitta vegetazione, dei laghi e degli stagni (Sapkarev 1964), dove probabilmente stazionano in attesa di potenziali ospiti.

Mentre altre specie di *Placobdella* sono state osservate alimentarsi dai vasi sanguigni del piastrone e dalle ossa del carapace delle tartarughe, (Siddall e Gaffney, 2004), gli individui di *P. costata* sono di solito attaccati a punti in cui la pelle è sottile e non protetta, come il collo e le regioni inguinali (Ayres e Alvarez, 2008; Bielecki et al., 2012). Attualmente l'unica eccezione è rappresentata da una segnalazione di un solo individuo trovato attaccato direttamente al carapace di una tartaruga palustre iberica, *M. leprosa*, catturata nel sud della Spagna da Romero et al. (2014).

1.4 Obiettivi della ricerca

Gli obiettivi previsti nell'ambito del presente progetto di dottorato, sono i seguenti:

- i. Incrementare il numero di campioni provenienti dalla Tunisia e dall'Algeria, al fine di ottenere un quadro chiaro della distribuzione degli aplotipi di *Mauremys leprosa* ed *Emys orbicularis* in Maghreb, dei flussi genici storici ed attuali tra le sue popolazioni e delle barriere biogeografiche che li regolano.
- ii. Approfondire il grado di conoscenza della biologia di popolazione di *E. trinacris* e delle dinamiche implicate.
- iii. Definire la diversità genetica di *Emys trinacris* in relazione alla sua distribuzione geografica, includendo campioni della provincia di Palermo ed incrementandone il numero nelle altre provincie siciliane.
- iv. Come nel caso della relazione tra *Mauremys leprosa* e lo stretto di Gibilterra, sarà importante verificare il ruolo dello stretto di Messina come barriera biogeografica attraverso campionamenti condotti nelle aree a sud del fiume Neto, in Calabria, dove è presente un aplotipo di *Emys orbicularis galloitalica* rinvenuto anche in un singolo campione della provincia di Messina (Fritz et al., 2006b).

2. MATERIALI E METODI

2.1 *Mauremys leprosa*

I campioni di tessuto o di sangue di 83 individui di *Mauremys leprosa*, raccolti in Maghreb (Tunisia, Algeria e Marocco) e nella penisola Iberica, sono stati utilizzati per lo studio di due geni del DNA mitocondriale: il citocromo b (*cytb*) ed il d-loop. Tutti i campioni provengono da una campagna di campionamenti, i cui siti sono riportati in **Tabella 1** e **Figura 3**.

Le tartarughe sono state catturate manualmente o attraverso l'utilizzo di nasse innescate (Figura 4). Le nasse sono state immerse in acqua con un sistema di galleggiamento, affinché almeno una parte delle trappole rimanesse emersa per garantire alle tartarughe, eventualmente catturate, la possibilità di tornare in superficie a respirare (Ream *et al.*, 1966). Le trappole sono state lasciate in pesca per un tempo variabile, tra le 3 e le 24 ore, a seconda delle differenti condizioni logistiche ed ambientali.



Figura 3 – Siti di campionamento europei e nord africani di *Mauremys leprosa*.

Tabella 1 Campioni di *M. leprosa* analizzati, relative aree di provenienza e coordinate geografiche.

Campione	Nazione	Area	Coordinate (WGS84)
FS4177	Tunisia	Oued Sidi Youssef (Aïn Draham)	36° 46.575'N, 8° 40.835'E
FS4178	Tunisia	Oued Ordha	36° 48.411'N, 8° 54.679'E
FS4179	Tunisia	Oued Sidi Youssef (Aïn Draham)	36° 46.575'N, 8° 40.835'E
FS4180	Tunisia	Oued Sidi Youssef (Aïn Draham)	36° 46.575'N, 8° 40.835'E
FS4181	Tunisia	Oued Ordha	36° 48.411'N, 8° 54.679'E
FS2455	Marocco	Béni Snassen near Algeria (north of Oujda)	34° 54.404'N, 2° 20.029'W
FS3249	Algeria	El Kala	36° 53.146'N, 8° 27.316'E
FS8419	Tunisia	Barrage Lebna	36° 44.421'N, 10° 55.346'E
FS8420	Tunisia	Barrage Lebna	36° 44.421'N, 10° 55.346'E
FS8421	Tunisia	Barrage Lebna	36° 44.421'N, 10° 55.346'E
FS8422	Tunisia	Barrage Lebna	36° 44.421'N, 10° 55.346'E
FS8423	Tunisia	Barrage Lebna	36° 44.421'N, 10° 55.346'E
FS8424	Tunisia	Barrage Lebna	36° 44.421'N, 10° 55.346'E
FS8425	Tunisia	Barrage Lebna	36° 44.421'N, 10° 55.346'E
FS8426	Tunisia	Barrage Lebna	36° 44.421'N, 10° 55.346'E
FS8427	Tunisia	Oued El Abid	36° 52.039'N, 10° 43.481'E
FS8428	Tunisia	Oued El Abid	36° 52.039'N, 10° 43.481'E
FS8429	Tunisia	Oued El Abid	36° 52.039'N, 10° 43.481'E
FS8430	Tunisia	Oued El Abid	36° 52.039'N, 10° 43.481'E
FS8431	Tunisia	Oued El Abid	36° 52.039'N, 10° 43.481'E
FS8432	Tunisia	Oued El Abid	36° 52.039'N, 10° 43.481'E
FS8433	Tunisia	Barrage El Abid	36° 48.643'N, 10° 41.956'E
FS8434	Tunisia	Oued Bzigh	36° 43.173'N, 10° 37.261'E
FS8435	Tunisia	Oued Bzigh	36° 43.173'N, 10° 37.261'E
FS8436	Tunisia	Oued Bzigh	36° 43.173'N, 10° 37.261'E
FS8437	Tunisia	Oued Bzigh	36° 43.173'N, 10° 37.261'E
FS8438	Tunisia	Oued Bzigh	36° 43.173'N, 10° 37.261'E
FS8439	Tunisia	Oued Bzigh	36° 43.173'N, 10° 37.261'E
FS8440	Tunisia	Oued Bzigh	36° 43.173'N, 10° 37.261'E
FS8441	Tunisia	Djebel Rmil	36° 35.604'N, 8° 38.379'E
FS8442	Tunisia	Djebel Rmil	36° 35.604'N, 8° 38.379'E
FS8443	Tunisia	Djebel Rmil	36° 35.604'N, 8° 38.379'E
FS8444	Tunisia	Djebel Rmil	36° 35.604'N, 8° 38.379'E
FS8445	Tunisia	Djebel Rmil	36° 35.604'N, 8° 38.379'E
FS8446	Tunisia	Oued Ghezala	36° 38.607'N, 8° 41.970'E
FS8447	Tunisia	Oued Ghezala	36° 38.607'N, 8° 41.970'E
FS8448	Tunisia	Oued Ghezala	36° 38.607'N, 8° 41.970'E
FS8449	Tunisia	Oued Ghezala	36° 38.607'N, 8° 41.970'E
FS8450	Tunisia	Oued Ghrib	36° 36.980'N, 8° 41.154'E
FS8451	Tunisia	Oued Ghrib	36° 36.980'N, 8° 41.154'E
FS8452	Tunisia	Oued Ghrib	36° 36.980'N, 8° 41.154'E
FS8453	Tunisia	Oued Ghrib	36° 36.980'N, 8° 41.154'E
FS8454	Tunisia	Oued Ghrib	36° 36.980'N, 8° 41.154'E
FS8455	Tunisia	Oued Bou Heurtma	36° 40.481'N, 8° 50.142'E
FS8456	Tunisia	Oued Sejenane	37° 7.243'N, 9° 15.787'E
FS8457	Tunisia	Oued Sejenane	37° 7.243'N, 9° 15.787'E
FS8458	Tunisia	Oued Sejenane	37° 7.243'N, 9° 15.787'E

FS8459	Tunisia	Oued Sejenane	37° 7.243'N, 9° 15.787'E
FS8460	Tunisia	Cap Serrat	37° 12.357'N, 9° 13.929'E
FS8461	Tunisia	Cap Serrat	37° 12.357'N, 9° 13.929'E
FS8462	Tunisia	Cap Serrat	37° 12.357'N, 9° 13.929'E
FS8463	Tunisia	Cap Serrat	37° 12.357'N, 9° 13.929'E
6869_Tan_Tan	Marocco	Tan Tan: Drâa river	28° 34.027'N, 11° 4.640'W
6876_Tata	Marocco	Tata: sidi El Mehdaoui	29° 35.506'N, 8° 00.009'W
764_26g_Marrakech_Cytb_A25	Marocco	Marrakech	31° 27.891'N, 7° 46.724'E
765_26g_Marrakech_Cytb_A25	Marocco	Marrakech	31° 27.891'N, 7° 46.724'E
770_33i_Ouarzazate_Cytb_B3	Marocco	Ouerzazate: Drâa river	30° 40.183'N, 6° 22.881'W
774_30i_Tata_Cytb_B3	Marocco	Tata: sidi El Mehdaoui	29° 35.506'N, 8° 00.009'W
780_29h_Guelmine_Cytb_B1	Marocco	Guelmim	30° 35.506'N, 8° 00.009'W
784_29h_Guelmine_Cytb_B1	Marocco	Guelmim	31° 35.506'N, 8° 00.009'W
785_28h_Tiliouine_Cytb_B1	Marocco	Tiliouine (Oued Assaka)	29° 5.115'N, 10° 15.140'W
1204_27h_Taroudannt_Cytb_B2	Marocco	Taroudannt: Oued Souss	30° 26.560'N, 8° 54.028'W
1205_23f_Asilah_Cytb_A16	Marocco	Asilah	35° 20.560'N, 6° 4.028'W
1206_23f_Asilah_Cytb_A16	Marocco	Asilah	35° 20.560'N, 6° 4.028'W
1207_23f_Asilah_Cytb_B5	Marocco	Asilah	35° 20.560'N, 6° 4.028'W
1210_24f_Chefchaouene_Cytb_A16	Marocco	Chefchaouene	35° 17.140'N, 5° 26.972'W
1211_25f_Chefchaouene_Cytb_A16	Marocco	Chefchaouene	35° 17.140'N, 5° 26.972'W
1213_21f_Ksar_es_Srhir_Cytb_A16	Marocco	Ksar es Srhir	35° 20.876'N, 5° 45.347'W
1217_12c_Cadiz_Cytb_A16	Spagna	Cadice	36° 8.837'N, 5° 41.880'W
1218_12c_Cadiz_Cytb_A16	Spagna	Cadice	36° 8.752'N, 5° 37.032'W
1222_36l_Annaba_Cytb_B6	Algeria	Annaba	36° 43.000'N, 7° 39.000'E
1299_20f_Ceuta_Cytb_A16	Spagna	Ceuta	35° 52.000'N, 5° 20.000'W
1360_38l_Hammamet_Cytb_B7	Tunisia	Hammamet	36° 24.063'N, 10° 34.538'E
1436_14d_Valencia_Cytb_A16	Spagna	Valenzia	38° 29.000'N, 0° 19.000'W
1571_19e_Gerona_Cytb_A18	Spagna	Girona	42° 22.692'N, 3° 1.800'E
1577_19e_Gerona_Cytb_A18	Spagna	Girona	42° 22.692'N, 3° 1.800'E
1584_6b_Vilamoura_Cytb_A16	Portogallo	Vilamoura	37° 05'N, 8° 10'W
1585_6b_Vilamoura_Cytb_A16	Portogallo	Vilamoura	37° 05'N, 8° 10'W
1587_2a_Castelo_Branco_Cytb_A19	Portogallo	Castelo Branco	39° 82'N, 7° 50'W
1597_1a_Vila_Flor_Cytb_A15	Spagna	La Vilaflor	39° 13'N, 7° 15'W
1908_34k_Ksar_es_Souk_Cytb_B4	Marocco	Aoufouss: Oued Ziz	31° 40.946'N, 4° 11.008'W
1909_34k_Ksar_es_Souk_Cytb_B4	Marocco	Aoufouss: Oued Ziz	31° 40.946'N, 4° 11.008'W
773_31i_Tissint_Cytb_B3	Marocco	Tissint	29° 51.134'N, 7° 15.323'W

Alle tartarughe catturate è stato asportato del tessuto dalla parte terminale della coda (*tail clip*) o estratto il sangue da un vaso posto al di sotto della piastra nucale.

Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il kit di estrazione innuPREP per tessuto e sangue, prodotto da Analytik Jena (Germania).



Figura 4 - Le nasse sono state immerse in acqua con un sistema di galleggiamento e sono rimaste in pesca per un tempo variabile, tra le 3 e le 24 ore.

L'amplificazione del gene mitocondriale *cytb* è stata effettuata attraverso l'utilizzo dei seguenti primers: Cytb-G (forward, 5'-AAC CAT CGT TGT WAT CAA CTA C-3') di Spinks *et al.* (2004), H-1509 (reverse, 5'-AGG GTG GAG TCT TCA GTT TTT GGT TTA CAA GAC CAA TG-3'), Ri-neu (reverse, 5'- GTG AAG TTG TCT GGG TCT CCT AG-3') di Fritz *et al.* (2006a), Mt-C2 (forward, 5'-TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GG-3') e Mt-E-rev2 (reverse 5'-GCR AAT ARR AAG TAT CAT TCT GG-3') come riportato in Fritz *et al.* (2006c). *Cytb* è stato amplificato in uno o due frammenti (un frammento: Cytb-G + H-1509; due frammenti: Cytb-G + Mt-E-rev2/Ri-neu e Mt-C2 + H-1509), mentre per il sequenziamento del gene amplificato sono stati utilizzati i primers Mt-C2 e Mt-E-rev2 o Ri-neu (**Tabella 2**).

L'amplificazione del d-loop è stata condotta utilizzando degli oligonucleotidi specifici, disegnati con il software OLIGOEXPLORER 1.2 (<http://www.genelink.com/tools/gloe.asp>): MauMut_tThr.for (forward, 5'- ACT CTA GTA GCT TAA CCC AT-3') e MauMut_Dloop_2.rev (reverse, 5'- TCA GTT TAG TTG CTC TCG GA-3'), utilizzato anche come primer per il sequenziamento (**Tabella 2**).

Tabella 2 Primers utilizzati per l'amplificazione e il sequenziamento (*) dei marcatori mitocondriali di *Mauremys leprosa*

mtDNA fragment	Primer (5' to 3')	Direction	Reference
cyt <i>b</i>	CytbG AAC CAT CGT TGT WAT CAA CTA C*	forward	Spinks et al. (2004)
	H-1509 AGG GTG GAG TCT TCA GTT TTT GGT TTA CAA GAC CAA TG*	reverse	Fritz et al. (2006c)
	mt-C-For2 TGA GGV CAR ATA TCA TTY TGA G *	forward	Fritz et al. (2006c)
	Ri-neu GTG AAG TTG TCT GGG TCT CCT AG*	reverse	Fritz et al. (2006c)
	Mt-E-rev2 GCR AAT ARR AAG TAT CAT TCT GG*	reverse	Fritz et al. (2006c)
D-loop	MauMut_tThr.for ACT CTA GTA GCT TAA CCC AT	forward	/
	MauMut_Dloop_2.rev TCA GTT TAG TTG CTC TCG GA*	reverse	/

Tabella 3 Condizioni di amplificazione dei marcatori mitocondriali di *Mauremys leprosa*

mtDNA fragment	Initial denaturing	Number of cycles	Denaturing	Annealing	Extension	Final extension
cyt <i>b</i> (all primer combinations)	95°C, 5 min	40	95°C, 30 s	50°C, 30 s	72°C, 90 s	72°C, 10 min
D-loop	95°C, 5 min	35	94°C, 30 s	50-59°C, 30 s	72°C, 60 s	72°C, 10 min

Le PCR condotte per l'amplificazione del *cytb* avevano i seguenti profili: *hot start* a 95° C per 5 min, 40 cicli di 95° C (30 s), 50° C (30 s), 72° C (1,5 min), con uno stadio finale a 72° C per 10 min (**Tabella 3**).

Per l'amplificazione del d-loop, invece, le PCR sono state impostate con le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 95° C per 5 min, 35 cicli di 95° C (30 s), 59-50° C (30 s), 72° C (1 min) ed un'estensione finale a 72° C per 10 min (**Tabella 3**).

Tutte le PCR sono state condotte utilizzando 1–2 µl di DNA in 20 µl di soluzione, così composta: 1 µl di ciascun primer alla concentrazione di 10 pmol, 1 µl of dNTP-mix alla concentrazione di 10 pmol, 1 unità di Taq polimerasi (Bioron DFS Taq, Ludwigshafen, Germania), 2 µl PCR buffer + MgCl₂ 10x ed H₂O ultra pura.

I prodotti della PCR sono stati purificati enzimaticamente utilizzando, in ordine, ExoSAP-IT (USB Europe GmbH, Staufen, Germania) diluito 1:20 e, successivamente, mediante precipitazione con Sephadex (GE Healthcare, Monaco, Germania).

L'amplificazione pre-sequenziamento è stata condotta utilizzando 2 µl di buffer di sequenziamento, 1 µl di premix, 1 µl di *primer* 5pmol, 1–6 µl di DNA stampo e H₂O ultra pura per un volume totale di reazione di 10 µl con 25–30 cicli di 96°C per 10 s, 50°C per 5 s e 60°C per 4 min utilizzando l' ABI PRISM Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tutti i frammenti di DNA amplificato sono stati sequenziati in una direzione con il sequenziatore ABI 3130xl *sequencer* (Applied Biosystems). I campioni, le cui sequenze sono risultate di scarsa qualità, sono stati risequenziati utilizzando il *primer* complementare.

Tutte le sequenze ottenute sono state allineate con il *software* BIOEDIT 7.0.5.2 (Hall, 1999). Dall'unione delle sequenze dei due geni mitocondriali (*cytb* + d-loop) è stato ottenuto, per ogni campione di *M. leprosa*, un frammento di 1802 bp: 934 per il *cytb* e 868 per il d-loop.

Il miglior modello evoluzionistico, per i due marcatori mitocondriali, è stato determinato utilizzando il programma JMODELTEST 0.1.1 (Posada, 2008) ed il Criterio di Informazione Bayesiano (BIC;): sia le sequenze del *cytb* che del d-loop seguono il modello General Time Reversible, GTR.

Per le analisi filogenetiche è stato utilizzato PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) tramite la sua interfaccia online (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>), per produrre un albero secondo il metodo della Massima Verosimiglianza (ML). Per un ottenere un quadro più preciso della filogeografia di questa specie nell'area di studio, l'analisi di ML è stata

confrontata con quella bayesiana (MrBAYES 3.2.1; Ronquist *et al.*, 2012). Le analisi filogenetiche bayesiane sono state eseguite producendo 4.000.000 di generazioni, con un campionamento ogni 100 generazioni al fine di raggiungere una frequenza split inferiore allo 0,05. I parametri di calcolo sono stati analizzati utilizzando un burn-in di 10.000 generazioni.

Gli alberi ottenuti sono stati radicati con le sequenze mitocondriali di una specie appartenente ad un genere vicino a *Mauremys*, i.e. *Cuora aurocapitata* (AY874540, Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) ed, in più, sono state aggiunte le sequenze di due altre specie appartenenti al genere *Mauremys*: *M. rivulata* e *M. caspica*.

Infine le sequenze ottenute sono state utilizzate per il calcolo degli indici di diversità (diversità aplo-tipica h , diversità nucleotidica π , numero di siti polimorfici S) e di espansione demografica (D di Tajima e F_{ST} di Fu) delle popolazioni di *M. leprosa* campionate. (DNASP 5.10.1; Librado e Rozas, 2009).

L'analisi della varianza molecolare AMOVA è stata utilizzata per valutare statisticamente le eventuali distanze esistenti tra le queste popolazioni (ARLEQUIN 3.0; Excoffier *et al.*, 2006); in particolare le sequenze sono state suddivise per macro aree di appartenenza ottenendo così 5 gruppi distinti: Tunisia e Algeria, Marocco settentrionale, l'area di Marrakech, Marocco meridionale e Penisola Iberica.

2.2 *Emys orbicularis* s.l.

Emys orbicularis

In seguito ad una campagna di campionamento di *E. orbicularis* in nord Africa, è stato possibile ottenere il tessuto di 45 individui di testuggine palustre. Per la prima volta, sono disponibili campioni dell'area centro orientale del Maghreb, in particolare dell'Algeria (n=14) e della Tunisia (n=8). A questi, si aggiungono 23 individui campionati in Marocco (**Figura 5**).

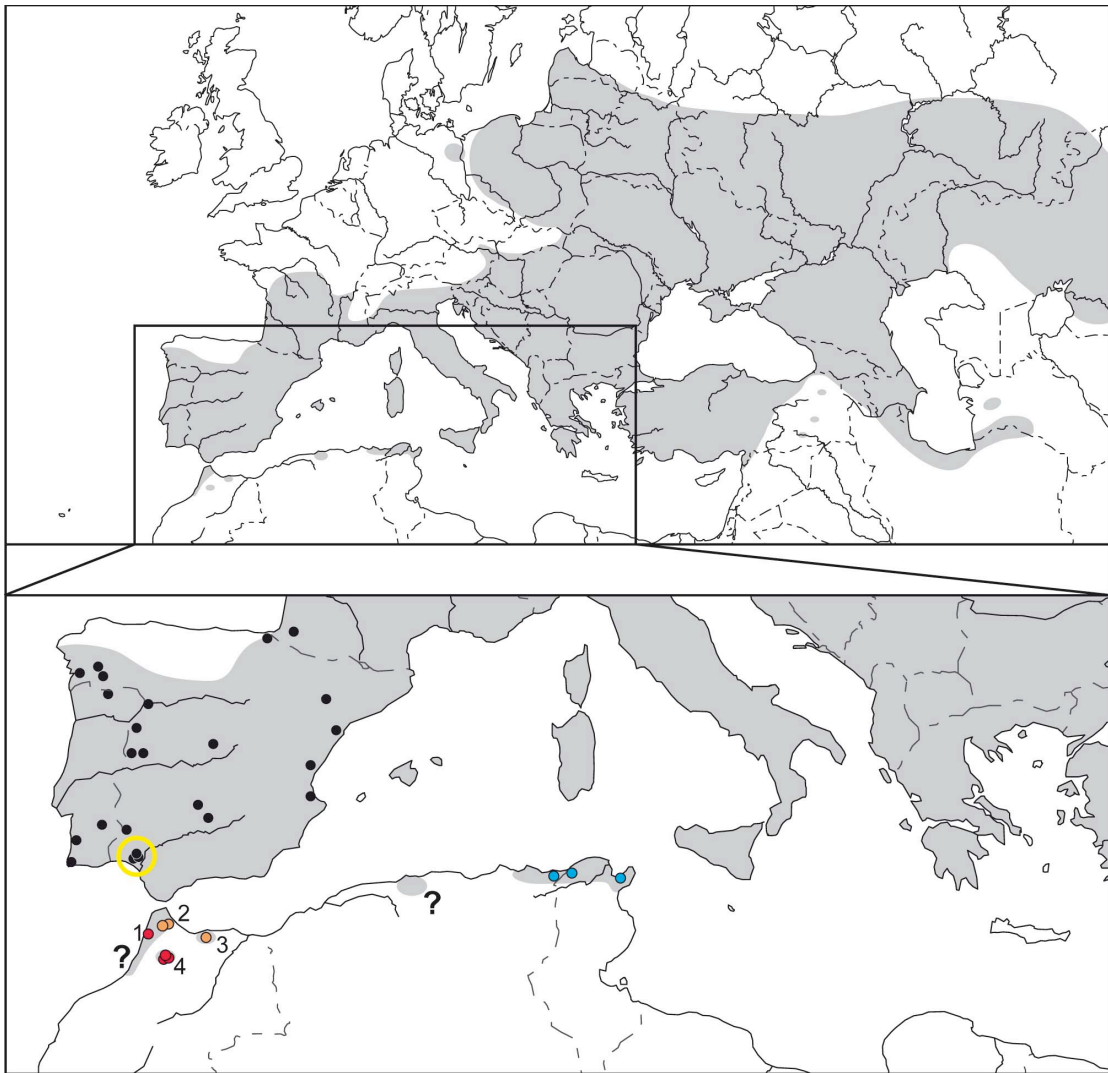


Figura 5 – Siti di campionamento di *Emys orbicularis* in Tunisia (blu), Algeria (blu) e Marocco (arancio per i Monti Rif, rosso per la catena montuosa dell'Atlante) più i siti delle sequenze di confronto scelte. Il punto interrogativo indica una possibile popolazione estinta. In grigio l'areale di *E. orbicularis* incluso *E. trinacris*.

Il DNA totale è stato estratto dai campioni di tessuto utilizzando differenti metodi di estrazione: proteinasi K e fenol-cloroformio (Sambrook e Russell, 2001), metodo DTAB (Gustincich *et al.*, 1991) e il kit innuPREP prodotto da Analytik Jena (Germania).

Lo studio della filogenesi è stato condotto attraverso cinque differenti frammenti del DNA mitocondriale amplificati tramite PCR: 12s, 16s, *cyt b*, D-loop e ND4. Le coppie di primers utilizzati e le condizioni di amplificazione sono riportate rispettivamente in Tabella 4 e Tabella 5. I prodotti amplificati sono stati sequenziati mediante ABI PRISM Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e le sequenze allineate con il *software* BIOEDIT 7.2.5 (Hall, 1999).

Gli studi precedenti sulla filogeografia della testuggine palustre europea sono basati sulle variazioni del *cyt b*, per cui, per confrontare i dati ottenuti dai 45 campioni nord africani con le sequenze già disponibili di Fritz *et al.* (2009) e Velo-Antón *et al.* (2011), è stato calcolato un network di aplotipi (TCS 1.21: Clement *et al.*, 2000), utilizzando solo questo marcatore (n tot=1596 sequenze).

Le relazioni filogenetiche tra i campioni nord africani sono state studiate concatenando le sequenze dei marcatori scelti ottenendo, così, un frammento totale di 3468 bp di lunghezza: 12s (394 bp), 16s (533 bp), D-loop (645 bp), *cyt b* (1031 bp), ND4+tRNAs (815 bp). Nelle analisi sono state aggiunte sequenze di tutti gli aplotipi rappresentativi di *E. orbicularis* ed *E. trinacris*. Come *outgroups*, son state utilizzate le sequenze, presenti su Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), del genere *Glyptemys*, anch'esso appartenente alla famiglia Emydidae.

Prima di procedere nell'inferenza filogenetica, è stato determinato il miglior partizionamento della sequenza concatenata (BIC; Li *et al.*, 2008) e stabilito il miglior modello evolutivo per ciascuna partizione (JMODELTEST 0.1.1; Posada, 2008) (**Tabella 6**). L'analisi di massima verosimiglianza (ML, 1000 repliche di bootstrap) è stata eseguita utilizzando RAxML 7.2.6 (Stamatakis, 2006) a cui è stata affiancata quella bayesiana (10.000.000 di generazioni, burn in = 2.500.000, MrBAYES 3.2.3; Ronquist *et al.*, 2012) per una migliore comprensione dei rapporti filogenetici.

Tabella 4 - Primers utilizzati per l'amplificazione e il sequenziamento (*) dei marcatori mitocondriali di *Emys orbicularis* ed *E. trinacris*.

mtDNA fragment	Primer (5' to 3')	Direction	Reference
12S	L1091 AAA AAG CTT CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT *	forward	Kocher et al. (1989)
	H1478 TGA CTG CAG AGG GTG ACG GGC GGT GTG T	reverse	Kocher et al. (1989)
16S	16sar-L CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT *	forward	Palumbi et al. (2002)
	16sbr-H CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	reverse	Palumbi et al. (2002)
cyt <i>b</i>	CytbG AAC CAT CGT TGT WAT CAA CTA C	forward	Spinks et al. (2004)
	mt-E-Rev2 GCR AAT ARR AAG TAT CAT TCT GG *	reverse	Fritz et al. (2006c)
	mt-C-For2 TGA GGV CAR ATA TCA TTY TGA G *	forward	Fritz et al. (2006c)
	mt-f-na AGG GTG GAG TCT TCA GTT TTT GGT TTA CAA GAC CAA TG	reverse	Fritz et al. (2006c)
D-loop	DES-1 GCA TTC ATC TAT TTT CCG TTA GCA *	forward	Starkey et al. (2003)
	DES-2 GGA TTT AGG GGT TTG ACG AGA AT	reverse	Starkey et al. (2003)
ND4 + tRNAs	H-Leu ATT ACT TTT ACT TGG ATT TGC ACC A *	forward	Stuart and Parham (2004)
	ND4 672 TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC *	reverse	Engstrom et al. (2004)

Tabella 5 Condizioni di amplificazione dei marcatori mitocondriali di *E. orbicularis* ed *E. trinacris*

mtDNA fragment	Initial denaturing	Number of cycles	Denaturing	Annealing	Extension	Final extension
12S	94°C, 3 min	35	94°C, 30 s	50°C, 45 s	72°C, 45 s	72°C, 10 min
16S	94°C, 1.5 min	35	94°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 90 s	72°C, 5 min
cyt <i>b</i> (all primer combinations)	95°C, 5 min	35	95°C, 45 s	58°C, 45 s	72°C, 90 s	72°C, 11 min
D-loop	94°C, 5 min	35	94°C, 45 s	54°C, 45 s	72°C, 60 s	72°C, 10 min
ND4 + tRNAs	94°C, 5 min	35	94°C, 45 s	54°C, 30 s	72°C, 60 s	72°C, 10 min

Tabella 6 Migliori modelli evolutivi selezionati, sia senza partizione che per ciascun segmento. Nst: Number of substitution types, +G: gamma correction, +I: correction for points of invariance, Y: yes, N: no

Partition	model	nst	+G	+I
No partition	TPM1uf+I+G	6	Y	Y
12S	TrN+G	6	Y	N
16S	TrN+G	6	Y	N
D-Loop	TPM1uf+G	6	Y	N
cyt <i>b</i>	TPM1uf	6	N	N
ND4	TrN+G	6	Y	N
tRNAs	HKY+G	2	Y	N

Emys trinacris

Nel corso del dottorato, è stato condotto un campionamento in tutte le provincie siciliane in cui è stata descritta la specie *E. trinacris* e nella valle di Sant'Eufemia in Calabria, l'area più meridionale della penisola italiana in cui è presente *E. orbicularis*. Tali campionamenti hanno permesso di ottenere, in totale, dati morfologici e tessuto da 122 individui.

Le aree oggetto della campagna di campionamento sono situate nelle provincie di Palermo, Messina, Agrigento e Siracusa. In particolare, nella provincia di Palermo, sono stati individuati quattro siti di campionamento all'interno dell'area di Ficuzza, mentre nella provincia di Messina sono state individuate due aree all'interno del Parco Nazionale dei Nebrodi: Urio Quattrocchi con due siti e Pantana con 5 siti. La provincia di Agrigento e quella di Siracusa sono rappresentate da individui provenienti da un'area e un sito ciascuna, rispettivamente il lago Gorgo a Montallegro e il Canale Longarini al confine tra il territorio di Pachino (Siracusa) e Ispica (Ragusa); a queste si aggiungono due siti campionati nella piana di Sant'Eufemia in Calabria (Figura 6).

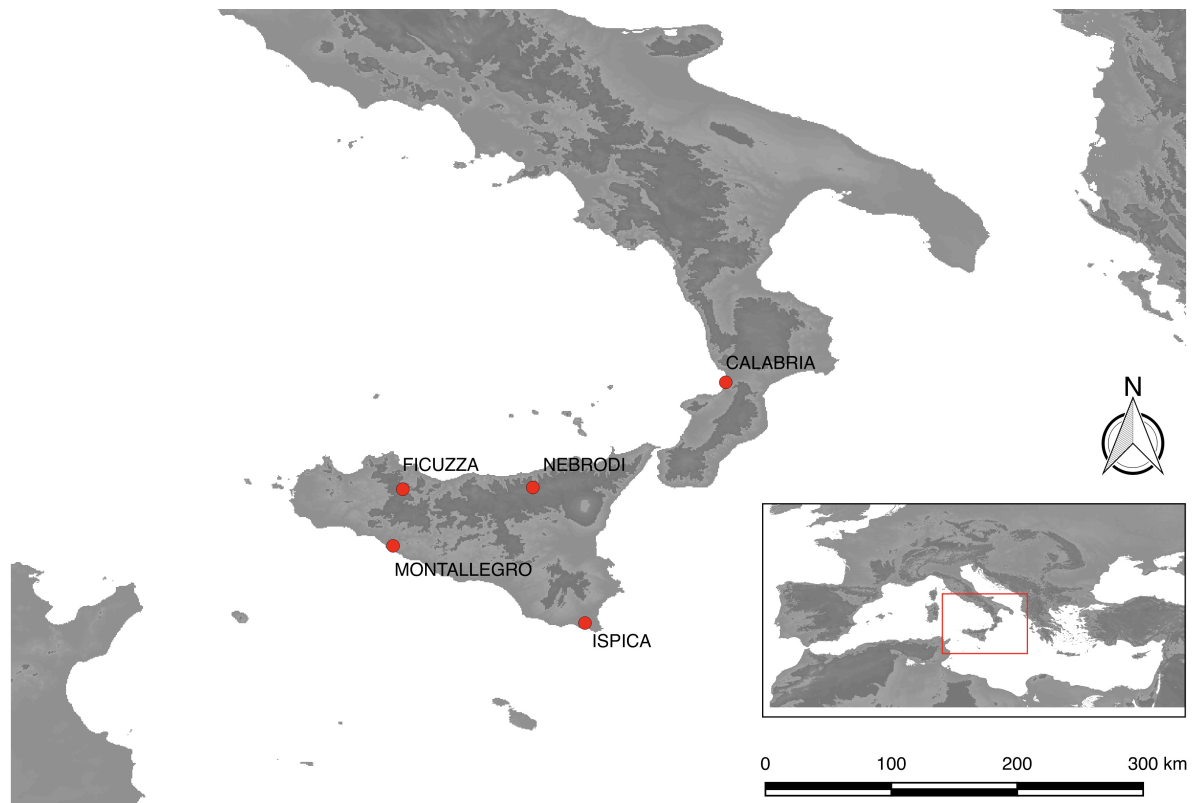


Figura 6 - Siti di campionamento siciliani e calabresi. Quattro siti in Sicilia, tra Palermo Messina, Agrigento e Ragusa, più due in Calabria a Vibo Valentia e nella Piana di Sant'Eufemia.

I campionamenti sono stati effettuati attraverso la cattura manuale o l'utilizzo di nasse, seguendo le stesse metodologie descritte sopra per *M. leprosa*. Inoltre per ogni individuo sono state registrate alcune misure biometriche, come descritto da Zuffi e Gariboldi (1995): i) la massa di ogni individuo (BM, in grammi, ii) la lunghezza del carapace (CL, in mm, la minima distanza tra la placca nucale e quella sopracaudale), iii) la larghezza del carapace (CW, in mm, la distanza tra i bordi del carapace all'altezza della sesta placca marginale passando attraverso la seconda placca laterale e il margine inferiore della seconda centrale), iv) la lunghezza del piastrone (PL, in mm, la distanza minore tra la convessità anteriore e posteriore del piastrone), v) la larghezza del piastrone (PW, in mm, la distanza tra le suture tra carapace e piastrone all'altezza della linea di separazione tra gli scudi pettorali e addominali), vi) altezza corazza (SH, in mm, la distanza lineare tra il margine caudale della seconda placca centrale e il punto mediano del piastrone), vii) lunghezza totale della coda (TL, in mm, dalla margine del piastrone alla punta della coda), viii) distanza tra la cloaca e la punta della coda (CT, in mm, dal margine cefalico della cloaca alla punta della coda).

I dati biometrici registrati sono stati utilizzati per ottenere i rapporti e le differenze utili per lo studio della morfologia delle popolazioni di *E. trinacris*. In particolare sono stati analizzati il rapporto dimensionale CL/BM, la forma del carapace inteso come CW/CL, la forma del

spessore del corpo in relazione alla lunghezza ventrale SH/PL, lo spessore del corpo in relazione alla larghezza del dorso SH/CW ed infine il rapporto TL/PL per la determinazione del sesso (intendendo tale rapporto nullo nel caso di femmine e positivo nel caso di maschi).

I dati raccolti sono stati utilizzati per la stima dei descrittori statistici di base (media e deviazione standard). Per analizzare le differenze tra i campioni suddivisi per sito di appartenenza, sono stati impiegati l'Analisi della Varianza ad una via (*one-way* ANOVA) e il test per la probabilità *a posteriori* Student-Newman-Keuls (test SNK): i due test, in particolare, confrontano i valori delle misure morfometriche e degli indici relativi, delle aree campionate.

Prima di procedere con le analisi, è stato eseguito il test di Cochran per verificare l'omogeneità della varianza delle variabili testate. Nel caso di varianze non omogenee i dati sono stati trasformati attraverso $\ln(x+1)$ e nei casi in cui la trasformazione dei dati non ha sortito alcun effetto, il valore soglia di significatività statistica è stato abbassato a $p < 0,001$ (Underwood, 1996)

Le possibili differenze nella forma sono state verificate attraverso l'Analisi delle Componenti Principali (PCA), applicata ad una matrice di correlazione che elimina l'effetto della componente dimensionale sulle altre (Camussi et al., 1991). Infine è stata utilizzata la *Discriminant Analysis* (DA) con lo scopo di ottenere una funzione lineare (equazione predittiva) attraverso la combinazione delle variabili biometriche che generano la variabilità massima tra i gruppi (Sokal e Rohlf, 1987).

Contestualmente alla misurazione, gli individui di testuggine palustre catturati nelle aree di Pantana (Parco Nazionale dei Nebrodi, Messina) e del lago Gorgo (Montallegro, Agrigento), sono stati marcati attraverso la scalfittura delle placche marginali (Olivier *et al.*, 2010), in modo da ottenere un codice di identificazione univoco (Figura 7).



Figura 7 – Codice univoco per l'identificazione degli individui campionati attraverso la scalfittura delle placche marginali: e.g. 3 sinistra – 4 sinistra, individuo 12343, Diga Gorgo (Montallegro, Ag).

Tali aree sono state oggetto di campionamenti, con cadenza mensile, durante il periodo di attività delle tartarughe.

Per gli studi molecolari, è stato prelevato del tessuto dalla parte terminale della coda (*tail clip*) delle tartarughe catturate, o estratto il sangue da un vaso posto al di sotto della piastra nucale.

Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il kit di estrazione Real Genomics della RBCBioscience. L'amplificazione del gene mitocondriale *cyt b*, scelto come marcatore mitocondriale, è stata eseguita attraverso l'utilizzo dei primers CytbG (forward, 5'-AAC CAT CGT TGT WAT CAA CTA C-3') di Spinks *et al.* (2004) e mt-f-na (reverse, 5'-AGG GTG GAG TCT TCA GTT TTT GGT TTA CAA GAC CAA TG-3', Fritz *et al.*, 2006c) per ottenere un frammento di circa 1250bp. Il sequenziamento è stato condotto con i primers mt-C-for2 (forward, 5'-TGA GGV CAR ATA TCA TTY TGA G-3', Fritz *et al.*, 2006c) e mt-E-rev2 (reverse, 5'-GCR AAT ARR AAG TAT CAT TCT GG-3', Fritz *et al.*, 2006c), così da

ottenere l'intera sequenza del marcatore mitocondriale in due frammenti sovrapponibili (Tabella 5).

Le PCR sono state condotte utilizzando 0,5 µl di DNA in 25 µl di soluzione così composta: 1,2 µl di ciascun *primer* alla concentrazione di 10 pmol, 0,5 µl of dNTP-mix alla concentrazione di 10 pmol, 2 unità di Taq polymerasi (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA), 3 µl PCR buffer 10x, 3 MgCl₂ 25pmol ed H₂O ultra pura. Le PCR sono state impostate con le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 95°C per 5 min, 37 cicli di 95°C (45 s), 58°C (45 s), 72°C (1,30 min) ed un'estensione finale a 72°C per 10 min.

Le sequenze ottenute sono state allineate con il software BIOEDIT 7.2.5 (Hall, 1999). Quindi sono state scaricate dal database di Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) e aggiunte al file di allineamento, le sequenze tipiche dei 4 aplotipi conosciuti per *E. trinacris* (IIIa, IIIb, IIIc, IIId) più 4 aplotipi di *E. o. galloitalica* (Va, Vb, Vc, Vd) e 10 di *E. o. hellenica* (IVa, IVb, IVc, IVd, IVe, IVf, IVg, IVh, IVi, IVj) in quanto sottospecie presenti in Calabria e in diretto contatto tra loro.

Inoltre sono state aggiunte le sequenze di tre specie di tartarughe palustri americane, *Actinemys marmorata* (Baird e Girard, 1852), *Emydoidea blandingii* (Holbrook, 1838) e *Glyptemys insculpta* (Le Conte, 1830) utilizzate come *outgroup* nella successiva costruzione degli alberi.

L'allineamento così ottenuto è stato analizzato con il software JMODELTEST 2 (Darriba *et al.*, 2012) ed con il Criterio di Informazione Bayesiano (BIC) per determinare il miglior modello evolutivo; quindi, per esaminare e meglio comprendere le relazioni filogenetiche tra le popolazioni campionate, sono state eseguite sia l'analisi di massima verosimiglianza (ML) (RAxML 7.2.6; Stamatakis, 2006) che l'analisi bayesiana (MrBAYES 3.2.1; Ronquist *et al.*, 2012). Le analisi filogenetiche bayesiane sono state eseguite utilizzando due piste parallele (ognuna con quattro catene). Entrambe le catene hanno corso per 2 milioni di generazioni, con un campionamento ogni 100 generazioni e hanno raggiunto una frequenza split di molto al di sotto del valore di 0,05. I parametri di calcolo sono stati analizzati utilizzando un burn-in di 5000 generazioni, per assicurare la convergenza ottimale di entrambe le catene, campionando così soltanto il *plateau* degli alberi più probabili. Infine è stato generato un albero di consenso. La probabilità *a posteriori* di ogni singolo clade di questo albero di consenso corrisponde alla percentuale che tutti gli alberi contengano quel clade ed è una misura della frequenza del clade e quindi della sua probabilità di verificarsi.

Per la determinazione degli aplotipi, le sequenze di cyt b sono state impiegate per la costruzione di un network di parsimonia attraverso l'uso del software NETWORK 4.6.1.2

(Bandelt et al., 1999). I nuovi aplotipi identificati seguono la nomenclatura utilizzata da Lenk et al. (1999), Fritz et al. (2005, 2009), Velo-Antòn et al. (2011) e Stuckas et al. (2014), composta da un numero romano seguito da una lettera.

Le analisi sul marcatore mitocondriale studiato sono state completate attraverso il calcolo degli indici di diversità genetica, pairwise F_{ST} e analisi della varianza molecolare (AMOVA). Inoltre è stata valutata l'espansione demografica delle popolazioni studiate attraverso la Mismatch analysis.

AMOVA è stata condotta raggruppando le sequenze delle popolazioni di *E. trinacris* campionate e confrontandole con quelle dei campioni calabresi di *E. orbicularis*, ottenendo così 2 gruppi: *E. trinacris* vs *E. orbicularis*. Le distanze interne tra le popolazioni sicule e tra le sottospecie *E. o. galloitalica* e *E. o. hellenica*, sono state valutate nell'ambito della stessa analisi mediante il confronto a coppie (pairwise F_{ST}).

La diversità aplotipica (h) e nucleotidica (π) oltre che gli indici di espansione demografica (D di Tajima e F_S di Fu) sono stati stimati attraverso il software DNASP 5.10.1 (Librado e Rozas, 2009), mentre AMOVA è stata condotta attraverso l'uso di ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al., 2006).

Oltre alle analisi sul DNA mitocondriale sono stati genotipizzati 122 individui campionati durante il progetto di dottorato cui sono stati aggiunti, con lo scopo di ottenere un'analisi più accurata, 131 individui siciliani già presenti nella *Tissue Collection* del DNA-lab del Museo di Storia Naturale Senckenberg di Dresda (Germania) per un totale di 253 campioni.

Per la genotipizzazione sono stati utilizzati 16 loci microsatelliti precedentemente caratterizzati, non collegati tra loro e altamente polimorfici sia per *Emys orbicularis* che per *E. trinacris* (Ciofi et al 2009; Pedall et al 2009).

I microsatelliti sono stati amplificati utilizzando quattro diverse multiplex PCR (**Tabella 7**) in un volume finale di 10 μ l contenente: 0,5 unità di Taq polimerasi (Bioron), buffer incompleto alla concentrazione di 10X (Bioron), 1,5 mM MgCl₂ (Bioron), 0,2 mM di ciascuna base nucleotidica (dNTP Thermo Scientific), 2 μ g di albumina estratta da siero bovino (Thermo Scientific) e 20-40 ng di DNA totale.

Ogni reazione multiplex è stata preparata con una serie specifica di primer ad una differente concentrazione: la reazione Multiplex 1 è stata preparata con i primer per i loci msEo21 (forward e reverse, 0,132 μ M ciascuno), msEo29 (forward e reverse, 0,4 μ M ciascuno), msEo41 (forward e reverse, 0,4 μ M ciascuno) e GmuD107 (forward e reverse, 0,1 μ M ciascuno); la reazione Multiplex 2 conteneva i primer per i loci msEo2 (forward e reverse, 0,2 μ M ciascuno), GmuD16 (forward e reverse, 0,4 μ M ciascuno), GmuD55 (forward e

reverse, 0,2 μM ciascuno) e GmuD88 (forward e reverse, 0,1 μM ciascuno); la reazione Multiplex 3 era composta dai primer per Emys2 (forward e reverse, 0,4 μM ciascuno), Emys4 (forward e reverse, 0,6 μM ciascuno), Emys5 (forward e reverse, 0,4 μM ciascuno) e Emys11 (forward e reverse, 0,2 μM ciascuno); infine la Multiplex 4 conteneva primer per Emys1 (forward e reverse, 0,4 μM ciascuno), Emys6 (forward e reverse, 0,5 μM ciascuno), Emys7 (forward e reverse, 0,2 μM ciascuno) e Emys8 (forward e reverse, 0,5 μM ciascuno). I cicli termici sono gli stessi utilizzati da Stuckas et al. (2014) e descritti in **Tabella 8**.

Le lunghezze dei frammenti amplificati sono state determinati con il sequenziatore ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizzando il *size-standard* GeneScan-600 LIZ (Applied Biosystems) e il software PEAK SCANNER 1.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA).

I problemi riscontrati con le dimensioni degli alleli del locus Emys2 ci hanno costretto ad escludere questo locus dalle analisi successive.

I dati dei restanti 15 loci microsatelliti sono stati analizzati tramite un approccio non supervisionato di *clustering bayesiano* utilizzando il software STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al 2000; Hubisz et al 2009) con il modello di *admixture* e le frequenze alleliche correlate.

Il software STRUCTURE ricerca nel set di dati le partizioni che sono, per quanto possibile, in equilibrio di Hardy-Weinberg e in *linkage equilibrium*.

Per tutte le analisi è stato impostato arbitrariamente il limite superiore per i calcoli a $K = 10$ e determinato il numero più probabile di cluster (K) utilizzando il metodo DeltaK (Evanno et al. 2005) con il software STRUCTURE HARVESTER (Earl e vonHoldt, 2012).

Le operazioni sono state ripetute 10 volte per ogni K con una catena MCMC di 750.000 generazioni per ogni corsa e un burn-in di 250.000 generazioni.

La struttura delle popolazioni e le eventuali ibridazioni sono state visualizzate utilizzando il software DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004). Come suggerito da Randi (2008), gli individui con percentuali di appartenenza al cluster inferiori a 80% sono stati considerati come ibridi.

Tabella 7 Loci microsatellite, multiplex utilizzate, numero e range di taglia degli alleli. I primer forward sono stati coniugati con sostanze fluorescenti.

Locus	Bibliografia	Multiplex set	Fluorescenza	Alleli [bp]	Numero di alleli
msEo21	Pedall et al. (2009)	1	ATTO 565	167-175	3
msEo29	Pedall et al. (2009)	1	6-FAM	300-310	4
msEo41	Pedall et al. (2009)	1	HEX	66-146	12
GmuD107	King and Julian (2004)	1	6-FAM	176-216	11
msEo2	Pedall et al. (2009)	2	ATTO 565	124-152	9
GmuD16	King and Julian (2004)	2	HEX	224-304	20
GmuD55	King and Julian (2004)	2	6-FAM	186-298	18
GmuD88	King and Julian (2004)	2	ATTO 565	179-231	14
Emys2	Ciofi et al. (2009)	3	ATTO 550	n/a	n/a
Emys4	Ciofi et al. (2009)	3	ATTO 565	99-105	4
Emys5	Ciofi et al. (2009)	3	6-FAM	98-150	18
Emys11	Ciofi et al. (2009)	3	HEX	86-132	15
Emys1	Ciofi et al. (2009)	4	6-FAM	116-134	6
Emys6	Ciofi et al. (2009)	4	ATTO 550	135-201	18
Emys7	Ciofi et al. (2009)	4	ATTO 565	133-185	20
Emys8	Ciofi et al. (2009)	4	HEX	126-138	5

Tabella 8 Cicli termici utilizzati per l'amplificazione dei microsatelliti tramite reazioni multiplex

Multiplex set	Denaturazione iniziale.	Numero di cicli	Denaturazione	Appaiamento	Allungamento	Allungamento finale
1, 2	94°C, 6 min	35	94°C, 60 s	58°C, 90 s	72°C, 60 s	72°C, 6 min
3, 4	94°C, 5 min	35	94°C, 40 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	72°C, 6 min

Durante la campagna di campionamento di *E. trinacris* in Sicilia e di *E. orbicularis* in Calabria, sono stati collezionati 75 ectoparassiti ematofagi riconducibili a 2 specie: *Placobdella costata* e *Helobdella stagnalis*.

I campioni di *P. costata* sono stati raccolti sia su *E. trinacris* che su *E. orbicularis*. Su *E. trinacris* è stata ritrovata anche una seconda specie di sanguisughe: *H. stagnalis*.

Dal totale di 75 individui, è stato scelto un sub-campione di 22 esemplari, 17 di *P. costata* e 5 di *H. stagnalis*, dal cui tessuto è stato estratto il DNA genomico utilizzando il kit di estrazione Real Genomics della RCBioscience. Durante le fasi preliminari dell'isolamento del DNA, è stata posta particolare attenzione affinché il sangue delle sanguisughe non venisse estratto.

Successivamente dal DNA isolato è stata amplificata la subunità 1 della citocromo ossidasi (COI) utilizzando i primer universali di Folmer et al. (1994): LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') e HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3').

Le PCR sono state impostate con le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94°C per 5 min, 35 cicli di 94°C (45 s), 48°C (45 s), 72°C (45 s) ed un'estensione finale a 72°C per 7 min.

Le mix per la PCR sono state preparate mescolando 1 µl di DNA stampo in 25 µl di soluzione così composta: 1 µl di ciascun *primer* alla concentrazione di 10 pmol, 0,4 µl of dNTP-mix alla concentrazione di 10 mM, 0,2 µl di Taq (5 unità/µl; Bioron), 3 µl PCR buffer + MgCl₂ 10x ed H₂O ultra pura.

Gli amplificati di circa 600 bp sono stati sequenziati con il sequenziatore ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e scegliendo come primer per il sequenziamento LCO1490.

Il software BIOEDIT 7.2.5 (Hall, 1999) è stato utilizzato per allineare le sequenze ottenute insieme ad altre 10, 1 di *P. costata* e 9 di *H. stagnalis*, scaricate dal database di Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

È stato determinato il miglior modello evolutivo con il software JMODELTEST 2 (Darriba et al., 2012) ed il Criterio di Informazione Bayesiano (GTR+I), quindi sono state condotte sia l'analisi di massima verosimiglianza (1000 repliche di bootstrap, RAxML 7.2.6; Stamatakis, 2006) che l'analisi bayesiana (2.000.000 di generazioni, 20.000 campionature, burn in = 5000; MrBAYES 3.2.1; Ronquist et al., 2012). Gli alberi ottenuti sono stati radicati con la sequenza di *Trachelobdellina glabra* (Hirudinea, Piscicolidae).

3. RISULTATI

3.1 *Mauremys leprosa*

Le sequenze di *M. leprosa* ottenute sono state suddivise per macro aree, ricavando così 5 gruppi (Algeria, Tunisia, Marrakech, Marocco settentrionale, Marocco meridionale) cui sono stati aggiunti un gruppo unico per il Marocco e uno totale, con incluse tutte le sequenze. Si è proceduto, quindi, al calcolo degli indici di diversità molecolare e di espansione demografica descritti in **Tabella 9**.

Tabella 9 Statistiche riassuntive per gli aplotipi delle sequenze *M. leprosa* (n = numero di campioni, nh = numero di aplotipi, h = diversità aplotipica e deviazione standard (SD_h), π = diversità nucleotidica e SD_π , S = numero di siti polimorfici, D = indice di Tajima), F_{ST} = indice di Fu).

Popolazioni	n	nh	h	SD_h	π	SD_π	S	$D^*_{(P<0,05)}$	Fu's F_{ST}
ALGERIA	2	2	1	0,5	0,00056	0,00028	1	na	na
TUNISIA	50	6	0,26	0,081	0,00046	0,00016	6	-1,80426*	-4,164
Marrakech	2	2	1	0,5	0,00116	0,00058	1	na	na
Marocco nord	7	5	0,714	0,181	0,00764	0,00458	22	-1,51224	2,36
Marocco sud	11	7	0,873	0,089	0,01168	0,0188	23	1,27099	1,395
MAROCCO	21	13	0,938	0,036	0,01983	0,00133	49	0,98503	0,382
PENISOLA IBERICA	10	2	0,511	0,164	0,00078	0,00028	2	-0,18393	-0,272
TOTALE	82	18	0,682	0,055	0,00859	0,00098	40	-0,3277	0,502

I risultati mostrano come il Marocco sia caratterizzato da una grande diversità, con 13 aplotipi totali e un valore di h elevato, pari a 0,938 (**Tabella 9**). Tale risultato è condiviso dalle tre macro aree identificate per il Marocco: in particolare, le popolazioni presenti nell'area marocchina meridionale mostrano 7 aplotipi differenti con h pari a 0,873, mentre le popolazioni settentrionali fanno registrare 5 aplotipi e un valore di $h = 0,714$. Un dato interessante è rappresentato dall'area di Marrakech che, su 2 sequenze disponibili, mostra il 100% di diversità aplotipica, al pari dell'area algerina. La Tunisia, rappresentata da un campione più elevato, mostra livelli di diversità aplotipica più modesti ($h = 0,26$) e un totale di 6 aplotipi differenti.

Al fine di individuare gli aplotipi condivisi e verificare l'eventuale presenza di aplotipi esclusivi, è stata costruita una tabella (**Tabella 10**) tramite la funzione *shared haplotypes* di ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et al., 2006).

Tabella 10 Tabella degli aplotipi di *M. leprosa* condivisi. In tabella, il numero di individui è suddiviso per popolazione e per ciascun aplotipo. Tra parentesi il numero degli aplotipi della macro area di riferimento.

Haplotypes	ALGERIA (1)	TUNISIA (6)	MAROCCO (13)	MARRAKECH (2)	MAROCCO nord (5)	MAROCCO sud (6)	PENISOLA IBERICA (1)
Hap 1			1		1		
Hap 2	2	43	1		1		
Hap 3		1					
Hap 4		1					
Hap 5		3					
Hap 6			5			5	
Hap 7		1					
Hap 8		1					
Hap 9			1	1			
Hap 10			1	1			
Hap 11						1	
Hap 12			1			1	
Hap 13			1			1	
Hap 14			1			1	
Hap 15			4		4		2
Hap 16			1		1		8
Hap 17			1		1		
Hap 18			2			2	

La **Tabella 10** mostra come l'aplotipo 2 sia maggiormente rappresentato in Tunisia e condiviso interamente con l'Algeria; è presente con un solo individuo anche in Marocco settentrionale. Gli aplotipi 3, 4, 5, 7 e 8 risultano essere esclusivi dell'area tunisina, così come gli aplotipi 9 e 10 lo sono dell'area di Marrakech (**Tabella 10**).

Il Marocco settentrionale condivide con la Penisola Iberica gli aplotipi 15 e 16, vantando l'esclusività degli aplotipi 1 e 17. Il Marocco meridionale sembra avere solo aplotipi esclusivi (6, 11, 12, 13, 14 e 18; **Tabella 10**).

Tabella 11 Tabella di AMOVA condotta tra gruppi.

Comparison levels	Source of variation	% variation	Fixation indices	F-statistic	P<0,05
Inter-groups	Among groups (Tunisia + Algeria vs Marocco vs Penisola Iberica)	3,77	Φ_{CT}	0,038	0,38
	Among populations within groups	79,72	Φ_{SC}	0,828	0,00
	Within populations	16,52	Φ_{ST}	0,835	0,00

L'analisi della varianza molecolare è stata effettuata suddividendo le sequenze in tre grandi gruppi: un primo gruppo è stato formato con le sequenze di Tunisia e Algeria, un secondo ha racchiuso tutte le sequenze marocchine e il terzo, invece, quelle della Penisola Iberica.

Il confronto tra questi gruppi non ha mostrato differenze significative, con una percentuale di variazione del 3,77% (**Tabella 11**). Tale risultato è probabilmente da imputare all'elevata variabilità interna dei gruppi impostati. Infatti, il confronto tra le popolazioni all'interno dei gruppi è risultato avere una variazione del 79,72% con un indice F_{SC} (0,835) altamente significativo (**Tabella 11**)

Tabella 12 Confronto a coppie della distanza genetica tra le macro aree, calcolata come *pairwise* F_{ST} . In grassetto i valori di F_{ST} significativi ($P < 0,05$).

Φ_{ST}	ALGERIA	TUNISIA	PENISOLA IBERICA	MARRAKECH	MAROCCO nord	MAROCCO sud
ALGERIA	0,000					
TUNISIA	-0,311	0,000				
PENISOLA IBERICA	0,808	0,945	0,000			
MARRAKECH	0,982	0,984	0,768	0,000		
MAROCCO nord	0,717	0,937	-0,053	0,675	0,000	
MAROCCO sud	0,375	0,796	0,702	0,704	0,639	0,000

Anche il confronto a coppie tra le popolazioni, intese come sequenze raggruppate nelle macro aree geografiche di appartenenza, ha presentato delle differenze significative (**Tabella 12**). Le distanze genetiche, calcolate sulla base dell'indice F_{ST} , hanno confermato la vicinanza tra le tartarughe algerine e quelle tunisine, così come tra la Penisola Iberica e il Marocco settentrionale. Le sequenze di Marrakech sembrano essere differenti rispetto al Marocco meridionale, alla Tunisia e alla Penisola Iberica mentre tale distanza non risulta significativa nei confronti dell'area settentrionale del Marocco. Infine, sono risultate significativamente differenti le popolazioni del Marocco meridionale e della Tunisia rispetto a tutte le altre.

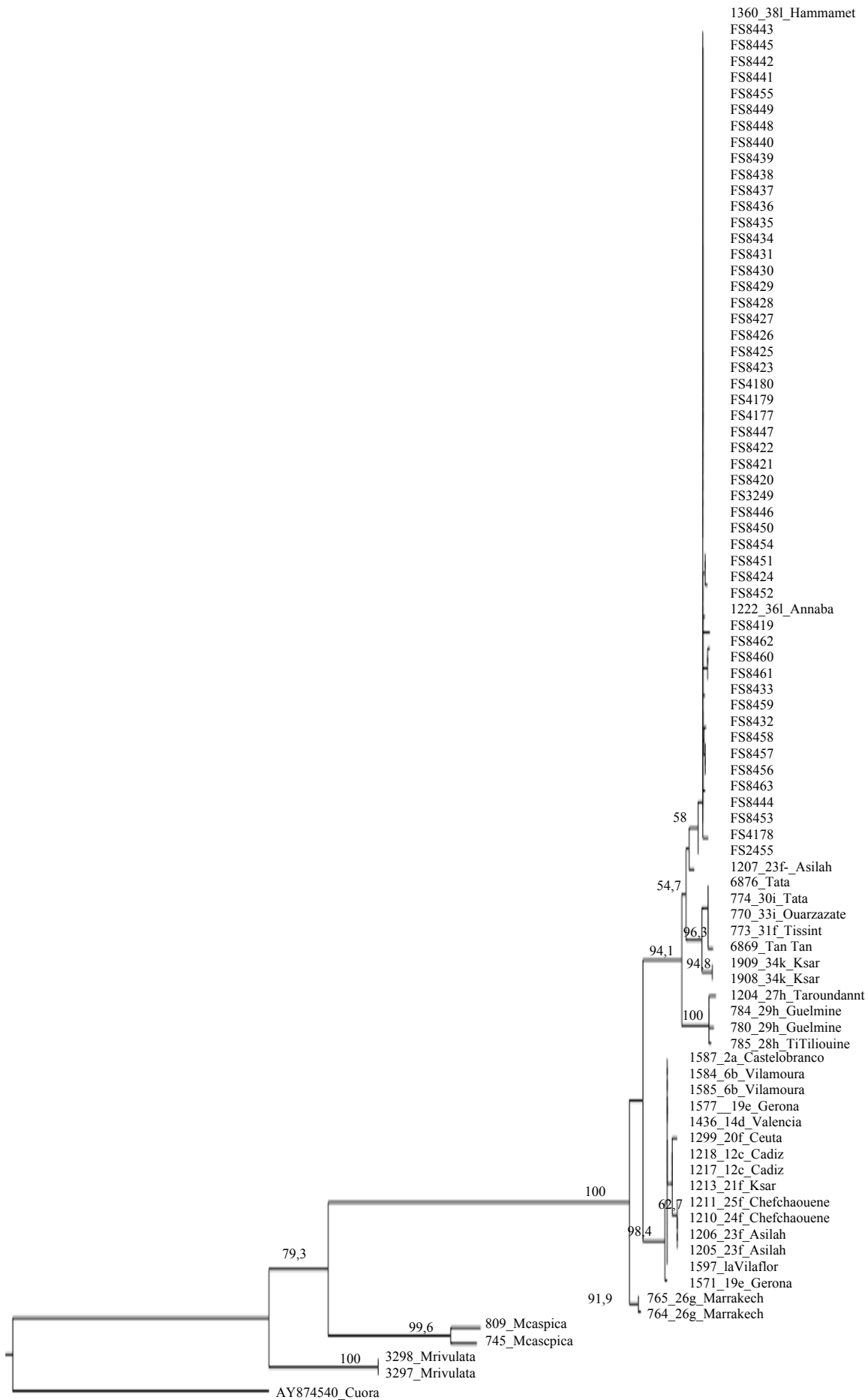
Gli alberi filogenetici prodotti dall'analisi di ML e dall'analisi Bayesiana hanno mostrato topologie sovrapponibili tra loro (**Figura 8**).

I campioni di *Mauremys leprosa* inclusi nell'analisi si dividono in tre gruppi monofiletici ben caratterizzati, i cui rapporti reciproci non sono supportati da valori di *bootstrap* superiori a 50. I rapporti tra questi tre cladi vanno, quindi, intesi *de facto* come non risolti e

rappresentabili da una politomia basale che individua tre gruppi monofiletici, tutti supportati da valori di *bootstrap* superiori al 90%. Essi sono: (i) un primo clade che include esclusivamente due individui campionati in Marocco presso Marrakech, i.e. all'interno della area di distribuzione della sottospecie *M. leprosa marokkensis*, (ii) un secondo clade che include la quasi totalità degli individui campionati in Marocco settentrionale e tutti gli individui campionati nella Penisola Iberica, e (iii) un ultimo, più numeroso clade, che include gli individui campionati in Tunisia, Algeria e nelle località marocchine situate a sud della catena dell'Atlante. È, altresì, riconducibile a questo gruppo un singolo individuo proveniente da un sito localizzato nel Marocco settentrionale.

Il clade "(iii)" è quello maggiormente strutturato dal punto di vista molecolare e consente di individuare al suo interno tre ulteriori gruppi monofiletici, due relativi a gruppi di popolazioni marocchine campionate a sud dell'Atlante ed un terzo che include la totalità dei campioni algerini e tunisini.

Figura 8 – Albero di ML costruito in seguito all'analisi di 83 sequenze concatenate di 1802 bp dei due geni mitocondriali *cytb* e d-loop di *Mauremys leprosa*. I numeri sopra i nodi sono relativi ai valori di *bootstrap* maggiori a 50; i numeri sotto i nodi sono presenti quando la probabilità *a posteriori* a supporto del nodo stesso è superiore a 0,95. Clade (i) rosso; Clade (ii) arancio; Clade (iii) toni del blu. →



3.2.2 *Emys orbicularis* s.l.

Emys orbicularis

Il network di aplotipi prodotto con l'analisi di parsimonia (Figura 9) mostra le sequenze marocchine raggruppate a quelle iberiche e gli aplotipi marocchini in posizione basale rispetto agli iberici (lignaggio VI *sensu* Lenk *et al.*, 1999).

Le sequenze algerine e tunisine occupano il lignaggio IX (*sensu* Fritz *et al.*, 2007), in precedenza assegnato ad animali presenti in alcuni zoo, di cui però si ignorava la provenienza. Tra le sequenze marocchine, algerine e tunisine, è stata riscontrata la presenza di 4 aplotipi mai osservati: VIh e VIi per il Marocco, IXb e IXc per Algeria e Tunisia.

L'aplotipo più comune in Marocco è il VIc (n=16), trovato in 14 tartarughe della catena montuosa dell'Atlante e 2 della provincia di Kenitra.

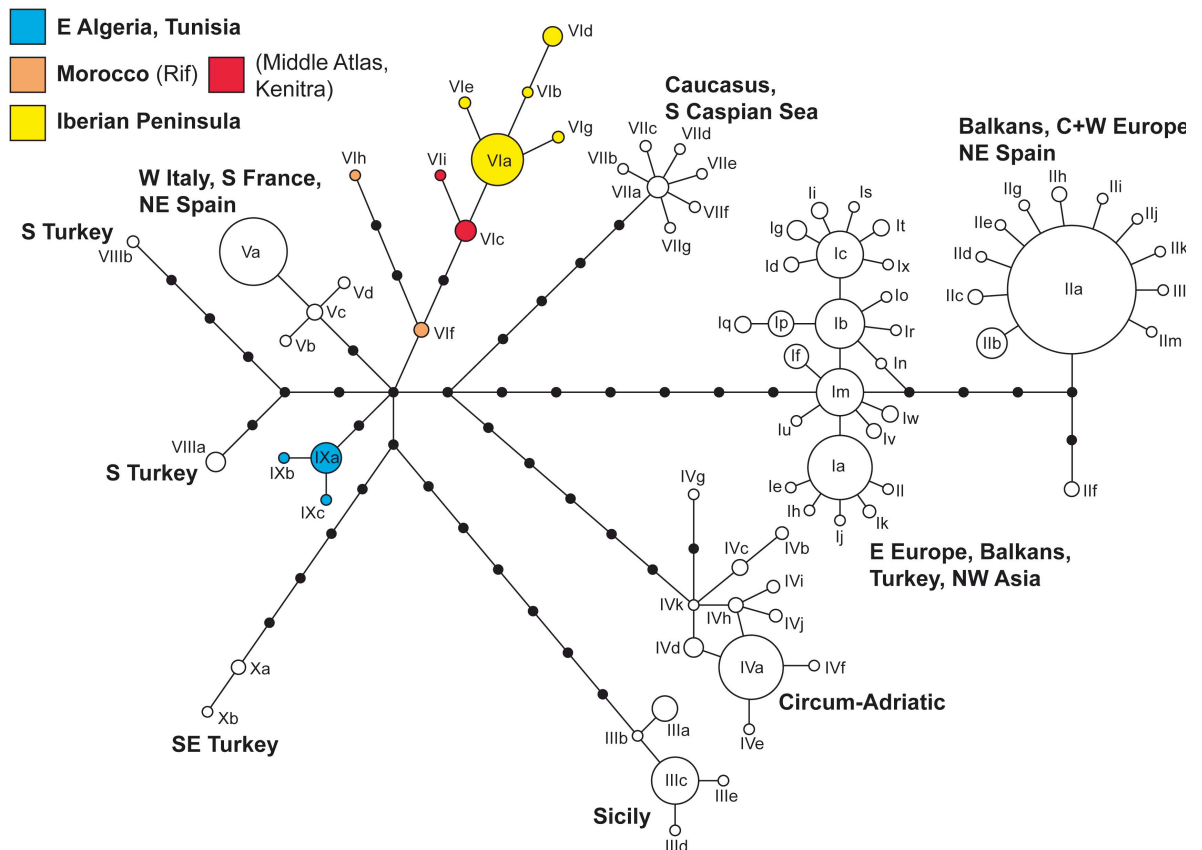


Figura 9 – Network di parsimonia per gli aplotipi mitocondriali di *Emys orbicularis* e *E. trinacris* basato sul marcatore *cyt b* (1031 bp) di 1596 campioni. La dimensione dei cerchi è funzione della frequenza degli aplotipi. I cerchi neri indicano gli aplotipi mancanti e ciascuna linea di connessione tra gli aplotipi corrisponde a uno *step* mutazionale.

L'aplotipo VII è relativo ad un individuo campionato nella parte centrale della catena dell'Atlante, mentre VI f è comune nelle popolazioni campionate nell'area montuosa del Rif. Un solo individuo di quest'area presenta l'aplotipo VI h.

In Tunisia e Algeria, invece, l'aplotipo più comune è il IXa (n=17), ritrovato in tre differenti siti di campionamento. Nella parte più orientale dell'Algeria è presente l'aplotipo IXb, mentre nella parte nord-occidentale della Tunisia si trova IXc.

Le analisi di ML e Bayesiana condotte sulle sequenze concatenate di DNA mitocondriale hanno prodotto due alberi dalla topologia perfettamente sovrapponibile (Figura 10) che mostrano una topologia abbastanza chiara con quattro gruppi ben distinti.

Un primo gruppo ben differenziato racchiude tutti i campioni provenienti dalla regione mediterranea occidentale, compreso un piccolo gruppo relativo al lignaggio V tipico delle coste nord-occidentali del Mediterraneo. All'interno di questo primo gruppo, è possibile distinguere due cladi: il primo relativo ai campioni algerini e tunisini e il secondo suddiviso in altri tre corrispondenti alle due aree marocchine (catena dell'Atlante e monti del Rif) e alla Penisola Iberica. La posizione di ciascun clade all'interno della regione mediterranea occidentale rimane comunque incerta, in quanto i valori di bootstrap non sono così solidi da poter considerare risolti i rapporti reciproci tra ciascun clade.

Gli altri gruppi sono relativi alla regione europea centro orientale, Asia inclusa, all'area circum-adriatica e alla specie sorella *Emys trinacris*.

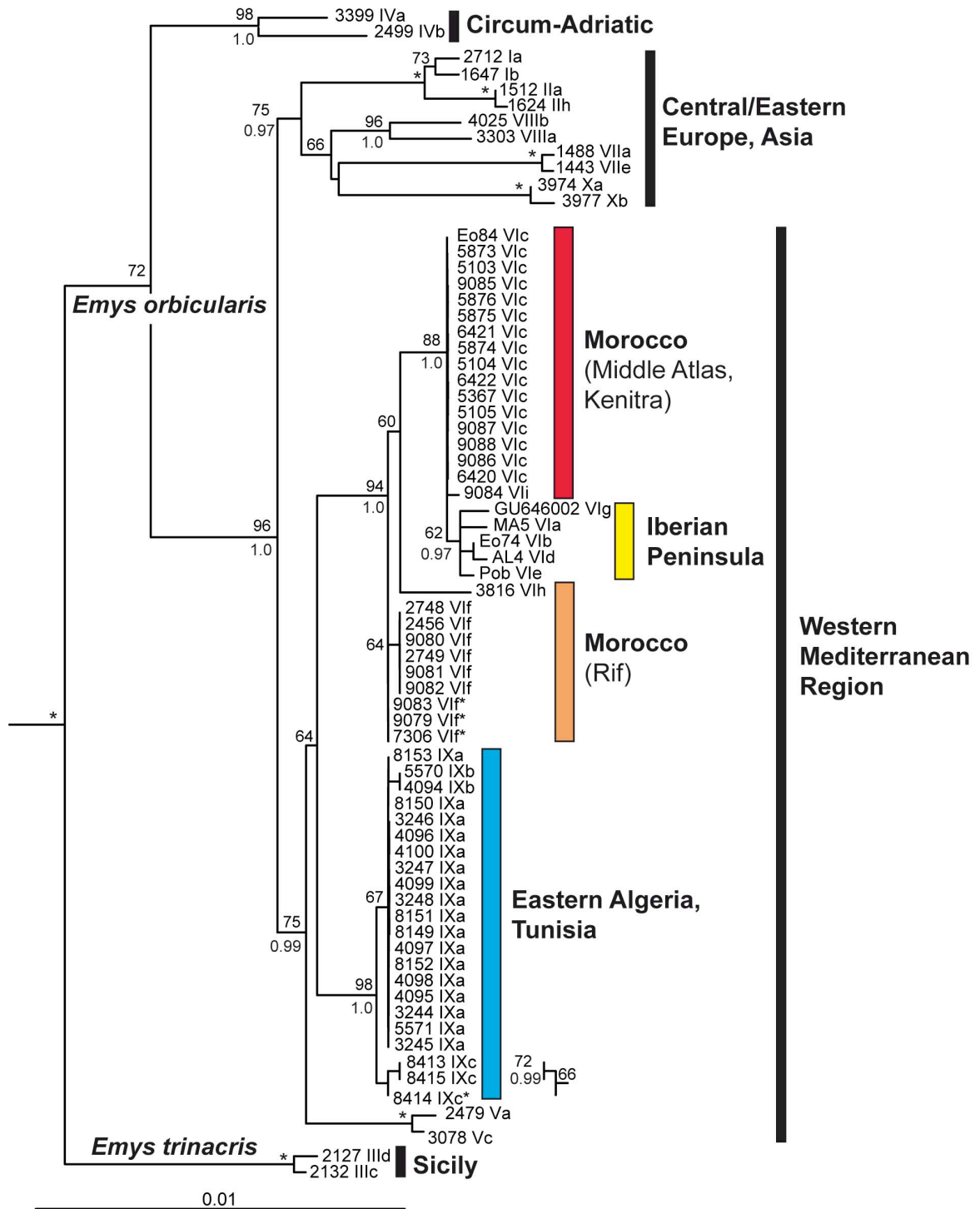


Figura 10 – Albero di massima verosimiglianza basato sull'analisi di 3468 bp di DNA mitocondriale di *Emys orbicularis* e *E. trinacris*. I numeri sopra i nodi sono relativi ai valori di *bootstrap* maggiori a 50; i numeri sotto i nodi sono presenti quando la probabilità *a posteriori* a supporto del nodo stesso è superiore a 0,95. Gli *outgroups* sono stati rimossi per rendere l'immagine più chiara in quanto il pattern di ramificazione corrispondeva alle aspettative. La nomenclatura degli aplotipi segue Lenk et al. (1999) e Fritz et al. (2005b, 2007, 2009)

Emys trinacris

Tutti i 122 individui catturati sono stati pesati e misurati. Per gli individui adulti, inoltre, è stato determinato il sesso. In **Tabella 13** sono riassunti i valori medi \pm la deviazione standard (SD) delle misure morfometriche e degli indici calcolati, suddivisi per sito di cattura e sesso. In questa sede sono stati esclusi gli individui giovanili per non generare una variabilità interna ai gruppi e quindi alterare i risultati delle analisi statistiche in seguito prodotte.

Le misure ottenute in campo sono state utilizzate per calcolare degli indici: in quanto adimensionali, essi si rivelano utili alla comparazione delle dimensioni delle popolazioni studiate (**Tabella 13**).

I risultati ottenuti da ANOVA mostrano come in generale non siano presenti differenze statisticamente significative, né tra i siti campionati all'interno della Sicilia né tra questi e la Calabria in cui è presente la specie sorella *E. orbicularis* (**Tabella 14** e **Tabella 15**).

Le differenze riscontrate sono relative al sito di Ficuzza che presenta valori di BM ($421 \pm 114,73$), CL ($13,73 \pm 1,33$), CW ($10,62 \pm 0,88$) e PL ($12,38 \pm 1,09$) maggiori rispetto a quelli delle tartarughe siciliane di Ispica (**Tabella 13** e **Tabella 15**). Tuttavia tali differenze non sono state riscontrate tra i rispettivi indici morfometrici (**Tabella 15**).

Il rapporto dimensionale PW/PL, che analizza la forma del piastrone, ha mostrato delle differenze interne tra le tartarughe siciliane e quelle calabre. In particolare, le tartarughe dei Nebrodi hanno fatto registrare valori del rapporto PW/PL statisticamente più elevati rispetto sia alla popolazione di Ispica che a quella calabra (**Tabella 13** e **Tabella 15**). Anche Montallegro presenta un pattern simile, differenziandosi però solo dagli individui di *E. orbicularis* calabri (**Tabella 13** e **Tabella 15**).

Il modello di organizzazione fattoriale, ottenuto attraverso la PCA mostra omogeneità nelle variabili morfometriche utilizzate per comparare le popolazioni di tartarughe siciliane e calabre. Come risultato per ANOVA, fanno eccezione alcuni individui dei Nebrodi e di Montallegro che si discostano dal resto dei campioni nell'ambito delle componenti principali 1 e 2 per quanto riguarda l'indice di forma del piastrone (**Figura 11**).

Il modello su piani fattoriali della *Discriminant Analysis*, DA1 – DA2, in linea con le altre analisi condotte, ha evidenziato alcune differenze significative (Wilks' $\lambda = 0,365795$; $F_{(32,322)} = 3,158970$; $p < 0,0000$)

Tabella 13 Tavola riassuntiva dei valori medi \pm deviazione standard (SD) delle misure morfometriche e degli indici calcolati, suddivisi per sito di campionamento e per sesso. Tra parentesi il numero di individui compreso nelle analisi. (BM = peso; CL = lunghezza carapace; CW = larghezza carapace; PL = lunghezza piastrone; PW = larghezza piastrone; SH = altezza corazza; TL = lunghezza coda; CT = distanza cloaca-apice coda; tutte le misure sono espresse in cm ad eccezione del peso in g)

	NEBRODI		MONTALLEGRO		FICUZZA	ISPICA		CALABRIA	
	Males (11)	Females (13)	Males (41)	Females (19)	Males (7)	Males (2)	Females (2)	Males (4)	Females (1)
BM	345,54 \pm 165,06	375,38 \pm 92,56	258,71 \pm 91,60	363,11 \pm 143,35	421,00 \pm 114,73	223,00 \pm 94,75	220,50 \pm 156,27	240,00 \pm 109,63	315,00 \pm 0,00
CL	12,27 \pm 3,02	13,08 \pm 0,98	11,62 \pm 1,59	12,61 \pm 2,07	13,73 \pm 1,33	11,05 \pm 1,85	10,44 \pm 2,76	11,51 \pm 1,95	12,12 \pm 0,00
CW	9,89 \pm 2,28	10,57 \pm 0,65	8,98 \pm 1,01	9,87 \pm 1,43	10,62 \pm 0,88	8,92 \pm 1,46	8,44 \pm 1,70	8,71 \pm 1,48	9,74 \pm 0,00
PL	11,20 \pm 2,83	12,41 \pm 0,99	10,41 \pm 1,35	11,72 \pm 1,99	12,38 \pm 1,09	9,92 \pm 1,45	9,66 \pm 2,53	10,22 \pm 2,04	11,19 \pm 0,00
PW	7,34 \pm 1,90	8,24 \pm 0,60	6,58 \pm 0,91	7,55 \pm 1,23	7,54 \pm 0,71	6,26 \pm 1,19	6,23 \pm 1,65	5,86 \pm 0,96	6,94 \pm 0,00
SH	4,88 \pm 1,16	5,50 \pm 0,50	4,34 \pm 0,56	5,05 \pm 0,82	5,08 \pm 0,30	4,23 \pm 0,62	4,20 \pm 0,98	4,28 \pm 0,70	5,21 \pm 0,00
TL	4,97 \pm 1,36	5,23 \pm 0,94	6,17 \pm 0,78	5,74 \pm 1,27	6,61 \pm 0,63	6,17 \pm 0,67	5,26 \pm 1,16	6,77 \pm 1,77	4,72 \pm 0,00
CT	3,84 \pm 1,27	4,52 \pm 0,91	4,64 \pm 0,63	4,67 \pm 1,39	5,37 \pm 0,56	4,42 \pm 0,31	4,73 \pm 1,03	5,30 \pm 0,75	3,98 \pm 0,00
CL/BM	0,06 \pm 0,09	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,03	0,06 \pm 0,02	0,04 \pm 0,00
CW/CL	0,81 \pm 0,04	0,81 \pm 0,03	0,78 \pm 0,05	0,79 \pm 0,03	0,77 \pm 0,02	0,81 \pm 0,00	0,81 \pm 0,05	0,76 \pm 0,01	0,80 \pm 0,00
PW/PL	0,65 \pm 0,04	0,67 \pm 0,03	0,63 \pm 0,04	0,65 \pm 0,03	0,61 \pm 0,02	0,63 \pm 0,03	0,64 \pm 0,00	0,58 \pm 0,02	0,62 \pm 0,00
SH/PL	0,44 \pm 0,03	0,44 \pm 0,02	0,42 \pm 0,02	0,43 \pm 0,03	0,41 \pm 0,03	0,43 \pm 0,00	0,44 \pm 0,01	0,42 \pm 0,02	0,47 \pm 0,00
SH/CW	0,49 \pm 0,03	0,52 \pm 0,03	0,48 \pm 0,02	0,51 \pm 0,03	0,48 \pm 0,03	0,47 \pm 0,01	0,50 \pm 0,02	0,49 \pm 0,01	0,53 \pm 0,00
TL/PL	0,47 \pm 0,17	0,42 \pm 0,08	0,60 \pm 0,06	0,47 \pm 0,15	0,54 \pm 0,07	0,62 \pm 0,02	0,55 \pm 0,02	0,67 \pm 0,16	0,42 \pm 0,00

Tabella 14 Tavola riassuntiva del Cochran's test e di *one-way* ANOVA sulle variabili morfometriche registrate effettuata tra i siti campionati. In grassetto i valori statisticamente significativi.

	Transformation	Cochran's test	df	SS	MS	F	p
BM	-	0,252309	4	214511,00	53628,00	3,65	0,01
CL	-	0,282786	4	37,03	9,26	2,63	0,04
CW	-	0,305768	4	30,26	7,56	4,30	0,00
PL	-	0,299838	4	39,09	9,77	3,10	0,02
PW	-	0,327326	4	25,03	6,26	4,57	0,00
SH	-	0,334461	4	9,71	2,43	4,24	0,00
TL	-	0,47832	4	20,66	5,17	4,79	0,00
CT	-	0,349736	4	9,00	2,25	2,52	0,05
CL/BM	ln(x+1)	0,709898	4	0,00	0,00	0,32	0,86
CW/CL	ln(x+1)	0,435536	4	0,02	0,01	3,41	0,01
PW/PL	-	0,36269	4	0,03	0,01	6,29	0,00
SH/PL	-	0,291642	4	0,01	0,00	3,48	0,01
SH/CW	-	0,309434	4	0,01	0,00	1,98	0,10
TL/PL	ln(x+1)	0,494406	4	0,29	0,07	6,65	0,00

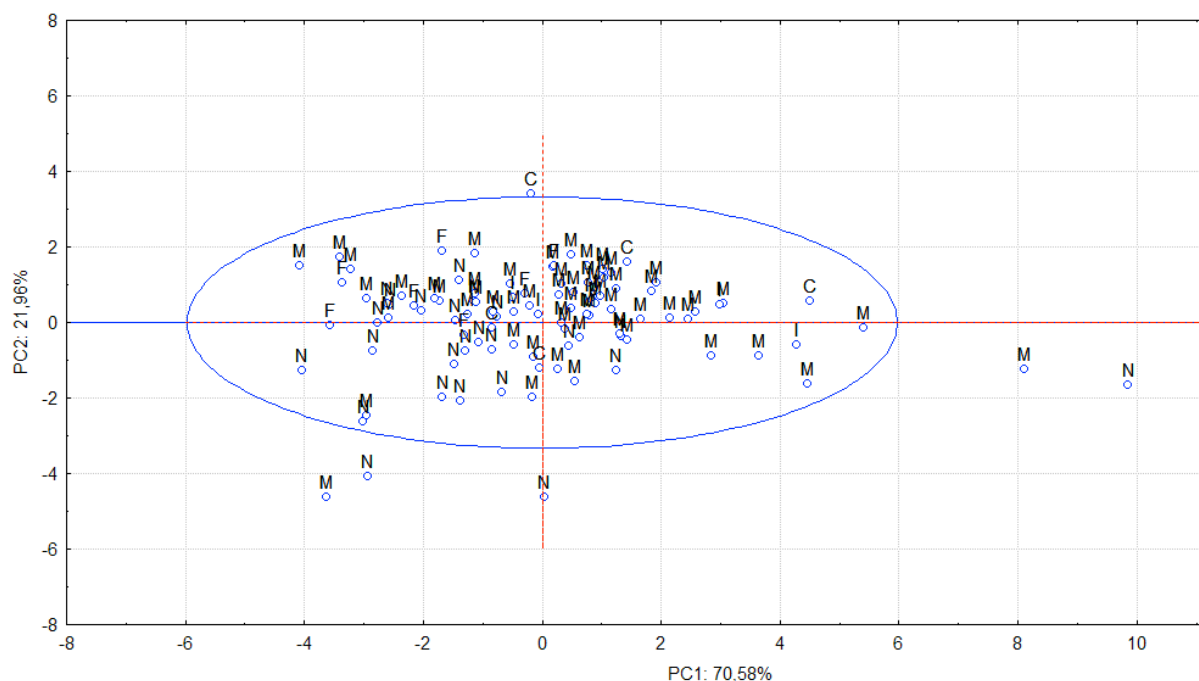


Figura 11 – Plot degli *scores* delle variabili analizzate (misure e indici morfometrici) in relazione ai siti di campionamento sugli assi delle prime due componenti principali. L'ellisse rappresenta l'area della probabilità al 95% (N = Nebrodi; M = Montallegro; F = Ficuzza; I = Ispica; C = Calabria).

Tuttavia dal grafico ottenuto non è possibile evidenziare un pattern di distribuzione dei campioni, suddivisi per sito, i quali appaiono, infatti, dispersi intorno all'origine. Anche questa volta i Nebrodi, insieme ad alcuni individui di Montallegro si separano dagli altri lungo l'asse DA1, che vede come variabile discriminante la forma del piastrone.

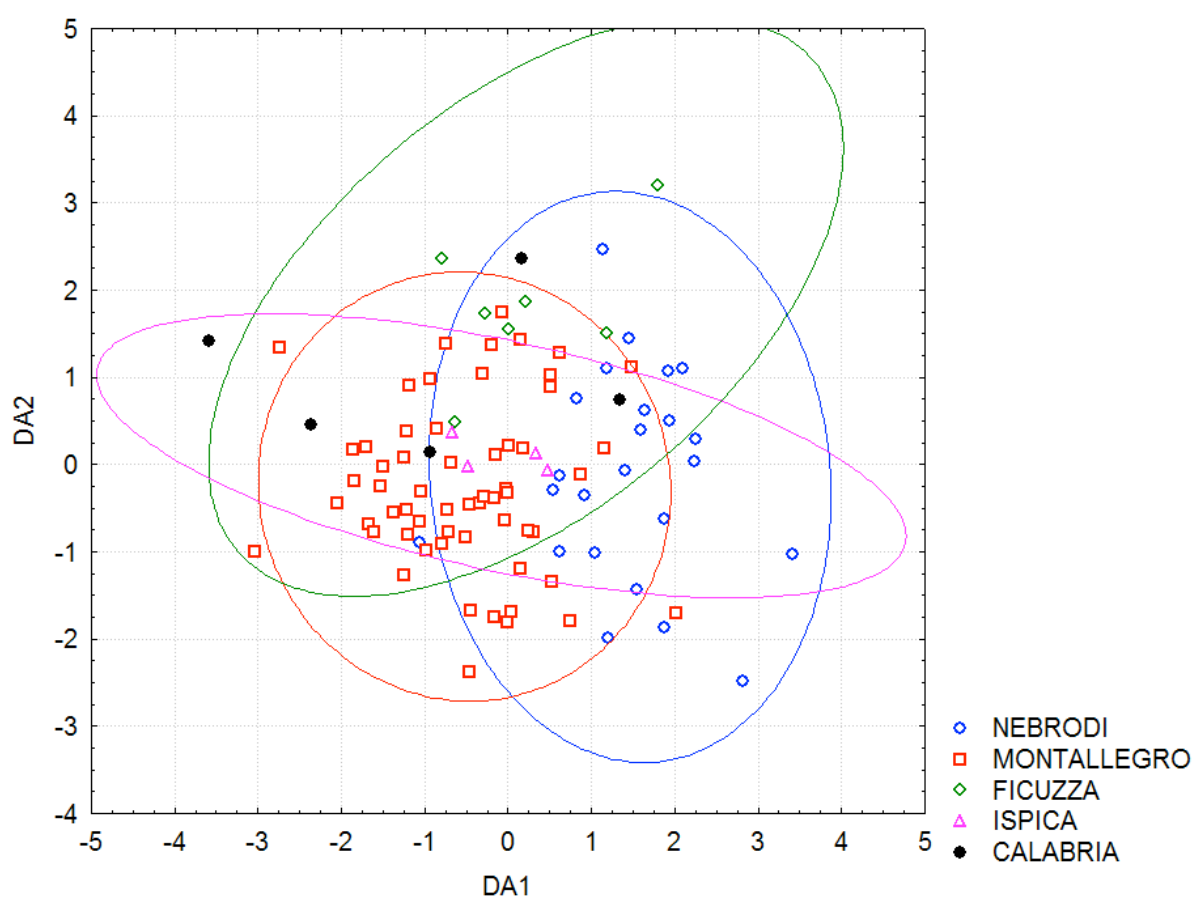


Figura 12 – Plot degli *scores* dei siti di campionamento di *E. trinacris* e *E. orbicularis* sugli assi dei due primi fattori della *Discriminant Analysis* e le ellissi della probabilità al 95% (Blu = Nebrodi; Rosso = Montallegro; Verde = Ficuzza; Rosa = Ispica; Nero = Calabria).

Tabella 15 Tavola riassuntiva dei valori di p delle differenze riscontrate nei confronti a coppie tramite ANOVA e test SNK sulla base delle misure e degli indici morfometrici (BM = peso; CL = lunghezza carapace; CW = larghezza carapace; PL = lunghezza piastrone; PW = larghezza piastrone; SH = altezza corazza; TL = lunghezza coda; CT = distanza cloaca-apice coda). In grassetto i valori significativi per $p < 0,05$.

	NEBRODI vs				MONTALLEGRO vs			FICUZZA vs		ISPICA vs
	MONTALLEGRO	FICUZZA	ISPICA	CALABRIA	FICUZZA	ISPICA	CALABRIA	ISPICA	CALABRIA	CALABRIA
BM	0,263	0,340	0,114	0,201	0,099	0,494	0,550	0,015	0,042	0,592
CL	0,420	0,287	0,177	0,503	0,149	0,433	0,756	0,020	0,133	0,356
CW	0,141	0,602	0,097	0,120	0,116	0,671	0,613	0,041	0,064	0,730
PL	0,254	0,565	0,110	0,255	0,201	0,496	0,660	0,041	0,140	0,491
PW	0,257	0,626	0,045	0,034	0,276	0,288	0,374	0,083	0,077	0,784
SH	0,209	0,732	0,079	0,216	0,177	0,646	0,810	0,117	0,250	0,517
TL	0,192	0,045	0,257	0,091	0,532	0,543	0,541	0,337	0,647	0,441
CT	0,632	0,119	0,450	0,317	0,293	0,876	0,421	0,349	0,487	0,601
CL/BM	0,977	0,707	0,930	0,847	0,446	0,979	0,973	0,775	0,756	0,866
CW/CL	0,138	0,180	0,986	0,135	0,773	0,290	0,769	0,279	0,689	0,187
PW/PL	0,213	0,027	0,401	0,001	0,254	0,966	0,026	0,125	0,204	0,016
SH/PL	0,390	0,141	0,387	0,599	0,453	0,753	0,535	0,458	0,358	0,923
SH/CW	0,505	0,368	0,442	0,619	0,763	0,705	0,537	0,749	0,552	0,579
TL/PL	0,071	0,095	0,053	0,012	0,586	0,721	0,541	0,639	0,380	0,485

Le sequenze mitocondriali del *cytb* sono state utilizzate per il calcolo degli indici di diversità molecolare e di espansione demografica: sono state suddivise per sito di campionamento (Nebrodi, Montallegro, Ficuzza, Ispica), ad eccezione del Molise che, con un'unica sequenza, è stato accorpato alla Calabria.

Infine, è stato creato un gruppo, denominato Sicilia, che accorpa tutte le sequenze ottenute in questo studio con quelle degli aplotipi caratteristici di *E. trinacris*. (**Tabella 16**).

Tabella 16 Statistiche riassuntive per gli aplotipi delle sequenze di *E. trinacris* e *E. orbicularis* (nh = numero di aplotipi, h = diversità aplotipica e deviazione standard (SD_h), π = diversità nucleotidica e SD_π , S = numero di siti polimorfici, D = indice di Tajima), F_S = indice di Fu).

CYTB	nh	h	SD_h	π	SD_π	S	$D^*_{(P<0,05)}$	Fu's $F_S^*_{(P<0,05)}$
NEBRODI	1	0	0	0	0	0	na	na
MONTALLEGRO	2	0,366	0,112	0,00038	0,00012	1	0,48809	0,70789
FICUZZA	1	0	0	0	0	0	na	na
ISPICA	2	0,6	0,129	0,00249	0,00054	4	2,00579	1,67545
CALABRIA e MOLISE	5	0,857	0,137	0,00503	0,00109	11	0,44252	0,16923
SICILIA	6	0,383	0,075	0,00075	0,00017	7	-1,45537	-0,88011
TOTALE	10	0,446	0,076	0,00291	0,00078	21	-1,11734	-0,0428

Gli indici di diversità aplotipica fanno registrare valori bassi per ciascun sito siciliano indicando una certa omogeneità interna delle popolazioni campionate. Ispica, nella Sicilia sud orientale, e Montallegro, lungo la costa centro meridionale, mostrano i valori di diversità aplotipica maggiore ($h = 0,6$ per Ispica e $h = 0,366$ per Montallegro) e un totale di 2 aplotipi ciascuno (**Tabella 16**).

Il valore di diversità aplotipica più elevato ($h = 0,857$ e 5 aplotipi differenti), è stato ottenuto da *E. orbicularis* per il gruppo composto da Calabria e Molise. Il gruppo siciliano, invece, mostra ben 6 aplotipi, ma con un valore di diversità aplotipica pari a $h = 0,383$.

Al fine di individuare gli aplotipi condivisi e verificare l'eventuale presenza di aplotipi esclusivi, è stata costruita la **Tabella 17** tramite la funzione *shared haplotypes* di ARLEQUIN 3.5 (Excoffier et al., 2006). Alla tabella, quindi sono stati aggiunti tutti gli aplotipi siciliani conosciuti e quelli delle sottospecie *E. o. galloitalica* e *E. o. hellenica*.

In questo set di sequenze l'aplotipo 1 è il più rappresentato in Sicilia ed è condiviso da tre siti differenti: Nebrodi, Ficuzza e Montallegro. L'aplotipo in questione non si sovrappone con

nessuno di quelli siciliani già conosciuti e non rientra nemmeno tra quelli *E. orbicularis*. La restante parte dei campioni di Montallegro è rappresentata dall'aplotipo 2 (**Tabella 17**).

Anche la popolazione di Ispica mostra un aplotipo esclusivo (Hap_9), non rappresentato tra quelli conosciuti di tartaruga palustre siciliana. Anche il gruppo composto da Calabria e Molise presenta due aplotipi (Hap_4 e Hap_5) non ancora descritti (**Tabella 17**).

Tabella 17 Tabella degli aplotipi di *E. trinacris* e *E. orbicularis* condivisi. In tabella il numero di individui è suddiviso per popolazione e per ciascun aplotipo. Tra parentesi il numero degli aplotipi totali per ciascuna area e per specie o sottospecie.

Haplotype	NEBRODI (1)	MONTALLEGRO (2)	FICUZZA (1)	ISPICA (2)	<i>E. trinacris</i> (4)	CALABRIA e MOLISE (5)	<i>E. o. galloitalica</i> (4)	<i>E.o. hellenica</i> (10)
Hap_1	24	14	11					
Hap_2		4			1			
Hap_3						1	1	
Hap_4						1		
Hap_5						1		
Hap_6						2		2
Hap_7						1	1	
Hap_8				3	1			
Hap_9				3				
Hap_10						1		1
Hap_11							1	
Hap_12							1	
Hap_13								1
Hap_14								1
Hap_15								1
Hap_16								1
Hap_17								1
Hap_18								1
Hap_19								1
Hap_20								1
Hap_21					1			
Hap_22					1			

Al fine di chiarire i rapporti tra i nuovi aplotipi identificati e quelli già conosciuti, è stato costruito il network di parsimonia riportato in Figura 13. I risultati dello studio confermano che il *range* di distribuzione degli aplotipi di *E. trinacris* e delle sottospecie *E. o. hellenica* e *E. o. galloitalica* rispecchia quello geografico rispettivamente degli aplotipi dei lignaggi III, IV e V (Pedall et al, 2011).

Sono stati identificati 4 nuovi aplotipi: 2 per *E. trinacris* (III_f e III_g), 1 per *E. o. hellenica* (IV_l) e 1 per *E. o. galloitalica* (V_e) (Figura 13).

L'aplotipo IIIf sembra essere diffuso in buona parte della Sicilia, essendo presente sui Nebrodi, a Ficuzza e a Montallegro, mentre IIIg è presente solo a Ispica.

L'aplotipo IIIf differisce di uno step mutazionale rispetto a IIIb, che nel network lo precede: IIIf è, quindi, il punto di partenza da cui si differenziano i restanti aplotipi, distanti da un minimo di uno step (IIIe e IIIc) a un massimo di quattro (IIIg) (Figura 13).

Per quanto concerne le sequenze calabre, nella Piana di Sant'Eufemia coesistono le due sottospecie *E. o. galloitalica* ed *E. o. hellenica*. Gli individui campionati oltre a rispecchiare la distribuzione conosciuta (Pedall et al. 2011) presentano un aplotipo non descritto, Ve, posto ad uno step da Vc (Figura 13)

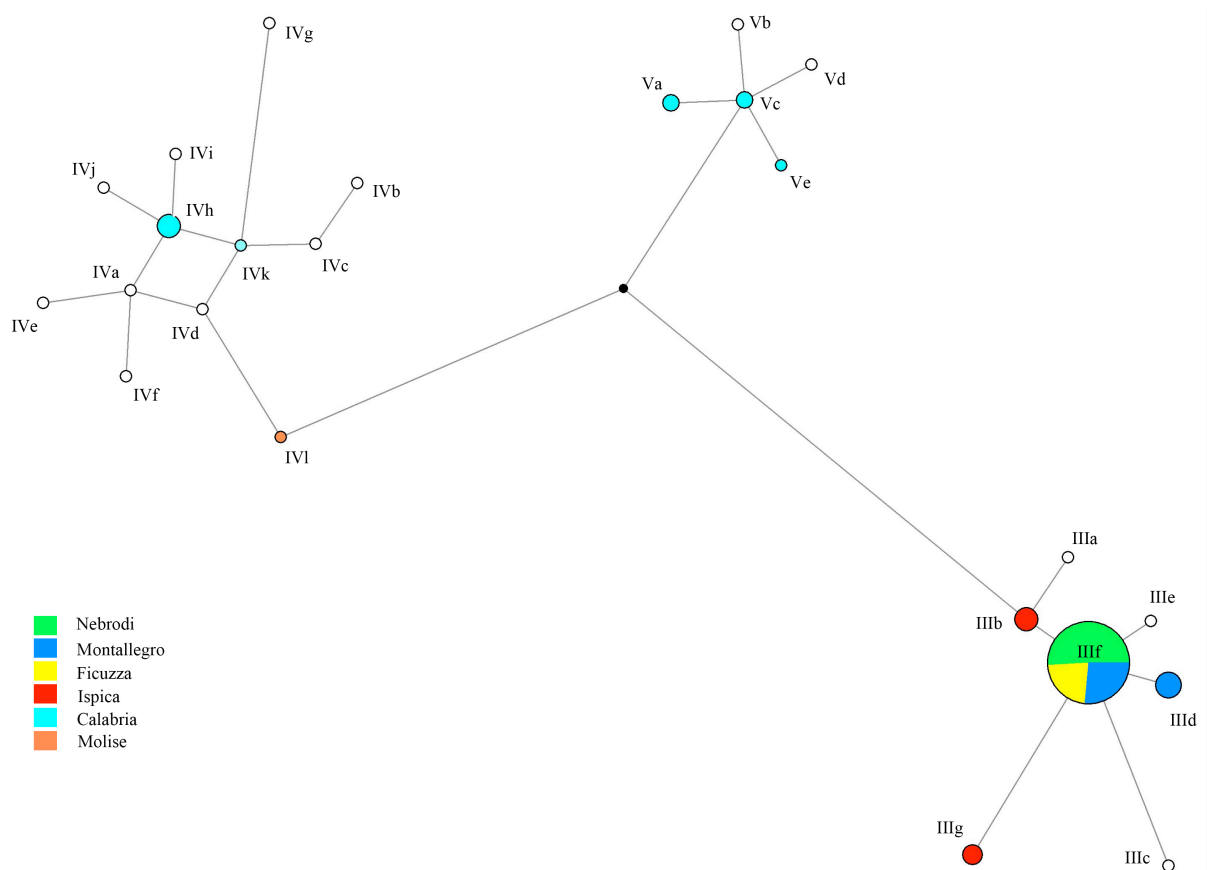


Figura 13 – Network di parsimonia per gli aplotipi mitocondriali di *Emys orbicularis* e *E. trinacris* basato sul marcatore *cyt b*. La dimensione dei cerchi è funzione della frequenza degli aplotipi. I cerchi neri indicano gli aplotipi mancanti, i bianchi gli aplotipi già conosciuti e, in ultimo, quelli colorati sono gli aplotipi rappresentati nei siti campionati.

Infine, l'aplotipo IVl, riscontrato nell'individuo campionato in Molise, si distanzia da IVd, primo aplotipo conosciuto di *E. o. hellenica*, di due posizioni mutate.

L'AMOVA è stata effettuata raggruppando tutte le sequenze (già suddivise per sito di campionamento) per specie di appartenenza al fine di verificare statisticamente la distanza genetica tra le sequenze più meridionali dell'areale della tartaruga palustre europea e quelle siciliane ottenute nel corso di questo studio.

L'analisi condotta ha mostrato delle differenze significative tra le specie con una percentuale di variazione del 33,5% e un valore di F_{CT} di 0,335 (**Tabella 18**). Tale differenza è stata riscontrata anche nel confronto tra popolazioni all'interno delle specie (19,85% di variazione, $F_{SC} = 0,299$) e tra tutte le popolazioni (46,65% di variazione, $F_{ST} = 0,533$) (**Tabella 18**).

Tabella 18 Tabella riassuntiva di AMOVA condotta tra le specie *E. trinacris* e *E. orbicularis*.

Comparison levels	Source of variation	% variation	Fixation indices	F-statistic	P<0,05
Inter-species	Among species (<i>E. trinacris</i> vs <i>E. orbicularis</i>)	33,5	Φ_{CT}	0,335	0,05
	Among populations within species	19,85	Φ_{SC}	0,299	0,00
	Within populations	46,65	Φ_{ST}	0,533	0,00

Il confronto a coppie, riassunto in **Tabella 19**, chiarisce i rapporti reciproci tra siti campionati. Risaltano le differenze tra le popolazioni siciliane ad eccezione del confronto Nebrodi – Ficuzza. Le differenze presenti anche tra i siti e il gruppo *E. trinacris* sono probabilmente giustificabili con la presenza degli aplotipi non ancora descritti.

Tabella 19 Confronto a coppie della distanza genetica tra i siti e le specie, calcolata come *pairwise* F_{ST} . In grassetto i valori di F_{ST} significativi ($P<0,05$)

Φ_{ST}	NEBRODI	MONTALLEGRO	FICUZZA	ISPICA	<i>E. trinacris</i>	CALABRIA MOLISE	<i>E. o. hellenica</i>
NEBRODI							
MONTALLEGRO	0,212						
FICUZZA	0,000	0,124					
ISPICA	0,690	0,536	0,529				
<i>E. trinacris</i>	0,482	0,199	0,285	0,186			
CALABRIA e MOLISE	0,872	0,822	0,786	0,632	0,645		
<i>E. o. hellenica</i>	0,940	0,910	0,902	0,797	0,831	0,278	
<i>E. o. galloitalica</i>	0,985	0,954	0,970	0,839	0,860	0,290	0,787

Le analisi di ML e Bayesiana hanno prodotto degli alberi dalla topologia confrontabile, per cui è stato riportato solo l'albero di ML ma con il supporto ai nodi di entrambe le analisi: sopra il valore di bootstrap (> 50) e sotto i valori di probabilità *a posteriori* ($pp > 70$).

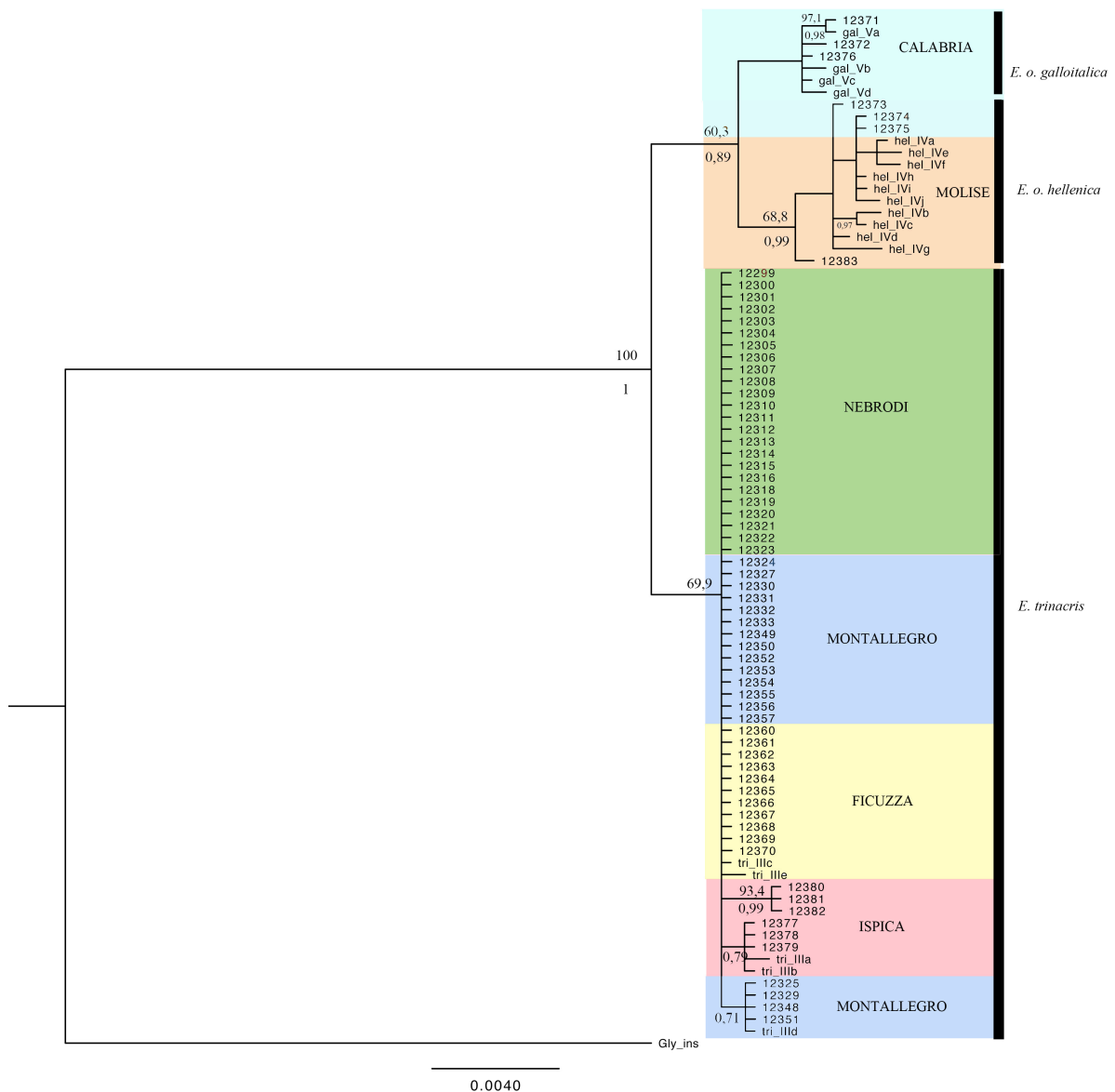


Figura 14 – Albero di massima verosimiglianza basato sull'analisi di *cytb Emys orbicularis* e *E. trinacris*. I numeri sopra i nodi sono relativi ai valori di *bootstrap* maggiori a 50; i numeri sotto i nodi sono presenti quando la probabilità *a posteriori* a supporto del nodo stesso è superiore a 0,70.

L'albero ottenuto mostra una suddivisione in due gruppi distinti, ben supportati, riconducibili alle due specie oggetto di studio: *E. trinacris* ed *E. orbicularis*.

Il clade delle tartarughe siciliane presenta dei nodi non sostenuti da consistenti valori di bootstrap e di *pp* che chiariscono i rapporti tra le popolazioni, ad eccezione di un gruppo di

individui campionati a Ispica che si differenzia rispetto agli altri (bootstrap = 93,4; $pp = 0,99$) (Figura 14). Questo gruppo è riconducibile all'aplotipo IIIg (Figura 13).

Anche i rapporti tra le sottospecie *E. o. hellenica* e *E. o. galloitalica* non sembrano essere chiariti: infatti il supporto al nodo che li separa presenta valori di bootstrap e di pp relativamente bassi (bootstrap = 69,3; $pp = 0,89$).

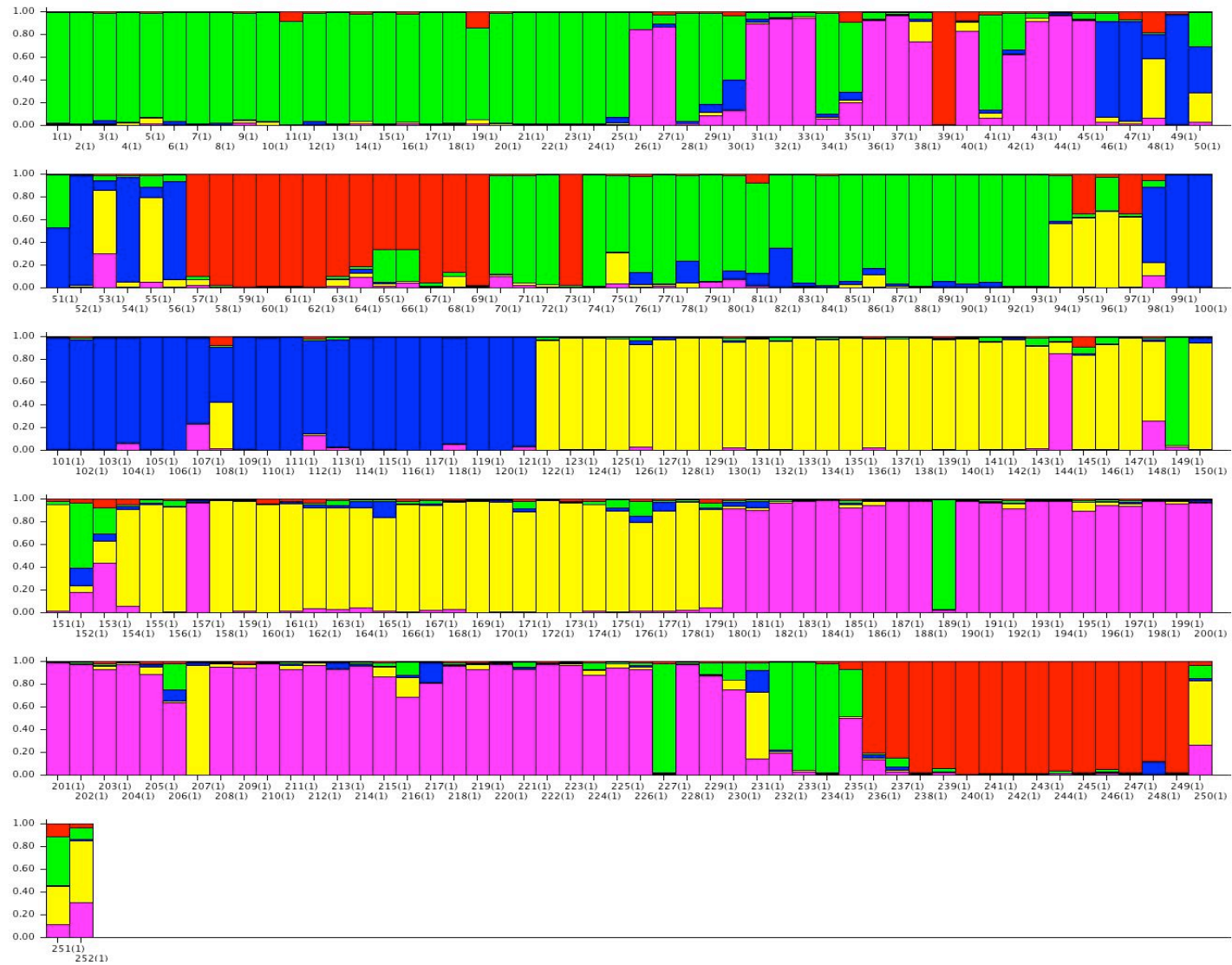
I 15 loci microsatellite studiati sono altamente polimorfici con un numero di alleli variabile tra 15 e 40 per locus e un totale di 373 (**Tabella 7** Loci microsatellite, multiplex utilizzate, numero e range di taglia degli alleli. I primer forward sono stati coniugati con sostanze fluorescenti.).

I risultati del metodo DeltaK (Evanno et al. 2005) mostrano per $K=5$ un pattern ben risolto con 4 clusters per *E. trinacris* e 1 per *E. orbicularis* (Figura 15).

Gli individui dei Nebrodi e in generale della provincia di Messina sono colorati in verde. Sono presenti alcuni individui ibridi che mostrano influenze alleliche dell'area codificata in giallo, di cui fanno parte gli individui campionati nella provincia trapanese (Alcamo, Marsala e Mazara del Vallo). In verde sono etichettati anche alcuni campioni della provincia di Agrigento (Montallegro, Siculiana e Licata) ma la maggior parte dei campioni provenienti da questa area sono evidenziati in rosa. Anche in questo caso sono presenti degli ibridi con l'area trapanese e quella della provincia di Palermo (Corleone e Ficuzza) indicata in blu. Ficuzza presenta 4 individui ibridi che hanno ricevuto le influenze alleliche di tutte le aree siciliane (Figura 15).

Tutti i campioni calabresi e quello del Molise appartenenti alla specie *E. orbicularis*, sono indicati dal colore rosso. I risultati ottenuti con STRUCTURE mostrano che gli alleli caratteristici di questa specie sono presenti anche nell'area orientale della Sicilia, sia con individui puri (Siracusa, Ragusa e Messina) che con ibridi con le popolazioni siciliane (Palermo, Messina e Agrigento) (Figura 15).

Figura 15 – Grafico dei clusters ottenuti con STRUCTURE ($K=5$). Ciascun segmento è relativo ad un individuo analizzato. I colori verde, giallo, blu e rosa sono tipici di *E. trinacris* mentre il rosso di *E. orbicularis* →



Le analisi filogenetiche condotte sulle sanguisughe hanno prodotto due alberi dalla identica topologia, per cui è stato riportato un solo albero sia con i valori di bootstrap che di *pp* posti rispettivamente sopra e sotto i nodi (Figura 16)

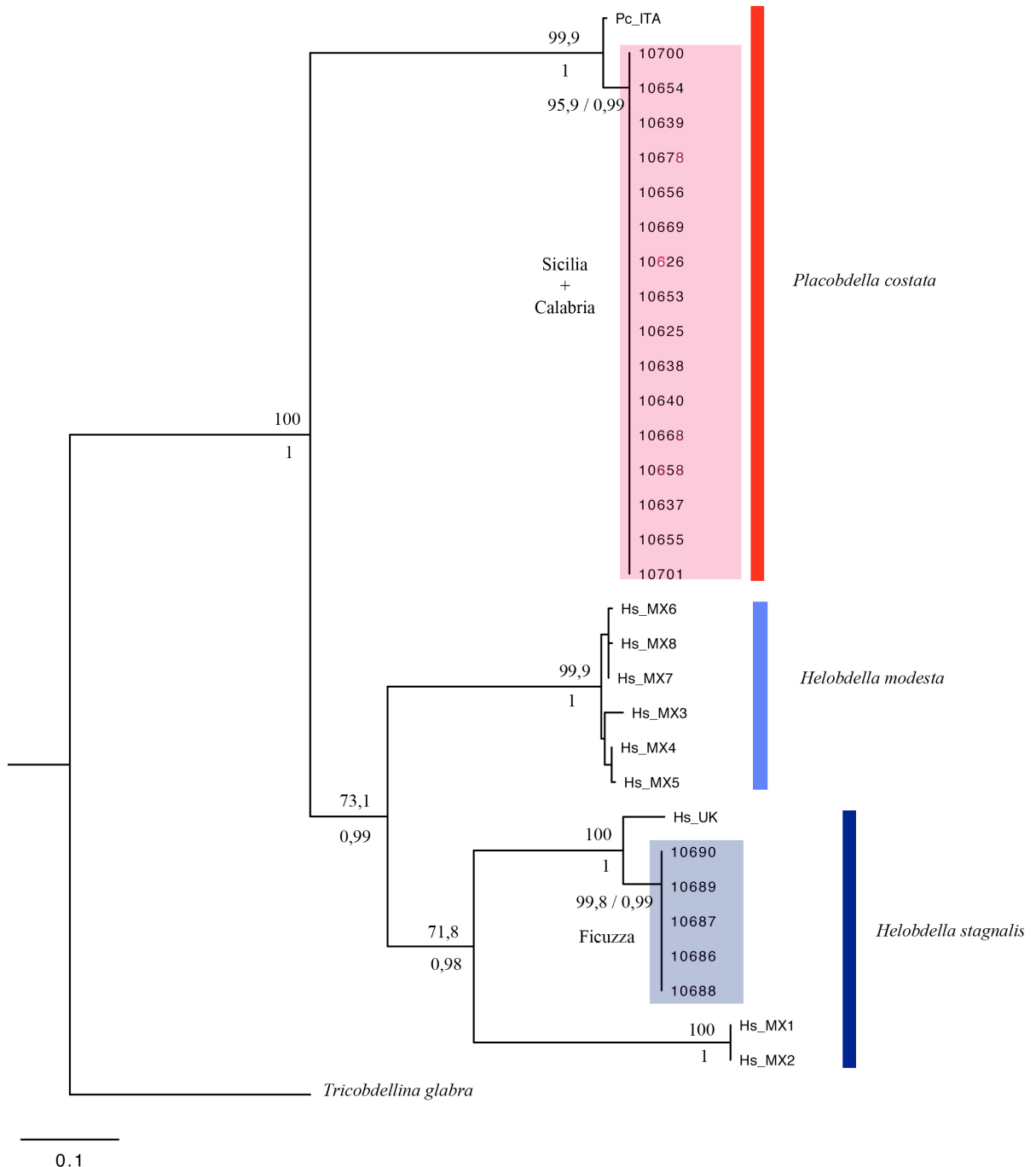


Figura 16 – Albero di massima verosimiglianza basato sull’analisi di COI delle sanguisughe trovate su *Emys orbicularis* e *E. trinacris*. I numeri sopra i nodi sono relativi ai valori di *bootstrap* maggiori a 70; i numeri sotto i nodi sono presenti quando la probabilità *a posteriori* a supporto del nodo stesso è superiore a 0,90.

Il gruppo monofiletico di *P. costata* è separato in due cladi: uno relativo alle sanguisughe provenienti sia dalla Sicilia che dalla Calabria e uno composto dall'unica sequenza disponibile su Genbank per questa specie, relativa ad un individuo campionato in una località italiana non specificata (Siddal et al., 2005) (Figura 16).

Il gruppo di *H. stagnalis* ha mostrato una divisione interna in due entità differenti (Figura 16). La prima entità è relativa alle sanguisughe nord americane, in un primo momento associate a *H. stagnalis* ma successivamente riclassificate come *H. modesta* (Siddall et al., 2005).

La seconda è relativa a *H. stagnalis sensu strictu*, ma raggruppa al suo interno altri due gruppi separati da un nodo ben supportato: un clade con le sequenze di Ficuzza insieme ad un campione del Regno Unito e un clade formato da due sequenze americane. A loro volta le sequenze siciliane di *H. stagnalis* si differenziano da quella inglese e il nodo alla base della separazione è confermato da un supporto di bootstrap e di *pp* elevato (Figura 16).

4. DISCUSSIONE

4.1 *Mauremys leprosa*

I risultati ottenuti dagli studi filogenetici di *Mauremys leprosa* disegnano un quadro abbastanza chiaro sui rapporti tra le popolazioni di questa specie. I valori degli indici molecolari e la presenza di aplotipi esclusivi mettono in risalto la grande diversità genetica dei campioni marocchini (**Tabella 9**, **Tabella 10**, **Tabella 11** e **Tabella 12**).

Dai risultati di AMOVA sono emerse le differenze tra le popolazioni del Marocco settentrionale e quelle a sud della catena montuosa dell'Atlante: le prime mostrano degli aplotipi condivisi con la Penisola Iberica, mentre le seconde solo aplotipi esclusivi che, ad un'attenta analisi, sono riconducibili ai bacini idrici presenti nell'area geografica di riferimento. È plausibile che le popolazioni marocchine meridionali siano isolate tra loro per la forte azione di filtro esercitata dal deserto del Sahara. La frammentazione genetica e gli aplotipi esclusivi delle popolazioni meridionali lasciano supporre che queste rappresentano i popolamenti più antichi e indicano che le popolazioni periferiche giocano un ruolo nell'evoluzione delle tartarughe palustri del Palearctico occidentale. Effetto del fondatore, inbreeding e deriva genetica di queste popolazioni, tipicamente molto piccole, comportano una differenziazione genetica distintiva in un breve lasso di tempo (Fritz et al., 2006a).

In accordo con quanto riportato da Fritz et al. (2006), le popolazioni del Maghreb orientale sono più vicine a quelle presenti a sud del Marocco. La differenza statistica riscontrata da AMOVA con le popolazioni Tunisine è ascrivibile solo alla variabilità interna di queste ultime. Infatti, le sequenze ottenute dagli individui campionati nel corso di questo studio rivelano la presenza di 5 nuovi aplotipi (**Tabella 10**).

Anche l'analisi filogenetica condotta, supporta l'elevata diversità interna delle popolazioni del Marocco, rappresentate in tutti e tre i cladi principali dell'albero ottenuto (**Figura 8**).

Un pattern di questo tipo suggerisce che l'area marocchina sia l'hot-spot di diversità genetica della specie e, probabilmente, il suo centro di diversificazione ovvero l'area che ne ospita i popolamenti più antichi.

Da qui *M. leprosa* avrebbe, in tempi relativamente recenti, colonizzato attivamente il Maghreb centro-orientale e la Penisola Iberica, con propaguli provenienti rispettivamente da popolazioni presenti a sud e a nord della catena dell'Atlante.

Successivamente sarebbe avvenuta una ricolonizzazione del Marocco settentrionale da parte delle popolazioni Iberiche (Fritz et al., 2006a). La vicinanza genetica delle popolazioni di *M. leprosa* presenti ai due lati dello stretto di Gibilterra ($F_{ST} = 0,053$ n.s.; **Tabella 12**) potrebbe essere attribuita alla crisi di salinità del Messiniano (tardo Miocene, circa 5 Ma, Duggen et al., 2003) ed ai bassi tassi evolutivi del mtDNA che caratterizzano i testudinati (0,25%/Ma invece del 2%/Ma dei vertebrati in generale; Avise et al., 1992).

A supporto di questa tesi ci sono i reperti fossili più antichi di *M. spp.* (Rusciano, 5.4-3.4 Ma) ritrovati in Algeria (Aïn Boucherit, Constantine Province) ed in Tunisia (Lapparent de Broin, 2000). I fossili europei che accerterebbero la presenza della tartaruga palustre iberica nel nostro continente, sono molto più recenti e risalgono al medio Pliocene (Mealhada, Portogallo).

Gli esiti di questo studio confermano ancora una volta che la biogeografia di questa specie non è influenzata dallo stretto di Gibilterra. La catena montuosa dell'Atlante invece costituisce un importante filtro che separa le popolazioni marocchine senza però rappresentare una barriera invalicabile.

Il rinvenimento di aplotipi esclusivi e ben caratterizzati nell'area di Marrakech, apparentemente priva di forti barriere biogeografiche, fa riflettere sulle cause che possano giustificare l'isolamento delle popolazioni presenti. Tuttavia, gli studi molecolari condotti non consentono di elevare di rango la sottospecie *M. leprosa marokkensis*, che trova in quest'area la sua *terra typica*.

Infine, la presenza di un singolo individuo appartenente al gruppo marocchino settentrionale all'interno del clade (iii), che include i campioni provenienti dalle popolazioni tunisine, algerine e del Marocco meridionale (**Figura 8**), è del tutto inaspettata.

In quest'ultimo caso, è verosimile che si tratti di un individuo introdotto per intervento dell'uomo, fenomeno certamente non trascurabile nell'ambito di animali da sempre oggetto di raccolta, allevamento e commercio a fini amatoriali.

Non si può, tuttavia, escludere completamente l'ipotesi che si tratti di una colonizzazione recente di aree settentrionali, ad opera di singoli individui provenienti dal sud del Marocco o dall'area occidentale dell'Algeria.

4.2 *Emys orbicularis* s.l.

Emys orbicularis

Dai risultati ottenuti, sembra chiaro che l'area nord africana è rappresentata da due differenti entità genetiche abbastanza distinte: l'aplotipo VI in Marocco e l'aplotipo IX (apparentemente endemico) in Algeria e Tunisia. L'aplotipo VI è condiviso con le popolazioni dell'area iberica (Figura 9).

L'analisi di ML (Figura 10), individua un clade ben supportato che comprende tutta la regione occidentale del Mediterraneo. Di questo clade fanno parte due *sister group*: uno che raggruppa le sequenze tunisine e algerine e uno invece suddiviso tra l'area del Rif e della catena dell'Altante in Marocco e la Penisola Iberica.

Questi risultati chiariscono le relazioni filogenetiche tra le popolazioni magrebine, tuttavia, rimane il dubbio su quali siano state le dinamiche che hanno portato all'attuale distribuzione degli aplotipi.

È generalmente accettato che il nord Africa e la Penisola Iberica furono temporaneamente in contatto durante la crisi di salinità del Messiniano (tardo Miocene, 5,5 Ma), quando il bacino del Mediterraneo andò incontro ad un abbassamento del livello delle acque dovuto all'evaporazione.

Le teorie inizialmente proposte sulla distribuzione di *E. orbicularis*, basate sui ritrovamenti fossili (Blain *et al.*, 2011), prevedevano che fosse arrivata in nord Africa passando dalla Penisola Iberica. Tali teorie sono in disaccordo con quanto ottenuto dai dati molecolari (Figura 9): il network mostra come i campioni marocchini dell'aplotipo VI siano collocati in posizione basale rispetto a quelli iberici, il che li classifica come più antichi.

Considerando, inoltre, la stretta relazione filogenetica dei campioni nord-africani con l'aplotipo V (coste del Mediterraneo nord-occidentale) è possibile ipotizzare che sia esistito un antenato comune europeo che abbia colonizzato il Marocco e il resto del nord Africa, dando origine a delle popolazioni diversificatesi in seguito. Quindi, dal Marocco potrebbe essere partita una ricolonizzazione della Penisola Iberica.

L'area sorgente di questo antenato comune rimane, però, un'incognita e le ipotesi possibili non trovano riscontro.

Le due aree sorgente potrebbero essere i) la Penisola Iberica, supponendo che tale popolazione sia andata incontro a estinzione e ii) l'area appenninica e la Sicilia: tuttavia, la

Sicilia è occupata da un'entità distinta - quale è *E. trinacris* - che non è geneticamente affine ai lignaggi africani o all'area occidentale del Mediterraneo.

Un aspetto da tenere in considerazione, che non semplifica la comprensione dei pattern filogeografici di questa specie nell'area magrebina, è che i reperti fossili non supportano la teoria secondo cui *E. orbicularis* abbia ricolonizzato la Penisola Iberica da Marocco. Infatti, i reperti iberici sono considerevolmente più antichi rispetto a quelli nord africani (Pleistocene inferiore, circa 1,4-1.3 Ma; Blain *et al.*, 2011).

È da considerare, tuttavia, che tali reperti hanno carattere frammentario e non sono riconducibili con certezza alla popolazione che, dopo aver colonizzato il Marocco, sia andata incontro a estinzione (Blain *et al.*, 2011). I primi fossili identificabili morfologicamente con certezza, fino al livello di specie, sono molto più recenti (370.000-320.000 anni fa; Fritz, 1995).

Benché i fossili forniscano un aiuto importante alla comprensione delle dinamiche che hanno portato agli attuali pattern filogeografici delle specie, in alcuni casi, non possono essere presi in considerazione. Un esempio è rappresentato dai casi in cui, in seguito a estinzione locale, le popolazioni vengono sostituite da altre conspecifiche (*E. orbicularis* e *Testudo hermanni* in Corsica e Sardegna; Giacalone *et al.* 2009; Pedall *et al.*, 2011; Perez *et al.*, 2013).

A tal proposito, in attesa di eventuali nuovi dati sui fossili di tartarughe dell'area betico-rifana, sembra più opportuno non tenere conto dello scenario prospettato dallo studio dei reperti, una colonizzazione dalla Penisola Iberica al nord Africa, e accettare, invece, quello risultante dalle analisi sul DNA mitocondriale che prevede un flusso di senso opposto.

Emys trinacris

La tartaruga palustre siciliana è considerata una specie criptica in quanto morfologicamente indistinguibile dalla specie sorella europea (Fritz *et al.*, 2005b).

Le campagne di campionamento effettuate hanno permesso di raccogliere dati morfometrici da 4 differenti popolazioni siciliane e da un sito calabro (Figura 6).

I siti di campionamento presentano delle caratteristiche ambientali differenti. Il sito dei Nebrodi è localizzato all'interno della zona A dell'omonimo parco, ad un'altitudine di circa 1000m. Anche il sito di Ficuzza è situato all'interno di un parco ad un'altitudine di circa 800m. Il sito di Montallegro è l'unico invaso artificiale campionato ed è situato a pochi km dal mare. Anche il sito di Ispica è poco distante dal mare, in un canale che sfocia in una serie

di laghi salmastri costieri. Anche il sito calabro, la palude di Imbutillo, è situato a poca distanza dal mare e per alcuni periodi dell'anno rimane in secca.

L'ANOVA condotta tra i siti ha mostrato relativamente poche differenze significative (**Tabella 15**). Tuttavia la forma del piastrone (PW/PL) ha fatto registrare un valore significativamente maggiore (**Tabella 13**) tra alcune popolazioni siciliane e la Calabria, dove è presente la specie *E. orbicularis*.

In particolare tale parametro differisce sia a livello intraspecifico (Nebrodi vs Ficuzza) che interspecifico (Nebrodi e Montallegro vs Calabria) (**Tabella 15**).

A supporto dei risultati ottenuti con ANOVA, i dati analizzati con la PCA e la DA si distribuiscono rispettivamente secondo l'asse della PC1 e DA1 che variano in funzione della forma del piastrone (**Figura 11, Figura 12**).

Le maggiori dimensioni, con una forma del piastrone più larga, potrebbe favorire la produzione di uova nelle femmine (Zuffi et al., 1999; D'Angelo et al., 2008; Fritz et al., 2006b).

Tuttavia non è possibile ipotizzare una causa che possa spiegare, senza incertezze, le differenze ottenute e le correlazioni a un ruolo ecologico funzionale. Bisogna, infatti, considerare le profonde differenze ecologiche tra i Nebrodi e Montallegro, che però presentano delle popolazioni accomunate da una variabile morfometrica differente rispetto alle altre popolazioni campionate della stessa specie e della sorella congenerica.

Il network di parsimonia evidenzia i rapporti tra gli aplotipi delle tartarughe palustri siciliane e calabre, queste ultime suddivise nelle due sottospecie *E. o. hellenica* (IV) e *E. o. galloitalica* (V). I rapporti filogenetici ottenuti rispecchiano quanto già conosciuto sulle specie oggetto di studio e le sequenze degli individui analizzati seguono la distribuzione geografica degli aplotipi mitocondriali (Lenk et al., 1999; Fritz et al., 2005b; 2007; Pedall et al., 2011). Tuttavia, le analisi mitocondriali hanno permesso di individuare dei nuovi aplotipi sia per *E. trinacris* che *E. orbicularis* (**Tabella 17** e Figura 13).

L'aplotipo IIIf raggruppa individui provenienti dai Nebrodi, da Ficuzza e in parte da Montallegro, abbracciando così un'estesa parte della Sicilia. L'aplotipo IIIg invece è esclusivo di tre individui catturati presso il Canale Longarini, ad Ispica.

I campioni calabresi sono stati catturati nel confine meridionale dell'areale di *E. orbicularis*: la piana di Sant'Eufemia. Questa area è risultata essere una zona in cui le sottospecie *E. o. hellenica* e *E. o. galloitalica* vengono a contatto: infatti le sequenze si dividono equamente tra gli aplotipi caratteristici delle due e in più presentano un nuovo aplotipo del lignaggio V (Vf;

Figura 13). La sola sequenza molisana, si allinea al pattern di distribuzione geografica della specie, mostrando però un nuovo aplotipo del lignaggio IV, proprio di *E. o. hellenica* (IV1; Figura 13).

L'analisi Bayesiana e di ML non apportano delle informazioni in più rispetto a quanto già presente in letteratura (Lenk et al., 1999; Fritz et al., 2005b; 2007; Pedall et al., 2011). Tuttavia è da sottolineare che tali analisi supportano quanto rilevato dall'analisi di parsimonia, relativamente all'aplotipo IIIg, individuato per Ispica (Figura 14).

Le analisi sui microsatelliti hanno permesso di strutturare i campioni siciliani in 4 popolazioni, i cui confini non sono perfettamente sovrapponibili con quelli geografici: a grandi linee è possibile suddividere i campioni tra le popolazioni in funzione delle province di appartenenza. I campioni calabresi, invece, sono stati raggruppati in una popolazione. (Figura 15).

Il risultato più interessante di queste analisi, che va in controtendenza rispetto a quanto conosciuto sulla biogeografia delle tartarughe palustri europee, è rappresentato dalla presenza di alcuni individui siciliani che mostrano alleli caratteristici di *E. orbicularis*: questi sono presenti nell'area orientale della Sicilia con individui puri (Siracusa, Ragusa e Messina) e con ibridi con le popolazioni siciliane (Palermo, Messina, Agrigento e Ragusa) (Figura 15).

Lo studio di Pedall et al. (2011) non ha trovato alcuna prova del flusso genico tra *E. orbicularis* e *E. trinacris* attraverso lo Stretto di Messina. Inoltre, utilizzando otto loci microsatelliti, questi autori hanno trovato una chiara delimitazione tra *E. o. galloitalica* e *E. o. hellenica*. Utilizzando 15 loci microsatelliti è stato possibile dimostrare che il flusso genico attraverso lo Stretto di Messina esiste. Tuttavia, le analisi con i marcatori mitocondriali evidenziano chiaramente la diversificazione tra le specie e supportano quanto riportato in letteratura (Lenk et al., 1999; Fritz et al., 2005b; 2007; Pedall et al., 2011).

Quindi siamo in presenza di tartarughe siciliane che mostrano aplotipi mitocondriali "locali" e contemporaneamente genotipi tipici di *E. orbicularis*.

Tale modello potrebbe essere spiegato da un vecchio evento di ibridazione che la STRUCTURE Analysis non è in grado di identificare (Sanz et al. 2009).

Quello che resta da chiarire sono le cause che hanno portato all'introduzione di linee genetiche europee in Sicilia.

La scarsa diffusione di queste linee genetiche potrebbe essere spiegata dal trasporto ad opera dell'uomo di alcuni individui di *E. orbicularis*. È noto, purtroppo, che questi animali sono oggetto di raccolta, allevamento e commercio a fini amatoriali.

Tuttavia non è possibile escludere che l'introggressione sia avvenuta naturalmente, specie se si considera che lo Stretto di Gibilterra, ampio circa 15 km, non ostacola in nessun modo significativo il flusso genico tra le popolazioni marocchine e quelle spagnole di *E. o. occidentalis* (Stuckas *et al.*, 2014) o di *Mauremys leprosa* (Fritz *et al.*, 2006a).

Le difficoltà di espansione, quindi, potrebbero essere dovute a condizioni ambientali che favoriscono le linee siciliane rispetto a quelle europee.

Il genere *Placobdella* è considerato un clade dell'America settentrionale, con l'unica eccezione rappresentata da *P. costata*, del cui areale fa parte anche l'Europa. Allo stesso modo, il genere *Emys* è considerato di origine americana e probabilmente si è distribuito nella regione paleartica durante il terziario (Siddall *et al.*, 2005). Reperti fossili e dati genetici suggerirebbero che *P. costata* sarebbe arrivata in Europa insieme ad *Emys* nel Miocene inferiore (Fritz, 1998; Lenk *et al.*, 1999).

La specie *Helobdella stagnalis* non è mai stata segnalata come parassita di *Emys trinacris*. Era considerata diffusa in Europa e in America, ma gli studi filogenetici di Siddall *et al.* (2005) hanno relegato le linee americane alla specie *H. modesta*.

Dalle analisi filogenetiche non è emersa alcuna differenza tra le sanguisughe parassite di tartarughe siciliane e quelle calabre e il gruppo di *P. costata* risulta suddiviso in due cladi: uno relativo alle sanguisughe provenienti dalla Sicilia e dalla Calabria e uno composto dall'unica sequenza disponibile su Genbank per questa specie, di un individuo campionato in una località italiana non specificata (Siddall *et al.*, 2005) (Figura 16).

Le sequenze di *H. stagnalis* sono raggruppate in un clade differente rispetto a quello in cui è presente il campione del Regno Unito, sebbene insieme formino un unico gruppo (Figura 16).

La filogenesi delle sanguisughe non segue quella delle tartarughe palustri europea e siciliana. I pattern filogenetici mitocondriali del parassita non rispecchiano quelli dell'ospite, per cui non è possibile distinguere una separazione geografica tra gli individui ai due lati dello stretto.

Non sono chiare le cause che portano alla separazione tra le sequenze ottenute nell'ambito di questo studio e quelle di riferimento. L'assenza di un adeguato campionamento lungo l'areale delle due specie, non permette di comprendere e valutare appieno i pattern filogeografici che li caratterizzano.

La segnalazione dell'associazione tra *P. costata* e *E. trinacris*, e soprattutto tra questa e *H. stagnilis* è un passo in più verso la conoscenza degli aspetti biologici della tartaruga palustre siciliana.

5. CONCLUSIONI

Lo studio della filogeografia delle tartarughe palustri dell'area mediterranea occidentale è stato affrontato sotto numerosi aspetti.

Sono stati studiati i rapporti reciproci tra le specie *M. leprosa*, *Emys orbicularis* e *E. trinacris*, e le rispettive popolazioni. È stata verificata la distribuzione degli aplotipi delle specie oggetto dello studio, quindi è stato valutato l'impatto delle barriere geografiche su di essa.

Dai risultati ottenuti è stato possibile confermare che le popolazioni di *M. leprosa* non sono influenzate dallo stretto di Gibilterra (Fritz et al., 2006a) come lo sono invece quelle di *E. trinacris* dallo stretto di Messina (Lenk et al., 1999; Fritz et al., 2005b; 2007; Pedall et al., 2011). I risultati ottenuti sulla distribuzione di *E. orbicularis* in Maghreb (Stuckas et al., 2014), confermano che Gibilterra non costituisce una barriera per queste tartarughe.

Sembra quasi innaturale che uno stretto di appena 3 km possa dividere più di uno di 15 km, eppure i risultati delle analisi mitocondriali non lascerebbero spazio ad interpretazioni. Nell'ambito di questo studio è stato ampliato il campionamento spaziale di *E. trinacris* ed è stato coperto il campionamento dei siti più meridionali dell'areale di *E. o.* nella penisola italiana. Le analisi filogenetiche sul *cytb* confermano quanto descritto in letteratura (Lenk et al., 1999; Fritz et al., 2005b; 2007; Pedall et al., 2011): esiste una barriera posta in corrispondenza dello stretto di Messina e le due specie sono nettamente separate.

Le tartarughe palustri dell'area mediterranea occidentale, così, presenterebbero due differenti modelli, diametralmente opposti, di distribuzione in relazione alla presenza di uno stretto marino: da un lato non rappresenta un ostacolo alle connessioni tra popolazioni, dall'altro invece si erge a barriera biogeografica, separando due entità ben caratterizzate geneticamente.

Tuttavia, uno dei risultati più importanti presentati, riguarda l'analisi dei microsattelliti che ha rilevato la presenza di un flusso genico tra la sponda siciliana e quella calabra. I genotipi calabresi sono presenti con linee pure in Sicilia orientale e con ibridi in buona parte dell'isola.

La discordanza con i risultati mitocondriali può essere spiegata da un limite dell'analisi sulla struttura delle popolazioni: infatti questo tipo di analisi non è in grado di individuare antichi eventi di ibridazione. Resta da chiarire se l'introggressione sia dovuta a cause naturali o antropiche.

Lo studio delle popolazioni di *E. orbicularis* tunisine ha permesso di escludere l'ipotesi di un flusso genico tra queste e le congeneriche siciliane (Stuckas et al., 2014).

Le tartarughe tunisine, insieme a quelle algerine, mostrano degli aplotipi esclusivi che potrebbero derivare da alcune delle più antiche popolazioni di *E. orbicularis* dell'area betico-rifana. Infatti, dai risultati ottenuti è stato possibile ipotizzare che le tartarughe tunisine e algerine abbiano colonizzato l'intero Maghreb e successivamente la Penisola Iberica.

In considerazione delle basse densità presentate dalle popolazioni maghrebine sarebbe auspicabile la creazione di misure speciali di conservazione *ad hoc*.

Infine sono stati trattati alcuni aspetti relativi alla biologia di *E. trinacris*: parametri morfometrici e parassiti.

Le analisi condotte sulle misure lineari e sugli indici morfometrici di *E. trinacris* hanno permesso di individuare una sola variabile discriminante: l'indice di forma del piastrone (PW/PL). Questo rapporto è maggiore nella popolazione dei Nebrodi e di Montallegro rispetto alle altre siciliane e a quelle calabre. Le maggiori dimensioni, con una forma del piastrone più larga, potrebbe favorire la produzione di uova nelle femmine (Zuffi et al., 1999; D'Angelo et al., 2008; Fritz et al., 2006b).

Tuttavia non è possibile ipotizzare una causa che possa spiegare, senza incertezze, le differenze ottenute e le correli a un ruolo ecologico funzionale. Bisogna, infatti, considerare le profonde differenze ecologiche tra i Nebrodi e Montallegro, che però presentano delle popolazioni accomunate da una variabile morfometrica differente rispetto alle altre popolazioni campionate della stessa specie e della sorella congenerica.

La filogenesi delle sanguisughe non segue quella delle tartarughe palustri europea e siciliana. I pattern filogenetici mitocondriali del parassita non rispecchiano quelli dell'ospite, per cui non è possibile distinguere una separazione geografica tra gli individui ai due lati dello stretto. Non sono chiare le cause che portano alla separazione tra le sequenze ottenute nell'ambito di questo studio e quelle di riferimento. L'assenza di un adeguato campionamento lungo l'areale delle due specie, non permette di comprendere e valutare appieno i pattern filogeografici che li caratterizzano. La segnalazione dell'associazione tra *P. costata* e *E. trinacris*, e soprattutto tra questa e *H. stagnilis* è uno passo in più verso la conoscenza degli aspetti biologici della tartaruga palustre siciliana.

Un'ultima considerazione va fatta sulla conservazione di *E. trinacris*. Questa specie è considerata a rischio, soprattutto a causa della distruzione della maggior parte degli habitat ideonei (Turrisi e Vaccaro, 1997). L'utilizzo di misure di protezione *ad hoc*, come la traslocazione verso aree sicure, dovrebbe essere sempre preceduta dalle analisi genetiche:

infatti tale pratica potrebbe portare alla perdita della grande diversità genetica risultata dalla genotipizzazione.

5.1 RINGRAZIAMENTI

Al termine di un lungo lavoro, che mi ha impegnato per tre anni, i ringraziamenti verso chi ne ha permesso lo svolgimento sono quanto meno dovuti.

Il primo ringraziamento va al Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio che ha concesso l'autorizzazione alla cattura, manipolazione e prelievi di tessuto di *Emys trinacris* e *E. orbicularis* (Prot. PNM-2011-17973 e 000-8884/PNM) e all'Assessorato Regionale dell'Energia e dei Servizi di Pubblica Utilità, Dipartimento regionale dell'Acqua e dei Rifiuti per l'autorizzazione ai campionamenti all'interno dell'area della diga Gorgo in Montallegro (Prot. 41092/2012).

Indubbiamente la collaborazione con il DNAlab del Museo di Storia Naturale Senckenberg di Dresda, diretto dal Prof Uwe Fritz, è stata produttiva e molto formativa.

Desidero, quindi, ringraziare il Prof Fritz per la grandissima disponibilità ad ospitarmi presso le strutture del museo e avermi permesso di effettuare le analisi genetiche necessarie al completamento dello studio di dottorato. Il “grazie” va certamente esteso ai ricercatori e a tecnici del DNAlab, che mi hanno supportato e stimolato nei periodi di lavoro trascorsi insieme e non solo: i Dott. Anna Hundsdörfer, Melita Vamberger, Anke Mueller, Anja Rauh, l'impareggiabile Christian Kehlmaier ed Heiko Stuckas.

Christian Schmidt e Francesca Vegliante, accogliendomi nella loro casa di Langebrück, hanno reso i periodi in Germania ancora più piacevoli.

Le campagne di campionamento sono più divertenti in compagnia degli amici: un sentito grazie al “segretario” Luigi Cappugi che, oltre la simpatia e le storie di pesca, ci ha messo anche la macchina e soprattutto il suo “occhio” sopraffino nell'individuare le tartarughe.

Grazie alla Dott. “Raffa” Melfi del “Turtle team”, fulcro logistico delle “spedizioni” nel sud-est siciliano e non solo.

Grazie al “mitico” Bar Chantigne di Acquadolci che con la sua unicità è stato al centro delle nostre discussioni, non proprio per la bontà dei pasti propinati....

E i periodi invernali passati in laboratorio? Come avrei fatto senza i compagni del tè delle 5? Un grazie doveroso va anche a loro!

“Ah! Quante avventure!!” direbbe un altro amico. Il Dott. Federico Marrone. A lui va, sicuramente, il grazie più sentito. Il suo supporto sul campo e in laboratorio, i suoi stimoli e le sue critiche: semplicemente inestimabili.

6. BIBLIOGRAFIA

- Avise, J. C., Bowen, B. W., Lamb, T., Meylan, A. B., & Bermingham, E., 1992. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Molecular biology and evolution*, 9(3), 457-473.
- Avise, J. C., 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J. C., 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Second ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Ayres, C., & Alvarez, A., 2008. On the presence of *Placobdella* sp. leeches on *Emys orbicularis*. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, 8(1), 53-55.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Barton, N. H., & Hewitt, G. M., 1989. Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341(6242), 497-503.
- Bielecki, A., Cichocka, J. M., Jabłoński, A., Jeleń, I., Ropelewska, E., Biedunkiewicz, A., ... & Szlachciak, J. (2012). Coexistence of *Placobdella costata* (Fr. Müller, 1846)(Hirudinida: Glossiphoniidae) and mud turtle *Emys orbicularis*. *Biologia*, 67(4), 731-738.
- Blain, H. A., Bailon, S., Agustí, J., Martínez-Navarro, B., & Toro, I., 2011. Paleoenvironmental and paleoclimatic proxies to the Early Pleistocene hominids of Barranco León D and Fuente Nueva 3 (Granada, Spain) by means of their amphibian and reptile assemblages. *Quaternary International*, 243(1), 44-53.
- Božiková, E. V. A., Munclinger, P., Teeter, K. C., Tucker, P. K., Macholán, M., & Piálek, J., 2005. Mitochondrial DNA in the hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*: a comparison of two transects. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84(3), 363-378.
- Camussi, A., Möller, F., Ottaviano, E. & Sari Gorla, M., 1991. Metodi statistici per la sperimentazione biologica. Zanichelli.
- Ciofi, C., Tzika, A. C., Natali, C., Chelazzi, G., Naziridis, T., & Milinkovitch, M. C., 2009. Characterization of microsatellite loci in the European pond turtle *Emys orbicularis*. *Molecular ecology resources*, 9(1), 189-191.
- Clement, M., Posada, D. C. K. A., & Crandall, K. A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*, 9(10), 1657-1659.
- Corti, C., Capula, M., Luiselli, L., Razzetti, E., & Sindaco, R., 2010. Fauna d'Italia. *Reptilia*, 14.
- D'Angelo, S., Galia, F. e Lo Valvo M. L., 2008. Biometric characterization of two Sicilian pond turtle (*Emys trinacris*) populations of south-western Sicily. *Rev. Esp. Herp*, 22, 15-22.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R e Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.
- Duggen S., Hoernle K., Van Den Bogaard P., Rüpke L. e Morgan J. P., 2003. Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 422: 602-606.

- Dureje, L., Macholan, M., Baird, S. J., & Pialek, J., 2012. The mouse hybrid zone in Central Europe: from morphology to molecules. *Folia Zoologica*, 61(3-4), 308-318.
- Earl, D. A. and vonHoldt B. M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.*, 4 (2012), pp. 359–361
- Engstrom, T. N., Shaffer, H. B., & McCord, W. P., 2004. Multiple data sets, high homoplasy, and the phylogeny of softshell turtles (Testudines: Trionychidae). *Systematic Biology*, 53(5), 693-710.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47.
- Fahd, S., El Marnisi, B., Mediani, M., & Fritz, U., 2009. Zur Verbreitung und zum Bedrohungsstatus der Europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*) in Marokko.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R., 1994. Dna primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294-299.
- Fritz U, Lenk P, Lenk S, 1995. Sumpfschildkröten (*Emys orbicularis galloitalica*) aus Südfrankreich und Latium. *Herpetofauna*, 17.
- Fritz, U., 1998. Introduction to zoogeography and subspecific differentiation in *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). In *Proceedings of the EMYS Symposium Dresden* (Vol. 96, pp. 1-27).
- Fritz, U., Guicking, D., Lenk, P., Joger, U., & Wink, M., 2004. When turtle distribution tells European history: mtDNA haplotypes of *Emys orbicularis* reflect in Germany former division by the Iron Curtain. *Biologia*, 59(Supplement 14), 19–25.
- Fritz U, Fritsch G., Lehr E., Ducotterd J. M. e Muller A., 2005a. The Atlas Mountains, not the Strait of Gibraltar, as a biogeographic barrier for *Mauremys leprosa* (Reptilia: Testudines). *Salamandra*, 41, 3: 97-106.
- Fritz U., Fattizzo T., Guicking D., Trieppl S., Pennisi M. G., Lenk P., Joger U. e Wink M., 2005b. A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys* (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Zoologica Scripta*, 34, 4: 351-371.
- Fritz U., Barata M., Busack S. D., Fritsch G. e Castilho R., 2006a. Impact of mountain chains, sea straits and peripheral populations on genetic and taxonomic structure of freshwater turtle, *Mauremys leprosa* (Reptilia, Testudines, Geoemydidae). *Zoologica Scripta*, 35: 97-108.
- Fritz U., D'Angelo S., Pennisi M. G. e Lo Valvo M., 2006b. Variation of Sicilian pond turtles, *Emys trinacris* – What makes a species cryptic? *Amphibia-Reptilia*, 27: 513-529.
- Fritz U., Auer M., Bertolero A., Cheylan M., Fattizzo T. Hundsdoerfer, A. K., et al., 2006c. A rangewide phylogeography of Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Reptilia: Testudines: Testudinidae): implications for taxonomy. *Zoologica Scripta*, 35: 531–543.
- Fritz, U., Guicking, D., Kami, H., Arakelyan, M., Auer, M., Ayaz, D., ... & Wink, M., 2007. Mitochondrial phylogeography of European pond turtles (*Emys orbicularis*, *Emys trinacris*)-an update. *Amphibia Reptilia*, 28(3), 418.
- Fritz, U., Ayaz, D., Hundsdoerfer, A. K., Kotenko, T., Guicking, D., Wink, M., ... & Buschbom, J., 2009. Mitochondrial diversity of European pond turtles (*Emys orbicularis*) in Anatolia and the Ponto-Caspian Region: Multiple old refuges, hotspot of

- extant diversification and critically endangered endemics. *Organisms Diversity & Evolution*, 9(2), 100-114.
- Fritz, U., Branch, W. R., Hofmeyr, M. D., Maran, J., Prokop, H., Schleicher, A., ... & Hundsörfer, A. K., 2011. Molecular phylogeny of African hinged and helmeted terrapins (Testudines: Pelomedusidae: Pelusios and Pelomedusa). *Zoologica Scripta*, 40(2), 115-125.
- Giacalone, G., Lo Valvo, M., & Fritz, U., 2009. Phylogeographic link between Sicilian and Corso-Sardinian Testudo h. hermanni confirmed. *Acta Herpetologica*, 4(2), 119-123.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W. e Gascuel O., 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59, 3:307-21
- Gustincich, S., Manfioletti, G., Del Sal, G., Schneider, C., & Carninci, P., 1991. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, 11(3), 298-300.
- Gyllensten, U., & Wilson, A. C., 1987. Interspecific mitochondrial DNA transfer and the colonization of Scandinavia by mice. *Genetical Research*, 49(01), 25-29.
- Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, pp. 95-98).
- Harrison, R. G., 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford surveys in evolutionary biology*, 7, 69-128.
- Harrison, R. G., 1993. *Hybrid zones and the evolutionary process*. (Ed.). Oxford University Press.
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
- Hofman, S., & Szymura, J. M., 2007. Limited mitochondrial DNA introgression in a Bombina hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(2), 295-306.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K., 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*, 9(5), 1322-1332.
- Joger U., Fritz U., Guiking D., Kalyabina-Hauf S., Nagy Z. T. e Wink M., 2007. Phylogeography of western Palaearctic reptiles – Spatial and temporal speciation patterns. *Zoologischer Anzeiger*, 246: 293-313.
- King, T. L., & Julian, S. E., 2004. Conservation of microsatellite DNA flanking sequence across 13 Emydid genera assayed with novel bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*) loci. *Conservation Genetics*, 5(5), 719-725.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196-6200.
- Lenk, P., Fritz, U., Joger, U., & Wink, M., 1999. Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). *Molecular ecology*, 8(11), 1911-1922.
- Li, H., Ruan, J., & Durbin, R., 2008. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome research*, 18(11), 1851-1858.
- Librado, P., & Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Olivier, A., Barbraud, C., Rosecchi, E., Germain, C., & Cheylan, M., 2010. Assessing spatial and temporal population dynamics of cryptic species: an example with the European pond turtle. *Ecological Applications*, 20(4), 993-1004.
- Palumbi, S., 1991. Simple fool's guide to PCR.

- Pedall, I., Fritz, U., Stuckas, H., Valdeón, A., & Wink, M., 2011. Gene flow across secondary contact zones of the *Emys orbicularis* complex in the Western Mediterranean and evidence for extinction and re-introduction of pond turtles on Corsica and Sardinia (Testudines: Emydidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49(1), 44-57.
- Perez, M., Livoreil, B., Mantovani, S., Boisselier, M. C., Crestanello, B., Abdelkrim, J., ... & Bertorelle, G., 2013. Genetic Variation and Population Structure in the Endangered Hermann's Tortoise: The Roles of Geography and Human-Mediated Processes. *Journal of Heredity*, est071.
- Posada D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol*, 25, 7: 1253-1256.
- Prager, E. M., Sage, R. D., Gyllensten, U. L. F., Thomas, W. K., Hübner, R., Jones, C. S., ... & Wilson, A. C., 1993. Mitochondrial DNA sequence diversity and the colonization of Scandinavia by house mice from East Holstein. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50(2), 85-122.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Prusak, A., Stefanów, P., Niewczas, M., & Sikora, T., 2013. APPLICATION OF The AHP in evaluation and selection of suppliers. In *57th EOQ Congress Quality Renaissance-Cocreating a Viable Future June* (pp. 17-20).
- Randi, E., 2008. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular ecology*, 17(1), 285-293.
- Ream C. e Ream R., 1966. The influence of sampling methods on the estimation of population structure in painted turtles. *The American Midland Naturalist*, 75, 2: 325-338
- Romero, D., Duarte, J., Narváez-Ledesma, L., Farfán, M. Á., & Real, R., 2014. Presence of the leech *Placobdella costata* in the south of the Iberian Peninsula. *Acta Parasitologica*, 59(2), 259-262.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... & 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.
- Rosenberg, N. A., 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 137-138.
- Sağlam, N., 2001. First record of the leech *Placobdella costata* (Hirudinoidea: Glossiphoniidae) in Turkey. *Zoology in the Middle East*, 23(1), 113-118.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. 2001. Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarose gel electrophoresis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 1.
- Sanz, N., Araguas, R.M., Fernández, R., Vera, M., García-Marín, J.-L. (2009) Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Conserv. Genet.* 10: 225-236.
- Sapkarev, J. A., 1964. Faunata na Hirudinea wo Makedonija. *Folia Balcanica*, 2(3), 1-8.
- Sawyer, R. T., 1986. Leech biology and behaviour.
- Schmitt, T., 2007. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in zoology*, 4(11), 1-13.
- Siddall, M. E., Budinoff, R. B., & Borda, E., 2005. Phylogenetic evaluation of systematics and biogeography of the leech family Glossiphoniidae. *Invertebrate Systematics*, 19(2), 105-112.
- Siddall, M. E., & Gaffney, E. S., 2009. Observations on the leech *Placobdella ornata* feeding from bony tissues of turtles.
- Sket B. & Trontelj P. 2008. Global diversity of leeches (Hirundinea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 129–137. DOI: 10.1007/s10750-007-9010-8.

- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J., 1987. *Introduction to biostatistics* (p. 363). New York.
- Sommer, R. S., Persson, A., Wieseke, N., & Fritz, U., 2007. Holocene recolonization and extinction of the pond turtle *Emys orbicularis* (L., 1758), in Europe. *Quaternary science reviews*, 26(25), 3099-3107.
- Sommer, R. S., Lindqvist, C., Persson, A., Bringsøe, H., Rhodin, A. G., Schneeweiss, N., ... & Fritz, U., 2009. Unexpected early extinction of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) in Sweden and climatic impact on its Holocene range. *Molecular ecology*, 18(6), 1252-1262.
- Spinks, P. Q., Bradley Shaffer, H., Iverson, J. B., & McCord, W. P., 2004. Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 32(1), 164-182.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688-2690.
- Starkey, D. E., Shaffer, H. B., Burke, R. L., Forstner, M. R., Iverson, J. B., Janzen, F. J., ... & Ultsch, G. R., 2003. Molecular systematics, phylogeography, and the effects of Pleistocene glaciation in the painted turtle (*Chrysemys picta*) complex. *Evolution*, 57(1), 119-128.
- Stuart, B. L., & Parham, J. F. (2004). Molecular phylogeny of the critically endangered Indochinese box turtle (< i> Cuora galbinifrons</i>). *Molecular phylogenetics and evolution*, 31(1), 164-177.
- Stuckas, H., Velo-Antón, G., Fahd, S., Kalboussi, M., Rouag, R., Arculeo, M., ... & Fritz, U. (2014). Where are you from, stranger? The enigmatic biogeography of North African pond turtles (*Emys orbicularis*). *Organisms Diversity & Evolution*, 1-12.
- Szymura, J. M., & Barton, N. H., 1986. Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution*, 1141-1159.
- Szymura, J. M., & Barton, N. H., 1991. The genetic structure of the hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*: comparisons between transects and between loci. *Evolution*, 237-261.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A. G. e Cosson J. F., 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.*, 7: 453-464.
- Turrisi, G. F. e Vaccaro, A., 1997. Contributo alla conoscenza degli Anfibi e dei Rettili di Sicilia. *Bollettino dell'Accademia Gioenia di Scienze Naturali*. Catania 4,30 353:5-88.
- Underwood, A. J., 1996. *Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press.
- Velo-Antón, G., Godinho, R., Ayres, C., Ferrand, N., & Cordero Rivera, A., 2007. Assignment tests applied to relocate individuals of unknown origin in a threatened species, the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Amphibia-Reptilia*, 28, 475-484.
- Velo-Antón, G., García-París, M., & Cordero Rivera, A. (2008). Patterns of nuclear and mitochondrial DNA variation in Iberian populations of *Emys orbicularis* (Emydidae): conservation implications. *Conservation Genetics*, 9, 1263-1274.
- Velo-Antón, G., Wink, M., Schneeweiß, N., & Fritz, U., 2011. Native or not? Tracing the origin of wild-caught and captive freshwater turtles in a threatened and widely distributed species (*Emys orbicularis*). *Conservation Genetics*, 12(2), 583-588.
- White, G. C., D. R. Anderson, K. P. Burnham, and D. L. Otis. 1982. Capture-recapture and removal methods for sampling closed populations. Los Alamos National Laboratory LA-8787-NERP. 235 pp.
- Yanchukov, A., Hofman, S., Szymura, J. M., Mezhzherin, S. V., Morozov, Leonov, S. Y., Barton, N. H., & Nürnberger, B., 2006. Hybridization of *Bombina bombina* and *B. variegata* (Anura, Discoglossidae) at a sharp ecotone in western Ukraine: comparisons across transects and over time. *Evolution*, 60(3), 583-600.

- Zuffi M. A. L. e Gariboldi A., 1995. Sexual dimorphism of the European Pond Terrapin, *Emys orbicularis* (L., 1758) from Italy. *Scientia Herpetologica*, 124-129, Llorente et al (Eds.)
- Zuffi, M. A. L., Odetti, F., Batistoni, R., & Mancino, G., 2006. Geographic variation of sexual size dimorphism and genetics in the European pond turtle, *Emys orbicularis* and *Emys trinacris*, of Italy. *Italian Journal of Zoology*, 73(4), 363-372.

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

- Verissimo, J., Znari, M., Stuckas, H., Fritz U., Pereira P., Teixeira, J., Arculeo, M., Marrone, F., Sacco, F. e Velo-Antón (Submitted). Pliocene-Pleistocene divergence in North-Western Maghreb and recent demographic expansion across the Iberian Peninsula in the Mediterranean pond turtle *Mauremys leprosa*. *Organisms Diversity and Evolution*, submitted.
- Vamberger, M., Stuckas, H., Sacco, F., D'Angelo, S., Arculeo, M., Cheylan, M., Corti, C., Marrone, F., Wink, M. e Fritz, U. (2015). Differences in gene flow in a twofold secondary contact zone of pond turtles in southern Italy (Testudines: Emydidae: *Emys orbicularis galloitalica*, *E. o. hellenica*, *E. trinacris*). *Zoologica Scripta*, in press.
- Arizza, V., Russo, D., Marrone, F., Sacco, F., & Arculeo, M. (2014). Morphological characterization of the blood cells in the endangered Sicilian endemic pond turtle, *Emys trinacris* (Testudines: Emydidae). *Italian Journal of Zoology*, 81(3), 344-353.
- Stuckas, H., Velo-Antón, G., Fahd, S., Kalboussi, M., Rouag, R., Arculeo, M., Marrone, F., Sacco, F., Vamberger, M., e Fritz, U. (2014). Where are you from, stranger? The enigmatic biogeography of North African pond turtles (*Emys orbicularis*). *Organisms Diversity & Evolution*, 1-12.
- Marrone, F., Naser, M. D., Amaal, G. Y., Sacco, F., & Arculeo, M. (2014). First record of the North American cryptic invader *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863)(Mollusca: Gastropoda: Planorbidae) in the Middle East. *Zoology in the Middle East*, 60(1), 39-45.
- Sacco, F., Marrone, F., Arculeo, M., & Fritz, U. (2013). Diversità genetica e pattern filogeografici in *Meuremys leprosa* (Testudines, Geoemydidae). In 74° Congresso Nazionale della Unione Zoologica Italiana (UZI), 116-116.

Morphological characterization of the blood cells in the endangered Sicilian endemic pond turtle, *Emys trinacris* (Testudines: Emydidae)

V. ARIZZA^{1,2,3}, D. RUSSO^{1,3}, F. MARRONE¹, F. SACCO¹, & M. ARCULEO¹

¹Dipartimento STEBICEF, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy, ²Dipartimento Key-SET, Istituto Euro Mediterraneo di Scienza e Tecnologia, Palermo, Italy, and ³Applied Biodiversity Laboratory, Dipartimento STEBICEF, Università di Palermo, Palermo, Italy

(Received 27 March 2014; accepted 13 June 2014)

Abstract

In this study, measurements of morphological parameters, sizes and frequencies of peripheral blood cells (erythrocytes, leukocytes, thrombocytes) on blood smear preparation devices stained with May-Grünwald stain were evaluated for both sexes in 20 *Emys trinacris* (Testudines: Emydidae) specimens. Erythrocytes were higher in male than in female specimens. The leukocyte of *E. trinacris* contains eosinophil, basophil, monocyte, heterophil and lymphocyte. The eosinophil was higher in males than in females whereas lymphocytes were higher in females than in males. The erythrocyte morphological parameters (EL [erythrocyte length], EW [erythrocyte width], L/W [length/width], ES [erythrocyte size]) were compared with the same data from *Emys orbicularis* s.l. and from species belonging to other chelonian genera. The erythrocyte size did not vary within the studied Palearctic *Emys* taxa, whereas it proved to differ from that observed in other chelonians.

Keywords: *Emys trinacris*, blood smear, blood cell morphology, *Trachemys scripta elegans*

Introduction

Emys trinacris (Fritz et al. 2005) (Testudines: Emydidae) is a Sicilian endemic pond turtle (Fritz et al. 2005); although it is morphologically close to *Emys orbicularis* s.l. (Fritz et al. 2006), molecular taxonomic studies have unambiguously revealed the presence of significant differences between the two species, which are adelphotaxa (Fritz et al. 2007; Pedall et al. 2011; Stuckas et al. 2014). Considering the biogeographical and evolutionary importance of this species and the drastic reduction of its populations caused by habitat destruction, pollution, and pathogens, in 2013, *E. trinacris* was listed in the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List as “Endangered” (EN) (Rhodin et al. 2009).

To date, few studies have focused on the biology of this endemic species, and nothing is known about the hematologic blood characterization (HBC) of the species and on the health status of the wild populations of *E. trinacris*.

In the literature, HBC has been used successfully to diagnose chelonian diseases and to assess the

physiological status of wild turtle populations (Duguy 1967; Dessauer 1970; Frye 1991; Campbell 1996; Stein 1996). This approach is widely used because the HBC is a minimally invasive tool that allows health evaluations, especially in relation to determining potential effects associated with stress factors such as pollution, disease, invasion by exotic species, etc. In order to be soundly usable, the reference evaluations have to be performed on healthy animals (Nagy & Medica 1986; Deem et al. 2006).

Blood cell parameters of reptiles may be influenced by several factors, such as age, sex, seasonality, reproduction, nutritional status and environmental parameters such as temperature, salinity, oxygen and light (Dessauer 1970; Duguy 1970; Frye 1991; Wilkinson 2003; Tavares-Dias et al. 2009; Yilmaz & Tosunoglu 2010; Gu et al. 2011; Scheelings & Jessop 2011; Tosunoglu et al. 2011; Scheelings & Rafferty 2012); these parameters can vary through the annual cycle and throughout the life of the individuals. Studies that describe chelonian

blood cells are rare and the data are often in contradiction because of the lack of standard criteria used to categorize blood cells (Work et al. 1998). Various authors described circulating blood cells of different amphibian and reptile species; moreover, there are many chelonian species for which blood cell morphology and reference values are still unknown or imprecise. Descriptions of the morphologic characteristics of blood cells of pond turtles are limited and fail to standardize the parameters of the HBC (Metin et al. 2006; Rossini et al. 2012).

In order to perform conservation activities for the populations of *E. trinacris*, reference studies on biological parameters are necessary. Moreover, as a good practice, any action taken for the protection and the conservation of species in danger of extinction cannot ignore the full knowledge of their biology. For this reason, the blood cell parameters of the Sicilian pond turtle *E. trinacris* have been documented by analysing blood samples from free-living males and females. Moreover, blood cell parameter data obtained from *E. trinacris* were compared with

those available from *E. orbicularis* s.l. Other comparisons were performed with those of the American emydid *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1839).

The present study describes for the first time the blood cell parameters in *E. trinacris* obtained from the turtles under natural conditions, and aims to establish the blood cell parameter reference values necessary for the evaluation of the health status of individuals from wild populations.

Materials and methods

Sampling area

Collection was performed in four sites located in the Sicilian mainland as shown in Figure 1 and Table I.

The pond turtles were caught by hand or with hoop net traps (Ream & Ream 1966). Caught pond turtles were weighed and measured: measurements included the length and the width of the carapace, the length and the width of the plastron, the carapace height, the total and cloaca-apex tail length in mm

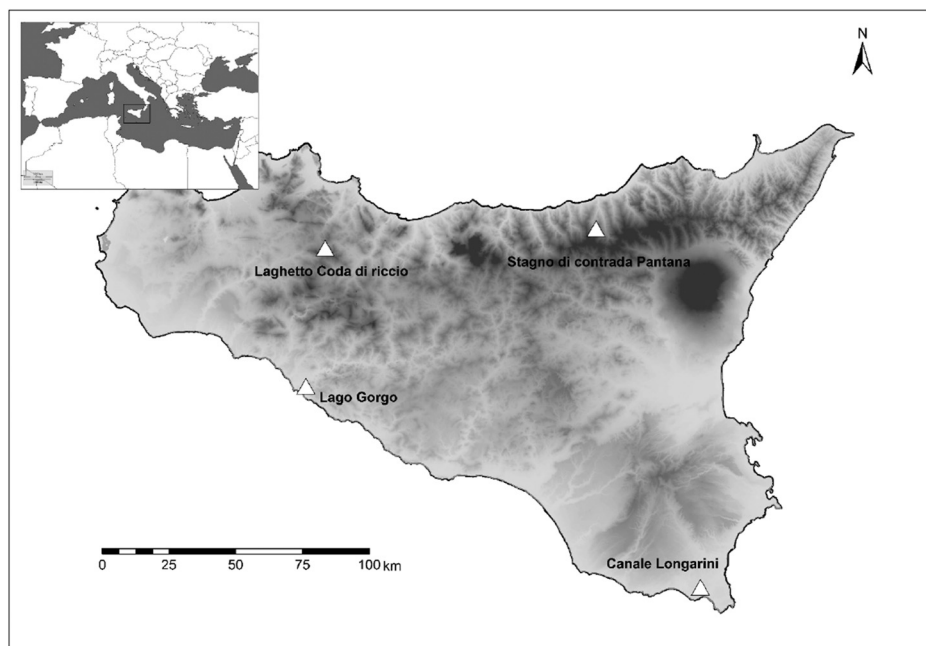


Figure 1. Locations of the sampled sites.

Table I. Geographical coordinates of the sampled sites and synopsis of the studied *Emys trinacris* specimens.

Sites	Coordinates (WGS84)	# Specimens	Males	Females
Laghetto "Coda di Riccio", Godrano (PA)	37.873333 N, 13.39845 E	7	7	0
Laghetto di Contrada Pantana, Caronia (ME)	37.949467 N, 14.551267 E	3	2	1
Lago Gorgo, Montallegro (AG)	37.405833 N, 13.327033 E	8	5	3
Canale Longarini, Ispica (RG)	36.73565 N, 14.996683 E	2	2	0

(with a caliper, to the nearest 0.5 mm) (Fritz et al. 2005), and the body mass in grams for each specimen (Zuffi & Gariboldi 1995; Zuffi et al. 2006). Ten blood samples of *Trachemys scripta elegans* were obtained in September 2013 from specimens housed in the Botanical Garden of the department of STEBICEF, University of Palermo.

Blood sampling, cell morphology and counts

Blood samples were obtained from the dorsal coccygeal vessel via heparinized glass capillaries (Hutchison & Szarski 1965; Szarski 1968). After obtaining blood samples, the animals were immediately released to their natural environments. For each individual, one to three capillaries were collected.

Blood smears were prepared *in situ*. A blood drop was smeared on a glass slide and air-dried. The sample was then fixed in methanol and stained by the Pappenheim method (May-Grünwald + Giemsa-Romanowsky staining diluted 1:10 in buffered water, pH 7) for 20 min, and washed in running tap water for 2 minutes. One hundred erythrocytes and 30 each of thrombocytes, eosinophils, basophils, lymphocytes and monocytes were measured under a microscope (Leica DMRE) equipped with a digital camera (Leica DCF420 C). In each smear were recorded lengths (L) and widths (W) of 100 randomly chosen erythrocytes as well as nuclear lengths (NL) and nuclear widths (NW). Erythrocyte sizes (ES) and their nucleus sizes (NS) were computed from the following equations (Arikan & Cicek 2010):

$$ES = (EL \times EW \times \pi) / 4 \quad (1)$$

$$NS = (NL \times NW \times \pi) / 4 \quad (2)$$

Cells and nuclear shapes were compared with EL/EW and NL/NW ratios, and nucleus/cytoplasm with NS/ES ratio. In addition, from the blood smears of each species, measurements of leucocytes (lymphocytes, monocytes, heterophils, eosinophils, basophils) and thrombocytes (TL, TW)

were also taken to determine their sizes and computed from the following formula:

$$A = \pi r^2 \quad (3)$$

Statistical analyses

Hematological variables (number of cells or dimensions) were summarized as mean, standard deviation (SD), standard error of the mean (SE) and range. We used analysis of the t test for a comparison of the sexes.

Results

Sampling and measurements

A total of 20 wild pond turtles *Emys trinacris*, 16 male and four female, were sampled in Sicily from 2012 to 2013 (Table I). The average body weights for the male and female turtles used for the study were 355.31 ± 154.78 g and 504.33 ± 75.5 g, respectively. The measured carapace lengths were 12.77 ± 2.15 cm and 14.08 ± 1.11 cm for male and female specimens, respectively.

Those samples which showed wounds or epiphytes or possessed parasites in the blood were not included in the analyses.

Emys trinacris blood cells

Differential blood cell count of the peripheral blood of *E. trinacris* was carried out using blood smears stained with May-Grünwald Giemsa observed under a light microscope equipped with a digital camera. The leukocyte types recognized in *Emys trinacris* correspond with those found in other species of the family Emydidae (Table II). In particular, seven cell types were identified: (a) nucleated erythrocytes, (b) eosinophils, (c) basophils, (d) monocytes, (e) thrombocytes, (f) heterophils and (g) lymphocytes (Figure 2). Significant differences in cell size were not observed in either sex. Males possessed significantly higher numbers of red blood cells

Table II. Leukocytes in turtle species of the Emydidae family.

Species	Leukocyte type					Reference
	Lymphocyte	Heterophils	Eosinophils	Basophils	Monocyte	
<i>Emys orbicularis galloitalica</i>	+	+	+	+	+	(Metin et al. 2006)
	+	+	+	+	+	(Yilmaz & Tosunoglu 2010)
<i>Graptemys gibbonsi</i>	+	+	+	+	+	(Perpiñán et al. 2008)
<i>Pseudemys rubriventris</i>	+	+	+	+	+	(Innis et al. 2007)
<i>Clemmys mühlenbergii</i>	+	+	+	+	+	(Brenner et al. 2002)
<i>Chrysemys picta</i>	+	+	+	+	+	(Schwanz et al. 2011)

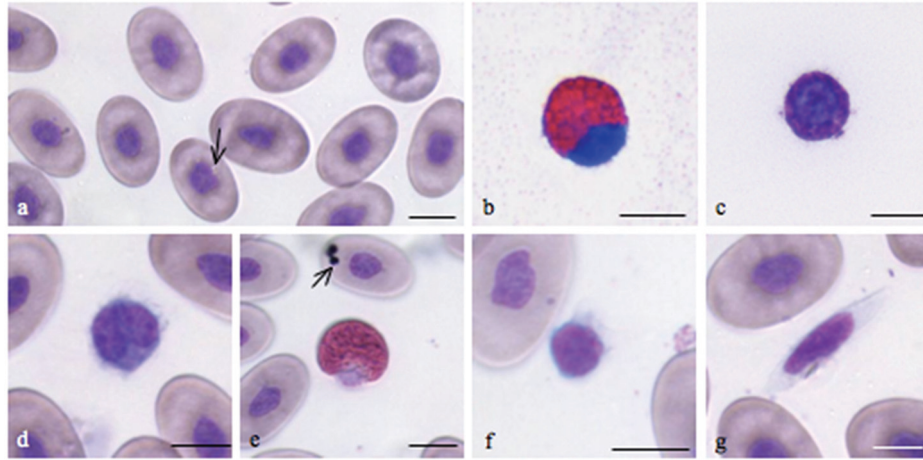


Figure 2. Blood smears of *Emys trinacris* stained with May-Grünwald Giemsa. Pictures were taken with an optical microscope equipped with a digital camera. **a**, erythrocyte; **b**, eosinophil; **c**, basophil; **d**, monocyte; **e**, heterophil; **f**, lymphocyte; **g**, thrombocyte. Scale bars: 10 μ m.

($p < 0.05$) and eosinophils ($p < 0.01$), while females showed a significantly ($p < 0.05$) higher percentage of lymphocytes (Table I). For other cell types, although their number varied between the genders, no significant differences were found.

Erythrocyte morphology

Mature erythrocytes were homogeneous in size, shape and color (Figure 2a). They were nucleated cells with elliptical shape and abundant pale pink cytoplasm like those of the other turtle species (Kassab et al. 2009; Orós et al. 2010). The violet-blue oval or round nucleus with rounded or irregular poles was centrally positioned and had condensed deeply basophilic chromatin. Its major axis was parallel with the long diameter of the cell. Some erythrocytes had small intracytoplasmic inclusions (arrow Figure 2e) or might contain vacuoles (arrow Figure 2a). Although the erythrocytes of males

compared with females were generally larger in size, a significant difference was not recorded. Parasites were not detected. The results of erythrocyte measurements are summarized in Table III.

White blood cell morphology

Eosinophils. The eosinophils (Figure 2b) were easily distinguished by their round eosinophilic cytoplasmic granules, which fill the whole cytoplasm. They were the smallest among the granulocytes, ranging between 13.5 ± 5.67 and $12.6 \pm 1.3 \mu$ m for males and females respectively (Table III). The nucleus contains coarse, clumped chromatin and strongly stained blue. It was round to oval, single or bilobed and eccentrically placed near the membrane. The cytoplasm was filled with granules measuring approximately $1.15 \pm 0.035 \mu$ m. Males had a significantly ($p < 0.01$) higher number of eosinophils (20.2 ± 1.2) than females (17.5 ± 1.09).

Table III. Differential blood cells count and size in peripheral blood of *Emys trinacris*. (*) = Significant differences $p < 0.05$; (**) = significant differences $p < 0.01$. The erythrocyte size was reported as ratio between measurements (μ m) of length and width (L/W). The size of the thrombocyte was the length of the cells (L) expressed in μ m.

Blood cell type	Male		Female		
	Count \pm SD	Size \pm SD (μ m)	Count \pm SD	Size \pm SD (μ m)	
Erythrocyte	$422.5 \pm 12.6 (10^4/\mu\text{L})$	$1.6 \pm 0.12 (L/W)$	$379.4 \pm 17.3 (10^4/\mu\text{L})^{(*)}$	$1.6 \pm 0.14 (L/W)$	
Leukocyte	Eosinophils	$20.2 \pm 1.2 (\%)$	13.5 ± 5.67	$17.3 \pm 1.09 (\%)^{(**)}$	12.6 ± 1.3
	Basophils	$20.5 \pm 2.58 (\%)$	9.5 ± 0.12	$17.3 \pm 1.58 (\%)$	9.3 ± 0.23
	Monocytes	$4.1 \pm 1.82 (\%)$	11.3 ± 4.81	$4.3 \pm 2.11 (\%)$	11.7 ± 1.75
	Heterophils	$21.7 \pm 0.8 (\%)$	13.9 ± 6.71	$20.6 \pm 1.2 (\%)$	13.3 ± 1.27
	Lymphocytes	$31.6 \pm 0.69 (\%)$	6.7 ± 2.12	$41.3 \pm 1.24 (\%)^{(*)}$	6.5 ± 1.26
Thrombocytes	$2.9 \pm 1.25 (\mu\text{L})$	$25.0 \pm 1.23 (L)$	$2.8 \pm 2.2 (\mu\text{L})$	$22.9 \pm 0.63 (L)$	

SD, standard deviation.

Basophils. The basophils (Figure 2c) were present with a percentage of 5.8 ± 0.45 and 5.4 ± 0.77 respectively for male and female turtles. They were small cells, about $9.49 \mu\text{m}$, without significant differences between the genders. They are easily identified by their deeply stained cytoplasm filled with very dense, dark purple granules. Their large nuclei (7.09 ± 0.25) were round and centrally placed (Figure 2c).

Monocytes. The monocyte (Figure 2d) contained a large amount of light blue-gray, finely granular or vacuolated cytoplasm and an oval or kidney-shaped nucleus with a dense chromatin pattern near the membrane. The mean diameter in observed monocytes ranged between 11.3 ± 4.81 and $11.7 \pm 1.75 \mu\text{m}$ and did not differ significantly between males and females (Table III). The presence of this cell in both males and females was the same.

Heterophils. Heterophils contained large, eosinophilic and fusiform cytoplasmic granules. The cytoplasm, which can be difficult to visualize, was light blue or clear (Figure 2e). The nucleus is segmented and frequently displaced toward the edge of the cell and appeared basophilic with dense chromatin. No significant differences were found between males and females for size; the diameter ranged from 13.9 ± 6.71 in males to 13.3 ± 1.27 in females, and the frequency was $15.4 \pm 0.8\%$ in males and $15.7 \pm 1.2\%$ in females.

Lymphocytes. The lymphocytes of *E. trinacris* were easily recognizable because they differed greatly from thrombocytes (Figure 2f). They were round cells with a diameter of $6.7 \pm 2.12 \mu\text{m}$ in males and $6.5 \pm 1.26 \mu\text{m}$ in females. They contained a small amount of blue-stained cytoplasm and a round nucleus with a fine reticular pattern. The lymphocyte showed a nuclear to cytoplasmic ratio greater than one.

Thrombocytes. The thrombocytes (Figure 2g) were observed as spindle-shaped cells ($25.0 \pm 1.23 \times 5.0 \pm 0.89 \mu\text{m}$ for males and $22.9 \pm 0.63 \times 4.8 \pm 0.54$ for females) that contained a central, ellipsoidal, densely stained nucleus of about $12.9 \pm 1.3 \times 4.11 \pm 0.74 \mu\text{m}$ for both males and females. The cytoplasm was hyaline and had no granules.

Discussion

The comparison of the red blood cells of *E. trinacris* with those of *E. orbicularis* s.l. showed a high variability in size (Table IV). In particular, *E. orbicularis* data in the literature show mean values of L/W ranging from 1.6 to 1.8 μm , with cell average areas

Table IV. Erythrocyte dimensions from male and female individual of *Emys trinacris* compared with *E. orbicularis galloitalica* and *E. orbicularis hellenica* ($\mu\text{m} \pm$ standard deviation, SD). EL: erythrocyte length, EW: erythrocyte width, L/W: ratio between measurements (μm) of length and width, ES: erythrocyte size, NL: nucleus length, NW: nucleus width, NS: nucleus size. ES and NS were estimated with the respective formulas $\text{ELEW}\pi/4$ and $\text{NLNW}\pi/4$.

Species	Sex	EL	EW	L/W	ES (μm^2)	NL	NW	NL/NW	NS (μm^2)	NS/ES	Reference
<i>E. trinacris</i>	Male	22.7 ± 1.53	14.3 ± 0.56	1.6 ± 0.12	255.4 ± 22.74	6.5 ± 0.48	5.2 ± 0.24	1.3 ± 0.1	26.5 ± 3.3	0.1 ± 0.01	Present study
	Female	22.4 ± 0.93	13.9 ± 0.32	1.6 ± 0.16	244.4 ± 16.02	6.4 ± 0.32	5.0 ± 0.52	1.3 ± 0.06	25.1 ± 4.01	0.1 ± 0.01	
	Mean	22.5 ± 1.21	14.1 ± 0.44	1.6 ± 0.14	249.4 ± 21.58	6.3 ± 0.16	5.1 ± 0.34	1.2 ± 0.01	25.2 ± 2.48	0.1 ± 0.01	
<i>E. orbicularis galloitalica</i>	Male	14.9 ± 0.79	9.9 ± 0.54	1.5 ± 0.09	116.5 ± 10.17	4.9 ± 0.57	3.8 ± 0.03	1.3 ± 0.17	14.7 ± 2.3	0.13 ± 0.004	(Javanbakht et al. 2013)
	Female	15.4 ± 1.0	8.7 ± 0.65	1.8 ± 0.16	105.4 ± 11.63	4.7 ± 0.51	3.3 ± 0.38	1.5 ± 0.22	11.9 ± 0.19	0.11 ± 0.003	
	Mean	15.2 ± 0.18	9.3 ± 0.12	1.6 ± 0.12	110.9 ± 23.17	4.8 ± 0.42	3.51 ± 0.05	1.4 ± 0.03	13.3 ± 0.42	0.12 ± 0.003	
<i>E. orbicularis hellenica</i>	Male	21.5 ± 1.37	12.9 ± 1.09	1.7 ± 0.18	217.8 ± 22.63	7 ± 0.73	5.4 ± 0.61	1.3 ± 0.18	28.9 ± 5.1	0.1 ± 0.02	(Metin et al. 2006)
	Female	21.8 ± 1.61	13.6 ± 1.05	1.6 ± 0.14	232.3 ± 22.55	6.8 ± 0.81	5.4 ± 0.69	1.3 ± 0.2	29.5 ± 5.64	0.1 ± 0.02	
	Mean	21.7 ± 1.27	13.2 ± 1.12	1.6 ± 0.16	225.1 ± 24.18	6.9 ± 0.78	5.4 ± 0.65	1.3 ± 0.19	29.2 ± 5.41	0.1 ± 0.02	
<i>E. orbicularis hellenica</i>	Mean	19.9 ± 0.11	12.7 ± 0.09	1.6 ± 0.01	200.7 ± 1.88	7.1 ± 0.05	6.2 ± 0.19	1.2 ± 0.01	35.4 ± 1.1	0.18 ± 0.01	(Arikan & Cicek 2010) (Colagar & Jafari 2007) (Ugurtas et al. 2003)
	Mean	21.7 ± 1.51	11.5 ± 0.98	1.8 ± 0.14	195.8 ± 1.16	6.6 ± 0.75	5.7 ± 0.47	1.2 ± 0.15	29.5 ± 0.27	0.15 ± 0.023	
	Mean	21.7 ± 1.01	12.5 ± 0.98	1.7 ± 0.12	214.0 ± 22.8	7.5 ± 0.54	5.7 ± 0.47	1.3 ± 0.15	33.6 ± 3.74	0.15 ± 0.01	

ranging from 110.9 to 225.1 μm^2 . The red blood cells of *E. trinacris* were larger compared with the erythrocytes of the other two taxa. They were long on average, 22.5 μm and 14.1 μm wide, with a cell area of 249 μm^2 . The nuclei of the red blood cells of *E. trinacris* were smaller when compared with those of the other two species (Table IV). A further comparison was made between the sizes of the erythrocytes of *E. trinacris* with those of *Trachemys scripta* (Schoepff, 1792) (Table V). The data show that the sizes of EL, EW, their ratio (L/W) and the cell areas were significantly larger than those of *T. scripta*. However, the size of the nuclei of the erythrocytes of *E. trinacris* did not differ significantly when compared with those of *T. scripta* (Table V).

Hematological and biochemical parameters are useful tools in measuring the physiological status of turtles because they may provide information on the health and general condition of individuals and populations (Campbell 1998; Oliveira-Júnior et al. 2009). Moreover, such tools have been used as physiological disturbance indicators of diseases, stress or exposure to contaminants, as well as to assess degrees of dehydration (Peterson 2002; Christopher et al. 2003; Tavares-Dias et al. 2008).

Since data on the hematology of the Sicilian endemic *Emys trinacris* are currently lacking, the main aim of this study was to characterize, for the first time, the blood cells of *E. trinacris* and, in particular, to classify its leukocytes. The classification criteria of chelonian leukocytes pose many problems, partly because these cells show morphological variation among the species and partly because several different nomenclatures have been used to describe them. Moreover, some cells are not easily identified based on their morphological differences, e.g.: small lymphocytes may be morphologically similar to thrombocytes. Most authors agree that reptiles do not have neutrophils, whereas they do have heterophils and eosinophils, which both show acidophilic granules (Canfield 1998). Some studies classify acidophils (i.e., heterophils and eosinophils) as a single cell type at different stages of maturation (Azevedo & Lunardi 2003). Neutrophils have been reported only in some reports (Wood & Ebanks 1984; Pitol et al. 2007). Some authors (Christopher et al. 1999; Dickinson et al. 2002; Knotková et al. 2002) refer to the presence of azurophils in the peripheral blood of chelonians, and the very existence of azurophils is still in dispute (Roskopf 2000). Studies involving other species aiming to study leukocytes under light microscopy analysis showed, in the turtle species *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) and *Emys orbicularis* s.l., the presence of basophiles, eosinophils, lymphocytes, monocytes and heterophils (Metin et al. 2006).

Table V. Erythrocyte dimensions of *Trachemys scripta elegans* ($\mu\text{m} \pm$ standard deviation, SD). EL: erythrocyte length, EW: erythrocyte width, L/W: ratio between measurements (μm) of length and width, ES: erythrocyte size, NL: nucleus length, NW: nucleus width, NS: nucleus size. ES and NS were esteemed with the respective formulas: $\text{ELEW}/\pi/4$ and $\text{NLNW}/\pi/4$. * = $p < 0.05$.

Species	Sex	EL	EW	L/W	ES (μm^2)	NL	NW	NL/NW	NS (μm^2)	NS/ES
<i>E. trinacris</i>	Male	22.7 \pm 1.53	14.3 \pm 0.56	1.6 \pm 0.12	255.4 \pm 22.74	6.5 \pm 0.48	5.2 \pm 0.24	1.3 \pm 0.1	26.5 \pm 3.3	0.1 \pm 0.01
	Female	22.4 \pm 0.93	13.9 \pm 0.32	1.6 \pm 0.16	244.4 \pm 16.02	6.4 \pm 0.32	5 \pm 0.52	1.3 \pm 0.06	25.1 \pm 4.01	0.1 \pm 0.01
	Mean	22.5 \pm 1.21	14.1 \pm 0.44	1.6 \pm 0.14	249.4 \pm 21.58	6.3 \pm 0.16	5.1 \pm 0.34	1.2 \pm 0.01	25.2 \pm 2.48	0.1 \pm 0.01
<i>T. scripta elegans</i>	Male	19.4 \pm 0.45	13.8 \pm 0.97	1.5 \pm 0.20	206.6 \pm 23.82	6.1 \pm 0.56	5.4 \pm 0.32	1.1 \pm 0.03	26.0 \pm 3.88	0.1 \pm 0.005
	Female	19.0 \pm 0.91	13.4 \pm 0.45	1.4 \pm 0.03	203.3 \pm 11.78	5.9 \pm 0.20	5.3 \pm 0.18	1.1 \pm 0.007	24.3 \pm 1.7	0.1 \pm 0.009
	Mean	19.2 \pm 0.62*	13.6 \pm 0.61*	1.4 \pm 0.01*	204.9 \pm 15.46*	6.0 \pm 0.37	5.3 \pm 0.25	1.1 \pm 0.02	25.2 \pm 2.8	0.1 \pm 0.007

Furthermore, another difficulty lies in determining the proportions of these cells within a particular species since these vary with individual physiologic status and the method of investigation (Campbell & Ellis 2007).

Erythrocytes

Mature erythrocytes of *E. trinacris* proved to be morphologically similar to those of various species of turtles and tortoises and in particular to those of *E. orbicularis* s.l. (Ugurtas et al. 2003; Metin et al. 2006). They were ellipsoidal cells with a centrally positioned, ovoid nucleus and cytoplasmic inclusions, observed in over 30% of erythrocytes. For other reptiles, these inclusions have been reported to be degenerated organelles (Alleman et al. 1992; Clark et al. 2001; Chung et al. 2009) and may be related to the aging of erythrocytes (Heard et al. 2004). Others have postulated that the basophilic inclusions could be micronuclei and, therefore, they could be biomarkers for chromosomal damage from genotoxic environmental pollutants (Matson et al. 2005; Metin et al. 2006). The erythrocyte mean sizes did not differ significantly from those of *E. orbicularis* s.l. ($p > 0.05$), failing in an attempt to use the erythrocyte size as a discriminator between species of the same Emydinae subfamily. The higher number of red blood cells observed in males of *E. trinacris* than in females is similar to the findings in other turtles such as *E. orbicularis* (Duguy 1967) and *Kimixys erosa* (Schweigger, 1812) (Oyewale et al. 1998). The higher number of red blood cells found in males may depend on testosterone hormone levels. In fact, testosterone, when present in chelonians (Paity & Bowden 2013), is able to increase the number of erythrocytes (Fried & Gurney 1965; Pati & Thapliyal 1984; Oyewale et al. 1998).

White blood cell morphology

Our findings conform to the basic morphological description for other Emydidae turtle species such as *Emys orbicularis*, *Graptemys gibbonsi* (Lovich & McCoy, 1992), *Pseudemys rubriventris* (LeConte, 1830) and *Clemmys muhlenbergii* (Schoepff, 1801) (Table III).

Eosinophils. In turtles, the same authors showed two types of eosinophils distinguishable by the shape of cytoplasmic granules. Azevedo and Lunardi (2003) observed in the blood of *Chrysemys dorsibigni* (Duméril & Bibron, 1835) two types of granulocytes that exhibit eosinophilia, one of them with round cytoplasmic granules and the other with elongated cytoplasmic granules. It has been suggested that these cells may

be eosinophils in different stages of maturation, but they also may be distinct cell types, i.e. eosinophils and heterophils (Azevedo & Lunardi 2003). In *E. trinacris*, most leukocytes were heterophils, basophils and eosinophils. Similar findings have also been reported by (Oliveira-Júnior et al. 2009) for *Podocnemis expansa*. This result was not confirmed for other species of turtles. In fact, only captive female *Clemmys muhlenbergii* had a higher absolute eosinophil count and a higher percentage of eosinophils compared with captive males; conversely, wild females were not significantly different from wild males (Brenner et al. 2002).

Basophils. The numbers of basophils in turtles vary greatly. In *Graptemys gibbonsi*, basophils were found to be the most abundant leukocyte type, about 40% of total leukocytes (Perpiñán et al. 2008). Higher percentages of basophils (50–63%) have been found in other chelonians, such as *Chelydra serpentina* (Linnaeus, 1758) (Mead et al. 1983). In contrast, moderate basophil percentages have been found in other species, such as 5.7% in *Gopherus polyphemus* (Daudin, 1802) (Taylor & Jacobson 1982) and 8% in *Geochelone radiata* (Shaw, 1802) (Marks & Citino 1990). Basophil numbers were almost nonexistent (~0.8 for both sexes) in *Clemmys muhlenbergii* (Brenner et al. 2002). However, care must be taken when analyzing published works; as an example, basophil counts in *E. orbicularis* varied widely: 0–4% was reported by Duguy (1970) and about 34% was reported by Javanbakht et al. (2013). This variation of basophil density in various species of turtles is difficult to explain. Many factors can affect the number of basophils and the leukocytic formula such as age, health status, ecological factors and the seasons (for a review see Duguy 1970). We found in *E. trinacris* that the percentage of basophils did not vary significantly between sexes, ranging between 20.5 ± 2.58 for males and 17.3 ± 1.58 for females.

Monocytes. This leukocyte type is not present in all species of turtles. Indeed, in *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), authors did not identify monocytes (Wood & Ebanks 1984; Aguirre et al. 1995). Often, monocytes are not visible if the blood smears are performed with blood that was taken eight or more hours before (Work et al. 1998). Monocytes from *E. trinacris* were similar to the monocytes from *E. orbicularis* described by Metin et al. (2006) or *Ocadia sinensis* (Gray, 1870) described by Chung et al. (2009). In *E. trinacris*, monocytes were round cells and had a similar size in both males and females, (11.3 and 11.7 μm respectively). Also, their frequency was similar for both sexes (~4.2%).

Heterophils. The heterophils of chelonians are analogous to mammalian neutrophils (Montali 1988) and can be easily distinguished by the fusiform red granules contained in the cytoplasm. They had the same percentage for both sexes (~15%). These frequencies correspond with those found in *Graptemys gibbonsi* (Perpiñán et al. 2008), but differ from those in *Pseudemys rubriventris* (~26.9%) (Innis et al. 2007) and *Clemmys muhlenbergii* and *Chrysemys picta* (Schneider, 1783) (both about 9.3% (Brenner et al. 2002; Schwanz et al. 2011)). Furthermore, the percentage value is included within the range indicated for *E. orbicularis* (Duguay 1970). The number and size of heterophils have been observed to be influenced by individual and seasonal factors (Duguay 1970).

Lymphocytes. The lymphocytes were the smallest cells, with a diameter on average about 6.6 µm for both sexes. Female had a significantly ($p < 0.05$) higher percentage of lymphocytes (27.3 ± 1.24) compared with males (22.5 ± 0.69). The same result was reported by Brenner et al. (2002) for *C. muhlenbergii*, where female and male lymphocyte percentages were 1.8 and 1.5%, respectively. The percentages of lymphocytes found in both genders of *E. trinacris* were coherent with values reported for other Emydidae turtles such as *G. gibbonsi* and *C. muhlenbergii* (Brenner et al. 2002; Perpiñán et al. 2008) but differ from those for *P. rubriventris*, in which these cells represent about 50% of the white blood cell differential count (Innis et al. 2007).

Thrombocytes. Although the similarity of thrombocytes and leukocytes in reptiles is known (Frye 1991), in the case of *E. trinacris*, thrombocytes differ greatly from those of other pond turtles. In *E. orbicularis*, the thrombocytes are round cells with a nucleus round to oval and dark (Metin et al. 2006), whereas in *Pseudemys rubriventris* these were elliptical, with central ovoid basophilic nuclei, lightly basophilic cytoplasm, and were often noted in small clusters (Innis et al. 2007). The thrombocytes of *E. trinacris* have an elongated cell shape with a central ovoid nucleus. The size and number do not differ between the sexes.

The comparison of the erythrocyte size parameters with those of *Emys orbicularis* s.l. showed no important differences even in comparison between the two sexes (Table IV). The data reported by Javanbakht et al. (2013) had the lowest values, which probably derived from different environmental conditions (e.g. temperature, air pressure) (Ruiz et al. 1983, 1989) or different activity levels (e.g. healthy, breeding, hibernating, foraging and daily activity) (Sykes & Klaphake 2008; Tosunoglu et al. 2011; Yu et al. 2013).

However, significant differences were found when the erythrocyte parameters (EL, EW, L/W, ES) of *E.*

trinacris were compared with those of *T. scripta elegans*, a tortoise belonging to the same family but to a different genus (Table V). The morphology of *E. trinacris* erythrocytes was similar to that of *T. scripta elegans*, but the size was greater. The L/W ratio was about 1.6 for *E. trinacris* and about 1.4 for *T. scripta elegans*; consequently, erythrocyte shape was more ellipsoidal in *E. trinacris*. No significant differences were found in the nucleo-cytoplasmic ratio.

The results of our analysis show that the morphology of erythrocytes within the family of Emydidae does not change greatly and, in a comparison between species from different genera, only a few differences in size can be found.

The findings of this study present for the first time data on the cytomorphological structure and numbers of peripheral blood cells in both sexes of wild-caught, healthy *E. trinacris*. Since dates were derived from specimens in good health, the hematological profile here reported could be used as reference values for studies on *E. trinacris*, and could be beneficial to future clinical and conservation work on the endangered Sicilian pond turtle.

Acknowledgements

We thank the Director of Orto botanico of the University of Palermo for permission to sample the *Trachemys scripta elegans* specimens, the President of Parco dei Nebrodi and the Italian Ministry of the Environment and Protection of Land and Sea for granting the authorization U. prot. PNM-2011-0022035 25/10/2011 to sample *Emys*.

Research partially funded by the “Fondi di Ateneo” (60%) of the University of Palermo.

References

- Aguirre AA, Balazs GH, Spraker TR, Gross TS. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiological Zoology* 68:831–854.
- Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE. 1992. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research* 53:1645–1651.
- Arikan H, Cicek K. 2010. Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish herpetofauna. *Acta Herpetologica* 5:179–198.
- Azevedo A, Lunardi LO. 2003. Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorsignih*). *Acta Histochemica* 105:99–105. doi:10.1078/0065-1281-00693.
- Brenner D, Lewbart G, Stebbins M, Herman DW. 2002. Health survey of wild and captive bog turtles (*Clemmys muhlenbergii*) in North Carolina and Virginia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33:311–316.

- Campbell TW. 1996. Clinical pathology. In: Mader DR, editor. Reptile medicine surgery. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Saunders Company Ltd. pp. 248–257.
- Campbell TW. 1998. Interpretation of the reptilian blood profile. *Exotic Pet Practice* 3:33–36.
- Campbell TW, Ellis C. 2007. Avian and exotic animal hematology and cytology. 3rd ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Pub.
- Canfield PJ. 1998. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Australian Veterinary Journal* 76:793–800. doi:10.1111/j.1751-0813.1998.tb12328.x.
- Christopher MM, Berry KH, Henen BT, Nagy KA. 2003. Clinical disease and laboratory abnormalities in free-ranging desert tortoises in California (1990–1995). *Journal of Wildlife Diseases* 39:35–56. doi:10.7589/0090-3558-39.1.35.
- Christopher MM, Berry KH, Wallis IR, Nagy KA, Henen BT, Peterson CC. 1999. Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave Desert. *Journal of Wildlife Diseases* 35:212–238. doi:10.7589/0090-3558-35.2.212.
- Chung CS, Cheng CH, Chin SC, Lee AH, Chi CH. 2009. Morphologic and cytochemical characteristics of Asian yellow pond turtle (*Ocadia sinensis*) blood cells and their hematologic and plasma biochemical reference values. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40:76–85. doi:10.1638/2008-0023.1.
- Clark P, Johnstone AC, Ellison R, Goold M. 2001. Inclusions in the erythrocytes of eastern water dragons (*Physignathus lesueurii*). *Australian Veterinary Journal* 79:61–62. doi:10.1111/j.1751-0813.2001.tb10643.x.
- Colagar H, Jafari N. 2007. Red blood cell morphology and plasma proteins electrophoresis of the European pond terrapin *Emys orbicularis*. *African Journal of Biotechnology* 6:1578–1581.
- Deem SL, Dierenfeld ES, Sounquet GP, Alleman AR, Cray C, Poppenga RH, Norton TM, Karesh WB. 2006. Blood values in free-ranging nesting leatherback sea turtles (*Dermodochelys coriacea*) on the coast of the Republic of Gabon. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37:464–471. doi:10.1638/05-102.1.
- Dessauer HC. 1970. Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects. In: Gans C, Parson T, editors. *Biology of the reptilia*. London, UK: Academy Press. pp. 1–72.
- Dickinson VM, Jarchow JL, Trueblood MH. 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases* 38:143–153. doi:10.7589/0090-3558-38.1.143.
- Duguy R. 1967. Le cycle annuel des éléments figures dus sang chez *Emys orbicularis* L., *Lacerta muralis* Laur., et *Natrix maura* L. *Bulletin de la Societe Zoologique de France* 92:15.
- Duguy R. 1970. Numbers of blood cells and their variation. In: Gans C, Parson T, editors. *Biology of the reptilia*. Vol. 3. London, UK: Academy Press. pp. 93–110.
- Fried W, Gurney CW. 1965. Use of mild plethora to demonstrate an erythropoietic effect from small amounts of androgens. *Experimental Biology and Medicine* 120:519–521. doi:10.3181/00379727-120-30577.
- Fritz U, d'Angelo S, Pennisi MG, Lo Valvo M. 2006. Variation of Sicilian pond turtles, *Emys trinacris* - What makes a species cryptic? *Amphibia-Reptilia* 27:513–529. doi:10.1163/156853806778877095.
- Fritz U, Fattizzo T, Guicking D, Tripepi S, Pennisi MG, Lenk P, Joger U, Wink M. 2005. A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys* (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Zoologica Scripta* 34:351–371. doi:10.1111/j.1463-6409.2005.00188.x.
- Fritz U, Guicking D, Kami H, Arakelyan M, Auer M, Ayaz D, Fernandez CA, Bakiev AG, Celani A, Dzucik G, Fahd S, Havaš P, Joger U, Khabibullin VF, Mazanaeva LF, Široky P, Tripepi S, Vélez AV, Antón GV, Wink M. 2007. Mitochondrial phylogeography of European pond turtles (*Emys orbicularis*, *Emys trinacris*) - an update. *Amphibia-Reptilia* 28:418–426. doi:10.1163/156853807781374737.
- Frye FL. 1991. Hematology as applied to clinical reptile medicine. In: Frye FL, editor. *Biomedical surgical aspects of captive reptile husbandry*. Vol. 1. Malabar, Florida, USA: Krieger Publishing Co. pp. 209–280.
- Gu HX, Zhang FY, Li PP. 2011. A Review of chelonian hematology. *Asian Herpetological Research* 2:12–20. doi:10.3724/SP.J.1245.2011.00012.
- Heard D, Harr K, Wellehan J. 2004. Diagnostic sampling and laboratory tests. In: Girling SJ, Raiti P, editors. *Manual of reptiles*. 2nd ed. Quedgeley, Gloucester, UK: BSAVA Publisher. pp. 70–86.
- Hutchinson HV, Szarski H. 1965. Number of erythrocytes in some amphibians and reptiles. *Copeia* 1965:373–376. doi:10.2307/1440807.
- Innis CJ, Tlusty M, Wunn D. 2007. Hematologic and plasma biochemical analysis of juvenile head-started northern red-bellied cooters (*Pseudemys rubriventris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38:425–432. doi:10.1638/1042-7260(2007)38[425:HAPBAO]2.0.CO;2.
- Javanbakht H, Vaissi S, Parto P. 2013. The morphological characterization of the blood cells in the three species of turtle and tortoise in Iran. *Research in Zoology* 3:38–44.
- Kassab A, Shousha S, Fargani A. 2009. Morphology of blood cells, liver and spleen of the Desert tortoise (*Testudo graeca*). *The Open Anatomy Journal* 1:1–10. doi:10.2174/1877609400901010001.
- Knotková Z, Doubek J, Knotek Z, Hájková P. 2002. Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agryonemys horsfieldi*). *Acta Veterinaria Brno* 71:191–198. doi:10.2754/avb200271020191.
- Marks SK, Citino SB. 1990. Hematology and serum chemistry of the radiated tortoise (*Testudo radiata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 21:342–344.
- Matson CW, Palatnikov G, Islamzadeh A, McDonald TJ, Autenrieth RL, Donnelly KC, Bickham JW. 2005. Chromosomal damage in two species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. *Ecotoxicology* 14:513–525. doi:10.1007/s10646-005-0001-0.
- Mead KF, Borysenko M, Findlay SR. 1983. Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, possess cytophilic surface antibody with reagin function. *Journal of Immunology* 130:334–340.
- Metin K, Türkozan O, Kargin F, Koca YB, Taskavak E, Koca S. 2006. Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive European pond turtle *Emys orbicularis*. *Acta Veterinaria Brno* 75:49–55. doi:10.2754/avb200675010049.
- Montali RJ. 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of Comparative Pathology* 99:1–26. doi:10.1016/0021-9975(88)90101-6.
- Nagy KA, Medica PA. 1986. Physiological ecology of desert tortoises in southern Nevada. *Herpetologica* 42:73–92.
- Oliveira-Júnior AA, Tavares-Dias M, Marcon JL. 2009. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science* 86:146–151. doi:10.1016/j.rvsc.2008.05.015.
- Orós J, Casal A, Arencibia A. 2010. Microscopic studies on characterization of blood cells of endangered sea turtles. In: Méndez-Vilas A, Diaz J, editors. *Microscopy: Science, technology, applications and education*. Vol. 1. Badajoz, Spain: Formatex Research Center. pp. 75–84.

- Oyewale J, Ebute C, Ogunsanmi A, Olayemi F, Durotoye L. 1998. Weights and blood profiles of the West African hinge backed tortoise, *Kinixys erosa* and the desert tortoise, *Gopherus agassizii*. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 45:599–605. doi:10.1111/j.1439-0442.1998.tb00864.x.
- Paitz RT, Bowden RM. 2013. Sulfonation of maternal steroids is a conserved metabolic pathway in vertebrates. *Integrative and Comparative Biology* 53:895–901. doi:10.1093/icb/ict027.
- Pati A, Thapliyal J. 1984. Erythropoietin, testosterone, and thyroxine in the erythropoietic response of the snake, *Xenochrophis piscator*. *General and Comparative Endocrinology* 53:370–374. doi:10.1016/0016-6480(84)90264-8.
- Pedall I, Fritz U, Stuckas H, Valdeón A, Wink M. 2011. Gene flow across secondary contact zones of the *Emys orbicularis* complex in the Western Mediterranean and evidence for extinction and re-introduction of pond turtles on Corsica and Sardinia (Testudines: Emydidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49:44–57. doi:10.1111/j.1439-0469.2010.00572.x.
- Perpiñán D, Hernandez-Divers SM, Latimer KS, Akre T, Hagen C, Buhlmann KA, Hernandez-Divers SJ. 2008. Hematology of the Pascagoula map turtle (*Graptemys Gibbonsi*) and the south-east Asian box turtle (*Cuora amboinensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39:460–463. doi:10.1638/2007-0044.1.
- Peterson CC. 2002. Temporal, population, and sexual variation in hematocrit of free-living desert tortoises: Correlational tests of causal hypotheses. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 80:461–470. doi:10.1139/z02-021.
- Pitol DL, Issa JPM, Caetano FH, Lunardi LO. 2007. Morphological characterization of the leukocytes in circulating blood of the turtle (*Phrynops hilarii*). *International Journal of Morphology* 25:6. doi:10.4067/S0717-95022007000400002.
- Ream C, Ream R. 1966. The Influence of sampling methods on the estimation of population structure in painted turtles. *American Midland Naturalist* 75:325–338. doi:10.2307/2423395.
- Rhodin AGJ, Parham JF, van Dijk PP, Iverson JB. 2009. Turtles of the world: annotated checklist of taxonomy and synonymy, 2009 update, with conservation status summary. Conservation biology of freshwater turtles and tortoises: A compilation project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. *Chelonian Research Monographs* 5:000.39–000.84.
- Rossini M, Blanco PA, Marin E, Comerma-Steffensen S, Zerpa H. 2012. Haematological values of post-laying Arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Orinoco River, Venezuela. *Research in Veterinary Science* 92:128–131. doi:10.1016/j.rvsc.2010.10.026.
- Roskopf WJ. 2000. Disorders of reptilian leucocytes and erythrocytes. In: Fudge AM, editor. *Laboratory medicine: Avian and exotic pets*. Philadelphia, USA: Saunders, W.B. pp. 198–204.
- Ruiz G, Rosenmann M, Veloso A. 1983. Respiratory and hematological adaptations to high altitude in *Telmatobius* frogs from the Chilean Andes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 76:109–113. doi:10.1016/0300-9629(83)90300-6.
- Ruiz G, Rosenmann M, Veloso A. 1989. Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 94:643–646. doi:10.1016/0300-9629(89)90609-9.
- Scheelings TF, Jessop TS. 2011. Influence of capture method, habitat quality and individual traits on blood parameters of free ranging lace monitors (*Varanus varius*). *Australian Veterinary Journal* 89:360–365.
- Scheelings TF, Rafferty AR. 2012. Hematologic and serum biochemical values of gravid freshwater Australian chelonians. *Journal of Wildlife Diseases* 48:314–321. doi:10.7589/0090-3558-48.2.314.
- Schwanz L, Warner DA, McGaugh S, Di Terlizzi R, Bronikowski A. 2011. State-dependent physiological maintenance in a long-lived ectotherm, the painted turtle (*Chrysemys picta*). *The Journal of Experimental Biology* 214:88–97. doi:10.1242/jeb.046813.
- Stein G. 1996. Hematologic and blood chemistry values in reptiles. In: Mader DR, editor. *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Saunders, W B. Company Ltd. pp. 473–483.
- Stuckas H, Velo-Antón G, Fahd S, Kalboussi M, Rouag R, Arculeo M, Marrone F, Sacco F, Vamberger M, Fritz U. 2014. Where are you from, stranger? The enigmatic biogeography of North African pond turtles (*Emys orbicularis*). *Organisms Diversity and Evolution*. doi:10.1007/s13127-014-0168-4.
- Sykes JM, Klaphake E. 2008. Reptile hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 11:481–500. doi:10.1016/j.cvex.2008.03.005.
- Szarski H. 1968. Evolution of cell size in lower vertebrates. In: Orvig T, editor. *Current problems of lower vertebrate phylogeny*. Stockholm, SE: Almqvist and Wiksell. pp. 445–453.
- Tavares-Dias M, Oliveira-Júnior AA, Marcon JL. 2008. Methodological limitations of counting total leukocytes and thrombocytes in reptiles (Amazon turtle, *Podocnemis expansa*): An analysis and discussion. *Acta Amazonica* 38:351–356. doi:10.1590/S0044-59672008000200020.
- Tavares-Dias M, Oliveira-Junior AA, Silva MG, Marcon JL, Barcellos JFM. 2009. Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Veterinarski Arhiv* 79:601–610.
- Taylor RW, Jacobson ER. 1982. Hematology and serum chemistry of the gopher tortoise, *Gopherus polyphemus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 72:425–428. doi:10.1016/0300-9629(82)90241-9.
- Tosunoglu M, Yilmaz N, Gul C. 2011. Effects of varying ecological conditions on the blood parameters of freshwater turtles in Canakkale (Turkey). *Ekoloji* 20:7–12. doi:10.5053/ekoloji.2011.782.
- Ugurtas IH, Sevinc M, Yildirimhan HS. 2003. Erythrocyte size and morphology of some tortoises and turtles from Turkey. *Zoological Studies* 42:173–178.
- Wilkinson R. 2003. Clinical pathology. In: McArthur S, Wilkinson R, Meyer J, editors. *Medicine and surgery of tortoises and turtles*. Oxford, UK: Blackwell Publishing. pp. 141–186.
- Wood FE, Ebanks GK. 1984. Blood cytology and hematology of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Herpetologica* 40:6.
- Work TM, Raskin RE, Balazs GH, Whittaker SD. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *American Journal of Veterinary Research* 59:1252–1257.
- Yilmaz N, Tosunoglu M. 2010. Hematology and some plasma biochemistry values of free living freshwater turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys rivulata*) from Turkey. *North-Western Journal of Zoology* 6:109–117.
- Yu PH, Yang PY, Chiu YS, Chi CH. 2013. Hematologic and plasma biochemical reference values of the yellow pond turtle *Mauremys mutica* and the effects of sex and season. *Zoological Studies* 52:24–29. doi:10.1186/1810-522X-52-24.
- Zuffi MAL, Gariboldi A. 1995. Geographical patterns of Italian *Emys orbicularis*: A biometrical analysis. In: Llorente GA, Montori A, Santox X, Carretero MA, editors. *Scientia Herpetologica*. Barcelona: Agal. pp. 120–123.
- Zuffi MAL, Odetti F, Batistoni R, Mancino G. 2006. Geographic variation of sexual size dimorphism and genetics in the European pond turtle, *Emys orbicularis* and *Emys trinacris*, of Italy. *Italian Journal of Zoology* 73:363–372. doi:10.1080/1125000600971323.

Where are you from, stranger? The enigmatic biogeography of North African pond turtles (*Emys orbicularis*)

Heiko Stuckas · Guillermo Velo-Antón · Soumia Fahd · Mohsen Kalboussi · Rachid Rouag · Marco Arculeo · Federico Marrone · Francesco Sacco · Melita Vamberger · Uwe Fritz

Received: 27 November 2013 / Accepted: 4 February 2014
© Gesellschaft für Biologische Systematik 2014

Abstract The European pond turtle (*Emys orbicularis*) is a Nearctic element in the African fauna and thought to have invaded North Africa from the Iberian Peninsula. All North African populations are currently identified with the subspecies *E. o. occidentalis*. However, a nearly range-wide sampling in North Africa used for analyses of mitochondrial and microsatellite DNA provides evidence that only Moroccan populations belong to this taxon, while eastern Algerian and Tunisian pond turtles represent an undescribed distinct subspecies. These two taxa are most closely related to *E. o. galloitalica* with a native distribution along the Mediterranean coast of northern Spain

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13127-014-0168-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. Stuckas · M. Vamberger · U. Fritz (✉)
Museum of Zoology, Senckenberg Dresden, A. B. Meyer Building,
01109 Dresden, Germany
e-mail: Uwe.Fritz@senckenberg.de

G. Velo-Antón
CIBIO/InBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos
Genéticos, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão,
4485-661 Vairão, Portugal

S. Fahd
Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université
Abdelmalek Essaâdi, 93000 Tétouan, Morocco

M. Kalboussi
Institut Sylvo-Pastoral, 8110 Tabarka, Tunisia

R. Rouag
Institut d'Agronomie, Centre universitaire d'El Tarf, 36000 El Tarf,
Algeria

M. Arculeo · F. Marrone · F. Sacco
Dipartimento di Scienze e Tecnologia Biologica, Chimiche e
Farmaceutiche (STEBICEF), Università di Palermo, Via Archirafi
18, 90123 Palermo, Italy

through southern France to western and southern Italy. This group is sister to a clade comprising several mitochondrial lineages and subspecies of *E. orbicularis* from Central and Eastern Europe plus Asia, and the successive sisters are *E. o. hellenica* and *E. trinacris*. Our results suggest that *E. orbicularis* has been present in North Africa longer than on the Iberian Peninsula and that after an initial invasion of North Africa by pond turtles from an unknown European source region, there was a phase of diversification in North Africa, followed by a later re-invasion of Europe by one of the African lineages. The differentiation of pond turtles in North Africa parallels a general phylogeographic paradigm in amphibians and reptiles, with deeply divergent lineages in the western and eastern Maghreb. Acknowledging their genetic similarity, we propose to synonymize the previously recognized Iberian subspecies *E. o. fritzjuergenobsti* with *E. o. occidentalis* sensu stricto. The seriously imperiled Moroccan populations of *E. o. occidentalis* represent two Management Units different in mitochondrial haplotypes and microsatellite markers. The conservation status of eastern Algerian pond turtles is unclear, while Tunisian populations are endangered. Considering that Algerian and Tunisian pond turtles represent an endemic taxon, their situation throughout the historical range should be surveyed to establish a basis for conservation measures.

Keywords Reptilia · Testudines · Emydidae · Phylogeography · Africa · Iberian Peninsula · Palaearctic

Introduction

The European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758), is distributed over a vast range embracing northwestern Africa and much of Europe and western Asia (Fig. 1). Sicilian pond turtles, formerly treated as conspecific with *E. orbicularis*, are today recognized as the distinct species *E. trinacris* Fritz et al. 2005

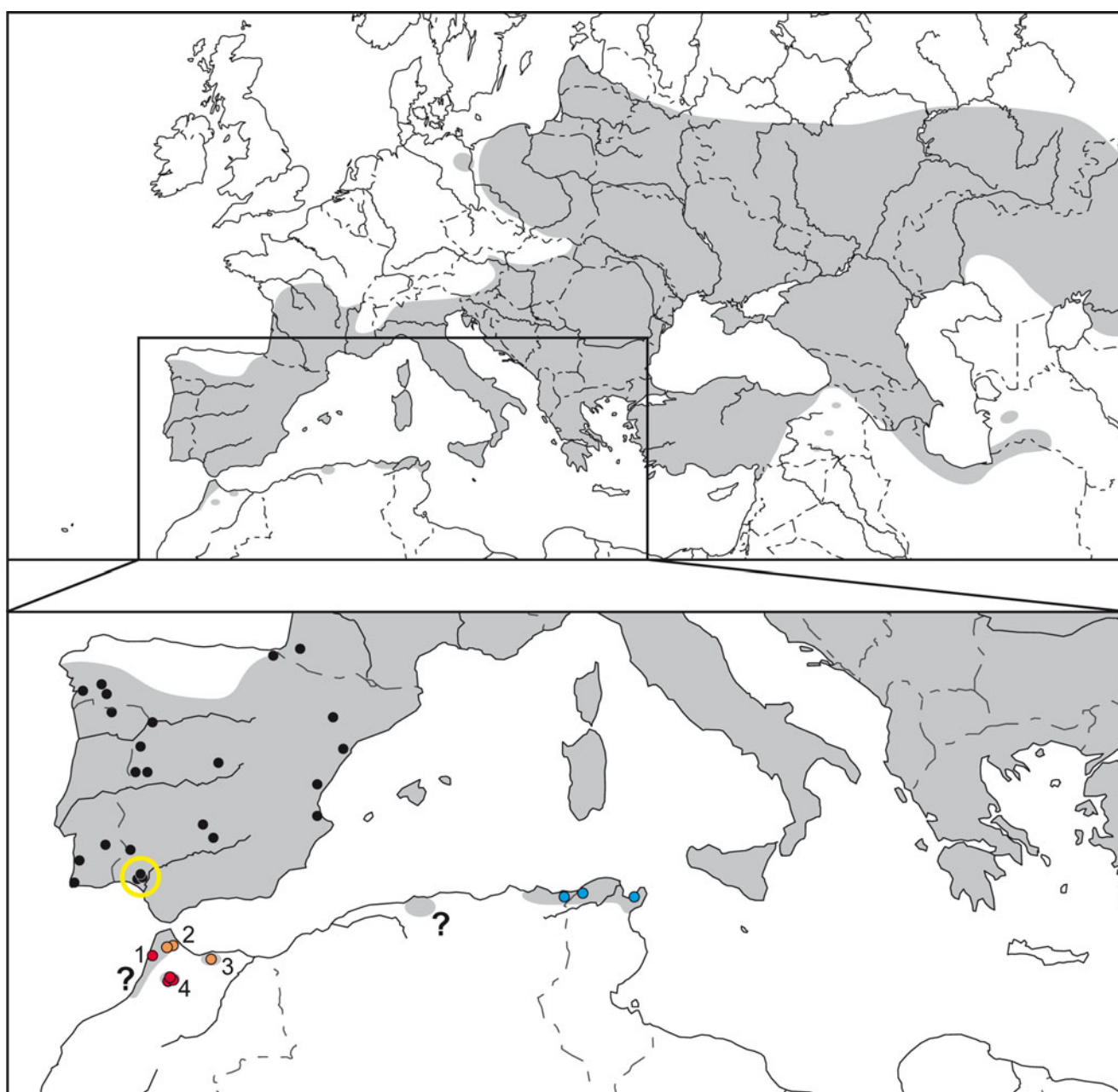


Fig. 1 *Top*: Distribution range of European and Sicilian pond turtles (*Emys orbicularis*, *E. trinacris*, shaded). *Bottom*: Sampling sites of pond turtles yielding haplotypes of mtDNA lineage VI in Europe (Fritz et al. 2007; Velo-Antón et al. 2011; present study) and of North African samples (present study). *Red sampling sites*: Morocco (Middle Atlas Mountains and Kenitra Province), *orange*: Morocco (Rif Mountains),

blue: eastern Algeria, Tunisia; sampling sites in the Doñana National Park (Spain) used for genotyping *encircled in yellow*. Possibly extinct populations (Gharb plain, Morocco, Fahd et al. 2009; Algiers Region, Algeria, Fritz 1994) are indicated by *question marks*. Moroccan regions mentioned in the text are: 1 Kenitra Province; 2 Rif Mountains (west); 3 Rif Mountains (east); 4 Middle Atlas Mountains

(Fritz and Havaš 2007; van Dijk et al. 2012), and these two species together constitute the only Palaearctic representatives of the otherwise strictly New World family Emydidae (McDowell 1964; Fritz and Havaš 2007; van Dijk et al. 2012). The ancestor of the extant *Emys* species is thought to have immigrated from North America via the Bering Bridge during the Miocene (Hutchison 1981; Fritz 1995, 1996, 2003). In North Africa, *E. orbicularis* is generally understood as a very recent invader

from Europe (Bons and Geniez 1996; Schleich et al. 1996; Lapparent de Broin 2000). The rich African freshwater turtle fauna is otherwise composed of softshell turtles (Trionychidae), pelomedusid side-neck turtles (Pelomedusidae) and the geoemydid *Mauremys leprosa* (Fritz and Havaš 2007; van Dijk et al. 2012), so that *E. orbicularis*, having Nearctic roots and immigrated from Europe, represents a doubly exotic element. The species occurs in North Africa in a patchy range with some

isolated populations in Morocco and, widely separated thereof, in eastern Algeria and northern Tunisia (Fig. 1). Whether *E. orbicularis* is extinct or still persists near Algiers, another isolated region for which a few historical records are known, remains unclear (Fritz 1994, 2003).

While the knowledge of the phylogeography and taxonomy of European and Sicilian pond turtles has increased steadily during the past 25 years (Fritz 1996, 1998, 2001, 2003; Lenk et al. 1999; Fritz et al. 2004, 2005, 2006a, 2007, 2009a; Sommer et al. 2007, 2009; Velo-Antón et al. 2007, 2008, 2011; Pedall et al. 2011), the North African populations remain poorly studied. For instance, several studies accumulated a large, nearly range-wide data set of more than 1,550 sequences of the mitochondrial cytochrome *b* (*cyt b*) gene for phylogeographic purposes (Lenk et al. 1999; Fritz et al. 2004, 2005, 2006a, 2007, 2009a; Sommer et al. 2009; Velo-Antón et al. 2011). However, not more than four of these sequences originated from North African turtles (three turtles from the Rif Mountains, Morocco, and one from the Middle Atlas Mountains, Morocco; Lenk et al. 1999; Fritz et al. 2007). The mitochondrial haplotypes of these Moroccan turtles closely resemble haplotypes endemic in Spain and Portugal. Pond turtles from other parts of the range represent nine distinct genetic lineages (Lenk et al. 1999; Fritz et al. 2007, 2009a), two of which penetrate the Iberian Peninsula in the Pyrenean region and hybridize there with the Iberian lineage (Lenk et al. 1999; Fritz et al. 2007; Pedall et al. 2011). In phylogenetic and parsimony network analyses, the Moroccan haplotypes came consistently out as basal to the Iberian haplotypes, suggesting that the latter are derived from the North African haplotypes. This has led to the speculation that *E. orbicularis* might have colonized the Iberian Peninsula from North Africa (Fritz et al. 2007). Such a scenario would conflict with the established view that the European pond turtle is a recent invader of North Africa (Bons and Geniez 1996; Schleich et al. 1996; Lapparent de Broin 2000).

In the present article, we examine this question by expanding the sampling considerably with 45 new samples from North Africa, including for the first time turtles from eastern Algeria and Tunisia. Based on this sampling, we analyze a robust genetic data set (approximately 3,500 bp of mitochondrial DNA and 15 microsatellite markers) to study the biogeography of European pond turtles in a region crucial for understanding the evolutionary history of both *E. orbicularis* and *E. trinacris* and, in particular, the colonization history of North Africa and the Iberian Peninsula.

Materials and methods

Sampling

Forty-five new samples (tissue and blood) of North African pond turtles were obtained. Among these were for the first

time samples from eastern Algeria ($n=14$) and Tunisia ($n=8$). With respect to Moroccan samples ($n=23$), 2 came from Kenitra Province, 7 from the Rif Mountains and 14 from the Middle Atlas Mountains. Considering the precarious conservation situation of *Emys orbicularis* in North Africa (Fritz 2003; Fahd et al. 2009), precise locality data are not published here. Approximate sampling sites are shown in Fig. 1. For comparison of population structuring, 24 Spanish samples from the Doñana National Park were used, representing a geographically close population from the European side of the Straits of Gibraltar.

DNA extraction, PCR and sequencing of mtDNA, alignment

Total DNA from the North African samples and two representatives of each other mtDNA lineage of *Emys orbicularis* and *E. trinacris* (Table S1) was isolated using standard proteinase K and phenol chloroform protocols (Sambrook and Russell 2001), the DTAB method (Gustincich et al. 1991) or the InnuPrep DNA Mini Kit (Analytik Jena, Jena, Germany).

PCR was used to amplify five different mtDNA fragments (12S, 16S, *cyt b*, D-loop, ND4+adjacent DNA coding for tRNAs) and performed in a final volume of 20 μ l containing 1 unit *Taq* polymerase (Bioron, Ludwigshafen, Germany) with the buffer recommended by the supplier, 2.5 mM MgCl₂ (Bioron), 0.5 mM of each dNTP (Thermo-Scientific, St. Leon-Rot, Germany), 0.5 μ M of each primer (Table S2) and 10–50 ng of total DNA.

The *cyt b* fragment was amplified using the primer pair CytbG and mt-f-na, resulting in a DNA fragment of approximately 1,250 bp. When PCR failed, two alternative primer pairs were applied to generate two shorter overlapping fragments (CytbG and mt-E-Rev2: approximately 870 bp; mt-C-For2 and mt-f-na: approximately 800 bp). Thermocycling conditions for all three primer combinations were the same. The other mtDNA fragments were amplified using a single primer pair (Table S2). Thermocycling protocols are summarized in Table S3.

PCR products were purified using the ExoSAP-IT enzymatic cleanup (USB Europe GmbH, Staufien, Germany) and sequenced on an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and the primers indicated in Table S2. Resulting sequence data were aligned in BIOEDIT 7.0.5.2 (Hall 1999) and individually checked. GenBank accession numbers are listed in Table S1.

Haplotype analyses and phylogenetic inference

Previous phylogeographic studies on European pond turtles relied largely on sequence variation of the *cyt b* gene (Lenk et al. 1999; Fritz et al. 2004, 2005, 2007, 2009a; Velo-Antón

et al. 2011). To compare our 45 new North African turtles to the comprehensive data set of 1,551 *cyt b* sequences published by Fritz et al. (2009a) and Velo-Antón et al. (2011), a parsimony network (TCS 1.21; Clement et al. 2000) was calculated using a 1,031-bp-long alignment of 1,596 sequences and the default 95 % probability threshold. In addition, uncorrected *p* distances among and within mitochondrial lineages were obtained using MEGA 6.06 (Tamura et al. 2013).

For further examination of phylogenetic relationships of the North African turtles, the *cyt b* data were concatenated with the other mtDNA fragments, resulting in an alignment of 3,475 bp length of the following partitions: 12S (395 bp), 16S (537 bp), D-loop (645 bp), *cyt b* (1,031 bp), ND4 (682 bp), tRNA-His (70 bp), tRNA-Ser (66 bp) and tRNA-Leu (49 bp). In addition to the data of all North African samples, each Iberian haplotype and two representatives of all other mitochondrial lineages of *Emys orbicularis* and *E. trinacris* (see Fritz et al. 2007, 2009a) were included. Previously published sequences of all other emyde genera served as outgroups (Table S1).

To determine the best partitioning for phylogenetic inference, three partition schemes (no partitioning, partitioning by DNA fragment and maximum partitioning; Table S4) were compared using the Bayesian information criterion (BIC) according to Li et al. (2008). In the second and third partition schemes, the short tRNA fragments were pooled in a single partition of 185 bp. In the maximum partitioning scheme, each codon of protein-coding genes and each non-protein-coding DNA area corresponded to a distinct partition, except for the lumped DNA coding for tRNAs.

Bayesian trees were computed for each scheme using MRBAYES 3.2.1 (Ronquist et al. 2012), with the best evolutionary model for each partition established in jMODELTEST 0.1.1 (Posada 2008) by the BIC (Table S4). Models were defined by the number of substitution types (nst) and the substitution rates for each partition, but without setting priors for the alpha parameter, points of invariance and rate matrix, allowing these parameters to be estimated by MRBAYES. Phylogenetic analyses were performed using two parallel runs (each with four chains). The chains ran for 10 million generations with every 500th generation sampled and reached a split frequency below 0.05. The calculation parameters were analyzed using a burn-in of 2.5 million generations to assure that both runs converged. Subsequently, only the plateau of the most likely trees was sampled using the same burn-in, and a 50 % majority rule consensus tree was generated. The posterior probability of any individual clade in this consensus tree corresponds to the percentage of all trees containing that clade and is a measure of clade frequency and credibility.

In addition to Bayesian inference (BI), maximum likelihood (ML) calculations were run using RAXML 7.2.6 (Stamatakis 2006) and the default GTR+G model. For each partition scheme, five independent ML searches were

performed using different starting conditions and the fast bootstrap algorithm to explore the robustness of the phylogenetic trees by comparing the best trees. Subsequently, 1,000 non-parametric thorough bootstrap replicates were computed and the values plotted against the best tree.

In all cases, the trees were rooted with *Glyptemys*, a genus constituting the sister group of the remaining emyde according to Wiens et al. (2010). The maximum partitioning scheme delivered the most accurate phylogenetic inference for both BI and ML (Table S5).

Microsatellites

Our North African samples (Table S1) plus 24 samples from the southern Spanish Doñana National Park were genotyped at 16 previously characterized microsatellite loci, which are unlinked and highly polymorphic in *Emys orbicularis* (Ciofi et al. 2009; Pedall et al. 2009). Microsatellite DNA was amplified using four multiplex PCRs (Table S6) in a final volume of 10 μ l containing 0.5 units *Taq* polymerase (Bioron) together with the buffer recommended by the supplier, 1.5 mM MgCl₂ (Bioron), 0.2 mM of each dNTP (Thermo-Scientific), 2 μ g of bovine serum albumin (Thermo-Scientific) and 20–40 ng of total DNA. Each multiplex reaction contained a specific set of primers at a specific concentration: Multiplex reaction I contained primers for locus msEo21 (0.132 μ M each), msEo29 (0.4 μ M each), msEo41 (0.4 μ M each) and GmuD107 (0.1 μ M each); multiplex reaction II contained primers for msEo2 (0.2 μ M each), GmuD16 (0.4 μ M each), GmuD55 (0.2 μ M each) and GmuD88 (0.1 μ M each); multiplex reaction III contained primers for Emys2 (0.4 μ M each), Emys4 (0.6 μ M each), Emys5 (0.4 μ M each) and Emys11 (0.2 μ M each); multiplex reaction IV contained primers for Emys1 (0.4 μ M each), Emys6 (0.5 μ M each), Emys7 (0.2 μ M each) and Emys8 (0.5 μ M each). Thermocycling conditions are summarized in Table S7.

Fragment lengths were determined on an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using the GeneScan–600 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) and the software PEAK SCANNER 1.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Genetic cluster analysis and diversity indices for microsatellite data

Our microsatellite data were analyzed with an unsupervised Bayesian clustering approach as implemented in STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000; Hubisz et al. 2009) using the admixture model and correlated allele frequencies. However, the Emys2 locus was excluded because allele sizes could not be determined unambiguously. STRUCTURE searches in the data set for partitions that are, as far as possible, in Hardy-

Weinberg equilibrium and linkage equilibrium. The upper bound for calculations was arbitrarily set to $K=10$, a value clearly beyond the number of North African sampling regions plus the Doñana National Park (Fig. 1). The most likely number of clusters (K) was determined using the maximum posterior probability method (Pritchard et al. 2000) and the ΔK method (Evanno et al. 2005). Calculations were repeated ten times for each K using a MCMC chain of 750,000 generations for each run, including a burn-in of 250,000 generations. Population structuring and individual admixture were visualized using the software DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004).

Clusters inferred by STRUCTURE were further examined by calculating pairwise F_{ST} values and analyses of molecular variance (AMOVAs) using ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005). In addition, clusters were characterized by genetic diversity indices. For this purpose, allele frequency tables were produced using CONVERT 1.31 (Glaubitz 2004) and subsequently taken to calculate the total number of alleles per cluster, the mean number of alleles per locus and to count the total number of private alleles per cluster. FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995) was employed to estimate F_{IS} values and mean values for allelic richness per locus and population. Observed and expected heterozygosities were estimated for each locus in ARLEQUIN and used to calculate the arithmetic means.

Results

mtDNA analyses

In parsimony network analysis, North African *cyt b* sequences were assigned to two distinct clusters (Fig. 2), indicating a previously unknown major phylogeographic break within North Africa. Moroccan sequences clustered together with Iberian haplotypes in mtDNA lineage VI sensu Lenk et al. (1999), and the Moroccan haplotypes had a basal position compared to the Iberian ones. By contrast, Algerian and Tunisian sequences were assigned to mtDNA lineage IX sensu Fritz et al. (2005, 2007), which was known before only from a zoo turtle without locality data. Among the Moroccan sequences were two previously unknown haplotypes (VIh, VIi), and also among the Algerian and Tunisian sequences were two new haplotypes (IXb, IXc).

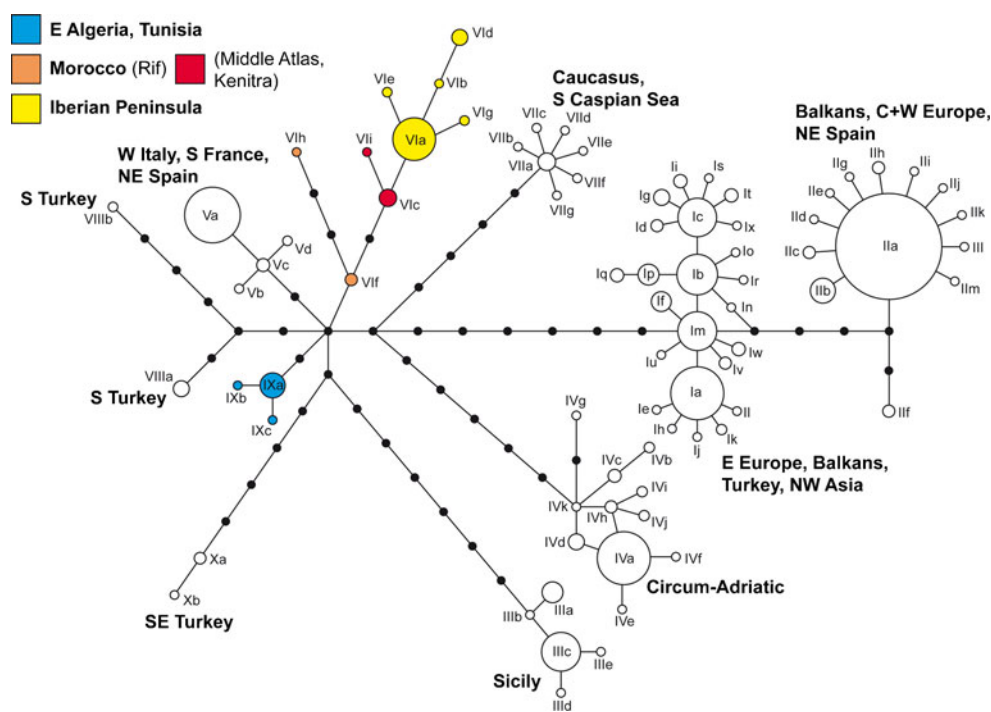
The geographical distribution of haplotypes suggests a weak phylogeographic structuring within each lineage occurring in North Africa. The most common Moroccan haplotype is VIc ($n=16$), which was found in 14 turtles from the Middle Atlas and two from Kenitra Province. Haplotype VIc differs from the most frequent Iberian haplotype VIa in just one mutational step. Also the newly discovered Moroccan haplotype VIi differs in one step from VIc. Haplotype VIi was found in one turtle from the Middle Atlas. Most turtles from the Rif Mountains ($n=9$) harbored haplotype VIi, regardless

of whether the turtles originate from the western or eastern Rif Mountains. One turtle from the Rif Mountains yielded haplotype VIh, which differs in three mutational steps from VIi (Fig. 2; Table S1). The most common haplotype among Algerian and Tunisian sequences is IXa ($n=18$), which was found at all three collecting sites in easternmost Algeria and Tunisia. Haplotype IXb was found twice and occurred only in easternmost Algeria; haplotype IXc was also found twice, but in northeastern Tunisia (Table S1). Haplotypes XIb and XIc differ from XIa in one mutational step each (Fig. 2).

The uncorrected p distance between distinct haplotypes of lineages VI ($n=9$) and IX ($n=3$) amounts on average to 0.66 %. This falls into the lower range observed among the ten mitochondrial lineages of *E. orbicularis* and *E. trinacris* (Table S8). Within lineage VI, an average divergence of 0.31 % is observed, and within lineage IX, 0.13 %. The five Iberian haplotypes of lineage VI differ on average by 0.37 % from the four Moroccan haplotypes of lineage VI. Among the Iberian haplotypes an average divergence of 0.18 % occurs, while the Moroccan haplotypes differ by 0.32 %, reflecting the greater number of mutational steps among Moroccan sequences (Fig. 2).

Phylogenetic analyses using ML and BI and the concatenated mtDNA sequences of 3,475 bp length yielded completely identical trees. They mirrored the differentiation between Moroccan plus Iberian pond turtles on the one hand and Algerian plus Tunisian turtles on the other (Fig. 3). Haplotypes of each group clustered in two well-supported clades (corresponding to haplotypes of mtDNA lineages VI and IX, respectively), which were placed together with haplotypes of mtDNA lineage V (*E. o. galloitalica*, distributed in western Italy, southern France and northeastern Spain) in a well-supported, more inclusive Western Mediterranean clade. This Western Mediterranean clade was with high support sister to a clade comprising the mtDNA lineages I, II, VII, VIII and X from Central and Eastern Europe and Asia. These lineages agree with *E. o. orbicularis*, *E. o. eiselti*, *E. o. persica* and an undescribed subspecies from southern Turkey (Fritz et al. 2009a). The successive sister groups were the circum-Adriatic lineage IV (*E. o. hellenica*) and the Sicilian lineage III (*E. trinacris*). Within the Western Mediterranean clade, the placement of each of the three included clades was badly resolved, and a sister group relationship of the Moroccan-Iberian clade and the Algerian-Tunisian clade was only weakly supported. Within the Moroccan-Iberian clade, haplotypes from the Iberian Peninsula constituted a weakly supported clade, which was firmly embedded within Moroccan sequences. If the mtDNA sequences are related to the currently recognized subspecies of *E. orbicularis* (Fig. 3), the sequences of the North African subspecies *E. o. occidentalis* correspond to two distinct mitochondrial clades (VI and IX). Moreover, *E. o. occidentalis* is paraphyletic with respect to the Iberian subspecies *E. o. fritziuergenobsti*.

Fig. 2 Parsimony network for mitochondrial haplotypes of *Emys orbicularis* (mtDNA lineages I and II, IV-X sensu Lenk et al. 1999; Fritz et al. 2007, 2009a) and *E. trinacris* (mtDNA lineage III) based on 1,031 bp of the *cyt b* gene of 1,596 samples. Symbol size very roughly reflects haplotype frequency. Black circles indicate missing haplotypes; each line connecting haplotypes corresponds to one mutational step. Introduced populations harboring lineage V also occur on Corsica and Sardinia (Pedall et al. 2011) and on the Balearic Islands, where lineage II is found as well (Lenk et al. 1999)



Microsatellite analyses

According to the maximum posterior probability method (Pritchard et al. 2000), the most likely number of clusters (K) for the pond turtles from North Africa and the Doñana National Park (Spain) is four ($K=4$; Fig. S1), whereas the ΔK method (Evanno et al. 2005) suggested $K=2$ (Fig. S2). However, the ΔK values show for $K=4$ a pronounced second peak, giving the maximum posterior probability approach at least some support. Based on this evidence, the inferred population structuring for $K=2$ and $K=4$ is presented here (Fig. 4).

Under $K=2$, all Moroccan turtles are lumped together with the ones from the Doñana National Park (Spain). The second cluster is constituted by Algerian and Tunisian turtles, without any indication of admixture. An AMOVA revealed that 67.6 % of the molecular variance occurred within and 32.4 % between the two clusters, corresponding to an F_{ST} value of 0.324 between the two entities.

Under $K=4$, the Algerian-Tunisian cluster remains unchanged. However, the Moroccan turtles are assigned to two distinct clusters (Rif Mountains vs. Middle Atlas Mountains plus Kenitra) and the Spanish turtles to a fourth cluster, with weak individual admixture among the Moroccan and Spanish clusters. Compared to the turtles from the Doñana National Park, the North African clusters did not show any sign of a reduced genetic diversity (Table S9). According to an AMOVA, 67.5 % of the molecular variance occurred within and 32.5 % among the four clusters. Pairwise F_{ST} values ranged from 0.220 to 0.408 (Table S10). The Algerian-

Tunisian cluster was the most differentiated one, with fixation indices of 0.327-0.408, while between the Moroccan and Spanish clusters lower values were observed (0.220-0.291). It should be noted that the two Moroccan clusters differed by a higher value (0.291) than when each of the two Moroccan clusters was compared to the Spanish one (0.220 and 0.230).

Discussion

Biogeography

Our most prominent finding is that North African pond turtles represent two completely distinct genetic entities (mtDNA lineages VI and IX), which are supported by mitochondrial and microsatellite data (Figs. 2, 3, 4). One entity corresponds to Moroccan pond turtles (lineage VI) and the other to eastern Algerian plus Tunisian turtles (lineage IX).

Moreover, our additional mitochondrial sequence data yield a much better resolved phylogeny compared to previous studies relying on the mitochondrial *cyt b* gene alone (Lenk et al. 1999; Fritz et al. 2005, 2007, 2009a; Spinks and Shaffer 2009) or using three slowly evolving nuclear genes (Spinks and Shaffer 2009). Our data confirm the sister group relationship of *Emys orbicularis* and the Sicilian species *E. trinacris* (Fig. 3; Fritz et al. 2005, 2007, 2009a). The mitochondrial lineages representing the polytypic *E. orbicularis* cluster in three moderately to well-supported clades (Fig. 3) with a branching pattern indicating a hitherto unknown biogeographic scenario. A Western Mediterranean clade includes the two

Fig. 3 Maximum likelihood tree based on 3,475-bp mtDNA of *Emys orbicularis* and *E. trinacris* using the maximum partitioning scheme (Table S4). The topology inferred by Bayesian analyses was completely identical. For *E. orbicularis*, currently recognized subspecies indicated. Note that haplotypes of *E. o. occidentalis* are paraphyletic with respect to *E. o. fritzjuergenobsti*; see Discussion. Numbers above nodes are thorough bootstrap values greater than 50; numbers below nodes, Bayesian posterior probabilities greater than 0.95. Asterisks indicate maximum support under both methods. For each sample, the mitochondrial haplotype is given, preceded by the lab code or in one case by the GenBank accession number (GU646002). Haplotype nomenclature follows Lenk et al. (1999) and Fritz et al. (2005, 2007, 2009a). Identical haplotypes marked with asterisks are identical in their cyt b sequences, but differ elsewhere. Outgroups removed for clarity (branching patterns correspond to expectations; see Wiens et al. 2010)

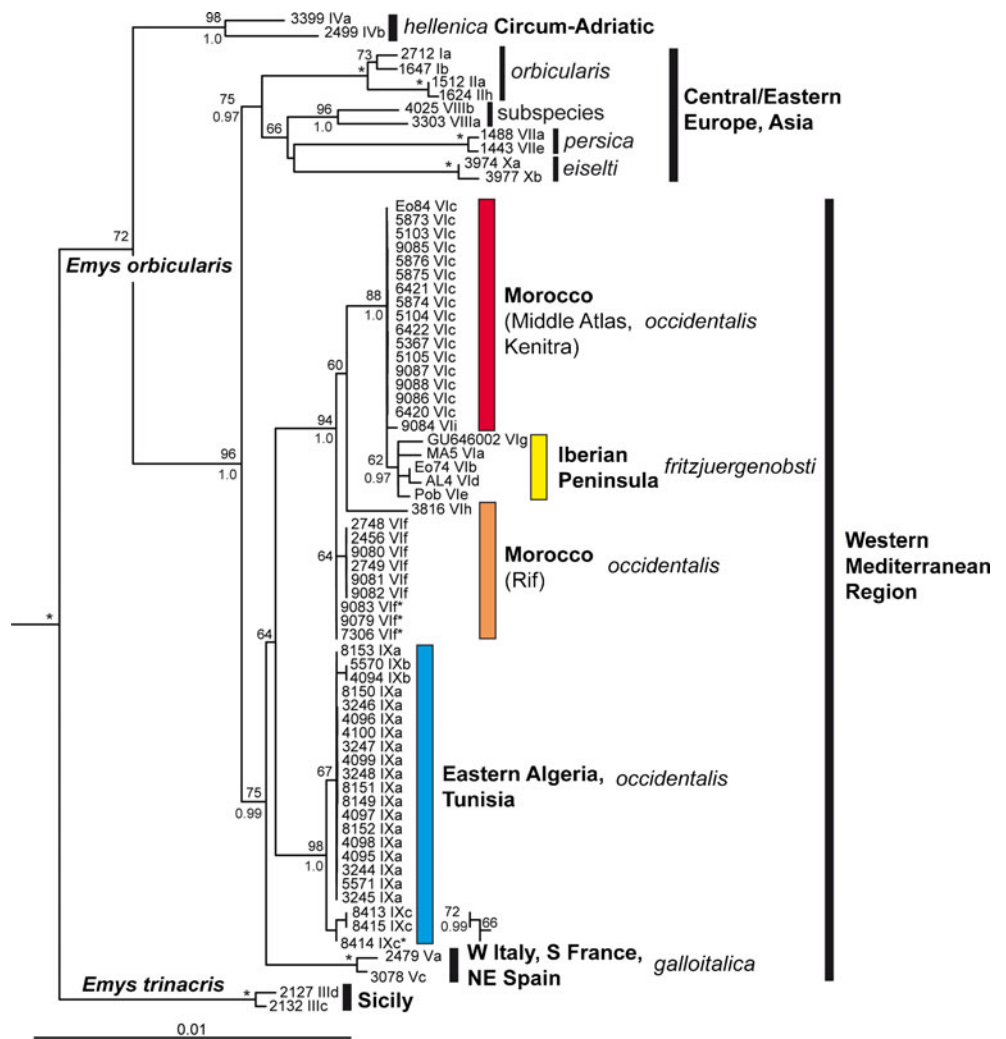
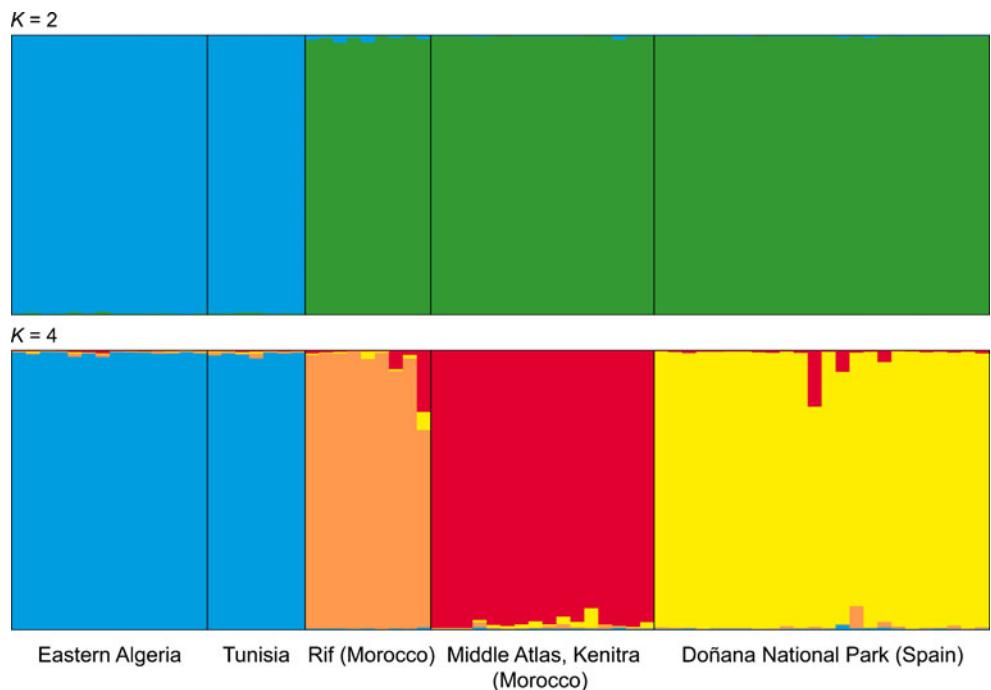


Fig. 4 Inferred population structure of European pond turtles from North Africa and the Doñana National Park (Spain) for $K=2$ (top) and $K=4$ (bottom) using 15 microsatellite loci. Shown are the STRUCTURE runs with the best probability values. Distinct clusters are color-coded. Within each cluster, an individual turtle corresponds to a vertical segment that reflects its ancestry. Mixed ancestries are indicated by differently colored sectors, corresponding to inferred genetic percentages of the corresponding clusters. Sampling regions are separated by black lines



lineages VI (Morocco, Iberian Peninsula) and IX (Algeria, Tunisia) plus lineage V. The latter lineage is distributed along the Mediterranean coast of northern Spain through southern France to western and southern Italy and corresponds to the subspecies *galloitalica* (introduced populations also occur on Corsica and Sardinia; Lenk et al. 1999; Fritz et al. 2005, 2007; Pedall et al. 2011). This well-supported Western Mediterranean clade is sister to another clade containing several mtDNA lineages (I, II, VII, VIII, X) occurring in the eastern part of the distribution range of *E. orbicularis*, and the successive sister group is constituted by lineage IV having a circum-Adriatic distribution. This suggests that there was a sequence of vicariance events, leading first to the separation of the Sicilian *E. trinacris* (lineage III), then to the evolution of lineage IV (*E. o. hellenica*), and then to a split between a western and an eastern stock, which diverged later into the remaining eight mtDNA lineages of *E. orbicularis* identified with all other currently recognized subspecies of *E. orbicularis* (Fig. 3), including the North African populations.

In this context it must be emphasized that it remains entirely unclear when and from where *E. orbicularis* invaded North Africa. The close phylogenetic relationship of the two North African lineages VI and IX with lineage V from the northwestern Mediterranean coast (Fig. 3) suggests that the ancestor of the two North African lineages originated somewhere in western Europe and that lineages VI and IX diverged only in North Africa, because lineage IX is endemic there. Furthermore, we found a very close relationship between Moroccan and Iberian pond turtles (Fig. 4: top), and with respect to mitochondrial data, sequences of Iberian turtles are phylogenetically nested among Moroccan sequences. This relationship is also confirmed by a parsimony network analysis, in which the Moroccan sequences are basal to the Iberian sequences (Figs. 2 and 3), indicating that Iberian pond turtles have evolved from North African founders and not vice versa, as traditionally assumed (Bons and Geniez 1996; Schleich et al. 1996; Lapparent de Broin 2000). The occurrence of two genetically deeply divergent lineages in North Africa, together with the fact that Iberian pond turtles seem to be derived from North African ancestors, implies that European pond turtles have been present in North Africa longer than on the Iberian Peninsula and that after an initial invasion of North Africa by pond turtles from an unknown European source region, there was a phase of diversification in North Africa, followed by a later re-invasion of Europe from Morocco. This fits with the finding that Iberian haplotypes of lineage VI are less diverse than Moroccan ones (Fig. 2), and with a decrease of genetic diversity from south to north in Iberia (Velo-Antón et al. 2008).

Theoretically, there are two source regions for the initial invasion of North Africa, but both are not very likely: (1) The Iberian Peninsula, which would necessitate a later massive

extinction event there, followed by a re-colonization from North Africa, and (2) the Apennine Peninsula and Sicily (as hypothesized in the opposite direction for green toads; Stöck et al. 2008). However, Sicily is occupied by a genetically totally different pond turtle, *E. trinacris* (lineage III), which is not closely related to any African or Western Mediterranean lineage (Fig. 3).

Moreover, fossil evidence currently does not support the long presence of *Emys* in North Africa. Although the fossil record of European pond turtles in Europe is extensive (e.g., Fritz 1995; Hervet 2000; Delfino 2002; Sommer et al. 2007; Bailón 2011; Georgialis and Kear 2013), there are only a few Holocene finds known from North Africa (Algeria and Tunisia; Lapparent de Broin 2000), which was interpreted as evidence for a very recent colonization of North Africa. The oldest records from the Iberian Peninsula are considerably older, dating back to the Lower Pleistocene (approximately 1.5–1.2 million years ago; Fig. S3), and at first glance this seems to support the traditional hypothesis that European pond turtles were present on the Iberian Peninsula for a long time and invaded North Africa from there. However, due to the fragmentary character of the oldest Iberian fossils (Bailón 2011; Blasco et al. 2011), it is impossible to determine whether they represent the ancestor of the extant Spanish and Portuguese pond turtles or possibly another lineage that became extinct and was later replaced by invaders from North Africa. The first Iberian fossils that can be unambiguously morphologically identified with the extant turtles are much younger and only 370,000–320,000 years old (Jiménez Fuentes 1980; Fritz 1995).

Normally, fossils are considered to indicate the long-term occurrence of the relevant species in the fossiliferous region. However, it has been shown twice that putatively long-established local populations of turtles and tortoises became extinct and were replaced much later – in these cases – by introduced conspecifics (*Emys orbicularis* and *Testudo hermanni* in Corsica and Sardinia: Giacalone et al. 2009; Pedall et al. 2011; Perez et al. 2014). Taking this complex situation into account, we believe it is prudent not to consider the current fossil record as evidence for any biogeographic scenario. In addition, this situation prevents us from using the fossil record of *Emys* to date the mitochondrial phylogeny. Our exploratory calculations using fossils of North American emydines lead to such excessive confidence intervals with respect to the *Emys* lineages that we refrain from publishing these results here.

In general, the differentiation pattern found for Iberian and North African pond turtles mirrors a common paradigm for North African amphibians and reptiles, with Moroccan populations often being well-differentiated from their eastern Algerian and Tunisian counterparts (e.g., *Pleurodeles* spp., Carranza and Arnold 2004; Veith et al. 2004; *Hyla meridionalis*, Recuero et al. 2007; *Mauremys leprosa*, Fritz

et al. 2006b; *Testudo graeca*, Fritz et al. 2009b; *Chamaeleo chamaeleon*, Dimaki et al. 2008; *Timon* spp., Paulo et al. 2008; *Coronella girondica*, Santos et al. 2012; *Macroprotodon* spp., Carranza et al. 2004; *Malpolon* spp., Carranza et al. 2006; *Natrix maura*, Guicking et al. 2008; *Vipera latastei* complex, Velo-Antón et al. 2012), while Moroccan and Iberian populations can be often very similar (e.g., *Pleurodeles waltl*, Carranza and Arnold 2004; Veith et al. 2004; *Mauremys leprosa*, Fritz et al. 2006b; *Testudo graeca*, Fritz et al. 2009b; Graciá et al. 2013; *Macroprotodon brevis*, Carranza et al. 2004; *Malpolon monspessulanus*, Carranza et al. 2006). This suggests that the Straits of Gibraltar constitutes no significant biogeographic barrier for these taxa, and this may be especially true for *E. orbicularis*, as indicated by the weak differentiation of pond turtles from southern Spain (Doñana National Park) and Morocco (Fig. 4).

Taxonomic conclusions

Currently, several subspecies are recognized for *Emys orbicularis*. Most of these taxa correspond to distinct mtDNA lineages (Velo-Antón et al. 2008; Fritz et al. 2009a; Pedall et al. 2011; van Dijk et al. 2012). Exceptions are *E. o. occidentalis* from North Africa, thought to include populations from Morocco, Algeria and Tunisia (Fritz 1993), and *E. o. fritzuergenobsti* from the Iberian Peninsula (Fig. 3).

As shown in the present study, all Moroccan pond turtles belong to the same mitochondrial lineage as Iberian conspecifics (lineage VI), while eastern Algerian and Tunisian turtles represent the distinct mtDNA lineage IX. This differentiation pattern is also supported by microsatellite data. Moreover, concerning mtDNA sequences, Moroccan *E. o. occidentalis* are paraphyletic with respect to *E. o. fritzuergenobsti* from the Iberian Peninsula.

We therefore conclude that Iberian and Moroccan pond turtles should be better regarded as representing one and the same subspecies. According to the First Reviser Principle (ICZN 1999: Article 24.2), we give the name *Emys orbicularis occidentalis* Fritz 1993 priority over *Emys orbicularis fritzuergenobsti* Fritz 1993. Morphological differences that were originally thought to differentiate these two subspecies (Fritz 1993) can now be understood as the result of genetic influx from other taxa along the Mediterranean coast of Spain (Pedall et al. 2011).

Eastern Algerian and Tunisian pond turtles cannot be identified with *E. o. occidentalis* and represent a distinct taxon. Considering the degree of differentiation (Figs. 2, 3, 4), eastern Algerian and Tunisian populations should be regarded as a distinct new subspecies for which no name is available (Fritz and Havaš 2007). Unfortunately, our knowledge of external morphology of eastern Algerian and Tunisian pond turtles is deficient. There are only five adult museum specimens known (Fritz 1993) that can be identified with this subspecies. This

situation does not allow a sound morphological comparison of the new subspecies with other taxa. As a consequence, we abstain from its formal description here, acknowledging that this situation is counterproductive for conservational purposes because only named taxa are covered by legislation.

Conservation

Emys orbicularis is a seriously imperiled species in North Africa (Fritz 2003; Fahd et al. 2009; Pleguezuelos et al. 2010). Notwithstanding the generally low individual densities, there is no evidence for a decline in genetic diversity (Table S9), suggesting that conservation measures for the current relicts may still preserve viable populations.

In Morocco, the populations along the Atlantic coast are either extinct or close to extinction because of massive habitat alteration (Fahd et al. 2009), and all remaining populations in other regions are threatened for the same reason. Our sampling sites in the Moroccan Rif Mountains correspond to two disjunct regions, one in the western and the other in the eastern region of this mountain chain (Fig. 1). With respect to mitochondrial haplotypes and microsatellites, we found both isolates not differentiated. By contrast, the only two individuals we studied from Kenitra Province share their mitochondrial haplotypes not with the geographically closer western Rif population, but with the pond turtles from the Middle Atlas Mountains, to which the Kenitra turtles were also assigned using microsatellite data (Figs. 2 and 4). This has important implications for conservation measures, for instance if in future an exchange of individuals between different local populations should be considered.

Our results suggest that the relict populations in the Rif Mountains and from the Middle Atlas Mountains plus Kenitra Province should be treated as two distinct Management Units (Moritz 1994). The pond turtles in Kenitra Province perhaps represent the last survivors of the populations that were formerly widely distributed in the Gharb plain (Fritz 1993; Bons and Geniez 1996; Fahd et al. 2009). Consequently, if habitat improvements and later reintroductions should be ever planned for the Gharb plain, pond turtles from the Rif Mountains should not be used for that purpose.

In Tunisia, we could confirm the presence of a few individuals at only two of the many sites listed in Loveridge and Williams (1957), despite intensive fieldwork. In neighboring Algeria, the El Kala National Park still supports a substantial population, while the situation outside the park is completely unclear. As Algerian and Tunisian pond turtles represent an endemic taxon, we recommend surveying their population status throughout the historical range (Fig. 1) to establish a basis for conservation measures. This could also shed light on the possible survival and taxonomic status of the isolated populations around Algiers (Fritz 1994, 2003).

Acknowledgements Most of the laboratory work was done by Anke Müller. Special thanks go to Martin Päckert for the exploratory molecular clock calculations. Alessandra Sicilia assisted during fieldwork. Oscar Arribas, Massimo Delfino and Aitor Valdeón helped with references for fossils. Guillermo Velo-Antón's research was supported by the Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BPD/74834/2010).

References

- Bailón, S. (2011). Quelonios fósiles del yacimiento de Barranco León (Pleistoceno inferior, Orce, Granada, España). In I. Toro, B. Martínez-Navarro, & J. Agustí (Eds.), *Ocupaciones humanas en el Pleistoceno inferior y medio de la Cuenca de Guadix-Baza* (pp. 185–195). Sevilla: Junta de Andalucía, Consejería de Cultura.
- Blasco, R., Blain, H.-A., Rosell, J., Díez, J. C., Huguet, R., Rodríguez, J., Arsuaga, J. L., Bermúdez de Castro, J. M., & Carbonell, E. (2011). Earliest evidence for human consumption of tortoises in the European Early Pleistocene from Sima del Elefante, Sierra de Atapuerca, Spain. *Journal of Human Evolution*, *61*, 503–509.
- Bons, J., & Geniez, P. (1996). *Amphibiens et reptiles du Maroc (Sahara Occidental compris)*. Atlas biogéographique. Barcelona: AHE.
- Carranza, S., & Arnold, E. N. (2004). History of West Mediterranean newts, *Pleurodeles* (Amphibia: Salamandridae), inferred from old and recent DNA sequences. *Systematics and Biodiversity*, *1*, 327–337.
- Carranza, S., Arnold, E. N., Wade, E., & Fahd, S. (2004). Phylogeography of the false smooth snakes, *Macroprotodon* (Serpentes, Colubridae): mitochondrial DNA sequences show European populations arrived recently from Northwest Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *33*, 523–532.
- Carranza, S., Arnold, E. N., & Pleguezuelos, J. M. (2006). Phylogeny, biogeography, and evolution of two Mediterranean snakes, *Malpolon monspessulanus* and *Hemorrhois hippocrepsis* (Squamata, Colubridae), using mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *40*, 532–546.
- Ciofi, C., Tzika, A. C., Natali, C., Chelazzi, G., Naziridis, T., & Milinkovitch, M. C. (2009). Characterization of microsatellite loci in the European pond turtle *Emys orbicularis*. *Molecular Ecology Resources*, *9*, 189–191.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, *9*, 1657–1660.
- de Lapparent de Broin, F. (2000). African chelonians from the Jurassic to the present: phases of development and preliminary catalogue of the fossil record. *Palaeontologia Africana*, *36*, 43–82.
- Delfino, M. (2002). *Erpetofauna italiana del Neogene e del Quaternario*. PhD thesis, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia.
- Dimaki, M., Hundsdoerfer, A. K., & Fritz, U. (2008). Eastern Mediterranean chameleons (*Chamaeleo chamaeleon*, *Ch. africanus*) are distinct. *Amphibia-Reptilia*, *29*, 535–540.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, *14*, 2611–2620.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). ARLEQUIN (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, *1*, 47–50.
- Fahd, S., El Marnisi, B., Mediani, M., & Fritz, U. (2009). Zur Verbreitung und zum Bedrohungsstatus der Europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*) in Marokko. *Elaphe*, *17*, 30–33.
- Fritz, U. (1993). Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 3. Zwei neue Unterarten von der Iberischen Halbinsel und aus Nordafrika, *Emys orbicularis fritzjuergenobsti* subsp. nov. und *E. o. occidentalis* subsp. nov. *Zoologische Abhandlungen des Staatlichen Museums für Tierkunde Dresden*, *47*, 131–155.
- Fritz, U. (1994). Gibt es in Nordafrika zwei verschiedene Formen der Europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*)? *Salamandra*, *30*, 76–80.
- Fritz, U. (1995). Kritische Übersicht der Fossilgeschichte der Sumpfschildkröten-Gattung *Emys* A. Duméril, 1806. *Zoologische Abhandlungen des Staatlichen Museums für Tierkunde Dresden*, *48*, 243–264.
- Fritz, U. (1996). Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). 5b. Innerartliche Hierarchie und Zoogeographie. *Zoologische Abhandlungen des Staatlichen Museums für Tierkunde Dresden*, *49*, 31–71.
- Fritz, U. (1998). Introduction to zoogeography and subspecific differentiation in *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). *Mertensiella*, *10*, 1–27.
- Fritz, U. (2001). *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758) – Europäische Sumpfschildkröte. In U. Fritz (Ed.), *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIIA: Schildkröten I* (pp. 343–515). Wiebelsheim: Aula-Verlag.
- Fritz, U. (2003). *Die Europäische Sumpfschildkröte*. Bielefeld: Laurenti.
- Fritz, U., & Havaš, P. (2007). Checklist of chelonians of the world. *Vertebrate Zoology*, *57*, 149–368.
- Fritz, U., Guicking, D., Lenk, P., Joger, U., & Wink, M. (2004). When turtle distribution tells European history: mtDNA haplotypes of *Emys orbicularis* reflect in Germany former division by the Iron Curtain. *Biologia*, *59*(Supplement 14), 19–25.
- Fritz, U., Fattizzo, T., Guicking, D., Tripepi, S., Pennisi, M. G., Lenk, P., Joger, U., & Wink, M. (2005). A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys*. *Zoologica Scripta*, *34*, 351–371.
- Fritz, U., d'Angelo, S., Pennisi, M. G., & Lo Valvo, M. (2006a). Variation of Sicilian pond turtles, *Emys trinacris* – What makes a species cryptic? *Amphibia-Reptilia*, *27*, 513–529.
- Fritz, U., Barata, M., Busack, S. D., Fritzsche, G., & Castilho, R. (2006b). Impact of mountain chains, sea straits and peripheral populations on genetic and taxonomic structure of a freshwater turtle, *Mauremys leprosa*. *Zoologica Scripta*, *35*, 97–108.
- Fritz, U., Guicking, D., Kami, H., Arakelyan, M., Auer, M., Ayaz, D., Ayres Fernández, C., Bakiev, A. G., Celani, A., Džukić, G., Fahd, S., Havaš, P., Joger, U., Khabibullin, V. F., Mazanaeva, L. F., Široký, P., Tripepi, S., Valdeón Vélez, A., Velo Antón, G., & Wink, M. (2007). Mitochondrial phylogeography of European pond turtles (*Emys orbicularis*, *Emys trinacris*) – an update. *Amphibia-Reptilia*, *28*, 418–426.
- Fritz, U., Ayaz, D., Hundsdoerfer, A. K., Kotenko, T., Guicking, D., Wink, M., Tok, C. V., Çiçek, K., & Buschbom, J. (2009a). Mitochondrial diversity of European pond turtles (*Emys orbicularis*) in Anatolia and the Ponto-Caspian Region: multiple old refuges, hotspot of extant diversification and critically endangered endemics. *Organisms, Diversity and Evolution*, *9*, 100–114.
- Fritz, U., Harris, D. J., Fahd, S., Rouag, R., Graciá Martínez, E., Giménez Casaldueiro, A., Široký, P., Kalboussi, M., Jdeidi, T. B., & Hundsdoerfer, A. K. (2009b). Mitochondrial phylogeography of *Testudo graeca* in the Western Mediterranean: old complex divergence in North Africa and recent arrival in Europe. *Amphibia-Reptilia*, *30*, 63–80.
- Georgialis, G. L., & Kear, B. P. (2013). The fossil turtles of Greece: an overview of taxonomy and distribution. *Geobios*, *46*, 299–311.
- Giacalone, G., Lo Valvo, M., & Fritz, U. (2009). Phylogeographic link between Sicilian and Corso-Sardinian *Testudo h. hermanni* confirmed. *Acta Herpetologica*, *4*, 119–123.
- Glaubitz, J. C. (2004). CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, *4*, 309–310.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, *86*, 485–486.

- Graciá, E., Giménez, A., Anadón, J. D., Harris, D. J., Fritz, U., & Botella, F. (2013). The uncertainty of Late Pleistocene range expansions in the western Mediterranean: a case study of the colonization of south-eastern Spain by the spur-thighed tortoise, *Testudo graeca*. *Journal of Biogeography*, *40*, 323–334.
- Guicking, D., Joger, U., & Wink, M. (2008). Molecular phylogeography of the viperine snake *Natrix maura* (Serpentes: Colubridae): evidence for strong intraspecific differentiation. *Organisms, Diversity and Evolution*, *8*, 130–145.
- Gustincich, S., Manfioletti, G., del Sal, G., Schneider, C., & Carninci, C. (1991). A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *BioTechniques*, *11*, 298–302.
- 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.
- Hervet, S. (2000). Tortues du Quaternaire de France: critères de détermination, répartitions chronologique et géographique. *Mésogée*, *58*, 3–47.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, *9*, 1322–1332.
- Hutchison, J. H. (1981). *Emydoidea* (Emydidae, Testudines) from the Barstovian (Miocene) of Nebraska. *PaleoBios*, *37*, 1–6.
- ICZN [International Commission on Zoological Nomenclature]. (1999). *International Code of Zoological Nomenclature* (4th ed.). London: International Trust for Zoological Nomenclature.
- Jiménez Fuentes, E. (1980). Los quelonios del sitio de ocupación achelense de Áridos-1 (Arganda, Madrid). In M. Santonja, N. López, & A. Pérez (Eds.), *Ocupaciones achelenses en el Valle del Jarama* (pp. 139–143). Madrid: Exelentísima Diputación Provincial de Madrid.
- Lenk, P., Fritz, U., Joger, U., & Wink, M. (1999). Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758). *Molecular Ecology*, *8*, 1911–1922.
- Li, C., Lu, G., & Orti, G. (2008). Optimal data partitioning and a test case for ray-finned fishes (Actinopterygii) based on ten nuclear loci. *Systematic Biology*, *57*, 519–539.
- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis. Tomus I. Regnum Animale. Editio Decima, Reformata*. Stockholm: Laurentius Salvius.
- Loveridge, A., & Williams, E. E. (1957). Revision of the African tortoises and turtles of the suborder Cryptodira. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, *115*, 163–557.
- McDowell, S. B. (1964). Partition of the genus *Clemmys* and related problems in the taxonomy of the aquatic Testudinidae. *Proceedings of the Zoological Society London*, *143*, 239–279.
- Moritz, C. (1994). Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, *9*, 373–375.
- Paulo, O. S., Pinheiro, J., Miraldo, A., Bruford, M. W., Jordan, W. C., & Nichols, R. A. (2008). The role of vicariance vs. dispersal in shaping genetic patterns in ocellated lizard species in the western Mediterranean. *Molecular Ecology*, *17*, 1535–1551.
- Pedall, I., Schäfer, H., Fritz, U., & Wink, M. (2009). Isolation of microsatellite markers in the *Emys orbicularis* complex and development of multiplex PCR amplification. *Conservation Genetics*, *10*, 725–727.
- Pedall, I., Fritz, U., Stuckas, H., Valdéron, A., & Wink, M. (2011). Gene flow across secondary contact zones of the *Emys orbicularis* complex in the Western Mediterranean and evidence for extinction and re-introduction of pond turtles on Corsica and Sardinia (Testudines: Emydidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *49*, 44–57.
- Perez, M., Livoreil, B., Mantovani, S., Boisselier, M.-C., Crestanello, B., Abdelkrim, J., Bonillo, C., Goutner, V., Lambourdière, J., Pierpaoli, M., Sterijovski, B., Tomovic, L., Vilaça, S. T., Mazzotti, S., & Bertorelle, G. (2014). Genetic variation and population structure in the endangered Hermann’s tortoise: the roles of geography and human-mediated processes. *Journal of Heredity*, *105*, 70–81.
- Pleguezuelos, J. M., Brito, J. C., Fahd, S., Feriche, M., Mateo, J. A., Moreno-Rueda, G., Reques, R., & Santos, X. (2010). Setting conservation priorities for the Moroccan herpetofauna: the utility of regional red listing. *Oryx*, *14*, 501–508.
- Posada, D. (2008). JMODELTEST: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, *25*, 1253–1256.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*, 945–959.
- Recuero, E., Iraola, A., Rubio, X., Machordom, A., & García-París, M. (2007). Mitochondrial differentiation and biogeography of *Hyla meridionalis* (Anura: Hylidae): an unusual phylogeographical pattern. *Journal of Biogeography*, *34*, 1207–1219.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MRBAYES 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*, 539–542.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, *4*, 137–138.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, X., Rato, C., Carranza, S., Carretero, M. A., & Pleguezuelos, J. M. (2012). Complex phylogeography in the southern smooth snake (*Coronella girondica*) supported by mtDNA sequences. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *50*, 210–219.
- Schleich, H. H., Kästle, W., & Kabisch, K. (1996). *Amphibians and Reptiles of North Africa*. Königstein: Koeltz Scientific Publishers.
- Sommer, R. S., Persson, A., Wieseke, N., & Fritz, U. (2007). Holocene recolonization and extinction of the pond turtle, *Emys orbicularis* (L., 1758), in Europe. *Quaternary Science Reviews*, *26*, 3099–3107.
- Sommer, R. S., Lindqvist, C., Persson, A., Bringsøe, H., Rhodin, A. G. J., Schneeweiss, N., Široký, P., Bachmann, L., & Fritz, U. (2009). Unexpected early extinction of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) in Sweden and climatic impact on its Holocene range. *Molecular Ecology*, *18*, 1252–1262.
- Spinks, P. Q., & Shaffer, H. B. (2009). Conflicting mitochondrial and nuclear phylogenies for the widely disjunct *Emys* (Testudines: Emydidae) species complex, and what they tell us about biogeography and hybridization. *Systematic Biology*, *58*, 1–20.
- Stamatakis, A. (2006). RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, *22*, 2688–2690.
- Stöck, M., Sicilia, A., Belfiore, N. M., Buckley, D., Lo Brutto, S., Lo Valvo, M., & Arculeo, M. (2008). Post-Messinian evolutionary relationships across the Sicilian channel: mitochondrial and nuclear markers link a new green toad from Sicily to African relatives. *BMC Evolutionary Biology*, *8*, 56.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. *Molecular Biology and Evolution*, *30*, 2725–2729.
- van Dijk, P. P., Iverson, J. B., Shaffer, H. B., Bour, R., & Rhodin, A. G. J. (2012). Turtles of the world, 2012 update: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. In A. G. J. Rhodin, P. C. H. Pritchard, P. P. van Dijk, R. A. Saumure, K. A. Buhlmann, J. B. Iverson, & R. A. Mittermeier (Eds.), *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group* (pp. 000.243–000.328). Lunenburg, MA: Chelonian Research Foundation. Chelonian Research Monographs, 5.

- Veith, M., Mayer, C., Samraoui, B., Donaire Barroso, D., & Bogaerts, S. (2004). From Europe to Africa and vice versa: evidence for multiple intercontinental dispersal in ribbed salamanders (genus *Pleurodeles*). *Journal of Biogeography*, *31*, 159–171.
- Velo-Antón, G., Godinho, R., Ayres, C., Ferrand, N., & Cordero Rivera, A. (2007). Assignment tests applied to relocate individuals of unknown origin in a threatened species, the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Amphibia-Reptilia*, *28*, 475–484.
- Velo-Antón, G., García-París, M., & Cordero Rivera, A. (2008). Patterns of nuclear and mitochondrial DNA variation in Iberian populations of *Emys orbicularis* (Emydidae): conservation implications. *Conservation Genetics*, *9*, 1263–1274.
- Velo-Antón, G., Wink, M., Schneeweiss, N., & Fritz, U. (2011). Native or not? Tracing the origin of wild-caught and captive freshwater turtles in a threatened and widely distributed species (*Emys orbicularis*). *Conservation Genetics*, *12*, 583–588.
- Velo-Antón, G., Godinho, R., Harris, D. J., Santos, F., Martínez-Freiria, F., Fahd, S., Larbes, S., Pleguezuelos, J. M., & Brito, J. C. (2012). Deep evolutionary lineages in a Western Mediterranean snake (*Vipera latastei/monticola* group) and high genetic structuring in Southern Iberian populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *65*, 965–973.
- Wiens, J. J., Kuczynski, C. A., & Stephens, P. R. (2010). Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: implications for speciation and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, *99*, 445–461.

First record of the North American cryptic invader *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) (Mollusca: Gastropoda: Planorbidae) in the Middle East

Federico Marrone^{1*}, Murtada D. Naser², Amaal Gh. Yasser^{2,3},
Francesco Sacco¹, and Marco Arculeo¹

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche & Farmaceutiche, Università di Palermo, Palermo, Italy. ²Marine Science Centre, University of Basrah, Basrah, Iraq. ³College of Veterinary Medicine, University of Basrah, Basrah, Iraq.

Some gastropod specimens belonging to the planorbid genus *Ferrissia* were recently collected in Lebanon and in Iraq, where the autochthonous species *Ferrissia clessiniana* (Jickeli, 1882) is supposed to occur. The molecular identification of collected specimens proved that they belong to the allochthonous species *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863), the protagonist of a dramatic cryptic invasion which is of interest to the whole of Eurasia. These findings cast further doubts on the actual existence of autochthonous *Ferrissia* species in the Palaearctic. The need for a molecular characterisation of the topotypical population of *F. clessiniana*, and for a revision of the Palaearctic *Ferrissia* species, is stressed.

Keywords: Ancyliinae, biological invasion, cryptic species, molecular identification.

Introduction

The planorbid gastropod genus *Ferrissia* Walker, 1903 has a worldwide distribution, but the actual number of species within the genus is unknown, and their autochthony is doubtful in several countries. The taxonomy of the genus is in fact quite uncertain, which is due to the paucity of sound diagnostic morphological characters currently known, coupled with a noteworthy conchological and environmentally-induced plasticity. The taxon has been relatively better investigated in the Nearctic, where Walther, Burch, and Ó Foighil (2010) concluded that out of the five *Ferrissia* species previously supposed to occur in North America, only two widely distributed taxa actually exist (i.e. *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) and *F. rivularis* (Say, 1817)), each encompassing multiple nominal species. Conversely, the taxonomy of Palaearctic *Ferrissia* taxa is currently under debate, and only scarce data are available for Afrotropical and Australian taxa.

Although fossil records testify for an ancient occurrence of the genus *Ferrissia* in the Palaearctic region (e.g. van der Velde, 1991; Harzhauser, Neubauer, Mandic, Zuschin, & Čorić, 2012; Mienis & Rittner, 2013), its presence in the recent molluscan faunas of Europe, Africa, and Asia was completely overlooked until the description of *Ferrissia clessiniana* (Jickeli, 1882) from Egypt, and of *Ferrissia wautieri* (Mirolli, 1960) from Italy. In the last few years, an ever increasing number of records reporting the occurrence of *Ferrissia* species throughout the western Palaearctic region have been published (e.g. Marrone, Lo Brutto & Arculeo, 2011; Albrecht, Föller, Clewing, Hauffe & Wilke, *in press*, and references therein), but an agreement on the taxonomic identity of the recorded populations is currently missing, so that they have been referred to as

*Corresponding author. Email: federico.marrone@unipa.it

either *F. wautieri*, *F. fragilis*, or *F. clessiniana*, often only on a geographic basis. Furthermore, as stressed by Walther, Lee, Burch, & Ó Foighil (2006c), each used name is charged with different biogeographic implications: *Ferrissia wautieri* was assumed to be an endemic European species, *F. clessiniana* is assumed to be a taxon with an African or Middle-East gravitation, and *F. fragilis* is the binomen used when the scored populations are assumed to be the result of a recent colonization event from North America (see Walther et al., 2010; Marrone et al., 2011, Albrecht et al., *in press*, and references therein).

Molecular studies aimed at investigating the identity of Palaearctic *Ferrissia* species showed that of a number of populations in Europe and Asia belong to the North American species *Ferrissia fragilis*, while no evidence supporting the presence of autochthonous taxa or lineages has been found to date. The mtDNA sequences of a *Ferrissia* specimen collected in Uganda and identified as "*Ferrissia clessiniana*" by Jørgensen, Kristensen, and Stothard (2004) are rather distinct from the known *F. fragilis* haplotypes, so that *F. clessiniana* is currently considered to be a *bona species* and the sister taxon of *F. fragilis* (Walther et al., 2010). However, it has to be stressed that the putative Ugandan *F. clessiniana* specimen was collected in a different biogeographic region from where the species was originally described, that no information on the sampling locality or on the identification methods used was provided, and that the putative *F. clessiniana* 16S and COI sequences available on GenBank are of rather poor quality. Accordingly, it cannot be ruled out that the *Ferrissia* specimen studied by Jørgensen et al. (2004) might in fact belong to a different, Afrotropical *Ferrissia* species or that the published sequences might be, at least partially, an artefact due to amplification or sequencing.

Recently, the possibility that both *F. wautieri* and *F. clessiniana* might actually be junior synonyms of *F. fragilis* was raised (cf. Walther, Lee, Burch, & Ó Foighil, 2006a, 2006b; Marrone et al., 2011), and the molecular characterisation of a *Ferrissia* specimen from the type locality of *F. wautieri* suggested that this last binomen is actually a junior synonym of *F. fragilis* (Albrecht et al., *in press*). If this is corroborated for both species, all the Palaearctic *Ferrissia* populations are to be considered allochthonous.

In the light of these taxonomic uncertainties, and of the practical implications related to environmental management, the aim of the present study is to determine the taxonomic identity of Middle East *Ferrissia* populations, which are currently supposed to belong to the autochthonous species *Ferrissia clessiniana*.

Material and Methods

Two *Ferrissia* populations from the Lebanese Republic and from the Republic of Iraq were sampled. *Ferrissia* specimens were collected during field surveys on 24 August, 2008 (Lebanon, Beirut river near Al Daychounieh village: 33°50'N, 35°34'E) and on 25 October, 2012 (Iraq, Tigris river at Qurna, Dorat harriba: 31°07'N, 47°26'E). The Beirut river flows from Lebanon's mountains, passing through Al Daychounieh, a village located in the Matn District of the Mount Lebanon Governorate, to the Mediterranean Sea. The Tigris river is one of the most important rivers in Iraq, being the main water source for human use, especially for drinking water, along with the Euphrates River. It is 1850 km long, rising in the Taurus Mountainous of eastern Turkey and flowing into the Persian Gulf. Visited sites were sampled both visually and through the use of 200 µm mesh-sized hand nets passed through the vegetation and on the bottom of the studied water bodies. Collected samples were fixed *in situ* in 80% ethanol and sorted in the laboratory under a stereomicroscope. Unfortunately, within the frame of this survey no *Ferrissia* samples from Egypt, the *terra typica* of *F. clessiniana*, could be obtained.

Specimens were identified as *Ferrissia* sp. under the stereomicroscope, soaked in double-distilled water, and then processed for DNA extraction using the Qiagen “DNeasy Animal Tissue Kit” following the standard protocols. Fragments of the large ribosomal subunit 16S and the cytochrome oxidase 1 (COI) were amplified following the protocols described in Marrone et al. (2011). Chromatograms were imported and edited with ChromasLite 2.01 (Technelysium Pty. Ltd.) and aligned with BioEdit (Hall, 1999). The sequences were deposited in GenBank (16S: KF889403-KF889405; COI: KF889400-KF889402). Mega5 (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, & Kumar, 2011) was used to translate in amino acids the sequences of the protein-coding gene COI in order to check for the possible presence of frameshifts or premature stop codons, which would indicate the presence of sequencing errors or pseudogenes, which is a well-known and wide-spread problem in invertebrates (e.g. Marrone, Lo Brutto, Hundsdoerfer, & Arculeo, 2013).

In order to compare the *Ferrissia* sp. sequences obtained from the Lebanese and Iraqi populations with those available for *Ferrissia fragilis*, *F. rivularis*, *F. clessiniana* and *Ferrissia* sp. populations from different countries, COI and 16S *Ferrissia* species sequences were downloaded from GenBank; furthermore, 16S and COI sequences of the related planorbid *Ancylus fluviatilis* were downloaded to be used as outgroups (see the codes reported in Figures 1 and 2). The poor quality of the single available COI sequence of the putative *Ferrissia clessiniana* from Uganda (Accession Number: AY577509) (Marrone et al., 2011), does not allow it to be included in the analysis.

The molecular identification of studied specimens and the reconstruction of the phylogenetic relationships among the taxa were performed with Bayesian (BA) and Maximum Likelihood (ML) analyses as implemented in MrBayes 3.2.1 (Ronquist et al., 2012) and PhyML v.3 (Guindon & Gascuel, 2003), respectively. As a measure of branch support, bootstrap values were calculated with 1,000 replicates in the ML trees. Nodes support of BA trees were evaluated by their posterior probabilities.

For both the COI and 16S datasets, BA and ML analyses were performed using a general time-reversible model of sequence evolution for molecular data with a proportion of invariable sites (GTR+I), as selected by AIC in mrModeltest 2.2 (Nylander, 2004). For both markers, the BA analyses were performed with two independent runs of 2,000,000 generations and four Markov chains using default heating values. Trees and parameter values were sampled every 100 generations resulting in 20,000 saved trees per analysis; in both the analyses convergence was reached well before the 500,000th generation; 5,000 trees were then conservatively discarded as “burn-in”.

Results

Both the mitochondrial markers and the analyses implemented show a well-supported clade which includes the North American *F. fragilis* populations along with all the available Eurasian *Ferrissia* sp. specimens (Figures 2–3). The other *Ferrissia* species, i.e. the single Ugandan specimen identified as “*F. clessiniana*”, the Australian *Ferrissia* sp., and the North American *F. rivularis* are separated from the “*F. fragilis* clade” by deep genetic distances and well supported nodes (Figures 1–2).

All the specimens included in the framework of this study belong to a single 16S haplotype, which is shared by the North American, Middle East and European *Ferrissia fragilis* populations, the only exceptions being the single specimen from Denmark and one out of the two specimens from Alabama (U.S.A.); these two specimens show slightly different haplotypes (differing respectively 0.3 and 0.6% of uncorrected p-distance from the commonest haplotype). Unfortunately, no 16S sequences for eastern Asian specimens are available in GenBank for comparison.

The COI sequences are slightly more diverse than 16S ones (mean p-distance among the *Ferrissia fragilis* COI sequences: 0.4%, ranging from 0 to 0.9%), and the scored haplotypes are shared among Asian, European and American populations without any clear geographic structure.

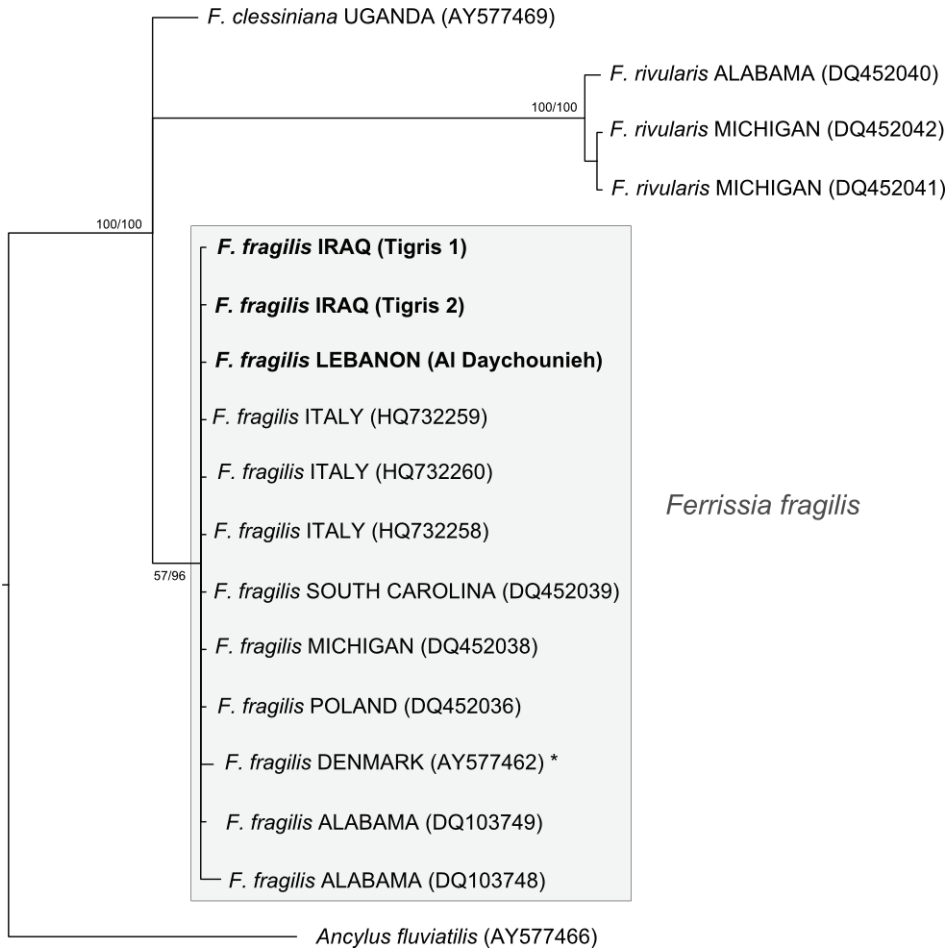


Figure 1. Bayesian phylogram (ngen = 2,000,000; nchains = 4; nrun = 2; samplefreq = 100; temp = 0.2; default priors) of the mitochondrial large subunit ribosomal DNA (mtDNA 16S) dataset composed of *Ferrissia* spp. and the outgroup *Ancylus fluviatilis*. Node support is reported as nodal posterior probabilities/ML. GenBank accession numbers are given among brackets for non-novel haplotypes. *: mislabelled as *Acroloxus lacustris* (see discussion in Walther et al. 2006b).

Discussion

The topologies of the trees obtained with both 16S and COI markers stress the molecular homogeneity of the European and Asian *Ferrissia* samples, and their identity with some of the *F. fragilis* haplotypes recorded in North America, thus providing the first evidence of the presence of this invasive taxon in the Middle East, an area where the possible presence of the autochthonous *Ferrissia clessiniana* was suggested by some authors (e.g. Walther et al., 2006c; Mienis & Rittner, 2013). Conversely, no evidence for the presence of *F. clessiniana* in the whole Mediterranean area and the Middle East has been collected to date; thus, in spite of the finding of *Ferrissia* fossils from the Israeli Pleistocene (Mienis & Rittner, 2013) and from the European Miocene to Pleistocene (van der Velde 1991; Harzhauser et al., 2012), there is so far no evidence of the

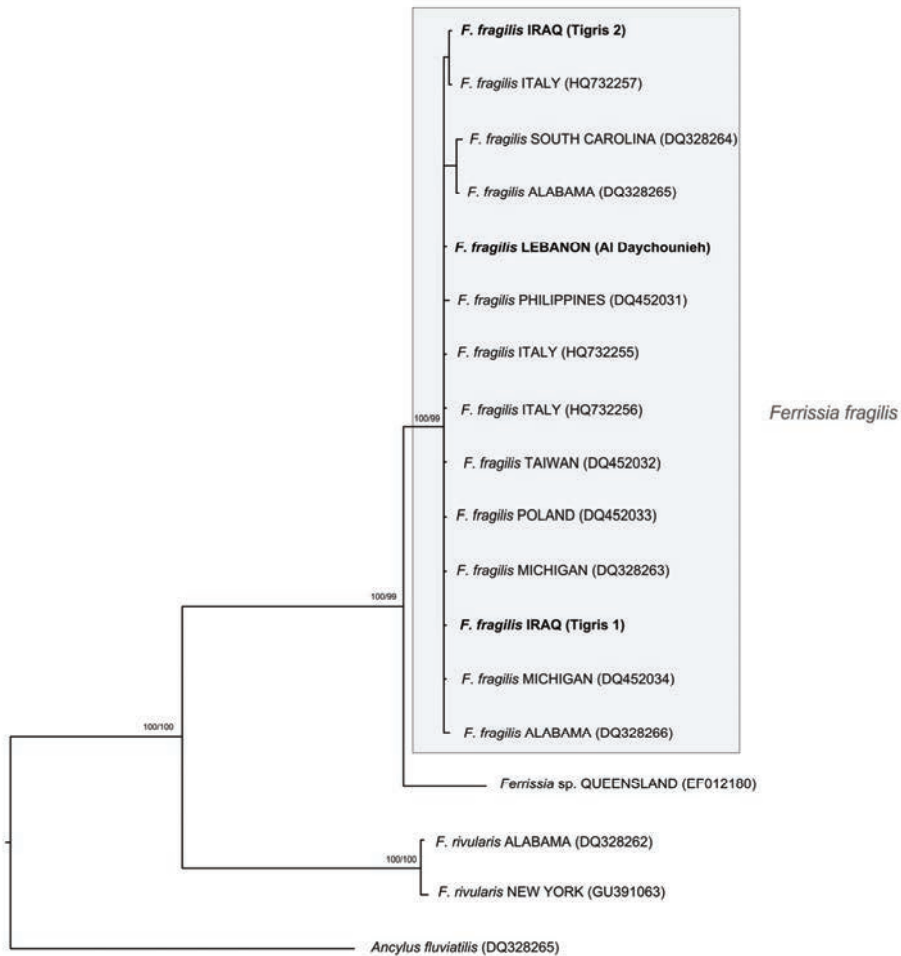


Figure 2. Bayesian phylogram (ngen = 2,000,000; nchains = 4; nrun = 2; samplefreq = 100; temp = 0.2; default priors) of the cytochrome oxidase 1 (mtDNA COI) dataset composed of *Ferrissia* spp. and the outgroup *Ancyclus fluviatilis*. Node support is reported as Nodal posterior probabilities/ML. GenBank accession numbers are given in brackets for non-novel haplotypes.

survival of ancient autochthonous lineages in the Palaearctic region, and all the European and Asian *Ferrissia* populations surveyed so far proved to belong to the invasive American species *F. fragilis*, the protagonist of an overlooked large-scale biological invasion which is currently underway and whose impact on the autochthonous freshwater biota is as yet unknown.

Obviously, based on currently available data, the alternative hypothesis that a putative autochthonous Palaearctic *Ferrissia* species might have been only recently replaced by a North-American congener cannot be completely ruled out; however, the fact that no report of *Ferrissia* sp. older than the end of the 19th century exists for the Palaearctic region, nor are there *Ferrissia* specimens stored in historical malacology collections, suggests that this is probably not the case and that no autochthonous *Ferrissia* possibly

occurred in the western Palaearctic region in the Holocene. In the light of the results presented here, the actual existence of *F. clessiniana* itself needs to be tested, and the advisability of obtaining a molecular characterisation of the topotypical population of the species is here further stressed.

The molecular characterisation of other West Palaearctic *Ferrissia* populations would enable us to trace back the colonisation route followed by this cryptic invader out of North America; however, in the light of the scarce to absent molecular structuring of the surveyed populations throughout Eurasia, it is likely that *Ferrissia fragilis* was introduced in Eurasia from a single North American source area, and that it then spread over the continents thanks to a combination of autogenous (both active and passive) and human-mediated dispersal. For example, the recent record of the hydrobiid *Ecrobia grimmeri* from Sawa Lake, south of Iraq, provides evidence of the high dispersal potential of small molluscan species by endo- or ectozoochory through avian vectors (Haase et al., 2010).

The Middle East inland water bodies are threatened by an alarming number of biological invasions threatening the autochthonous biota (e.g. Bößneck, 2011; Naser et al., 2011, 2012), which is often already significantly impaired by habitat alteration. This process is still in progress and is characterised by an accelerating pace, possibly due to ongoing globalisation processes. In the Iraqi sampling sites, as an example, *Ferrissia fragilis* is part of a molluscan community dominated by the alien gastropods *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) and *Physella acuta* (Draparnaud, 1805), whose impact on the indigenous taxa is well documented (e.g. Albrecht et al., 2009; Ladd & Rogowski, 2012; Naser et al., 2011). It is thus desirable that the autochthonous freshwater fauna of the Middle East is further studied, mapped and described before it is completely lost or adulterated.

Acknowledgements

The Lebanese *Ferrissia* sample was kindly provided by A. Dia and M. Bodon. The authors thank two anonymous referees for their valuable comments on a first draft of the manuscript. The research was partially supported by the “Fondi di Ateneo” (ex 60%) provided by the Italian Ministry of Education, Universities and Research (MIUR).

References

- Albrecht, C., Kroll, O., Moreno-Terrazas, E., & Wilke, T. (2009): Invasion of ancient Lake Titicaca by the globally invasive *Physa acuta* (Gastropoda: Pulmonata: Hygrophila). *Biological Invasions*, 11, 1821–1826.
- Albrecht, C., Föller, K., Clewing, C., Hauffe, T., & Wilke, T. (*in press*): Invaders versus endemics: alien gastropod species in ancient Lake Ohrid. *Hydrobiologia*, DOI 10.1007/s10750-013-1724-1.
- Bößneck, U. (2011): New records of freshwater and land molluscs from Lebanon (Mollusca: Gastropoda & Bivalvia). *Zoology in the Middle East*, 54, 35–52.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696–704.
- Haase, M., Naser, M. D., & Wilke, T. (2010): *Ecrobia grimmeri* in brackish Lake Sawa, Iraq: indirect evidence for long-distance dispersal of hydrobiid gastropods (Caenogastropoda: Rissoioidea) by birds. *Journal of Molluscan Studies*, 76, 101–105.
- 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.

- Harzhauser, M., Neubauer, T. A., Mandic, O., Zuschin, M., & Čorić, S. (2012): A Middle Miocene endemic freshwater mollusc assemblage from an intramontane Alpine lake (Aflenz Basin, Eastern Alps, Austria). *Paläontologische Zeitschrift*, *86*, 23–41.
- Jørgensen, A., Kristensen, T. K., & Stothard, J. R. (2004): An investigation of the “Ancyloplanorbidae” (Gastropoda, Pulmonata, Hygrophila): preliminary evidence from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *32*, 778–787.
- Ladd, H. L. A., & Rogowski, D. L. (2012): Egg predation and parasite prevalence in the invasive freshwater snail, *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) in a west Texas spring system. *Aquatic Invasions*, *7*, 287–290.
- Marrone, F., Lo Brutto, S., & Arculeo, M. (2011): Cryptic invasion in Southern Europe: the case of *Ferrissia fragilis* (Pulmonata: Ancyliidae) Mediterranean populations. *Biologia*, *66*, 484–490.
- Marrone, F., Lo Brutto, S., Hundsdoerfer, A. K., & Arculeo, M. (2013): Cryptic endemism in copepods: systematics and natural history of the calanoid subgenus *Occidodiaptomus* Borutzky 1991 (Copepoda, Calanoida, Diaptomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *66*, 190–202.
- Mienis, H. K., & Rittner, O. (2013): On the distribution and status of the River Limpet *Ancylus fluviatilis* O. F. Müller, 1774 (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae) in Israel. *Malacologia*, *9*, 460–462.
- Naser, M. D., Son, M. O., & Yasser, A. G. (2011): Assessing the risks of invasions of aquatic invertebrates in the Shatt Al-Arab River. *Russian Journal of Biological Invasions*, *2*, 120–125.
- Naser, M. D., Page, T. J., Ng, N.K., Apel, M., Yasser, A. G., Bishop, J. M., Ng, P. K. L., & Clark, P. F. (2012): Invasive records of *Eriocheir hepuensis* Dai, 1991 (Crustacea: Brachyura: Grapsoidea: Varunidae): Implications and taxonomic considerations. *BioInvasions Records*, *1*, 71–86.
- Nylander, J. A. A. (2004): *MrModeltest v2*. Program distributed by the author. Uppsala University: Evolutionary Biology Centre.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012): MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*, 539–542.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony. *Molecular Biology and Evolution*, *28*, 2731–2739.
- Van der Velde, G. (1991): Population dynamics and population structure of *Ferrissia wautieri* (Mirolli, 1960) (Gastropoda, Ancyliidae) in a pond near Nijmegen (The Netherlands). *Hydrobiological Bulletin*, *24*, 141–144.
- Walther, A. C., Lee, T., Burch, J. B., & Ó Foighil, D. (2006a): E Pluribus Unum: A phylogenetic and phylogeographic reassessment of *Laevapex* (Pulmonata: Ancyliidae), a North American genus of freshwater limpets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *40*, 501–516.
- Walther, A. C., Lee, T., Burch, J. B., & Ó Foighil, D. (2006b): *Acroloxus lacustris* is not an ancyliid: A case of misidentification involving the cryptic invader *Ferrissia fragilis* (Mollusca: Pulmonata: Hygrophila). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *39*, 271–275.
- Walther, A. C., Lee T., Burch, J. B., & Ó Foighil, D. (2006c): Confirmation that the North American ancyliid *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) is a cryptic invader of European and East Asian freshwater ecosystems. *Journal of Molluscan Studies*, *72*, 318–321.
- Walther, A. C., Burch, J. B., & Ó Foighil, D. (2010): Molecular phylogenetic revision of the freshwater limpet genus *Ferrissia* (Planorbidae: Ancyliinae) in North America yields two species: *Ferrissia* (*Ferrissia*) *rivularis* and *Ferrissia* (*Kincaidilla*) *fragilis*. *Malacologia*, *53*, 25–45.