

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

GIUSEPPE NASCETTI, LAMBERTO TIZI, LUCIANO BULLINI

**Differenziazione biochimica e variabilità genetica in  
due popolazioni simpatriche di *Apodemus sylvaticus*  
(L., 1758) e *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834)  
(Rodentia, Muridae)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 67 (1979), n.1-2, p.  
131-136.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1979\\_8\\_67\\_1-2\\_131\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1979_8_67_1-2_131_0)

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>



## SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

**Genetica.** — *Differenziazione biochimica e variabilità genetica in due popolazioni simpatriche di Apodemus sylvaticus (L., 1758) e Apodemus flavicollis (Melchior, 1834) (Rodentia, Muridae).* Nota di GIUSEPPE NASCETTI (\*), LAMBERTO TIZI(\*\*) e LUCIANO BULLINI(\*), presentata (\*\*\*) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The taxonomic status, the possible hybridization in nature and the genetic variability of *Apodemus sylvaticus* and *A. flavicollis* has been investigated using the electrophoretic analysis of 30 enzyme loci in field populations of both species, living sympatrically in the Tolfa hills (North-West of Rome).

The results obtained show:

1) *A. sylvaticus* and *A. flavicollis* are reproductively isolated and genetically well-differentiated species, easily and surely identifiable by electrophoresis;

2) in the area studied four enzyme loci (*Ldh-1*, *Me-1*, *Ipo-1* and  $\alpha$ -*Gpdh*) are diagnostic between *A. sylvaticus* and *A. flavicollis*, while three others (*Idh-1*, *6-Pgdh* and *Est-2*) are partially discriminating as the common alleles are different in the two species;

3) average genetic distance (*D*) between the populations of *A. sylvaticus* and *A. flavicollis* studied is 0.2029 ( $I = 0.8163$ );

4) the mean heterozygosity per locus observed was 0.035 in *A. sylvaticus* and 0.020 in *A. flavicollis*;

5) no hybrids were observed in the area studied and habitat isolation appears to be an important factor in reproductive isolation;

6) the occurrence of introgression in the area studied cannot be completely excluded on the basis of the electrophoretic data;

7) comparison of *A. flavicollis* from the Tolfa hills with populations of the same species from the Western Alps and Central Apennines North of Tolfa showed considerable genetic differences, confirming the existence of distinct subspecies of *A. flavicollis* in Italy.

### INTRODUZIONE

Lo status tassonomico, la possibilità di ibridazione in natura e la variabilità genetica delle due forme di *Apodemus: sylvaticus* e *flavicollis* sono da molto tempo oggetto di discussioni. Così vari autori hanno considerato *flavicollis* una semplice varietà o una razza geografica di *A. sylvaticus* (per esempio Barret-Hamilton [3]; Schaffer [18]; Didier e Rode [9]), mentre altri (Miller [12]; Zimmermann [23]; Stein [20]; Ellermann e Morrison-Scott [10], ecc.) le ritengono specie distinte. In particolare Engel *et al.* [11], confrontando i patterns elettroforetici di 33 proteine in individui di *A. sylvaticus* e *A. flavicollis* provenienti dai dintorni di Friburgo (Germania), trovano che ben

(\*) Istituto di Genetica, Università di Roma.

(\*\*) Istituto di Zoologia, Università di Roma.

(\*\*\*) Nella seduta del 14 giugno 1979.

12 di queste (LDH B, LDH X, SDH, ADH, 3  $\beta$ -OHSD,  $\alpha$ -GPDH, S-NADP-MDH, S-NADP-IDH, IPO-B, PGM, Hexose-6 PD e Albumina) differiscono nelle due specie. L'ibridazione tra le due entità e la presenza di fenomeni di introgressione sono stati ammessi da Saint-Girons [16], Botschafter [4], Amtmann [1] e altri autori. Witte [22], ad esempio, considera la sottospecie *A. flavicollis geminae* Lehmann, 1961 del Gargano come costituita da individui di *A. sylvaticus* di origine ibrida. Altri autori, al contrario, negano la possibilità stessa dell'ibridazione (Day [7]; Engel *et al.* [11]; Debrot e Mermod [8]). Infine la variabilità degli *Apodemus*, sia a livello intrapopolazionale che interpopolazione, è tanto notevole che nè la morfologia esterna, nè quella dello scheletro, nè l'analisi biometrica sembrano permettere la discriminazione delle due specie con sufficiente attendibilità. Anche la morfologia dentaria, che secondo Pasquier [14] fornirebbe i caratteri più validi per l'analisi tassonomica, non consente la sicura attribuzione di tutti gli individui all'una o all'altra delle due specie.

Noi abbiamo voluto affrontare i problemi dello status tassonomico, dell'ibridazione in natura e della variabilità genetica degli *Apodemus* mediante lo studio elettroforetico di sistemi gene-enzima, un approccio che negli ultimi anni ha portato a risultati di estremo interesse per la comprensione dei processi microevolutivi.

Ci siamo in particolare proposti:

- 1) di ricercare eventuali caratteri che consentissero una sicura attribuzione di tutti gli individui all'una o all'altra delle due entità; in altre parole di identificare un certo numero di loci che presentassero nelle due entità alleli diversi, elettroforeticamente riconoscibili;
- 2) di valutare quantitativamente, mediante metodiche statistiche appropriate, la divergenza genetica esistente tra le due entità;
- 3) di evidenziare eventuali casi di ibridazione naturale tra le due entità, nonchè la presenza di fenomeni di introgressione, più volte ipotizzati da vari autori;
- 4) di studiare la variabilità genetica a livello intrapopolazionale nelle due entità e di quantizzarla mediante: a) la stima della percentuale di loci strutturali elettroforeticamente polimorfici; b) la stima del tasso di eterozigosi media per locus.

Le ricerche sono state condotte in un'area dell'Antiappennino laziale, il comprensorio Tolfetano-Cerite, in cui *Apodemus sylvaticus* e *A. flavicollis* sono entrambi presenti in situazione di apparente simpatria (Contoli [6], Recco *et al.* [15]).

#### MATERIALE E METODI

##### a) *Materiale*

Il materiale studiato (62 individui, di cui 32 attribuibili in base alla morfologia e allo studio elettroforetico a *A. sylvaticus* e 30 ad *A. flavicollis*) è stato catturato in varie stazioni del comprensorio Tolfetano-Cerite con

trappole a scatto tipo Havahart e trappole a bilanciere. La maggior parte delle stazioni di raccolta era compresa nel comune di Allumiere. Le catture sono state effettuate in ambienti diversi: aree boschive (boschi di faggio, quercia, castagno, sia ad alto fusto che ceduo), aree cespugliose, prevalentemente a macchia mediterranea e, infine, campi coltivati e no.

Tutti gli individui dopo lo studio elettroforetico sono stati conservati per ulteriori indagini morfologiche e biometriche.

#### b) *Tecniche elettroforetiche*

Le ricerche sui sistemi gene-enzima sono state condotte mediante elettroforesi su gel d'amido. Sono stati studiati i seguenti enzimi: esterasi (EST), adenosindeaminasi (ADA), aldolasi (ALDO),  $\alpha$ -glicerofosfato deidrogenasi ( $\alpha$ -GPDH), isocitrico deidrogenasi (IDH), ottanolo deidrogenasi (ODH), 6-fosfo-gluconato deidrogenasi (6-PGDH), glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PDH), sorbitolo deidrogenasi (SDH), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (G-3-PDH), xantino deidrogenasi (XDH), malato deidrogenasi (MDH), lattato deidrogenasi (LDH), fosfoglucomutasi (PGM), adenilatochinasi (ADK), esochinasi (HK), fruttochinasi (FK), fosfoesosoisomerasi (PHI), triosofosfoisomerasi (TPI), mannosio fosfatoisomerasi (MPI), glutammato ossalacetico transaminasi (GOT), enzima malico (ME) e indofenolo ossidasi (IPO).

Le tecniche impiegate sono, con piccole modifiche, quelle descritte da Shaw e Koen [19], Brewer [5], Selander *et al.* [17] e Ayala *et al.* [2].

L'indagine elettroforetica è stata condotta su porzioni di tessuto muscolare omogenate meccanicamente in soluzione tampone.

I loci enzimatici analizzati sono stati i seguenti: *Est-1*, *Est-2*, *Ada*, *Aldo*,  $\alpha$ -*Gpdh*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Odh*, *6-Pgdh*, *G-6-pdh*, *Sdh*, *G-3-pdh*, *Xdh*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Ldh-1*, *Ldh-2*, *Pgm*, *Adk*, *Hk*, *Fk*, *Phi*, *Tpi*, *Mpi*, *Got-1*, *Got-2*, *Me-1*, *Me-2*, *Ipo-1* e *Ipo-2*.

Lo studio della distanza genetica è stato condotto utilizzando il metodo proposto da Nei [13].

### RISULTATI E CONCLUSIONI

Lo studio elettroforetico dei trenta loci enzimatici sopra elencati ha mostrato senza possibilità di dubbio che *A. sylvaticus* e *A. flavicollis* sono due specie ben distinte. Nonostante la situazione di simpatria, propria dell'area studiata, quattro loci (*Ldh-1*, *Me-1*, *Ipo-1* e  $\alpha$ -*Gpdh*) sono risultati diagnostici, presentando nelle due specie alleli diversi, elettroforeticamente riconoscibili. Altri tre loci (*Idh-1*, *6-Pgdh* e *Est-2*) risultano parzialmente discriminanti, almeno nell'area studiata, essendo gli alleli più comuni diversi nelle due specie. La distanza genetica (*D*) tra le due specie, calcolata sui campioni raccolti nel comprensorio Tolfetano-Cerite per i trenta loci studiati, è risultata di 0,2029 ( $I = 0,8163$ ). Valori del tutto simili sono stati recentemente osservati da Zimmermann *et al.* [24] tra specie ben differenziate di roditori del genere *Peromyscus*.

Nessun ibrido è stato osservato tra i sessantadue individui studiati. La presenza di fenomeni di introgressione tra le due specie non può, tuttavia, essere completamente esclusa. Un esemplare di *A. flavicollis* è, ad esempio, risultato eterozigote  $Idh-I^1/Idh-I^{1.05}$ , mentre tutti gli altri sono risultati omozigoti  $Idh-I^{1.05}/Idh-I^{1.05}$  (al contrario tutti gli *A. sylvaticus* sono risultati omozigoti  $Idh-I^1/Idh-I^1$ ). Lo stesso individuo è risultato omozigote  $6-Pgdh^1/6-Pgdh^1$ , allele relativamente raro in *A. flavicollis*, mentre la sua frequenza è superiore al 95 % in *A. sylvaticus*. Tuttavia se l'ibridazione in natura tra *A. sylvaticus* e *A. flavicollis* si realizza (e questo punto potrà essere chiarito solo da ulteriori indagini condotte sia in laboratorio che sul campo utilizzando le tecniche elettroforetiche di studio dei sistemi gene-enzima), deve trattarsi di un fenomeno del tutto eccezionale. Abbiamo, infatti, potuto mettere in evidenza l'esistenza di un'efficace barriera di isolamento riproduttivo pre-copula di tipo ecologico (*habitat isolation*). Le due specie, infatti, pur essendo presenti anche a distanze molto ravvicinate (spesso non più di 100-200 metri) mostrano di preferire habitat nettamente differenziati: nei boschi ceduati, nelle zone cespugliose e nei campi si trova *A. sylvaticus*, mentre *A. flavicollis* risulta limitato ai boschi folti e ad alto fusto. Questi dati confermano precedenti osservazioni di Zimmermann [23] secondo cui *A. sylvaticus* sarebbe proprio dei campi e in generale dei luoghi aperti, mentre *A. flavicollis* risulterebbe legato ai boschi.

Lo studio della variabilità genetica delle due popolazioni di *A. sylvaticus* e *A. flavicollis* ha mostrato: a) che i loci polimorfici sono 7 su 30 sia in *A. sylvaticus* (*Mpi*, *Ada*,  $\alpha$ -*Gpdh*, *Est-2*, *Pgm*, *Tpi* e  $6-Pgdh$ ), sia in *A. flavicollis* (*Mpi*, *Est-1*, *Pgm*, *Idh-1*, *Ldh-1*, *Ldh-2* e  $6-Pgdh$ ); b) che l'eterozigosi media osservata per locus è 0,035 in *A. sylvaticus* e 0,020 in *A. flavicollis*.

Va, inoltre, segnalato che una subpopolazione di *A. sylvaticus* presente in località La Castellina (Allumiere) è risultata sensibilmente differenziata dalle altre per le frequenze alleliche di due loci:  $\alpha$ -*Gpdh* e *Tpi*.

Va, infine, ricordato che il confronto tra la popolazione di *A. flavicollis* dei monti della Tolfa con individui provenienti da altre regioni (Alpi occidentali, Appennino marchigiano), pur confermando i dati sopra riportati sul differenziamento di questa specie da *A. sylvaticus*, ha mostrato l'esistenza di un notevole differenziamento genetico a livello intraspecifico, che confermerebbe l'esistenza in Italia di più sottospecie di *A. flavicollis*.

#### *Ringraziamenti.*

Gli autori esprimono la loro gratitudine al Dott. Longino Contoli per le proficue discussioni e gli utili suggerimenti, al Prof. Ettore Biocca per aver messo a disposizione alcuni esemplari di *A. flavicollis* da lui raccolti in varie regioni italiane e alla Dott.ssa Maria Rossella Cianchi per aver collaborato alle ricerche elettroforetiche sui sistemi gene-enzima e all'elaborazione statistica dei dati. Ringraziano, inoltre, la Comunità montana dei Monti della Tolfa, III zona, per aver contribuito con materiali e mezzi allo svolgimento delle

ricerche e i Signori Maria Luisa Pinna, Mauro Pomponi, Augusto Battilocchio e Antonella Mignanti, componenti dell'unità operativa « Tutela della fauna » della Cooperativa AZETA, per aver coadiuvato gli autori nella raccolta del materiale sul campo.

Le ricerche sono state svolte nell'ambito del progetto « Tutela ambiente e creazione Parco », finanziato dalla Regione Lazio.

## LAVORI CITATI

- [1] E. AMTMANN (1965) - *Biometrische Untersuchungen zu Introgression Hybridation der Gelbhalsmaus (A. tauricus Pallas, 1811) und der Waldmaus (A. sylvaticus L., 1785)*. « Zeitschrift Zool. Syst. Evolut. », 3, 103-156.
- [2] F. J. AYALA, J. R. POWELL, M. L. TRACEY, C. A. MOURAO e S. PEREZ-SALAS (1972) - *Enzyme variability in the Drosophila willistoni group. IV. Genic variation in natural population of Drosophila willistoni*. « Genetics », 70, 113-139.
- [3] G. E. H. BARRET-HAMILTON (1900) - *On geographical and individual variation in Mus sylvaticus and its allies*. « Proc. Zool. Soc. London », 387-423.
- [4] E. BOTHSCHAFTER (1962) - *Biometrische Untersuchungen an Gelbhalsmäusen (A. tauricus, P. 1811) und Waldmäusen (A. sylvaticus Linné, 1785) aus dem Bayerischen Wald*. « Säugetierk. Mitt. », 13, 1-47.
- [5] G. J. BREWER (1970) - *An Introduction to Isozyme Techniques*. Academic Press, New York.
- [6] L. CONTOLI (1977) - *Mammiferi del Tolfetano-Cerite*. « Quaderni Acc. Naz. Lincei », 227, 191-226.
- [7] T. H. DAY (1972) - *Variation in the lens proteins among species of rodents*. « Comp. Bioch. Physiol. », 43 B, 1019-1027.
- [8] S. DEBROT e C. MERMOD (1977) - *Chimiotaxonomie du genre Apodemus Kaup (1827) (Rodentia, Muridae)*. « Rev. Suisse de Zool. », 84, 521-526.
- [9] R. DIDIER e P. RODE (1935) - *Les Mammifères de France (Editeur)*. Tome 10, Paris, 393.
- [10] J. R. ELLERMANN e MORRISON SCOTT T. C. S. (1951) - *Checklist of Palearctic and Indian Mammals*. « London, Brit. Mus. (Nat. Hist.) ».
- [11] W. ENGEL *et al.* (1973) - *Cytogenetic and Biochemical differences between A. sylvaticus and A. flavicollis possibly responsible for failure to interbreed*. « Comp. Bioch. Physiol. », 44 B, 1165-1173.
- [12] G. S. MILLER (1912) - *Catalogue of the Mammals of Western Europe (Europe exclusive of Russia) in the collection of the British Museum*. « British Museum (Nat. Hist.) ».
- [13] M. NEI (1972) - *Genetic distance between populations*. « Amer. Natur. », 106, 283-292.
- [14] L. PASQUIER (1974) - *Dynamique évolutive d'un sous-genre de Muridae Apodemus (Sylvaemus). Etude biométrique des caractères dentaires de population fossiles et actuelles d'Europe occidentale*. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle Montellier.
- [15] M. A. RECCO, R. FEDERICI e M. CRISTALDI (1978) - *Presenza simpatrica di Apodemus flavicollis e di Apodemus sylvaticus nelle zone di Tolfa e Manziana: considerazioni critiche*. « Boll. Mus. Civ. St. Nat. Verona », 5, 313-353.
- [16] M. CH. SAINT-GIRONS (1962) - *A propos de l'hybridation éventuelle entre Mulot gris, A. sylvaticus (L. 1785) et Mulot fauve, A. flavicollis (M., 1834)*. « Säugetier Mitt. », 10, 25.
- [17] R. K. SELANDER, M. H. SMITH, S. Y. YANG, W. E. JOHNSON e J. B. GENTRY (1971) - *Biochemical polymorphism in the genus Peromyscus. I. Variation in the old-field mouse (Peromyscus polionotus)*. « Studies in Genet., Univ. Texas », publ. N. 7103, 49-90.
- [18] H. SCHAFFER (1935) - *Studien an mitteleuropäischen Kleinsäugetern mit besonderer Berücksichtigung der Rassenbildung*. « Arch. Naturgesch. », 4, 535-559.
- [19] C. R. SHAW e A. L. KOEN (1968) - *Starch gel zone electrophoresis of enzymes*. In: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques* Vol. 2, 2<sup>a</sup> ed., I. Smith e L. Wiley editors, New York.

- [20] G. STEIN (1938) - *Biologische Studien an deutschen Kleinsäugetern*. « Arch. Naturgesch. », 7, 477-513.
- [21] A. TOSCHI (1965) - *Mammalia. Fauna d'Italia*, Ed. Calderini, Bologna.
- [22] G. WITTE (1964) - *Zur Systematik der Insektenfresser des Monte-Gargano-Gebietes (Italien)*. « Bonn. Zool. Beiträge », 15, 1-35.
- [23] K. ZIMMERMANN (1936) - *Zur Kenntnis der europäischen Waldmäusen*. « Arch. Naturgesch. », 5, 116-133.
- [24] E. G. ZIMMERMANN, C. W. KILPATRICK e B. J. HART (1978) - *The genetics of speciation in the Rodent genus Peromyscus*. « Evolution », 32, 565-579.