

# Primo dato genetico per il fratino (*Charadrius alexandrinus*) in Italia e confronto su scala continentale

Monica Guerrini<sup>1</sup>, Paolo Maria Politi<sup>2</sup>, Luca Puglisi<sup>3</sup>, Filippo Barbanera<sup>1\*</sup>

**Riassunto** - Il fratino (*Charadrius alexandrinus*, Charadriiformes) è una specie con distribuzione ampia che comprende i litorali di tutta la fascia temperata e subtropicale di Europa, Asia ed Africa. Negli ultimi decenni la disponibilità di habitat per la nidificazione della specie è risultata fortemente limitata dalla distruzione diretta o perdita funzionale delle aree dunali ad opera del crescente turismo costiero. Quando non è preclusa la possibilità di insediarsi sul litorale, il successo riproduttivo risulta comunque drasticamente ridotto dal disturbo antropico. In Italia, il fratino è in forte diminuzione ed è classificato “In Pericolo” nella Lista Rossa dei vertebrati italiani. Tre nuclei stabili sono noti in Toscana, di cui uno nel comune di Castagneto Carducci (Livorno). In quest’area, il recupero di un uovo fratturato a seguito di una forte mareggiata (2020) sull’arenile della Zona Speciale di Conservazione/Zona di Protezione Speciale Padule di Bolgheri, ha permesso l’amplificazione tramite PCR di un frammento di 523 pb della Regione di Controllo del DNA mitocondriale. La sequenza è stata allineata con altre 198 scaricate dalla *GenBank* al fine di ricostruire le relazioni genetiche tra fratini sulla base sia dell’origine geografica che dell’appartenenza a popolazioni continentali o insulari, identificare gruppi geneticamente omogenei, e testare un’ipotesi di espansione demografica attraverso l’intero areale di distribuzione della specie. La diversità genetica è risultata più elevata nelle isole rispetto alle aree continentali. Dei 47 aplotipi (H) totali, 35 sono privati mentre tra i rimanenti, tutti condivisi da più popolazioni, due si sono distinti per elevata frequenza: uno (H3) è stato quasi esclusivamente rinvenuto in Europa mentre l’altro (H14) nell’intera Eurasia (con prevalenza orientale). Il fratino di Bolgheri è stato assegnato all’aplotipo H3 insieme a soggetti originari soprattutto della Penisola Iberica e della Macaronesia. Nel complesso, tre gruppi genetici omogenei sono stati identificati nell’intero areale della specie; tuttavia, a conferma di un elevato flusso genico intraspecifico, nessuno di questi possiede una definita struttura spaziale. Infine, le analisi demografiche hanno evidenziato una significativa espansione demografica su scala continentale nella storia naturale del fratino. Questo studio rappresenta il primo contributo alla conoscenza delle affinità genetiche

della popolazione italiana di fratino e sottolinea l’urgenza di investigare la specie su scala nazionale per definire strategie di conservazione più adeguatamente informate.

**Parole chiave:** Charadriidae, *Charadrius alexandrinus*, DNA mitocondriale, fratino, Regione di Controllo, Toscana.

**Abstract** - First genetic data for the Kentish Plover (*Charadrius alexandrinus*) in Italy and a comparison on a continental scale.

The Kentish Plover (*Charadrius alexandrinus*, Charadriiformes) is a shorebird with a huge range including beaches and salt pans across northern temperate to subtropical latitudes of Europe, Asia, and Africa. In the last decades, the availability of breeding sites for this species has been greatly reduced through direct destruction or functional loss of dune areas due to a remarkable expansion of coastal tourism. Altogether this has often prevented the Kentish Plover from settling along the shore and, wherever possible, its reproductive success has in any case been negatively impacted by human disturbance. In Italy, the species is in sharp decline and reported as Endangered in the national Red List of vertebrates. Three well-established nuclei are known in Tuscany, with one occurring in the municipality of Castagneto Carducci (Province of Livorno). In this area, after a strong storm a cracked egg was recovered in 2020 on the beach of the Special Area of Conservation/Special Protection Area Padule di Bolgheri. A 523 bp-long fragment of the mitochondrial DNA Control Region was amplified by PCR. The sequence was aligned with those available (n = 198) in the GenBank (i) to determine relationships between the Italian representative and conspecifics from the entire range based on both their geographical origin and affiliation to mainland/island populations, (ii) to identify genetically homogeneous clusters, and (iii) to test a hypothesis of sudden demographic expansion across the entire range of the species. Overall, the haplotypic diversity ( $h$ ) was  $0.86 \pm 0.02$  while the nucleotide diversity ( $\pi$ , %) was  $0.46 \pm 0.28$ , with the island populations holding higher values than the mainland ones (except Azores:  $h = 0.12 \pm 0.11$ ,  $\pi = 0.24 \pm 0.43$ ). Thirty-five (e.g., Taiwan, 8; Ukraine, 7; Russia, 5) over a total of 47 haplotypes (H) turned out to be private, while all the remaining ones were shared by several populations. Of these, two (H3, H14) showed up with a remarkably high frequency (18.5% and 31.6%, respectively): H3 occurred almost exclusively in Europe while H14 across the whole Eurasia (more to the East than to the West). The Median Joining network reflected a double-star structure with most of the haplotypes being a single-mutational step away from H3 and H14, a pattern that did not change when the birds from the mainland and island populations were investigated separately. The single Italian representative was assigned to H3 as well as most of the individuals from the Iberian Peninsula and Macaronesia. The Analysis of the Molecular Variance indicated that the 25.53% of the genetic diversity was partitioned among populations and the 74.47% among individuals within populations ( $\phi_{ST} = 0.25$ ;  $P < 0.001$ ). The values of  $F_s$  and  $D$  statistics of Fu’s and Tajima tests were  $-26.782$  ( $P < 0.001$ ) and  $1.680$  ( $P = 0.016$ ), respectively, and the curve of Mismatch Distribution showed a markedly unimodal trend (Harpending index:  $r = 0.027$ ,  $P = 0.45$ ). Therefore, the hypothesis of a sudden demographic expansion across the whole species’ range could not be

<sup>1</sup> Dipartimento di Biologia, Università di Pisa, Via A. Volta 4, 56126 Pisa, Italia.

<sup>2</sup> Tenuta San Guido, Località le Capanne 27, 57022 Bolgheri (Livorno), Italia.

<sup>3</sup> COT - Centro Ornitologico Toscano “Paolo Savi” - ETS, Via de Larderel 93, 57122 Livorno, Italia.

\* Corresponding author: filippo.barbanera@unipi.it

© 2022 Monica Guerrini, Paolo Maria Politi, Luca Puglisi, Filippo Barbanera

Received for publication: 2 September 2021

Accepted for publication: 17 November 2021

Online publication: 15 December 2022

rejected. A Bayesian clustering analysis of the 199 investigated sequences pointed to the occurrence of three genetic groups. Clusters 1 (red,  $n = 86$ ; mean membership value, 0.43) and 3 (green,  $n = 83$ , with the Italian representative: mean membership value, 0.46) occurred mostly across Europe and in the eastern part of the species' range, respectively, whereas cluster 2 (yellow,  $n = 30$ ; mean membership value, 0.11) included birds from Cape Verde, Russia, and the United Arab Emirates. However, these groups did not reflect a significant spatial genetic structure across the Kentish Plover's range, thus confirming the well-known high levels of intraspecific gene flow. In conclusion, while this study provided the first contribution to the knowledge of genetic relationships of the Italian Kentish Plover population, a national scale investigation of this species to draw up more adequately informed conservation strategies cannot be delayed any longer.

**Key words:** Charadriidae, *Charadrius alexandrinus*, Control Region, Kentish Plover, mitochondrial DNA, Tuscany.

## INTRODUZIONE

Il fratino (*Charadrius alexandrinus*, Charadriiformes) è una specie con distribuzione ampia che comprende tutta la fascia temperata e subtropicale di Europa (inclusa la Macaronesia), Asia ed Africa. Frequenta aree con copertura vegetale scarsa prossime a corpi idrici come lagune salate o salmastre e spiagge sabbiose, sebbene possa essere rinvenuto anche in aree non costiere con caratteristiche idonee (Fig. 1). Depone usualmente tre uova in una piccola buca scavata nel suolo dal maschio, solitamente tra metà aprile (fine marzo) e metà luglio (inizio agosto) (Brichetti & Fracasso, 2004). Le uova sono covate per 24-29 giorni da entrambi i sessi, benché la femmina si faccia prevalentemente carico dell'incubazione durante le ore diurne. I piccoli sono nidifughi ed a poche ore dalla schiusa si allontanano definitivamente dal nido, quantunque controllati continuamente da almeno un genitore che fornisce loro supporto anche nella termoregolazione. Covate successive e di sostituzione, in caso di fallimento, sono frequenti e la strategia riproduttiva include poliginia e poliandria successive (del Hoyo *et al.*, 2021).

Negli ultimi decenni la grande espansione del turismo costiero ha fortemente ridotto la disponibilità di habitat sulle spiagge a causa della distruzione diretta (per lasciare posto a infrastrutture) o della perdita funzionale delle aree dunali dovuta al prolungato e massiccio disturbo antropico nei mesi primaverili ed estivi (Biondi & Pietrelli, 2011; Cimiotti & Hoetker, 2013; Hortas *et al.*, 2013; Gómez-Serrano, 2021). Pertanto, al fratino è spesso preclusa la possibilità di insediarsi e, ove questo sia ancora possibile, il successo riproduttivo della specie risulta drasticamente ridotto. Le variazioni artificiali dei livelli idrici, invece, costituiscono la principale causa di riduzione della presenza della specie nelle zone umide. In Italia, il fratino ha una distribuzione strettamente costiera, molto discontinua a causa dell'urbanizzazione dei litorali. La sua popolazione è in forte diminuzione con 570-690 coppie stimate nel 2018 rispetto alle circa 1554-1901 stimate nel 2009 (Comitato Nazionale per la Conservazione del Fratino *et al.*, 2019); pertanto, è classificato "In Pericolo" nella Lista Rossa nazionale dei vertebrati (Gustin *et al.*, 2019). In Toscana, la specie è passata da 52-70 coppie alla fine degli anni '80 a 17-22 del 2016, con un minimo di 9-13 nel 2018 (Puglisi & Meschini, 2016), per poi oscillare tra 20 e 30 coppie negli anni successivi, con una distribuzione ridotta a tre nuclei di presenza regolare lungo i litorali (e spiagge attigue) ubicati nel Parco Regionale di Migliarino San Rossore Massaciuccoli, nel comune di Castagneto Carducci (Livorno) e nel Parco Regionale della Maremma. A questi nuclei se ne aggiungono altri di entità variabile a seconda dei livelli idrici in aree umide nel Porto di Livorno e nella Laguna di Orbetello (COT - Centro Ornitologico Toscano, dati inediti). In Italia, la specie è nidificante, migratrice e svernante, e sebbene l'osservazione di fratini inanellati all'estero suggerisca movimenti da/per Spagna, Francia, Germania, Austria, Ungheria, Marocco, Tunisia e Senegal (Spina & Volponi, 2008), non sono noti dati relativi a connessioni tra le popolazioni nidificanti nelle diverse aree geografiche e la Penisola Italiana.

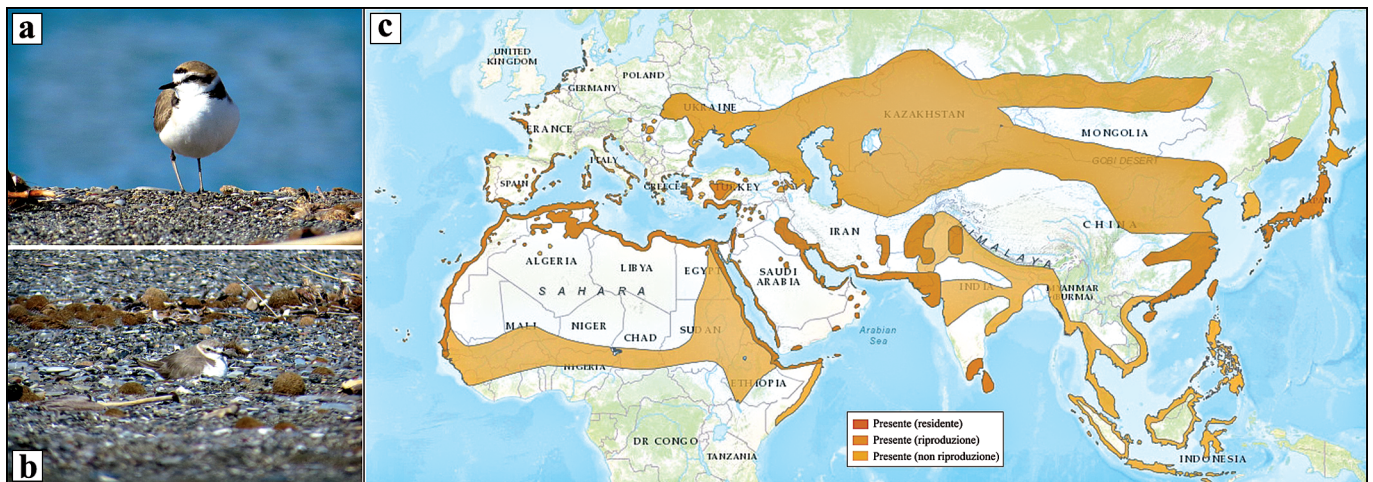


Fig. 1 - (a) maschio di fratino nei pressi del nido; / male Kentish Plover near the nest; (b) femmina in cova sull'arenile del Padule di Bolgheri; / brooding female on the beach of Padule di Bolgheri; (c) areale di distribuzione del fratino / Kentish Plover's range. (Bird-Life International and Handbook of the Birds of the World, 2019. *Charadrius alexandrinus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1). (Foto: /Photo: Paolo M. Politi).

Nell'ultimo decennio il fratino è stato investigato a livello genetico e genomico su scala sia continentale che regionale. Con riferimento a campionamenti effettuati nell'intero areale di distribuzione, Rheindt *et al.* (2011) hanno genotipizzato circa 300 individui a tre e sette loci del DNA mitocondriale e nucleare (microsatelliti autosomici), rispettivamente, riportando un elevato flusso genico ed una conseguente marcata omogeneità tra popolazioni. Similmente, Küpper *et al.* (2012) hanno sequenziato un frammento (427 pb) del gene della Regione di Controllo (CR) del DNA mitocondriale ed altri loci nucleari in circa 400 fratini. Questi autori non hanno rilevato né struttura spaziale significativa né alcuna evidenza di cambiamento demografico, sottolineando una moderata divergenza ed una ridotta diversità genetica delle popolazioni insulari. A fronte del maggior grado di struttura genetica riscontrato nei maschi rispetto alle femmine, hanno suggerito che l'intenso flusso genico e la relativa panmissia siano attribuibili prevalentemente a femmine poliandriche in dispersione per la nidificazione. Viceversa, Vidal *et al.* (2014) hanno riscontrato segni di espansione demografica ma assenza di struttura genetica spaziale in popolazioni di fratino della costa atlantica spagnola e portoghese, mentre Almalki *et al.* (2017) – analizzando i dati dei microsatelliti prodotti da Küpper *et al.* (2012) – hanno evidenziato divergenza genetica tra le popolazioni delle isole della Macaronesia e quelle continentali di Portogallo e Marocco.

Questo studio offre il primo contributo genetico alla conoscenza della popolazione italiana di fratino tramite la caratterizzazione della CR mitocondriale in un soggetto

campionato in una delle aree più importanti per la nidificazione della specie in centro Italia (Provincia di Livorno). La sequenza è stata allineata con altre 198 depositate nella *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) allo scopo di (i) ricostruire l'affinità genetica tra fratini in base all'origine geografica e all'appartenenza a popolazioni continentali o insulari, (ii) identificare gruppi geneticamente omogenei attraverso l'areale di distribuzione della specie, e (iii) testare un'ipotesi di espansione demografica attraverso l'intero areale.

## MATERIALI E METODI

### Area di studio e campionamento biologico

La Zona Speciale di Conservazione (ZSC)/Zona di Protezione Speciale (ZPS) Padule di Bolgheri si estende per circa 577 ha e 2,2 km di litorale sabbioso lungo il Mar Tirreno nel comune di Castagneto Carducci (Livorno). Al suo interno ricade interamente il Rifugio Faunistico Padule di Bolgheri – istituito nel 1959 – ed a sua volta compreso nella Tenuta San Guido (Fig. 2). Il sito è listato nella Convenzione sulle Zone Umide di Importanza Internazionale (Ramsar 1971, 1977 in Italia) e beneficia della denominazione IBA (*Important Bird and Biodiversity Areas*, Aree di Importanza per gli Uccelli e la Biodiversità) da parte di BirdLife International. Infine, in base alla L.R.T. 11.2.1992 n.157, il Padule di Bolgheri è inquadrato in regime di “Zona di Protezione art. 14”.

L'assetto naturale del litorale di Castagneto Carducci e il ridotto numero di accessi pubblici che limita forte-

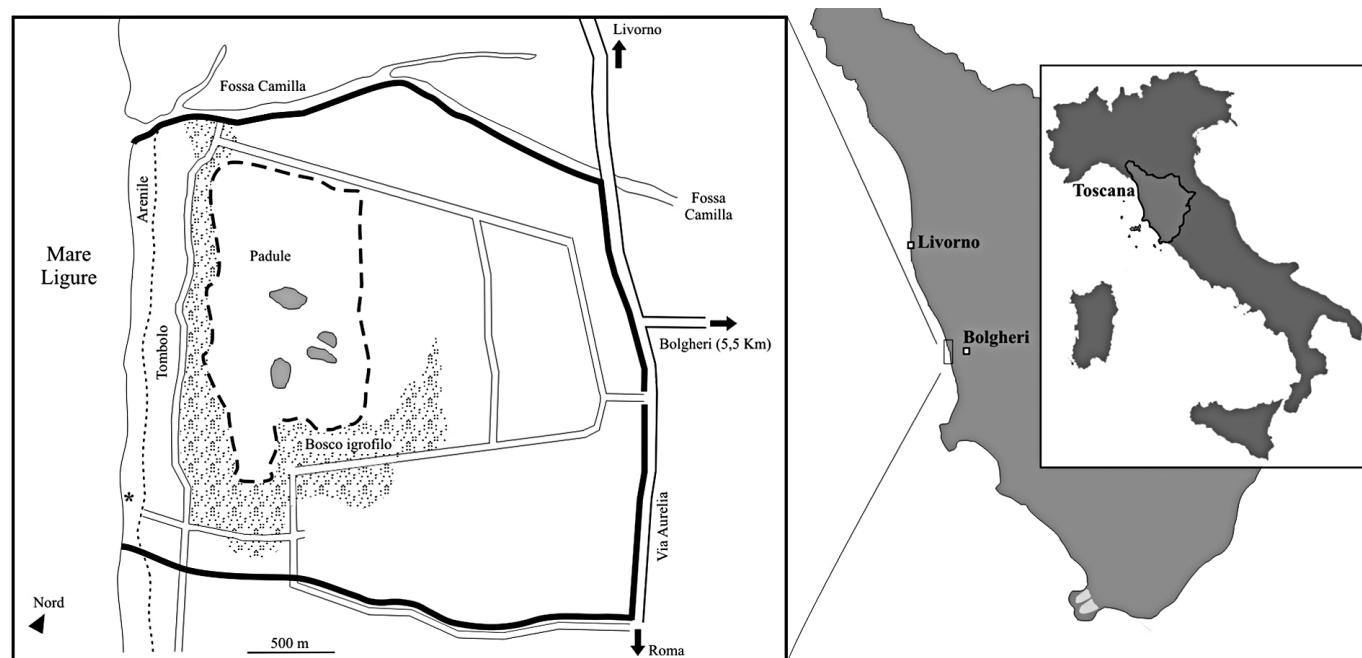


Fig. 2 - Area di studio della Tenuta San Guido nella parte meridionale della Provincia di Livorno, in Toscana. Sulla sinistra è schematizzata l'area pertinente l'intero Rifugio Faunistico Padule di Bolgheri con l'esteso bosco igrofilo (frassino, *Fraxinus angustifolia*). Sull'arenile, l'asterisco (\*) indica la posizione del nido di fratino oggetto della presente investigazione genetica. / Tenuta San Guido study area in the southern part of the Province of Livorno, Tuscany. The area pertaining the entire Rifugio Faunistico Padule di Bolgheri – including an extensive hygrophilous forest (Ash, *Fraxinus angustifolia*) – is schematically given on the left side. On the beach, the asterisk (\*) indicates the position of the Kentish Plovers' nest that was genetically investigated in this study.

mente il disturbo antropico, hanno consentito al fratino di nidificarvi regolarmente sebbene con un numero di coppie decrescente negli anni (12 nel 2016, 4 nel 2020: Puglisi & Meschini, 2016; COT, dati inediti), 1-2 delle quali nidificanti annualmente lungo l'arenile della ZSC/ZPS. Tali condizioni rendono quest'area di primaria importanza per la conservazione della specie in Toscana.

In data 23 aprile 2020, uno degli autori (P.M.P.) ha individuato un nido di fratino (con tre uova) posizionato sull'arenile della ZSC/ZPS a 17 m dalla battigia (Fig. 2). Nella notte tra il 29 e 30 aprile in seguito al rafforzarsi dei venti di ponente/libeccio (Video S1), le onde hanno sovravanzato il nido di almeno 3 m disperdendo le tre uova: due, integre, sono state ricollocate *in situ*. Il terzo uovo, fratturato, è stato consegnato al Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa dove è conservato a -40 °C in etanolo al 96%.

### Estrazione, amplificazione e sequenziamento del DNA

Il DNA totale genomico è stato estratto da 10 mg di frammenti di tessuto rinvenuti all'interno dell'uovo impiegando il *Puregene Core Kit-A* (Qiagen, Germania) e seguendo il protocollo *DNA Purification from Tissue* riportato nel manuale dell'azienda produttrice. L'eluzione finale del DNA è stata effettuata in 50 µl di acqua distillata sterile. Un frammento della lunghezza di 523 pb del gene CR mitocondriale, corrispondente alla porzione compresa tra le posizioni 241 e 759 del medesimo locus nel mitogenoma di *C. alexandrinus* (codice *GenBank*, MN356434: Feng *et al.*, 2020), è stato amplificato utilizzando i *primers forward* SNPL90 (5'-SATCATGACACGTCACATGC-3') e *reverse* TS778H (5'-AAACACTTGAAACCGTCTCAT-3') disegnati da Funk *et al.* (2007) e Wenink *et al.* (1994), rispettivamente. L'amplificazione (50 µl) tramite Reazione a Catena della Polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) è stata effettuata come in Barbanera *et al.* (2015) impiegando 1 µl di DNA estratto e una temperatura di appaiamento di 55 °C. Il prodotto di PCR è stato purificato usando il *GenElute PCR Clean-Up Kit* (Merck) e sottoposto a sequenziamento diretto (ABI 3730) su entrambi i filamenti di DNA utilizzando i *primers* di amplificazione ed il *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (v. 3.1, Thermo Fisher Scientific) presso i laboratori di Bio-Fab Research (Roma).

### Analisi genetiche ed elaborazione statistica dei dati

I cromatogrammi sono stati letti utilizzando il programma CHROMAS v. 2.6.4 (Technelysium Pty Ltd, Australia). Quindi, abbiamo scaricato 198 sequenze dalla *GenBank* comprendenti il frammento di gene amplificato ed appartenenti a fratini di 14 popolazioni sia continentali che insulari (Tab. 1). Tra queste, 30 contenevano una base non risolta in posizione 411 del gene CR: tale posizione è stata eliminata (lunghezza finale del frammento amplificato, 522 pb). Quindi, le sequenze sono state allineate con CLUSTALX v. 2.1 (Thompson *et al.*, 1997) mentre gli aplotipi (H) sono stati determinati con DNASP v. 6 (Rozas *et al.*, 2017). La misurazione

della diversità aplotipica ( $h$ ) e nucleotidica ( $\pi$ , %) con ARLEQUIN v. 3.5.1 (Excoffier & Lischer, 2010), la ricostruzione delle relazioni tra gli aplotipi (*network*) con NETWORK v. 5.0.1.1 (Fluxus Technology, UK) secondo il metodo del *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999), ed il calcolo della partizione della variabilità genetica (Analisi della Varianza Molecolare, AMOVA) con ARLEQUIN tramite analogo  $\phi_{ST}$  della statistica  $F$  di Wright (1951), sono state condotte sulla base sia della area geografica di origine dei campioni (15 gruppi) che della loro appartenenza a popolazioni continentali ( $n = 123$ ) o insulari ( $n = 76$ ) (Tab. 1).

Il programma BAPS v. 6.0 (Corander & Marttinen, 2006; Cheng *et al.*, 2013) è stato impiegato per condurre un'analisi di gruppi di tipo bayesiano (*Bayesian clustering*) sulle 199 sequenze disponibili, applicando le opzioni *linked molecular data* e *codon linkage model*, senza informazioni preliminari sulla posizione geografica degli individui campionati, con un limite superiore di  $K = 10$  e cinque repliche per ciascuna analisi. Una volta determinato il numero di gruppi secondo cui le 199 sequenze possono essere ripartite, abbiamo condotto un'analisi di commistione genetica (*admixture analysis*) per valutare il grado di ancestralità di ciascun individuo ovvero la discendenza da uno o più dei  $K$  *clusters* geneticamente distinti (1000 simulazioni, 200 individui di riferimento per popolazione, e 50 iterazioni). Quindi, è stato calcolato il coefficiente di assegnazione (*admixture coefficient*) a ciascun *cluster* per ogni individuo e per le 15 popolazioni incluse nello studio (Tab. 1).

Sono state ottenute inferenze sull'espansione demografica della popolazione di fratino su scala geografica continentale utilizzando metodi diversi (Pilkington *et al.*, 2008). Dapprima abbiamo calcolato con ARLEQUIN la statistica  $F_S$  di Fu (1997) e la  $D$  di Tajima (1989), che permettono di inferire eventuali deviazioni dal modello neutrale di evoluzione atteso per sequenze del DNA mitocondriale. Dal momento che gli eventuali discostamenti significativi possono essere dovuti a variazioni demografiche, selezione naturale e/o deriva genetica, il significato delle statistiche  $F_S$  e  $D$  è stato a sua volta indagato utilizzando DNASP e creando per ciascuna di esse una distribuzione nulla di 5000 simulazioni di coalescenza al fine di testare un'ipotesi ( $H_0$ ) di espansione demografica. Allo stesso scopo, infine, la distribuzione dei disappaiamenti tra le sequenze di DNA (*Mismatch Distribution*) è stata investigata con ARLEQUIN. Abbiamo ottenuto la curva di frequenza del numero dei siti nucleotidici in cui differiscono le combinazioni a coppie delle sequenze. La bontà della corrispondenza tra la distribuzione osservata e quella attesa è stata stimata tramite il test di Harpending *et al.* (1993). Quanto più la curva è multimodale (i.e., elevato valore dell'indice di Harpending,  $r$ ), ovvero quanto più sono numerose le mutazioni condivise tra gli aplotipi (i.e., lunghi rami evolutivi per molti individui), tanto più la popolazione è prossima ad una condizione di stazionarietà demografica. Al contrario, quanto più la curva è unimodale (i.e., bassi valori di  $r$ ), ovvero quanto più elevato è il numero di mutazioni alla base della divergenza tra gli aplotipi (i.e., lunghi rami evolutivi per pochi individui), tanto più la popolazione è stata oggetto

di un'espansione (la cui antichità cresce all'aumentare della distanza della curva stessa rispetto all'asse delle ordinate). La validità del modello è stata anche testata utilizzando i parametri osservati dell'espansione per creare nuove loro stime tramite simulazioni coalescenti e sommando gli scarti quadratici (*Sum of Squared Differences*, SSD) tra i parametri della curva osservata e stimata utilizzando un *bootstrap* parametrico (Schneider & Excoffier, 1999; Excoffier, 2004).

## RISULTATI

Sono stati identificati 47 aplotipi di cui 35 assegnati ad una sola area geografica (privati), mentre i rimanenti sono risultati condivisi tra più di una popolazione (Tab. 1). Ad Ucraina, Taiwan e Spagna è ascritto il numero più alto di aplotipi, mentre Taiwan, Ucraina, e Russia detengono la quota maggiore di aplotipi privati (Fig. 3, Tab. 2). Complessivamente la diversità aplo-tipica ( $h$ ) è risultata  $0,86 \pm 0,02$  mentre quella nucle-

Tab. 1 - Popolazioni di fratino incluse nel presente studio. Sono riportati il paese di origine e il suo codice identificativo, la località, il numero (n) di individui investigati, gli aplotipi (vedi Fig. 3), gli intervalli dei codici di accesso delle sequenze in GenBank, ed il riferimento bibliografico. (?) località sconosciuta; \*) popolazione insulare. / Kentish Plover populations of this study are listed along with both their country of origin and identification code, locality, number (n) of investigated individuals, haplotypes (see Fig. 3), GenBank sequence code range, and bibliographic reference. (?) unknown locality; \*) island population.

Paese	Codice	Località	n	Aplotipo H (n)	GenBank	Letteratura
Arabia Saudita	AS	Farasan Islands*	15	H3 (1), H14 (4), H30 (1), H34 (6), H35 (2), H38 (1)	HE603751-HE603766	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Capo Verde	CV	Capo Verde (Boa Vista)*	2	H39 (1), H40 (1)	HE603664-HE603666	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Capo Verde	CV	Capo Verde (Maio)*	7	H14 (1), H27 (3), H40 (3)	HE603667-HE603673	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Cina	C	Bohai	9	H14 (7), H24 (2)	FR822861-FR822870	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Emirati Arabi Uniti	EAU	Al Wathba	8	H14 (3), H16 (1), H29 (1), H30 (1), H32 (1), H42 (1)	AM941535-AM941542	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Emirati Arabi Uniti	EAU	Al Wathba	8	H13 (1), H14 (2), H27 (4), H29 (1)	FR822851-FR822858	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Germania	G	BeltringharderKoog	9	H3 (2), H14 (5), H21 (1), H26 (1)	HE603767-HE603776	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Italia	I	ZSC/ZPS Pad. Bolgheri	1	H3 (1)	MZ450119	Questo studio
Portogallo	P	Samouco	17	H1 (1), H3 (3), H9 (1), H14 (8), H24 (1), H27 (1), H33 (1), H41 (1)	HE603734-HE603750	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Portogallo	Ma	Madeira (Porto Santo)*	2	H14 (2)	HE603716-HE603717	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Portogallo	Az	Azzorre (Santa Maria)*	16	H3 (15), H37 (1)	HE603718-HE603733	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Russia	R	Lake Elton	13	H4 (1), H10 (2), H14 (2), H15 (1), H17 (1), H21 (1), H23 (1), H27 (3), H28 (1)	HE603777-HE603791	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Spagna	S	Doñana	8	H1 (1), H7 (1), H14 (2), H18 (1), H21 (1), H24 (1), H27 (1)	FR822896-FR822903	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Spagna	S	Doñana	9	H1 (1), H3 (2), H14 (4), H24 (1), H38 (1)	AM941543-AM941551	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Spagna	S	Fuente de Piedra	12	H3 (3), H9 (2), H14 (4), H21 (3)	HE603650-HE603663	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Spagna	Ca	Canarie (Fuerteventura)*	16	H1 (1), H3 (4), H14 (4), H36 (7)	HE603699-HE603715	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Taiwan	Ta	? *	18	H3 (1), H5 (2), H11 (1), H12 (1), H14 (5), H19 (2), H20 (1), H31 (1), H43 (1), H44 (3)	FR822957-FR822974	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Turchia	T	Tuzla	6	H3 (2), H14 (2), H17 (1), H22 (1)	AM941527-AM941534	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Turchia	T	Tuzla	6	H2 (1), H3 (1), H14 (3), H27 (1)	FR822975-FR822981	Rheindt <i>et al.</i> (2011)
Ucraina	U	Kujalnik	10	H6 (1), H8 (1), H14 (4), H25 (1), H45 (1), H46 (1), H47 (1)	AM941516-AM941525	Küpper <i>et al.</i> (2012)
Ucraina	U	Kujalnik	7	H3 (2), H6 (1), H7 (1), H14 (1), H16 (1), H24 (1)	FR822935-FR822941	Rheindt <i>et al.</i> (2011)

Tab. 2 - Il numero di individui ( $n$ ), aplotipi ( $N_a$ ), aplotipi privati ( $N_{ap}$ ) ed i valori della diversità aplotipica ( $h$ ) e nucleotidica ( $\pi$ , %) sono riportati per ciascuna delle popolazioni investigate e per la totalità delle stesse. d.s.) deviazione standard; \*) popolazione insulare. / The number of individuals ( $n$ ), haplotypes ( $N_a$ ), private haplotypes ( $N_{ap}$ ) and values of both haplotype ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ , %) are given for each of the investigated populations and for them as a whole. d.s.) standard deviation; \*) island population.

Popolazione	$n$	$N_a$	$N_{ap}$	$h \pm d.s.$	$\pi \pm d.s$
Arabia Saudita*	15	6	2	$0,79 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,27$
Capo Verde*	9	4	2	$0,75 \pm 0,11$	$0,50 \pm 0,33$
Cina	9	2	0	$0,39 \pm 0,16$	$0,07 \pm 0,09$
Emirati Arabi Uniti	16	8	4	$0,86 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,26$
Germania	9	4	1	$0,69 \pm 0,15$	$0,27 \pm 0,20$
Italia	1	1	0	-	-
Portogallo	17	8	2	$0,77 \pm 0,10$	$0,31 \pm 0,22$
Madeira*	2	1	0	-	-
Azzorre*	16	2	1	$0,12 \pm 0,11$	$0,24 \pm 0,43$
Russia	13	9	5	$0,94 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,34$
Spagna	29	10	1	$0,84 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,22$
Canarie*	16	4	1	$0,72 \pm 0,07$	$0,28 \pm 0,20$
Taiwan*	18	10	8	$0,90 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,33$
Turchia	12	6	2	$0,80 \pm 0,10$	$0,32 \pm 0,23$
Ucraina	17	11	6	$0,91 \pm 0,06$	$0,48 \pm 0,30$
Continentali	123	33	21	$0,83 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,26$
Insulari	76	20	14	$0,87 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,28$
Totale	199	47	35	$0,86 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,28$

otidica ( $\pi$ , %)  $0,46 \pm 0,28$ , con le popolazioni insulari caratterizzate da valori più alti rispetto a quelle continentali per entrambi i parametri. In particolare, i fratini di Russia e Ucraina possiedono la più alta diversità ( $h$ :  $0,94 \pm 0,05$  e  $0,91 \pm 0,06$ , rispettivamente;  $\pi$   $0,53 \pm 0,34$  e  $0,48 \pm 0,30$ , rispettivamente) mentre quelli delle Isole Azzorre costituiscono la popolazione geneticamente più omogenea ( $h = 0,12 \pm 0,11$ ;  $\pi$   $0,24 \pm 0,43$ ) (Tab. 2).

Il *Median Joining network* (Fig. 3 in alto) ha evidenziato una doppia configurazione a stella con la maggior parte degli aplotipi distanti una singola mutazione rispetto ai due aplotipi con maggior frequenza (H3 e H14: 18,5% e 31,6%, con individui campionati in 13 e 10 popolazioni, rispettivamente) e separati fra loro da una singola mutazione. La sequenza del fratino campionato a Bolgheri è stata assegnata all'aplotipo H3, al quale risultano appartenere per la gran parte soggetti originari della Penisola Iberica e relativi arcipelaghi nell'Oceano Atlantico (Tab. 1). All'aplotipo H3 appartengono anche

alcuni individui campionati in Germania, in Turchia, in Ucraina, in Arabia Saudita ( $n = 1$ ), e Taiwan ( $n = 1$ ). Il *network* ottenuto separando le popolazioni continentali da quelle insulari (Fig. 3 in basso) ha evidenziato che gli individui ( $n = 100$ ) assegnati ai due aplotipi più condivisi (H3 e H14) sono rappresentati per il 63% e 37% da fratini continentali e insulari, rispettivamente. Tale rapporto resta sostanzialmente immutato quando si considerano i rimanenti fratini ( $n = 99$ ), assegnati ad aplotipi che gemmano da ciascuno dei due più condivisi e che risultano appartenere a popolazioni continentali ed insulari per il 60,6% e 39,4%, rispettivamente. Infine, l'AMOVA ha mostrato che il 25,53% della varianza molecolare è distribuito tra popolazioni ed il 74,47% tra gli individui all'interno delle popolazioni ( $\phi_{ST} = 0,25$ ;  $P < 0,001$ ). Quando i gruppi presi in esame sono i fratini continentali e quelli insulari, la varianza molecolare è ripartita per il 15,35% tra di essi (84,65% al loro interno) sempre in modo altamente significativo ( $\phi_{ST} = 0,15$ ;  $P < 0,001$ ).

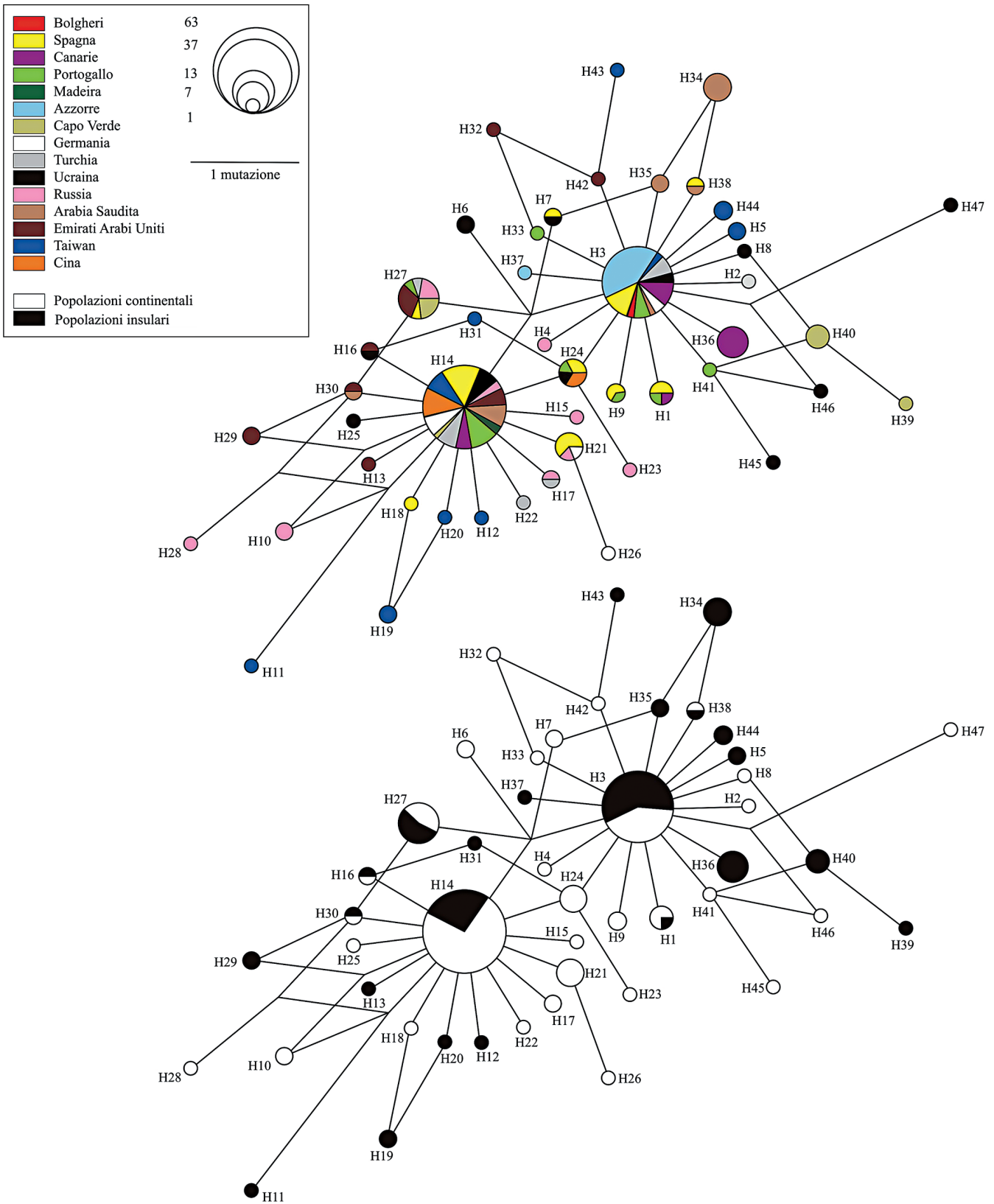


Fig. 3 - Il *Median Joining network* ottenuto dall'elaborazione delle 199 sequenze relative alla porzione di CR amplificata. Ad ogni aplotipo (Tab. 1) corrisponde un cerchio il cui diametro è direttamente proporzionale alla sua frequenza nel campione di sequenze investigato. La lunghezza della linea di collegamento tra due aplotipi è proporzionale al numero di mutazioni che intercorrono tra di essi. Un numero ed un colore per ogni paese identificano ciascuno aplotipo. / *Median Joining network* computed using all 199 mtDNA CR sequences. A circle is drawn in correspondence of each haplotype (Tab. 1): the diameter is proportional to its frequency in the investigated sample of sequences. The length of the line connecting two haplotypes is proportional to the number of mutations occurring between them. Each haplotype is identified by a number and a colour for each country.

I valori osservati di  $F_s$  e  $D$  sono risultati - 26,782 ( $P < 0,001$ ) e 1,680 ( $P = 0,016$ ), rispettivamente. Pertanto, entrambi i test suggeriscono il mancato rispetto di un modello di evoluzione neutrale per le sequenze investigate. I valori attesi di  $F_s$  e  $D$  in base alle simulazioni di coalescenza e la significatività del test rispetto a quelli osservati sono - 0,078 ( $P < 0,001$ ) e - 0,046 ( $P = 0,0088$ ), rispettivamente. La curva di *Mismatch Distribution* (Fig. 4) ha mostrato un andamento marcatamente unimodale e l'ipotesi di una espansione demografica non può essere rigettata (Harpending:  $r = 0,027$  con  $P = 0,45$ ;  $P$  SSD = 0,29).

L'analisi di tipo bayesiano effettuata con BAPS (Fig. 5, Tab. S1) ha ripartito le 199 sequenze investigate secondo tre gruppi genetici di affinità (*Probability for three clusters* = 0,99; *log likelihood for optimal partition* = 829,20). In particolare, i *clusters* 1 e 3 sono risultati predominanti (86 e 83 individui con un coefficiente di assegnazione medio pari a 0,43 e 0,46, rispettivamente). Il *cluster* 2 è risultato il meno inclusivo e comprende fratini originari di Capo Verde, Russia ed Emirati Arabi Uniti con un coefficiente di assegnazione medio pari a 0,11. Il fratino di Bolgheri è inserito nel *cluster* 1 così come tutti gli individui delle Isole Azzorre e la maggior parte di quelli delle Canarie. Le popolazioni di Spagna e Portogallo mostrano coefficienti di assegnazione ai *clusters* 1 e 3 comparabili (rispettivamente 0,39 e 0,57 per la Spagna vs. 0,44 e 0,50 per il Portogallo: Fig. 5, Tab. S1).

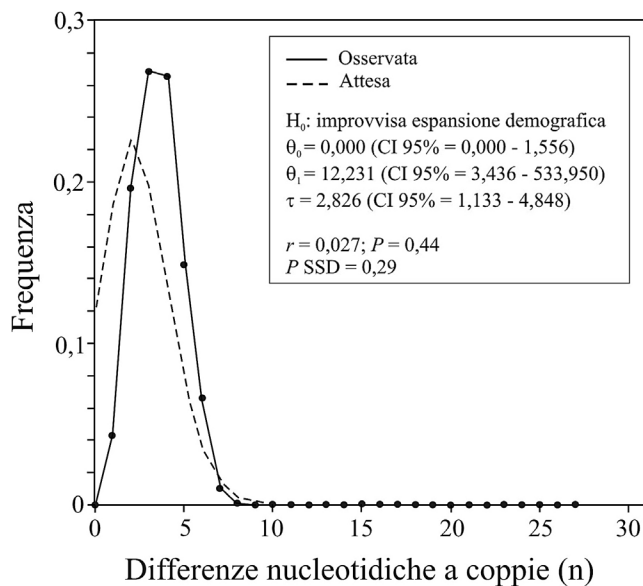


Fig. 4 - Curva di distribuzione (osservata: linea continua; attesa: linea tratteggiata) delle differenze nucleotidiche tra coppie di sequenze (*Mismatch Distribution*).  $\theta_0$ ) theta della popolazione prima dell'espansione;  $\theta_1$ ) theta della popolazione dopo l'espansione;  $\tau$ ) tempo di espansione;  $r$ ) indice di Harpending e significatività ( $P$ ) del relativo test;  $P$  SSD) significatività test SSD; CI) intervallo di confidenza al 95%. / *Mismatch Distribution* (observed: continuous line; expected: dotted line) of the mtDNA pairwise differences.  $\theta_0$ ) theta of the population before expansion;  $\theta_1$ ) theta of the population after expansion;  $\tau$ ) time to the expansion;  $r$ ) Harpending index with significance ( $P$ ) of related test;  $P$  SSD) significance of SSD test; CI) 95% confidence interval.

## DISCUSSIONE

Il nucleo di fratino nidificante a Castagneto Carducci (Livorno) svolge un ruolo centrale per la conservazione della specie lungo il litorale toscano e dell'alto Tirreno in quanto è quello che si riproduce con maggior regolarità e successo (Centro Ornitologico Toscano, dati inediti). L'investigazione del suo grado di separazione da altre popolazioni della specie ha quindi grande importanza per definire le strategie di gestione della specie almeno a scala regionale.

La teoria della coalescenza (Crandall & Templeton, 1993) predice che gli aplotipi frequenti e geograficamente dispersi siano quelli più antichi all'interno di una specie. In questo studio, H3 e H14 costituiscono due varianti genetiche ancestrali di cui la prima è quasi esclusivamente presente in Europa (fatta eccezione per un individuo di Taiwan) mentre la seconda è rinvenuta attraverso l'intera Eurasia (Fig. 3 in alto). In questa ricostruzione, il fratino di Bolgheri, il primo individuo per il quale sono resi disponibili in Italia dati di tipo genico-molecolare, è stato assegnato all'aplotipo H3 condiviso con soggetti per la gran parte originari dell'arcipelago delle Azzorre, di quello delle Canarie oltre che della Spagna continentale.

Nel complesso, il *network* ha evidenziato una doppia struttura con molteplici aplotipi in gemmazione dai due (H3, H14) più largamente condivisi (Fig. 3). L'elevata diversità aplotipica ( $h = 0,86$ ) e la bassa diversità nucleotidica ( $\pi = 0,46$ ) unitamente alle inferenze demografiche (Fig. 4, Risultati) hanno definito un quadro del tutto coerente ed espressione di una chiara espansione demografica del fratino su larga scala geografica avvenuta in qualche momento della sua storia naturale. In accordo con Grant & Bowen (1998), valori di  $h > 0,5$  e  $\pi < 0,5$  sono tipici di popolazioni che dopo un periodo di contrazione sono andate incontro a rapida espansione demografica, un fenomeno che aumenta la ritenzione di nuove mutazioni (Avise *et al.*, 1984; Rogers & Harpending, 1992) e che si riflette in una struttura genetica caratterizzata da uno o due aplotipi prevalenti incorporati in un gruppo di altri distanti una o poche mutazioni. Questi dati genetici complessivi sono in pieno accordo con i valori negativi e significativi delle statistiche calcolate nei test per la verifica della neutralità delle sequenze (test di Tajima, test di Fu), entrambi indice di crescita demografica. L'analisi di *Mismatch Distribution* effettuata per l'intero campione mostra che la curva osservata si adatta molto bene a quella attesa, producendo una distribuzione unimodale tipica del modello di improvvisa espansione demografica. I valori non significativi dei test di Harpending e SSD confermano la bontà della corrispondenza e consentono di non rigettare l'ipotesi di espansione, con l'ulteriore conforto della netta difformità tra i valori di  $\theta_0$  e  $\theta_1$ . Nel complesso, a differenza di quanto riportato da Rheindt *et al.* (2011) e Küpper *et al.* (2012), questi risultati indicano un'espansione demografica del fratino su scala continentale, in linea con quanto già riscontrato da Vidal *et al.* (2014) per le popolazioni della Galizia (Spagna) e del Portogallo.

Quando la ricostruzione del *network* è stata condotta distinguendo in base all'appartenenza degli individui



a popolazioni continentali o insulari (Fig. 3 in basso), i due aplotipi più condivisi – così come tutti i rimanenti – sono risultati ascritti per circa il 60% a soggetti del primo gruppo, escludendo così l'attribuzione degli aplotipi continentali e insulari come 'ancestrali' e 'derivati', rispettivamente. Tuttavia, in accordo con Küpper *et al.* (2012), che hanno suggerito come anche modeste distanze (e.g., 40 km) possano rendere ragione di un moderato differenziamento genetico tra popolazioni continentali ed insulari, abbiamo riscontrato una divergenza altamente significativa tra i fratini campionati sulle isole e tutti gli altri ( $\varphi_{ST} = 0,15$ ;  $P < 0,001$ ). Inoltre, a differenza di quanto riportato dagli stessi autori circa la ridotta diversità genetica delle popolazioni insulari, con la sola eccezione dei fratini delle Azzorre (15 fratini su 16 con aplotipo H3), i valori di  $h$  e  $\pi$  per le popolazioni insulari sono risultati superiori a quelli calcolati per quelle continentali ( $h$ :  $0,87 \pm 0,03$  e  $0,83 \pm 0,03$ , rispettivamente;  $\pi$ :  $0,47 \pm 0,28$  e  $0,42 \pm 0,26$ , rispettivamente; Tab. 2).

La struttura spaziale determinata attraverso l'assegnazione bayesiana degli aplotipi (Fig. 5, Tab. S1) suggerisce la presenza di tre distinti raggruppamenti genetici ai quali, tuttavia, non corrisponde una precisa ripartizione geografica. Il primo, di colore rosso in figura, include il fratino di Bolgheri ed è distribuito prevalentemente in Europa sebbene sia presente anche in Asia orientale. A differenza del *network* (Fig. 3 in alto), i fratini delle Azzorre sono assegnati in modo omogeneo a questo unico gruppo genetico, che risulta dominante anche in altri (Capo Verde, Canarie) ma non in tutti (Madeira, in verde) i territori insulari della Macaronesia

oltre che assai diffuso nella Penisola Iberica e tra 30°-50° Long. Est (Ucraina, Turchia, e Penisola d'Arabia; Fig. 5). Peraltro, quest'ultima fascia geografica risulta quella a maggior diversità all'interno del *range* della specie (Tab. 2). Per quanto riguarda invece la Macaronesia, il *pattern* osservato è solo in parte sovrapponibile (e.g., divergenza Azzorre-Madeira) a quello riportato da Almakil *et al.* (2017) secondo cui Azzorre, Madeira, Capo Verde e Canarie costituiscono quattro *clusters* geneticamente distinti. Il secondo raggruppamento, di colore verde (Fig. 5), è distribuito prevalentemente nella porzione più orientale del *range* della specie sebbene sia presente anche ad occidente (e.g., Madeira). Infine, il raggruppamento genetico di colore giallo è quello con minor frequenza, e la sua presenza a Capo Verde, unica nell'intera Macaronesia, sembra indicare un certo grado di divergenza dell'arcipelago africano. A dispetto della dispersione dei tre *clusters* sopra menzionati, la partizione della variabilità genetica tra le popolazioni è altamente significativa ( $\varphi_{ST} = 0,25$  e  $P < 0,001$ ) e, pertanto, indica l'esistenza di un non trascurabile livello differenziamento ancorché geograficamente disgregato attraverso l'intero areale della specie.

I dati raccolti sottolineano la necessità di piani di gestione del fratino ad ampia scala geografica non essendo al momento possibile individuare popolazioni chiaramente disgiunte. Tale risultato è in linea con la capacità del fratino di compiere tentativi di nidificazione in siti ubicati anche a grande distanza tra loro durante la stessa stagione riproduttiva e con *partners* differenti (Lessells, 1984; Székely & Lessells, 1993). Tuttavia, è verosimi-

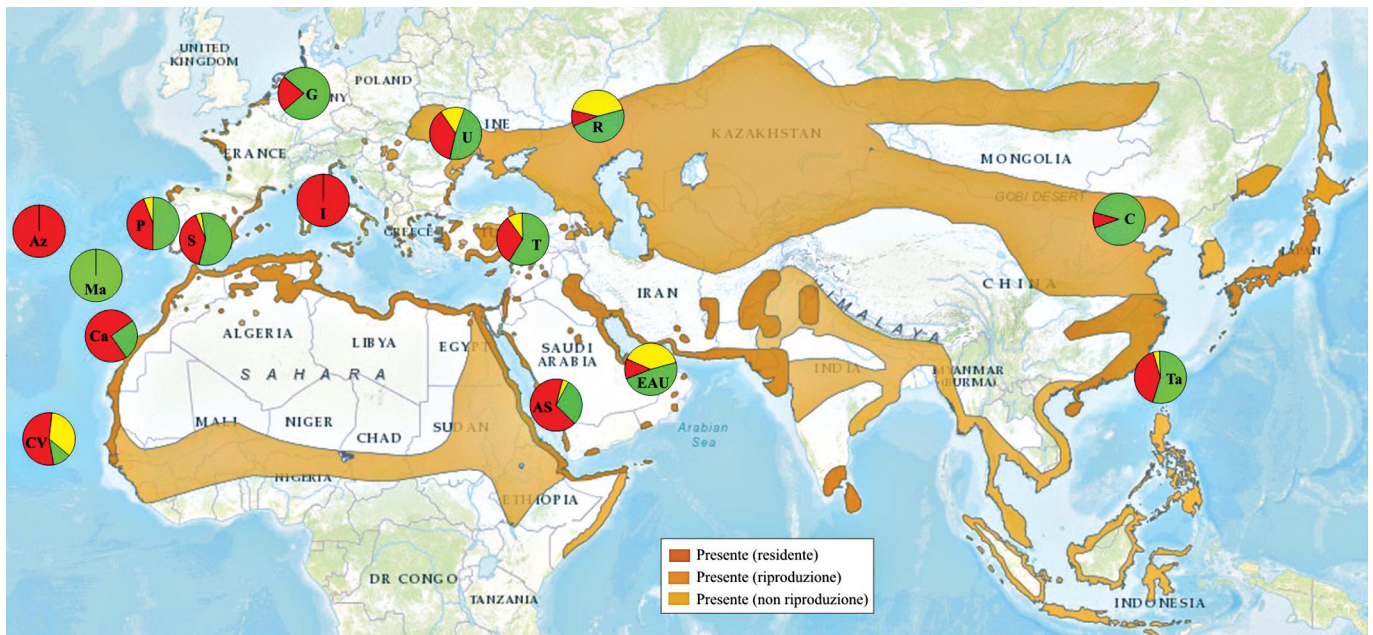


Fig. 5 - La struttura spaziale genetica del fratino - inferita con BAPS in base ad un'analisi di gruppi di tipo bayesiano - è riportata sovrapposta alla carta di distribuzione della specie mediante un grafico a torta con segmenti proporzionali all'appartenenza stimata ai  $K$  gruppi (gruppo 1, rosso; gruppo 2, giallo; gruppo 3, verde). I codici riportati in ciascuna torta del grafico si riferiscono alle popolazioni elencate nella Tab. 1. / The Kenstish Plover's spatial genetic structure – inferred with BAPS according to a Bayesian clustering analysis – is given by means of a pie chart with segments proportional to the estimated membership to the  $K$  clusters (cluster 1, red; cluster 2, yellow; cluster 3, green) and using a map with the species' range. The codes reported in each pie of the graph refer to the populations listed in Tab. 1.

le che nel breve volgere di qualche anno si renderanno disponibili informazioni più dettagliate circa il grado di connessione tra fradini nidificanti in aree diverse grazie all'impiego di marcatori molecolari di tipo genomico. La necessità di queste informazioni è particolarmente sentita in Italia dove la specie fa registrare tassi di successo riproduttivo molto variabili nel tempo e soprattutto nello spazio (Biondi & Pietrelli, 2011; Pietrelli & Biondi, 2012; Puglisi, 2015; Mitri *et al.*, 2019), suggerendo che la dinamica della popolazione sia sostenuta principalmente dalla produttività in aree sorgente cui dovrebbero essere prioritariamente indirizzati gli sforzi di conservazione, rimuovendo o mitigando successivamente i fattori limitanti che operano negli altri siti.

### Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare Enrico Meschini e i numerosi volontari del COT impegnati nelle attività di monitoraggio e ricerca sul fradino in Toscana, la Tenuta San Guido di Bolgheri, ed in particolare il Direttore Generale dott. Carlo Paoli, per la costante azione di monitoraggio naturalistico condotta nella ZSC Rifugio Faunistico Padule di Bolgheri, e l'Amministrazione Comunale di Castagneto Carducci - Ufficio Ambiente per aver reso possibile la tutela dei siti di nidificazione del fradino tramite azioni mirate condotte dal COT. Gli autori sono infine grati ai revisori per i significativi miglioramenti apportati al testo ed alla struttura complessiva del lavoro.

### BIBLIOGRAFIA

- Almalki M., Kupán K., Carmona-Isunza M. C., López P., Veiga A., Kosztolányi A., Székely T. & Küpper C., 2017 – Morphological and genetic differentiation among Kentish Plover *Charadrius alexandrinus* populations in Macaronesia. *Ardeola*, 64: 3-16.
- Avise J. C., Neigel J. E. & Arnold J., 1984 – Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20: 99-105.
- Bandelt H. J., Forster P. & Röhl A., 1999 – Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Barbanera F., Forcina G., Cappello A., Guerrini M., van Grouw H. & Aebischer N. J., 2015 – Introductions over introductions: the genomic adulteration of an early genetically valuable alien species in the United Kingdom. *Biological Invasions*, 17: 409-422.
- Biondi M. & Pietrelli L. (eds.), 2011 – Il Fradino: status, biologia e conservazione di una specie minacciata. In: Atti del convegno nazionale, Bracciano (RM), 18 settembre 2010. *Edizioni Belvedere*, Latina.
- Bricchetti P. & Fracasso G., 2004 – Ornitologia italiana. Vol. 2. Tetraonidae-Scolopacidae. *Alberto Perdisa Editore*, Bologna.
- Cheng L., Connor T. R., Sirén J., Aanensen D. M. & Corander J., 2013 – Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 1224-1228.
- Cimiotti D. V. & Hoetker H., 2013 – Conservation of Kentish Plovers in NW Europe: results of a workshop in N Germany. *Wader Study Group Bulletin*, 120: 218-221.
- Comitato Nazionale per la Conservazione del Fradino, Biondi M., Carusi F., Farioli A., Fulco E., Giannotti M., Gustin M., Guzzon C., Liuzzi C., Lucchese L., Mencarelli M., Meschini E., Morici F., Pietrelli L., Puglisi L., Sartori A., Spinella G., Storino P., Tinarelli R., Todisco S. & Utmar P. (eds.), 2019 – Censimento nazionale della popolazione nidificante di fradino: aggiornamento al 2018 e considerazioni preliminari. In: XX Convegno italiano di ornitologia. Libro degli abstract. Napoli, 26-29 settembre 2019. Balestrieri R. & Bazzi G. (a cura di). *Doppiavoce*, Napoli: 46.
- Corander J. & Marttinen P., 2006 – Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Molecular Ecology*, 15: 2833-2843.
- Crandall K. A. & Templeton A. R., 1993 – Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134: 959-969.
- del Hoyo J., Wiersma P., Kirwan G. M., Collar N., Boesman P. F. D. & Sharpe C. J., 2021 – Kentish Plover (*Charadrius alexandrinus*), version 1.1. In: Birds of the World (B. K. Keeney, Editor). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. <<https://doi.org/10.2173/bow.kenplo1.01.1>>
- Excoffier L., 2004 – Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13: 853-864.
- Excoffier L. & Lischer H. E. L., 2010 – Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource*, 10: 564-567.
- Feng S., Stiller J., Deng Y., Armstrong J., Fang Q., Reeve A. H., Xie D., Chen G., Guo C., Faircloth B. C., Petersen B., Wang Z., Zhou Q., Diekhans M., Chen W., Andreu-Sánchez S., Margaryan A., Travis Howard J., Parent C., Pacheco G., Sinding M.-H. S., Puetz L., Cavill E., Ribeiro A. M., Eckhart L., Fjeldsà J., Hosner P. A., Brumfield R. T., Christidis L., Bertelsen M. F., Sicheritz-Ponten T., Thomas Tietze D., Robertson B. C., Song G., Borgia G., Claramunt S., Lovette I. J., Cowen S. J., Njoroge P., Dumbacher J. P., Ryder O. A., Fuchs J., Bunce M., Burt D. W., Cracraft J., Meng G., Hackett S. J., Ryan P. G., Jønsson K. A., Jamieson I. G., da Fonseca R. R., Braun E. L., Houde P., Mirarab S., Suh A., Hansson B., Ponnikas S., Sigeman H., Stervander M., Frandsen P. B., van der Zwan H., van der Sluis R., Visser C., Balakrishnan C. N., Clark A. G., Fitzpatrick J. W., Bowman R., Chen N., Cloutier A., Sackton T. B., Edwards S. V., Foote D. J., Shakya S. B., Sheldon F. H., Vignal A., Soares A. E. R., Shapiro B., González-Solís J., Ferrer-Obiol J., Rozas J., Riutort M., Tigano A., Friesen V., Dalén L., Urrutia A. O., Székely T., Liu Y., Campana M. G., Corvelo A., Fleischer R. C., Rutherford K. M., Gemmel N. J., Dussex N., Mouritsen H., Thiele N., Delmore K., Liedvogel M., Franke A., Hoepfner M. P., Krone O.,

- Fudickar A. M., Milá B., Ketterson E. D., Fidler A. E., Friis G., Parody-Merino Á. M., Battley P. F., Cox M. P., Costa Barroso Lima N., Prosdociami F., Lee Parchman T., Schlinger B. A., Loisel B. A., Blake J. G., Chuan Lim H., Day L. B., Fuxjager M. J., Baldwin M. W., Braun M. J., Wirthlin M., Dikow R. B., Brandt Ryder T., Camenisch G., Keller L. F., DaCosta J. M., Hauber M. E., Louder M. I. M., Witt C. C., McGuire J. A., Mudge J., Megna L. C., Carling M. D., Wang B., Taylor S. A., Del-Rio G., Aleixo A., Ribeiro Vasconcelos A. T., Mello C. V., Weir J. T., Haussler D., Li Q., Yang H., Wang J., Lei F., Rahbek C., Gilbert M. T. P., Graves G. R., Jarvis E. D., Paten B. & Zhang G., 2020 – Dense sampling of bird diversity increases power of comparative genomics. *Nature*, 587: 252-257.
- Fu Y. X., 1997 – Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Funk W. C., Mullins T. D. & Haig S. M., 2007 – Conservation genetics of snowy plovers (*Charadrius alexandrinus*) in the Western Hemisphere: population genetic structure and delineation of subspecies. *Conservation genetics*, 8: 1287-1309.
- Gómez-Serrano M. Á., 2021 – Four-legged foes: dogs disturb nesting plovers more than people do on tourist beaches. *Ibis*, 163: 338-352.
- Grant W. S. & Bowen B.W., 1998 – Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89: 415-426.
- Gustin M., Nardelli R., Bricchetti P., Battistoni A., Rondinini C. & Teofili C., 2019 – Lista Rossa IUCN degli uccelli nidificanti in Italia 2019. *Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare*, Roma.
- Harpending H. C., Sherry S. T., Rogers A. R. & Stoneking M., 1993 – Genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology*, 34: 483-496.
- Hortas F., Amat J. A. & Figuerola J., 2013 – Chorlitejo patinegro *Charadrius alexandrinus*. In: Atlas de las aves en invierno en España 2007-2010. J. C. del Moral, B. Molina, A. Bermejo & D. Palomino (eds). *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente-SEO/BirdLife*: 234-235.
- Küpper C., Edwards S. V., Kosztolányi A., Alrashidi M., Burke T., Herrmann P., Arguelles-Tico A., Amat U. A., Amezian M., Rocha A., Hötter H., Ivanov A., Chernicko J. & Székely T., 2012 – High gene flow on a continental scale in the polyandrous Kentish plover *Charadrius alexandrinus*. *Molecular Ecology*, 21: 5864-5879.
- Lessells C. M., 1984 – The mating system of Kentish Plovers *Charadrius alexandrinus*. *Ibis*, 126 (4): 474-483.
- Mitri M. G., Borgo A., Antinori E., Castelli S., Scarpa M., Bonotto L. & Cesarotto C. 2019 – Allarmante situazione del Fratino *Charadrius alexandrinus* sul litorale veneziano: l'emblematico caso dell'area di San Nicolò nel SIC/ZPS "Lido di Venezia: biotopi litoranei". *Bollettino del Museo civico di Storia Naturale di Venezia*, 69: 148-54.
- Pietrelli L. & Biondi M., 2012 – Long term reproduction data of Kentish Plover *Charadrius alexandrinus* along a Mediterranean coast. *Wader Study Group Bulletin*, 119 (2): 114-119.
- Pilkington M. M., Wilder J. A., Mendez F. L., Cox M. P., Woerner A., Angui T., Kingan S., Mobasher Z., Batini C., Destro-Bisol G., Soodyall S., Strassmann B. I. & Hammer M. F., 2008 – Contrasting signatures of population growth for mitochondrial DNA and Y chromosomes among human populations in Africa. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 517-525.
- Puglisi L., 2015 – La nidificazione del Fratino *Charadrius alexandrinus* su un litorale soggetto a diverse forme di gestione. *Picus*, 41: 96-104.
- Puglisi L. & Meschini E., 2016 – Situazione critica per il Fratino *Charadrius alexandrinus* nidificante in Toscana. *Picus*, 42: 137-141.
- Rheindt F. E., Székely T., Edwards S. V., Lee P. L., Burke T., Kennerley P. R., Bakewell D. N., Alrashidi M., Kosztolányi A., Weston M. A., Liu W. T., Lei W. P., Shigeta Y., Javed S., Zefania S. & Küpper C., 2011 – Conflict between Genetic and Phenotypic Differentiation: The Evolutionary History of a 'Lost and Rediscovered' Shorebird. *PLoS ONE*, 6: e26995.
- Rogers A. R. & Harpending H., 1992 – Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-569.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E. & Sánchez-Gracia A., 2017 – DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34: 3299-3302.
- Schneider S. & L. Excoffier L., 1999 – Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079-1089.
- Spina F. & Volponi S., 2008 – Atlante della Migrazione degli Uccelli in Italia. 1. non-Passeriformi. *Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale*.
- Székely T. & Lessells C. M., 1993 – Mate Change by Kentish Plovers *Charadrius alexandrinus*. *Ornis Scandinavica (Scandinavian Journal of Ornithology)*, 24: 317-322.
- Tajima F., 1989 – Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D. G., 1997 – The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
- Vidal M., Hernández M.A., Luis A. & Domínguez J., 2014 – Lack of genetic structure in Kentish Plover *Charadrius alexandrinus* from the Iberian coast. What's wrong with the endangered north-western population? *Bird Conservation International*, 25: 153-165.

- Wenink P. W, Baker A. J. & Tilanus M. G., 1994 – Mitochondrial control-region sequences in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 22-31.
- Wright S., 1951 – The genetical structure of populations. *Annals Eugenics*, 15: 323-354.

#### **INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI / SUPPORTING INFORMATION**

Per questo articolo sono disponibili informazioni supplementari online. / Additional supporting information may be found online for this article.

Video S1 - Fratino al nido ripreso il giorno 28 aprile 2020 sull'arenile di Bolgheri battuto da forti venti di ponente-libeccio. / Kentish Plover at the nest filmed on April 28 (2020) on the Bolgheri beach while beaten by strong west and south-west winds. (Video: Paolo M. Politi).

Table S1 - Coefficiente di assegnazione (*admixture coefficient*, in BAPS) a ciascuno dei tre *clusters* per ogni individuo e per le 15 popolazioni incluse nello studio (*cluster 1*, rosso; *cluster 2*, giallo; *cluster 3*, verde; cf., Fig. 5). / Admixture coefficient as computed in BAPS for the assignment of both each individual and the 15 populations of the study to each of three inferred clusters (cluster 1, red; cluster 2, yellow; cluster 3, green; cf., Fig. 5).