

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA
IN BIOLOGIA AVANZATA
INDIRIZZO BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
XIX CICLO (2003-2006)

ISOLAMENTO, MICROEVOLUZIONE E FILOGEOGRAFIA
IN *PODARCIS SICULA* (RAFINESQUE-SCHMALTZ, 1810)

DOTT.SSA SERENA GUGLIELMI

Tutore
Ch.mo prof.
Rakesh Kumar RASTOGI

Co-tutore
Ch.mo prof.
Gaetano ODIERNA

Coordinatore
Ch.ma prof.ssa
Silvana FILOSA



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA
IN BIOLOGIA AVANZATA
INDIRIZZO BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA
XIX CICLO (2003-2006)

ISOLAMENTO, MICROEVOLUZIONE E FILOGEOGRAFIA
IN *PODARCIS SICULA* (RAFINESQUE-SCHMALTZ, 1810)

DOTT.SSA SERENA GUGLIELMI

Tutore
Ch.mo prof.
Rakesh Kumar RASTOGI

Coordinatore
Ch.ma prof.ssa
Silvana FILOSA

Co-tutore
Ch.mo prof.
Gaetano ODIERNA

*Ai tre anni trascorsi,
dal primo all'ultimo giorno*

PREMESSA	3
I SEZIONE I	7
I.1 INTRODUZIONE	7
I.1.1 <i>L'insularità</i>	7
I.1.2 <i>Variabilità nei Lacertidi insulari</i>	11
I.1.3 <i>La specie modello di studio</i>	18
I.1.3.1 Inquadramento sistematico e descrittivo	18
I.1.3.2 <i>Podarcis sicula</i>	18
I.1.3.3 Caratteristiche biologiche ed ecologiche	19
I.1.3.4 Distribuzione	21
I.1.3.5 Genere, specie e sottospecie in <i>P. sicula</i> : un percorso complesso	24
I.1.3.6 Aspetti di conservazione e status normativo	31
I.1.4 <i>Obiettivo</i>	33
I.2 AREA DI STUDIO	34
I.3 CRITERI METODOLOGICI	40
I.3.1 <i>Filogeografia</i>	40
I.3.2 <i>Coalescenza</i>	40
I.4 METODOLOGIE	43
I.4.1 <i>Acquisizione dei dati</i>	43
I.4.1.1 Campionamento	43
I.4.1.2 Analisi morfologiche	44
I.4.1.3 Analisi molecolari	50
I.4.2 <i>Elaborazioni</i>	63
I.4.2.1 Trattamento dei dati morfometrici e cromatici	63
I.4.2.2 Trattamento dei dati genetici	64
I.5 RISULTATI	69
I.5.1 <i>Formalizzazione delle variazioni</i>	69
I.5.1.1 Morfologia e cromatismi	69
I.5.1.2 Mitocondriale e microsatelliti	76
I.5.2 <i>Genesi dell'isola di Licosia</i>	81
II SEZIONE II	87
II.1 INTRODUZIONE	87
II.1.1 <i>Il paesaggio</i>	87
II.1.2 <i>Complessità e frammentazione</i>	88
II.1.3 <i>Le isole paesaggistiche</i>	90
II.1.4 <i>Barriere ecologiche ed evoluzione</i>	92
II.1.5 <i>Lo spazio multidimensionale della specie: la nicchia ecologica</i>	94
II.1.6 <i>Obiettivo</i>	96

II.2	AREA DI STUDIO -----	97
II.3	CRITERI METODOLOGICI -----	99
II.3.1	<i>Landscape genetics</i> -----	99
II.3.2	<i>Modelli ecologici</i> -----	100
II.4	METODOLOGIE -----	102
II.4.1	<i>Acquisizione dei dati</i> -----	102
II.4.1.1	Analisi paesaggistiche -----	102
II.4.2	<i>Elaborazioni</i> -----	103
II.4.2.1	Trattamento dei dati morfologici e molecolari -----	103
II.4.2.2	Trattamento dei dati paesaggistici -----	105
II.5	RISULTATI -----	116
II.5.1	<i>Formalizzazione delle variazioni</i> -----	116
II.5.1.1	Morfologia e cromatismi -----	116
II.5.1.2	Mitocondriale e microsatellite -----	119
II.5.2	<i>Analisi dell'isola continentale</i> -----	124
III	DISCUSSIONE -----	135
IV	CONCLUSIONI -----	141
	BIBLIOGRAFIA -----	143

PREMESSA

Il progetto portato a termine durante i tre anni di ricerca, nel suo complesso ha affrontato alcuni aspetti del fenomeno dell'isolamento in popolazioni naturali.

Sono infatti numerose le constatazioni delle divergenze fenotipiche e genetiche in popolazioni naturali insulari, evidentemente guidate da forze microevolutive. In particolar modo, si riscontra a livello internazionale che un gruppo che, per sue caratteristiche intrinseche, mostra particolare tendenza alle variazioni in condizioni isolate è quello dei Lacertidae; infatti, questa famiglia risulta spesso essere oggetto di ricerca di molti gruppi in tutto il mondo. In Italia una specie che esprime in maniera particolarmente evidente una elevata variabilità, anche e soprattutto in condizioni d'insularità, è rappresentata da *Podarcis sicula*; così la specie è stata scelta come modello per lo studio delle modalità di espressione dei fenomeni di differenziamento, delle origini causali della variabilità, in termini filogeografici e dunque dispersivi o in termini di selettività/adattamento, in condizioni di isolamento.

La problematica è stata fondamentalmente condotta attraverso l'analisi della distribuzione della variabilità fenotipica e genetica in tre popolazioni di lucertola che vivono su tre piccole isole: Licosia (in Campania), Cirella (in Calabria) ed Ustica (in Sicilia). Le tre isole, di diversa origine geologica, rappresentano tre condizioni sperimentali differenti ed inoltre ospitano tre popolazioni che esprimono tre modalità di variabilità diverse. Per formalizzare queste modalità sono stati condotti dei confronti tra le caratteristiche fenotipiche e genetiche delle tre popolazioni e di ciascuna con la popolazione della terraferma immediatamente prospiciente l'isola: l'analisi multivariata dei parametri morfometrici e fenotipici, quindi, ha riconosciuto differenze dimensionali solo a carico della popolazione di Ustica rispetto alla popolazione di Palermo e differenze cromatiche solo a carico della popolazione di Licosia rispetto alla popolazione di Punta Licosia. La

popolazione di Cirella sembra essere fenotipicamente sovrapponibile alle popolazioni continentali. E' stata, poi, approfondita la storia evolutiva della popolazione dell'Isola di Licoso, l'unica delle tre ad evidenziare tracce di una storia evolutiva particolare, l'unica delle tre ad essere riconosciuta come sottospecie *P. s. klemmeri* e l'unica delle tre ad esprimere un carattere differenziativo particolare, il melanismo. In effetti, questo fenomeno è stato rilevato in diverse popolazioni insulari della lucertola campestre, dalla sottospecie *P. s. coerulea* del Faraglione di Mezzo a Capri, alla *P. s. medemi* di Isola Bella a Catania, anche se la variazione di colore, concentrata particolarmente sul ventre degli animali, nei diversi casi registrati si indirizza verso colori e tonalità disparate.

Per la popolazione di Licoso è stata identificata, mediante l'integrazione di tecniche di analisi molecolare inferenziale classica e bayesiana, la popolazione madre con un certo grado di certezza in quella del promontorio di Punta Licoso. Attraverso analisi di coalescenza e sull'informazione del DNA mitocondriale, è stata constatata una discrepanza tra i tempi di divergenza genica e di divergenza popolazionistica, corrispondenti rispettivamente a circa 14.000 e 12.600 anni fa. Inoltre, in collaborazione con il dipartimento di Geologia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" si è cercato di collocare questi eventi rispetto al paesaggio dell'epoca della divergenza e rispetto alla nascita dell'isola: ai tempi della divergenza genica e popolazionistica una grande pianura circondava la piccola collinetta che oggi costituisce l'isola di Licoso. La nascita dell'isola è stata fatta risalire a 4.500 anni fa, grazie alle informazioni geologiche di trasgressione marina e ai reperti fossili rinvenuti nelle grotte di Capo Palinuro, a pochi chilometri dall'area di studio. Considerando questi due risultati, la constatazione della esistenza di un processo microevolutivo di differenziamento genetico, che non coincide con i tempi geologici di separazione della piccola isola dalla terraferma, ha indotto nuovi interrogativi e dunque nuovi obiettivi per la ricerca. In effetti questo risultato indicherebbe che qualche forma di differenziamento, che ha portato alle due diverse popolazioni odierne, l'una dal ventre bianco "normotipo", l'altra dal ventre blu melanico, possa essere spiegata solo con l'ausilio di due

ipotesi: la prima vedrebbe la popolazione di Licosia, isolata effettivamente solo a causa dell'evento geologico, soggetta ad un tasso evolutivo molto più alto rispetto al riferimento (mtDNA), l'altra presupporrebbe l'esistenza di qualche barriera diversa dal mare, che agiva già in tempi antecedenti la separazione geologica dell'isola. L'ammissione della prima ipotesi conduce a tarare più accuratamente il tasso evolutivo del DNA mitocondriale della popolazione in esame che risulterebbe notevolmente più elevato del riferimento. Una verifica della seconda ipotesi, invece, conduce verso l'analisi delle possibili barriere esistenti in un paesaggio complesso, responsabili di un isolamento paesaggistico.

Recenti studi hanno evidenziato l'esistenza di una popolazione continentale melanica, a Roscigno, nella zona montuosa del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. Le caratteristiche fenotipiche, legate al melanismo degli individui e sovrapponibili a quelle della popolazione di Licosia, rendono questa popolazione continentale interessante per l'approfondimento delle dinamiche evolutive e dell'individuazione di barriere, in condizione di "non-insularità": si è supposto, quindi, che si fosse verificata una condizione di isolamento anche nell'entroterra cilentano, che abbia indotto un differenziamento verso forme melaniche. Tale condizione di isolamento è stata accertata mediante strumenti di analisi paesaggistica in ambiente GIS: in particolare mediante l'ENFA è stato costruito un modello d'idoneità ambientale per la specie sulla base di alcuni parametri della sua nicchia ecologica i cui valori ottimali vengono dedotti direttamente dalla presenza delle lucertole nelle diverse tipologie ambientali del paesaggio considerato. Tale modello ha riconosciuto le aree circostanti il sito di studio come zone a bassa idoneità per la specie, individuando così un'isola "paesaggistica".

Contemporaneamente, inoltre, è stato condotto anche un confronto dei profili morfologico e genetico con la popolazione insulare di Licosia: la popolazione di Roscigno effettivamente ha risposto alle analisi genetiche in maniera analoga alla popolazione di Licosia, evidenziando l'esistenza di una barriera allo scambio genico con le popolazioni confinanti. E' stata in tal modo accertata l'importanza delle componenti paesaggistiche nel determinare effetti

sulla dinamica delle popolazioni e sulla loro connettività (Hanski & Ovaskainen, 2000): microevoluzione e paesaggio sembrano essere entrambi coinvolti nelle modalità di variazione espresse dalle popolazioni naturali.

Il percorso di ricerca viene descritto nella tesi in due sezioni principali che trattano separatamente l'indagine nelle isole marine e l'indagine nell'isola continentale, dal momento che i due obiettivi sono stati progressivi e sequenziali durante i tre anni di ricerca.

Nonostante sia stato recentemente sostenuto (Böhme, 1997; 1998) che il genere *Podarcis* sia maschile, la questione resta ancora aperta in quanto alcuni autori (Lanza & Boscherini, 2000; Arnold, 2000) ritengono di dover considerare il genere come femminile. Nelle recenti pubblicazioni di riferimento (Sindaco *et al.*, 2006) gli epiteti specifici e sottospecifici continuano a mantenere la desinenza al femminile, per cui in questa ricerca si è preferito mantenere la dizione tradizionale, in attesa di un definitivo chiarimento.

SEZIONE I

I.1 Introduzione

L'evoluzione, il motore della vita e della sua diversificazione sul nostro pianeta, è un processo che agisce su larga scala sia spaziale che temporale: ciò impone una serie di difficoltà alle molteplici discipline empiriche che tentano esperimenti di campo a scala naturale, per studiare i processi alla base dell'evoluzione.

Non bisogna dimenticare, comunque, che tutti i grandi processi evolutivi e i più grandi *pattern* biogeografici che ne derivano sono mediati da processi a scala ridotta, anche a livello di popolazione.

Le isole rappresentano uno scenario d'indagine sull'evoluzione per molti studi, già dai tempi della famosa associazione tra la teoria dell'evoluzione di Darwin ed i fringuelli delle isole Galapagos (Darwin, 1859).

I.1.1 L'insularità

I sistemi insulari risultano interessanti soprattutto per diverse ragioni: a) si presentano come entità geografiche discrete con confini ben definiti; b) le loro dimensioni spesso ridotte rendono gli studi più facili di quelli nei sistemi continentali; c) nonostante le loro dimensioni spesso, appunto, ridotte possono contenere una notevole diversità di habitat; d) il flusso genico tra le singole isole o tra un'isola e la terraferma è ridotto dalla barriera rappresentata dal mare; e) spesso sono molto dinamiche geologicamente per attività erosionale e vulcanica, sia storica che contemporanea (Emerson, 2002).

Quando Mac Arthur e Wilson (1967) proposero la loro teoria dell'equilibrio della biogeografia insulare, l'obiettivo principale era soprattutto la comprensione dei *pattern* di ricchezza in specie come funzione

dell'area dell'isola e della sua distanza dalla costa. Successive ricerche ampliarono il fuoco rivolgendosi allo studio di altre proprietà delle isole, quali tipologie di habitat ed elevazione; ma il centro delle ricerche rimaneva pur sempre focalizzato sulla ricchezza delle specie o altre caratteristiche di comunità (Diamond & Mayr, 1976; Rosenzweig, 1995; Ricklefs & Bermingham, 2004; Lomolino *et al.*, 2005). La maggior parte degli approcci sperimentali alla biogeografia insulare, dunque, si è concentrata interamente sulla comunità piuttosto che sugli aspetti popolazionistici (Shoener, 1988; Shoener *et al.*, 2005), spesso senza considerare neanche che questi ultimi possano costituire elementi centrali della comunità stessa e della biogeografia insulare stessa (Thorpe, 2005).

Da molti studi di tal genere e dalla stessa teoria biogeografica insulare di Mac Arthur e Wilson (1967) si evince notoriamente che la ricchezza di specie insulari è inferiore a quella di una corrispondente superficie continentale. A dispetto di ciò, diversi studi di analisi e catalogazione di flora e fauna delle isole hanno riscontrato un'elevata diversità specifica, di cui gli Autori non sono riusciti a definire le origini, in termini geografici e causali. Ricostruzioni filogenetiche tra i gruppi di specie potrebbero aiutare in tal senso (Emerson, 2002). Questo approccio, inoltre, può aiutare anche a discriminare tra i processi ritenuti probabili responsabili: sicuramente può intervenire la diversificazione di una popolazione fondatrice in un sistema di specie differentemente adattate alle varie nicchie secondo un processo di radiazione adattativa o a causa di eventi vicarianti quali processi erosionali o flusso lavico. Non va comunque trascurato l'effetto di eventuali multiple colonizzazioni dai territori circostanti, ma in un sistema piuttosto chiuso, qual è quello insulare, in cui gli scambi con altre popolazioni sono certamente ridotti, pare che la velocità di diversificazione può essere tanto alta da superare gli effetti degli scambi (Begon *et al.*, 1997).

Al livello eco-etologico, esistono una serie di effetti dell'insularità sulle popolazioni oramai codificati in ecologia: si assiste spesso all'"inflazione della densità", un aumento della dimensione della popolazione, all'allargamento della nicchia ecologica, per cui la specie occupa e sfrutta anche microhabitat

diversi rispetto allo spettro ecologico normale. Si registrano ancora alterazioni dei comportamenti territoriali e dell'aggressività, soprattutto a carico di Rettili e di Mammiferi, con effetti quali: riduzione della superficie territoriale individuale, aumento della sovrapposizione di tali aree, maggiore tolleranza degli individui subordinati e abbandono della difesa del territorio. L' "ipotesi della difesa" (Stamps & Bauchner, 1985) suggerisce che l'insieme di tali modificazioni dipenda dall'equilibrio tra i costi di difesa e di riproduzione: gli individui beneficerebbero dallo spendere meno in difesa territoriale, per produrre anche meno prole, purché sia più competitiva. Un'altro processo che investe notoriamente la fauna insulare è la modificazione delle dimensioni corporee: la regola di van Valen (1973) conduce all'uniformità nelle misure sulle isole, per cui specie più grandi tenderebbero al nanismo e viceversa. Famosi esempi sono rappresentati dagli ippopotami e dagli elefanti che abitavano le isole del Mediterraneo prima che l'uomo li sterminasse.

A scala popolazionistica, bisogna considerare che la colonizzazione comporta il confronto con un insieme di fattori ambientali biotici e abiotici del tutto nuovi per gli individui colonizzatori; a ciò va aggiunto il differente *background* genetico che li caratterizza, rispetto alla popolazione di provenienza, in quanto sicuramente ridotto in variabilità (Blondel, 2005). Spesso, però, le condizioni ambientali sono tali da favorire lo sviluppo demografico della popolazione (Hendry & Kinnison, 2001). Una colonizzazione seguita dall'opportunità di crescere rappresenta una condizione che favorisce un rapido cambiamento adattativo (Reznick & Ghalambor, 2001), che può avere basi genetiche (Merilla *et al.*, 2001). In altre parole, in tali condizioni agisce la cosiddetta microevoluzione: attraverso un insieme di processi evolutivi questa conduce a cambiamenti entro e tra le popolazioni in un breve tempo (Mayr, 1942; Simpson, 1944). I processi evolutivi che agiscono su queste popolazioni sono costituiti, in linea generale, da forze come selezione naturale e sessuale, mutazioni, deriva genetica e flusso genico. Gli effetti di tali processi sono visibili anche in poche generazioni (Hendry & Kinnison, 2001). Per di più Gingerich (2001) ha mostrato che l'evoluzione può agire in tempi brevissimi se la stabilità del sistema è interrotta da repentini

cambiamenti non intervallati da periodi lunghi di stasi, come accade, per esempio, nei casi di isole ad elevata attività vulcanica.

La variabilità ridotta dei colonizzatori comporta a livello microevolutivo l'effetto del fondatore (Mayr, 1963), un processo secondo cui ha origine un'intera popolazione a partire da pochi individui che presentano un *pool* genico costituito da pochi alleli per ciascun gene. Di conseguenza anche la popolazione derivante presenterà una variabilità genetica ridotta e dunque un ridotto potenziale evolutivo (Frankham, 1997), finché non intervengono altri processi adattativi.

Le condizioni intrinseche del sistema, inoltre, generano un elevato rischio di accoppiamenti tra consanguinei e dunque di *inbreeding*, in una condizione di ridotto flusso genico con altre popolazioni.

La limitata variabilità che spesso caratterizza le popolazioni insulari è, dunque, l'effetto netto dell'azione di diversi processi microevolutivi: una riduzione al momento della colonizzazione, una dimensione effettiva della popolazione ridotta, gli eventuali incrementi di variabilità dovuti a secondarie immigrazioni e le nuove mutazioni (Jaenike, 1973). La selezione naturale influenza ulteriormente la variabilità genetica: la selezione per un allele favorevole, per esempio, aumenta il tasso di riduzione di variabilità, mentre il vantaggio dell'eterozigote lo rallenta (Frankham, 1997).

Le nuove condizioni ecologiche e genetiche, quindi, portano ad una pressione di selezione che inevitabilmente induce la popolazione colonizzatrice a divergere dalla popolazione madre. La divergenza e la sua velocità di insorgenza sono inversamente proporzionali al numero dei fondatori, alla differenza di dimensioni tra le due popolazioni e dipendono direttamente dal tasso d'immigrazione. Anche le caratteristiche dell'isola, quali la dimensione e la distanza dalla costa, ovviamente influiscono sui processi di differenziazione (Frankham, 1997).

La divergenza tra le due popolazioni può portare eventualmente alla speciazione se si verifica un isolamento riproduttivo prima dell'arrivo di altri individui dalla popolazione di origine. E' stato dimostrato, in effetti, in ecosistemi insulari un aumento del tasso di speciazione (Losos & Shluter,

2000), che avviene attraverso processi di collo di bottiglia e di effetto del fondatore (Templeton, 1980; Carson & Templeton, 1984). Questi processi sono i responsabili degli elevati tassi di endemismi sulle isole (Orians, 1997). I tassi di divergenza genetica sono inversamente proporzionali alla distanza tra la terraferma e l'isola; di conseguenza, i tassi di endemismi sono più alti sulle isole remote. Intuitivamente si capisce anche che il numero di endemismi è minore per i *taxon* con elevata attitudine alla dispersione; di conseguenza, si registrano tassi maggiori in animali meno mobili come Rettili, Anfibi, Mammiferi non volatori, piuttosto che in Uccelli e chiroteri. Ad ogni modo sono più alti i tassi di endemismo nelle piante che nei vertebrati delle isole (Blondel, 2005).

Il quadro di processi descritti chiarisce anche la suscettibilità delle popolazioni insulari. Le cause di questa vulnerabilità sono svariate, ma certamente sono predette su base genetica (Frankham, 1995) e tra i fattori genetici che possono contribuire a determinare gli elevati tassi di estinzione si rinvengono la depressione da inincrocio, la perdita della variabilità genetica, l'accumulo di mutazioni leggermente deleterie, l'adattamento genetico spinto alle condizioni ambientali (Frankham, 1997).

Gli studi sulle dinamiche evolutive delle popolazioni insulari possono fare riferimento a diverse specie: la famiglia dei Lacertidi ha rappresentato, per una parte consistente della letteratura, un modello di riferimento. Tra i Lacertidi delle nostre regioni, la specie *Podarcis sicula* evidenzia interessanti modalità di variazioni intraspecifica in ragione delle condizioni di isolamento. Per comprendere tali modalità di variazione è necessario condurre una indagine a livello di popolazione che coinvolga aspetti evolutivi ed ecologici.

I.1.2 Variabilità nei Lacertidi insulari

L'insieme dei fattori responsabili della differenziazione della fauna insulare si manifestano anche a scala finemente ridotta, come riportato da numerose recenti ricerche per molti *taxa* differenti. In particolare, nell'ambito dei Lacertidae è stato identificato un'insieme di modificazioni biometriche e

cromatiche in popolazioni insulari e microinsulari, per cui l'attività di ricerca in tal senso è molto prolifica, soprattutto al fine di determinare i motori evolutivi di tali variazioni.

Losos (1990), analizzando in un contesto filogenetico le differenze biometriche fra popolazioni di due specie di *Anolis* che vivono su diverse isole delle Antille, riscontrò un *pattern* di variazioni particolare: tali differenze esistono solo laddove si verificano condizioni di simpatria tra le due specie, in caso contrario la dimensione del corpo delle lucertole si mantiene su livelli intermedi. Tra i due possibili processi responsabili, il **dispiegamento dei caratteri**, secondo cui specie di simili dimensioni evolvono in direzioni differenti in simpatria e l'**assortimento delle dimensioni**, secondo cui solo specie di differenti taglie possono colonizzare con successo la stessa isola, l'autore ritiene responsabile il secondo processo. Diversamente, studi sulle dimensioni differenti per specie simpatriche di Scincidi (*Macroscincus* e *Mabuya*) nelle isole di Capo Verde (Carranza *et al.*, 2001), danno maggior credito al dispiegamento dei caratteri. Ricerche sulle spinte variazioni morfologiche tra lucertole del genere *Cnemidophorus* sulle isole del Mar di Cortez e sulla terraferma circostante attribuiscono le modificazioni ad una compartecipazione dei due processi (Radtkey *et al.*, 1997).

Anche *Podarcis sicula* ha manifestato di essere soggetta a variazioni biometriche in contesti ambientali insulari. In realtà la tendenza ad una differenziazione in tal senso riguarda anche le due sottospecie peninsulari e vede la *P. s. sicula*, centro-meridionale, di taglia maggiore rispetto alla *P. s. campestris*, centro-settentrionale (Podnar *et al.*, 2005). Il fenomeno, però, accentra particolare interesse quando si rivela tra la sottospecie nominale e qualcuna microinsulare, come è stato accertato nel contesto siciliano da Faraone (2001): le sottospecie *P. s. trischittai* e *liscabiancae* presentano dimensioni minori rispetto alla sottospecie nominale e generano *cluster* abbastanza separati in un'analisi discriminante, nonostante siano di dubbia validità tassonomica (Lo Valvo, 1998). Lasciando per un attimo da parte la sistematica, sembra che la popolazione insulare di Pantelleria mostri una certa tendenza al nanismo, mentre l'analisi discriminante ha nettamente differenziato

le popolazioni di Isola delle Femmine, a Palermo e delle Egadi, a Trapani, dalle popolazioni della Sicilia (Faraone, 2001).

Va in ogni caso considerato che recenti evidenze (Losos *et al.*, 1998) hanno mostrato lo sviluppo rapido di divergenze morfologiche in alcune popolazioni di lucertole del genere *Anolis*, a seguito della colonizzazione di nuove isole dei Caraibi; gli autori propongono la possibilità di una forma di adattamento plastico negli ambienti insulari e, quindi, sottolineano che la loro morfologia può essere molto ingannevole come unico carattere di riferimento in quanto è fortemente correlata ai parametri ambientali.

La tendenza al melanismo è un altro fenomeno comune a molti Rettili che vivono sulle piccole isole (Zunino & Zullini, 1995), associato alla variabilità della colorazione di fondo e del *pattern* con cui si presenta il disegno dorsale.

Le colorazioni giocano un ruolo importante nella storia evolutiva degli animali, in quanto veri e propri sistemi di comunicazione. Infatti, differenti modelli di colorazione sono stati associati a fenomeni quali scelta sessuale, mimetismo, difesa sia in pesci, uccelli e rane (Seehausen *et al.*, 1997; 1999; Summers *et al.*, 1999; Uy & Borgia, 2000); così come spesso la brillantezza di colori è fondamentale in quanto associata con la tossicità dell'organismo, agendo come un segnale aposemantico di avvertimento per i predatori (Servedio, 2000). Inoltre è stato osservato che l'uso di marcatori cromatici come segnali di aggressività, per esempio permette agli animali di evitare costi inutili di interazioni aggressive (Rohwer & Ewald, 1981; Marler & Moore, 1988; 1989) laddove essi riconoscano una maggiore capacità combattiva all'avversario e dunque la necessità di modificare il proprio comportamento (Parker, 1974; Enquist & Leimar, 1983). Poiché, però, il carattere informativo cromatico non è direttamente relazionato alla capacità combattiva, ne è stato anche riscontrato un uso ingannevole: gli individui possono segnalare un livello gerarchico più alto di quello reale (Krebs & Dawkins, 1983)!

Nelle specie caratterizzate da dicromismo sessuale, generalmente il maschio espone colori intensi o particolari caratteri cromatici (Cooper & Burns, 1987), utili al riconoscimento intersessuale. Al contrario le femmine presentano nella maggior parte dei casi una colorazione smorzata per

consentire il riconoscimento ed evitare reazioni aggressive inutili dei maschi. In alcune specie, le femmine possono sviluppare colorazioni intense durante la produzione di uova, per evitare ulteriori corteggiamenti (Cooper & Greenberg, 1992; Galán, 2000). Sembra interessante un altro tipo di “inganno” che viene attuato dai maschi giocando sui caratteri cromatici: alcuni individui possono assumere una colorazione smorzata, tipicamente femminile, per eludere l’aggressione di maschi dominanti ed in tal modo riescono anche ad attuare strategie di copulazione extra-coppia (Kodrick-Brown, 1998; Martin & Forsman, 1999; López *et al.*, 2003).

La manipolazione artificiale dei colori in alcuni Lacertidi ha fornito la prova che nell’identificazione sessuale è fondamentale il segnale visivo (Bauwens *et al.*, 1987; Cooper & Greenberg, 1992; Cuadrado, 2000) almeno a lunga distanza (López & Martin, 2001; López *et al.*, 2003; 2004). In particolare sembra che il ruolo di segnali sociali (Cooper & Greenberg, 1992), relativi a comportamenti riproduttivi e di competizione intrasessuale (Thompsn & Moore, 1991; Olsson, 1994; Zucker, 1994), sia legato principalmente ad un sistema di macchiatura percepibile nel *range* dell’ultravioletto (Thorpe & Murielle, 2000).

E’ noto che alla generazione del colore nei vertebrati ectodermici, quali i Rettili concorra sia l’azione dei pigmenti, quali carotenoidi, pteridine e melanina, sia quella dei cromatofori (Rosemblum *et al.*, 2003), che determinano la presenza dei colori strutturali sulla pelle degli animali (Fox, 1976). Tra questi superficialmente si trovano gli xantofori (Bagnara *et al.*, 1986), che generano colori gialli ed arancioni; negli strati progressivamente più interni si ritrovano gli iridofori, responsabili della riflessione e della diffusione di luce a bassa lunghezza d’onda (Quinn & Hews, 2003); infine, ancora più in profondità ci sono i melanofori (Morrison *et al.*, 1995). A differenza di quanto accade in Uccelli e Mammiferi, i melanofori dei Rettili producono solo eumelanina (Bagnara & Hadley, 1973); quindi il colore scuro del corpo è conseguenza della quantità di melanina depositata nei melanofori (Bagnara & Hadley, 1973; Morrison *et al.*, 1995). Le variazioni nella produzione e nella dispersione dei granuli di pigmento sono state riconosciute responsabili delle

variazioni del colore dorsale dei Rettili (Hadley, 1997).

I pigmenti assorbono in maniera selettiva la luce a differenti lunghezze d'onda, producendo così le diverse tonalità dei colori, mentre gli iridofori soprattutto contribuiscono alla colorazione della pelle producendo i colori strutturali (Alexander & Fahrenbach, 1969).

Cambiamenti minimi nell'architettura cellulare della pelle inducono variazioni drammatiche della colorazione della pelle dei Rettili (DuShane, 1935; Gosner, 1989). Nelle lucertole della famiglia Phrynosomatidae le variazioni nelle colorazioni addominali riscontrate a livello interspecifico e intraspecifico intersessuale, sono il risultato della variazione in posizione, in abbondanza e in densità dei vari tipi di cromatofori. Il modello proposto (Quinn & Hews, 2003) ascrive la colorazione addominale blu dei maschi di alcune specie della famiglia alla riflessione a basse lunghezze d'onda della luce, operata dallo strato degli iridofori e all'assorbimento di tutte le altre lunghezze d'onda da parte della melanina (Morrison *et al.*, 1995). La pelle bianca sarebbe il risultato di basse quantità di melanina: questa condizione condurrebbe, dunque, all'alta riflessione di tutte le altre lunghezze d'onda, che non vengono diffuse dagli iridofori, da parte di uno strato sottostante di fibre collagene. Ma la variazione nella quantità di melanina è solo uno dei possibili meccanismi che possono contribuire alla variazione dello stato del carattere (Quinn & Hews, 2003), in quanto si ipotizza che possa essere fondamentale, per esempio, anche lo strato degli iridofori (Sherbrooke & Frost, 1989).

Il carattere blu della colorazione addominale di alcune specie di *Sceloporus* rappresenta un segnale visivo di aggressività (Cooper & Burns, 1987), rientrando quindi nei caratteri cromatici strutturali delle lucertole. A conferma di ciò è stato addirittura utilizzato per ricostruzioni filogenetiche nell'ambito della famiglia Phrynosomatidae (Wiens, 1999). In tal modo è stata determinata l'ancestralità del colore bianco del ventre, che in soli due generi, *Urosaurus* e *Sceloporus*, è evoluto nelle tinte del blu. In questi due generi, le analisi di parsimonia della distribuzione filogenetica della colorazione addominale supportano l'ipotesi che il carattere ancestrale sia il dimorfismo sessuale che vede i maschi dal ventre blu e le femmine dal ventre bianco. Oggi

esistono altri due stati del carattere: in almeno nove specie differenti si è sviluppata indipendentemente la perdita della colorazione blu addominale nei maschi ed in almeno undici specie differenti si è sviluppata indipendentemente la colorazione blu nell'addome delle femmine (Wiens, 1999).

Le colorazioni dei Rettili sono state a lungo studiate come esempio di evoluzione adattativa (Cott, 1940; Norris & Lowe, 1964). Variazioni geografiche nei colori dorsali si riscontrano piuttosto comunemente e la pressione di selezione è stata spesso valutata in tali casi. Infatti, in alcuni casi la variazione di colore coincide con substrati di colore differente in cui gli animali vivono (Norris, 1965; Kettlewell, 1973), mentre in altri contesti sembra esista un'associazione del colore con differenti situazioni termiche (Majerus, 1998; Bittner *et al.*, 2002).

Ritornando alla specie d'interesse, oltre alla classica colorazione di *Podarcis sicula*, tipica delle popolazioni continentali e macroinsulari (si veda il paragrafo I. 1.3.2), è frequente osservare esemplari di numerose popolazioni microinsulari con una spiccata tendenza verso diverse forme di ipercromismo, dal cianismo al melanismo completo (Fulgione *et al.*, 2004; Corti e Lo Cascio, 2002; Corti, 2006): essi mostrano una colorazione dorsale e ventrale più scura e metallizzata, tendente all'azzurro intenso, al blu scuro, fino al nero completo. E' famosa a tal proposito la popolazione del Faraglione di Mezzo a Capri, descritta da Eimer nel 1872, come una varietà distinta della specie, con cui, tra l'altro, prese avvio la lunga storia degli studi sull'evoluzione e sulla differenziazione dei Lacertidi nelle piccole isole italiane.

In passato sono stati numerosi gli studi sul significato adattativo del fenomeno. Le ipotesi proposte sono state svariate, partendo dal mimetismo di Eimer (1974), alla necessità di schermare i raggi UV del sole in ambienti, quelli microinsulari, troppo soleggiati e poco ombreggiati (Krammerer, 1926; Kramer, 1949; Bedriaga, 1984). Eisentraut (1950) suppose anche che si trattasse dell'effetto di uno spostamento dello spettro alimentare, verso una dieta prevalentemente vegetariana a causa della ridotta disponibilità d'Insetti. In tali situazioni i melanofori prevaricherebbero sui lipofori, a causa di una riduzione dei grassi, rispetto ad una situazione di normale spettro alimentare.

Nel lungo *excursus* di studi sulle cause del fenomeno, c'è anche chi invoca la “regola di Gloger” nel tentativo di correlare gli elevati tassi di umidità degli isolotti ai caratteri cromatici scuri delle lucertole. Mertens (1963) e Lanza (1979), al contrario, diedero credito all'ipotesi termoregolativa, invocata per spiegare la maggiore necessità di ore di attività in ambienti a bassa disponibilità trofica: il colore più scuro favorirebbe l'assorbimento dei raggi anche in condizioni di minor luce e di temperatura bassa rispetto ad un individuo “normo-tipo”.

C'è da sottolineare che esistono popolazioni insulari di *Podarcis sicula* con divergenze cromatiche differenti: Lo Valvo *et al.* (2004) hanno studiato la popolazione di Isola Bella, a Catania, dal ventre di colore rosso mattone-ruggine, tra l'altro riconosciuta come sottospecie *P. s. medemi* Mertens, 1942.

Nell'ambito delle variazioni cromatiche, anche il disegno dorso-laterale generato dalle strie e dalle macchie nere è un carattere molto variabile nella specie; infatti, si riconosce un cline lungo la penisola italiana, a carico delle due sottospecie continentali di *P. sicula*, passando da una maggiore frequenza di fenotipo striato al Nord e al Centro d'Italia ad uno prevalentemente reticolato al Sud della penisola. In questo settore geografico, peraltro, si registra una maggiore variabilità fenotipica, che giustifica anche l'interesse e la curiosità degli studiosi a scala ridotta. Si ritrovano, infatti, studi che analizzano il *pattern* dorsale, considerando anche le variazioni tra la terraferma e i sistemi insulari (per esempio si veda Faraone, 2001).

Un'altra prova della divergenza delle popolazioni insulari e microinsulari di *Podarcis sicula* è stata fornita anche dalla citogenetica: in uno studio sulle variazioni tra popolazioni cilentane campane, è stato riconosciuto il contenuto in eterocromatina minore per la popolazione dell'isola di Licoso, in corrispondenza con l'assenza di un cromosoma nel bandeggio C negli stessi campioni (Cardone *et al.*, 1990). Tenuto conto che i campioni provenienti dal promontorio prospiciente mostrarono una tendenza invertita rispetto alle altre popolazioni cilentane, il risultato sembra assumere un certo significato.

I.1.3 La specie modello di studio

I.1.3.1 Inquadramento sistematico e descrittivo

Podarcis sicula, Rafinesque-Schmaltz, 1810, insieme ad altre 17 specie (*P. atrata*, *P. bocagei*, *P. carbonelli*, *P. erhardii*, *P. filfolensis*, *P. gaigeae*, *P. hispanica*, *P. lilfordi*, *P. melisellensis*, *P. milensis*, *P. muralis*, *P. peloponnesiaca*, *P. pityusensis*, *P. raffonei*, *P. taurica*, *P. tiliguerta*, *P. wagleriana*), fa parte del genere *Podarcis*, che con i generi *Acanthodactylus*, *Adolfus*, *Algyroides*, *Australolacerta*, *Darevskia*, *Eremias*, *Gallotia*, *Gastropholis*, *Heliobolus*, *Holaspis*, *Ichnotropis*, *Lacerta*, *Latastia*, *Meroles*, *Mesalina*, *Nucras*, *Ophisops*, *Pedioplanis*, *Philochortus*, *Poromera*, *Psammodromus*, *Pseuderemias*, *Scapteira*, *Takydromus*, *Timon*, *Tropidosaura*, forma la famiglia dei Lacertidae, tra i Rettili il gruppo dominante in Europa (Harris *et al.*, 1998a). Con altre 15, questa famiglia costituisce il sottordine Sauria che con quelli Amphisbaenia e Ophidia, forma l'ordine Squamata della classe Reptilia (Baccetti *et al.*, 1991).

In tale Classe, il genere *Podarcis* Wagler 1830, è sicuramente il gruppo più diffuso nell'area del Mediterraneo.

I.1.3.2 Podarcis sicula

La Lucertola campestre, è probabilmente, tra i Lacertidi, la più diffusa e più conosciuta nel panorama italiano (Corti & Lo Cascio, 1999). E' una lucertola di medie dimensioni (nei maschi si arriva ai 26 cm di lunghezza), con una corporatura robusta e una testa piramidocefala.

La regione ventrale è chiara, generalmente biancastra. Solo la fila delle squame ventrali esterne può presentare delle macchie azzurre o nere. Di regola non presenta punteggiature o macchie scure né sulla gola, né sul ventre, ma una maculatura azzurra nella regione ascellare. La colorazione dorsale è generalmente verde, dalle tonalità che vanno dall'oliva a quelle del giallastro-senape, o a volte al marrone. Sulla colorazione di base si riconoscono delle macchie a formare un disegno striato o reticolato; le striature dorsolaterali possono essere a volte continue, ma non sono mai a contatto della zona

temporale. La banda occipitale, se è presente, è costituita da macchie nere, talvolta in contatto fra loro, che nei maschi sono più larghe e più scure (Corti & Lo Cascio, 1999).

Il disegno dorsale rappresenta un carattere di variabilità geografica, lungo la penisola italiana (Corti & Lo Cascio, 1999). Nell'Italia centrale e settentrionale, in Corsica settentrionale ed in Sardegna, la stria in corrispondenza della linea vertebrale è una fascia continua o discontinua di colore bruno o nero, ai lati della quale ci sono due fasce di colore bruno chiaro o verde. Nell'Italia meridionale ed in Sicilia, invece, possono essere presenti fenotipi con striatura vertebrale nera e strie dorsolaterali ridotte, fenotipi reticolati ed individui *concolor* ovvero di colore uniforme senza ornamentazioni. La taglia è generalmente maggiore. In Sardegna ed in Corsica meridionale si ritrovano individui interamente reticolati e con un disegno meno evidente (Corti & Lo Cascio, 1999). L'alta variabilità fenotipica espressa dalla specie nel suo areale si manifesta particolarmente nelle numerose popolazioni microinsulari, che mostrano colori veramente singolari.

Un'altra caratteristica indice della variabilità nell'ambito delle popolazioni del territorio nazionale è costituita dalle dimensioni corporee, come viene frequentemente constatato e riportato in letteratura (Corti & Lo Cascio, 1999; Faraone, 2001; Bruschi *et al.*, 2006).

1.1.3.3 Caratteristiche biologiche ed ecologiche

Podarcis sicula è una specie fortemente eliofila e mostra un'ampia valenza ecologica: è presente spesso in aree fortemente antropizzate e colonizza ambienti di gariga, di macchia e di collina, dove predilige le aree aperte ai margini del bosco o le radure e i terreni sabbiosi o pietrosi e si rifugia nei muri a secco e nei cespugli (Corti & Lo Cascio, 1999). Nella parte settentrionale dell'areale la Lucertola campestre è una specie prevalentemente praticola, che occupa zone pianeggianti anche antropizzate ed ambienti dunali, senza mai superare i 1000 m slm. Nel sud Italia progressivamente diventa una specie sempre più euriecia, colonizzando ogni tipo di ambiente, anche i più montani, raggiungendo ad esempio i 2200 m di altitudine sull'Etna, in Sicilia (Turrisi &

Vaccaro, 2001).

In molti siti è sintopica con la congenerica Lucertola muraiola (*P. muralis*) ed in queste situazioni essa si insedia nelle zone di pianura, relegandosi solo in determinati biotopi, come d'altronde accade in Corsica, nei siti di simpatria con l'autoctona *P. tiliguerta* (Delaugerre & Cheylan, 1992). Non sembra che accada lo stesso nelle aree siciliane di sintopia con *P. wagleriana* o con *P. raffonei*: in tali casi, infatti, *P. sicula* colonizza ogni tipo di ambiente, scalzando le congeneriche (Lo Cascio & Corti, 2004). Questo comportamento fa parte del suo carattere opportunista, della sua notevole capacità di propagazione e di adattamento ad ambienti anche molto diversi tra loro, al punto che viene definita specie "ubiquista" (Corti & Lo Cascio, 1999).

In generale *P. sicula* è predatrice e caccia sul suolo. Le componenti principali della sua dieta sono estremamente variabili, rendendola particolarmente generalista: in studi localizzati sono stati individuati differenti spettri alimentari in relazione alle tipologie di territori occupati (Ouboter, 1981; Sorci, 1990; Perez-Mellado & Corti, 1993; Rugiero 1994; Capula *et al.* 1993). In ogni caso in qualità di predatore si nutre soprattutto di Insetti degli ordini dei Coleotteri, Ortotteri, Afidi, Ditteri, Lepidotteri e Imenotteri Formicidi, di Crostacei Isopodi, di Araneidi e di piccoli Gasteropodi (Corti & Lo Cascio, 1999), pur non trascurando alimenti di natura vegetale.

Il ciclo di attività annuale generalmente ha inizio nel mese di Marzo, per terminare in autunno, più o meno nel mese di Novembre. La variabilità di ambienti in cui *P. sicula* è adattata determina una notevole differenza anche nella sua biologia: mentre nelle zone montane la specie ha un periodo di latenza invernale di 7 mesi circa (da Ottobre ad Aprile), progressivamente verso il limite meridionale del suo areale mostra di accorciarlo. Nelle zone costiere, nelle isole e negli isolotti mediterranei, addirittura non esiste più un vero e proprio periodo di latenza invernale e frequentemente si osservano lucertole campestri anche in pieno inverno, in giornate soleggiate. Queste differenze si riflettono anche sul ciclo riproduttivo, in quanto l'accoppiamento avviene appena comincia la nuova attività annuale: di regola, dunque ogni femmina depone le sue due-otto uova (Henle, 1988) una sola volta all'anno, tra

Maggio e Giugno (Corti & Lo Cascio, 1999), ma nelle zone a clima mediterraneo si assiste anche a due, eccezionalmente tre deposizioni in un anno. La deposizione delle uova avviene in buche scavate dalle femmine, in muretti a secco, nelle cavità dei tronchi. La schiusa delle uova avviene dopo circa due mesi dalla deposizione, cosicché nascono i piccoli di circa 60 mm, a cavallo tra i mesi di Luglio e Agosto. Nel periodo della riproduzione i maschi assumono un comportamento particolarmente aggressivo, manifestando anche forti istinti di territorialità, per i quali si può assistere a violenti combattimenti (Arnold, 1993).

L'attività della specie, comunque, risulta di tipo bimodale, durante i mesi più caldi può raggiungere anche una media di 14 ore giornaliere, mentre nella stagione invernale si riduce in genere a 2-3 ore, in assenza di latenza. L'attività si svolge normalmente con temperatura corporea compresa tra 28,5°C e 37,8°C (van Damme *et al.*, 1990; Tosini *et al.*, 1992).

Più volte all'anno la specie è soggetta ad una muta completa, a cui gli individui partecipano attivamente staccandosi la vecchia pelle secca, servendosi delle mandibole, delle zampe posteriori e sfregandosi contro arbusti e pietre.

1.1.3.4 Distribuzione

L'areale della specie può essere ricondotto all'Europa centro-meridionale: l'Italia, con le sue isole maggiori, la Sicilia e la Sardegna, zone costiere della Slovenia, Croazia, e parte del Montenegro (fig.2).

L'Italia, in ogni caso, viene considerata l'area di origine ed il centro di espansione della specie (Radovanović, 1956; Schneider, 1971; Gorman *et al.*, 1975). Nella penisola, oggi, è comune in tutte le regioni ad eccezione della Valle d'Aosta e del Trentino Alto Adige (Barbieri, 1996) e la dorsale appenninica, sopra i 1000 m di altitudine, resta priva di segnalazione (Corti, 2006).

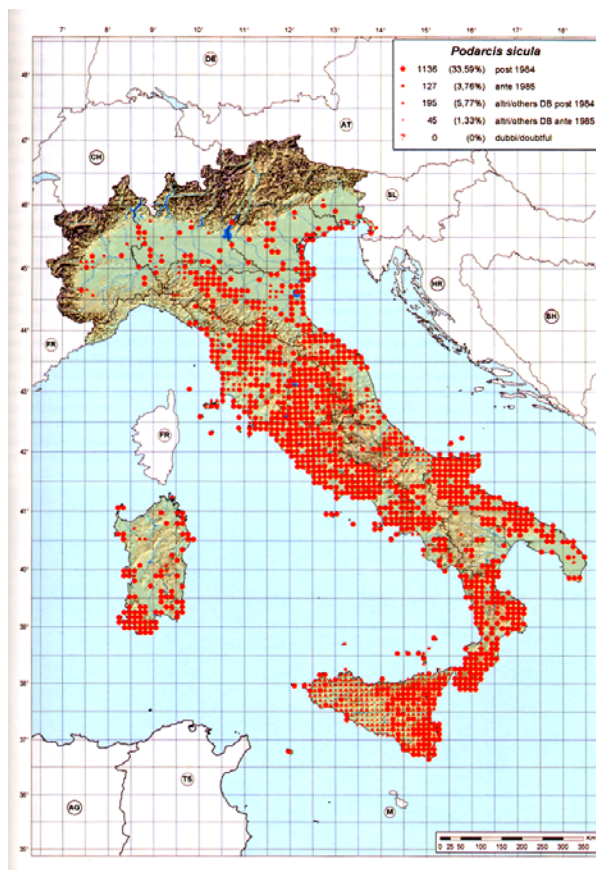


Figura 1 - Distribuzione di *Podarcis sicula* in Italia (Corti, 2006).

nelle isole di Gorgona e Palmaiola e in alcuni isolotti minori (Corti *et al.*, 1991); in quello Pontino e in quello Campano, in cui era già stata segnalata a partire dalla seconda metà dell'Ottocento (Eimer, 1872; 1881; Giglioli, 1878; Wallace, 1878; Bedriaga, 1879); in quello delle Tremiti ed in altre isole pugliesi; in alcune isole del litorale tirrenico meridionale ed in alcune di quello veneto e friulano (Henle & Klaver, 1986). Inoltre, essa è segnalata in tutte le maggiori isole circumsiciliane e in 21 dei loro isolotti minori (Corti *et al.*, 1998) ed in circa 10 tra le isole circumsarde (Poggesi *et al.*, 1996).

L'area di distribuzione, limitatamente alla penisola italiana, pubblicato dal Ministero dell'Ambiente, riportato dall'"Atlante degli Anfibi e Rettili italiani" (Sindaco *et al.*, 2006) è mostrato in figura 1.

P. sicula è nota per essere un'ottima colonizzatrice insulare, come dimostra la sua presenza in gran parte delle isole e microisole degli arcipelaghi italiani (Corti & Lo Cascio, 1999). La specie è segnalata: nell'Arcipelago Toscano, dove manca solo



Figura 2 - Areale di *Podarcis sicula*.

In alcuni casi, come in Corsica (Delaugerre & Cheylan, 1992), sembra che la presenza della specie sia il risultato di traslocazioni da parte dell'uomo, seguite dall'acclimatazione delle popolazioni (Lanza, 1973; 1983; Capula, 1992; 1994; Lo Valvo & Nicolini, 2001). In effetti, la notevole capacità di dispersione e di naturalizzazione della specie ha favorito l'acclimatazione in numerosi siti in cui è stata volontariamente e/o involontariamente traslocata: così *P. sicula* oggi si incontra anche nella Penisola Iberica (in Almeria; Mertens & Wermuth, 1960; Meijide, 1981), nelle Baleari (nell'Isola di Minorca; Bedriaga, 1878; Esteban *et al.*, 1994), in Francia (a Tolone e nell'Isola di Chateau d'If, a Marsiglia; Orsini, 1984; Morgue, 1924) in Corsica (Lanza, 1983; Delaugerre & Cheylan, 1992), in Nord Africa (nei dintorni di Tunisi e di Tripoli; Arnold & Burton, 1978; Henle & Klaver, 1986), in Turchia (nei dintorni di Istanbul e nella zona del Mar di Marmara; Basoglu & Baran, 1977) e negli Stati Uniti (a Philadelphia; Conant, 1959; Conant & Collins 1991; Oliverio *et al.*, 2001). Recentemente è stata segnalata anche in

Portogallo, a Lisbona (González de la Vega *et al.*, 2001).

1.1.3.5 Genere, specie e sottospecie in P. sicula: un percorso complesso

Le interrelazioni tra la variabilità morfologica e la filogenesi della specie sono ancora oggetto di un ampio dibattito tra gli studiosi. Tale dibattito è naturalmente aperto all'indagine dei processi evolutivi che interessano i caratteri differenziativi. D'altra parte, però, proprio la forte variabilità dei caratteri morfologici ha reso molto difficile tracciare un quadro esaustivo dell'evoluzione del genere *Podarcis*. Sono, infatti, molto discordanti tra loro i tentativi effettuati per ricostruire le relazioni filogenetiche all'interno del *taxon*, rendendole ancora oggi poco chiare addirittura all'interno della famiglia Lacertidae (Oliverio *et al.*, 1998).

Le classificazioni più antiche sono certamente il frutto della tassonomia tradizionale, secondo cui la sola variazione dei caratteri morfologici e distributivi risultava sufficiente ad individuare e discriminare sottogruppi, senza soffermarsi sulle loro interrelazioni e quindi senza interrogarsi se tali gruppi corrispondessero ad effettive linee filogenetiche. Già a partire dai primi anni del 1800, infatti, il genere era studiato e le descrizioni tassonomiche si basavano su un approccio esclusivamente fenetico, sulla base di caratteri morfologici. Bisogna attendere la metà del '900 perché si cominci ad affrontare la problematica con approcci analitici differenti: i primi approcci allo studio filogenetico risalgono a Klemmer (1957) che sulla base di parametri osteologici, ancora fenotipici, conferma l'uniformità dell'allora sottogenere *Podarcis* Wagler, 1830 (genere *Lacerta*). Egli, inoltre, distinse tre gruppi morfologici: il primo composto da *P. muralis*, *P. tiliguerta*, *P. filfolensis*, *P. wagleriana* e *P. milensis*, il secondo comprendente le specie spagnole e delle Baleari (*P. hispanica*, *P. bocagei*, *P. lilfordi*, *P. pityusensis*), il terzo gruppo composto da *P. sicula*, *P. melisellensis* e due specie dell'est-mediterraneo. Comparando alcuni caratteri morfologici con altri finalmente biochimici, Arnold (1973) riconobbe gli stessi raggruppamenti, ma propose di elevare a genere il sottogenere *Podarcis*. Questo gruppo oggi è ristretto alle sole specie

della regione Euro-Mediterranea e raccoglie i *taxa* che facevano parte del genere *Lacerta*.

Nei numerosi tentativi di inferire la filogenesi del gruppo non è raro scorgere l'effetto che il tipo di analisi e soprattutto i caratteri considerati conferivano ai risultati; basti notare, per esempio, che le ipotesi filogenetiche scaturite da dati morfologici e biochimici di Arnold (1989; 1993) erano in contrasto netto con gli arrangiamenti ottenuti su base immunologica da Mayer e Benyr (1994). Recentemente approcci di tipo biomolecolare (Harris *et al.*, 1998b; Oliverio *et al.*, 1998, 2000; Fu, 2000) hanno fornito nuovi contributi, anche più attendibili, alla sistematica del genere, aprendo la strada tra l'altro ad un nuovo approccio di valutazione dell'idoneità dei caratteri morfologici tradizionalmente utilizzati a fini tassonomici.

Le indicazioni scaturite da tali studi appaiono più utili in quanto i marcatori molecolari sono meno influenzati dai processi di adattamento evolutivo rispetto ai caratteri morfologici. Inoltre, questo approccio offre un'ampia possibilità di scelta di marcatori (Fu, 1998), che va dai più conservativi ai più variabili (Miyamoto & Cracraft, 1991; Hillis *et al.*, 1996) e i dati molecolari offrono un numero illimitato di caratteri per le ricostruzioni filogenetiche. Grazie a queste peculiarità l'approccio biomolecolare permette di affrontare differenti casi evolutivi di analisi. Così sono fioccati in breve tempo studi filogenetici che si avvalgono di tecniche molecolari, in particolar modo mediante l'uso del DNA mitocondriale (solo per Lacertidae si veda p. e. Thorpe *et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 1996; Fu *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 1998a; 1998b). Lutz e Mayer (1985) confrontando le albumine di vari generi di Lacertidi, riconobbero una stretta affinità tra *P. sicula* e *P. muralis*, come hanno confermato anche altre ricerche più recenti (Capula, 1990) in cui è stata in più riconosciuta la possibile monotopia del ramo *siculus*, fino ad allora ritenuta specie politipica. Böhme (1986) riconobbe 17 specie e in accordo con Richter (1980) divise il genere *Podarcis* in due sottogeneri: il nominale *Podarcis podarcis* con 15 specie e *Podarcis teira* Gray, 1838 con due specie, gruppo che oggi è riconosciuto come genere (Mayer & Bischoff, 1996).

Un percorso di studi così tortuoso ha indubbiamente risolto molti

interrogativi, ma la sistematica del genere risulta ancora irrisolta a tal punto da ritenere il *taxon* “molto resistente alle analisi” (Arnold, 1993)!

Parallelamente bisogna purtroppo notare che il rango specifico non sembra avere subito sorti molto differenti, con tutti gli studi e i risultati discordanti che si possono collezionare in un *excursus* bibliografico.

Il monofiletismo, della specie *P. sicula* viene recentemente confermato da Oliverio *et al.* (1998): analizzando filogeneticamente, attraverso sequenze di mtDNA, diverse specie italiane gli Autori riscontrano negli alberi sia di massima parsimonia sia di *Neighbour-Joining* (sulla base delle distanze di Jukes & Cantor), un clade costituito solo da *P. sicula*. Inoltre, applicando il tasso di mutazione del 12S rDNA derivato per la salamandrina (Caccone *et al.*, 1997) per determinare il *clock molecolare*, fanno risalire la separazione di *P. sicula* a 17-15 MY BP; quella tra la sottospecie sarda *P. s. cettii* e la sottospecie continentale nordica, *P. sicula campestris* rispettivamente a 7 MY e 6 MY fa. I precedenti dati biochimici avevano generato simili stime nella diversificazione del genere *Podarcis* (Gorman *et al.*, 1975; Lanza & Cei, 1977; Guillaume & Lanza, 1982; Mayer & Tiedmann, 1982; Lutz & Mayer 1984; 1985; Lutz *et al.*, 1986). Ad ogni modo, nonostante la congruenza di datazione, i paragoni tra tali stime, estrapolate con metodologie tanto differenti, non risultano corretti né proficui.

Un’aspetto di *P. sicula* che ha concentrato molto l’interesse degli studiosi è rappresentato dalla sua elevata variabilità fenotipica. Scendendo ancora di rango nella sistematica della specie, infatti, anche a livello sottospecifico la tassonomia di *P. sicula* si sviluppa secondo un percorso spinoso e di difficile ricostruzione: negli anni molte popolazioni insulari sono state assunte a livello sottospecifico solo sulla base delle divergenze fenologiche che presentavano (Nascetti *et al.*, 1982; Amori *et al.*; 1993, Corti & Lo Cascio, 1999). Quindi, la tendenza di classificazione della tassonomia classica, associata ad un quadro biogeografico complesso tipico della specie, diffusa ampiamente in ambienti insulari e microinsulari, accompagnate alla notevole variabilità morfologica, dagli aspetti cromatici (Arnold, 2002) a quelli scheletrici (Oliverio *et al.*, 1998), è sfociata, nel tempo, in un quadro molto artificioso che si presenta

dunque ancora molto dibattuto (Oliverio *et al.*, 2000), che in questa sede si cerca di sintetizzare.

La popolazione continentale di *P. sicula*, con l'eccezione di alcune popolazioni isolate (*P. s. ragusae* Wettstein 1931, *P. s. cattaroi* Taddei, 1950 e *P. s. hieroglyphica* Berthold 1940; Podnar *et al.* 2005) appartiene a due sottospecie piuttosto differenziate sul territorio: *P. sicula sicula* che occupa il meridione della penisola italiana fino all'altezza di Roma e lungo il versante Ovest del centro Italia e *P. s. campestris* che è presente al Nord Italia fin dove si estende l'areale della specie e sul versante Est della penisola, nonché sulla costa atlantica delle regioni balcaniche. Si ritiene che le due sottospecie si siano differenziate durante la glaciazione del Würmiano, per i differenti rifugi glaciali occupati (Shneider, 1971). Ad ogni modo, non è stata riconosciuta una distinzione geografica netta tra le due sottospecie, bensì dagli studi più recenti sono stati identificati caratteri morfologici di transizione tra i due *range* di distribuzione in individui provenienti dall'area circostante Roma, precisamente da Formia (Oliverio *et al.*, 1998).

Podnar *et al.* (2005) ipotizzano tra l'altro un processo di migrazione spazialmente continuo, recente o probabilmente ancora in atto, di maschi di *P. s. sicula* che per le dimensioni maggiori e per la loro forza avrebbero un successo riproduttivo maggiore rispetto ai maschi di *P. s. campestris* De Betta, 1857. Un simile fenomeno è stato dimostrato per *Anolis oculatus dominicanus* (Stenson *et al.*, 2002). Una migrazione preferenziale maschile genererebbe probabilmente un processo di diluizione degli alleli nucleari di *P. s. campestris*, che spiegherebbe l'elevata diversificazione a livello mitocondriale che non trova corrispondenza a livello fenotipico (Birky *et al.*, 1983).

Lasciando da parte la situazione sul territorio peninsulare e riprendendo in considerazione l'intero panorama biogeografico della specie, l'ultima ricostruzione tassonomica completa (Henle & Klaver, 1986) consta di 52 sottospecie, 47 delle quali risulterebbero endemismi locali di una o poche "micro-isole".

Tra le sottospecie, 24 risultano ristrette alla Croazia, mentre 3 sono state dichiarate estinte di recente: *P. s. hadzii* (Isola di Porer, Istria occidentale –

Brelìh, 1961), *P. s. sanctistephani* (Isola di Santo Stefano, Arcipelago Pontino, sostituita dalla sottospecie nominale) e la sottospecie di Lisca Nera nell'Arcipelago Eoliano.

Poiché tutte le sottospecie sono state descritte sulla base di differenze minime e/o sull'analisi di campioni ridotti, già Henle e Klaver (1986) tentarono di assegnare le numerose sottospecie a pochi gruppi: i primi due, il gruppo delle *P. s. sicula* e il gruppo delle *P. s. campestris*, vennero definiti sulla base di similarità di *pattern*; gli altri tre gruppi vennero descritti solo per una o poche entità che non potevano essere assegnate ad alcuno dei precedenti. Il primo di questi gruppi, il gruppo delle Tirreniche, comprendeva le popolazioni delle isole dell'Arcipelago Toscano. Il secondo, il gruppo delle *P. s. cettii*, conteneva solo questa sottospecie. Il terzo gruppo era rappresentato solo da *P. s. cattaroi*, popolazione di Kotor in Montenegro, di origine incerta.

Tutta la situazione descritta e le tendenze più recenti di (Corti *et al.*, 1989; Capula, 1994; Tome, 1995; Lo Valvo, 1998; Oliveiro *et al.*, 2001; Capula & Ceccarelli, 2003) evidenziano la necessità di una differente dimensione d'introspezione all'interno del *taxon*, che tenga conto piuttosto dei processi evolutivi alla base della variabilità fenotipica (Bauwens & Diaz-Uriarte, 1997). D'altra parte nell'affrontare la ricostruzione bibliografica di tale problematica, ancor più che nei casi discussi precedentemente, si percepisce quanto possa risultare ingannevole l'uso della morfologia come unico carattere diagnostico per propositi sistematici (Corti & Lo Cascio, 1999). Così anche al livello sottospecifico si comincia ad affrontare la problematica attraverso nuovi approcci di ricerca, soprattutto analizzandola sotto profili all'avanguardia nel campo tecnico. La più recente ricostruzione della filogeografia della specie, anche se incompleta, (Podnar *et al.*, 2005) è stata effettuata sulla base di sequenze mitocondriali con 96 campioni provenienti da 86 località dell'areale e comprendenti 24 tra le sottospecie riconosciute da Henle e Klaver (1986). Il *pattern* filogeografico di base, ottenuto mediante *Maximum Likelihood analysis*, mostrato in figura 3 riscontra l'esistenza di 6 aplocyadi principali. I campioni meridionali si distribuiscono nel seguente modo:

- nel **clade** siculo ricade la Sicilia, la Sardegna ed il sud-ovest della

Calabria;

- nel **clade** di Monasterace è compresa la Calabria ionica;
- nel **clade** di Catanzaro ricade il centro della Calabria.

L'analisi del citocromo b suddivide ulteriormente il primo gruppo in un clade siculo-sardo che comprende anche pochi campioni a distribuzione circum-adriatica ed in uno calabro che comprende anche qualche campione della pianura Padana e della regione Nord Adriatica. I campioni del Nord determinano gli ultimi tre cladi:

- il clade della Toscana comprende tutto il Nord dell'Italia Occidentale (da Roma alla Toscana);
- il clade di Sūsac comprende tutte le isole del Sud e del Centro della Dalmazia;
- l'ultimo clade è definito Campestris-sicula ed è costituito dal nord Italia, dalla costa adriatica e dal Sud-Ovest della penisola. Questo gruppo risulta suddiviso ulteriormente in tre apoclad: l'adriatico, quello del Po e quello campano, parafiletico, circoscritto geograficamente in quanto comprende gli unici campioni di *P. s. sicula* sia che facciano parte della Campania, del Nord della Calabria sia del Sud del Lazio.

Per la maggior parte delle sottospecie analizzate (24) gli Autori suppongono che una sovrapposizione delle caratteristiche specifiche delle popolazioni hanno portato alla definizione delle numerose sottospecie: essi ipotizzano che forse tali caratteristiche derivano da processi di effetto fondatore e deriva genetica piuttosto che da processi evolutivi a lungo termine, in quanto analizzando l'mtDNA non si riscontrano differenze nette tali da giustificare le sottospecie in questione. Va riconosciuto indubbiamente che l'uso del mtDNA può non essere la chiave risolutiva di una indagine di classificazione intraspecifica, se non è parallelamente accompagnato da marcatori nucleari.

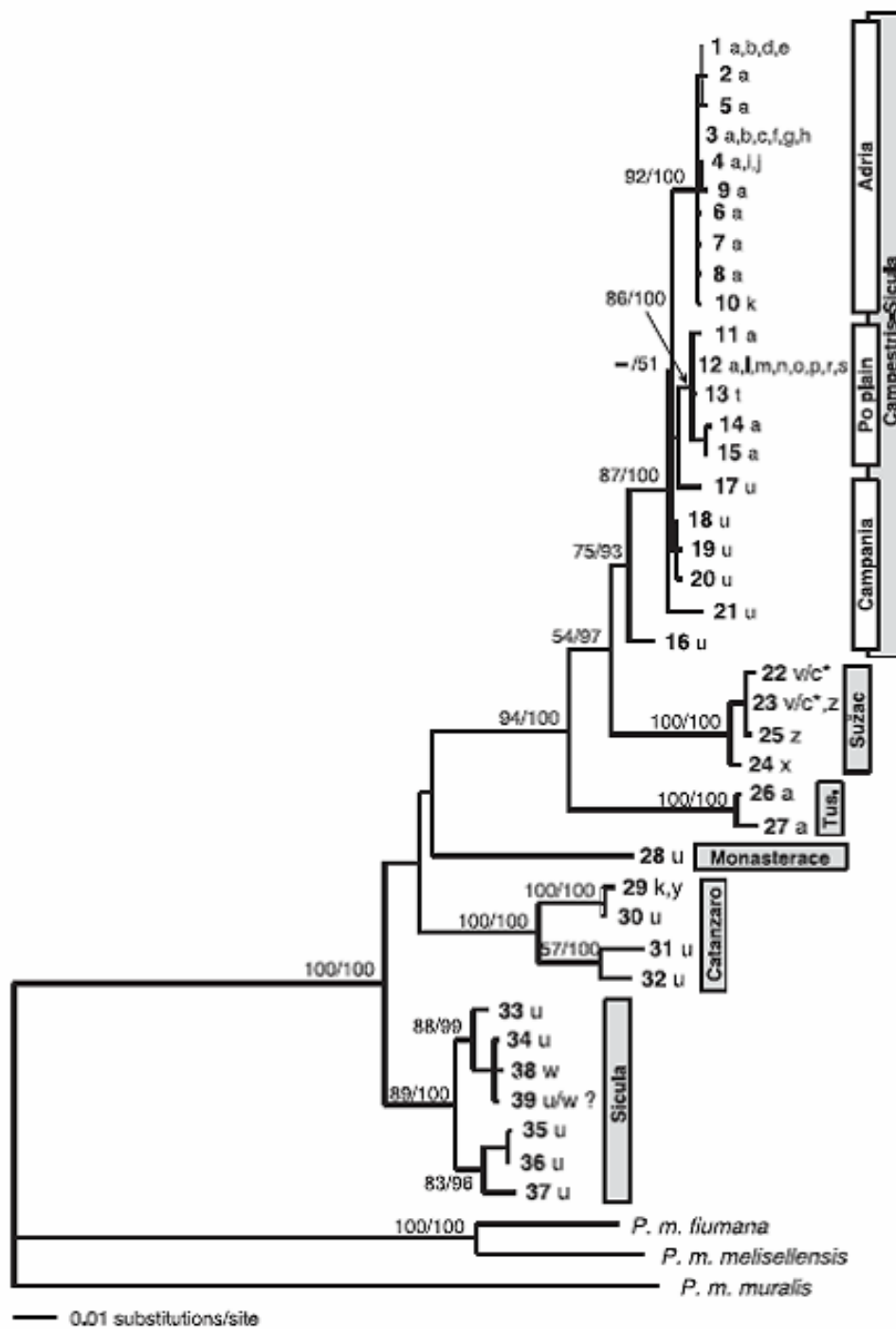


Figura 3 – filogrammi, da analisi di *ML*, di Podnar *et al.* (2005). I campioni di *Podarcis sicula* provengono dall'intera area di distribuzione

In definitiva, tutta la situazione tassonomica descritta è ritenuta incerta, mai chiarita e necessaria di una revisione completa, a tal punto che nella *check-list* dei Rettili d'Italia, nell'Atlante di riferimento più recente (Sindaco *et al.*, 2006) sono state volontariamente omesse le sottospecie, ad esclusione delle due continentali.

I.1.3.6 Aspetti di conservazione e status normativo

Le situazioni di difficile definizione sistematica, come quella di *Podarcis sicula*, per quanto appaiano confuse, rappresentano nel contempo dei casi unici di ricchezza dal punto di vista conservazionistico. Al di là delle difficoltà di definire uno *status* sistematico corretto, infatti, esse sono l'espressione di un lungo processo evolutivo che, nel suo agire, genera differenziazione e dunque biodiversità. Questa rappresenta una ricchezza inestimabile per la Terra, sia per il suo valore intrinseco (Soulé, 1985), sia per la funzionalità degli ecosistemi naturali. Purtroppo la distruzione della natura e di conseguenza la perdita della biodiversità hanno subito una fortissima accelerazione nel XX secolo (Massa, 1999). A ciò va aggiunto che nelle zone temperate il processo di estinzione interessa principalmente porzioni delle specie viventi (sottospecie, ecotipi, morfotipi e popolazioni geneticamente distinte) piuttosto che specie *tout court*: tutto ciò rappresenta una minaccia maggiore per la funzionalità degli ecosistemi (Ehrlich, 1986).

La situazione di *P. sicula*, dal punto di vista conservazionistico, rappresenta un caso piuttosto anomalo per la particolare situazione biogeografica in cui essa ricade: si rinvergono infatti due fondamentali situazioni, quella inerente le popolazioni peninsulari e quella inerente le popolazioni microinsulari, che non permettono di considerare la specie nel suo insieme. *Podarcis sicula*, infatti, globalmente rientra nella categoria delle specie sub-endemiche italiane ad areale più ampio, specie ampiamente ed organicamente diffusa nel loro areale (Sindaco, 2006) sulla base di alcuni parametri di interesse conservazionistico ricavati dalla distribuzione geografica (Sindaco, 2000).

Le popolazioni peninsulari, dunque, non mostrano particolari problemi, che potrebbero però sorgere laddove l'incremento dell'attività umana alteri gli habitat. A tal proposito, infatti, viene già segnalata in Pianura Padana (p.e. in Piemonte) l'estinzione della maggior parte delle popolazioni in passato conosciute, a causa della scomparsa degli ambienti naturali perfluviali (Corti, 2006). Non si può, però, trascurare l'unicità delle popolazioni insulari dal punto di vista eco-etologico. In alcuni casi queste popolazioni mostrano rischi

elevati di estinzione per la loro densità o per la ridotta estensione del loro habitat (si pensi al Faraglione di Mezzo di Capri); in altri casi anche se apparentemente queste possono presentare elevata densità, prospettano probabilmente un certo grado di vulnerabilità dovuto all'isolamento, per cui piccole variazioni ambientali costituiscono un elevato rischio (Corti, 2006). A tal proposito la recente estinzione della sottospecie *P. s. sanctistephani*, benché attribuita a fenomeni naturali, dimostra il rischio a cui sono sottoposte le popolazioni localizzate e costrette in condizioni di insularità (Scalera, 2003).

La dualità nell'approccio conservazionistico è fondamentale per la tutela della specie, ma andrebbe affiancata da chiarimenti sulla sua sistematica, in quanto situazioni incerte o errate possono avere implicazioni anche a livello normativo (Meffe & Carroll, 1997): si può facilmente incorrere in una sottostima del grado di tutela di entità scorrettamente raggruppate (quindi ad esempio definire la specie non vulnerabile in quanto ampiamente diffusa nel suo areale, dimenticando le situazioni insulari di rischio locale) o nel caso opposto, si possono indirizzare gli sforzi conservazionistici su alcune entità inutilmente, per non aver riconosciuto all'interno del *taxon* una differenziazione più fine (quindi, per esempio, tutelare inutilmente tutta la specie sulla base della vulnerabilità delle piccole popolazioni a rischio di estinzione).

Un altro aspetto da considerare per la conservazione della specie è rappresentato dal suo carattere di colonizzatrice e dalla sua adattabilità, che la rende in alcuni casi addirittura invasiva a discapito di popolazioni locali di altre specie (per esempio nella competizione con la congenerica *P. raffonei* endemica dell'arcipelago Eoliano; Lo Cascio & Corti, 2004) o di *Podarcis sicula* stessa (Capula, 1992; Capula *et al.*, 2002).

Malgrado l'esistenza di situazioni così diverse, addirittura contrapposte, la normativa vigente, nazionale ed internazionale riguarda ancora l'intera specie indistintamente, salvaguardandola. Di seguito si elencano le norme che tutelano la specie:

- ✓ convenzione di Berna (all. II) sulla conservazione della fauna selvatica e degli habitat naturali;

✓ direttiva 92/43/CEE "Habitat" (all. 4) e D.P.R. n° 357/1997 (all. D) sulla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche.

A livello regionale è protetta solo in alcune regioni italiane:

✓ in Liguria dalla L.R. 4/92 sulla "Tutela della fauna minore";

✓ in Abruzzo dalla L.R. 50/93, "Primi interventi per la difesa della biodiversità nella Regione Abruzzo: tutela della fauna cosiddetta minore";

✓ in Lazio dalla L.R. 364/87, "Tutela di alcune specie della fauna minore" e dalla L.R. 18/1988.

I.1.4 Obiettivo

Dallo studio condotto sulla bibliografia disponibile e dalle problematiche esposte nei paragrafi precedenti, si evince che il modello di studio rappresenta un caso diffuso e di grande interesse per lo studio dei motori microevolutivi legati alla condizione di isolamento delle popolazioni.

Con questo lavoro di ricerca si intende, quindi:

- chiarire le modalità di distribuzione della variabilità genotipica e fenotipica in *Podarcis sicula* con riferimento alla connessione tra le popolazioni e ai processi di colonizzazione;
- interpretare l'insorgenza di popolazioni varianti in ragione della storia dispersiva (causalità filogeografica) oppure come conseguenza a pressioni selettive locali (causalità adattativa);
- valutare la pertinenza del livello sottospecifico di *P. s. klemmeri* Lanza e Capolongo 1972, in considerazione degli aspetti filogenetici e delle strategie di conservazione a cui questa ed altre popolazioni vanno incontro.

I.2 Area di studio

In relazione all'areale originario di *Podarcis sicula* (fig. 1) si è scelto di lavorare nell'area tirrenica dove le caratteristiche ecologiche e di popolazione della specie le permettono l'ampia diffusione e il notevole adattamento, più di quanto non accada in aree del Nord. Si suppone, quindi, che nel settore geografico tirrenico, per le caratteristiche climatiche e ambientali presenti, la specie esprima al meglio le proprie esigenze ecologiche.



Figura 4 - l'area di studio complessivamente riguarda la regione del Tirreno meridionale, dove sono collocate le tre isole (cerchi tratteggiati): Licosa, in Campania, Cirella, in Calabria e Ustica, in Sicilia

Nell'ambito, dunque, del bacino del Tirreno, per l'identificazione delle isole marine ci si è avvalsi di ricerche bibliografiche e di consultazione di cartografia IGM e di foto aeree, provenienti dal Portale Cartografico Nazionale del Ministero dell'Ambiente (<http://www.pcn.atlanteitaliano.it/>) e dal

programma Google Earth v3.0 (<http://earth.google.com>). Così, dunque, sono state scelte tre isole (fig. 4) quali laboratori *in situ*. I criteri di scelta sono fondati sulle caratteristiche geomorfologiche delle isole, sul loro grado d'isolamento, quantificato mediante la distanza dalla linea di costa e l'orogenesi delle isole e sull'accessibilità e la facilità di approdo sulle isole. Quest'ultimo criterio ha determinato l'esclusione di alcuni siti, peraltro interessanti, quale il Faraglione di Mezzo dell'isola di Capri. In definitiva le isole in cui è stata portata avanti la ricerca sono: Cirella, Licoso e Ustica (figg. 5, 6 e 7).

Cirella (33T 568762 4394647 Datum wgs84) è un isolotto di 12 ettari al largo del Comune di Diamante, lungo la costa calabra (fig. 5). L'isola non è mai stata abitata ed oggi è popolata da una folta colonia di Gabbiano reale (*Larus michaellis michaellis*), indubbiamente soggetto di predazione per la

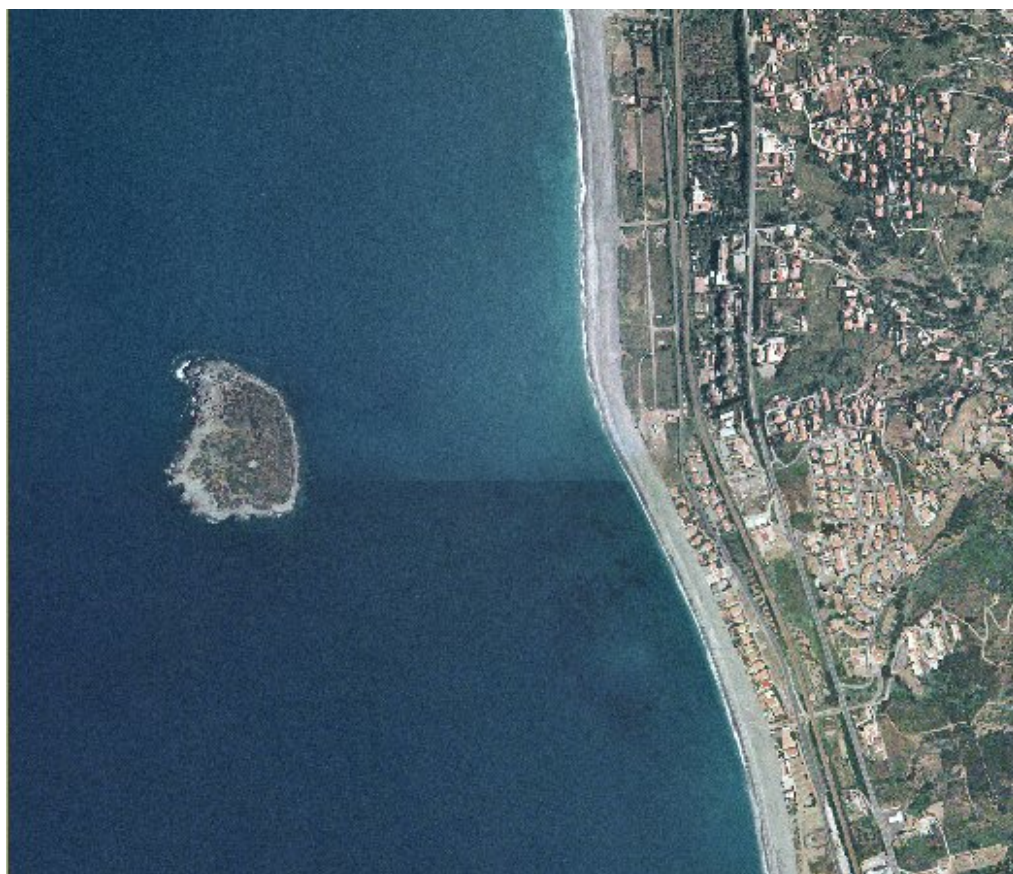


Figura 5 - foto aerea (scala 1:15.000) di Cirella

specie d'interesse. L'isolotto si presenta estremamente arido ed assolato con scarsa vegetazione dal portamento erbaceo e arbustivo. Il tipo di ambiente e di

copertura è omogeneo su tutta l'isola, ma nonostante ciò si è ritenuto opportuno campionare in tutte le zone dell'isola, in maniera casuale.

Licosa (33T 491525 4455637 Datum wgs84) è una piccola isoletta (fig. 6), di 4,8 ettari, che dista dalla costa cilentana di appena 200 metri ed è abitata dalla sottospecie *P. s. klemmeri* Lanza e Capolongo, 1972.

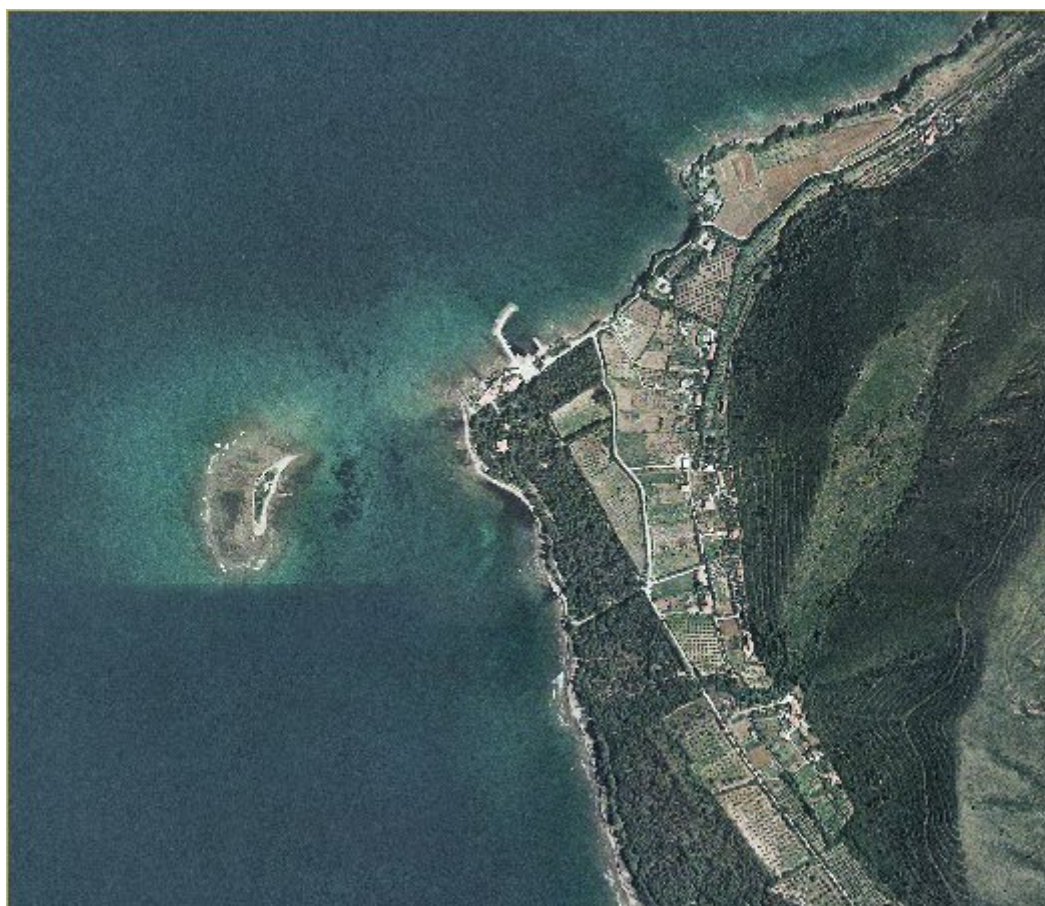


Figura 6 - foto aerea e IGM (scala 1:15.000) di Licosa

Questa popolazione, già in passato oggetto d'interesse da parte degli studiosi, oggi gode di protezione indiretta: Punta Licosa ed il suo isolotto, per la splendida conformazione della costa e l'unica pineta di Pino d'Aleppo (*Pinus halepensis*) del meridione, si trovano in zona A di massima protezione del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, nonché in riserva naturale, tra l'altro in un'area privata. Purtroppo l'area è soggetta al fenomeno incontrollato del turismo marino e da diporto: per quanto sul promontorio costiero sia controllato strettamente l'accesso, l'isola è frequentata direttamente da mare. Anche le barche di cooperative private portano turisti

sull'isolotto, in quanto questo ospita un sito archeologico di resti romani, dal porto semisommerso, alle vasche di piscicoltura in mare. Il melanismo delle lucertole dell'isola e la frequentazione da parte dei turisti, fanno sì che la popolazione di *P. sicula* mostra comportamenti di addomesticazione: gli animali sono molto confidenti e presentano una bassa tendenza alla fuga, tipica invece della specie. Secondo racconti dei locali, i turisti vengono spesso spronati a fornire cibo alle lucertole, per poterne osservare la tipica colorazione melanica. Questo comportamento confidente delle lucertole ha facilitato il campionamento: il lavoro è stato svolto principalmente nella piattaforma di cemento sottostante il faro, dove la densità della popolazione è molto elevata e l'accessibilità è consentita. Il resto dell'isola, infatti, è coperto da macchia mediterranea bassa a portamento cespuglioso molto fitto oppure è costituito da sassi e scogli degradanti in mare continuamente inondati dall'acqua, che offrono vie di fuga alle lucertole.

Ustica (33T 341527 4285628 Datum wgs84; fig. 7) è un'isola vulcanica nella cui morfologia, infatti, si riconoscono ancora tre centri eruttivi relitti; in



Figura 7 - foto aerea e IGM (scala 1:50.000) di Ustica

realtà rappresenta la cima di un apparato vulcanico sommerso la cui base si

ISOLA D' USTICA

TIRRENO

Punta del Gorgo Sella

VILLAGGIO PREISTORICO

Scoglio dei Medici

Punta Testa del Rosso

CALA DELLA MADONNA

CALA DEL CAMPOSANTO

CALA GIACONE

VILLAGGIO DEI PESCATI

CALA S. MARIA

Capo Fanciano

Punta Omo Mario

Punta S. Paolo

Punta Solera

Grotta Verde

Punta Galletta

Piacine Naturali

Punta Grotte

Punta dello Sparanone

Punta di Megro

Scoglio Poietze

Grotta delle Barche

Grotta Azzurra

Scoglio Poietze

Approfondimenti condotti durante la ricerca hanno determinato la necessità di considerare campioni provenienti da altre popolazioni, estranee a quelle descritte.

38

Nell'indagine tesa a ricostruire la provenienza della popolazione dell'Isola di Licos, sono stati considerati altri siti sulla costa cilentana, siti di plausibili

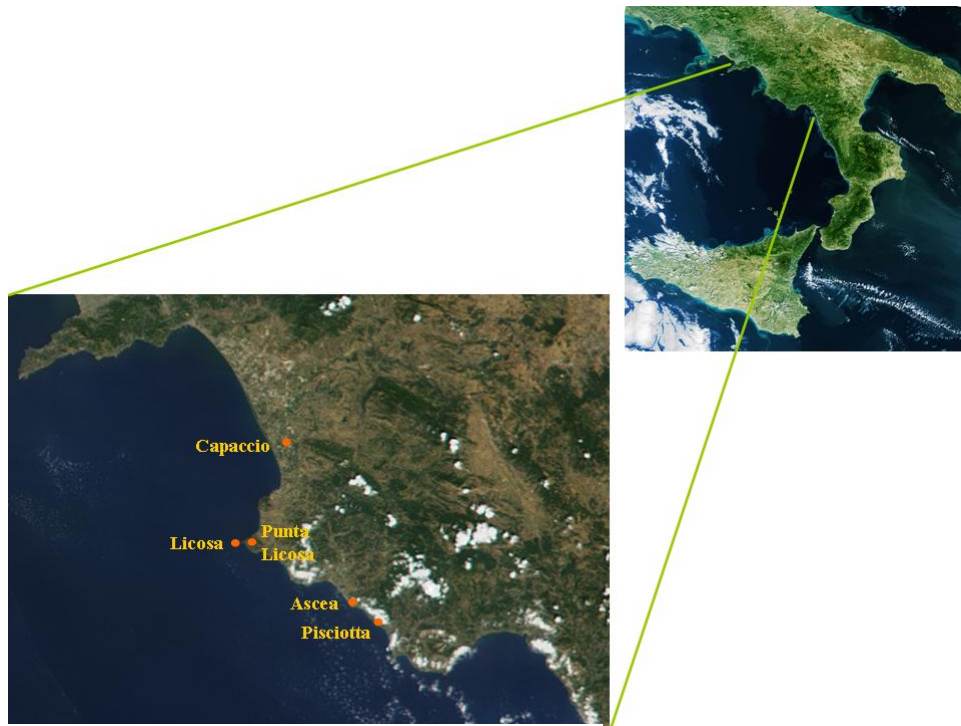


Figura 9 - popolazioni continentali cilentane, considerate nella ricerca per approfondimenti

popolazioni madri. Sulla base del traffico marino di pescatori che frequentano l'area intorno all'isola ed in considerazione delle correnti marine che si registrano nella zona, sono state individuate quattro popolazioni putative poste poco più a Nord, poco più a Sud ed in corrispondenza dell'isola lungo la costa: Capaccio, Punta Licosa, Ascea e Pisciotta (fig. 9).

I.3 Criteri metodologici

I.3.1 Filogeografia

La disciplina recentissima della filogeografia, nata nel 1988 (Bermingham & Moritz), che affonda le sue radici nella biogeografia storica e nella genetica di popolazione, consente di saggiare e valutare le congruenze tra i percorsi evolutivi, demografici, distributivi dei vari *taxa* e gli assetti geologici ed ecografici dei contesti geografici; in tal modo la filogeografia tenta di determinare la cronologia degli eventi evolutivi e di approfondire la biogeografia regionale e le aree *hot spot* di endemismi (Avise *et al.*, 1987). Così la filogeografia è stata indicata come il ponte empirico e concettuale tra gli studi dei processi micro- e macroevolutivi (Bermingham & Moritz, 1988). Per la sua versatilità nelle indagini di diversa natura ha proliferato velocemente, soprattutto nel campo della Conservazione della Natura.

I.3.2 Coalescenza

Metodi di analisi filogenetica che permettono la ricostruzione di alberi sono basati su caratteri omologhi tra le specie. Le assunzioni implicite in tali circostanze, quali che le specie siano riproduttivamente isolate, con discendenza mediata da eventi lineari e dicotomici di speciazione (Rosenberg & Nordborg, 2002), non sono soddisfatte se si inferiscono processi evolutivi nucleotidici che ricadono nella sfera intraspecifica: in tali situazioni, infatti, il fuoco è spostato su una scala evolutiva più recente, che implica che gli stati ancestrali potrebbero ancora esistere, che multiple apomorfie possano essere presenti e che possano essere coinvolti anche processi ricombinativi (Crandall & Templeton, 1993).

Il processo coalescente, un potente strumento di modellistica di genetica di popolazione, affronta al meglio la questione nell'ambito intraspecifico. Questo

rappresenta un metodo stocastico di genetica di popolazione noto da 15 anni (Kingman, 1982a e b) e oramai correntemente usato, che addirittura viene ritenuto essenziale per chiunque voglia analizzare dati di polimorfismo genetico di popolazione (Nordborg, 2000). La coalescenza analizza la genealogia di un campione di alleli, ricostruendone il passato. Gli stati allelici dei geni sono determinati dalla storia evolutiva e da quella mutazionale delle copie alleliche. Questo approccio fonda sulla realizzazione che è più semplice inferire la genealogia indietro nel tempo, per poi imporre all'albero ricostruito le mutazioni selettivamente neutrali. In altre parole, laddove tutti gli strumenti di genetica di popolazione classica considerano il futuro di una popolazione da un determinato punto di partenza, il coalescente considera il presente e tiene conto del passato. In tal senso l'approccio coalescente si basa su due principi fondamentali: il primo costituisce la possibilità di separare i processi di mutazione neutrale, dai processi genealogici, in quanto per definizione le varianti selettivamente neutrali non interferiscono con il successo riproduttivo; il secondo afferma la possibilità di ricostruire un albero genealogico di un gruppo di individui indietro nel tempo, senza preoccuparsi del resto della popolazione (Nordborg, 2000). Inoltre, l'approccio basato sulla teoria della coalescenza rappresenta un potente strumento di simulazione che permette di considerare qualsiasi scenario, di saggiare un'ipotesi ed analizzare i dati sperimentali alla luce della simulazione. In pratica, quindi, in un albero genealogico probabilistico, costruito seguendo la genealogia a

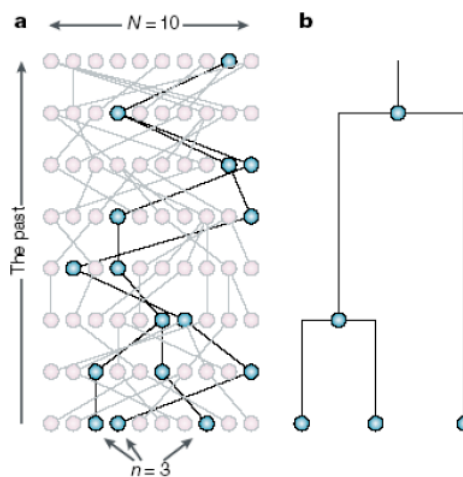


Figura 10 – schema di ricostruzione genealogica mediante la Teoria della Coalescenza. Da Nordborg, 2000

partire dalle generazioni attuali nel loro passato, le linee genealogiche non si interromperanno mai, a differenza di quanto accade con gli strumenti di genetica di popolazione classica. Piuttosto nel processo di coalescenza le linee genealogiche diminuiranno in numero, fino a convergere in una sola, nel

momento in cui si raggiunge il più recente progenitore comune (MRCA, *Most Recent Common Ancestor*; Robberts *et al.*, 2004; Nordborg, 2000). In tal modo, nell'albero ricostruito sono escluse tutte le differenze genetiche neutrali tra gli individui. Le dinamiche evolutive delle varianti alleliche neutrali possono essere inferite mediante il cosiddetto “*mutation dropping*”: gli stati allelici sono assegnati alle generazioni originali, in particolare al MRCA, nel modo più congruente e le linee dei discendenti seguite in avanti nel tempo, tenendo in conto che la prole eredita gli stati allelici della generazione parentale, a meno che non ci siano mutazioni.

L'applicazione della teoria della coalescenza alle problematiche evoluzionistiche sia a livello di popolazione sia a livello di specie ha riscontrato una repentina e vasta applicazione in diversi settori degli studi biologici.

I.4 Metodologie

I.4.1 Acquisizione dei dati

I.4.1.1 Campionamento

Per ciascuna popolazione campionata sono stati catturati ed analizzati mediamente 20 individui. Solo nel sito di Diamante non è stato possibile raggiungere tale *standard*. In tabella I viene riportato il quadro completo dei campioni raccolti, per ciascun sito, con riferimento alle tre isole e ai siti considerati per gli approfondimenti specifici.

La cattura è stata effettuata mediante la classica tecnica del cappio, del tutto innocua per le lucertole. Per ciascun individuo catturato, sono stati raccolti i dati morfologici, biometrici e cromatici, ed è stato prelevato un frammento di tessuto dalla coda per l'analisi genetica, sfruttando la capacità di autotomia che caratterizza questi Rettili; inoltre, ogni individuo è stato ripreso con una fotocamera digitale (*Nikon Coolpix E995*), per la costruzione di un archivio fotografico da cui ricavare i tratti fenologici di difficile interpretazione immediata. Tutti i dati raccolti sono stati registrati in apposite schede e i tessuti organici sono stati conservati in etanolo assoluto. Le lucertole sono state sempre rilasciate vive.

Per ciascun sito si è provveduto alla georeferenziazione, mediante l'uso di un GPS (Garmin modello GPS12) in sistema di coordinate di tipo UTM, datum ED1950.

Tabella I - consistenza del campionamento nelle tre isole di indagine (Cirella, Licosa e Ustica) e nei 6 siti continentali degli approfondimenti

SITO	N
CIRELLA	23
LICOSA	40
USTICA	19
DIAMANTE	6
PUNTA LICOSA	23
PALERMO	23
ASCEA	16
CAPACCIO	46
PISCIOTTA	21
TOTALE	217

I.4.1.2 Analisi morfologiche

La variabilità morfologica in *Podarcis sicula* è stata valutata considerando due ordini di caratteri, già discussi nel precedente capitolo (cfr. paragrafo I.1.2): quelli che determinano un profilo biometrico e quelli che descrivono un profilo cromatico di ciascun individuo.

I.4.1.2.1 Biometria

La storia degli studi basati sui caratteri biometrici degli animali si rivela lunga: anche nei Lacertidi si analizzano tali parametri quali caratteri discriminativi di popolazioni, (Losos *et al.*, 1998; Gübitz *et al.*, 2000; Sá-Sousa *et al.*, 2000; 2002; Faraone, 2001; Macedonia *et al.*, 2002; Crochet *et al.*, 2003; Bruschi *et al.*, 2006).

La scelta dei parametri biometrici da utilizzare è stata in prima istanza guidata da una ricerca bibliografica e secondariamente da saggi preliminari, utili all'individuazione dei parametri con elevata capacità discriminativa. Dal panorama dei parametri utilizzati da altri studiosi, dunque, sono stati esclusi, per questa ricerca, quelli che apparivano costanti tra gli individui, quelli che apparivano dipendenti da altri fenomeni (ad esempio, autotomia della coda), quelli che apparivano ridondanti, così come tutti quei parametri che hanno mostrato autocorrelazione nel processo discriminativo durante le elaborazioni

Tabella II - parametri biometrici considerati nella ricerca

TESTA	SP	Larghezza massima delle squame parietali
	LMT	Larghezza massima della testa
	AT	Altezza massima della testa
	RO	Larghezza massima del <i>pileus</i> , dalla squama rostrale alla squama occipitale
ZAMPA ANTER.	AG	Lunghezza compresa tra l'attaccatura della zampa anteriore ed il gomito
	GD	Lunghezza compresa tra il gomito e la commessura tra il quarto e il quinto dito della zampa anteriore
	DAM	Lunghezza del quarto dito della zampa anteriore
ZAMPA POSTER.	CS	Lunghezza della coscia, dal margine interno della fila dei pori femorali al ginocchio
	ZP	Lunghezza dello zigopodio della zampa posteriore, dal ginocchio al calcagno
	T	Lunghezza del tarso, dal calcagno alla commessura tra il secondo e il terzo dito
TRONCO	AI	Distanza ascella-inguine dal margine posteriore dell'attaccatura della zampa anteriore al margine posteriore della fila dei pori femorali del medesimo lato
	MC	Distanza muso-cloaca dalla squama rostrale alla apertura cloacale

preliminari. Si è dato spazio, quindi, ai parametri scheletrici, che offrono un supporto osseo rigido durante la misurazione, a parte i casi in cui si identificano due estremi di riferimento particolarmente riconoscibili, quali particolari squame o i pori femorali.

Per ciascun individuo sono state rilevate con un calibro di precisione le misure relative a 12 parametri biometrici; in tabella II sono riportati i parametri con le relative sigle, che si rifanno agli schemi della lucertola riportati nella figura 11.

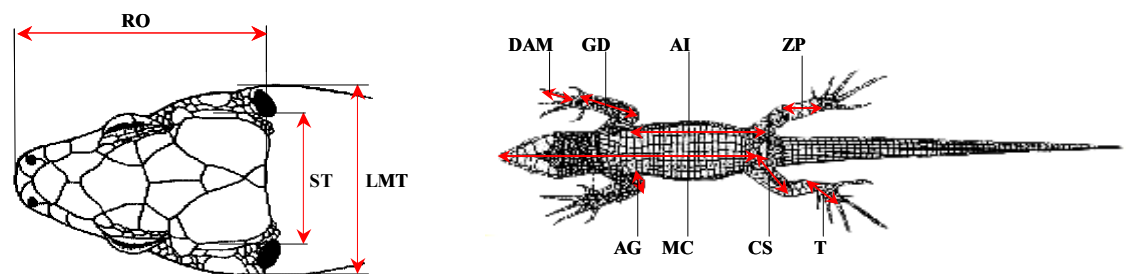


Figura 11 - rappresentazione dei parametri biometrici misurati sulle lucertole

I.4.1.2.2 Cromatismi

L'analisi dei caratteri cromatici è stata condotta valutando quattro settori corporei: capo, dorso, ventre e fianco, in cui sono stati identificati i parametri cromatici. L'analisi è stata effettuata quasi interamente mediante osservazione e fotointerpretazione delle immagini che costituiscono la collezione fotografica: ogni individuo è stato ripreso in diverse fotografie per assicurare l'osservazione di tutti i quattro compartimenti corporei. La consultazione delle fotografie digitali è stata condotta mediante il visualizzatore d'immagini della Nikon (*Nikon View 6 ver. 6.0.0*).

Anche nel settore cromatico, la scelta dei parametri da analizzare è stata effettuata su base bibliografica ed a seguito di elaborazioni preliminari dei dati. Questo percorso ha sostenuto l'analisi di tipo qualitativo, a differenza dai parametri del profilo biometrico: praticamente, ciascun settore corporeo considerato presenta uno o più stati possibili cromatici definiti mediante un

percorso di tipo dicotomico. I parametri relativi ai compartimenti ventrale e laterale si basano sulla pigmentazione di base; quelli relativi al capo fondano sia sul colore di fondo che sulla pigmentazione fine presente all'interno della squama. Infine nel compartimento dorsale viene valutato il *pattern* tipicamente della specie nelle sue numerose varianti, determinate dalla striatura o reticolatura o dalla maculatura, sul colore di fondo. Di seguito verranno descritti i possibili stati cromatici ricorrenti nei diversi settori corporei, con riferimenti ad immagini ed al percorso effettuato per identificare le diverse classi cromatiche. Ciascuno stato cromatico relativo ad un settore corporeo viene indicato con una sigla.

Per il settore corporeo relativo al **ventre**, per esempio, si determina la pigmentazione di base, che può essere o non essere uniforme: i colori di fondo riscontrati sono il bianco (B), il rosa (R), il verde (V), il celeste (C), l'azzurro intenso (A) ed il nero (N). A questi si aggiungono delle combinazioni generate dai fenotipi che presentano una pigmentazione centrale più chiara, che verso le regioni laterali si scurisce assumendo un altro colore: si ritrovano così anche i possibili stati dati dal bianco e dal rosa (BR), dal bianco e dal celeste (BC) dal bianco e dall'azzurro intenso (BA), dal bianco e dal nero (BN), dal celeste e

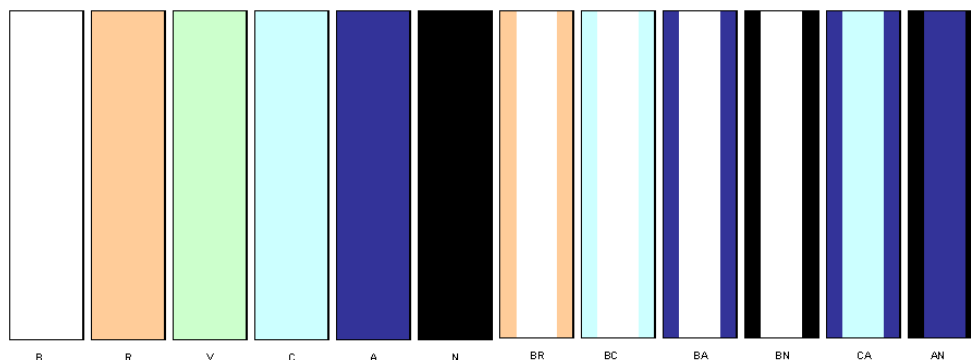


Figura 12 - rappresentazione schematica degli stati di colore del ventre riscontrati in *Podarcis sicula*. I colori sono del tutto indicativi; per le sigle si rimanda al testo

dall'azzurro intenso (CA), dall'azzurro intenso e dal nero (AN). Tutti questi stati sono schematizzati in figura 12.

Per quanto riguarda i **fianchi** è stata scelta soltanto la pigmentazione di base come carattere differenziativo. Per quanto le lucertole presentino un'elevata variabilità nei fianchi, dettata dall'espressione di differenti macchie

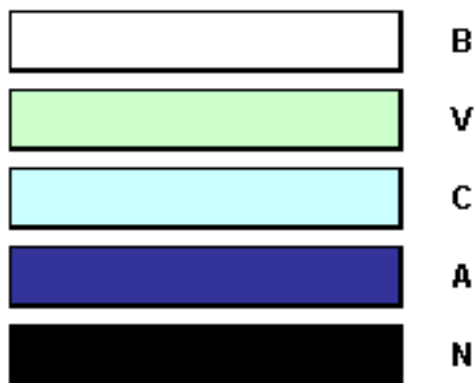


Figura 13 - rappresentazione schematica degli stati di colore del fianco riscontrati in *Podarcis sicula*. I colori sono del tutto indicativi; per le sigle si rimanda al testo

nelle squame, recenti ricerche (López *et al.*, 2004) hanno sostenuto una scarsa utilità di questi caratteri, nella discriminazione. D'altra parte preliminari studi, condotti durante il primo anno di dottorato in siti campione avevano già messo in evidenza il potere differenziativo del colore di fondo dei fianchi rispetto alla maculatura interna alla squama. In definitiva i possibili stati cromatici dei fianchi variano dal bianco (B), al verde (V), al celeste (C), all'azzurro intenso (A), fino al nero (N) e sono riportati nello schema di figura 13.

Per il settore relativo al **capo** dell'animale, si valuta innanzitutto il colore di fondo che può essere marrone (M), verde (V), marrone e verde contemporaneamente (MV), oppure azzurro intenso (A). Su questa base cromatica, le squame risultano screziate da macchioline più o meno grandi ed intense e distribuite in maniera più o meno omogenea all'interno delle squame stesse o sui loro bordi. Questo carattere rappresenta il secondo criterio differenziativo. Quindi ciascun colore di base può presentare quattro stati diversi: con screziature distribuite in modo omogeneo al centro delle squame (OI, Omogenee Interne) o sui bordi (OE, Omogenee Esterne) oppure con screziature distribuite in modo non omogeneo

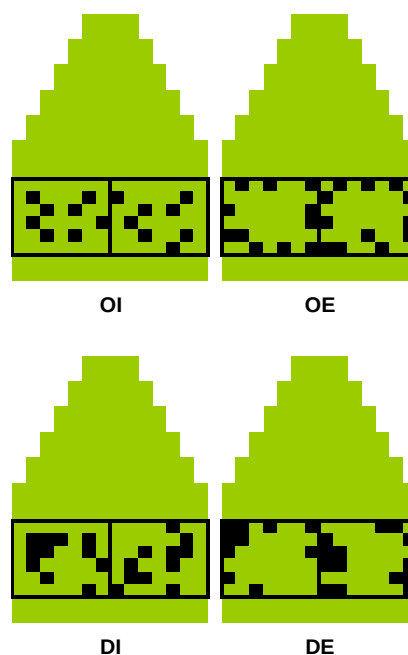


Figura 14 - schema delle possibili combinazioni di distribuzione delle macchie scure relativamente alle squame parietali della testa delle lucertole. Per le sigle si rimanda al testo

al centro (DI, Disomogenee Interne) o sui bordi delle squame (DE, Disomogenee Esterne). Lo schema dei 4 possibili stati, tralasciando i colori di fondo, è rappresentato in figura 14. Infine ciascun colore di fondo si può presentare anziché con macchie distribuite, abbinato ad un colore nero diffuso, che genera il fenotipo indicato con la N.

In ultimo, il **dorso**, con i suoi disegni possibili è la regione corporea che si presenta più variabile, con fenotipi non facilmente classificabili, in quanto

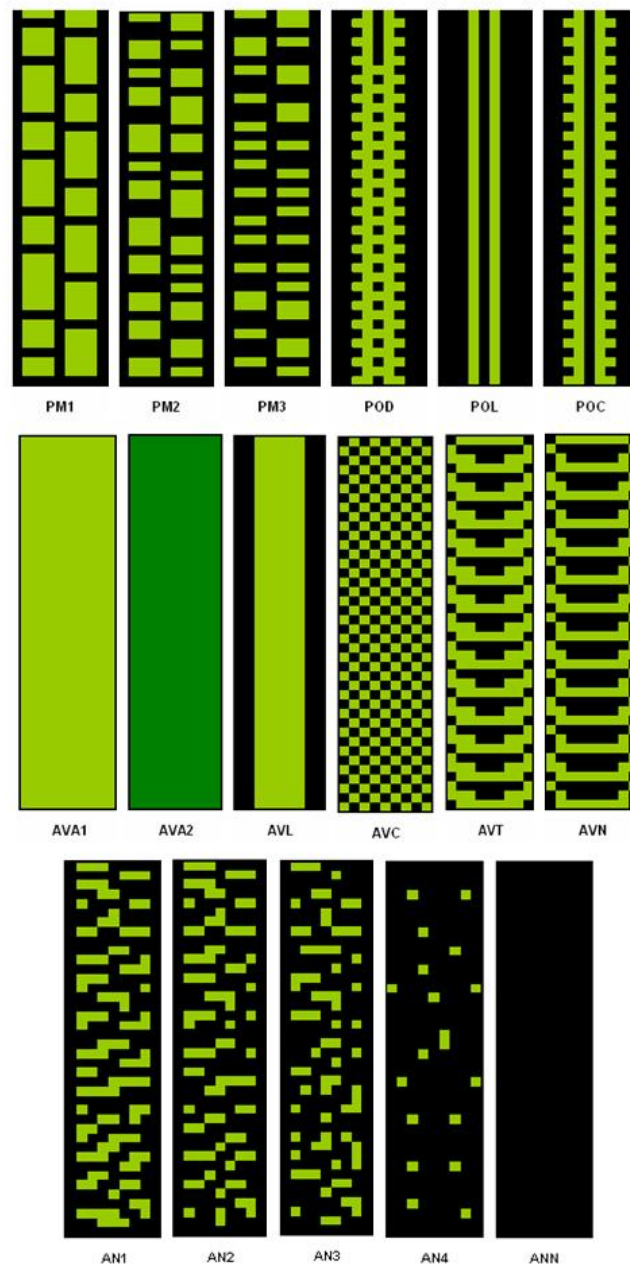


Figura 15 - schema dei *pattern* dorsali ricorrenti nei campioni di *Podarcis sicula*; per le codifiche delle sigle si rimanda alla figura 16

caratterizzati da un *continuum* di stati possibili: un *pattern* maculato, per esempio, leggermente più saturato di macchie, ricade facilmente in un'altra classe. Si è reso necessario, quindi, creare una vera e propria chiave interpretativa, descritta nella figura 16, che sfocia in 17 casi possibili (fig. 15). La prima caratteristica che viene valutata è la presenza o l'assenza della stria vertebrale, che definisce rispettivamente gli stati P e A. Se la stria dorsale è presente si analizza l'anastomosi di questa con le macchie delle strie dorsolaterali scure; in caso positivo si stima l'intensità delle macchie (M) e si definiscono tre stati: PM1, PM2, PM3. Viceversa nel caso in cui le macchie non tocchino la stria (O) ci si concentra su quest'ultima per valutare se è discontinua (POD), oppure continua con la presenza di strie dorsolaterali scure, generate da una maculatura intensa (POL) ovvero più lassa (POC). Tornando alla prima caratteristica considerata, qualora il fenotipo non mostri la stria centrale, si valuta la predominanza della pigmentazione di base, che può essere verde (V) o nera (N): il colore di fondo dipende dal numero, dalla forma, dalla grandezza delle macchie nere sulla base verde. Nel caso in cui predomini il verde può capitare che non ci siano macchie, dunque il disegno risulta assente (AVA1 e AVA2 a della tonalità di verde, che diventa progressivamente più scuro), ovvero si possono riconoscere solo le due fasce laterali (AVL), o, ancora delle macchie che generano una reticolatura pressoché perfetta (AVC) ed infine si possono ritrovare delle macchie disposte su file trasversali al piano antero-posteriore del corpo dell'animale (AVT). Progredendo con l'intensità e il numero delle macchie nere su fondo verde da questo *pattern*, facilmente si ricade nella classe di equivalenza dei due colori verde e nero (AVN). Progressivamente, poi il nero prevale rispetto al verde di fondo, per la saturazione del disegno (AN). Tra questi, i 4 possibili casi riscontrati vedono un'intensità crescente delle macchie (AN1, AN2, AN3, AN4), fino a sfociare nel fenotipo completamente nero, melanico (ANN).

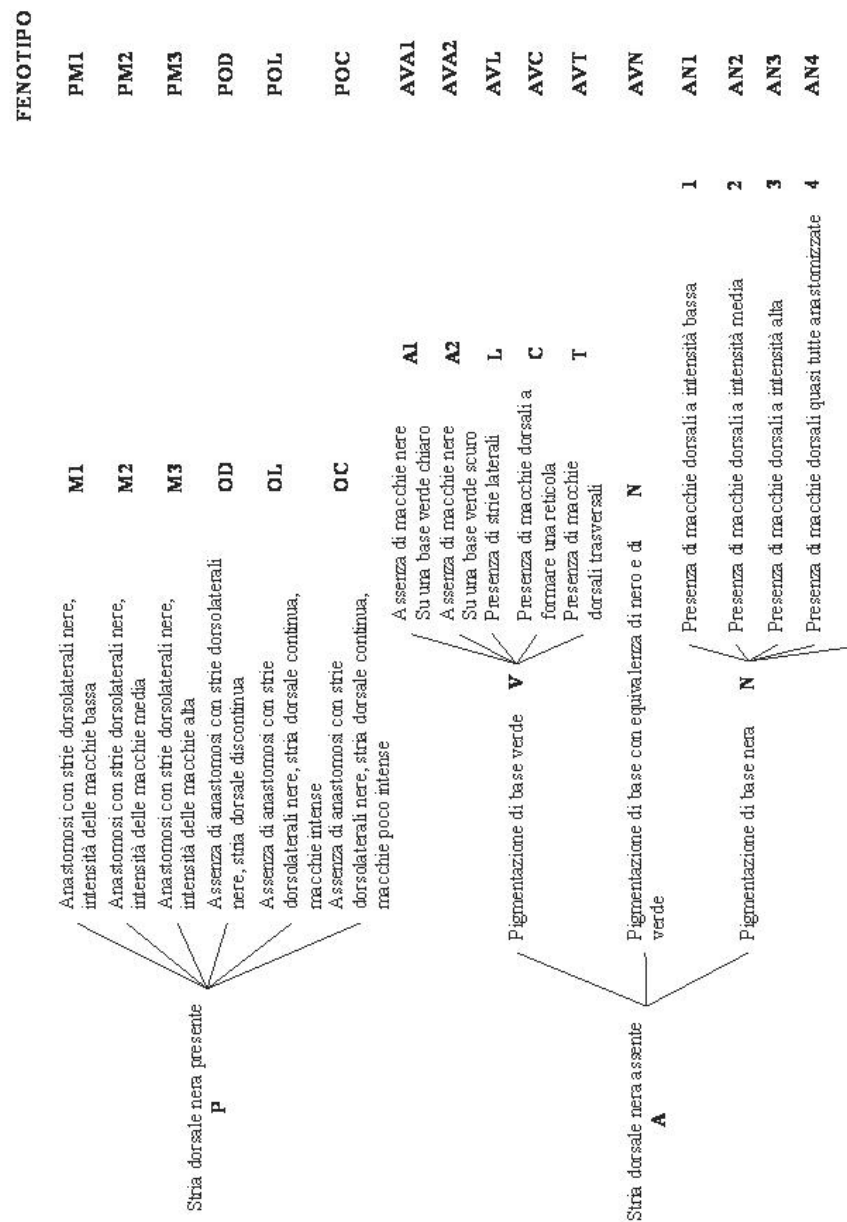


Figura 16 - chiave interpretativa per l'identificazione dei pattern dorsali di *Podarcis sicula*

I.4.1.3 Analisi molecolari

I.4.1.3.1 Scelta dei Marcatori molecolari

Per gli obbiettivi fissati in questa ricerca, necessariamente l'analisi con marcatori molecolari deve prevedere l'affiancamento di due diverse linee di introspezione, l'una che indaga a scala intrapopolazionistica e l'altra che

inferisce le relazioni interpopolazionistiche: se da una parte appariva importante indagare le relazioni matrilineari per una ricostruzione filetica, dall'altra non si poteva tralasciare l'informazione sulle peculiarità popolazionistiche in ragione di eventi ricombinativi. Solo in tal modo è stato possibile affrontare le diverse esigenze definite dagli obiettivi della ricerca. A tal fine l'analisi genetica è stata progettata secondo due linee d'indagine mediante due tipi di marcatori molecolari differenti. I primi sono rappresentati dai microsatelliti, interspersi nel DNA nucleare, il secondo è costituito da un tratto di un gene del DNA mitocondriale. I seguenti paragrafi riportano separatamente le fasi di analisi dei due tipi di marcatori.

I.4.1.3.2 Microsatelliti

I microsatelliti sono regioni ritenute non codificanti intersperse nel genoma degli eucarioti, maggiormente frequenti, appunto, nelle regioni genomiche non codificanti (Hancock, 1999): essi sono costituiti da corti motivi ripetuti, generalmente ciascun non più lungo di 6 basi, (Garza *et al.*, 1995). I motivi costituiti da dinucleotidi sono i tipi di microsatelliti più comunemente isolati, forse a causa della loro frequenza nei genomi degli eucarioti (Queller *et al.*, 1993), anche se i *loci* tri- e tetranucleotidi sono sempre più utilizzati, probabilmente in relazione all'avanzamento delle tecniche di isolamento (Gardner *et al.*, 1999). Dal momento che sono state trovate migliaia di volte in genomi di vertebrati e non sono riconosciute forme di espressione, i microsatelliti, in genere sono considerati dei marcatori neutrali, eccetto per i casi di *linkage* a geni funzionali (De Woody, 2005). I *loci* microsatelliti risultano essere ipervariabili, con un tasso di mutazione stimato tra 10^{-5} e 10^{-3} (McDonald & Potts, 1994). Le mutazioni si esprimono attraverso variazioni nella lunghezza del motivo ripetuto (Wright, 1994), per l'acquisizione o la delezione dei motivi. Ciò provoca, dunque, in genere livelli abbastanza alti di polimorfismo per lunghezza; infatti, la diversità genetica nei frammenti microsatelliti degli animali, espressa in numero di alleli e in eterozigosità in una popolazione, è generalmente alta (De Woody, 2005). Tale caratteristica rende i microsatelliti buoni marcatori molecolari codominanti negli studi di genetica delle popolazioni, facilmente analizzabili, in quanto gli alleli di

differenti lunghezze possono essere riconosciuti mediante tecniche semplici, quale è l'elettroforesi.

I meccanismi responsabili della propagazione e del mantenimento dei *loci* microsatelliti non sono noti definitivamente, ma due ipotesi sono le più accreditate. Il processo definito “*Slipped-Strand Mismatching*” (SSM) consiste in una denaturazione locale della doppia elica, un appaiamento scorretto dei filamenti con uno slittamento di alcune basi e la successiva rinaturazione. Nel *loop* che si forma per l'appaiamento slittato non ci sono riparazioni fino al successivo ciclo di replicazione: così si verifica l'aggiunta di un'unità ripetuta se il *loop* si trova sul filamento di allungamento e viceversa una delezione della stessa unità ripetitiva se si trova sul filamento stampo. Più lunga è l'unità ripetitiva maggiormente distorta dovrebbe essere la doppia elica allineata scorrettamente. Wells *et al.* (1967) hanno riscontrato che i tassi di inserzioni di unità ripetute diminuiscono quando il motivo ripetuto passa da 2 a 4 basi, in accordo con un principio di riduzione della distorsione nel DNA, per cui sono sfavoriti gli eventi che interessano distorsioni della doppia elica quanto più il motivo ripetuto è lungo.

L'altro meccanismo ritenuto responsabile dell'aumento del numero di ripetizioni del microsatellite avviene a livello cromosomico, piuttosto che molecolare: un *crossing-over* ineguale (Smith, 1976), o in mitosi o in meiosi. Tale processo, dunque, richiede un appaiamento dei cromatidi in modo scorretto, una stabilizzazione di tale appaiamento ed un riallineamento sul filamento opposto seguito dal *crossover*.

I microsatelliti rappresentano marcatori molto versatili, che possono essere utilizzati per affrontare questioni a differenti scale tassonomiche, da quelle specifiche ed interspecifiche (Longmire *et al.*, 1993) a livello parentale (McDonald & Potts, 1991; Kellogg *et al.*, 1995; Primmer *et al.*, 1995) a livello di popolazione (Dallas *et al.*, 1995; Gibbs *et al.*, 1996). Un'altra caratteristica dei microsatelliti che li rende marcatori molto agevoli è di essere fiancheggiati da regioni di DNA altamente conservate, con tassi di mutazioni molto bassi, entro le quali è possibile disegnare *primers* utili all'amplificazione delle regioni centrali più variabili. Tale caratteristica permette l'identificazione dei

primers da utilizzare nella ricerca mediante la metodologia definita “*Cross-Species Amplification*” (CSA), evitando in tal modo procedure dispendiose in termini economici e di tempo (Mc Donald & Potts, 1994), quali la costruzione di *library* genomiche, l’analisi tramite cloni, il sequenziamento dei cloni contenenti *tandem repeats* e lo sviluppo dei *primers* per l’amplificazione (Zane *et al.*, 2002). La metodica utilizzata anche in questo lavoro del CSA consiste nel valutare ed in caso positivo nell’usare *primers* costruiti per altre specie filogeneticamente correlate alla specie d’interesse (Moore *et al.*, 1991; Zardoya *et al.*, 1996; Fields & Scribner, 1997; Galbusera *et al.*, 2000) proprio in relazione al basso tasso di mutazione della regione. La probabilità che i *primers* eterologhi riescano ad amplificare è inversamente proporzionale al tempo di divergenza dei *taxa* considerati (Primmer *et al.*, 1996).

Al fine di interpretare la variabilità genetica nel numero di ripetizioni dei *loci* microsatellite è necessario capire i processi che determinano la variazione anche al livello di popolazione. I cambiamenti possono essere spiegati sia a livello molecolare, come i meccanismi di mutazione o il tasso di mutazione, sia a livello popolazionale, con deriva genetica e selezione (Nauta & Weissing, 1996). Esistono due modelli che incorporano mutazioni e deriva genetica e che spiegano la variabilità genetica nei microsatelliti. L’*Infinite Allele Model* (IAM) assume che ciascuna mutazione dia origine ad un nuovo allele (Shriver *et al.*, 1993) generando potenzialmente un numero infinito di alleli. Lo *Stepwise Mutation Model* (SMM), al contrario considera i possibili stati allelici come multipli di un numero discreto, rappresentato dall’unità ripetitiva del microsatellite. Simulazioni al computer hanno mostrato che tale modello spiega bene le variabilità a carico di un dinucleotide, rispetto a tri-esanucleotidi, la cui variabilità a livello popolazionale è descritta meglio dal IAM (Shriver *et al.*, 1993). I due modelli sono stati anche descritti come fasi di un unico modello, in cui la maggior parte delle mutazioni sono a piccole fasi come descritto da SSM, ma alcune sono caratterizzate da cambiamenti in lunghezza estremi, derivanti da UCO (*Unequal Crossing Over*; Jin *et al.*, 1996).

I.4.1.3.3 DNA mitocondriale

Per gli aspetti della ricerca che riguardano le ricostruzioni filetiche e

filogeografiche ci si è rivolti, al DNA mitocondriale (mtDNA). Gli studi filogeografici intraspecifici, che rivelano *pattern* di variazione risultanti da barriere storiche o recenti al flusso genico tra le popolazioni, iniziarono proprio usando l'mtDNA (Avice, 2000). Tale molecola, infatti, soddisfa alcuni criteri specifici richiesti dal tipo di introspezione, quali fra gli altri di essere facilmente isolabile, di essere presente nelle cellule in copie multiple e di avere una struttura genica piuttosto conservata in tutti i vertebrati superiori e piuttosto semplice, priva di sequenze ripetute, di elementi trasponibili, di pseudogeni ed introni. Inoltre, la molecola esprime bene diversi stati qualitativi di un carattere in modo che le interrelazioni tra gli individui possono essere inferite mediante criteri di parsimonia. E' ben noto che il mtDNA è trasmesso in modo diretto, senza subire ricombinazione ed altri meccanismi di riarrangiamento genetico (Brown *et al.*, 1979; Vawter *et al.* 1986); la maggior parte, quindi, dei cambiamenti genetici consistono in sostituzioni nucleotidiche ed in alcuni casi in delezioni/inserzioni. Questo comporta che i segnali molecolari di deriva genetica siano particolarmente robusti (Avice, 2004).

Infine, un'altra caratteristica che rende il mtDNA un sistema molecolare per così dire ideale per determinati studi è rappresentato dall'elevato tasso evolutivo (da 1 a 10 volte più elevato di quello medio del DNA nucleare a singola copia): nuovi stati di un carattere analizzato possono essere rinvenuti anche durante lo sviluppo di una specie (Avice *et al.*, 1987).

Le caratteristiche descritte fin qui, però, determinano anche alcuni limiti potenziali e/o reali a carico del marcatore molecolare, che è necessario tener presente quando si lavora con il mtDNA. Esiste la possibilità di processi di omoplasia dovuta a fenomeni di transizione di base che si ripetono in alcuni siti nucleotidici nell'intervallo di tempo che intercorre dalla separazione di due linee. Ma questo problema viene generalmente superato dal momento che gli studi basati sul mtDNA considerano diverse centinaia di paia basi, spesso anche appartenenti a porzioni genomiche diverse: similitudini diffuse vengono verosimilmente attribuite a relazioni parentali piuttosto che a fenomeni di evoluzione convergente. D'altra parte sono stati messi a punto metodi che permettono il riconoscimento ed il trattamento di casi di omoplasie in

situazioni di dubbia attribuzione degli aplotipi (Awise & Lansman, 1983).

Non sono pochi gli studi che hanno messo in luce il potere del mtDNA per le ricostruzioni filogenetiche nella famiglia Lacertidae a diversi livelli (Thorpe *et al.*, 1993; 1994; Castilla *et al.*, 1998; Fu, 1998; Harris *et al.*, 1998a; 1998b; 2002; Pinho *et al.*, 2003; Busack *et al.*, 2005; Podnar *et al.*, 2005; Poulakakis *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006) e più nello specifico tra alcune popolazioni di *Podarcis sicula* (Oliverio *et al.*, 1998; Oliverio *et al.*, 2001; Capula, 2003; Lo Maggio *et al.*, 2005). I marcatori più frequentemente utilizzati ricadono in tratti del 12S rDNA, del 16S rDNA, e del citocromo b. In questa ricerca si è scelto di adottare come marcatore mitocondriale; un tratto del gene che codifica per la subunità 12S del ribosoma (12S rDNA); la scelta di tale regione è dipesa anche dall'esigenza di permettere confronti tra le popolazioni oggetto di studio ed altre della stessa specie, oggetto di altri studi. Un'attenta ricerca bibliografica ha indicato la disponibilità di numerose sequenze complete del 12S rDNA depositate in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) non solo di diversi individui della specie in generale ma anche di alcune sottospecie riconosciute.

I.4.1.3.4 Procedure di laboratorio

Estrazione del DNA ed Elettroforesi in gel di agarosio

L'estrazione del DNA è stata ottenuta attraverso la rottura meccanica di 3 mm³ di tessuto muscolare della coda, lisi degli organuli, eliminazione delle proteine e successiva purificazione del materiale genomico ottenuto; tale procedura è stata eseguita mediante l'uso di un kit di estrazione GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich) seguendo il protocollo descritto dalla casa produttrice. Il tessuto muscolare privato delle squame e tagliuzzato viene risospeso in una soluzione di lisi contenente sali caotropici e proteinasi K. Durante la digestione della durata di circa 4 ore a 55°C, i preparati sono stati più volte agitati e pestellati. Al termine di questa fase, viene aggiunta per un'incubazione di 10 minuti a 70°C un'altra soluzione di lisi cellulare. Per l'isolamento del DNA genomico vengono effettuati dei lavaggi successivi del lisato in etanolo puro, in appositi microtubi pre-assemblati dotati di filtri membranosi silicei preventivamente attivati. Infine,

dopo un lavaggio ulteriore con una soluzione che rimuove i contaminanti, l'eluizione del DNA è stata effettuata in 200 µl di H₂O bidistillata sterilizzata.

Il risultato della procedura di estrazione del DNA genomico totale è stato verificato attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio. La concentrazione di agarosio utilizzata è pari allo 0.8-1% in TBE 1X, al quale viene aggiunto 1/100 del volume in µl di EtBr (10mg/ml), per poter visualizzare le molecole di DNA sotto irraggiamento con la luce ultravioletta: il DNA contenuto nei campioni, attraversando il gel di agarosio durante la corsa elettroforetica, assume il EtBr che si intercala fra le basi nucleotidiche ed emette fluorescenza all'UV. Un'aliquota di 6,0 µl di campione viene caricata nei pozzetti del gel e viene fatta migrare sotto l'effetto di un campo elettrico. Le molecole a doppio filamento migrano con una velocità inversamente proporzionale al log₁₀ del loro peso molecolare. Contemporaneamente in un pozzetto viene caricato anche un marcatore di peso molecolare noto che genera quindi bande di dimensioni note, ad altezze fisse nel gel. Nel caso specifico il *ladder* utilizzato è da 1kb genera 11 frammenti ciascuno di 500 paia di basi di differenza dai due più vicini. In tal modo è possibile ottenere anche una stima quantitativa di DNA estratto.

Amplificazione dei frammenti di DNA

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) rappresenta un potente strumento per effettuare e replicazioni di tratti di DNA *in vitro*. Tale processo è altamente sensibile al punto tale da riuscire ad estrarre singole molecole di DNA o singoli geni o pezzi di geni dall'intero DNA genomico e amplificarlo numerose volte (Innis & Gelfand, 1990). Parallelamente quindi ad una replicazione naturale, gli stampi sono costituiti da filamenti singoli ottenuti mediante denaturazione a temperature alte (prossime ai 90°C). In un termociclatore si effettuano programmi di amplificazione specifici costituiti per grandi linee da cicli che si ripetono, dopo la denaturazione iniziale. Ciascun ciclo è costituito da una fase di denaturazione, seguita da una fase di appaiamento dei *primers* (*annealing*) scelti in modo da essere omologhi a sequenze presenti sullo stampo e l'ultima fase di allungamento (*extention*) del DNA copia. La replicazione avviene grazie all'azione della Taq polimerasi, enzima ormai proveniente

dall'eubatterio termofilo *Termus aquaticus*, che proprio per la sua provenienza è stabile anche alle temperature elevate. Il numero dei cicli di polimerizzazione del DNA varia in funzione del protocollo specifico, in genere tra i trenta ed i quaranta; attraverso il susseguirsi di tali cicli si ottiene una replicazione esponenziale di tratti lunghi anche fino a 1-3 kb.

L'uso di due tipi di marcatori differenti, nucleari e mitocondriale, ha determinato la necessità di protocolli di lavoro differenti. Per questo motivo le procedure verranno descritte separatamente.

Frammenti microsatelliti

Su base di ricerche bibliografiche e avvalendosi della banca dati genomica telematica GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sono stati identificati dei *primers* microsatelliti sintetizzati per specie affini a *Podarcis sicula*, ovvero in particolare disegnati per *Lacerta agilis* e per *Podarcis muralis*. Sono stati provati sui campioni di DNA di *P. sicula* 5 *primers* di *L. agilis* denominati con la sigla **La** e 5 *primers* di *P. muralis* denominati con un codice alfanumerico: di questi, 8 *primers* hanno amplificato nella specie d'interesse frammenti

Tabella III - sequenze dei *primers* valutati; gli asterischi indicano i *primers* che hanno amplificato frammenti nucleari polimorfi

	Sequenza del primer Forward	Sequenza del primer Reverse
La 1	5' – AGGTTTCCTGGCTTGGAG – 3'	5' – ATTTGCACAAAACAGCAGC – 3'
*La 2	5' – GCTTAAATTGGAACCAGATTG – 3'	5' – AAGCAGCCAGAACACAGAG – 3'
*La 3	5' – AGTAGGAGCGAGAAGAATCAG – 3'	5' – GACATATGGCAGAAGAGCAG – 3'
*La 4	5' – CATGAGCAAAGCAATGAGC – 3'	5' – TGGAATGTGTCTATTGAACCTCTG – 3'
*La 6	5' – GACTGGCGCATTCTATAAAAC – 3'	5' – GCCTTAAAGGGCCATCAG – 3'
*A 7	5' – TGCTTATGGGTGATGACTGG – 3'	5' – AGAATTGCAGAGGTGGAAGG – 3'
*B 3	5' – CTGTCCTCTCACAGTTCCTCC – 3'	5' – AAAGAGCTAAGAAGCGAAGACC – 3'
*B 4	5' – AATCTGCAATTCTGGGATGC – 3'	5' – AGAAGCAGGGGATGCTACAG – 3'
B 6	5' – CTGCTGCTTCAATCACACTC – 3'	5' – GCCTTGCCTCTCCAGAAC – 3'
*D 1	5' – GAGTGCCCAAGACAGTTGTAT – 3'	5' – GAGGTCTTGAATCTCCAGGTG – 3'

microsatelliti effettivamente polimorfi. Nella tabella III vengono riportate le sequenze dei *primers* valutati.

Per ciascun *locus* microsatellite sono state messe a punto le condizioni di amplificazione, partendo dalle informazioni bibliografiche e adattandole per permettere la reazione su *P. sicula*. Per i *loci* microsatelliti amplificati con *primers* **La**, di *L. agilis*, si è partiti dal protocollo di amplificazione descritto da Gullberg *et al.* (1997). Per gli altri *loci* microsatelliti si è fatto riferimento ai

protocolli descritti da Nembrini e Oppliger (2003). Quindi, sono state effettuate amplificazioni per tutti gli individui di ciascuna popolazione considerata. In tabella IV sono riportate le reazioni allestite per i 10 *loci* microsatelliti.

Tabella IV - protocolli di reazioni di amplificazione per i *loci* microsatelliti

	La 1	La 2	La 3	La 4	La 6	A 7	B 3	B 4	B 6	D 1
DNA template (ng)	100	200	100	100	200	100	100	100	100	100
Tampone (X)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
MgCl₂ (mM)	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
dNTPs (nM)	400,0	400,0	200,0	400,0	400,0	400,0	250,0	200,0	250,0	400,0
Primer (μM)	1,0	1,0	0,5	0,8	1,0	0,8	1,3	0,8	1,3	0,8
Taq polimerasi (U.E.)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume finale (μl)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0

Di seguito, nella tabella V, sono riportati i programmi di amplificazione per i diversi frammenti microsatelliti.

Tabella V - programmi di amplificazione dei *loci* microsatelliti

	La 2	La 3	La 4	La 6	A 7	B 3	B 6	D 1
Denat. iniziale	94°Cx5 ^I	94°Cx5 ^I	94°Cx3 ^I	94°Cx3 ^I	95°Cx3 ^I	94°Cx3 ^I	94°Cx3 ^I	94°Cx3 ^I
Denaturazione	94°Cx45 ^{II}	94°Cx45 ^{II}	94°Cx30 ^{II}	94°Cx30 ^{II}	94°Cx45 ^{II}	94°Cx30 ^{II}	94°Cx30 ^{II}	94°Cx30 ^{II}
Appaiamento	54°Cx30 ^{II}	54°Cx30 ^{II}	60°Cx30 ^{II}	58°Cx30 ^{II}	60°Cx30 ^{II}	58°Cx30 ^{II}	58°Cx30 ^{II}	58°Cx30 ^{II}
Estensione	72°Cx30 ^{II}	72°Cx30 ^{II}	72°Cx30 ^{II}	72°Cx30 ^{II}	72°Cx30 ^{II}	72°Cx30 ^{II}	72°Cx30 ^{II}	72°Cx30 ^{II}
N° di cicli	40	32	32	33	35	33	33	33
Estens. finale	72°Cx10 ^I	72°Cx10 ^I	72°Cx10 ^I	72°Cx10 ^I	72°Cx10 ^I	72°Cx10 ^I	72°Cx10 ^I	72°Cx10 ^I

DNA mitocondriale

Anche l'amplificazione dei tratti di mtDNA d'interesse è stata effettuata mediante l'uso di *primers* pubblicati in bibliografia. Il primo tratto, nella regione 5' del gene 12S rDNA, è stato amplificato con *primers* riportati da Oliverio *et al.* (1998) ed avvalendosi del protocollo definito dallo stesso autore (Oliverio *et al.*, 2001). Il secondo tratto, posto nello stesso gene un po' più a valle, è stato amplificato con *primers* riportati da Knight e Mindell (1993), con un protocollo descritto da Podnar *et al.* (2005). Di seguito si riportano le sequenze dei 4 *primers* utilizzati:

12s_Luc_H 5'- AGAACAGGCTCCTCTAGG -3'
12s_Luc_L 5'- ATTCGTGCCAGCCAC -3'
H-981 5'- GTACACTTACCTTGTTACGACTT -3'
L-524 5'- AAACCTGGGATTAGATACCCCACTA -3'

Le due reazioni di amplificazioni sono state allestite e espletate come descritto successivamente (tab. VI e VII):

Tabella VI - protocolli di reazioni di amplificazione dei due tratti di mtDNA amplificato
 Tutte le amplificazioni

	12s reg. 5'	12s reg. 3'	sono state eseguite in
DNA template (ng)	100	100	termociclatori Duattec 96
Tampone (X)	1,0	1,0	wells.
MgCl ₂ (mM)	1,0	1,0	
DNTPs (nM)	0,3	0,3	Per verificare la riuscita
Primer (µM)	0,5	0,0	dell'amplificazione, i prodotti,
Taq polimerasi (U.E.)	0,5	0,5	
Volume finale (µl)	25,0	25,0	colorati con blu di

bromofenolo, sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio al 2% in

Tabella VII - programmi di amplificazione dei tratti di mtDNA analizzati
 TBE 1X, secondo gli stessi principi già descritti; così la

	12s reg. 5'	12s reg. 3'	visualizzazione è avvenuta su un
Denat. iniziale	93°Cx5 ^I	94°Cx2 ^I	transilluminatore UV ed i risultati
Denaturazione	94°Cx45 ^{II}	95°Cx10 ^{II}	sono stati fotografati mediante
Appaiamento	50°Cx1 ^I	50°Cx20 ^{II}	fotocamere digitali Fujifilm S5000
Estensione	72°Cx1 ^I	72°Cx1 ^I	e Olympus C200. I prodotti di
N° di cicli	30	35	amplificazione sono stati purificati
Estens. finale	72°Cx5	72°Cx7	per filtrazione, utilizzando il

GenElute™ PCR Clean-up kit della SIGMA o il GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit della Amersham Biosciences, seguendo i rispettivi protocolli indicati dalla casa. Nucleotidi, *primers* ed enzima in eccesso vengono così allontanati insieme alle impurità, aumentando notevolmente il grado di purezza del DNA, grazie all'uso di colonnine dotate di filtri contenenti una matrice fibrosa di vetro e di agenti caotropici che denaturano le proteine e favoriscono il legame del doppio filamento di DNA ai filtri. Il DNA purificato viene, quindi, eluito in un tampone a bassa forza ionica (TE, Tris-

HCl o acqua) ed è stato quantificato mediante stima in una nuova corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% in TBE 1X.

Da questo punto per i due tipi di marcatori molecolari sono state seguite procedure differenti. Per quanto riguarda i frammenti nucleari, dopo aver messo a punto il protocollo e dunque accertata l'avvenuta amplificazione, al fine di verificare l'effettiva presenza di un motivo ripetuto nel prodotto amplificato, il purificato è stato sottoposto a sequenza diretta; la procedura verrà descritta successivamente.

In tabella VIII sono riportati i motivi ripetuti rinvenuti in *P. sicula* affiancati a quelli pubblicati in bibliografia per ciascun *primer*, relativi alle specie su cui sono stati disegnati.

Tabella VIII - motivi ripetuti dei *loci* microsatelliti riscontrati nella ricerca a confronto con quelli riportati in letteratura

	Motivo ripetuto in	
	<i>Podarcis sicula</i>	Bibliografia
La 1	(CT) ₁₀ (AAC) ₂	(GT) ₁₄
La 2	(AT) ₈ (AC) ₈ GTG(AC) ₁₃	(GT) ₁₆
La 3	(CA) ₈	(GA) ₂₈
La 4	(CA) ₆ (CT) ₄ (AT) ₂ (CT) ₃ (GA) ₁₄	(GT) ₁₉
La 6	(GT) ₁₀ (AAT) ₃	(GT) ₁₇
A 7	(AG) ₁₃	(GT) ₁₈
B 3	(GA) ₈ TAGA(GA) ₁₃	(TAGA) ₃ (GA) ₁₄
B 4	(TA) ₄ (AG) ₆	(AG) ₁₆
B 6	(TC) ₁₆ (TG) ₉ (GA) ₄	(AG) ₂₂
D 1	(CTT) ₁₇	(CTT) ₁₆

Le fasi successive, che hanno riguardato i due tipi di marcatori, sono state:
per i frammenti microsatelliti, l'elettroforesi capillare e la valutazione degli alleli;

per i tratti di mtDNA, il sequenziamento diretto e il confronto fra le sequenze.

Elettroforesi capillare per i frammenti di DNA microsatellite

Gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti successivamente ad un'elettroforesi capillare per la visualizzazione dei frammenti amplificati e la determinazione della lunghezza dei singoli alleli. I criteri della procedura sono

simili a quelli dell'elettroforesi su gel, benché la sensibilità delle due versioni sia completamente differente. L'elettroforesi capillare, infatti, permette di discriminare la lunghezza di due frammenti che differiscono anche di una singola base nucleotidica.

Per fare ciò, verificata la presenza del motivo ripetuto, sono state effettuate amplificazioni in tutti gli individui delle diverse popolazioni con il *primer forward* fluorocromato all'estremità 5'. I fluorocromi utilizzati sono FAM ed HEX, a seconda dei casi.

Per lo *screening* dei frammenti microsatelliti è stata allestita una miscela di reazione per ciascun campione di 2 µl di prodotto di amplificazione, contenente 12,0 µl di formammide deionizzata e 0,4 µl di GENE SCAN 500 Rox (Applied Biosystem), un marcatore, che genera una rosa di 12 frammenti a peso molecolare noto. Il caricamento dei campioni nel sequenziatore automatico a singolo capillare ABI 3100 viene effettuato a seguito di una denaturazione.

I risultati della corsa elettroforetica sono visualizzati sotto forma di elettroferogrammi (fig. 17a), costituiti da picchi che restituiscono la lunghezza del frammento marcato con l'uno o l'altro fluorocromo. Sulla base della lettura dei picchi del marcatore, i *software* dedicati effettuano una taratura che permette di conoscere la lunghezza del frammento d'interesse. La lettura delle rispettive lunghezze e la compilazione delle matrici per l'elaborazione dei dati sono state effettuate mediante il *software* GENOTYPER 2.0.

Reazioni di sequenza ed analisi delle sequenze per il mtDNA

Circa 200 e 400 ng di prodotto di amplificazione, rispettivamente per i due tratti del 12S rDNA, sono stati necessari per allestire le reazioni di sequenza, secondo il metodo enzimatico di Sanger *et al.* (1977) modificato, utilizzando l'ABI BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, il cui enzima è l'AmpliTaq DNA polimerasi. Questo enzima è una forma mutante della Taq polimerasi, privo di attività nucleasica 5'→3' e con capacità di discriminare tra i didesossiribonucleotidi drasticamente ridotta.

La quantità di DNA necessaria per effettuare il sequenziamento viene portata a 2 µl di soluzione mediante essiccamento o risospensione in acqua

distillata, a seconda della concentrazione nel prodotto di purificazione; al DNA viene aggiunta una miscela di reazione con 1,0 µl di Big Dye, 1,0 µl di *primer* (*Forward* o *Reverse*) in concentrazione di 1,6 µM e 1,0 µl di H₂O, per un volume totale di 5,0 µl di soluzione. Le condizioni di sequenziamento sono le seguenti:

denaturazione a 96°C per 10 secondi

appaiaimento a 50°C per 5 secondi

estensione a 60 °C per 4 minuti

ripetute per un totale di 25 cicli.

Al termine dell'amplificazione il DNA viene fatto precipitare e purificato dai terminatori in eccesso, mediante l'aggiunta iniziale di 20,0 µl di H₂O, il doppio del volume di reazione di etanolo assoluto glaciale (50,0 µl) e 1/10 del volume di reazione di acetato di sodio (3M, pH 4.6). Dopo 30 minuti a -80°C, la miscela è stata centrifugata per 30 minuti a 12.000 rpm. Il precipitato è stato ulteriormente purificato mediante tre lavaggi consecutivi in etanolo al 70% in centrifuga per 20 minuti a 11.000 rpm, per essere infine essiccato sottovuoto dai residui alcolici. Ogni campione è stato poi risospeso in 12,0 µl di formammide deionizzata ed è stato così denaturato con un passaggio a caldo a

94°C per 3 minuti. Il DNA denaturato e risospeso è stato poi caricato in un sequenziatore automatico capillare

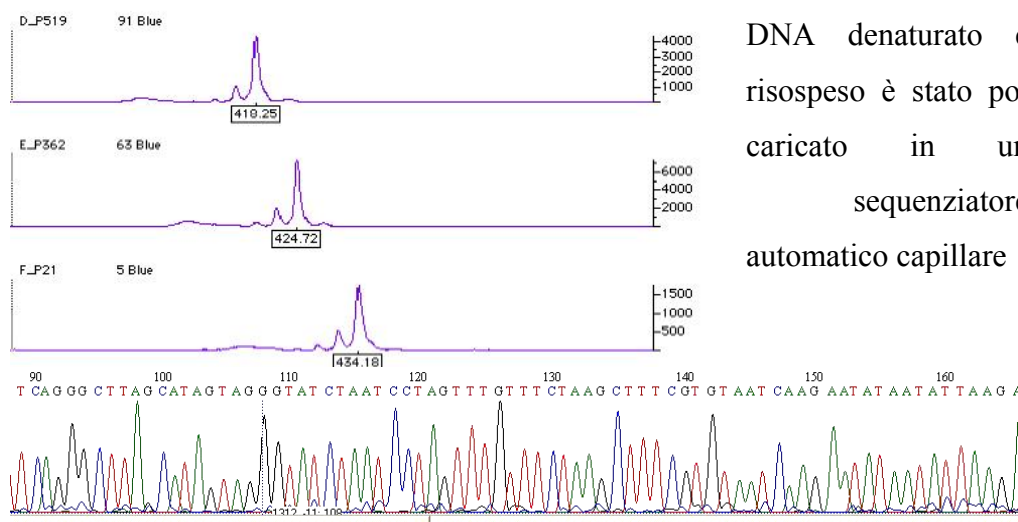


Figura 17 – esempi di elettroferogrammi: in a, i picchi indicano la lunghezza del frammento microsatellite; in b, una sequenza di un frammento di mtDNA

Applied Biosystem3100 (Perkin Elmer).

Le sequenze così ottenute, sotto forma di elettroferogrammi (fig. 17b), sono state analizzate mediante *software* che permettono la valutazione della qualità di ogni singola sequenza, il confronto di sequenze diverse, la correzione manuale degli errori compiuti dai sequenziatori automatici. In particolare mediante i programmi *Chromas* 20.1 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e *BioEdit* 5.0.9 (Hall, 1999; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) ogni sequenza è stata corretta a mano e poi allineata alle altre utilizzando l'algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994; Higgins *et al.*, 1996) implementato in *BioEdit*.

Le stesse procedure sono state applicate alle sequenze microsatelliti effettuate per verifica della presenza dei motivi ripetuti nel prodotto di amplificazione.

I.4.2 Elaborazioni

Le elaborazioni dei dati di diversa natura, fenotipici e molecolari, sono state effettuate mediante l'uso di *software* specifici per i diversi fini perseguiti. Di seguito saranno, quindi, richiamate le procedure su cui si basano i programmi utilizzati in relazione alla finalità di volta in volta perseguita.

I.4.2.1 Trattamento dei dati morfometrici e cromatici

Per rendere oggettive le eventuali variazioni caratterizzanti le tre popolazioni insulari sono state effettuate analisi fenotipiche, basate sulla morfometria e sui cromatismi. Le variazioni morfologiche tra le isole e tra ognuna di esse e le popolazioni della terraferma prospiciente sono state esaminate mediante analisi univariata (confronto tra medie di ogni singolo carattere, distribuzione dei caratteri nelle popolazioni) e multivariata (Analisi Fattoriale). Tra le tecniche di ordinamento fattoriale l'elaborazione è stata condotta mediante l'Analisi delle Componenti Principali (PCA, *Principal Component Analysis*), una trasformazione lineare che converte un *data set*

multidimensionale in un nuovo sistema di coordinate: in esso la più alta varianza di ciascuna proiezione dei dati ricade sulla prima coordinata, ovvero sulla prima componente principale, la varianza progressivamente più piccola sulla seconda componente principale e così via. Le diverse componenti principali sono estratte dalla procedura in modo da essere ortogonali e dunque indipendenti. L'analisi è stata condotta impostando una matrice di correlazione basata sui semplici coefficienti di correlazione, l'estrazione di tutti gli autovalori con valore superiore ad 1 e adottando una strategia di rotazione di tipo VARIMAX.

Prima dell'analisi è stata condotta una standardizzazione dei dati bruti, al fine di eliminare l'influenza della dimensione corporea sulle singole misure morfometriche. In accordo con la procedura indicata da Losos *et al.* (1998), è stata calcolata la retta di regressione di ogni variabile contro la dimensione Muso-Cloaca (MC) e per le successive analisi sono stati usati i residui dei valori di ogni campione rispetto alla retta calcolata.

I caratteri cromatici, invece, sono stati analizzati mediante una procedura multivariata di *Categorical Principal Component Analysis (CatPCA)*, cioè una variante della PCA che lavora con stringhe di dati non numerici. Attraverso una procedura di *recoding*, le variabili vengono ricodificate in variabili ordinali. In tale processo di discretizzazione non sono stati attribuiti pesi diversi alle variabili. Il *software* utilizzato per entrambe le procedure è stato SPSS (SPSS Inc., 2005).

1.4.2.2 Trattamento dei dati molecolari

Le analisi genetiche sono state condotte differentemente per l'informazione di sequenza (derivante dall'analisi del DNA mitocondriale) e per quella di frequenza allelica (DNA microsatellite).

Sequenze

Gli allineamenti delle sequenze sono stati condotti con l'algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994; Higgins *et al.*, 1996), implementato nel *software* BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999) e successivamente corretti manualmente. La

diversità nucleotidica è stata stimata mediante *MEGA3* (Kumar *et al.*, 2004; <http://www.megasoftware.net/>); l'individuazione degli aplotipi e le relative frequenze è stata condotta manualmente.

Mediante *Arlequin 3.1* (Excoffier *et al.*, 2005; <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>) un *software* che processa i dati genetici per estrarre informazioni sui sistemi di accoppiamento, sulla suddivisione delle popolazioni, sulla demografia trascorsa o sullo scostamento dalla neutralità per i loci considerati, sono state calcolate due stime della variabilità nucleotidica, θ_π (Nei & Li, 1979) e θ_s (Watterson, 1975). La diversità nucleotidica θ_π è basata sul numero medio di differenze nucleotidiche tra coppie di sequenze e θ_s è basata sulla proporzione di siti segreganti nel campione analizzato.

Un test di selezione neutrale è stato effettuato mediante il D di Tajima (1989):

$$D = \frac{\hat{\theta}_\pi - \hat{\theta}_s}{\sqrt{\text{Var}(\hat{\theta}_\pi - \hat{\theta}_s)}},$$

I due parametri θ_π e θ_s , pur riflettendo diversi tipi di informazioni, secondo il modello di mutazione di sequenze *Infinite Site Model*, dovrebbero essere uguali in condizioni di equilibrio in accordo con la teoria neutrale. Scostamenti da queste condizioni si riflettono sui valori dei due parametri e possono essere generati da selezione, eterogeneità nei tassi di mutazione o repentina crescita demografica. Il test di Tajima, quindi, paragona le differenze tra le due stime di θ .

La necessità di effettuare datazioni di divergenza tra popolazioni è stata affrontata mediante due approcci distinti: infatti, alla tradizionale datazione genetica è stata affiancata anche una simulazione di coalescenza dei genotipi.

La datazione genetica è stata basata sul tasso di mutazione del mtDNA ed è stata calcolata con il *software Arlequin 3.1* (Excoffier *et al.*, 2005) mediante l'algoritmo di Gaggiotti ed Excoffier (2000), in modo da rimuovere gli effetti di eventuali *bottleneck* e/o di differenti dimensioni effettive delle due

popolazioni di riferimento. Il parametro stimato dal modello risulta dalla risoluzione numerica di un sistema a tre equazioni non lineari con tre incognite: la prima stima la divergenza di tempo di separazione delle due popolazioni da una popolazione ancestrale, tarata attraverso il tasso di mutazione ($\tau = 2Tu$), un'altra stima la dimensione della popolazione ancestrale tarata per il tasso di mutazione ($\theta_0 = 4N_0u$) e l'ultima stima la dimensione relativa delle due popolazioni attuali (k e $[1-k]$).

La simulazione del processo di coalescenza che ha interessato le popolazioni esaminate è stata effettuata per individuare la differenza temporale tra la divergenza genetica e la divergenza popolazionistica ($T-\tau$; fig. 18).

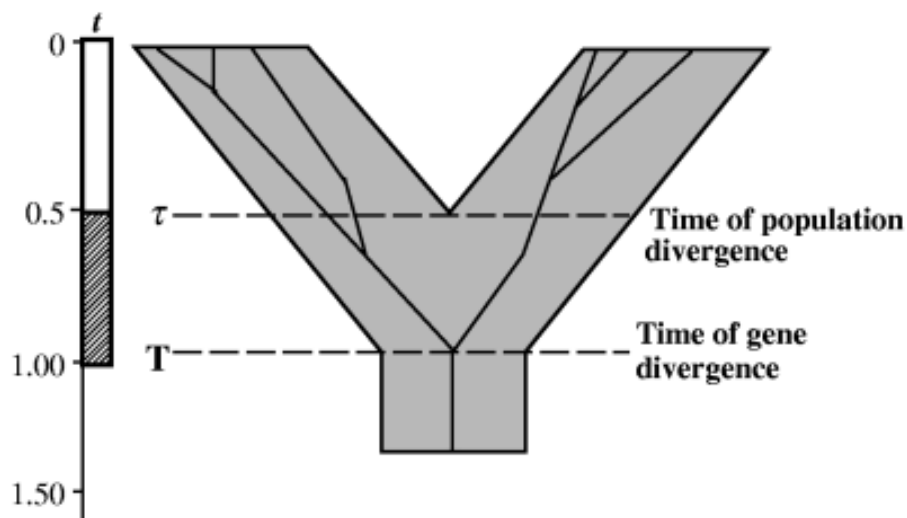


Figura 18 - schema di un albero filogenetico tra due popolazioni che sottende un albero filogenetico tra due geni. E' possibile osservare che il momento di divergenza genetica non coincide con quello in cui le due popolazioni si sono differenziate

Infatti, tale approccio tiene conto delle informazioni di polimorfismo e genealogia degli aplotipi considerati al fine di ripercorrere il processo demografico ed evolutivo a cui sono andate incontro le popolazioni. Tale procedura è stata effettuata mediante il *software Mesquite* v1.12 (Madison & Madison, 2006; <http://mesquiteproject.org>), che, conduce analisi filogenetiche (metodi di parsimonia, di *likelihood*, metodi comparativi, simulazioni ed alberi) analisi di genetica di popolazione mediante processi di coalescenza: attraverso simulazioni ricostruisce la genealogia dei geni, all'interno di un

albero filogenetico di popolazioni.

Frequenze alleliche

Per analizzare la struttura delle popolazioni e per avere informazioni sulla distribuzione dei genotipi microsatellite in condizioni di non equilibrio, si è proceduto ad un'analisi di agglomerazione di tipo bayesiano, derivata dai test di assegnazione tradizionali che lavorano con genotipi individuali *multiloci* (Paetkau *et al.*, 1995; Dawson & Belkhir, 2001). Tali metodi prima tentano di identificare probabilisticamente una popolazione in un *set* di dati genotipici provenienti da individui ad incrocio casuale: l'operazione viene effettuata in modo che il disequilibrio di Hardy-Weinberg, nonché quello gametico, dei dati di base siano minimizzati. L'eventuale allontanamento dall'equilibrio porta a separare la popolazione in sub-popolazioni. In tal modo gli individui, tutti di origine ignota, possono essere assegnati a potenziali popolazioni di origine tenendo conto della probabilità di questi all'interno di ciascuna popolazione campionata, così come viene definito dai dati genetici. Per tale analisi è stato utilizzato il *software STRUCTURE 2.0* (Pritchard *et al.*, 2000a; Falush *et al.*, 2003; <http://pritch.bsd.uchicago.edu>).

Il programma implementa un modello di agglomerazione per inferire la struttura di un gruppo di genotipi costituiti da marcatori *no-linked*. La matrice dei genotipi viene analizzata come un'unica popolazione senza alcuna informazione sulla provenienza degli individui. L'individuazione di strutture "probabili" viene effettuata sulla base delle caratteristiche genotipiche. Gli individui del campione vengono assegnati su base probabilistica, mediante una serie di iterazioni, ad un gruppo o ad un altro o parzialmente a due o più gruppi, indicando in tal caso che sono individui "misti". In tal modo si procede assegnando gli individui a gruppi di coerenza distinti ed identificando individui migranti e misti e comparando tali gruppi con la struttura popolazionistica originaria. Nella procedura di assegnazione si tende a creare gruppi di genotipi che siano all'equilibrio di Hardy-Weinberg e all'equilibrio di *linkage*. La procedura è stata ripetuta impostando ad ogni elaborazione un diverso numero di gruppi di coerenza (K), che dovrebbero corrispondere alle popolazioni di appartenenza dei genotipi. La probabilità associata ai diversi modelli di

struttura derivanti è stata valutata per scegliere quello a maggiore *likelihood*. Secondo una simulazione a Catena di Monte Carlo sono state effettuate 1.000.000 replicazioni con un *burn-in periods* di 10.000 repliche. La scelta del modello di struttura più congruente, viene effettuata sulla base della consultazione di due parametri nell'ambito dei risultati, $\log \Pr(X/K)$ e α , l'*admixture parameter* (Pritchard *et al.*, 2000b), che informa sul grado di correttezza nell'assegnazione dei genotipi alle K popolazioni richieste, mediante un valore crescente man mano che aumenta la proporzione di genotipi appartenenti a più gruppi. Praticamente viene preferita l'iterazione in cui K, il numero di gruppi di coerenza richiesto, sia il più basso valore che cattura la maggior parte della struttura dei dati di partenza e α presenti il valore più basso.

I.5 Risultati

I.5.1 Formalizzazione delle variazioni

I.5.1.1 Morfologia e cromatismi

Per l'analisi dei caratteri fenotipici, sono stati considerati in tutto 81 campioni, provenienti dalle isole e dalla costa prospiciente. Di questi 23 sono provenienti da Cirella, 6 da Diamante, 29 da Licoso, 5 da Punta Licoso, 18 da Ustica e 23 da Palermo, distinti in Monte Pellegrino e Capo Gallo.

La tabella IX riporta il numero di campioni, il valore medio e la deviazione standard, i valori minimo e massimo per ciascuna misura morfometrica considerata. Vengono anche considerati due campioni separati rispetto al sesso degli individui. In tabella X sono riportati gli stessi parametri, calcolati per le tre isole, sia per ogni popolazione intera, sia separatamente per maschi e per femmine.

Tabella IX - valor medio $\pm$ deviazione standard, valori minimo e massimo per ogni parametro biometrico considerato, per i campioni delle popolazioni insulari. N indica il numero di campioni considerato

	TUTTE LE POPOLAZIONI									
	TOTALI				MASCHI			FEMMINE		
	MEDIA e DEV ST	MIN-MAX	N		MEDIA e DEV ST	MIN-MAX	N	MEDIA e DEV ST	MIN-MAX	N
SP	8,0 $\pm$ 1,3	6,0-12,2	76		8,6 $\pm$ 1,0	7,0-10,2	45	7,1 $\pm$ 1,0	6,0-12,2	31
LMT	10,2 $\pm$ 2,0	7,0 -14,3	99		11,2 $\pm$ 1,5	7,8-14,3	68	8,0 $\pm$ 0,6	7,0-9,3	31
RO	17,4 $\pm$ 2,4	8,5-22,1	99		18,5 $\pm$ 2,0	12,1-22,1	68	15,0 $\pm$ 1,5	8,5-16,7	31
AT	7,7 $\pm$ 1,3	5,3-12,0	99		8,4 $\pm$ 1,1	6,0-12,0	68	6,3 $\pm$ 0,5	5,3-7,3	31
AG	7,9 $\pm$ 1,5	5,1-15,9	99		8,2 $\pm$ 1,7	5,1-15,9	68	7,1 $\pm$ 0,6	6,0-8,7	31
GD	10,5 $\pm$ 1,8	1,8-18,0	98		11,3 $\pm$ 1,7	7,5-18,0	67	9,3 $\pm$ 0,9	7,3-11,0	31
AI	37,5 $\pm$ 4,9	27,6-50,0	99		36,8 $\pm$ 5,3	27,6-50,0	68	39,0 $\pm$ 3,4	29,8-43,3	31
CS	12,8 $\pm$ 2,0	6,7-16,4	99		13,5 $\pm$ 1,8	7,9-16,4	68	11,1 $\pm$ 1,4	6,7-13,4	31
ZP	11,7 $\pm$ 1,7	7,7-15,4	99		12,5 $\pm$ 1,4	8,5-15,4	68	9,9 $\pm$ 0,8	7,7-11,4	31
T	6,5 $\pm$ 0,9	4,6-9,2	99		6,8 $\pm$ 1,0	5,0-9,2	68	6,1 $\pm$ 0,5	4,6-6,9	31
MC	72,2 $\pm$ 6,6	52,0-88,0	99		73,2 $\pm$ 6,5	61,0-88,0	68	69,9 $\pm$ 6,2	52,0-82,0	31
DAM	7,8 $\pm$ 1,1	4,0-11,1	99		8,1 $\pm$ 1,1	6,2-11,1	68	7,1 $\pm$ 0,9	4,0-8,3	31

Tabella XI - valor medio $\pm$ deviazione standard, valore minimo e valore massimo per ogni parametro biometrico considerato, per tutti i campioni di ciascuna delle popolazioni insulari. N indica il numero di campioni considerati

CIRELLA										LICOSA										USTICA											
TOTALI					FEMMINE					TOTALI					FEMMINE					TOTALI					MASCHI						
MEDIA e		MASCHI		N	MEDIA e		FEMMINE		N	MEDIA e		TOTALI		N	MEDIA e		FEMMINE		N	MEDIA e		TOTALI		N	MEDIA e		TOTALI		N		
DEV	ST	MIN	MAX		DEV	ST	MIN	MAX		DEV	ST	MIN	MAX		DEV	ST	MIN	MAX		DEV	ST	MIN	MAX		DEV	ST	MIN	MAX		DEV	ST
SP	7,4 $\pm$ 1,0	6,0	9,9	22	8,07 $\pm$ 1,0	7,0	9,9	10	6,8 $\pm$ 0,4	6,0	8,5	12	8,6 $\pm$ 1,4	6,8	8,6	20	9,5 $\pm$ 0,5	7,7	10,1	10	8,1 $\pm$ 1,6	6,8	12,2	10	8,1 $\pm$ 1,0	6,4	8,1	18	8,5 $\pm$ 0,8	6,4	10,1
LMT	8,6 $\pm$ 1,3	7,0	8,6	22	9,5 $\pm$ 1,2	7,8	11,6	10	7,7 $\pm$ 0,5	7,0	9,8	12	9,7 $\pm$ 1,5	7,5	9,7	20	11,1 $\pm$ 0,4	8,9	11,7	10	8,7 $\pm$ 0,6	7,5	9,3	10	10,2 $\pm$ 1,4	7,8	10,2	18	10,7 $\pm$ 1,0	7,8	12,1
RO	15,9 $\pm$ 2,5	8,5	15,9	22	17,8 $\pm$ 1,8	15,6	20,2	10	14,3 $\pm$ 2,0	8,5	18,0	12	18,2 $\pm$ 2,7	14,9	18,2	20	20,7 $\pm$ 0,8	16,3	22,0	10	16,6 $\pm$ 0,7	14,9	16,7	10	17,7 $\pm$ 2,4	13,1	17,7	18	18,6 $\pm$ 1,9	13,1	20,1
AT	6,8 $\pm$ 0,8	5,3	6,7	22	7,2 $\pm$ 0,9	6,0	8,7	10	6,4 $\pm$ 0,6	5,3	7,2	12	7,5 $\pm$ 1,3	5,7	7,5	20	8,7 $\pm$ 0,7	6,4	9,8	10	6,8 $\pm$ 0,5	5,7	7,3	10	8,3 $\pm$ 1,4	6,5	8,3	18	8,8 $\pm$ 1,2	6,7	12,0
AG	7,5 $\pm$ 1,0	6,0	7,5	22	8,1 $\pm$ 1,1	6,0	9,7	10	7,0 $\pm$ 0,6	6,1	8,4	12	8,3 $\pm$ 1,5	6,5	8,3	20	9,2 $\pm$ 1,6	7,3	13,0	10	7,7 $\pm$ 0,4	6,5	7,9	10	8,1 $\pm$ 1,2	6,0	8,1	18	8,5 $\pm$ 1,0	6,0	10,7
GD	10,3 $\pm$ 1,6	7,5	10,3	22	11,4 $\pm$ 1,7	7,5	13,5	10	9,4 $\pm$ 0,7	8,0	10,4	12	10,0 $\pm$ 2,8	1,8	10,0	20	10,7 $\pm$ 3,9	1,8	18,0	10	8,0 $\pm$ 0,8	7,3	10,2	10	10,4 $\pm$ 1,6	7,4	10,4	18	11,0 $\pm$ 1,2	7,7	12,7
AI	37,7 $\pm$ 3,0	32,4	37,7	22	37,5 $\pm$ 3,0	33,6	41,4	10	37,8 $\pm$ 3,2	32,4	42,4	12	41,3 $\pm$ 2,6	35,5	41,3	20	42,0 $\pm$ 2,3	37,6	44,7	10	41,2 $\pm$ 2,7	35,5	43,3	10	39,0 $\pm$ 3,9	29,8	39,0	18	39,7 $\pm$ 3,3	29,8	45,7
CS	11,4 $\pm$ 1,8	8,7	11,4	22	12,6 $\pm$ 1,9	9,2	14,5	10	10,4 $\pm$ 1,0	8,7	13,8	12	12,8 $\pm$ 1,9	9,0	12,8	20	13,8 $\pm$ 2,2	9,0	16,3	10	12,4 $\pm$ 1,0	9,8	13,4	10	13,1 $\pm$ 1,6	10,0	13,1	18	13,7 $\pm$ 1,3	10,0	16,0
ZP	10,8 $\pm$ 1,4	9,1	10,8	22	11,9 $\pm$ 1,3	9,4	13,2	10	9,9 $\pm$ 0,5	9,1	13,0	12	11,1 $\pm$ 1,4	8,5	11,1	20	12,1 $\pm$ 1,4	8,5	13,6	10	10,6 $\pm$ 0,4	9,4	10,7	10	11,3 $\pm$ 1,6	7,7	11,3	18	12,0 $\pm$ 0,9	7,7	13,2
T	6,5 $\pm$ 0,8	5,0	6,5	22	7,1 $\pm$ 0,6	5,9	7,8	10	6,1 $\pm$ 0,5	5,0	7,8	12	6,8 $\pm$ 0,9	5,4	6,8	20	7,4 $\pm$ 0,9	5,7	8,8	10	6,3 $\pm$ 0,5	5,4	6,9	10	6,8 $\pm$ 0,8	4,6	6,8	18	7,1 $\pm$ 0,4	4,6	7,9
MC	67,4 $\pm$ 4,5	60,0	67,5	22	67,7 $\pm$ 5,2	61,0	77,0	10	67,3 $\pm$ 4,1	60,0	77,0	12	79,4 $\pm$ 4,9	69,0	79,4	20	82,9 $\pm$ 3,2	78,0	88,0	10	77,8 $\pm$ 3,4	69,0	82,0	10	72,2 $\pm$ 6,4	52,0	72,2	18	74,4 $\pm$ 3,5	52,0	79,0
DAM	7,5 $\pm$ 1,3	4,0	7,5	22	8,3 $\pm$ 0,7	7,0	9,2	10	6,8 $\pm$ 1,2	4,0	9,2	12	8,0 $\pm$ 1,0	7,0	8,0	20	8,7 $\pm$ 1,0	7,0	10,0	10	7,7 $\pm$ 0,5	7,0	8,0	10	8,6 $\pm$ 1,1	6,0	8,6	18	213,6 $\pm$ 0,9	6,0	10,0

Tabella X - varianza degli oggetti spiegata dai fattori principali estratti dalla PCA durante varie fasi della procedura. La varianza complessiva spiegata dai primi tre assi ammonta al 63,6%

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings			Rotation Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	4,013	30,867	30,867	4,013	30,867	30,867	3,464	26,643	26,643
2	3,019	23,222	54,089	3,019	23,222	54,089	3,097	23,825	50,467
3	1,241	9,546	63,635	1,241	9,546	63,635	1,712	13,168	63,635
4	,876	6,738	70,373						
5	,778	5,983	76,356						
6	,719	5,534	81,890						
7	,510	3,925	85,815						
8	,481	3,703	89,518						
9	,433	3,328	92,846						
10	,367	2,824	95,670						
11	,258	1,984	97,654						
12	,237	1,821	99,475						
13	,068	,525	100,000						

Extraction Method: Principal Component Analysis.

L'analisi fattoriale delle misure morfometriche, condotta secondo la procedura delle Componenti Principali, ha

Tabella XII - valori di communalità iniziale ed estratta dalla PCA

	Initial	Extraction
C	1,000	,765
ST	1,000	,863
LMT	1,000	,873
RO	1,000	,619
AT	1,000	,506
AG	1,000	,609
GD	1,000	,396
AI	1,000	,681
CS	1,000	,395
ZP	1,000	,675
T	1,000	,638
LT	1,000	,742
DAM	1,000	,512

spiegato il 63,6% della varianza cumulativa nelle prime tre componenti (tab. XI); i valori di

communalità per ciascuna variabile, riportati nella tabella XII, sono superiori a 0,5 fuorché per due parametri, la distanza gomito-dito (GD, 0,396) e la lunghezza della fascia dei pori femorali (CS, 0,395). I grafici riportati nelle figure 19, 20, 21 e 22, rappresentano la distribuzione spaziale degli oggetti nello spazio tridimensionale delle prime tre componenti: rispettivamente vengono riportati gli ordinamenti degli individui delle 6 popolazioni

e successivamente l'ordinamento di ciascuna isola con la popolazione della terraferma prospiciente (per Cirella Diamante, per Licosa Punta Licosa, per Ustica Palermo).

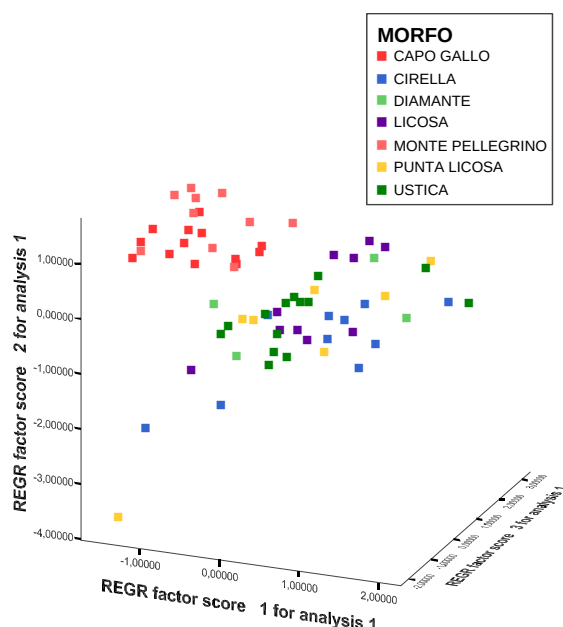


Figura 19 - ordinamento in PCA degli individui delle sei popolazioni analizzate, sulla base dei parametri morfometrici, nello spazio tridimensionale definito dai primi tre fattori principali

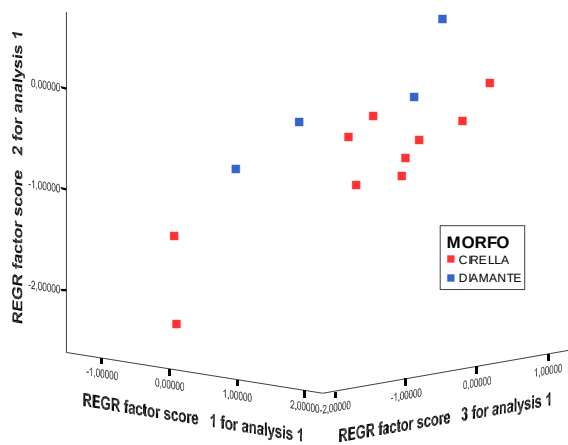


Figura 20 - ordinamento in PCA degli individui di Cirella (isola) e di Diamante (terraferma), sulla base dei parametri morfometrici, nello spazio tridimensionale definito dai primi tre fattori principali

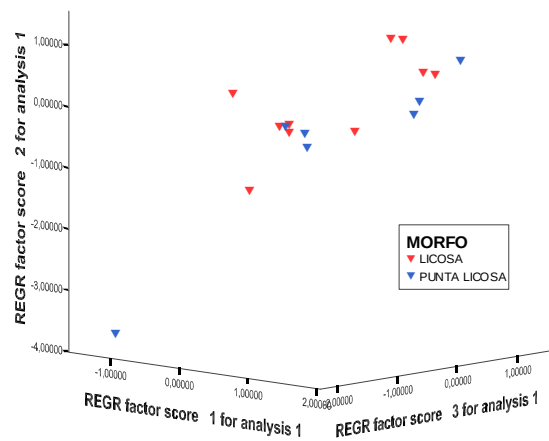


Figura 22 - ordinamento in PCA degli individui di Licosa (isola) e di Punta Licosa (terraferma), sulla base dei parametri morfometrici, nello spazio tridimensionale definito dai primi tre fattori principali

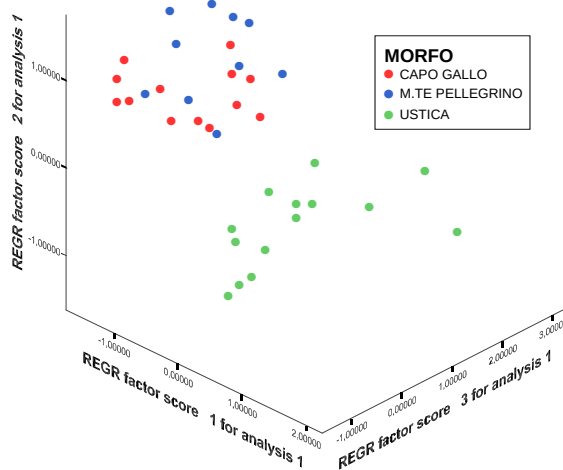


Figura 21 - ordinamento in PCA degli individui di Ustica (isola) e di Palermo (terraferma), sulla base dei parametri morfometrici, nello spazio tridimensionale definito dai primi tre fattori principali

Dai grafici riportati si evince un isolamento dei campioni siciliani, rispetto alle altre popolazioni (fig. 19) ed in particolar modo, nei confronti a coppie si deduce la differenziazione di Ustica dalla popolazione della terraferma, di

Palermo (fig. 22). Nessun'altra discriminazione tra le popolazioni viene evidenziata a carico della morfometria.

In tabella XIII sono riportate le frequenze dei fenotipi cromatici ricorrenti nelle tre isole per i diversi stati dei quattro compartimenti corporei; nei grafici di figura 23a, b, c e d sono riportate le frequenze di ciascun fenotipo, rispettivamente per ventre, fianco, capo e dorso, ricorrenti in ciascuna isola. Dalle percentuali si evince che il ventre celeste (C) con una rappresentatività del 28,9% è il più comune, con il fenotipo bianco (B, 21,1%); tutti gli altri sono di uno (fenotipo azzurro intenso, A) o addirittura due ordini di grandezza in meno. Anche nei fianchi si riconosce più spesso il fenotipo celeste (C, 40,0%) seguito dal verde (V, 26,3%) e dall'azzurro intenso (A, 22,5%). Il capo più frequente si presenta a fondo verde e nero (VN, 26,2%), mentre il capo marrone con screziature sia omogenee sia disomogenee all'interno della squama (MOI, MDI) presenta in

entrambi i casi una frequenza del 18,0%. Infine, il dorso più comune nelle tre isole sembra essere privo di linea dorsale, con macchie nere trasversali sul fondo verde (AVT, 13,8%), seguito da tre tipologie di fenotipi dorsali che mostrano la stessa frequenza (12,5%): uno con la stria

dorsale e quelle laterali anastomizzate in diversi punti (PM3), un altro mancante di qualsiasi disegno dorsale (AVA1), l'ultimo privo di stria dorsale con parità di verde e nero (AVN).

Per quanto riguarda, invece, il confronto fra i fenotipi delle tre isole per il comparto ventrale (fig. 23a), Cirella presenta soprattutto individui con fenotipo

Tabella XIII - frequenze percentuali dei fenotipi riscontrati in *Podarcis sicula*, per i quattro settori corporei analizzati. Per la spiegazione delle sigle dei fenotipi si faccia riferimento al paragrafo I.4.1.2

VENTRE		FIANCO		CAPO		DORSO	
Fenot.	%	Fenot.	%	Fenot.	%	Fenot.	%
B	21,1	B	2,5	VM	4,9	PM2	5,0
V	1,1	V	26,3	MOI	18,0	PM3	12,5
C	28,9	C	40,0	MDI	18,0	POD	6,3
A	14,4	A	22,5	MDE	4,9	POL	3,8
R	7,8	N	8,8	VOI	9,8	POC	1,3
N	1,1			VOE	1,6	AVA1	12,5
BC	3,3			VDI	13,1	AVA2	3,8
BA	7,8			VDE	3,3	AVL	1,3
BR	2,2			VN	26,2	AVC	5,0
BN	2,2					AVT	13,8
CA	8,9					AVN	12,5
AN	1,1					AN1	7,5
						AN2	5,0
						AN3	2,5
						AN4	6,3
						ANN	1,3

celeste (C, 35%), mentre Licosa presenta un'alta rappresentatività del ventre azzurro intenso (A, 45%); Ustica, infine, evidenzia il 100% degli individui a ventre bianco (B). I fianchi sono celesti o verdi a Cirella (C e V, rispettivamente 52 e 39% negli istogrammi di figura 23b), soprattutto azzurri intensi a Licosa (A, 59%) e soprattutto verdi a Ustica (V, 31%). Mentre a Cirella il capo presenta maggiore frequenza nei fenotipi verde e marrone con screziature disomogenee all'interno della squama (MDI e VDI, rispettivamente 26 e 30%, fig.23c), a Licosa il fenotipo più rappresentato è quello con parità di verde e di nero (VN, 35%) e a Ustica il 35% degli individui mostra un capo marrone con macchie distribuite in maniera omogenea all'interno delle squame (MOI). Infine, per il compartimento del dorso (fig. 23d) a Cirella si riscontra principalmente il fenotipo privo di stria dorsale con le macchie distribuite trasversalmente alla lunghezza dell'animale (AVT, 39%), a Licosa principalmente un fenotipo solo verde chiaro (AVA1, 32%); aspetto interessante su quest'isola è la presenza di quasi tutti i fenotipi a prevalenza di nero (AN1, AN2, AN3 e AN4), con un alta percentuale (18%) del quasi totalmente nero. Ad Ustica sono, invece, presenti tutti i fenotipi con anastomosi tra la stria dorsale e le due laterali (PM1, PM2, PM3).

Nella figura 24a e b viene riportata la normalizzazione delle variabili cromatiche effettuata durante la procedura di CatPCA. Le quattro variabili cromatiche, ventre, fianco, capo e dorso, si presentano indipendenti, non correlate e tutte informative nel determinare i primi due fattori principali: questi, infatti, da soli già spiegano il 79,9% della varianza totale dei dati (tabella XIV). Il risultato dell'analisi multivariata è riportato nei grafici di figura 25: in rosso sono rappresentati i campioni provenienti dalle tre isole, in verde quelli provenienti dalla terra ferma prospiciente ciascuna isola (per Cirella Diamante, per Licosa Punta Licosa, per Ustica Palermo). Si percepisce una discriminazione netta nello spazio di ordinamento tra i due gruppi di campioni solo nel caso di Licosa, mentre negli altri due casi si osserva una distribuzione più omogenea nello spazio bidimensionale.

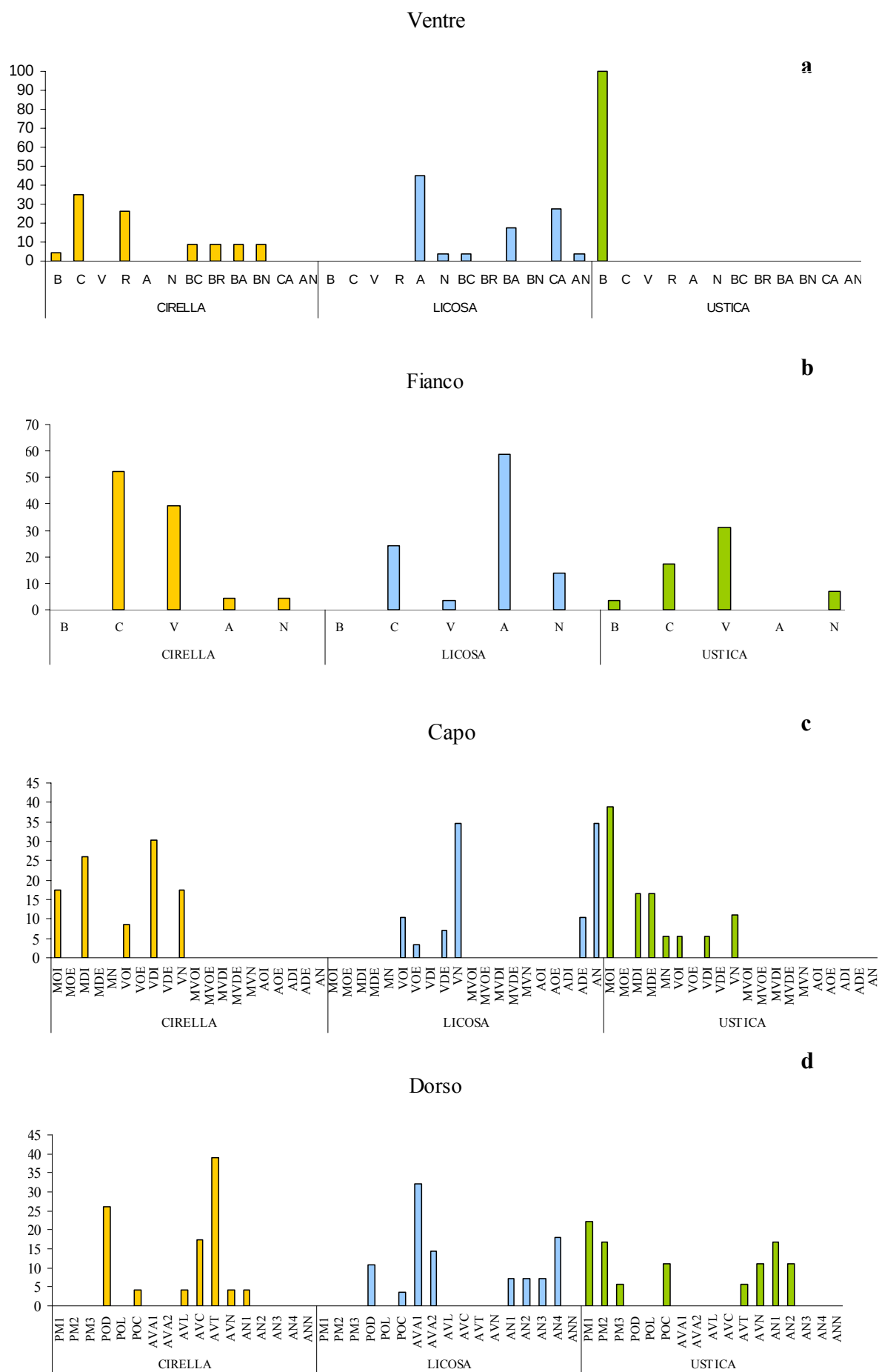


Figura 23 - frequenze percentuali dei fenotipi insulari di *Podarcis sicula* messi a confronto, per il ventre (a), per il fianco (b), per il capo (c) e per il dorso (d). Per le sigle si veda paragrafo I.4.1.2

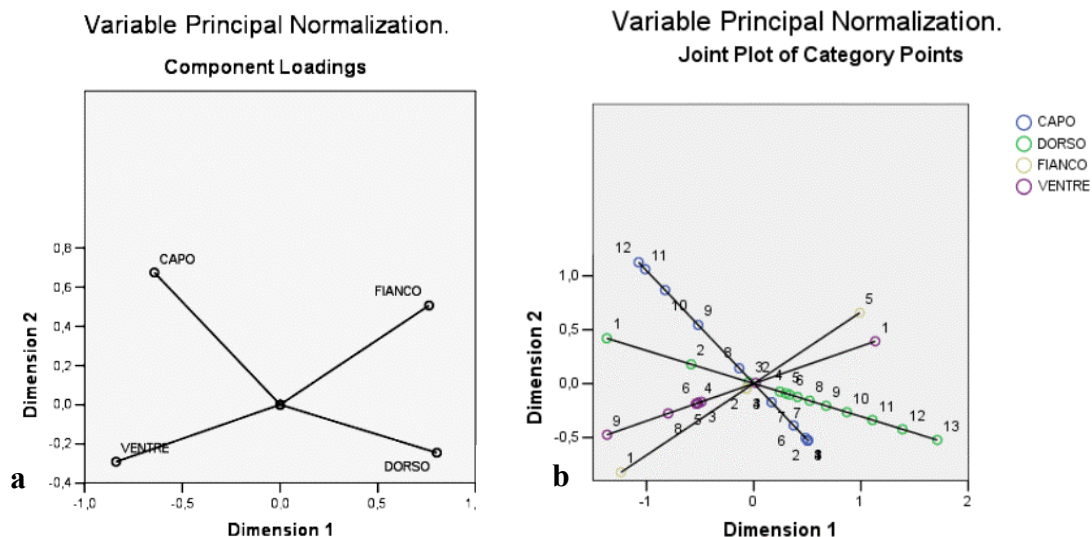


Figura 24 - a, normalizzazione delle variabili cromatiche e b, distribuzione dei fenotipi rilevati sulle variabili cromatiche normalizzate, entrambe operazioni condotte dalla CatPCA

Tabella XIV - varianza globale delle variabili cromatiche spiegata dai primi due assi che la CatPCA ha estratto

Dimension	Cronbach's Alpha	Variance Accounted For	
		Total (Eigenvalue)	% of Variance
1	,764	2,340	58,500
2	-,226	,855	21,380
Total	,916 ^a	3,195	79,880

a. Total Cronbach's Alpha is based on the total Eigenvalue.

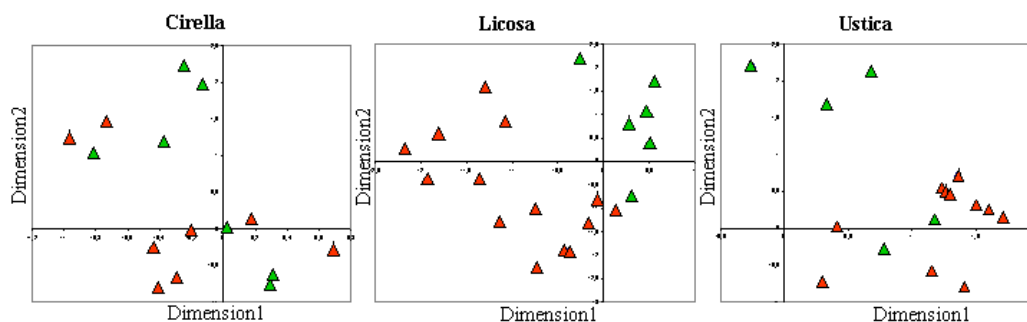


Figura 25 - ordinamento nello spazio bidimensionale degli individui di *Podarcis sicula* sulla base della loro variabilità cromatica; gli individui della popolazione insulare sono indicati in rosso e quelli della popolazione della terraferma prospiciente in verde. La varianza cumulativa dei primi due assi di ordinamento ammonta a 79,9%

1.5.1.2 Mitocondriale e microsatelliti

Il tratto d'interesse di mtDNA è stato sequenziato ed analizzato in 58 campioni (19 individui dell'Isola di Licosa, 21 di Cirella e 18 di Ustica). Per ognuno di questi è stata sequenziata la regione 5' del gene 12S rDNA, per un

totale di 615 paia di basi.

Diversità nucleotidica e genetica

Analisi preliminari sono state effettuate mediante il sequenziamento di pochi individui (1-3) per popolazione per verificare la variabilità genetica del tratto scelto. In tal modo quindi è stato possibile confermare la scelta operata

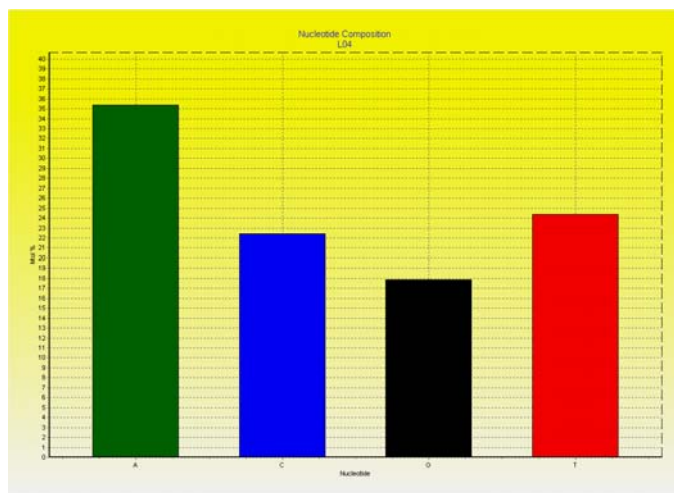


Figura 26 - rappresentatività media delle singole basi nucleotidiche nelle sequenze di 12s rDNA. In verde la A, in celeste la C, in nero la G ed in rosso la T

su basi bibliografiche (Oliverio *et al.*, 1998; Oliverio *et al.*, 2001; Capula, 2003). Il sequenziamento è stato quindi ampliato a tutto il *data set* per le analisi intrapopolazionistiche. In accordo con le composizioni medie di genomi mitocondriali la composizione

nucleotidica risulta deficitaria in G (17,68-18,17%) mentre frequenze simili si riscontrano per le altre 3 basi nucleotidiche con una prevalenza per la A (35,19-36,02%, T 23,76-24,39% e C 22,09-22,59%, fig. 26). Quindi la composizione in basi è a favore di A+T (59,41-60,07%) in accordo con Podnar

Tabella XV - indici di variabilità nucleotidica delle sequenze di mtDNA di *Podarcis sicula*

	Cirella	Licosa	Ustica
N° transizioni	3	7	8
N° trasversioni	6	7	9
N° sostituzioni	9	14	17
N° del/inserzioni	1	1	1
Pi	2.959	3.262	4.536

et al. (2005) che riporta un valore del 57,2%.

L'allineamento di tutte le sequenze ha evidenziato la presenza di 40 siti variabili rappresentati da sostituzioni di base; tra

questi si distinguono 8 mutazioni singole e 32 siti *parsimony-informative*. Sono state anche riscontrate 4 delezioni/inserzioni. Il rapporto transizioni: trasversioni stimato per l'intero *data set* è risultato pari a 2,3. La variabilità nucleotidica viene riassunta per le tre popolazioni nella tabella XV.

Diversità aplotipica

Gli aplotipi mitocondriali riscontrati sono in tutto 25; l'elenco è riportato in tabella XVI. Le sequenze sono state riportate nella figura 27 e nella figura successiva, 28, è rappresentata la composizione aplotipica di ciascun sito, con le relative frequenze.

La maggior parte degli aplotipi riscontrati risultano essere unici per ciascuna popolazione, al di fuori di H1, comune alle due isole dell'Italia peninsulare: solo nella popolazione di Licosa, però, esso è il più frequente (48%). Ad Ustica, invece, l'aplotipo maggiormente rappresentato è l'H21, presente nel 55% del campione. La distribuzione aplotipica meno omogenea è quella di Cirella, che mostra 10 aplotipi, mentre Ustica con 7 aplotipi è la popolazione più uniforme. Nonostante Licosa e Cirella mostrino un simile numero di aplotipi (rispettivamente 10 e 9), le frequenze sono diverse: Licosa per il 52% è costituita da aplotipi unici, similmente a Ustica, (45%); nell'isola di Cirella, invece, gli aplotipi unici ammontano all'80% della composizione della popolazione.

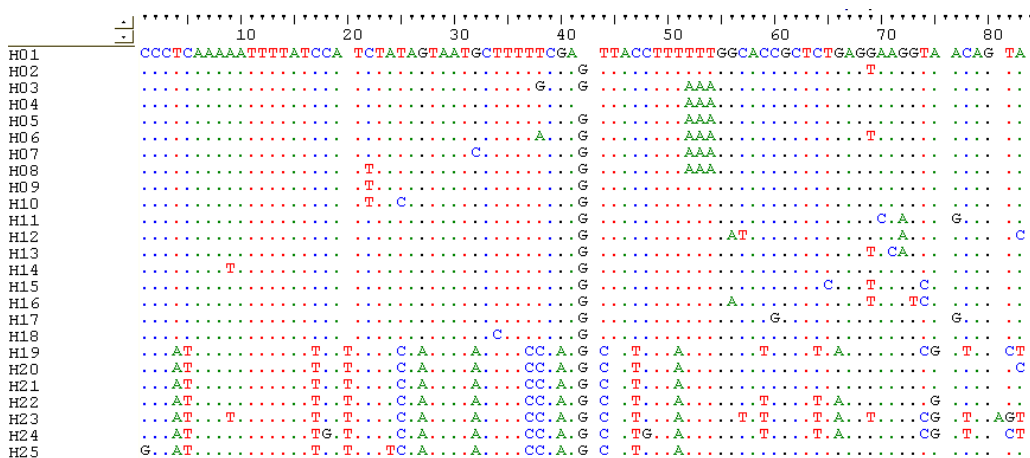


Figura 27 - lista degli aplotipi definiti dalle posizioni nucleotidiche polimorfiche. Le posizioni identiche alla prima sequenza sono indicate con un punto; i tratti indicano i gap

Tabella XVI - composizione aplotipica delle popolazioni insulari. Le frequenze di ciascun aplotipo sono riportate alla base della rispettiva colonna, le frequenze per popolazione nell'ultima colonna a destra

Popolaz	n	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	
Cirella	21	4	2	1	1	2	1	1	5	1	3																12
Licosa	19	9										1	1	2	1	1	1	1	2								11
Ustica	19																			3	1	10	1	1	1	1	9
	59	13	2	1	1	2	1	1	5	1	3	1	1	2	1	1	1	1	2	3	1	10	1	1	1	1	1

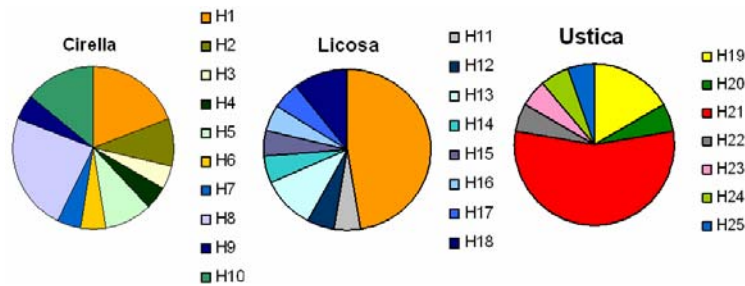


Figura 28 - composizione aplotipica delle tre isole, il grafico rende conto anche delle proporzioni di rappresentatività degli aplotipi

Test di selezione neutrale

I risultati del test di Tajima applicato alle sequenze mitocondriali delle tre isole sono rappresentati in tabella XVII, dove è possibile osservare il basso

Tabella XVII - test di Tajima applicato alle sequenze delle popolazioni delle tre isole

isole	Cirella	Licosa	Ustica
N	21	19	18
S	8,0	14,0	15,0
π	2,89	2,43	4,43
D Tajima	0,98	-1,46	0,06
P-val	0,86	0,05	0,59
θ_s	2,22	4,01	4,36
θ_π	2,88	2,43	4,43
Delta θ	0,66	1,57	0,06

valore del numero dei siti segreganti in corrispondenza della popolazione di Cirella ($S = 8,0$) e l'alto valore del delta θ (0,66), rispetto agli altri due casi. Nella popolazione di Licosa, invece, si osserva un differenziale tra le statistiche S e π maggiore (11,6) rispetto agli altri due casi (5,2 in Cirella e 10,5 in Ustica) e soprattutto si incontra il più basso valore di

D di Tajima associato alla significatività più alta ($D = -1,46$; $P = 0,05$). Ustica evidenzia il più alto valore di S (15,0) ed il più basso tra i D di Tajima (0,055).

L'analisi dei **frammenti microsatellite**, trattandosi di marcatori nucleari, certamente fornisce una stima più precisa del livello di variabilità di ogni popolazione oltre a poter riferire le statistiche di popolazione all'intera popolazione.

L'analisi dei frammenti microsatelliti del DNA nucleare, condotta su 60 campioni (21 individui dell'Isola di Cirella, 20 di Licosa e 19 di Ustica) è stata

Tabella XVIII - distribuzione degli alleli riscontrati in un pannello di 8 *loci* microsatelliti polimorfi nelle tre popolazioni insulari

<i>locus</i>	N° alleli	Min-Max
La2	17	175-255
La3	4	144-160
la4	4	112-180
La6	11	247-272
A7	16	140-170
B3	10	151-171
B4	13	160-172
D1	21	161-195

La variabilità mitocondriale maggiore viene registrata a carico della popolazione di Cirella in base all'eterozigosità attesa, mentre Licosa sembra evidenziare il più basso livello medio di distanza intrapopolazionistica, sia su base mitocondriale che nucleare.

Test di assegnazione

L'analisi dei genotipi degli individui campionati nelle tre isole, Cirella, Licosa ed Ustica, è stata effettuata mediante diverse corse del programma, ciascuna ipotizzando un numero diverso di gruppi di coerenza, che dovrebbero corrispondere alle popolazioni di appartenenza dei genotipi. La scelta dell'analisi corretta ovvero più congruente, viene effettuata sulla base della consultazione di due parametri nell'ambito dei risultati, $\log \Pr(X/K)$ e α , l'*admixture parameter* (Pritchard *et al.*, 2000b), che informa sul grado di correttezza nell'assegnazione dei genotipi alle K popolazioni richieste. Nel caso specifico è stato scelto il modello di struttura risultato impostando K=7 con 10.000 *burn-in periods* e 1.000.0000 replicazioni; i risultati vengono rappresentati in figura 29, in cui ciascun istogramma rappresenta un genotipo di un individuo e ciascun colore un gruppo di coerenza o appartenenza. La

effettuata su un pannello di 8 *loci*.

Diversità genetica

Sono stati evidenziati, mediante l'elettroforesi capillare 96 alleli ripartiti nei diversi *loci* microsatelliti secondo come descritto dalla tabella XVIII.

Indicatori del livello di variabilità intrapopolazionistica vengono forniti dagli indici dell'eterozigosità H sui dati di sequenza e della distanza genetica, riportati in tabella XIX.

Tabella XIX - variabilità intrapopolazionistica valutata sui dati di sequenza e di frequenze alleliche

Isola	H_{att} mit.	π	H_{att} nucl.	D
Cirella	0,063	1,42	0,92	0,56
Licosa	0,054	2,83	0,53	0,67
Ustica	0,048	2,43	0,7	0,87

lettura del grafico, dunque, permette di individuare genotipi perfettamente assegnati ad un gruppo, quali quelli in rosso (la maggior parte degli individui di Ustica) e genotipi “misti” ovvero appartenenti a più gruppi di origine, quali quelli di due, tre, o più colori. Si ricorda che la procedura lavora all’oscuro

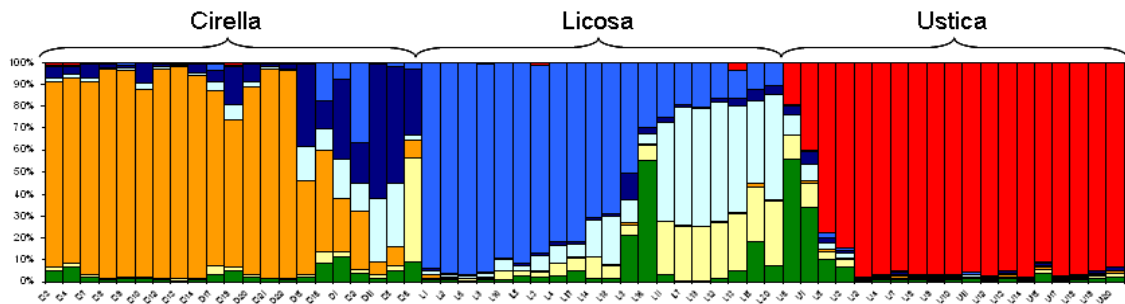


Figura 29 - test di assegnazione molecolare in cui i genotipi (barre degli istogrammi), di ignota provenienza, vengono attribuiti probabilisticamente a gruppi di coerenza (colori degli istogrammi), corrispondenti a possibili gruppi di origine. Il grafico può essere letto in chiave di gruppi, in chiave di popolazioni o in chiave di genotipi

delle provenienze geografiche dei genotipi e che l’indicazione dell’isola è stata posta successivamente nell’immagine.

Si noti che i genotipi appartenenti ad individui di ciascuna delle tre isole vengono fortemente assegnati a tre gruppi di coerenza ben definiti (arancione, azzurro e rosso). In particolare modo il 90% dei genotipi provenienti da Ustica viene assegnato ad un solo gruppo, in figura identificato dal colore rosso, i genotipi di individui di Cirella vengono assegnati per il 70% circa ad un solo gruppo di origine, arancione ed infine, per quanto riguarda i restanti genotipi, di campioni provenienti dall’isola di Licosa, per il 55% viene riconosciuta l’appartenenza ad un gruppo ancestrale, indicato in azzurro. Per gli altri gruppi, se ne riconoscono due, rappresentati in blue ed in grigio nella figura 29, che caratterizzano principalmente la popolazione rispettivamente di Cirella e di Licosa, pur ritrovandosi in minima parte in genotipi di individui di altre provenienze.

I.5.2 Genesi dell’isola di Licosa

Per l’Isola di Licosa, che sostiene una sottospecie, *P. s. klemmeri*, con una

caratteristica distintiva di melanismo rispetto alle altre due e con segni di scostamento da una condizione di equilibrio neutrale, si è tentato di ripercorrere nel tempo la storia evolutiva, cercando di comprendere la sua genesi: provenienza del nucleo fondatore, datazione dell'evento primario e riscontro di eventuali colonizzazioni secondarie.

Al fine di individuare la popolazione che può aver dato **origine** a quella dell'Isola di Licoso, sono state considerate e valutate quattro popolazioni della terraferma: Capaccio, Punta Licoso, Ascea, Pisciotto, distribuite lungo la costa cilentana a Nord, di fronte l'isola e più a Sud. Al di là della necessità di ampliare il raggio di possibilità, la scelta dei siti è ricaduta principalmente sulle zone di provenienza di pescatori che frequentano con le loro barche l'area marina dell'isola.

Tabella XX - indici di diversità di sequenze (Reynolds *et al.* 1983) e alleliche (Weir-Cockerham, 1984) tra la popolazione insulare melanica e ciascuno delle quattro popolazioni della terraferma possibili siti di origine

Popolazioni a confronto	Diversità di	
	R	W& C
Licoso vs Capaccio	0,0145	0,071
Licoso vs P. Licoso	0,0067	0,008
Licoso vs Ascea	0,0032	0,086
Licoso vs Pisciotto	0,135	0,061

I campioni analizzati per tale approfondimento sono 94: oltre ai 20 di Licoso, sono stati indagati altri 20 per Capaccio, 18 per Punta Licoso, 16 per Ascea e 20 per Pisciotto.

Un primo confronto genetico tra la popolazione in questione e ciascuna delle quattro putative è stato condotto mediante indici sintetici di diversità: sulle sequenze è stato utilizzato l'indice di Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983), sulle frequenze alleliche l'indice di Weir & Cockerham (1984). I risultati sono riportati nella tabella XX. In effetti, la diversità maggiore si registra tra Licoso e Pisciotto su base aploipica (0,135) e tra Licoso e Ascea su base nucleare (0,086); viceversa con Ascea si osserva la diversità più bassa al livello mitocondriale (0,003) e con Punta Licoso sull'informazione allelica (0,008).

Il confronto successivo è stato condotto sulla composizione aploipica delle varie popolazioni. I grafici in figura 30, riportano la distribuzione delle frequenze degli aplotipi in ogni popolazione.

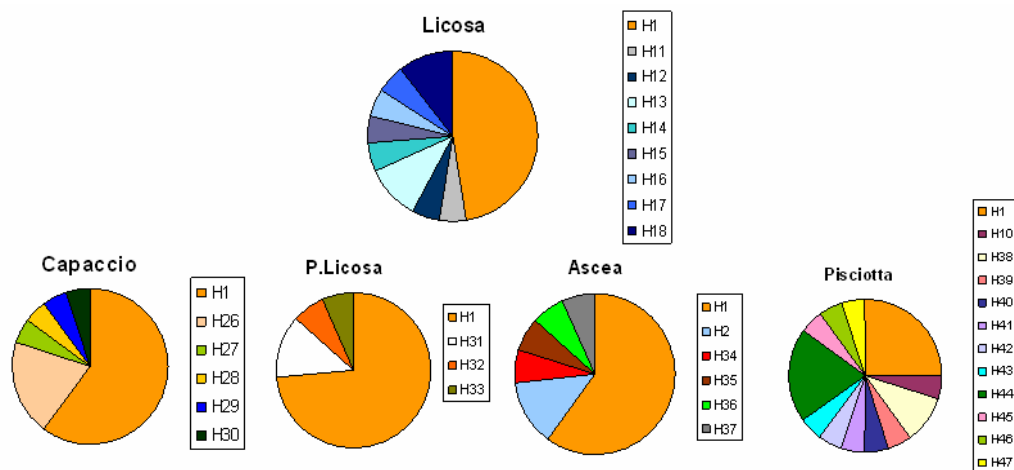


Figura 30 - confronto tra la composizione aplotipica riscontrata a Licosa e quella delle quattro plausibili popolazioni madre dell'insulare

Tra queste popolazioni sono stati identificati altri 22 aplotipi unici. Pisciotta è la popolazione che ha una composizione aplotipica più complessa (12 aplotipi), mentre Punta Licosa è la popolazione più omogenea (4 aplotipi). L'aplotipo H01 accomuna tutte le popolazioni considerate, ma con frequenze molto diverse che vanno dal 73% di Punta Licosa al 25% di Pisciotta.

Infine è stato condotto il test di assegnazione mediante *STRUCTURE* 3.1 come descritto precedentemente, considerando le popolazioni putative e quella di Licosa. Il modello di struttura più congruente che la procedura ha elaborato corrisponde ad un numero di gruppi di coerenza pari a $K=5$, con 10.000 *burn-in periods* e 1.000.000 replicazioni; il risultati vengono rappresentati in figura 31.

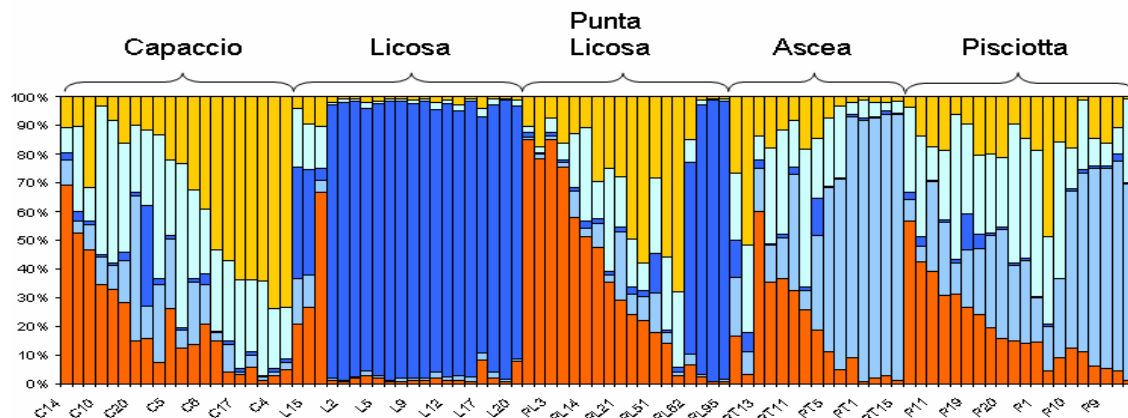


Figura 31 - test di assegnazione molecolare dei genotipi nucleari delle popolazioni di Licosa e degli altri quattro siti cilentani individuati come putativi siti di origine. Per la spiegazione delle barre e dei colori si veda figura 27 o il testo

Il gruppo che caratterizza Licosa in blu è presente praticamente con esclusività nella popolazione di Punta Licosa. L'altro gruppo che aggrega discretamente i restanti genotipi di Licosa (indicato dal colore arancio) è presente in tutte le popolazioni: la maggiore rappresentatività però si riscontra in Punta Licosa, in cui accorpa il 30% dei genotipi.

Il peso della pressione selettiva a carico della popolazione dell'isola di Licosa è stato valutato mediante l'applicazione del test di selezione neutrale di Tajima (1989) alle sequenze della popolazione insulare e della costa di Punta Licosa. I risultati, presentati in tabella XXI, mostrano valori negativi dell'indice D di Tajima per entrambe le popolazioni. Licosa conferma anche in questo caso l'alto differenziale tra le stime di variabilità nucleotidica S e π

Tabella XXI - – risultati del test di Tajima applicato alle sequenze della popolazione di Licosa e di quella del promontorio prospiciente

	Licosa	P. Licosa
N	19	15
S	14,0	10,0
π	0,15	0,11
D	-1.47	-1.87
p-val	0.07	0.02
θ_s	4.01	3.08
θ_π	0,15	0,11
Delta θ	1.05	1.01

(11,04 per Licosa vs 8,02 per Punta Licosa).

La **datazione** dell'evento di separazione dalla popolazione ancestrale è stata condotta mediante due strategie differenti, l'una per stimare il tempo intercorso dalla divergenza genica tra le due popolazioni, l'altra per stimare quello legato alla divergenza popolazionistica. L'applicazione dell'algoritmo di Gaggiotti ed Excoffier (2000), in considerazione di un tasso di mutazione del mtDNA di 10^{-5} e di una distanz

a

genetica $k = 0,03$ tra le due popolazioni attuali, restituisce un tempo stimato di divergenza genica di circa 14.000 anni. L'applicazione di una simulazione di coalescenza ha stimato la separazione popolazionistica risalente a circa 12.600 anni fa, evidenziando una



Figura 32 - albero di divergenza popolazionistica, in blu, che sottende l'albero di divergenza genica, in verde, generati con simulazioni di coalescenza.

differenza tra le due stime di circa 1.400 anni. In figura 32 è riportato l'albero di divergenza popolazionistica contenente l'albero di divergenza genica, che la simulazione di coalescenza di *Mesquite v 1.21* ha prodotto

Un ulteriore passo nella ricostruzione storico-evolutiva della popolazione di Licosa è stato condotto mediante la datazione della separazione geologica dell'isolotto dalla

terraferma. A tale scopo ci si è avvalsi della collaborazione e dell'affiancamento del Dott. Ferrante del Dipartimento di Geologia

dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II". Sulla base delle indagini condotte lungo le coste del Tirreno inferiore ed in particolar modo al sito di Palinuro, poco lontano dalla costa di Licosa (circa 40 Km in linea d'aria) è stato ricostruito il movimento di trasgressione marina che ha interessato questa regione del Mediterraneo negli

ultimi 14.000 anni. La curva, riportata in figura 33, è stata ricostruita sulla base dei ritrovamenti fossili nelle grotte sottomarine e sui substrati dei fondali:

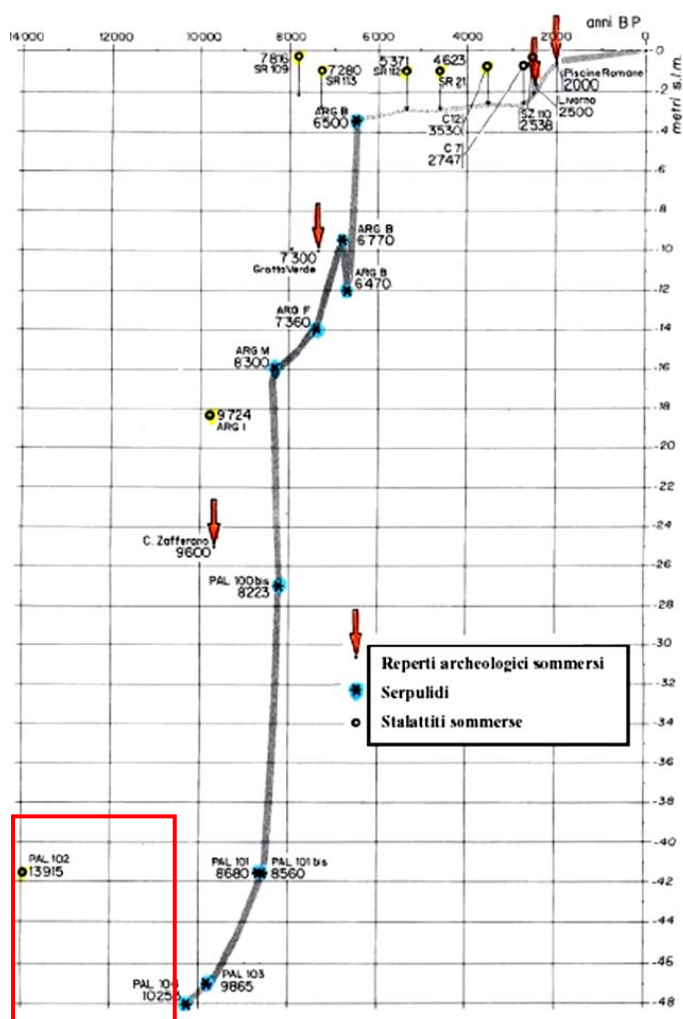


Figura 33 - risalita del mar Tirreno per trasgressione, a partire da 14.000 anni fa. La curva è stata ricostruita grazie ai ritrovamenti fossili nei fondali e nelle grotte marine (Antonioli *et al.*, 1998). Il riquadro rosso individua il periodo dell'evento di separazione tra la popolazione madre, normotipo e la popolazione melanica di Licosa

questa mostra come il livello del mare in questa parte del Tirreno sia risalito ad una velocità molto variabile; in particolar modo, all'epoca della divergenza genetica o popolazionistica tra le due popolazioni, qual si voglia considerare, il livello del mare era compreso tra -42 e -48 metri sotto il livello attuale.

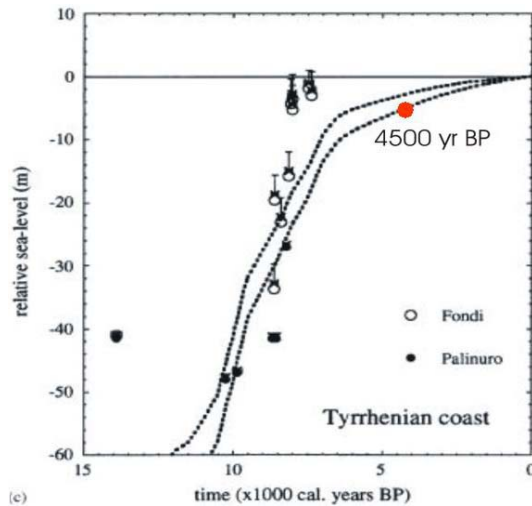


Figura 34 - il momento di separazione geologica dell'isola di Licosia e del promontorio di Punta Licosia viene riportato con il punto rosso, sulla curva di trasgressione marina.

separazione tra la terraferma e l'isola, dovrebbe risalire a circa 4.500 anni fa, come indicato nella figura 34 sulla curva di risalita del mare.

Una ricostruzione che si avvale delle batimetrie dei fondali attuali mostra che la curva isobata del livello marino intorno ai -45 m rispetto all'attuale situazione è abbastanza distante dalla linea di costa odierna. Infine dalle carte batimetriche si evince che la batimetria attuale tra il promontorio di Punta Licosia e l'isolotto raggiunge circa i 7 metri di profondità. Sulla base di questa informazione, dunque, la

SEZIONE II

II.1 Introduzione

II.1.1 Il paesaggio

Il concetto di paesaggio può essere descritto in diversi modi a seconda della disciplina di riferimento, dalla geografia fisica, all'architettura, all'ecologia ed è stato oggetto di numerose definizioni. Certamente quest'ultime risultano utili nei vari settori, ma incomplete, in quanto non rispecchiano mai il paesaggio come specifico sistema di organizzazione ecologica, quale, invece, si pone fortemente nel vuoto esistente tra il livello di ecosistema e quello di bioma (Ingegnoli, 1999). Si introduce solo con la recente disciplina dell'Ecologia del Paesaggio il concetto di paesaggio come sistema ecologico di ecosistemi, di particolare complessità con i suoi specifici caratteri e le proprie dinamiche. Esso s'inquadra in uno spazio geografico in cui le specie vivono, ma la cui dimensione, percezione e complessità sono fortemente specie-specifiche: il paesaggio è costituito, per fare un esempio estremo, per uomo in una scala chilometrica, mentre per un batterio in una millimetrica (Farina, 2001). Le unità funzionali di questo sistema ecologico sono le tipologie ecosistemiche che ricadono in quello spazio geografico, definite in linea generale "tessere" o "frammenti", immerse nella tipologia più frequentemente rappresentata, la "matrice". Ovviamente ogni paesaggio presenta una propria struttura in relazione alle diverse tipologie ecosistemiche della matrice e delle tessere esistenti, al numero, alla forma ed alla giustapposizione di questi suoi elementi.

II.1.2 Complessità e frammentazione

L'arrangiamento spaziale delle tipologie ecosistemiche in un paesaggio naturale, determina la diversità e l'eterogeneità ambientale, due caratteristiche del sistema che si riflettono ovviamente, per esempio, sulla distribuzione degli organismi viventi oppure sulla disposizione degli elementi abiotici. La diversità esprime la varietà degli elementi, mentre l'eterogeneità descrive il modo in cui questi sono associati tra loro (Farina, 2001).

I paesaggi naturali esprimono un elevato grado di **eterogeneità**, fondamentale per consentire le relazioni esistenti all'interno della componente biotica, tra questa e quella abiotica e per assicurare, in definitiva, l'equilibrio del sistema. Come accade in tutti i sistemi aperti, l'equilibrio è fortemente dinamico: il paesaggio è continuamente modificato dai flussi di energia e materia, dall'azione delle specie viventi, con un impatto particolare da parte dell'uomo o dei disturbi naturali, quali gli incendi. Questi processi tipicamente avvengono secondo distribuzioni spaziale e temporale del tutto casuali: il disturbo o l'azione di una specie avverrà in un'area, mentre un altro sito già disturbato si sta riprendendo. In particolar modo, i disturbi naturali, specialmente quando presentano moderata intensità o frequenza intermedia, sono i maggiori responsabili dell'eterogeneità del paesaggio.

La **frammentazione** del paesaggio è un processo dinamico, principalmente di origine antropica, attraverso cui un'area naturale subisce una suddivisione in frammenti più o meno disgiunti, progressivamente più piccoli ed isolati (Battisti, 2004). Il fenomeno, oramai in aumento esponenziale a livello globale, porta all'accostamento di tipologie ecosistemiche diverse, di tipo naturale, seminaturale ed artificiale: queste, quindi, si rivelano sia strutturalmente sia funzionalmente differenti fra loro. Ciò comporta conseguenze per diversi processi e a tutti i livelli di organizzazione ecologica (Debinski & Holt, 2000; Farina, 2001). Mediante fasi progressive, il processo di frammentazione può avvenire secondo diverse modalità, quali la perforazione di una tipologia paesaggistica omogenea, la dissezione che crea

delle fasce di habitat modificato e così via, in maniera progressivamente più

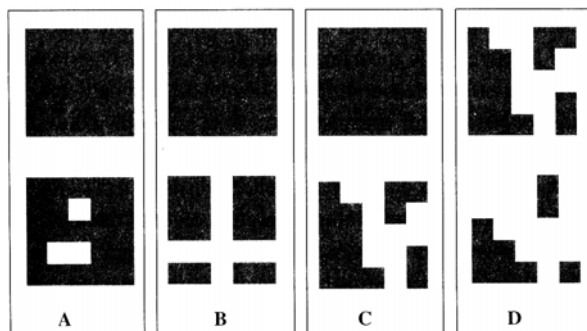


Figura 35 - differenti modalità attraverso cui un paesaggio può divenire più frammentato: perforazione (A), dissezione (B), frammentazione *sensu stricto* (C) e riduzione delle tessere (D) da Boagert, 2000

grave (fig. 35). Si può anche assistere ad un cambiamento di tipologia della matrice se il processo di frammentazione va oltre una soglia, per cui i frammenti divengono di estensione maggiore dell'area naturale (fig. 36).

La frammentazione, in quanto processo di origine antropica, ovviamente può

coinvolgere qualsiasi tipologia ecosistemica, sia terrestre (boschi, praterie, zone umide, costiere) sia marina (barriere coralline); chiaramente non procede secondo una distribuzione casuale nello spazio, in quanto ci sono delle aree più favorevoli alle attività umane, come le aree pianiziali, maggiormente soggette alle modificazioni (Saunders *et al.*, 1991; Bologna, 2002).

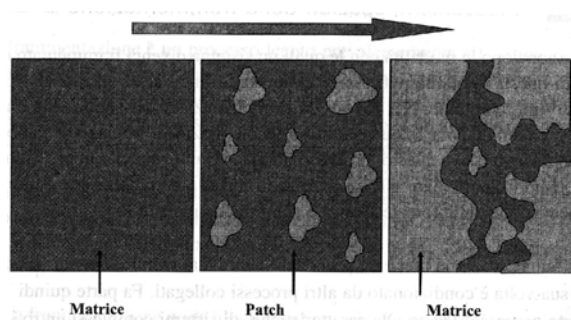


Figura 36 – schematizzazione di un bosco che viene progressivamente frammentato per ricavare coltivi; a loro volta questi diventano matrice, con tessere residuali di foresta che persistono solo lungo il corso d'acqua (Farina, 2001)

La frammentazione conduce verso paesaggi mosaicizzati, che ad un'osservazione superficiale possono apparire di maggiore eterogeneità (fig. 37). Esistono però tre grandi differenze di carattere ecologico tra un paesaggio frammentato ed uno naturalmente eterogeneo: innanzitutto un paesaggio

complesso naturalmente ha una struttura interna mosaicizzata, mentre un paesaggio frammentato ha tessere semplificate e omogenee; un paesaggio naturale inoltre ha minor contrasto e minori differenze strutturali tra tessere adiacenti rispetto ad un paesaggio frammentato e quindi potenzialmente minor

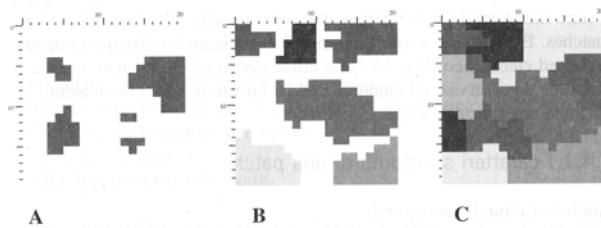


Figura 37 - A, mosaico frammentato omogeneo. B, mosaico frammentato eterogeneo. C, mosaico indiviso ed eterogeneo (Farina, 2001)

effetto margine. Alcune caratteristiche dei paesaggi frammentati, come strade e varie attività umane, infine, pongono specifiche minacce alla vitalità di popolazioni naturali (Noss & Csuti, 1997).

In definitiva, alla scala di paesaggio, si nota che la frammentazione porta alla strutturazione di ecomosaici paesistici, nei quali si riconosce una matrice antropica che si viene a formare per la scomparsa e l'alterazione di preesistenti tipologie ecosistemiche, all'interno della quale sono collocati i frammenti ambientali residui (Forman, 1995) le così dette "isole paesaggistiche" (Saunders *et al.*, 1991).

II.1.3 Le isole paesaggistiche

In seguito alla frammentazione le aree naturali residue subiscono un progressivo o netto isolamento, nonché una riduzione in superficie: il processo porta ad immaginare l'area residua come un'isola circoscritta dall'avanzamento di un mare di habitat modificato. Le numerose analogie, infatti, tra le due forme di isolamento hanno indotto gli studiosi del settore a definire le aree naturali isolate sulla terraferma "isole ecologiche" (Feinsinger, 1997; Ingegnoli, 1999; Farina, 2001), differenziandole dalle "isole geografiche" propriamente dette, ma nel contempo sottolineandone una certa similarità. In letteratura si usa addirittura parlare di "arcipelaghi ecologici" (Virgòs *et al.*, 2002), in casi di gruppi di frammenti di habitat limitrofi in una area geografica ristretta analogamente agli arcipelaghi definiti in senso stretto.

Va però precisato che il processo che porta alla formazione di isole ecologiche, "insularizzazione" seguendo il medesimo criterio (Scoccianti, 2001), può avere origine anche da cause naturali, legate a cambiamenti climatici e geologici, dunque su ampie scale temporali (creando laghi, cime

montuose, cavità), piuttosto che da cause antropogeniche recenti, come la frammentazione. D'altra parte già il carattere eterogeneo del paesaggio per definizione induce l'esistenza di situazioni di isolamento di determinate tipologie ecosistemiche.

Nei due casi di diversa genesi dell'isolamento si registrano differenze fondamentali, anche funzionali del sistema. Se da una parte l'eterogeneità ambientale sta alla base di un equilibrio dinamico del sistema paesaggistico, dall'altra la frammentazione, pur aumentando in un certo senso il grado di eterogeneità, contemporaneamente deprime la connettività specie-specifica (Farina, 2001): il processo, infatti, altera l'equilibrio naturale, agendo fra l'altro su scale ben diverse da quelle dei processi naturali e conducendo alla formazione di un mosaico in cui le tipologie disgiunte sono molto più alterate e piccole delle situazioni naturali. Le scale temporali diverse dai processi naturali non consentono l'avvio di processi evolutivi e/o adattativi nelle popolazioni viventi.

Le isole ecologiche presentano caratteristiche proprie (dalla tipologia, alla forma, alla superficie e alla qualità), oltre che una propria articolazione spaziale; i diversi gradi di isolamento a cui sono soggette fra loro, con le aree non disgiunte e con la matrice modificata, le caratterizzano per quanto riguarda, dunque, le specifiche relazioni funzionali con la matrice (Forman & Godron, 1986).

Considerazioni di tale natura hanno suggerito nel tempo ad ecologi e biogeografi l'applicazione della teoria della biogeografia insulare di MacArthur e Wilson (1967) a contesti terrestri (Diamond, 1975). Va, però, posto l'accento anche su alcuni elementi di distinzione tra i due casi. I disturbi provenienti dalla matrice antropica sulla terraferma possono esercitare un impatto graduale sui frammenti residui, diversamente da quanto accade nelle isole geografiche. L'entità dei disturbi, infatti, in un paesaggio complesso dipende sia dalla tipologia della matrice, d'impatto più o meno forte, sia da quella del frammento residuo, più o meno sensibile, sia dalle caratteristiche eco-etologiche ed evolutive delle specie viventi nel frammento, sensibili al disturbo stesso (Janzen, 1986; Forman, 1995). Per portare un esempio

lampante, la matrice potrebbe fungere da sorgente di specie sinantropiche, magari alloctone, avvantaggiate dalla frammentazione paesaggistica, che potrebbero usare il mosaico in modo polifunzionale, innescando competizione e predazione sulle specie presenti nel frammento residuo. Un'ulteriore distinzione, inoltre, vede nelle isole geografiche il grado d'isolamento per così dire costante lungo le diverse direzioni circostanti ed all'aumentare della distanza, fino alla linea di costa; nel caso delle isole terrestri, l'eterogeneità delle aree circostanti più o meno modificate dai processi in atto, genera gradi di isolamento differenti. Un'altra differenza fondamentale fra i due sistemi, riguarda la scala temporale di riferimento dei processi all'origine dell'isolamento. Come già definito, la frammentazione antropogenica, avvenuta su scale dell'ordine di 10-1000 anni, non può essere confrontata con i processi geologici e climatici che hanno consentito la formazione di isole geografiche, ad eccezione dei casi di isole vulcaniche. Anche per questo motivo le specie continentali sono spesso più vulnerabili alle trasformazioni ambientali: si assiste da tempo ad estinzioni locali in tempi brevi dovute alle modificazioni del paesaggio, alla perdita di habitat idoneo per una specie. La frammentazione, infatti, è considerata tra le principali minacce di origine antropica alla biodiversità e tra le cause maggiori dell'elevato tasso globale di estinzione di specie attuale (Shaffer, 1984; Soulé, 1987; Blaustein *et al.*, 1994; Soulé & Orians, 2001).

II.1.4 Barriere ecologiche ed evoluzione

I vari elementi del mosaico paesaggistico possono presentare diverse idoneità e funzionalità ecologica per le specie viventi, sia in termini di habitat sia di dispersione. In altre parole, presentano differente biopermeabilità (Romano, 1996), intesa come una potenziale funzione connettiva tra gruppi di specie e di individui (Aa. Vv., 2003).

Alcuni elementi paesistici, sia di forma lineare sia a carattere diffuso, quindi, sono caratterizzati da una bassa o addirittura nulla idoneità ecologica per determinate specie: questi complicano o impediscono le dinamiche

individuali, agendo da barriere parziali o totali, un po' come agisce il mare per le isole geografiche (Davies *et al.*, 2001). Differentemente dalle barriere naturali, queste provocano effetti su scale spaziali e temporali molto più pericolose per le specie, in quanto ancora una volta non corrispondono alle scale ecologiche ed evolutive.

Particolare attenzione va posta sul fatto che il concetto di barriera ecologica è relativo a ciascuna specie: una striscia di prati può agire da via di connessione per un lepidottero e nel contempo da barriera per un carabide forestale (Ingegnoli, 1999), lo stesso dicasi per le infrastrutture antropiche come le strade (Cederna & Lovari, 1985; Lamerenx *et al.*, 1992; Mace *et al.*, 1996; Primm, 1996; Linnell *et al.*, 2000).

Gli effetti dell'isolamento si manifestano ad ogni livello di organizzazione ecologica sotteso al livello di paesaggio: dal livello di ecosistema (per esempio nella capacità di intercettazione dell'acqua piovana o nel tasso di evapotraspirazione), a quello di comunità (sulla ricchezza e sulla diversità di specie), dal livello di specie (contribuendo all'estinzione globale), al livello di popolazione, al livello globale individuale (per esempio sulla dispersione individuale), non risparmiando neanche il livello di biodiversità. L'intensità degli effetti dipende direttamente dal grado di isolamento e quindi dalla densità dei frammenti, mentre gioca un ruolo inverso la loro dimensione: in frammenti di superficie minore gli effetti dei disturbi provenienti dall'area limitrofa sono più marcati anche nell'area interna (Harris & Silva-Lopez, 1992) comportando il cosiddetto "effetto margine". Tale fenomeno porta una trasformazione delle caratteristiche del frammento, dalla vegetazione al microclima, che si riflettono sulla distribuzione e l'abbondanza delle specie animali e vegetali (Laurance & Yensen, 1991; Schonewald-Cox & Buechner, 1992). Anche i *pattern* di distribuzione delle isole nel paesaggio sono determinanti: laddove esiste una maggiore aggregazione, gli effetti saranno minori rispetto a paesaggi con isole equidistribuite (Farina, 2001), che presenteranno più corridoi di connessione e meno barriere ecologiche.

Gli effetti delle barriere interessano anche l'aspetto evolutivo dei vari *taxa* coinvolti, in quanto investono la dispersione degli animali. I movimenti sono

considerati il collante tra le sub-popolazioni (Zimmermann, 2004), per la loro funzione di interconnessione tra popolazioni isolate (Waser *et al.*, 2001; Wiens, 2001). I movimenti hanno differenti significati biologici (Dingle, 1996) e quindi conseguenze varie per individui, popolazioni e comunità: gli effetti sui movimenti si riflettono, infatti, sui processi di dispersione, migrazione, esplorazione e quant'altro influenzi la distribuzione e l'abbondanza delle specie (Clobert *et al.*, 2001). E' stato inoltre osservato che i processi dispersivi sono molto più efficienti nel mantenere flussi tra popolazioni naturalmente isolate, in paesaggi eterogenei, piuttosto che in paesaggi precedentemente omogenei frammentati dall'azione dell'uomo (den Boer, 1970; Hansson, 1991), probabilmente perché gli animali che vivono in aree eterogenee hanno una migliore percezione del mosaico.

Queste conseguenze hanno una valenza particolare a livello microevolutivo in quanto provocano la riduzione del flusso genico tra le entità isolate, le sottopongono a colli di bottiglia e le espongono a fattori stocastici non prevedibili di tipo demografico (Debinski & Holt, 2000), ambientale (Seal *et al.*, 1989) e genetico (Janzen, 1986; Thomas, 1994; Burkey, 1995; Bullini, 1996; Reed *et al.*, 1996); inoltre condizionano la *fitness* degli individui (Zimmermann, 2004) e attivano una serie di meccanismi (deriva genetica, inincrocio e successiva depressione da *inbreeding*, erosione della variabilità genetica), che possono portare a processi di rapida divergenza genetica (Randi, 1993), per gli stessi principi descritti per le isole geografiche nella sezione precedente. In tal modo si possono generare diversi modelli spaziali di distribuzione delle popolazioni frammentate (Celada, 1995) che hanno effetti sulla loro possibile evoluzione: il modello *island-mainland*, il modello *patchy-population*, il modello *source-sink*, le metapopolazioni, per fare degli esempi (Harrison, 1991; 1994).

II.1.5 Lo spazio multidimensionale della specie: la nicchia ecologica

“Gli animali hanno distribuzioni limitate da abitudini e reazioni così

affinate da portarli a scegliere i luoghi in cui vivere, idonei per i loro requisiti fisiologici e riproduttivi” (Elton, 1927). Con tale affermazione si rende conto della complessità di tutti i fattori che intervengono nella determinazione della distribuzione delle specie, a qualsiasi scala si voglia intendere: a livello di paesaggio, come è stato descritto, o anche alla scala di habitat una specie non è mai distribuita in maniera casuale o omogenea. Gli habitat, dunque, sono differenti per ogni specie, poiché includono una serie pressoché infinita di combinazioni di fattori o variabili. Volendo scendere ad una scala ancora più fine, nemmeno nel habitat idoneo la specie è distribuita omogeneamente né casualmente. Infatti essa risente delle interrelazioni spaziali, trofiche, fisiche, fisiopatologiche, interspecifiche e quant’altro contribuisca a definire la sua **nicchia multidimensionale**. C’è voluto quasi mezzo secolo perché il concetto di nicchia, inizialmente ristretto appunto al suo aspetto spaziale (Grinnel, 1917; 1924; 1928) poi al suo aspetto trofico (Elton, 1927) approdasse con Hutchinson (1957) all’insieme degli aspetti fisici, chimici, biotici, ecologici, in cui una specie vive. Quest’astrazione, di completa innovazione concettuale, descrive dunque la nicchia ecologica di una specie come un ipervolume in uno spazio multidimensionale, definito dalle variabili ambientali, entro cui la

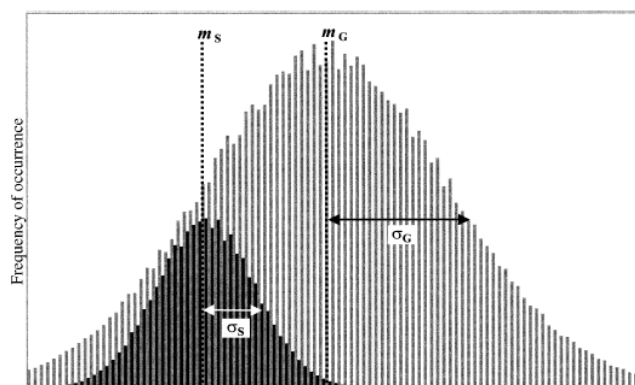


Figura 38 - la distribuzione delle caratteristiche ambientali sfruttate da una specie nel paesaggio (barre nere) non coincide con quella dell’intero set di condizioni che l’ambiente offre (barre grigie); la discrepanza fra le due medie ($m_s \neq m_G$) permette di calcolare la marginalità, mentre la discrepanza tra le rispettive deviazioni standard ($\sigma_s \neq \sigma_G$) permette la valutazione della specializzazione (Hirzel *et al.*, 2002)

specie può sostenere una popolazione vitale (Hutchinson, 1957; Begon *et al.*, 1996).

La nicchia multidimensionale di una specie nell’ambito di un paesaggio può essere ben descritta attraverso due caratteristiche: la marginalità e la specializzazione.

La **marginalità** rappresenta la distanza

ecologica tra le condizioni ambientali utilizzate dalla specie e quelle disponibili nell'intero habitat. Se la nicchia della specie può essere decritta dalle variabili ambientali, il significato di questa grandezza sta nella differenza tra la media della sua distribuzione e la media della distribuzione globale delle variabili ambientali offerte dall'ambiente (fig. 38).

La **specializzazione** esprime la porzione di habitat utilizzato dalla specie in relazione al *range* di condizioni ambientali offerto dal paesaggio; in altre parole indica quanto è ristretta la nicchia della specie in relazione all'area di studio.

Va precisato che essendo direttamente dipendenti dalle condizioni ambientali offerte da un determinato paesaggio, i valori specifici di questi due indici sono limitati solo all'insieme globale di riferimento scelto: le specie possono apparire estremamente specializzate o marginali ad una scala di un paesaggio, ma molto meno ad un sottoinsieme dello stesso.

II.1.6 Obiettivo

Dai risultati della ricerca descritta nella prima sezione e dalla documentazione bibliografica riguardante i numerosi casi di Lacertidae soggetti ad effetti da isolamento paesaggistico (*Phrynosoma platyrhinos*, *Uta stansburiana* Norris & Lowe, 1964; *Sceloporus undulatus*; Lowe & Norris, 1956; *Anniella pulchra*; Pearse & Pogson, 2000), l'obiettivo del lavoro di ricerca è stato ampliato *in itinere*, inducendo dunque l'approfondimento delle problematiche evolutive legate all'isolamento. Così, lo studio dei processi evolutivi è stato rivolto ad un caso di verosimile isolamento paesaggistico nel tentativo di:

- chiarire le modalità di distribuzione della variabilità genotipica e fenotipica in *Podarcis sicula* con riferimento alla connessione tra le popolazioni continentali e ai processi di isolamento paesaggistico;
- comprendere le relazioni tra l'aspetto paesaggistico e quello microevolutivo dell'isolamento.

II.2 Area di studio

La seconda parte dell'attività di ricerca è stata concentrata in un area del comune di Roscigno, (33T 526750 4472176 Datum wgs84; fig. 39) nell'entroterra cilentano: recenti studi, infatti, hanno messo in luce la presenza di una popolazione melanica di *P. sicula*, in un'area di campagna, nei dintorni del paesino abbandonato di Roscigno Vecchia (Fulgione *et al.*, 2002; 2004).



Figura 39 - foto aerea dell'area di studio, circonscritta in verde. La localizzazione delle lucertole melaniche è cerchiata con il tratteggio arancione

Il sito è ubicato tra il vecchio nucleo abitativo di Roscigno ed il fiume Ripiti; l'area è caratterizzata da un'agricoltura tradizionale a terrazzamento e attraversata da una rete stradale interpoderale. L'area coltivata è costituita da piccoli appezzamenti dedicati prevalentemente all'ulivo, alla vite, a seminativi e ad alberi da frutto dispersi. La componente antropica è rappresentata da muretti di contenimento, spesso costruiti a secco e da piccoli fabbricati, destinati a deposito di attrezzi agricoli. Elementi di macchia mediterranea secondaria e lembi residui di lecceta e cerreta si insinuano nelle porzioni

marginali degli appezzamenti coltivati; solo nella porzione Nord-Ovest dell'area di studio si osserva un'area boschiva più estesa, mentre a Sud e a Sud-Est i coltivi portano, con una leggera pendenza, fino all'area fluviale a ghiaieto, con elementi di vegetazione ripariale a saliceto e pioppeto (fig. 41).



Figura 40 - fotografia del muretto a Roscigno su cui vive una popolazione di *Podarcis sicula* composta da individui normotipo ed individui melanici sintopici. Fotografia di S. Guglielmi

La popolazione melanica di lucertole vive su un muretto di cemento che delimita un piccolo campo di proprietà privata (fig. 40). Apparentemente non si percepisce alcuna discontinuità particolare con il paesaggio circostante: i campi coltivati, gli uliveti, i vigneti e le piccole macchie di vegetazione residua frapposte, circondano uniformemente il muretto della popolazione ipercromatica.

Per alcune analisi, in particolare di natura molecolare, sono state prese in considerazione popolazioni provenienti da altri siti del Parco Nazionale del Cilento e

Vallo di Diano (P.N.C.V.D.), già considerati nella sezione I: Capaccio, Licosa, Punta Licosa, Ascea e Pisciotta. Questo criterio è utile per caratterizzare la



Figura 41 - fotografia panoramica dell'area di studio; si notano le diverse tipologie di coltivi, i lembi di boschi frapposti e gli elementi antropici stradali variamente dispersi. Fotografia di A. Della Paolera

popolazione d'interesse e confrontare i risultati progressivamente e raggiunti in un contesto più completo.

II.3 Criteri metodologici

II.3.1 Landscape genetics

I progressi effettuati in ambito biomolecolare ed in ambito bioinformatico, hanno recentemente incrementato lo sviluppo del campo della *Landscape Genetics*: una disciplina che analizza le interazioni tra le caratteristiche del paesaggio ed i processi microevolutivi che intervengono su di esso (Manel *et al.*, 2003). L'approccio di base combina gli strumenti di genetica molecolare con i principi della Biogeografia ecologica e della Ecologia del Paesaggio, sfruttando le statistiche spaziali ed i GIS; questo approccio è molto adatto agli studi di biologia delle popolazioni e di evoluzione, specialmente ad alte risoluzioni; infatti, permette per esempio, di identificare barriere criptiche al flusso genico tra popolazioni o contatti secondari tra popolazioni precedentemente isolate. In effetti, l'approccio genetico-paesaggistico è nato come un tentativo per spiegare i *pattern* genetici spaziali di distribuzione, quali i clini (Sokal & Thomson, 1998), l'isolamento per distanza (Cassens *et al.*, 2000), le barriere genetiche al flusso genico (Piertney *et al.*, 1998; Keyghobady *et al.*, 1999), le metapopolazioni (Hansky, 1998), nonché i modelli casuali di distribuzione (Pigliucci & Barbujani, 1991), usando variabili del paesaggio. D'altra parte se si tiene conto della scala temporale evolutiva in una ricerca, non si possono trascurare, tra i parametri di lavoro, le dinamiche di modificazione del paesaggio nel tempo, la variazioni di capacità portante o di frizione del territorio.

L'innovazione vera portata da questa disciplina sta nella sua unità operativa, rappresentata dall'individuo: ciò permette di condurre ricerche a scala molto fine, senza dover circoscrivere *a priori* una popolazione, operazione che presenta una serie di problemi e di limiti. In ogni caso, mediante l'uso delle frequenze alleliche e di altri parametri popolazionistici, l'attenzione può essere facilmente spostata sulla popolazione.

II.3.2 Modelli ecologici

La complessità del mondo che ci circonda rende spesso impossibile una comprensione completa dei processi a causa dei numerosi fattori che intervengono e delle scale temporali che interessano i processi naturali. Esistono fenomeni inarrivabili perché troppo lontani, come quelli dell'astrofisica o troppo lenti o troppo remoti, come quelli della geologia o della biologia evolutiva, o ancora semplicemente troppo grandi o costituiti da troppi elementi come nei casi della meteorologia e della climatologia. L'ecologia, per esempio, rientra in tale tipologia di sistemi, con le numerose interazioni tra gli organismi viventi e con la componente abiotica (Haeckel, 1866).

L'approccio più frequente alla comprensione dei sistemi, dunque, è la semplificazione: si cerca in genere di isolare piccole parti del sistema e di studiarle direttamente. L'incremento delle tecnologie e l'avanzare della ricerca permettono di riprodurre i sistemi in un computer, dove possano essere manipolati. In sostanza si cerca di modellarli.

Il modello imita il mondo reale prendendo solo gli elementi che sono rilevanti a quel particolare proposito. Ad ogni modo il compito del modello è di condensare, astrarre, interconnettere e quantificare la complessità del sistema: se l'operazione è sufficientemente accurata il modello può essere utile anche per determinare predizioni e per saggiare vari scenari o ipotesi di sviluppo del sistema, oltre che per descriverlo (Hirzel, 2001).

In ecologia e in biologia della conservazione i modelli di distribuzione delle specie permettono di formalizzare le relazioni specie-ambiente, integrandole e sintetizzandole. Tra questi si distinguono i modelli tattici, qualitativi e teorici, dai modelli strategici, quantitativi e applicabili ai dati reali (May, 1973; Gillman & Hails, 1997), i modelli empirici, basati su dati reali di censimenti (Guisan & Zimmermann, 2000) dai modelli basati invece sulla bibliografia (Boone & Hunter, 1996) o sull'opinione di esperti (Pereira &

Duckstein, 1993; Clevenger *et al.*, 2002). In particolare, i modelli di idoneità ambientale tentano di predire la presenza della specie d'interesse sulla base di variabili ecogeografiche predittori (Guisan & Zimmermann, 2000). Tra questi tipi di modelli, quelli basati sull'*environmental-envelope* seguono la teoria della nicchia multidimensionale, in quanto cercano di delineare in uno spazio di variabili ecogeografiche una ipersuperficie (*envelope*) che circoscriva le condizioni idonee per la specie. In effetti, mentre il processo risulta semplice in uno spazio ecogeografico unidimensionale (per esempio l'altitudine), poiché richiede semplicemente di trovare il *range* in cui la specie persiste, in uno spazio multidimensionale diventa più problematico e complesso. Va, inoltre, considerato che le specie risultano spesso sensibili a combinazioni di variabili (Cooley & Lohnes, 1971, Legendre & Legendre, 1998) piuttosto che all'azione delle singole variabili (per esempio al connubio temperatura-umidità, piuttosto che alle due variabili singole). In questi tipi di modelli, praticamente le condizioni di idoneità sono identificate dalla posizione dei siti dove la specie focale è rinvenuta nello spazio ecogeografico: la densità della specie, dunque, è correlata all'idoneità ambientale.

Tutte le informazioni che vengono fuori dai modelli possono essere anche una valida base di analisi per indagare altri campi, quale la storia evolutiva di una popolazione naturale.

II.4 Metodologie

II.4.1 Acquisizione dei dati

La ricerca è stata condotta in prima istanza in maniera analoga a quanto effettuato per l'indagine riguardante le isole marine, prevedendo, sinteticamente:

un ulteriore campionamento nell'area di Roscigno, con la cattura di 20 individui, la raccolta dei dati biometrici e cromatici, l'integrazione della collezione fotografica, il prelievo dei tessuti organici per l'analisi molecolare; alcuni campioni analizzati provengono anche da una precedente campagna di cattura compiuta dal gruppo di ricerca del prof. Odierna della Università degli studi di Napoli "Federico II";

l'organizzazione dei dati cromatici nelle categorie descritte al paragrafo I.4.1.2;

le analisi molecolari in laboratorio con la produzione delle sequenze del tratto del gene 12S del DNA mitocondriale e del pannello degli 8 loci microsatelliti come già descritto nei paragrafi I.4.1.3.

II.4.1.1 Analisi paesaggistiche

L'indagine sul sito di Roscigno ha richiesto, inoltre, una caratterizzazione del paesaggio intorno all'area occupata dalla popolazione di lucertole: durante la fase di campo si è proceduto all'acquisizione dei dati paesaggistici e ad un censimento della specie in tutte le tessere di paesaggio riscontrate.

La caratterizzazione paesaggistica è stata condotta mediante l'integrazione delle ricognizioni in campo e della lettura interpretativa di immagini satellitari e di carte tematiche già esistenti. Sono state così rilevate alcune caratteristiche descrittive delle tessere che compongono il mosaico ambientale del sito: uso del suolo e tipologia di vegetazione, densità della copertura vegetazionale, esposizione, presenza e distribuzione delle strutture antropiche. Un'altra

caratterizzazione rilevata per tipologia ambientale è la disponibilità trofica per le lucertole, mediante trappole a caduta per insetti, innescate con una soluzione 1:1 di acqua ed acido acetico (Southwood, 1979), poste lungo transetti che comprendevano diverse tipologie vegetazionali.

Le distribuzioni sul territorio di ciascuna delle variabili rilevate sono state quindi riportate su apposita base cartografica.

Per fare ciò tutti dati raccolti e tutte le tessere paesaggistiche identificate sono stati progressivamente georeferenziati con un GPS (Garmin modello GPS12) nel sistema di coordinate di tipo UTM, datum ED1950.

II.4.2 Elaborazioni

II.4.2.1 Trattamento dei dati morfologici e molecolari

La maggior parte della analisi è stata condotta considerando un campione più ampio, riferito a 6 popolazioni cilentane al fine contestualizzare la popolazione d'interesse (Rosignano) in un paesaggio e di effettuare validi confronti con altre dell'entroterra. Le popolazioni prese in considerazione sono: Capaccio, Isola di Licoso, Punta Licoso, Ascea e Pisciotta.

Anche per la fase elaborativa della ricerca una parte delle analisi è stata condotta analogamente alla prima sezione d'indagine. Così il trattamento dei dati morfologici, al fine di verificare l'espressione di qualche oggettiva variante da parte della popolazione, ha previsto analisi univariate e multivariate (PCA per i dati morfometrici e CatPCA per i dati cromatici).

Il trattamento dei dati molecolari, per valutare la possibilità di emergenza di varianti molecolari, ha visto l'analisi di diversità nucleotidica, aploipica, l'analisi di selezione neutrale (per le sequenze di DNA mitocondriale), analisi di diversità intrapopolazionistica ed il test di assegnazione molecolare (per le frequenze alleliche dei frammenti nucleari). Anche i *software* utilizzati per le suddette elaborazioni sono gli stessi di quelli già descritti nella sezione precedente.

Al fine di caratterizzare la struttura genetica spaziale delle popolazioni cilentane è stato usato il *software Alleles In Space* (AIS, Miller, 2005;

<http://www.marksgeneticsoftware.net>), che conduce analisi di dati spaziali e genetici interindividuali, anche a scala di paesaggio. Una procedura di regionalizzazione geografica, implementata dall'algoritmo di Monmonier (1973) permette di individuare la localizzazione di putative barriere al flusso genico, mediante analisi iterative delle maggiori distanze genetiche tra popolazioni contigue in una rete di connessione (Dounpanloup *et al.*, 2002; Manel *et al.*, 2003; Manni *et al.*, 2004). La rete di connessione tra le popolazioni viene costruita mediante un'interpolazione tra le localizzazioni, fornite al programma in forma di punti in un sistema di coordinate metriche; l'interpolazione scelta per l'analisi è basata sulla triangolazione di Delaunay (Watson, 1992; Brouns *et al.*, 2003). La rappresentazione grafica della distanza genetica tra gli individui sul territorio viene restituita sotto forma di una superficie tridimensionale in cui le prime due dimensioni, la X e la Y, individuano il paesaggio e localizzano le popolazioni, mentre la dimensione Z, rende conto della distanza genetica tra le popolazioni: i picchi corrispondono a distanze genetiche elevate, indicando difficoltà e barriere al flusso genico tra le popolazioni. La distanza genetica viene calcolata direttamente dal programma, secondo i seguenti algoritmi:

per analisi di marcatori codominanti

$$D_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^n \left(1 - \sum_{l=1}^{q_k} \sqrt{p_{il} \times p_{jl}} \right)}{n}$$

dove q_k è il numero di alleli differenti al locus k , n è il numero totale dei loci nel data set, p_{il} e p_{jl} sono le frequenze relative dell'allele l negli individui i e j . La misura è analoga a quella di Nei *et al.*, (1983), ma applicata a coppie di individui piuttosto che di popolazioni;

per analisi di sequenze

$$D_{ij} = \sum_{k=1}^n d_k / n$$

in cui n è la lunghezza della sequenza e d_k assume un valore di 1 se gli individui i e j contengono differenti nucleotidi al sito di allineamento k e 0 in

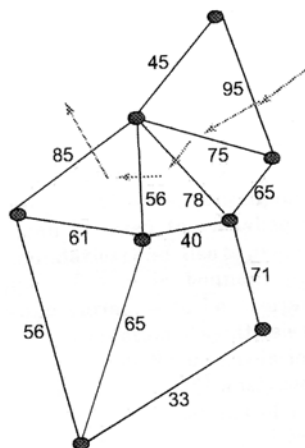


Figura 42 - esempio di creazione della rete di connessione e delle barriere tra le localizzazioni geografiche delle popolazioni, con le procedure descritte nel testo (Manel *et al.*, 2003)

caso contrario; una distanza di *mismatch*.

Nell'analisi sono state usate le distanze genetiche (Dgen) corrette sulla base delle distanze geografiche (Dgeo) mediante il $\log_{10} D_{gen}/D_{geo}$.

Tecnicamente una volta costruita la rete di connessione e la matrice delle distanze genetiche fra le popolazioni, mediante l'algoritmo di massima differenza di Monmonier, la procedura identifica la connessione tra due localizzazioni in cui è espressa la distanza maggiore; nel punto medio di tale connessione poi, posiziona la prima barriera al flusso genico. la barriera correrà perpendicolarmente alla linea di connessione nella direzione in cui si riscontra la distanza maggiore. Questi passaggi vengono, quindi, ripetuti in maniera iterativa.

Una stima della genealogia delle sequenze di mtDNA è stata inferita mediante una *Nested Clade Analysis*, NCA, con il software TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000; <http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html>); il metodo di stima del cladogramma è la parsimonia statistica (Templeton *et al.*, 1992); la probabilità di parsimonia viene calcolata per le differenze a coppie di sequenze, fino a che non ecceda il limite di 0,95. Il numero di differenze mutazionali associate con la probabilità prima di questa soglia del 95% è il massimo numero di connessioni mutazionali tra le coppie di sequenze giustificate dal criterio di parsimonia.

II.4.2.2 Trattamento dei dati paesaggistici

Verificare l'ipotesi di influenza della matrice paesaggistica sui processi evolutivi di una popolazione animale naturale richiede innanzitutto di analizzare lo stato di connettività paesaggistica per la specie, ovvero, in altre parole, di definirne il grado di isolamento paesaggistico. A tale scopo è stato costruito un modello d'idoneità ambientale per *P. sicula* nel sito di studio.

Il GIS come ambiente per sviluppare il modello

L'analisi di un paesaggio e la creazione dei modelli necessitano di quantità notevoli di dati spaziali espliciti interconnessi. Il GIS (*Geographical Information System*) è uno strumento di lavoro adatto a gestire i progetti in queste condizioni: è capace di archiviare, mantenere, esporre, integrare, analizzare attraverso numerose operazioni complesse i dati spaziali e esplicitare i risultati in immagini di facile lettura.

Così l'uso del GIS permette di gestire anche la natura multidimensionale delle relazioni specie-ambiente (Shaw & Atkinson, 1990). L'elaborazione di un modello d'idoneità ambientale mediante i GIS, si basa, quindi, fondamentalmente su un processo d'integrazione dei dati geografici. Tali dati spaziali espliciti, sono mantenuti in strati informativi (*layers* o livelli informativi), cartografie di riferimento, ognuna delle quali descrive la distribuzione di una determinata variabile ambientale misurabile nonché mappabile. Questo enfatizza il fatto che tutte le informazioni relative ad una particolare area sono distribuite tra diversi insiemi di dati logici che possono essere riassemblati, sovrapposti per essere paragonati ed analizzati. Gli strati possono essere organizzati in due modi. Il primo vede i dati allegati agli oggetti, le cui coordinate spaziali sono precisamente definite. In ecologia gli oggetti tipicamente rappresentano informazioni biologiche o paesaggistiche come osservazioni, localizzazioni di cattura, strade, fiumi o foreste. Quindi gli oggetti possono essere a-dimensionali (punti), uni-dimensionali (linee, linee spezzate, poligoni aperti) e bi-dimensionali (regioni o poligoni vuoti). I dati associati ad essi sono chiamati attributi e possono essere in numero variabile, fornendo qualsiasi tipo di informazione (nome, data, quantità, portata di un segmento del fiume, tipo di vegetazione). Gli oggetti simili sono raggruppati nei vari strati informativi. Il valore dei loro attributi può essere rappresentato da codici visivi, che variano di colore o di forma. In questa organizzazione i dati sono archiviati in una struttura vettoriale, cioè le informazioni spaziali sono contenute in nodi legati a vettori che definiscono la forma degli oggetti. Per tale caratteristica, questa organizzazione dei dati è particolarmente adatta a generare modelli con informazioni qualitative, come copertura vegetale,

strutture antropiche, reti fluviali, limiti amministrativi.

L'altro modo di organizzazione dei dati vede l'area di studio scomposta in celle isometriche (generalmente quadrate, dette *pixel*), a cui sono associate le informazioni spaziali. Ogni strato contiene un tipo di informazione, qualitativa o quantitativa, allegata alla singola cella. I dati in questo caso sono archiviati in una struttura raster, particolarmente adatta all'analisi dei processi paesaggistici: questa modalità, infatti, permette di modellizzare informazioni geografiche continue, come per esempio l'elevazione, la temperatura o la profondità.

Il dato geografico, in definitiva, risulta costituito da tre componenti: due di queste sono l'una descrittiva e l'altra spaziale, per cui è sempre possibile, selezionando la componente descrittiva, conoscere la posizione geografica associata a quel particolare valore o *set* di valori selezionati, oppure, partendo dalla componente geografica, attuare il percorso d'indagine inverso. La terza componente è temporale, che in genere, per semplicità, si considera costante.

L'ENFA

Tra i modelli di idoneità ambientale basati sul concetto di nicchia multidimensionale di Hutchinson (1957), spicca l'*Ecological Niche Factor Analysis* (ENFA, Hirtzel *et al.*, 2002; Hirtzel & Arlettaz, 2003), una recente procedura suggerita da Perrin (1984) e sviluppata ed implementata in ambiente GIS (Hausser, 1995) con il *software Biomapper 3.1* (Hirzel *et al.*, 2001; 2002; <http://www.unil.ch/biomapper>). Fin'ora tale metodica di analisi di dati si è mostrata più robusta dei metodi logistici classici (Brotons *et al.*, 2004), in relazione a diversi scenari di habitat *occupancy* e soprattutto in condizioni di *data set* non particolarmente accurati. Questo ne ha permesso l'uso, con risultati soddisfacenti, anche in situazioni particolarmente complesse: di recente l'ENFA è stata usata non solo per specie di Uccelli (Hirzel, 2003; Hirzel *et al.*, 2004; Boisteu & Marion, 2005), Mammiferi ungulati (Hirzel, 2002) e coleotteri, ma anche in ambiente marino per coralli (Leverette, 2004) o Cetacei (Mandleberg, 2004), comprensibilmente difficili da mappare, o ancora è stata saggiata con dati provenienti da atlanti, che certamente non mirano a definire con certezza l'assenza della specie.

In accordo con gli altri metodi di analisi multivariata, l'ENFA fonda su determinati principi: a) l'area di indagine è modellata come una mappa *raster* composta da N celle isometriche adiacenti; b) la variabile dipendente è espressa come dato di presenza/assenza della specie focale nell'insieme di celle; c) le Variabili Eco-Geografiche indipendenti (EGV), importanti per la specie focale ai fini dello studio, descrivono quantitativamente alcune caratteristiche delle celle. Tali variabili, dunque, vanno scelte *a priori* e possono riguardare, per esempio, caratteri topografici (altitudine, pendenza), dati ecologici (presenza di boschi, concentrazione di nitrati), influenza antropica (distribuzione di infrastrutture, distanza dal centro abitato); d) le EGV sono calibrate per classificare il più correttamente possibile ciascuna cella del paesaggio in funzione del grado di idoneità alla presenza della specie (Hirzel *et al.*, 2002).

Un'importante caratteristica dell'ENFA, rispetto agli altri strumenti di modellistica multivariata, è la sua indipendenza dai dati di assenza della specie focale nel paesaggio. Il mancato rinvenimento di una specie durante censimenti e campionamenti è, infatti, un punto debole dei modelli, in quanto può essere dovuto a numerose cause e può generare determinazioni di “false assenze”, che si riflettono sulle deduzioni del modello, soprattutto se la variabile dipendente è proprio la presenza della specie: si pensi a casi di habitat idonei, ma per motivi storici non occupati dalla specie, o a semplici problemi di contattabilità durante i censimenti (McArdle, 1990; Solow, 1993). L'ENFA quindi è fondato su un approccio nuovo che analizza la posizione della nicchia della specie nello spazio ecologico, basandosi solo su dati di presenza. In altre parole il modello confronta in uno spazio multidimensionale determinato dalle variabili ecogeografiche, la distribuzione delle celle in cui la presenza della specie è stata accertata, con l'intero insieme di celle che costituiscono l'area di studio: considerando la nicchia ecologica come un sottoinsieme di celle nello spazio ecogeografico dove la specie focale ha un'elevata probabilità di essere, l'ENFA riprende, quindi, il concetto di nicchia di Hutchinson (1957).

Per il resto, l'ENFA presenta alcune similitudini con la PCA, (Cooley &

Lohnes, 1971, Legendre & Legendre, 1998), in quanto la prima operazione che compie è l'estrazione di pochi fattori che sintetizzano l'informazione di tutte le EGV (Manly, 1986): in tal modo *in primis* riduce la complessità del sistema, scarica anche le correlazioni e la ridondanza tra le variabili e riduce il rumore di fondo (Hirzel, 2004). Ma a differenza di questa procedura, l'ENFA richiede due insiemi di dati di base: quello globale dei descrittori delle variabili ecogeografiche per ogni cella dell'area di studio e quello di presenza della specie per ciascuna cella. Inoltre, si riscontra un'altra differenza nel significato degli assi estratti: nella PCA sono scelti in modo da massimizzare la varianza della distribuzione, in ENFA assumono un significato ecologico in quanto rendono conto della marginalità e massimizzano la specializzazione delle specie (Hirzel *et al.*, 2002).

II.4.2.2.1 Procedure di lavoro

La prima operazione è consistita nella digitalizzazione dell'area di studio, ovvero, partendo da un substrato informatico di immagini satellitari sono state individuate e circoscritte, tramite poligoni, le tessere che compongono il paesaggio. Correzioni progressive sono state apportate alle mappe create, a seguito delle verifiche in campo. Il paesaggio è stato poi sottoposto ad un'analisi di frammentazione, condotta mediante l'estensione informatica *Patch Analyst* 3.1 (Rempel & Carr, 2003, <http://flash.lakeheadu.ca/~rrempel/patch/index.html>) del software *ArcView*. Così sono stati calcolati alcuni indici di frammentazione paesaggistica: la dimensione media (in ettari) delle tessere per tipologia; la sua deviazione standard, che esprime bene la variazione assoluta della dimensione nel paesaggio; la dimensione media dei margini, misura della lunghezza in metri del margine delle tessere per categoria ambientale, di cui quantifica praticamente il perimetro; la densità del margine, che valuta la dimensione dei margini standardizzata per la superficie del paesaggio preso in esame; la densità di margine per tessera, che analizza la quantità media di margine in metri per tessera di paesaggio; *Mean Shape Index* (MSI), che quantifica la complessità della forma delle tessere valutando il suo scostamento dalla forma isodiametrica del cerchio o del quadrato. L'indice risulta dalla media delle

differenze riscontrate per tutte le tessere appartenenti a ciascuna categoria ed assume valori sempre superiori ad 1, crescenti man mano che la complessità della forma delle tessere aumenta; infine, è stata calcolata la dimensione frattale media della tessera, che analizza la complessità della forma delle unità del paesaggio, basandosi sulla loro dimensione frattale. Chiaramente essa dipende anche dalla dimensione della tessera ed il suo valore, compreso fra 1 e 2, è tanto più vicino all'unità quanto più la forma è semplice.

Scelta delle variabili ecogeografiche e creazione degli strati informativi

Le variabili ecogeografiche (EGV) descrittive della nicchia ecologica di *P. sicula* sono state individuate sulla base delle conoscenze delle esigenze ecologiche della specie, supportate dalla letteratura. Tra le principali caratteristiche ambientali che sicuramente condizionano la persistenza di una specie vanno considerate le tipologie vegetazionali e la disponibilità trofica. Considerando la costituzione eteroterma della specie d'interesse in questa ricerca, si è scelto di valutare l'esposizione dell'area di studio, in quanto espressione della combinazione dell'intensità e della durata dell'insolazione al suolo. Infine, considerando anche la particolare preferenza di *P. sicula* per le strutture antropiche, quali muretti, costruzioni varie e strade, per le diverse attività quotidiane, è stata inserita tra le variabili anche la presenza di strutture antropiche.

Mediante analisi di campo, dunque, come già descritto, sono state quantificate le quattro variabili nonché la presenza della specie, per la successiva creazione dei relativi strati informativi in ambiente GIS. Per la valutazione della disponibilità trofica è stata considerata la presenza di Insetti, componente principale della dieta di *P. sicula* in condizioni normali (Corti e Lo Cascio, 1999). La successiva identificazione al microscopio (stereoscopio Wildheerbugg 40X) ha permesso una stima della loro distribuzione nelle tessere del paesaggio.

Costruzione degli strati informativi vettoriali e conversione in formati raster

Per ciascuna variabile ecogeografica è stata costruita una carta tematica, con i dati collezionati in campo, con integrazioni di cartografie già esistenti e

di analisi informatiche. In altre parole è stata effettuata una rilettura e una riclassificazione del paesaggio sulla base dell'informazione fornita di volta in volta da ciascuna EGV.

L'elaborazione digitale e la costruzione dei diversi strati informativi, relativi a uso del suolo, disponibilità trofica, esposizione, presenza di strutture antropiche e presenza della specie sul territorio, sono state condotte mediante il *software GIS ArcView 3.2* (ESRI Inc., 1999).

Gli strati informativi generati con *ArcView*, in formato vettoriale, sono stati convertiti in formato *raster*, ovvero in *grid*, per essere acquisiti dal *software Biomapper 3.1* (Hirtzel *et al.*, 2001) e per essere processati mediante l'ENFA. L'operazione di conversione ha richiesto una trasformazione di tutti i dati qualitativi e descrittivi, quali per esempio l'uso del suolo, in dati quantitativi. Così la tipologia vegetazionale dello strato "uso del suolo" è stata quantificata mediante l'indice di complessità strutturale della vegetazione, SC (de Filippo, 1985), assegnando ad ogni tipologia vegetazionale il valore medio di SC per tutte le tessere del paesaggio di quel tipo; l'esposizione è stata convertita mediante l'assegnazione di valori proporzionali all'insolazione ricevuta da ciascuna classe; i valori di densità media di prede per tipologia vegetazionale sono stati utilizzati per trasformare lo strato informativo di disponibilità trofica; per la presenza di strutture antropiche, è stato attribuito un valore pari a 1 nelle celle di presenza e pari a 0 per quelle che ne sono prive; infine, la distribuzione della specie sul territorio è stata associata ad un valore di 1 diversamente dal suo mancato ritrovamento (0). Poiché *Biomapper* accetta solo *file* informatici con estensione *.idrisi, è stato necessario una conversione degli *shape file* (*.shp), creati da *ArcView*. L'operazione è stata condotta mediante l'estensione Av2Idrisi di *ArcView*.

ENFA e il modello di idoneità ambientale

Le cinque *grid* ottenute dalla riclassificazione del paesaggio, riferite alla distribuzione nell'area di studio dei valori delle variabili ecogeografiche rilevanti per la specie focale e alla distribuzione della specie stessa, sono state utilizzate come *data input* per il *software Biomapper 3.1*.

La procedura ENFA inizia ad estrarre i fattori principali. Ogni cella è così

associata al vettore composto dai valori delle EGV nell'area sottesa e può essere rappresentata da un punto nello spazio multidimensionale delle EGV. Se le distribuzioni delle variabili sono multinormali, lo *scatterplot* avrà la forma di un iper-ellissoide (fig. 43). L'insieme delle celle in cui la specie focale è stata osservata costituisce un sottoinsieme, rappresentato da un iper-ellissoide più piccolo all'interno di quello globale. Il primo fattore, o fattore di marginalità, è la linea retta che passa attraverso i centroidi dei due ellissoidi. La marginalità della specie focale, è dunque la distanza standardizzata tra questi centroidi.

Per ottenere i fattori successivi, quelli di specializzazione, il procedimento

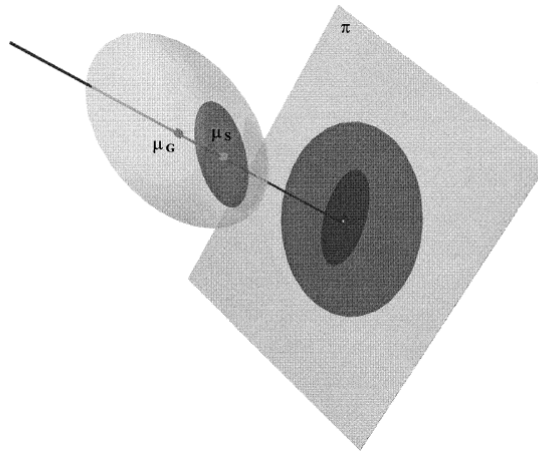


Figura 43 - interpretazione geometrica dell'Ecological Niche Factor Analysis. L'ellissoide maggiore, chiaro, rappresenta la nuvola di celle che descrivono l'area di studio nello spazio tridimensionale determinato dalle variabili ecogeografiche. L'ellissoide più piccolo e più scuro rappresenta il sottoinsieme di celle in cui la specie focale persiste. La linea che passa attraverso i centroidi (μ_G e μ_S) è il fattore di marginalità. Per estrarre la varianza associata a questo fattore le coordinate delle celle sono proiettate su un piano π perpendicolare alle celle tridimensionali. Da Hirzel *et al* 2002

opera un cambiamento nel sistema di riferimento, trasformando l'ellissoide della specie in una sfera, la varianza della quale eguaglia l'unità in ogni direzione. In questo nuovo sistema, il primo fattore di specializzazione è quello che massimizza la varianza della distribuzione globale ed i successivi sono estratti in turno, rimuovendo in ogni stadio una dimensione dallo spazio, prima che tutti i fattori siano estratti. La quantità di specializzazione progressivamente rendicontata da ogni fattore è necessariamente inferiore a quella del fattore precedentemente estratto; ogni fattore di specializzazione è

ortogonale agli altri in modo che la distribuzione di un sottoinsieme di specializzazione per ogni fattore non è correlata alla distribuzione degli altri. In questo modo un limitato numero di fattori F conterranno la maggior parte delle informazioni rilevanti iniziali. Il loro basso numero e la reciproca indipendenza li rende più facili da manipolare rispetto alle EGV originali. L'idoneità di ogni cella per la specie focale viene, così, calcolata in accordo

con la sua posizione nello spazio F-dimensionale, piuttosto che EGV-dimensionale.

I coefficienti m_i del fattore marginalità, esprimono appunto la marginalità della specie focale per ciascuna variabile in unità di deviazione standard della distribuzione globale. Sotto il profilo matematico la marginalità è espressa da una semplice equazione:

$$M = \frac{|m_G - m_S|}{1.96\sigma_G}$$

che descrive la differenza assoluta tra le mediane delle due distribuzioni della specie, standardizzata. La divisione per la deviazione standard permette di rimuovere gli errori introdotti dalla varianza della distribuzione globale, mentre il fattore moltiplicativo (1,96) assicura che il valore di marginalità sia sempre compreso fra 0 e 1.

Valori assoluti elevati dei coefficienti indicano che la specie si discosta dalla media disponibile di

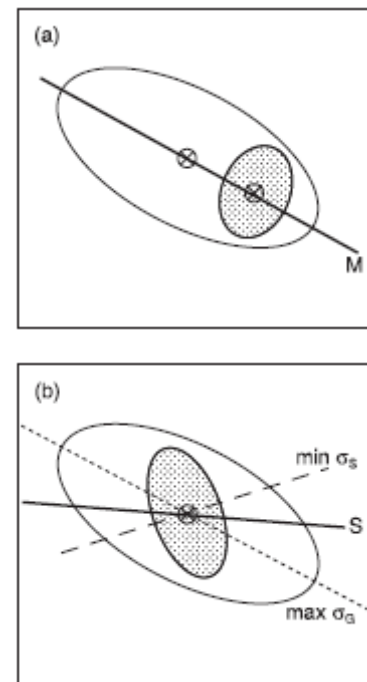


Figura 44 - interpretazione geometrica dei fattori di marginalità e di specializzazione. La distribuzione bidimensionale delle caratteristiche ambientali del paesaggio e della specie sono rappresentate dall'ellissi vuota e piena. Il fattore di marginalità M è l'asse che passa per entrambi i centroidi (a). Estratto questo fattore, le due distribuzioni hanno un centroide comune (b) ed il fattore di specializzazione (S) è l'asse che massimizza il rapporto fra la varianza globale σ_G e la varianza della specie σ_S . Da Hirzel *et al.*, 2004

habitat in relazione alla corrispondente variabile; valori negativi di m_i indicano che la specie preferisce valori della variabile corrispondente più bassi rispetto alla media relativa all'area di studio e viceversa per valori positivi del

coefficienti.

I coefficienti dei successivi fattori ricevono una diversa interpretazione: maggiore è il loro valore più ristretto risulta il *range* della specie focale rispetto alla variabile corrispondente. Il segno del coefficiente è del tutto arbitrario. L'autovalore λ_1 associato ad ogni fattore esprime la quantità di specializzazione sintetizzata in quel fattore: il rapporto tra la varianza della distribuzione globale e quella della distribuzione della specie sull'asse. In termini matematici la specializzazione è descritta in tal modo:

$$S = \frac{\sigma_G}{\sigma_s}.$$

Gli autovalori velocemente decrescono dal secondo fattore in poi: solo i primi quattro o cinque sono utili per computare l'idoneità del habitat.

Combinando la marginalità e la specializzazione di ciascuna variabile ambientale, ENFA computa la marginalità e la specializzazione globali (Hirzel *et al.*, 2002, Reutter *et al.*, 2003) con estensioni multivariate delle equazioni precedenti.

La marginalità globale, M,

$$M = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^v m_i^2}}{1.96}$$

assume valori compresi fra 0 e 1 con i valori maggiori che indicano che la specie non è ugualmente rappresentata nel paesaggio.

La specializzazione globale, S,

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^v \lambda_i}}{V}$$

varia, invece, tra 1 e ∞ , con l'ampiezza della nicchia che decresce all'aumentare del valore dell'indice. Per un'interpretazione più immediata viene spesso fornito il coefficiente di tolleranza globale definito come l'inverso della specializzazione: quest'ultimo varia tra 0 e 1 ed è un indicatore diretto della larghezza della nicchia (Reutter *et al.*, 2003).

Dai risultati della procedura ENFA, *Biomapper* genera e restituisce la mappa di idoneità ambientale per la specie focale nelle condizioni ambientali fornite da quel paesaggio.

Innanzitutto per ciascuna EGV viene registrato il valore di ogni locazione della presenza della specie; con questi valori viene generato un istogramma di frequenze e ad ogni classe dell'istogramma viene attribuito un punteggio. Supponendo una distribuzione normale, i punteggi saranno massimi alla mediana della distribuzione per diminuire verso le sue code (Hirzel *et al.*, 2002). Viene, poi, determinata la classe di appartenenza per ciascuna cella nell'area di studio e su tale base viene definito un valore provvisorio di idoneità a ogni cella. Le classi di celle più distanti avranno valori inferiori di

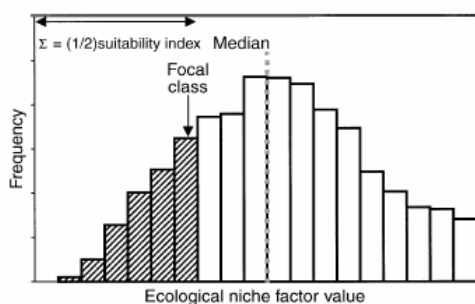


Figura 45 - esempio della procedura di calcolo dell'idoneità di ciascuna cella del paesaggio nella creazione del modello d'idoneità compiuta dall'ENFA. Per dettagli ulteriori si veda Hirzel *et al.*, 2002

idoneità parziale. Computando la media pesata di tutte le idoneità provvisorie viene generato per ogni cella un indice di idoneità ambientale, riscalo mediante il metodo delle isoplete in maniera da variare tra 0 e 100, parallelamente all'idoneità (Hirzel, 2001). Il metodo delle isoplete è preferito alla trasformazione lineare in quanto usa le osservazioni per riscalar l'indice: a tal fine, infatti, determina i limiti di ogni classe di indice di

idoneità in cui ricade un ugual numero di osservazioni. E' fondamentale che in tale operazione il metodo non assuma che tutte le osservazioni ricadano in habitat ottimali.

II.5 Risultati

II.5.1 Formalizzazione delle variazioni

II.5.1.1 Morfologia e cromatismi

Per l'analisi dei dati morfologici sono state considerate oltre alla popolazione di Roscigno con 30 individui, altre due provenienti da siti dell'entroterra cilentano, quella di Capaccio e quella di Pisciotta entrambe con 20 individui, per un totale di 70 campioni.

La tabella XXII riporta il numero di campioni, il valore medio e la deviazione standard, i valori minimo e massimo per ciascuna misura morfometrica considerata.

Tabella XXII - valor medio $\pm$ deviazione standard, valori minimo e massimo per ogni parametro biometrico considerato, per gli individui di Roscigno. N indica il numero di campioni; per le sigle si rimanda al paragrafo I.4.1.2.1 del testo

	ROSCIGNO									
	TOTALI				MASCHI			FEMMINE		
	MEDIA e DEV ST	MIN-MAX	N		MEDIA e DEV ST	MIN-MAX	N	MEDIA e DEV ST	MIN-MAX	N
SP	8,9 $\pm$ 1,3	6,5-10,6	20		9,3 $\pm$ 1,0	7,3-10,6	11	7,8 $\pm$ 1,4	6,5-9,8	4
LMT	10,7 $\pm$ 1,6	7,7-13,3	20		11,3 $\pm$ 1,2	8,6-13,3	11	9,1 $\pm$ 1,7	7,7-11,5	4
RO	19,3 $\pm$ 3,6	8,9-22,5	20		20,6 $\pm$ 1,6	16,9-22,5	11	15,7 $\pm$ 5,3	8,9-20,7	4
AT	8,5 $\pm$ 5,7	5,7-10,2	20		8,9 $\pm$ 1,1	6,3-10,2	11	7,3 $\pm$ 1,6	5,7-9,1	4
AG	8,7 $\pm$ 1,0	6,4-10,3	20		9,0 $\pm$ 0,9	7,3-10,3	11	7,9 $\pm$ 1,1	6,4-8,9	4
GD	12,2 $\pm$ 2,2	7,5-14,7	20		12,6 $\pm$ 2,1	7,5-14,7	11	11,1 $\pm$ 2,3	9,1-13,9	4
AI	41,8 $\pm$ 3,4	34,6-47,6	20		42,8 $\pm$ 2,9	38,2-47,6	11	39,2 $\pm$ 3,9	34,6-44,1	4
CS	13,8 $\pm$ 2,0	9,9-16,9	20		14,4 $\pm$ 1,6	10,3-16,9	11	12,0 $\pm$ 2,3	9,9-15,4	4
ZP	12,6 $\pm$ 1,9	9,4-14,9	20		13,8 $\pm$ 1,6	9,9-14,9	11	11,5 $\pm$ 2,1	9,4-14,4	4
T	7,8 $\pm$ 1,0	5,6-9,3	20		7,7 $\pm$ 1,0	5,6-9,3	11	7,9 $\pm$ 1,0	6,8-9,1	4
MC	77,1 $\pm$ 8,2	67,0-90,0	20		78,6 $\pm$ 8,2	68,0-90,0	11	73,5 $\pm$ 8,2	67,0-84,0	4
DAM	8,5 $\pm$ 1,2	6,0-11,0	20		8,8 $\pm$ 1,0	7,5-11,0	11	7,8 $\pm$ 1,7	6,0-10,0	4

L'analisi fattoriale delle misure morfometriche, condotta secondo la procedura delle Componenti Principali, ha spiegato il 69,9% della varianza cumulativa nelle prime tre componenti (tab. XXIII). Il grafico riportato in figura 46 rappresenta, appunto, la distribuzione spaziale delle variabili nello spazio tridimensionale delle prime tre componenti; il grafico in figura 47, invece rappresenta la distribuzione spaziale nelle stesse prime tre componenti degli

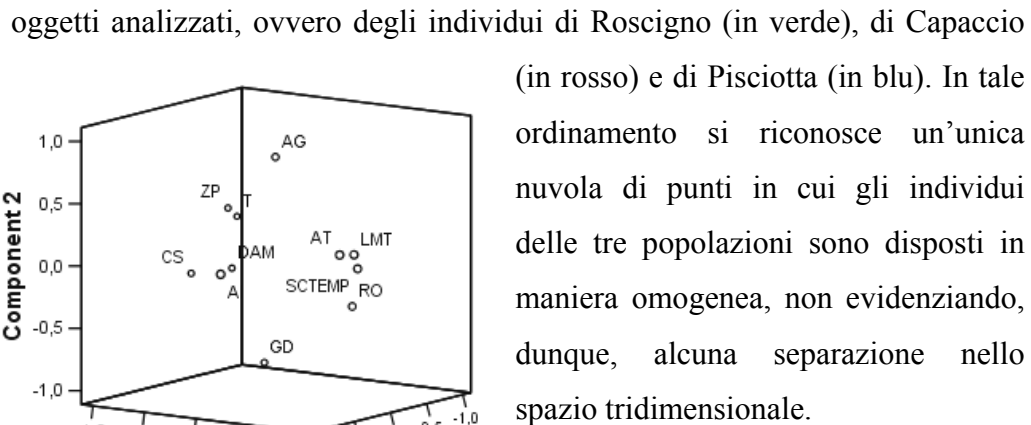


Figura 46 - distribuzione dei 12 parametri morfometrici utilizzati nell'analisi fattoriale nello spazio di ordinamento determinato dai fattori principali

Tabella XXIII - varianza degli oggetti spiegata dai fattori principali estratti dalla PCA durante la procedura. La varianza complessiva spiegata dai primi tre assi ammonta al 69,9%

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	4,923	44,753	44,753	4,923	44,753	44,753
2	1,739	15,809	60,562	1,739	15,809	60,562
3	1,031	9,372	69,933	1,031	9,372	69,933
4	,883	8,025	77,958			
5	,722	6,566	84,524			
6	,571	5,192	89,716			
7	,413	3,750	93,467			
8	,248	2,258	95,724			
9	,210	1,911	97,636			
10	,146	1,331	98,967			
11	,114	1,033	100,000			

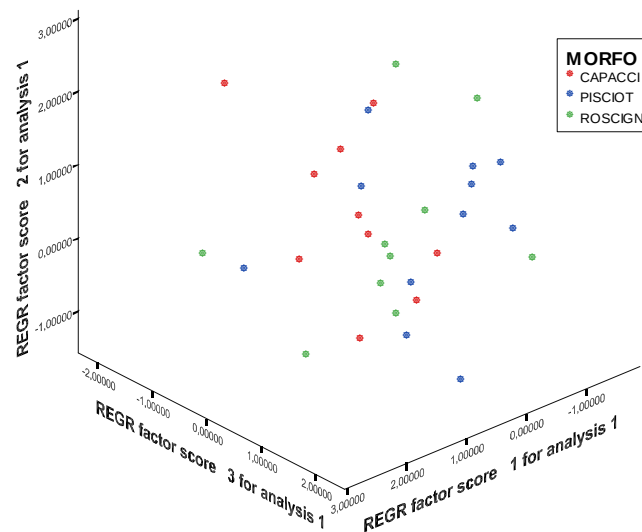


Figura 47 - ordinamento in PCA degli individui di Roscigno, in verde, di Capaccio in blue e di Pisciotta, in rosso, sulla base dei parametri morfometrici, nello spazio tridimensionale definito dai primi tre fattori principali (69,9% della varianza cumulativa)

L'analisi multivariata dei caratteri cromatici degli individui delle tre popolazioni, condotta mediante la procedura di CatPCA, descrive il 92,9% della varianza cumulativa nei primi tre assi di ordinamento (tab. XXIV); sono stati quindi utilizzati questi per raffigurare la distribuzione spaziale degli oggetti esaminati (fig. 48). Si nota che alcuni individui di Roscigno (in verde) occupano una regione dello spazio di ordinamento separata da quella generata da tutti gli altri individui, indicando una discriminazione tra i due gruppi.

Tabella XXIV- varianza globale delle variabili cromatiche spiegata dai primi due assi che la CatPCA ha estratto; il suo valore ammonta al 92.9%

Dimension	Cronbach's Alpha	Variance Accounted For	
		Total (Eigenvalue)	% of Variance
1	,465	1,536	38,393
2	,165	1,141	28,533
3	,052	1,040	26,010
Total	,975 ^a	3,717	92,936

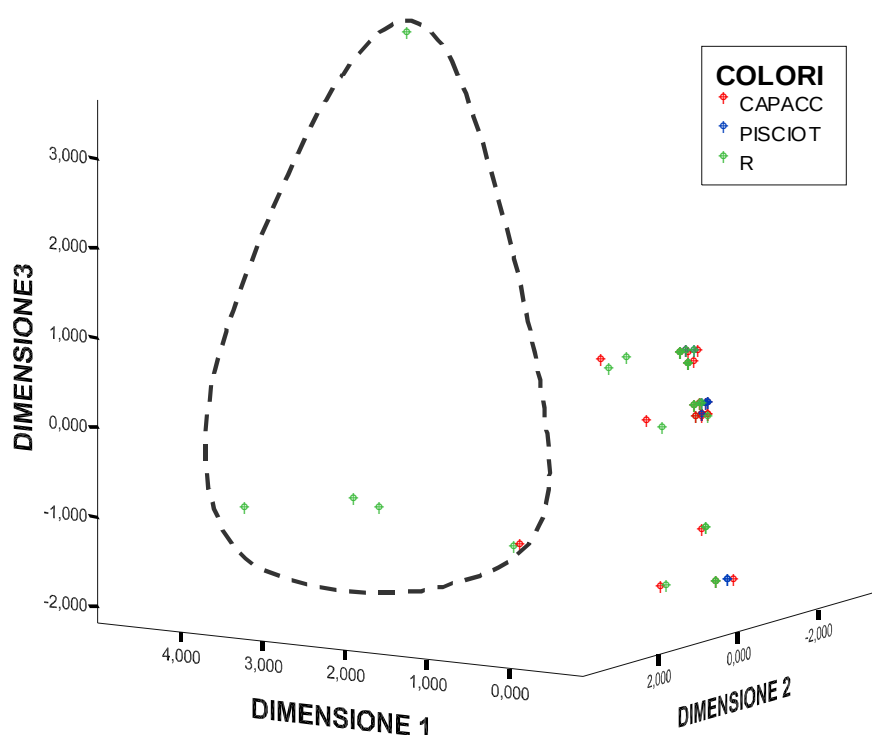


Figura 48 - ordinamento in CatPCA degli individui di Roscigno, in verde, di Capaccio, in blu e di Pisciotta, in rosso, sulla base dei parametri cromatici. I primi tre assi fattoriali utilizzati per la rappresentazione descrivono il 92,9% della varianza totale

II.5.1.2 Mitochondriale e microsatellite

Al fine di verificare la situazione di variabilità della popolazione di Roscigno in relazione ad altre popolazioni continentali, è stato analizzato anche il suo profilo genetico con 40 individui, confrontandolo con quello delle popolazioni provenienti da Capaccio (30 individui), Licosa (19 individui), Punta Licosa (18 individui), Ascea (15 individui) e Pisciotta (20 individui). Un totale di 142 campioni del Cilento è stato valutato.

Per ognuno di questi è stata sequenziata la regione 5' del gene 12S rDNA, per un totale di 615 paia di basi.

Diversità nucleotidica e aplo tipica

La composizione nucleotidica del tratto di DNA sequenziato nella popolazione di Roscigno è sovrapponibile con quanto descritto nella prima

Tabella XXV - composizione aplotipica della popolazione di Roscigno. N rappresenta la frequenza, mentre nel totale viene riportato il numero complessivo degli aplotipi nella popolazione

Aplotipi N

H1	22
H48	1
H49	1
H50	1
H51	1
H52	3
H53	1
H54	1
H55	1
H56	1
H57	1
H58	1
H59	1
H60	1
H61	1
H62	1
TOT	16

1,6.

Sono stati evidenziati 15 aplotipi nella popolazione di Roscigno, diversi da quelli già identificati, il cui elenco e le cui sequenze sono riportate rispettivamente in tabella XXV ed in figura 49. L'unico aplotipo comune alle popolazioni cilentane è l'H1, presente in Roscigno con una frequenza del 55%. La composizione aplotipica in frequenze di tutte le popolazioni cilentane considerate e confrontate nei grafici di figura 50 mette in luce l'alta variabilità aplotipica (16 aplotipi) della popolazione di Roscigno rispetto alle altre e la sua composizione poco omogenea, con un aplotipo dominante (H1, 55%) e tutti gli altri poco rappresentati.

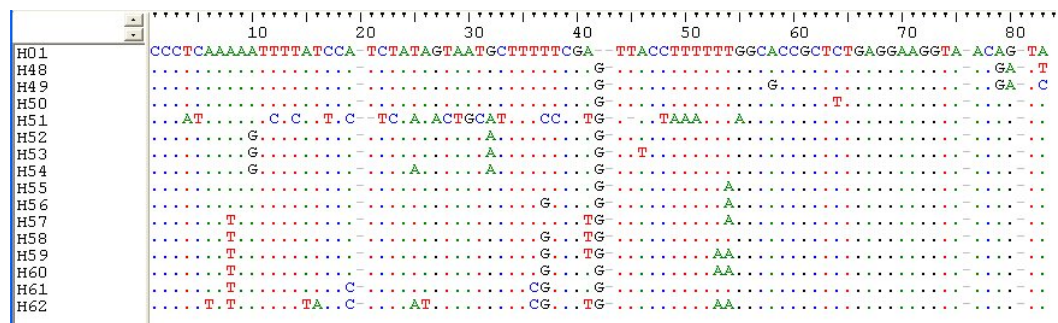


Figura 49 - lista degli aplotipi definiti dalle posizioni nucleotidiche polimorfiche. Le posizioni identiche alla prima sequenza sono indicate con un punto; i tratti indicano i *gap*

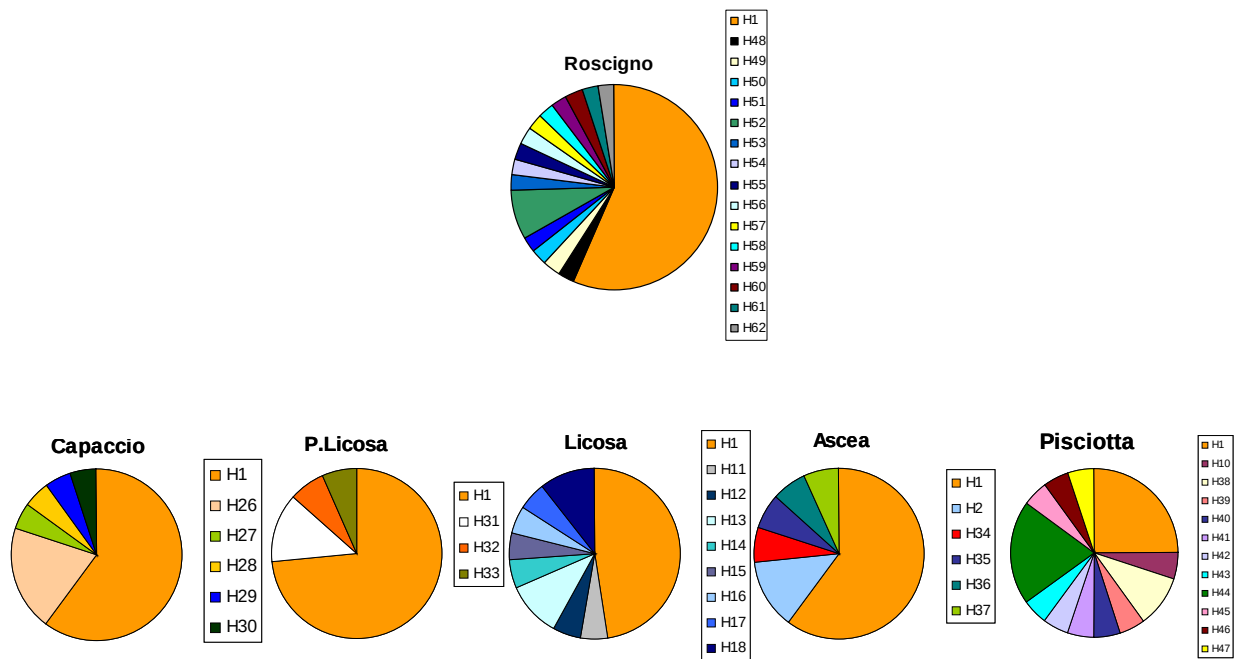


Figura 50 - composizione aplotipica di Roscigno e delle 5 popolazioni cilentane utilizzate per confronto; i grafici rendono conto anche delle proporzioni di rappresentatività degli aplotipi nelle popolazioni

Test di selezione neutrale

I risultati del test di Tajima applicato alle sequenze mitocondriali delle sei popolazioni cilentane, riportati nella tabella XXVI, evidenziano una situazione particolare per Roscigno: nell'ambito di una diffusa condizione di violazione dell'assunzione di equilibrio (tutte le popolazioni cilentane evidenziano un valore di $D \neq 0$), la popolazione d'interesse evidenzia lo scostamento maggiore ($-2,09$). Inoltre la popolazione mostra i valori più elevati di S e di π (39,0 e

Tabella XXVI - test di Tajima applicato alle sequenze delle sei popolazioni cilentane

	Capaccio	Punta Licosa	Licosa	Roscigno	Ascea	Pisciotta
N	30	18	19	40	15	20
S	7,0	10,0	14,0	39,0	13,0	11,0
π	1,02	1,56	2,43	3,74	2,07	2,00
D	-1,58	-1,87	-1,46	-2,09	-1,90	-1,27
P-value	0,06	0,10	0,05	0,004	0,02	0,09
θ_s	2,00	3,07	4,00	9,22	4,00	3,10
θ_π	1,03	1,56	2,43	3,74	2,07	2,00
Delta θ	-0,97	-1,51	-1,57	-5,48	-1,93	-1,10

3,74), delle due rispettive stime (9,22 e 3,74) ed il differenziale tra le due stime più elevato in valore assoluto (-5,48).

Analisi genealogica

Un'analisi filogenetica è stata condotta mediante la NCA, che ha costruito un *network* di aplotipi basato sulla parsimonia con le connessioni al limite di parsimonia fissate al 95% (Templeton *et al.*, 1992). Il risultato dell'analisi è rappresentato dal cladogramma di figura 51, in cui si riconoscono dei gruppi che corrispondono alle reali popolazioni.

L'analisi ha identificato H01 come aplotipo ancestrale, che connette tutti i gruppi riconosciuti, pur essendo stata condotta all'oscuro delle frequenze aplotipiche. H02, aplotipo unico di Ascea, popolazione cerchiata in rosso nella figura, è stato riconosciuto come successivo aplotipo ancestrale per le popolazioni di Pisciotta e Licosa e indirettamente anche per le altre due (Capaccio e Roscigno). Il gruppo che corrisponde alla popolazione di Capaccio (in verde scuro) è costituito dagli aplotipi intermedi che hanno dato origine ad altri aplotipi di Licosa (in celeste) e Roscigno (in verde chiaro). I gruppi che

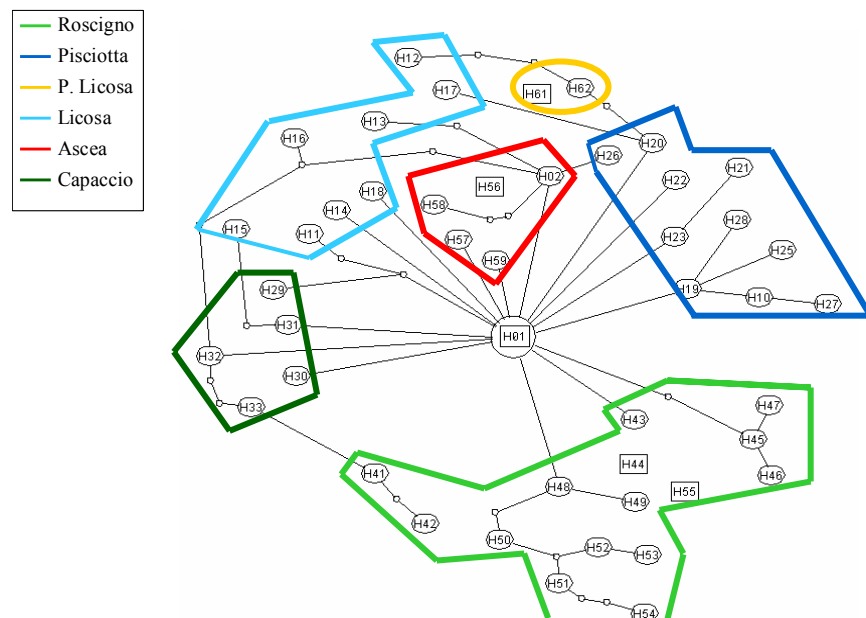


Figura 51 - cladogramma delle popolazioni cilentane analizzate, ottenuto mediante *Nested Clade Analysis*. Nell'albero degli aplotipi vengono identificati dei gruppi corrispondenti alle popolazioni, cerchiati con diversi colori secondo come indicato in legenda

identificano queste due popolazioni, inoltre, contengono solo aplotipi terminali, ovvero non collegati ad altri; solo in Roscigno alcuni aplotipi sono connessi ad altri della stessa popolazione, ma non mostrano connessioni con alcun'altra popolazione. Quattro aplotipi sono stati riconosciuti come indipendenti (H44 e H55 di Roscigno; H61 di Punta Licosa; H56 di Ascea), non legati a nessun altro; probabilmente questi rappresentano elementi di linee filetiche non campionate.

Diversità genetica

L'analisi dei frammenti microsatelliti del DNA nucleare, condotta sugli

Tabella XXVII -
distribuzione degli
alleli riscontrati nella
popolazione di
Roscigno

stessi 142 campioni e condotta mediante il pannello di 8 *loci* descritti nella prima sezione (para. I.4.1.3.4), ha messo in luce l'esistenza di altri 23 alleli caratteristici della popolazione di Roscigno (tab. XXVII).

<i>locus</i>	N° alleli
La2	4
La3	1
la4	2
La6	2
A7	2
B3	2
B4	4
D1	6

Test di assegnazione

Tra i diversi modelli di struttura generati con varie iterazioni del programma, il più congruente è stato impostato con $K = 5$, 10.000 *burn-in periods* e 1.000.000 repliche. I risultati dell'analisi bayesiana dei genotipi sono riportati in figura 52. Si riscontra un gruppo, contraddistinto dal celeste, che caratterizza la popolazione di Roscigno e che si ritrova praticamente solo in Ascea tra le altre popolazioni cilentane. Diversamente, gli altri gruppi della popolazione di Roscigno sono condivisi con tutte le popolazioni cilentane continentali.

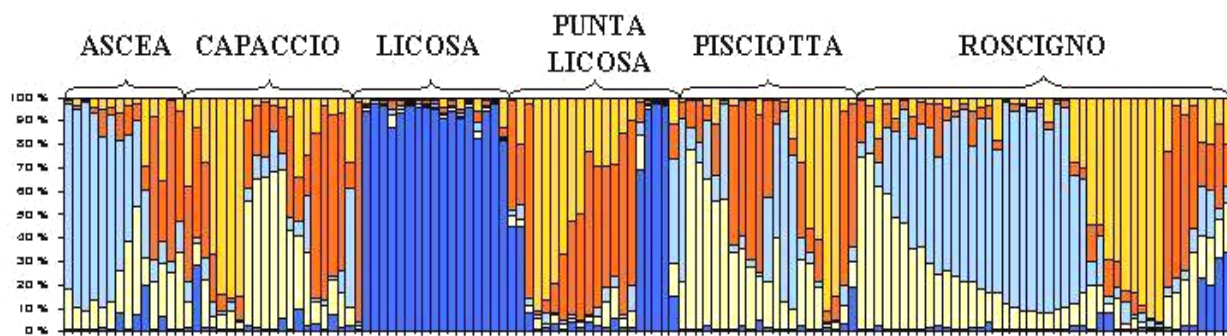


Figura 52 - test di assegnazione molecolare dei genotipi nucleari delle sei popolazioni cilentane. Per la spiegazione delle barre e dei colori si veda figura 29

L'analisi ha assegnato pochi genotipi di Roscigno al gruppo di congruenza arancione tipico invece di Punta Licosa.

II.5.2 Analisi dell'isola continentale

A scala globale....

L'analisi genetico-territoriale, condotta con il *software AIS*, ha restituito risultati quasi sovrapponibili nei due casi di applicazione: alle sequenze e ai

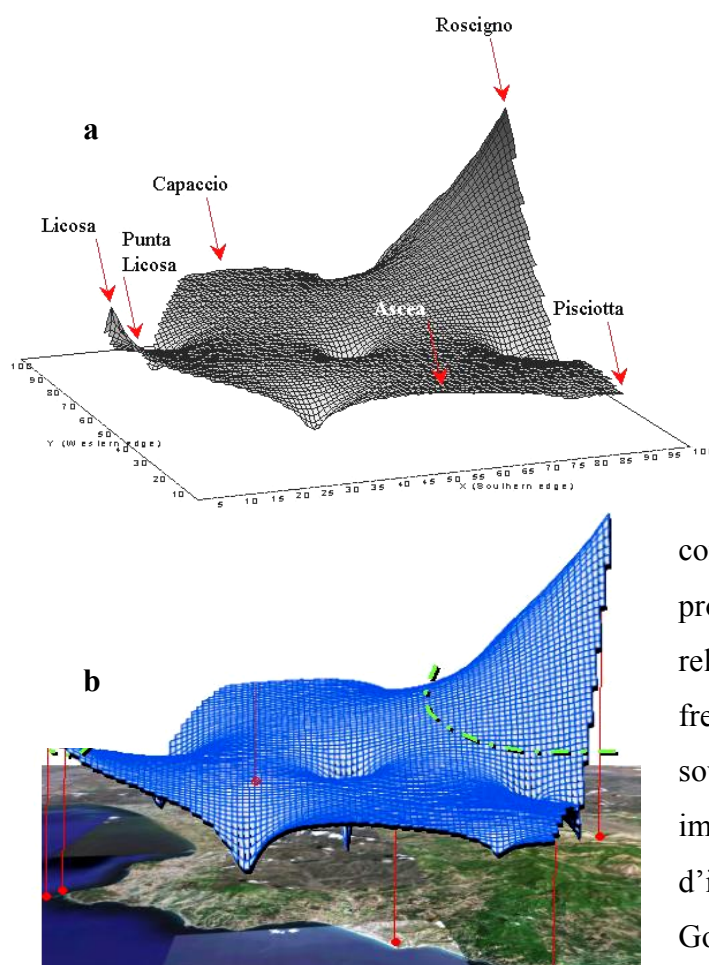


Figura 53 - ricostruzione di un paesaggio genetico tra le sei popolazioni cilentane, elaborato mediante l'interpolazione delle distanze genetiche dal *software AIS*. In a, l'output restituito dal programma dell'analisi è stata condotta sulle sequenze; in b, il risultato dell'analisi delle frequenze alleliche, è stato sovrapposto ad una immagine del paesaggio: le linee rosse riportano alle localizzazioni dei siti delle popolazioni (pallini rossi sul Cilento). Le linee tratteggiate verdi indicano le barriere al flusso genico.

frammenti
microsatellite, come
riportato
rispettivamente nelle
immagini di figura 53
a e b. La prima di
queste immagini,
relativa all'analisi
delle sequenze, viene
riportata direttamente
come l'*output* del
programma; l'altra, invece,
relativa all'analisi delle
frequenze alleliche, è stata
sovrapposta ad una
immagine del paesaggio
d'indagine, scaricato da
Google Earth v3.0

(<http://earth.google.com>) per una più
completa
visualizzazione. In
entrambe le analisi è
stata impostata una

maglia di 100x100 celle che descrive il territorio di analisi, per quanto riguarda la dimensione della griglia di visualizzazione del risultato; l'altro parametro di visualizzazione è a , che regola il peso attribuito alla distanza genetica nel paesaggio genetico ricreato ed è stato impostato pari ad 1. Il risultato dell'analisi, infatti, corrisponde ad una interpolazione del paesaggio in cui sono localizzate le popolazioni e ad una ricostruzione sulla base delle distanze genetiche riscontrate tra le popolazioni stesse: quindi se sugli assi ortogonali X e Y si rappresenta lo spazio geografico in un sistema metrico e si individuano i siti delle popolazioni campione, sull'asse verticale Z, si rappresenta la distanza genetica per cui la pendenza della maglia creata risulta direttamente proporzionale alla distanza genetica tra le popolazioni.

Dalle immagini di figura 52 a e b si nota che tra le popolazioni le distanze genetiche maggiori vengono espresse tra Roscigno e le due popolazioni confinanti, Pisciotta e Capaccio, e tra Licoso e Punta Licoso. L'algoritmo di Monmonier ha poi individuato quindi le barriere esistenti nell'ambito di tale paesaggio, rappresentate nella figura 53b, attorno a Licoso e a Roscigno.

....e a scala locale

Per realizzare l'analisi a scala locale dell'eventuale isola paesaggistica sono state condotte analisi GIS, attraverso cui è stato costruito un modello di idoneità ambientale per la specie, al fine di individuare livelli di biopermeabilità e di attrito ambientale delle diverse tessere esistenti attorno alla popolazione. Il modello è stato generato mediante la procedura dell'ENFA.

La prima operazione di digitalizzazione dell'area di studio ha individuato un mosaico paesaggistico composto da 10 tipologie di uso del suolo; l'organizzazione e la struttura di tale paesaggio vengono fornite dai risultati dell'analisi di frammentazione compiuta con *Patch Analyst 3.1* (Rempel & Carr, 2003), riportati sinteticamente in tabella XXVIII.

La tipologia più rappresentata è l'oliveto con 13 tessere; gli elementi lineari, il fiume Ripiti, la strada asfaltata e le sterrate costituiscono singole tessere. Fatta eccezione per il fiume, delineato da un unico poligono di grandi

dimensioni che circoscrive a sud-est l'intero paesaggio, il bosco rappresenta la

Tabella XXVIII - indicatori del grado di frammentazione del paesaggio d'interesse. Per la spiegazione degli indici si veda il testo. nc = non calcolato

uso del suolo	N° tessere	Dimensione media $\pm$ dev st (ha)	Dimensione del margine	Densità del margine	Dimensione media del margine / tessera	Mean Shape Index	Dimensione Frattale Media
Oliveto	13	3,45 $\pm$ 3,72	14267	79,15	1097	1,71	1,3562
Oliveto M	6	1,47 $\pm$ 1,62	3444	19,11	574	1,47	1,3649
Oliveto J	3	0,9 $\pm$ 0,66	1155	6,41	385	1,32	1,3849
Bosco	8	11,46 $\pm$ 10,62	16931	93,93	2116	2,22	1,405
Vigneto	3	0,33 $\pm$ 0,14	727	4,04	242	1,21	1,3636
BoscoFitto	3	6,25 $\pm$ 5,17	3780	20,97	1260	1,48	1,3279
Macchia	2	0,10 $\pm$ 0,04	429	2,38	214	1,89	1,5514
Sterrata	1	0,24	nc	nc	895	5,15	1,7466
Fiume	1	10,98	nc	nc	5716	4,87	1,4907
Strada	1	0,96	nc	nc	3754	10,78	1,7943

tipologia costituita da elementi di dimensioni medie maggiori, rispetto alle altre categorie (11,46 he) e contestualmente anche con la più alta deviazione standard (10,62): la sua variabilità dimensionale dipende dalla presenza delle piccolissime tessere residue. Diversamente, gli elementi a macchia mediterranea sono sporadici (2) e piccoli, raggiungendo una dimensione media di 0,1 he. Il bosco e l'oliveto rappresentano anche le due categorie con elevata dimensione (16.931 e 14.267) e densità dei margini (93,93 e 79,15) ed insieme al bosco fitto presentano i più alti valori di dimensione media di margine per tessera di paesaggio (rispettivamente 2.116 per il bosco, 1.270 per il bosco fitto e 1.097 per l'oliveto). Si è preferito escludere le tipologie di uso del suolo quali la strada e il fiume dal calcolo di metriche relative al margine, in quanto prive di significato ecologico. L'indice *Mean Shape Index* fornisce un'informazione sulla forma più o meno tondeggiante dei poligoni di una categoria. Il valore maggiore è espresso dalla strada, 10,78 data la sua forma dendritica, seguito da quello degli altri elementi lineari (5,15 per le strade secondarie sterrate e 4,87 per il fiume). Il valore minore, invece, è dei piccoli vigneti con forme geometriche regolari (1,21). Analogamente, la dimensione frattale delle tessere oscilla tra il massimo negli elementi sottili, come strade e fiume (1,79-1,49) ed il minimo del bosco fitto (1,33).

Le figure 54, 55, 56 e 57 mostrano gli strati informativi del paesaggio creati sulla base delle variabili ecogeografiche scelte, ovvero esprimono la distribuzione dei valori di ciascuna variabile nel paesaggio considerato: come

è facile osservare dalle immagini, ogni tessera di ciascuno strato informativo è identificata e discriminata sulla base della variabile. Ciascuna immagine di mappa vettoriale è affiancata nella figura dalla corrispondente mappa in formato *raster*, generata dalla riclassificazione quantitativa del paesaggio.

Specificatamente, si riporta il livello di uso del suolo e la sua corrispondente *grid*:

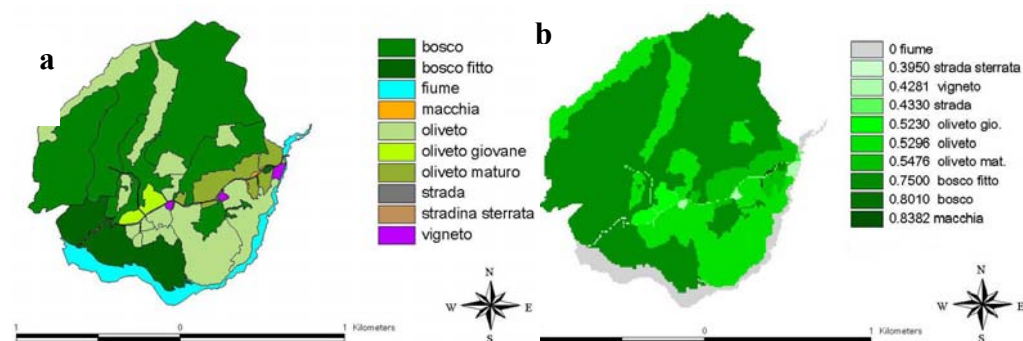


Figura 54 - livello informativo relativo all'uso del suolo. L'area di studio, Roscigno, è stata scomposta in tessere corrispondenti a diverse tipologie di uso del suolo, circonscritte dai poligoni. I colori di questi ultimi si rifanno alla legenda. In a è riportata la carta in formato vettoriale, in b la corrispondente *grid*

il livello relativo all'esposizione e il suo corrispondente strato in formato *raster*:

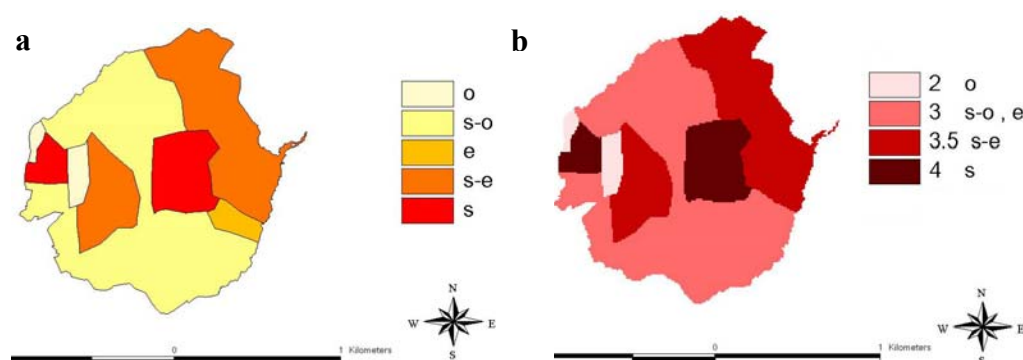


Figura 55 - livello informativo generato dall'analisi dell'esposizione delle tessere di Roscigno. In a è riportata la carta in formato vettoriale, in b la corrispondente *grid*

quello relativo alla disponibilità trofica e il suo corrispondente strato in formato *raster*:

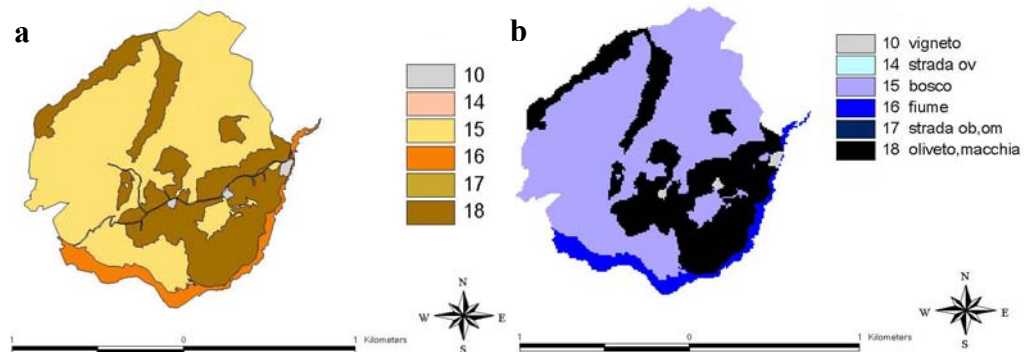


Figura 56 - strato informativo relativo alla disponibilità d'Insetti nel paesaggio di Roscigno. In a è riportata la carta in formato vettoriale, in b la corrispondente *grid*

ed infine, il livello relativo alle strutture antropiche e la sua *grid*:

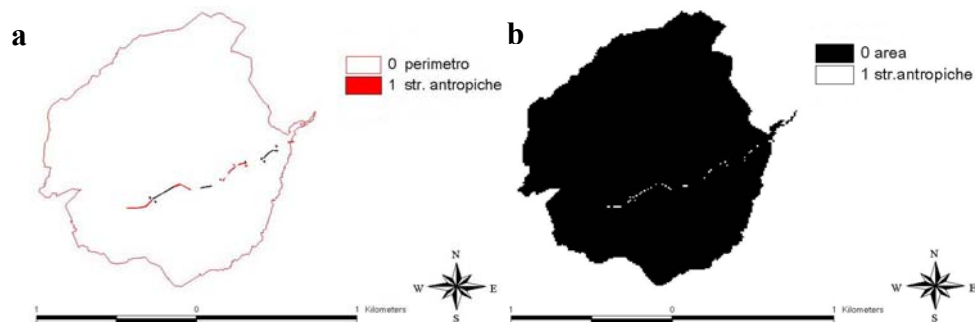


Figura 57 - strato informativo relativo alla presenza delle strutture antropiche, quali muretti o costruzioni varie nell'area di Roscigno. In a è riportata la carta in formato vettoriale, in b la corrispondente *grid*

In figura 58 viene riportata la distribuzione sul paesaggio della presenza della specie, variabile dipendente per la procedura ENFA, su cui fonda l'algoritmo di idoneità ambientale; anche in questo caso, accanto si riporta la mappa convertita in formato *raster*:

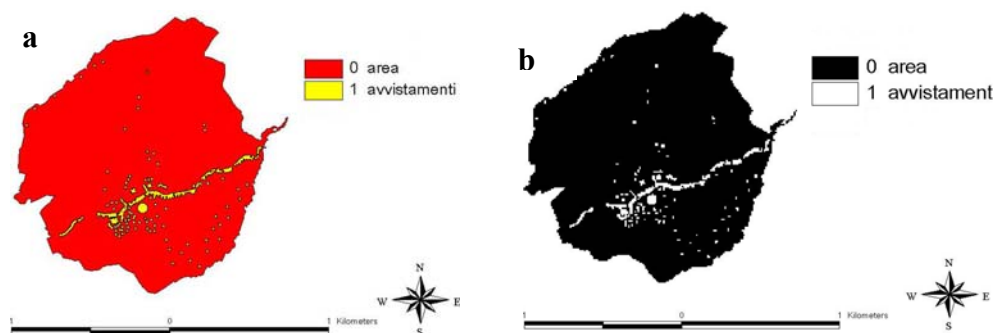


Figura 58 - distribuzione della specie focale *Podarcis sicula* nell'area di studio. In a è riportata la carta in formato vettoriale, in b la corrispondente grid

In tabella XXIX viene riportata la correlazione tra le EGV, determinata dalla procedura ENFA.

Tabella XXIX - correlazioni tra le 4 variabili ecogeografiche della nicchia di *Podarcis sicula*, calcolate dalla procedura dell'*Ecological Niche Factor Analysis*

EGV	uso del suolo	esposizione	disponibilità trofica
uso del suolo			
esposizione	0,16		
disponibilità trofica	-0,51	-0,09	
antropizzazione	-0,03	0,02	0,06

Le variabili non mostrano valori elevati di correlazione; la correlazione più alta è riscontrata tra la disponibilità trofica e l'uso del suolo, il cui valore corrisponde a - 0,51. La riduzione delle variabili ecogeografiche in due fattori principali, condotta dall'ENFA, esprime complessivamente l'84,7% della varianza delle EGV originarie. Il valore percentuale è distribuito fra i due fattori come esposto nella figura 59, che indica anche la relazione esistente tra i fattori principali e le variabili originarie: il primo fattore è particolarmente influenzato dall'antropizzazione, mentre l'uso del suolo e l'esposizione sono più pesanti nel costruire il secondo asse; la disponibilità trofica partecipa alla estrazione dei due assi con ugual peso.

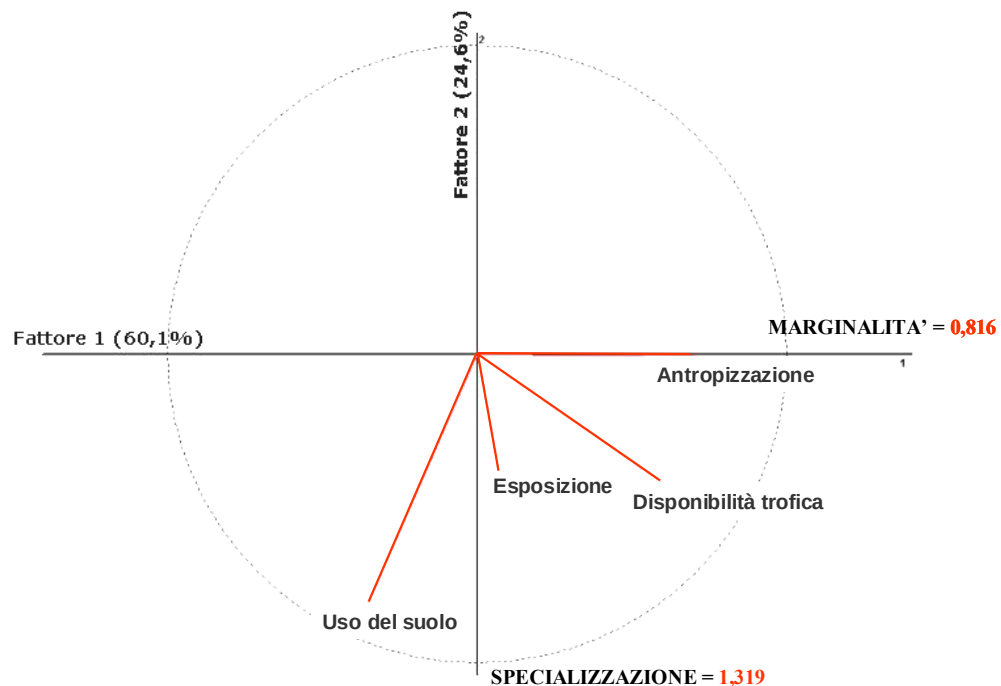


Figura 59 - rappresentazione dei primi due fattori che la procedura dell'*Ecological Niche Factor Analysis* ha estratto. Il primo fattore da conto della marginalità ed il secondo della specializzazione di *Podarcis sicula* nel paesaggio di Roscigno. Su ciascuno viene indicata la corrispondente varianza espressa. Le variabili ecogeografiche partecipano alla generazione dei fattori come indicato dalle rispettive linee rosse

Il significato ecologico del primo fattore è la **marginalità globale M** della specie nel paesaggio considerato. Questo indice massimizza la differenza assoluta tra la mediana delle condizioni ambientali utilizzate dalla specie e la mediana delle condizioni ambientali disponibili nel paesaggio; assume così valori compresi fra 0 e 1, progressivamente crescenti quanto più la specie non è ugualmente rappresentata nel paesaggio. In altre parole all'interno di questo *range* valori più elevati indicano una tendenza della specie a sfruttare condizioni ecologiche marginali rispetto a quelle maggiormente espresse dal paesaggio considerato, mentre valori più bassi indicano che la specie tende a vivere nelle condizioni ecologiche maggiormente disponibili nell'area di studio.

Il valore di marginalità calcolato per *Podarcis sicula* nel paesaggio analizzato è $M = 0,816$.

Il significato ecologico del secondo fattore, in cui sono state ridotte le variabili, è la specializzazione globale, che massimizza la varianza della distribuzione globale ed esprime il rapporto tra la varianza delle condizioni ambientali disponibili nel paesaggio e la varianza di quelle sfruttate dalla specie. Ogni valore dell'indice superiore ad 1 indica una forma di specializzazione.

Tabella XXX - correlazione tra ciascuna variabile ecogeografica e ogni fattore estratto dalla procedura ENFA

	Fattore 1 (60%)	Fattore 2 (25%)
Uso del suolo	-0,35	-0,81
Esposizione	0,07	-0,4
Disponibilità trofica	0,61	-0,42
Antropizzazione	0,71	0,01

Nel caso esaminato la specializzazione di *Podarcis sicula* nel paesaggio considerato è $S = 1,319$.

I valori di correlazione tra ciascuna

EGV e ciascuno dei primi due fattori estratti, riportati nella tabella XXX, aiutano a comprendere meglio il legame tra le variabili stesse ed i due fattori.

Le due variabili maggiormente correlate alla marginalità (primo fattore) risultano essere l'antropizzazione (0,7) ed la disponibilità trofica (0,6): i valori di tali variabili nelle celle di presenza della specie differiscono molto da quelli mediamente espressi dall'intero paesaggio. Al contrario, l'indice di correlazione basso espresso dall'esposizione (0,07) indica che i versanti preferiti dalla specie sono anche quelli maggiormente presenti nell'area di studio. Per quanto concerne la specializzazione (secondo fattore), la variabile ecogeografica più correlata ad essa è l'uso del suolo (0,8): in altre parole, tra tutte le tipologie di uso del suolo presenti nel paesaggio, la specie tende a frequentarne solo alcune. Infine è possibile affermare che l'antropizzazione non fornisce alcun contributo al fattore di specializzazione (correlazione pari 0,01) in quanto la presenza della specie è stata accertata su tutte le strutture antropiche presenti nell'area di studio.

In ragione della marginalità e della specializzazione di *Podarcis sicula*, infine, è stata realizzata la mappa di idoneità del habitat della specie relativa al paesaggio considerato (figura 60).

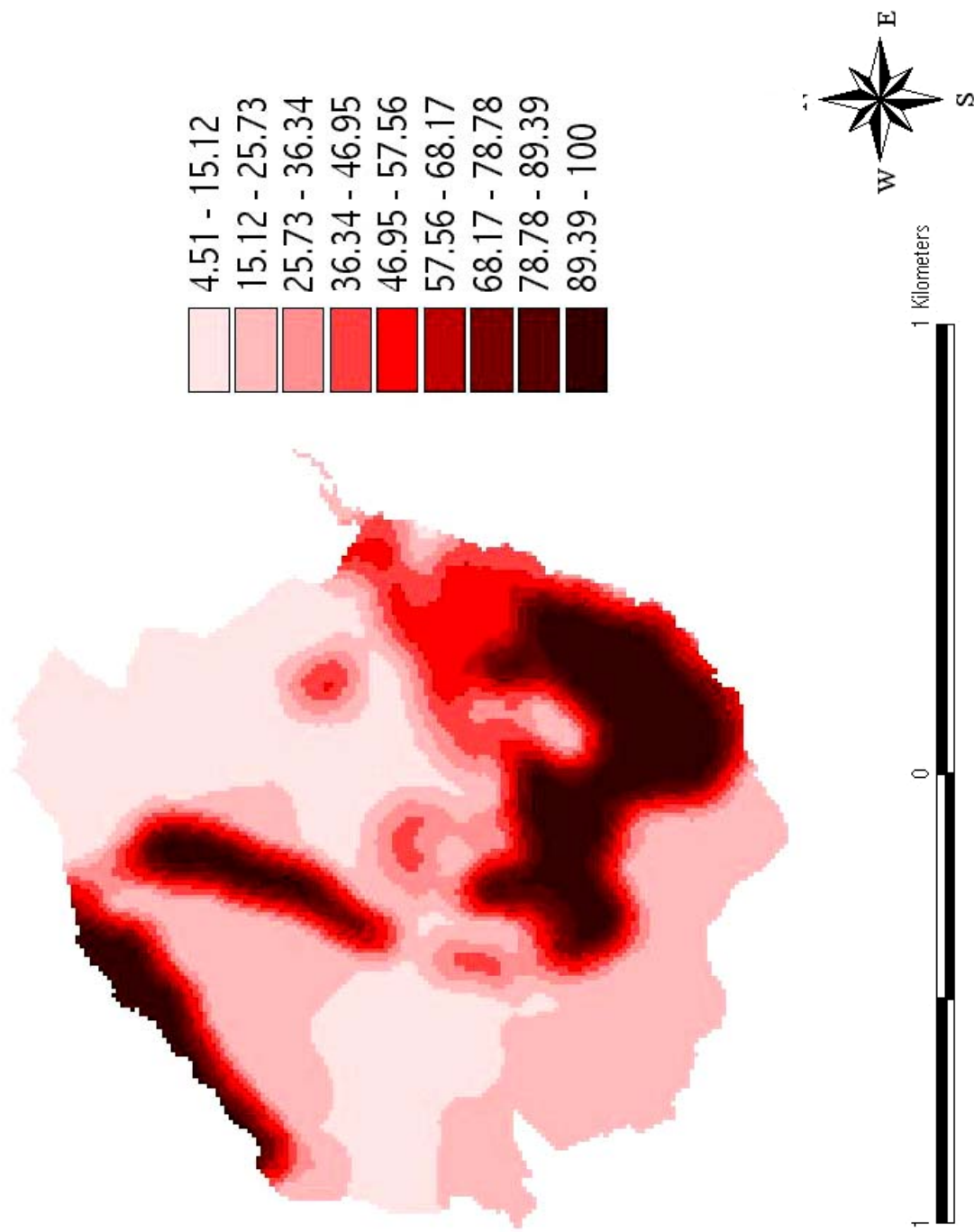


Figura 60 - carta dell'idoneità dell'habitat per *Podarcis sicula* nell'area di Roscigno, creata mediante la procedura dell'*Ecological Niche Factor Analysis*. Le diverse intensità di colore sono proporzionali all'idoneità per la specie

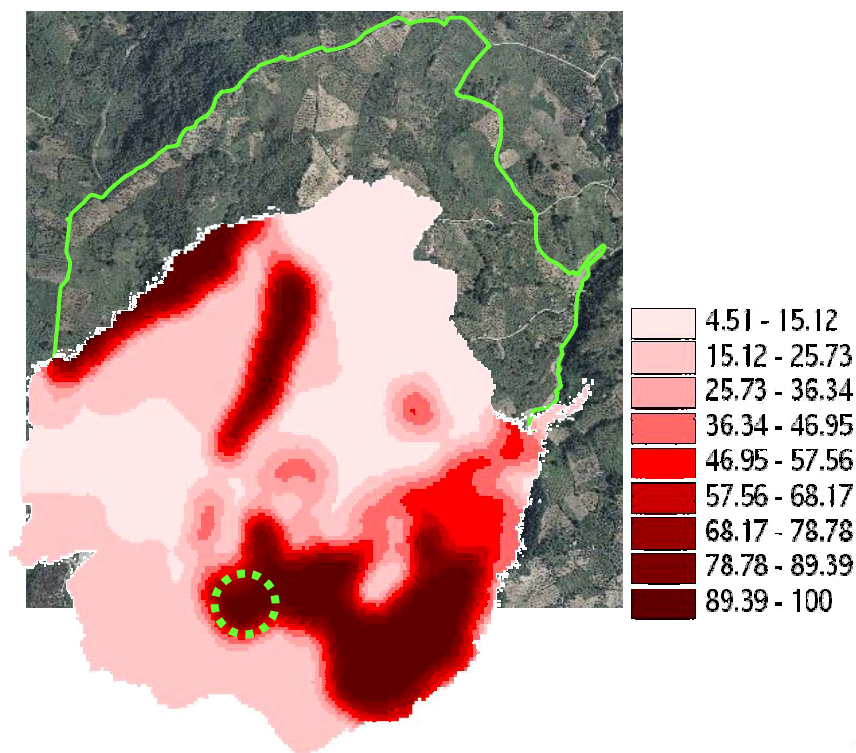


Figura 61 - modello d'idoneità ambientale sovrapposto alla foto aerea dell'area di studio e localizzazione della popolazione indagata in verde

L'area colorata identifica il paesaggio analizzato nell'area di Roscigno intorno alla popolazione di interesse (fig. 61). Le zone evidenziate da intensità



Figura 62 - un individuo di *Podarcis sicula* di Roscigno sul muretto. Foto di A. Della Paolera

di colore maggiore sono quelle caratterizzate dai più alti valori di idoneità e, quindi, manifestano una minore frizione per la specie focale. Progressivamente, al ridursi dell'intensità dei colori nella carta si riduce l'idoneità per la specie focale e di conseguenza la specie

tenderà ad frequentarle di meno.

Il modello di idoneità di figura 60 ha individuato l'esistenza di tre zone molto favorevoli alla presenza della specie immerse in una matrice essenzialmente ostile di paesaggio complessivo in cui vive la popolazione esaminata. In particolare nella zona idonea di maggiori dimensioni, situata

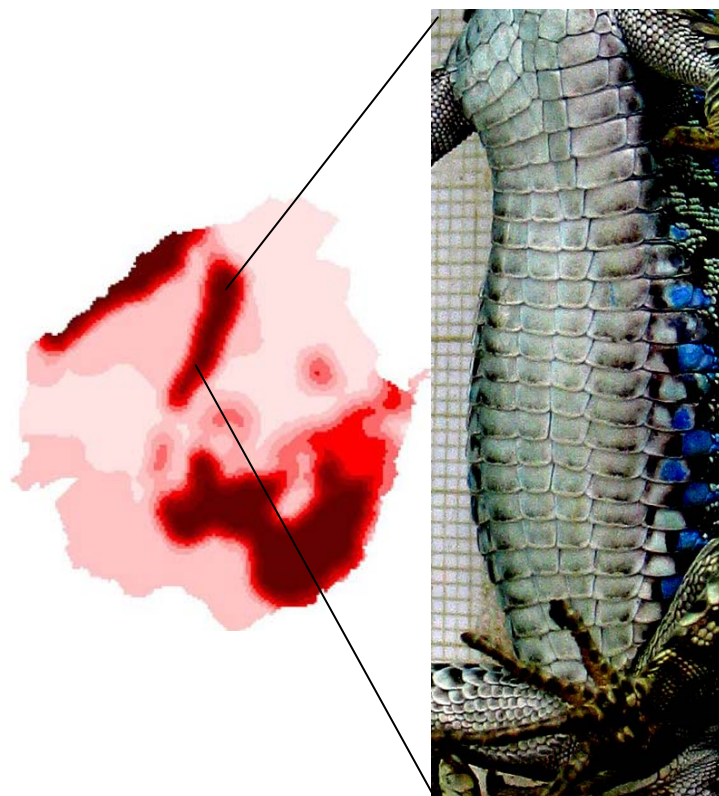


Figura 63 - individui parzialmente melanici sono stati identificati durante la validazione diretta del modello d'idoneità, anche in un'altra area idonea per *Podarcis sicula*, identificata dal modello stesso

nella parte sud-orientale dell'area di studio, è localizzato il muretto su cui vive la popolazione con individui melanici oggetto della ricerca (fig. 63).

Una validazione diretta del modello condotta sul campo, mediante una campagna di cattura di animali in tutte le aree risultate idonee, ha messo in luce

l'esistenza di animali almeno parzialmente melanici, con macchie scure nella regione ventrale, sicuramente in una delle due aree indicate dal modello (fig. X).

DISCUSSIONE

Le popolazioni naturali poste in condizioni di insularità seguono percorsi evolutivi condizionati dalle caratteristiche del nucleo fondatore o da eventi stocastici che intervenendo su gruppi di dimensioni effettive relativamente piccole, possono sortire effetti gravi. Questo aspetto è di grande interesse per la Biologia della Conservazione, infatti molte delle cause di minaccia per le popolazioni animali, quali la frammentazione o riduzione degli habitat, l'introduzione di nuove specie, la riduzione demografica, possono essere ricondotte a diversi aspetti del fenomeno "isolamento".

Al fine di indagare i processi microevolutivi che intervengono in popolazioni isolate, per inquadrare le caratteristiche dell'isolamento e dei suoi possibili effetti sul genotipo e sul fenotipo degli animali, la ricerca è partita con un modello d'indagine costituito dalle popolazioni di lucertole viventi in tre isole marine: Cirella, Licosia e Ustica. Lo schema così composto, in cui le isole evidenziano differenti caratteristiche geografiche e geologiche, ha effettivamente dimostrato differenze sostanziali tra le tre popolazioni di *Podarcis sicula* sia su base morfologica che molecolare. Nel definire il *pattern* di variabilità fenotipica esistente nelle tre popolazioni insulari sono state analizzate le caratteristiche biometriche e cromatiche degli individui. Singole variabili morfometriche discriminano le popolazioni, come le misure di lunghezza negli individui di Licosia; ma un'analisi di sintesi, tesa alla riduzione delle variabili, mostra una discriminazione significativa solo nel caso dell'isola di Ustica, rispetto alla popolazione della terraferma prospiciente. Questo potrebbe essere legato al grado di isolamento di quest'isola e/o alle sue caratteristiche ecologiche locali. Il *pattern* cromatico discrimina, invece, Licosia sulla base della iper-pigmentazione azzurra, tipica degli individui che vivono sull'isola. Questo aspetto sebbene difficile da giustificare (si rimanda all'introduzione per una rassegna delle ipotesi

formulate a riguardo) trova una sua corrispondenza con le caratteristiche genetiche della popolazione. Infatti, la diversità genetica, l'analisi degli aplotipi e il test di neutralità caratterizzano la popolazione di Licosa, l'unica melanica, come quella che ha subito e subisce integralmente le conseguenze dell'isolamento; Licosa, infatti ha evidenziato:

- livelli di variabilità (eterozigosità attesa su base microsatellite) più bassi delle altre due isole;
- una dominanza da parte di un aplotipo, condiviso con la popolazione di Cirella, che è presente nel 50% degli individui campionati;
- uno scostamento dall'equilibrio neutrale, con valori di $D \neq 0$, di differenziale tra S e π alto, condizionati da una significativa pressione selettiva direzionale; lo stesso test di neutralità mentre per Cirella, la popolazione fenotipicamente normotipo, fornisce indicazioni di un recente *bottleneck* (dato il basso numero dei siti segreganti S , la differenza positiva tra le stime θ , nonché il più alto valore di D), per Ustica, la popolazione differenziata su base biometrica, indica una popolazione non sottoposta a particolari pressioni selettive o incrementi demografici recenti, né pregressi *bottleneck*, visti il valore alto di S e il valore di D prossimo allo 0.

Questi risultati hanno indotto un approfondimento per la popolazione dell'isola di Licosa invitando a ricostruirne la storia evolutiva.

La popolazione di Licosa deriva da una popolazione ancestrale, progenitore comune dell'attuale popolazione dell'isola e della popolazione di Punta Licosa. Infatti, la similarità genetica stimata tramite indici sintetici di diversità, mediante analisi degli aplotipi, mediante il test di assegnazione molecolare con statistica bayesiana, prova il legame più vicino ed esclusivo esistente tra i suddetti siti, rispetto ad altri della terraferma, Capaccio, Ascea e Pisciotta. L'ipotesi di una relazione possibile tra Licosa e uno di questi luoghi, nasce da un'indagine sulle provenienze delle barche che frequentano l'area circostante l'isola. In altri casi la colonizzazione di Lacertidi dalla terra ferma si è vista dipendente da movimenti passivi degli individui che derivavano da località non contigue,

ma raggiungibili attraverso correnti marine.

In questa indagine il test di assegnazione molecolare ha dato un risultato particolarmente chiaro di associazione tra le due popolazioni prospicienti, supponendo anche un possibile evento di colonizzazione secondario a Licosia: probabilmente l'unico che abbia lasciato segni tra i tanti che si possono immaginare. Il genotipo che porterebbe traccia di tale evento, (cfr. fig. 30 ed in particolare il genotipo evidenziato dal colore arancione), si ritrova disperso in tutte le popolazioni cilentane considerate; si potrebbe quindi supporre la provenienza da qualsiasi parte della costa, ma la sua alta rappresentatività nella popolazione di Punta Licosia fa di nuovo presumere la sua provenienza da questo promontorio a soli 200 m di distanza.

Il passo successivo di analisi ha permesso di datare l'evento di origine della popolazione. A tal proposito è necessario fare una precisazione, l'uso del tratto genico utilizzato (12S del mtDNA) nella procedura di datazione va considerato con cautela, per due motivi:

- 1 la datazione di una separazione sulla base di un gene è certamente riferita ad una divergenza genica tra i due campioni considerati che potrebbe nel tempo essere rientrata senza effettivamente sfociare in una differenziazione tra le due popolazioni;
- 2 l'assenza di dati precisi sul tasso di evoluzione mitocondriale del gene in questione e della specie in analisi, ha indotto l'assunzione come riferimento del tasso evolutivo del DNA mitocondriale, come da letteratura pari a 10^{-5} .

Queste due considerazioni hanno spinto verso un'analisi più attenta e verso una duplice datazione: se la datazione genetica di divergenza ha indicato una separazione risalente a 14.000 anni fa, la datazione di divergenza popolazionistica ha ridotto di poco i tempi, datando l'evento a 12.600 anni fa. Tale discrepanza può essere attribuita alla diversa accuratezza delle due stime o ad una effettiva separazione tra le due popolazioni, successiva rispetto alla divergenza a livello genico. Va considerato comunque che trattandosi di tempi evolutivi una differenza di 1.400 anni non assume particolar peso in un evento

così lento e complesso come la differenziazione tra due popolazioni. L'aspetto particolarmente singolare è venuto fuori quando si tentato di collocare l'evento ricostruito nella storia geologica dell'isolotto. Un'indagine specifica ha infatti permesso di ricostruire la genesi dell'isola avvenuta solo 4.500 anni fa. Riassumendo, i tempi dei diversi eventi vengono rappresentati nella figura 64.

L'interpretazione di questa osservazione può essere duplice. Da un lato è

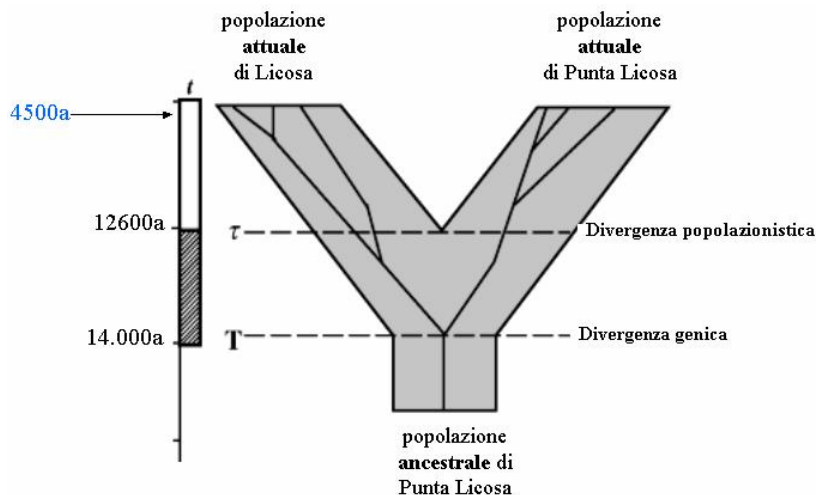


Figura 64 - schema riassuntivo della datazioni ricostruite durante la ricerca; in azzurro la datazione geologica

di Lacertidi che poste in condizioni di insularità evidenziano alti tassi di mutazione (p. e. Glor *et al.*, 2003; 2004). A tal proposito, tarando il tasso evolutivo del gene considerato sul tempo geologico di 4.500 anni, momento da cui avrebbe preso avvio la separazione tra le due popolazioni ($k = K/2 \cdot T$ (Jukes & Cantor) = $0.03/2 \cdot 4500$), la velocità evolutiva risulta pari a $0,35 \cdot 10^{-5}$. D'altro canto, se si ammette che i tassi di mutazione del marcatore impiegato non abbiano subito particolari impennate, sarà necessario datare l'evento di isolamento, o comunque l'inizio della divergenza genetica tra le due popolazioni, in tempi in cui la trasgressione marina non poteva essere una causa. Probabilmente l'isolamento delle lucertole di Licosa ha seguito un *pathway* spaziale mediato dalla frammentazione del paesaggio e non dal mare; in effetti, una ricostruzione condotta in base alle batimetrie dei

fondali ha dato un'idea generale della conformazione del paesaggio di Licosa intorno ai 14.000-12.000 anni fa: quando la popolazione attualmente

possibile che i tassi di mutazione del marcatore utilizzato siano notevolmente più elevati di quelli riportati in letteratura; non mancano, infatti, esempi di popolazioni

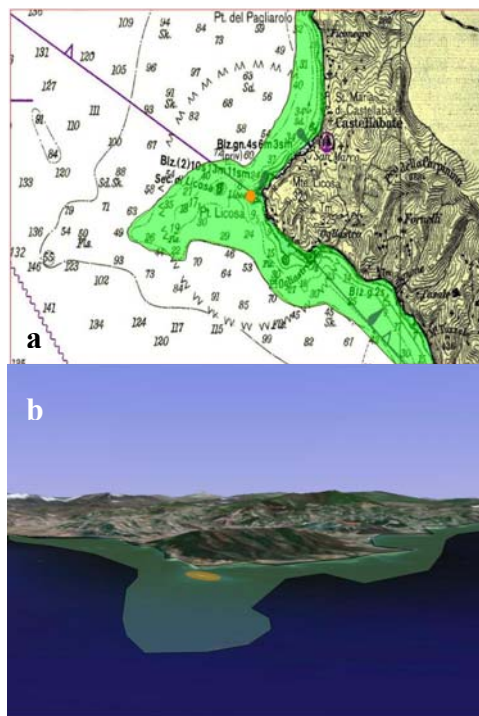


Figura 65 - ricostruzioni del paesaggio all'epoca della divergenza tra la popolazione di P. Licosia e quella dell'isola di Licosia secondo una delle ipotesi (cfr. testo); l'area semitrasparente rappresenta la terraferma dell'epoca, in arancione è indicata l'attuale isola; in a, ricostruzione su carta batimetrica dall'alto; in b, simulazione su una vista da mare

melanica

dell'isola di Licosia cominciava a divergere dalla popolazione ancestrale, secondo tale ipotesi, non abitava ancora un'isola, ma una piccola collina in una estesa pianura, come rappresentato nelle simulazioni di figura 65 a e b.

L'influenza della frammentazione del paesaggio sull'evoluzione di popolazioni naturali verso condizioni simili a quelle di reale insularità è un fenomeno che si riscontra ancora oggi in popolazioni continentali, che evidenziano divergenze morfologiche e genetiche significative. La seconda parte della ricerca, quindi, ha approfondito gli aspetti paesaggistici e microevolutivi dell'isolamento di una popolazione continentale rinvenuta nel 1999 a Roscigno (Fulgione *et al.*,

2002) che manifesta chiare caratteristiche di ipercromatismo, similmente alla popolazione di Licosia. Questa seconda fase è stata finalizzata ad individuare il contributo dell'effetto isolamento nell'indurre le caratteristiche rinvenute a Roscigno. Si è proceduto, quindi, attraverso tre grandi passi: innanzitutto il riscontro oggettivo della discriminazione cromatica degli individui della popolazione, poi quello della caratterizzazione genetica che fortemente ricorda quanto rintracciato in Licosia ed in ultimo la duplice individuazione dell'isola paesaggistica su ampia scala, attraverso tecniche di *Landscape Genetics* e su scala più fine, attraverso tecniche di analisi spaziale basate sulla nicchia ipervolumetrica di Hutchinson (1957).

La popolazione di Roscigno, anch'essa con elementi ben discriminati sul

piano della iper-pigmentazione degli individui, ha mostrato, similmente a Licosa:

- una netta predominanza dell'aplotipo condiviso con le popolazioni cilentane, seppure un alto numero di aplotipi,;
- un netto scostamento dall'equilibrio neutrale con valori di $D = -2,09$ e del differenziale tra le stime di S e di π alto in valore assoluto, nell'ambito di una diffusa violazione della condizione di equilibrio nel Cilento;
- un comportamento di derivazione e dunque di isolamento dei suoi aplotipi nell'analisi filogenetica di parsimonia.

Ma la constatazione di maggior impatto dell'isolamento della popolazione melanica è stata fornita dalla caratterizzazione della struttura genetica spaziale delle popolazioni e dall'individuazione diretta delle barriere al flusso genico nel Cilento, che di nuovo accomunano la condizione continentale di Roscigno a quella insulare di Licosa: entrambe le popolazioni rivelano distanze genetiche particolarmente alte rispetto alle popolazioni confinanti, anche a dispetto di distanze geografiche ridotte e sembrano letteralmente circonscritte da barriere che inficiano gli scambi con le altre popolazioni cilentane. Tutte le similitudini hanno dunque portato a risolvere più dettagliatamente l'isola continentale di Roscigno: il modello d'idoneità, basato sulla nicchia multidimensionale di Hutchinson e fondato sui soli dati di presenza delle lucertole, ha circoscritto l'area isolata, amplificando il carattere di isolamento della popolazione.

Le modalità con cui il paesaggio possa interferire nell'evoluzione di una popolazione sono ancora da chiarire nello specifico, ma certamente sembra evidente una forma di convergenza tra le due situazioni analizzate nella ricerca.

CONCLUSIONI

Come ogni ricerca del settore, anche questa è nata con l'aspirazione di contribuire alla conoscenza dei meccanismi evolutivi, sul piano generale e su quello più specifico.

A livello più globale la ricerca assume un ruolo quale modello d'indagine che può trovare applicazioni incentrate su altre specie animali o in altri casi di gestione e conservazione della natura: introduzioni di specie alloctone, reintroduzioni e frammentazione di popolazioni naturali. Certamente le tecniche di analisi vanno adattate e affinate nelle singole situazioni, per uniformare il dettaglio dell'analisi alle specifiche esigenze. Per quanto riguarda l'analisi paesaggistica, soprattutto, la flessibilità della metodologia consente un continuo miglioramento per superare le fonti di errore implicite, quali possono essere quelle insite nell'insieme iniziale di dati, siano essi, per esempio, gli strati informativi di base del modello d'idoneità o le osservazioni di presenza.

L'indagine svolta porta ad alcune considerazioni sul fenomeno dell'isolamento: esso rappresenta una condizione biologica graduale, la cui severità dipende dal livello di permessività della matrice del paesaggio; è emerso, inoltre, che isolamenti continentali dipendenti dalla frammentazione degli habitat possono sortire effetti paragonabili a quelli dell'isolamento marino.

Al livello locale dell'area di studio analizzata, si riscontra che:

- la popolazione ipercromatica della piccola isola di Licosia mostra peculiarità nella struttura genetica che potrebbero essere collegate a pressioni selettive locali. Il fenomeno dell'ipercromatismo potrebbe essere direttamente collegato a tali processi vista anche l'analogia con la popolazione di Roscigno.

- Se l'insorgenza della differenziazione dalla popolazione ancestrale è direttamente collegata all'isolamento marino, la velocità evolutiva di queste popolazioni sottoposte a condizioni particolari è nettamente più elevata per cause probabilmente legate all'effetto fondatore.
- Seppure per Licosa si accetta tale ipotesi di differenziazione, nel caso di Roscigno non si può escludere l'intervento dell'azione della frammentazione del paesaggio nel differenziamento, diretto verso una condizione apparentemente analoga a quella di Licosa.
- La popolazione di lucertole dell'isola di Licosa attualmente considerata una sottospecie, si rivela meritevole di particolare attenzione: alla luce di due considerazioni fondamentali che riguardano il destino evolutivo indipendente e l'isolamento riproduttivo fisico, una ridefinizione sistematica potrebbe condurre ad una nuova specie.
- Parimenti, nella popolazione di lucertole di Roscigno sembra essere in atto un differenziamento spinto che andrebbe valutato ai fini di un riconoscimento sistematico.

In ogni caso, queste entità faunistiche risultano ben caratterizzate sul piano evolutivo, esprimendo a gran voce la loro unicità; tale aspetto va riconosciuto sul piano conservazionistico e va valutato certamente l'eventuale *status* di ESU (*Evolutionary Significant Unit*; Moritz, 1994) per le popolazioni di Licosa e di Roscigno; queste, infatti, indipendentemente dalla loro condizione sistematica, necessitano azioni di tutela e di gestione progettate *ad hoc*. La loro collocazione geografica nell'ambito di un'area protetta, inoltre, contribuisce alla biodiversità del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, con il ruolo evolutivo intrinseco che va riconosciuto.

La ricerca comunque si conclude aprendo molti spunti di indagine consequenziali, quali il rapporto specifico tra il percorso evolutivo e la differenziazione cromatica delle due popolazioni o le relazioni interindividuali esistenti nella popolazione di Roscigno tra individui normotipo e individui melanici; anche il ritrovamento di individui parzialmente melanici, nelle isole paesaggistiche identificate dal modello durante la sua validazione appare di grande interesse.

BIBLIOGRAFIA

- Aa. Vv., 2003 – Pianificazione e reti ecologiche. PLANECO – Planning in ecological network. Cangemi Editore, pp. 272.
- Alexander N.J. & Fahrenbach W.H., 1969 – The dermal chromatophores of *Anolis carolinensis* (Reptilia, Iguanidae). Am. J. Anat., 126(1): 41-55.
- Amori G., Angelici F.M., Fruis S., Gandolfi G., Groppali R., Lanza B., Relini G. & Vicini G., 1993 – Vertebrata. In: Minelli A., Ruffo S. & La Posta S. (Eds). *Check-list delle specie della fauna italiana*, 110. Calderini. pp.84.
- Antonioli F., Borsato A., Frisia S. & Silenzi S., 1998 - L'uso degli speleotemi per ricostruzioni paleoclimatiche e variazioni del livello del mare. Il Quaternario – It. J. Quat. Sc., 11 (1): 67-78.
- Arnold E.N., 1989 – Towards a phylogeny and biogeography of the Lacertidae: relationships within an Old-World family of lizards derived from morphology. Bull. Brit. Nat. His. Zool., 55: 209-257.
- Arnold E.N., 1993 – Phylogeny and the Lacertidae. In: Valaskos E.D., Böhme W., Perez-Mellado V., Maragou P. (Eds). *Lacertids of the Mediterranean Region*, p 1-16. Athens, Hellenic Zoological Society.
- Arnold E.N., 2000 – The gender of *Podarcis* and the virtues of stability, a reply to W. Böhme. Bonn. Zool. Beitr., 49 (1-4): 71-74.
- Avice J.C., 2000 – *Phylogeography: the History and Formation of Species*, 1stedn. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avice J.C., 2004 – *Molecular markers, natural history and evolution*. Second edition. Sinauer Press, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Avice J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A. & Saunders N.C., 1987 – Intraspecific phylogeography: the Mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 489-522.
- Avice J.C. & Lansman R.A., 1983 – Polymorphism of animal mitochondrial DNA in populations of higher animals. In: Nei M. & Koehn R.K. (Eds). *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Baccetti B., Baldaccini N.E., Bedini C., Brandmayr P., Capanna E., Chieffi G., Cobolli M., Ferraguti M., Diretti F., Ghirardelli E., Giusti F., Grigolo A., Mainardi D., Minelli A., Papi F., Parrinello N., Ricci N., Ruffo S., Sarà M., Scali V. & Zullini A., 1991 – *Zoologia vol. II*. Zanichelli (Ed), Bologna. pp. 1098.
- Bagnara J.T. & Hadley M.E., 1973 – Chromatophores and color change: the comparative

- physiology of animal pigmentation. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ.
- Barbieri F., Doria G. & Sindaco R. (Eds), 1996 – Atlante provvisorio degli Anfibi e dei Rettili italiani. Ann. Mus. Civ. St. Nat. Genova, 91: 95-178.
- Battisti C., 2004 – Frammentazione ambientale, connettività e reti ecologiche. Un contributo teorico e metodologico con particolare riferimento alla fauna selvatica. provincia di Roma, Assessorato alle Politiche agricole, ambientali e Protezione civile. Stilgrafica, Roma. pp.248.
- Bauwens D., Diaz-Uriarte R., 1997 – Covariation of life-history traits in Lacertid lizards: a comparative study. Am. Nat., 149 (1): 91-111.
- Bauwens D., Nuijten K., Van Wezel H. & Verheyen R.F., 1987 – Sex recognition by males of the lizard *Lacerta vivipara*: an introductory study. Amphib. Rept., 8: 49—57.
- Bedriaga J., 1874 – Ueber die entstehung der Farben bei den Eidechsen. Jena (Herman Dabis) 40S.
- Begon M., Harper L. & Townsend C.R., 1996 – Ecologia. Individui popolazioni comunità. Zanichelli. Bologna, Italia.
- Bermingham E. & Moritz C., 1988 – Comparative phylogeography: concepts and applications. Mol. Ecol., 7: 367-369.
- Birky C.W. Jr, Maruyama T. & Fuerst P., 1983 – An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. Genetics, 103: 513–527.
- Bittner T.D., King R.B. & Kerfin J.M., 2002 – Effects of body size and melanism on the thermal biology of garter snakes (*Thamnophis sirtalis*). Copeia, 2002: 477–482.
- Blaustein A.R., Wake D.B. & Sousa W.P., 1994 – Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of population to local and global extinctions. Cons. Biol., 8: 60-71.
- Blondel J. & Aronson J., 2005 – Biology and Wildlife of the Mediterranean Region. Oxford University Press, Oxford, USA. pp.350.
- Bogaert J., 2000 - Quantifying habitat fragmentation as a spatial process in a patch-corridor-matrix landscape model. PhD Dissertation. Faculteit Wetenschappen. Departement Biologie. University of Antwerpen. Belgia.
- Böhme, W., 1997 – A note on the gender of the genus *Podarcis* (Sauria: Lacertidae). Bonn. Zool. Beitr., 47 (1-2): 187-188.
- Böhme, W., 1998 – *Podarcis siculus*, -a, -um? -Entgegnung auf eine Entgegnung. Die Eidechse, Rheinbach, 8 (3): 101-102.
- Boisieu B. & Marion L., 2005 – Définition des habitats potentiels du héron cendré *Ardea cinerea* par l'analyse du paysage et de sa niche écologique. Alauda, 73 (4): 431-440.
- Bologna M.A., 2002 – Rarefaction and extinction of species. In: Minelli A., Chemini C., Argano R., Ruffo S. (Eds). La fauna in Italia. p. 390-419. Touring Club Editore, Milano e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Roma.

- Boone R.B. & Hunter, M.L., 1996 – Using diffusion models to simulate the effects of land use on grizzly bear dispersal in the Rocky Mountains. *Land. Ecol.*, **11**: 51–64.
- Brotons L., Thuiller W., Araújo M.B. & Hirzel A.H., 2004 – Presence-absence versus presence-only modelling methods for predicting bird habitat suitability. *Ecography*, **27**: 437-448.
- Brouns G., De Wulf A. & Constales D., 2003 – Delaunay triangulation algorithms useful for multibeam echosounding. *J. Surv. Eng.*, **129**: 79-84.
- Bruschi S., Cipolla R.M., Corti C. & Nappi A., 2006 – Notes on the morphology of *Podarcis sicula coerulea*, the blue lizard of the Faraglioni di Capri. In: Bologna M.A., Capula M., Carpaneto G.M., Luiselli L., Marangoni C., Venchi A. (Eds): *Riassunti del 6° Congresso nazionale della Societas Herpetologica Italica*. p. 21. Stilgrafica, Roma.
- Bullini L., 1996 – Diversità genetica e specie minacciate di estinzione. *Atti S.It.E.*, **17**: 555-559.
- Burkey T.V., 1995 – Extinction rates in archipelagoes: implications for populations in fragmented habitats. *Cons. Biol.*, **9**: 527-541.
- Busack S.D., Lawson R. & Arjo W.M., 2005 – Mitochondrial DNA, allozymes, morphology and historical biogeography in the *Podarcis vaucheri* (Lacertidae) species complex. *Amph. Rept.*, **26**: 239-256.
- Caccone A., Milinkovitch M.C., Sbordoni V. & Powell J.R., 1997 – Mitochondrial DNA rate and biogeography in European newts (genus *Euproctus*). *Syst. Biol.*, **46**: 126-144.
- Capula M., 1992 – Competitive exclusion between *Podarcis* lizards from Thyrrenian: Inference from comparative species distributions. In: Korsòs Z., Kiss I. (Eds) *ProSixth Ord. Gen. Meeting Societas Europea Herpetologica*, Budapest, Hung. *Nat. Hist. Mus.*: 83-93.
- Capula M., 1994 – Population genetics of a colonizing lizard: loss of genetic variability in introduced populations of *Podarcis sicula*. *Experientia*, **50**: 691-696.
- Capula M., 2003 – Book review: *The Lizards of Italy and adjacent areas*. *Amph. Rept.*, **24** (1): 123-124.
- Capula M. & Ceccarelli A., 2003 – Distribution of genetic variation and taxonomy of insular and mainland populations of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*. *Amph. Rept.*, **24**: 483-495.
- Capula M., Luiselli L., Bologna M.A. & Ceccarelli A., 2002 – The decline of the Aeolian wall lizard, *Podarcis raffonei*: causes and conservation proposals. *Oryx* **36**: 66-72.
- Capula M., Luiselli L. & Rugiero L., 1993 – Comparative ecology in sympatric *Podarcis muralis* and *P. sicula* (Reptilia: Lacertidae) from the historical centre of Rome: What about competition and niche segregation in an urban habitat? *Boll. Zool.*, **60**: 287-291.
- Cardone A., Capriglione T., Odierna G., Redi C.A. & Garagna S., 1990 – Genomic intraspecific variations in some populations of *Podarcis s. sicula* Raf. In: Olmo E. (Ed): *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. pp. 247-254. *Advance in Life Sciences*.

Birkhäuser Verlag Basel, Berlin.

- Carranza S., Arnold E.N., Mateo J.A. & López-Jurado L.F., 2001 – Parallel gigantism and complex colonization patterns in the Capo Verde Scincid lizards *Mabuya* and *Macroscincus* (Reptilia: Scincidae) revealed by mitochondrial DNA sequence. *Proc. Roy. Soc. Lon.*, 268: 1595-1603.
- Carson H.L. & Templeton A.R., 1984 – Genetic revolutions in relation to speciation phenomena: the founding of new populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 15: 97-131.
- Cassens I., Tiedemann R., Suchentrunk F. & Hartl G.B., 2000 – Mitochondrial DNA variation in European otter (*Lutra lutra*) and the use of autocorrelation analysis in conservation. *J. Hered.*, 91: 31-35.
- Castilla A.M., Fernández-Pedrosa V., Backeljau T., González A., Latorre A. & Moya A., 1998 – Conservation genetics of insular *Podarcis* lizards using partial cytochrome b sequences. *Mol. Ecol.*, 7 (10): 1407-1411.
- Cederna A. & Lovari S., 1985 – The impact of tourism on chamois feeding activities in an area of the Abruzzo National Park, Italy. In: Lovari S. *The Biology and Management of Mountain Ungulates*. Croom Helm, London.
- Celada C., 1995 – Frammentazione degli ambienti e conservazione: approcci empirici e moderni. *Suppl. Ric. Biol. Selvaggina*, 22: 293-297.
- Chefaoui R.M., Hortal J. & Lobo J.M., 2005 – Potential distribution modelling, niche characterization and conservation status assessment using GIS tools: a case study of Iberian *Copris* species. *Biol. Cons.*, 122: 327–338.
- Clement M., Posada D. & Crandall K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ec.*, 9 (10): 1657-1660.
- Clevenger A.P., Wierzchowski J., Chruszcz B. & Gunson K., 2002 – GIS-generated, expert-based models for identifying wildlife habitat linkages and planning mitigation passages. *Cons. Biol.*, 16: 503–514.
- Clobert J., Wolff J.O., Nichols J.D., Danchin E. & Dhondt A.A., 2001 – Introduction. In: Clobert J., Danchin E., Dhondt A.A., Nichols J.D. (Eds). *Dispersal*. pp. 17–21. Oxford University Press, NY.
- Conant R. & Collins J.T., 1991 – A field guide to reptiles and amphibians: eastern and central North america. 3rdedn, Houghton Mifflin Company, Boston.
- Cooley W.W. & Lohnes P.R., 1971 – Multivariate data analysis. John Wiley, NY.
- Cooper W.E. Jr & Burns N., 1987 – Social significance of ventrolateral coloration in the fence lizard (*Sceloporus undulatus*). *Anim. Behav.*, 35: 526— 532.
- Cooper W.E. Jr & Greenberg N., 1992 – Reptilian coloration and behavior. In: Gans C. & Crews D. (Eds). *Biology of the Reptilia*, Vol. 18, *Physiology & Behavior*. pp 298-422. Univ. Chicago Press, Chicago, IL.
- Corti C., 2006 – *Podarcis sicula* (Rafinesque, 1810). In: Sindaco R., Doria G., Razzetti E., Bernini F., (Eds) *Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia/Atlas of Italian Amphibians*

- and Reptiles. Societas Herpetologica Italica. Edizioni Polistampa, Firenze, pp 486-489.
- Corti C., Capula M. & Nascetti G., 1989 – Biochemical taxonomy of *Podarcis sicula* from the Tuscan Archipelago (Reptilia, Sauria, Lacertidae). Abstracts of First World Congress of Herpetology, Canterbury. Univ. of Kent, Canterbury, UK.
- Corti C. & Lo Cascio P., 1999 – I lacertidi italiani. L'Epos (Ed). Palermo. pp. 11-14 e 35-61.
- Corti C., Nistri A., Poggesi M. & Vanni S., 1991 – Biogeographical analysis of the Tuscan herpetofauna (Central Italy). Rev. Esp. Herpetol., 5:51-75.
- Cott H.B., 1940 – Adaptive coloration in animals. Methuen & Co., London.
- 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.
- Crochet P-A., Geniez P. & Ineich I., 2003 – A multivariate analysis of the fringe-toed lizards of *Acanthodactylus scutellatus* group (Squamata: Lacertidae): systematic and biogeographical implications. Zool. J. Linn. Soc., 137: 117-155.
- Cuadrado M., 2000 – Body colours indicate the reproductive status of female common chameleons: experimental evidence for the inter-sex communication function. Ethology, 106: 79—91.
- Dallas J.F., Dob B., Boursot P., Prager E.M. & Bonhomme F., 1995 – Population subdivision and gene flow in Danish house mice. Mol. Ecol., 4: 311-320.
- Darwin C. 1859 – On the Origin of the Species by Means of Natural Selection John Murray. London.
- Davies K.F., Gascon C. & Margules C.R., 2001 – Habitat fragmentation: consequences, management, and future research priorities. In: Soulé M.E., Orians G.H. (Eds). Conservazione Biology. Research priorities for the next decade. pp. 81-97. Societas for Conservation Biology. Island Press, Washington.
- Dawson K.J., & Belkhir K., 2001 – A bayesian approach to identification of panmictic populations and the assignment of individuals. Genet.Res., 78: 59-77.
- de Filippo G., 1985 – L'indice centesimale di diversità strutturale: una misura standard per l'eterogeneità della vegetazione in studi di ecologia degli uccelli. Boll. Soc. Nat. Napoli, 94: 215-219
- De Woody J.A., 2005 – Molecular approaches to the study of parentage, relatedness and fitness: practical applications for wild animals. J. Wild. Manag., 69 (4): 1400-1418.
- Debinski D.M. & Holt R.D., 2000 – A survey and overview of habitat fragmentation experiments. Cons. Biol., 14: 342-355.
- Delaugerre M. & Cheylan M., 1992 – Atlas de répartition de batraciens et reptiles de Corse. Parc Naturel Regional de Corse – École Pratique des hautes Études, Pampelune. pp. 128.
- den Boer P.J., 1970 – On the significance of dispersal power for populatio of carabid beetles (Coleoptera, Carabidae). Oecologia, 4: 1-28.

- Diamond J.M. & Mayr E., 1976 – Species-distance relation for birds of the Solomon Archipelago and the paradox of the great speciators. PNAS, 73 (6): 2160-2164.
- Diamond M., 1975 – The island dilemma: lessons of modern biogeographic studies for the design of natural reserves. Biol. Cons., 7: 129-145.
- Dingle H., 1996 – Migration: the biology of live on the move. Oxford University Press, Oxford. UK.
- Dounpanloup I., Schneider S. & Excoffier L., 2002 – A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. Mol. Ecol., 11: 2571-2581.
- Dushane G.P., 1935 – An experimental study of the origin of pigment cells in Amphibia. J. Exp. Zool., 72 (1): 1-31.
- Ehrlich P.R. 1986 – Which animal will invade? In Mooney H.A. & Drake J.A. (Eds) Ecology of Biological Invasions of North America and Hawaii. Springer-Verlag. NY.
- Eimer G.H.T., 1974 – Zoologische Studien auf Capri. II. *Lacerta muralis coeruleae*, ein Beitrag zur Dawinischen Lehre. Leipzig.
- Eisentraut M., 1950 – Die Eidechsen der spanischen Mittelmeerinseeln und ihre Rassenaufspaltung im Lichte der Evolution. Mitt. Zool. Mus. Berlin, 26: 1-255.
- Elton C.S., 1927 – Animal ecology. Sidgwick and Jackson, London
- Emerson B.C., 2002 – Evolution on oceanic island: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. Mol. Ec., 11: 951-966.
- Enquist M. & Leimar O., 1983 – Evolution of fighting behaviour: decision rules and assessment of relative strength. J. Theor. Biol. 102, 387—410.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S., 2005 – Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinf. Online, 1:47-50.
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K., 2003 – Inference of population structure II. Linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, 164: 1567-1587.
- Faraone F.P., 2001 – Caratterizzazione biometrica e fenotipica delle quattro specie di lucertola appartenenti al genere *Podarcis* Wagler, 1830 (Reptilia, Lacertidae) presenti in Sicilia e nelle isole circumsiciliane. Tesi di Laurea. Università degli studi di Palermo. Italia.
- Farina A., 2001 – Ecologia del Paesaggio. Principi metodi e applicazioni. UTET. Torino. Italia, pp 673.
- Fields R.L. & Scribner K.T., 1997 – Isolation and characterization of novel waterfowl microsatellite loci: cross-species comparisons and research application. Mol. Ec., 6: 199-202.
- Forman R.T.T. & Godron M., 1986 – Landscape ecology. John Wiley, NY.
- Forman R.T.T., 1995 – Land mosaics. The ecology of landscapes and regions. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fox D.L., 1976 – Animal Biochromes and Structural Colors. University of California Press, Berkley.
- Frankham R., 1995 – Conservation Genetics. Ann. Rev. Genet., 29: 305-327.

- Frankham R., 1997 – Do island population have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, 78: 311-327.
- Fu J., 1998 – Toward the Phylogeny of the Family Lacertidae: Implications from Mitochondrial DNA 12S and 16S Gene Sequences (Reptilia: Squamata). *Mol. Phyl. Evol.*, 9 (1): 118–130.
- Fu, J. 2000 – Toward the phylogeny of the family Lacertidae - Why 4708 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture. *Biol. J. Linn. Soc.* 71: 203-217
- Fu J., Murphy R.W. & Darevsky I.S., 1997 – Towards the phylogeny of caucasian rock lizards: implications from mitochondrial DNA gene sequences (Reptilia: Lacertidae). *Zool. J. Linn. Soc.*, 121: 463-477.
- Fulgione D., Milone M., Aprea G., Capriglione T., Guarino F.M., Rega M. & Odierna G., 2002 – Analisi genetica in popolazioni melaniche nell'entroterra del Cilento di *Podarcis sicula*. Atti IV Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica, Ercolano, Napoli.
- Fulgione D., Milone M., Rippa D., Capriglione T., Guarino F.M. & Odierna G., 2004 – Genetic analysis in a mainland melanic lizard (*Podarcis sicula*) population from Cilento and Vallo di Diano National Park (Campania, Italy). *Ital. J. Zool., Suppl.*, 2: 25-28.
- Gaggiotti O. & Excoffier L., 2000 – A simple method of removing the effect of a bottleneck and unequal population sizes on pairwise genetic distances. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267: 81-87.
- Galan P., 2000 – Females that imitate males. Dorsal coloration varies with reproductive stage in female *Podarcis bocagei* (Lacertidae). *Copeia*, 2000: 819-825.
- Galbusera P., Van Dongen S., Matthysen E., 2000 – Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Cons. Gen.*, 1: 163-168.
- Gardner M.G., Cooper S.J.B., Bull C.M. & Grant W.N., 1999 – Isolation of microsatellite loci from a social lizard, *Egernia stokesii*, using a modified enrichment procedure. *J. Hered.*, 90: 301-304.
- Garza J.C., Slatkin M. & Freimer N.B., 1995 – Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 594-603
- Gibbs H.L., Brooke M.D. & Davies N.B., 1996 – Analysis of genetic differentiation of host races of the common cuckoo *Cuculus canorus* using mitochondrial and microsatellite DNA variation. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 263: 89-96.
- Gillman M. & Hails R., 1997 – An introduction to ecological modelling. Putting practice into theory. Blackwell Science. Oxford. UK.
- Gingerich P.D., 2001 – Rates of evolution on the time scale of the evolutionary process. *Genetica*, 112-113: 127-144.
- Glor R.E., Kolbe J.J., Powell R., Larson A. & Losos J.B., 2003 – Phylogenetic analysis of ecological and morphological diversification in Hispaniolan trunk-ground anoles (*Anolis cybotes* group). *Evolution*, 57: 2383-2397.

- Glor R.E., Gifford M.E., Larson A., Losos J.B., Rodríguez-Schettino L., Lara A.C. & Jackman T.R., 2004 – Partial island submergence and speciation in an adaptive radiation: A multilocus analysis of the Cuban green anoles. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 7;271(1554):2257-65.
- González de la Vega J.P., González-García J.P., García-Pulido T. & González-García G., 2001 – *Podarcis sicula* (lagartija italiana), primera cita para Portugal. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp.*, Barcelona, 12 (1): 9.
- Gonzalez P., Pinto F., Nogales M., Jimenez Asensio J., Hernandez M. & Cabrera V.M. 1996 – Phylogenetic relationships of the Canary Islands endemic lizard genus *Gallotia* (Sauria: Lacertidae), inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, 6: 63-71.
- Gorman G.C., Soulé M., Yang S.Y. & Nevo E., 1975 – Evolutionary genetics of insular Adriatic lizards. *Evolution*, 29: 52-71.
- Gosner K.L., 1989 – Histological notes on the green coloration of arboreal pit vipers: genus *Bothrops*. *J. Herpet.*, 23 (3):318-320.
- Grinnel J., 1917 – The niche relationships of the Californian thrasher. *Auk*, 21: 364-382.
- Grinnel J., 1924 – Geography and evolution. *Ecology*, 5: 225-229.
- Grinnel J. 1928. A distributional Summation of the Ornithology of Lower California. University of California Press. Berkeley, California
- Gubitz T., Thorpe R.S. & Malhotra A., 2000 – Phylogeography and natural selection in the Tenerife gecko *Tarentola delalandii*: testing historical and adaptive hypotheses. *Mol. Ec.*, 9: 1213-1221.
- Guillaume C.P. & Lanza B., 1982 – Comparaison électrophorétique de quelques espèces de Lacertidés Méditerranéens, Genera *Podarcis* et «*Archeolacerta*». *Amph. Rept.*, 4: 361-375.
- Guisan A. & Zimmermann N.E., 2000 – Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecol. Mod.*, 135, 147–186.
- Gullberg A., Tegelström H., Olsson M., 1997 – Microsatellites in the sand lizard (*Lacerta agilis*): description, variation, inheritance and applicability. *Bioch. Gen.*, Vol. 35 (7/8): 281-295.
- Hadley M.E., 1997 – Comparative aspects of non-mammalian pigmentation: regulation of pigment cells. *Pigm. Cell. Res.* 10: 114.
- Haeckel E., 1866 – Generelle morphologie der organismen. G. Reimer.
- Hall T.A., 1999 – BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hancock J.M., 1999 – Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanism. In: Goldstein D.B. & Schötter C. (Eds) *Microsatellites, evolution and applications* pp 1-9. Oxford University Press, Oxford. UK.
- Hanski I. & O. Ovaskainen, 2000 – The metapopulation capacity of a fragmented landscape.

- Nature, 404: 755-758.
- Hansky I., 1998 – Metapopulation dynamics. *Nature*, 396: 41-49.
- Hansson L., 1991 – Dispersal and connectivity in metapopulation. In: Gilpin M.E. & Hanski J. (Eds). *Metapopulation dynamics: empirical and theoretical investigations*. pp. 89-103. Linnean Society of London and Academic Press, London.
- Harris D.J., Arnold E.N. & Thomas R.H., 1998a – Relationships of lacertid lizards estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 1939–1948.
- Harris D.J., Arnold E.N. & Thomas R.H., 1998b – Rapid speciation, morphological evolution and adaptation to extreme environments in South African Sand Lizards (*Meroles*) as revealed by mitochondrial gene sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, 10 (1): 37–48.
- Harris D.J., Carranza S., Arnold E.N., Pinho C. & N. Ferrand, 2002 –Complex biogeographical distribution of genetic variation within *Podarcis* wall lizards across the Strait of Gibraltar. *J. Biog.*, 29: 1257–1262.
- Harris D.J., Thomas R.H. & Arnold E.N., 1998a – Rapid speciation, morphological evolution and adaptation to extreme environments in sand lizards (*Meroles*) as revealed by mitochondrial gene sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, 10(1): 37-48.
- Harris L.D. & Silva-Lopez G., 1992 – Forest fragmentation and the conservation of biological diversity. In: Fiedler P.L. & Jain S.K. (Eds). *Conservation Biology*. Chapman and Hall, NY and London.
- Harrison S., 1991 – Local extinction in a metapopulation context: An empirical evaluation. *Biol. J. Linn. Soc.*, 42: 73-88.
- Harrison S., 1994 – Metapopulation and conservation. In: Edwards P.J., May R.M. & Webb R.N. (Eds). *Large-scale ecology and conservation biology*, pp. 111-128. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Hausser J., 1995 – Mammifère de Suisse. Birkhäuser Verlag, Switzerland.
- Hendry A.P. & Kinnison M.T., 2001 – An introduction to microevolution; rate, pattern process. *Genetica*, 112-113: 18.
- Henle K., 1988 – Dynamics and ecology of three Yugoslavian populations of the Italian Wall lizard (*Podarcis sicula campestris* De Betta) (Reptilia: Lacertidae). *Zool. Anz., Jena*, 220 (1/2): 33-48.
- Henle K. & Klaver C.J.J., 1986 – *Podarcis sicula* (Rafinesque-Schmaltz, 1810) - Ruineneidechse. In: *Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas, Echsen III (Podarcis)* (ed. Böhme W), pp. 254–342. Aula- Verlag, Wiesbaden.
- Higgins D.G., Thompson J.D. & Gibson T.J., 1996 – Using CLUSTAL for multiple sequence alignment. *Meth. Enzym.*, 266: 383-402.
- Hillis D.M., Mable B.K., Moritz C., 1996 – Application of molecular Systematics. In Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (Eds) *Molecular Systematics*. pp. 515-543. Sinauer, Sunderland MA.

- Hirzel A.H., 2001 – When GIS come to life. Linking landscape and population ecology for large population management modelling: the case of Ibex (*Capra ibex*) in Switzerland. Doctoral thesis. Institute of Ecology, Laboratory for Conservation Biology University of Lausanne, Switzerland.
- Hirzel A.H. & Arlettaz R., 2003 – Modelling habitat suitability for complex species distributions by environmental-distance geometric mean. *Envir. Man.*, 32:614-623.
- Hirzel A.H., Hausser J., Chessel D. & Perrin N., 2002 – Ecological-Niche Factor Analysis: how to compute Habitat-Suitability maps without absence data? *Ecology*, 83(7): 2027-2036.
- Hirzel A.H., Posse B., Oggier P.A., Crettenand Y., Glenz C. & Arlettaz R., 2004 – Ecological requirements of reintroduced species and the implications for release policy: the case of the bearded vulture *J. App. Ecol.*, 41: 1103–1116.
- Hutchinson G.E., 1957 – Concluding remarks- Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 22:415-427. Reprinted in 1991: Classics in Theoretical Biology. *Bull. Math. Biol.* 53:193-213.
- Ingegnoli V., 1999 – Ecologia del Paesaggio. In Massa R. & Ingegnoli V. (Eds): *Biodiversità Estinzione e Conservazione*, pp. 189-210. UTET, Torino.
- Ingegnoli V. & Massa R., (a cura di) 1999 – *Biodiversità Estinzione e Conservazione*. UTET, Torino. pp. 518.
- Innis M.A. & Gelfand D.H., 1990 – Optimization of PCRs. In Innis M.A., Gelfand D. H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds) *PCR protocols – A guide to methods and applications*. Academic Press San Diego California
- Jaenike J.R., 1973 – A steady state model of genetic polymorphism on island. *Am. Nat.*, 107: 793-795.
- Janzen D.H., 1986 – The eternal external threat. In: Soulé M.E. (Ed). *Conservation Biology*. pp. 286-303. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Jin L., Macaubas C., Hallmeyer J., Kimura A., Mignot E., 1996 – Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: Phylogenetic evidence. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 93: 15285-15288.
- Kellogg K.A., Markert J.A., Stauffer J.R., Kocher T.D., 1995 – Microsatellite variation demonstrated multiple paternity in lekking cichlid fishes from Lake Malawi, Africa. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 260: 79-84.
- Kettlewell B., 1973 – The evolution of melanism: the study of a recurring necessity. Clarendon Press, Oxford, U.K.
- Keyghobady N., Roland J. & Strobeck C., 1999 – Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Mol. Ecol.*, 8: 1481-1495.
- Kingman J.F.C., 1982a – On the genealogy of large populations. In Gani, J. & Hannan, E. (Eds) *Essays in Statistical Science*. pp. 27-43. Applied Probability Trust, London. J.

Appl. Prob. 19A.

- Kingman J.F.C., 1982b – The coalescent. *Stochast. Proc. Appl.*, 12: 235-248.
- Klemmer K., 1957 – Untersuchungen zur Osteologie und Taxonomie der Europäischen Mauereidechsen. *Abh. Senck. Naturf. Ges.*, 496: 1-56.
- Knight R.A. & Mindell D.P., 1993 – Substitution bias, a priori weighting of DNA sequence change, and the phylogenetic position of *Azemiops feae*. *Sys. Biol.*, 42:18-31.
- Kodrick-Brown A., 1998 – Sexual dichromatism and temporary color changes in the reproduction of fishes. *Am. Zool.*, 38: 70-81.
- Kramer G., 1949 – Über Inselmellarismus bei Eidechsen. *Z. induct. Abstamm. Vererbungs*, 83: 157-164.
- Kammerer P., 1926 – Der Artenwandel auf Inseln und seine Ursachen, ermittelt durch Vergleich und Versuch an den Eidechsen der dalmatinischen Eilande. Wien, Leipzig (Deuticke).
- Krebs J.R. & Dawkins R., 1983 – Animal signals: mind reading and manipulation. In Krebs J.R. & Davies N.B. (Eds): *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*, 2ndedn. pp. 380-402. Blackwell Sci. Publ., Oxford. UK.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M., 2004 – MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.*, 5:150-163.
- Lamerenx F., Chadelaud H., Bard B. & Pépin D., 1992 – Influence of the proximity of a hiking trail on the behaviour of Isard (*Rupicapra pyrenaica*) in a Pyrenean reserve. In Spitz F., Janeau G., Gonzalez G. & Aulagnier S. (Eds) *Ongulés/Ungulates*. Proceedings of the International Symposium Toulouse, Paris.
- Lanza B., 1982 – Ipotesi sulle origine del popolamento erpetologico della Sardegna. *Lavori della Società Italiana di Biogeografia*, 8: 723–744.
- Lanza B. & Boscherini S., 2000 – The gender of the genera *Podarcis* Wagler 1830 (Lacertidae), *Pelamis* Daudin 1803 (Hydrophiidae) and *Uropeltis* Cuvier 1829 (Uropeltidae). *Trop. Zool.*, Firenze, 13 (2): 327-329.
- Lanza B & Cei J.M., 1977 – Immunological data on the taxonomy of some Italian lizards (Reptilia Lacertidae). *Monit. Zool. Ital. (N.S.)*, 11: 231-236.
- Laurance W.F. & Yensen E., 1991 – Predicting the impacts of edge effects in fragmented habitats. *Biol. Conserv.*, 55: 77-92.
- Legendre L. & Legendre P. 1998 – Numerical ecology. 2ndEnglish edn. Elsevier Science BV, Amsterdam, Netherlands.
- Leverette T.L., 2004 – Predicting suitable habitat for deep water corals in the Pacific and Atlantic continental margins of North America. Graduate Thesis. Department of Oceanography. Dalhousie University Halifax, Nova Scotia.
- Linnell J.D.C.; Swenson J.E.; Andersen R. & Barnes B. 2000 – How vulnerable are denning bears to disturbance? *Wildl. Soc. Bull.*, 28(2): 400–413.
- Lo Cascio P. & Corti C., 2004 – The micro-insular distribution of the Genus *Podarcis* within

- the Aeolian Archipelago: a possible historical interpretation. Abstracts of Fifth International Symposium on the Lacertids of the Mediterranean Basin. Lipari, Italia. p. 23.
- Lo Valvo F., 1998 – Status e conservazione dell’Erpetofauna siciliana. *Natural. Sicil.*, 22:53-71.
- Lo Valvo M., Faraone F.P., Scifo A., 2004 – Caratterizzazione fenotipica, analisi biometrica e stima della popolazione di lucertola campestre di Isola Bella (*Podarcis sicula medemi* Mertens, 1942). Riassunti dei contributi scientifici del 65° Congresso Nazionale UZI. Taormina, Italia. p. 93.
- Lomolino M.V., Riddle B.R. & Brown J.H, 2005 – Biogeography. Sinauer, Sunderland, MA, USA. pp.845.
- Longmire J.L., Maltbie M., Pavelka R.W., Smith L.M., White S.M., Ryder O.A., Ellsworth D.E., Baker R.J., 1993 – Gender identification in bird using microsatellite DNA fingerprinting analysis. *Auk* 110: 378-381.
- López P. & Martín J., 2001 – Pheromonal recognition of females takes precedence over the chromatic cue in male Iberian wall lizards, *Podarcis hispanica*. *Ethology*, 107 (10): 901-912.
- López P., Cuadrado M. & Martín J., 2003 – Chemosensory cues allow male lizards *Psammmodromus algirus* to override visual concealment of sexual identity by satellite males. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 54: 218-224.
- López P., Martín J. & Cuadrado M., 2004 – The role of lateral blue spots in intrasexual relationships between male iberian rock-lizard, *Lacerta monticola*. *Ethology*, 110 (7): 543-561.
- Losos J.B., 1990 – A phylogenetic analysis of character displacement in Caribbean *Anolis* lizards. *Evolution* 44: 558-569
- Losos J.B., Jackman T.R., Larson A., de Queiroz K. & Rodríguez-Schettino L., 1998 – Contingency and determinism in replicated adaptative radiations of island lizards. *Science*, 279: 2115-2118.
- Losos J.B. & Shluter D, 2000 – Analysis of an evolutionary species-area relationship. *Nature*, 408: 847-850.
- Lowe C.H. & Norris K.S., 1956 – A subspecies of the lizard *Sceloporus undulatus* from the White Sands of New Mexico. *Herpetologica*, 12:125-127.
- Lutz D., Bischoff W. & Mayer W., 1986 – Chemosystematische Untersuchungen zur Stellung von *Lacerta jayakari* Boulenger 1887 sowie der Gattungen *Gallotia* Boulenger und *Psammmodromus* Fitzinger (Sauria; Lacertidae). *Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.*, 24: 144-156.
- Lutz D. & Mayer W., 1984 – Albumin-immunologische und proteinelektrophoretische Untersuchungen zur systematischen Stellung von *Lacerta lepida* Daudin und *Lacerta princeps* Blanford (Sauria, Lacertidae). *Zool. Anz.*, 212: 95-104.

- Lutz D. & Mayer W., 1985 – Albumin evolution and its phylogenetic and taxonomic implications in several lacertid lizards. *Amph. Rept.*, 6: 53-61.
- Mac Arthur R.H. & Wilson E.O., 1967 – The theory of island biogeography. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.
- Mace R.D., Waller J.S., Manley T.L., Lyon L.J. & Zuuring H., 1996 – Relationships among grizzly bears, roads and habitat in the swan mountains Montana. *J. App. Ecol.* 33, (6): 1395-1404.
- Macedonia J.M., Brandt Y. & Clark D.L., 2002 – Sexual dichromatism and differential conspicuousness in two populations of the common collared lizard (*Crotaphytus collaris*) from Utah and New Mexico, USA. *Biol. J. Linn. Soc.*, 77: 67-85.
- Maddison W.P. & Maddison D.R., 2006 – Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 1.12; <http://mesquiteproject.org>.
- Maggio T., Faraone F.P., Arculeo M & Lo Valvo M., 2005 – Analisi dell'rDNA 12S nelle relazioni sistematiche della Lucertola campestre (*Podarcis sicula*) in Italia. Riassunti dei contributi scientifici del 66° Congresso Nazionale UZI. Roma, Italia. p. 37.
- Majerus M.E.N., 1998 – Melanism: evolution in action. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.
- Mandleberg L., 2004 – A comparison of the predictive abilities of four approaches for modelling the distribution of cetaceans. Graduate Thesis. University of Aberdeen, Aberdeen, U.K.
- Manel S., Schwartz M.K., Luikart G., Taberlet P., 2003 – Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TREE*, 18 (4): 189-197.
- Manly, B.F.J. 1986. Multivariate statistical methods: a primer. Chapman and Hall, NY, pp.59-71.
- Manni F., Guerard E., Heyer E., 2004 – Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum. Biol.*, 76: 173-190.
- Mantel N., 1967 – The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Canc. Res.* 27, 209-220.
- Marler C.A. & Moore M.C., 1988 – Evolutionary costs of aggression revealed by testosterone manipulations in free-living male lizards. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 23:21-26.
- Marler C.A. & Moore, M.C. 1989 – Time and energy cost of aggression in testosterone-implanted free-living male mountain spiny lizards (*Sceloporus jarrovi*). *Physiol. Zool.*, 62: 1334-1350.
- Martín J. & Forsman A., 1999 – Social costs and development of nuptial coloration in male *Psammmodromus algirus* lizards: an experiment. *Behav. Ecol.*, 10: 396—400.
- Massa R., 1999 – Origini della Conservazione. In: Ingegnoli V. e Massa R., (a cura di) – Biodiversità Estinzione e Conservazione. UTET, Torino: 7
- May R.M., 1973 – Stability and complexity in model ecosystems. Princeton, New Jersey, Princeton University Press.

- Mayer W. & Benyr G., 1994 – Albumin-evolution und phylogenese in der familie lacertidae. Ann. Nat. Mus. Wien, 96B:621-648.
- Mayer W. & Bischoff W., 1996 – Beiträfe zur taxonomischen Revision der Gattung *Lacerta* (Reptilia: Lacertidae). 1. *Zootoca*, *Omanasaura*, *Timon* und *Tiera* als eigenständige Gattungen. Salamandra, 32: 163-170.
- Mayer W. & Tiedemann F., 1982 – Chemotaxonomical investigations in the collective genus *Lacerta* (Lacertidae Sauria) by means of protein electrophoresis. Amph. Rept., 2: 349-355.
- Mayr E., 1942 – Systematics and the origin of species. Columbia University Press, NY pp. 334.
- Mayr E., 1963 – Animal species and evolution. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- McArdle B.H., 1990 – When are rare species not there? Oikos 57, 276-277.
- McDonald D.B. & Potts W.K., 1994- Cooperative display and relatedness among males in a lek-mating bird. Science, 266 (5187): 1030-1032.
- Meffe G.K., Carrol C.R. & Contributors, 1997 – Principles of Conservation Biology. 2ndedn. Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp. 729.
- Merilla J., Kruuk L.E.B. & Sheldon B.C. 2001 – Cryptic evolution in a wild bird population. Nature, 412: 76-79.
- Mertens R., 1963 – Wie entstand das dunkle Farbkleid der Inseleidechsen? Ums. In Wissensch. Tech., 6: 180-182, 192.
- Miller M.P., 2005 – Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. J. Hered., 96: 722-724.
- Miyamoto D.D. & Cracraft J., 1991 – Phylogenetic inference, DNA sequence analysis, and the future of molecular systematic. In: Miyamoto M.M. & Cracraft J. (Eds) Phylogenetic Analysis, DNA sequences, pp. 3-17. Oxford University Press, NY.
- Monmonier M., 1973 – Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. Geog. Anal. 3, 245–261.
- Moore S.S, Sargeant L.L., King T.J., Mattick J.S, Georges M. & Hetzel D.J.S., 1991- The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of eterologous PCR primer pairs in closely related species. Genomics, 10: 654-660.
- Moritz C.C., 1994 – Defining “Evolutionary Significant Unit” for conservation. TREE, 9: 373-375.
- Morrison R.L., Rand M.S. & Frost-Mason S.K., 1995 – Cellular basis of color differences in three morphs of the lizard *Sceloporus undulatus erythrocheilus*. Copeia 1995: 397–408.
- Nascetti G., Capula M., Capanna E. & Bullini L., 1982 – Differenziamento genetico nel genere *Podarcis* (Reptilia, Lacertidae). Boll. Zool., 48 (suppl.): 80.
- Nauta M. & Weissing F., 1996 – Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. Genetics 143: 1021- 1032.

- Nei M. & Li W.H., 1979 – Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76: 5269-5273.
- Nei M., Tajima F. & Tatenno Y., 1983 – Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.*, 19: 153-170.
- Nembrini M. & Opplinger A., 2003 – Characterization of microsatellite loci in the wall lizard *Podarcis muralis* (Sauria: Lacertidae). *Mol. Ecol. Notes*, 3: 123-124.
- Nordborg M., 2000 – Linkage disequilibrium, gene trees and selfing: ancestral recombination graph with partial self-fertilization. *Genetics*, 154: 923-929.
- Norris K.S., 1965 – Color adaptation in desert reptiles and its thermal relationships. In: Milstead W.W. (Ed) *Lizard ecology: a symposium*. Univ. of Missouri Press, MO.
- Norris K.S. & Lowe C.H., 1964 – An analysis of background color-matching in amphibians and reptiles. *Ecology*, 45: 565–580.
- Noss R.F. & Csuti B., 1997 – Habitat fragmentation. In Meffe G.K., Carrol C.R. & Contributors (Eds) *Principles of Conservation Biology*. 2ndedn. pp 269-304. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Oliverio M., Bologna M.A. & Mariottini P., 2000 – Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis* Wagler, 1830 and *Teira* Gray, 1838 (Reptilia, Lacertidae). *J. Biog.*, 27: 1403-1420.
- Oliverio M., Bologna M.A. & Mariottini P., 2001 – Molecular biogeography of the Mediterranean genera *Podarcis* and *Teira* (Reptilia, Lacertidae). *J. Biogeogr.*, 27: 1403-1420
- Oliverio M., Bologna M.A., Monciotti A., Annesi F., Mariottini P. 1998 – Molecular phylogenetics of the Italian *Podarcis* lizards (Reptilia, Lacertidae). *Ital. J. Zool.*, 65: 315-324.
- Oliveiro M., Burke R., Bologna M.A., Wirz A. & Mariottini P., 2001 – Molecular characterization of native (Italy) and introduced (USA) *Podarcis sicula* populations (Reptilia, Lacertidae). *Ital. J. Zool.*, 68: 121-124.
- Olsson M., 1994 – Nuptial coloration in the sand lizard, *Lacerta agilis*: an intra-sexually selected cue to fighting ability. *Anim. Behav.*, 48: 607—613.
- Orians G.H., 1997 – Global Biodiversity I: Patterns and Processes. In Meffe G.K., Carrol C.R. & contributors: *Principles of Conservation Biology*. 2ndedn. pp. 87-122. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Ouboter P.E., 1981 – The ecology of island-lizard *Podarcis sicula salfii*: correlation of microdistribution with vegetation coverage, thermal environment and food-size. *Amph. Rept.*, 2: 243-257.
- Pearse D.E & Pogson G.H., 2000 – Parallel evolution of the melanistic form of the California legless lizard, *Anniella pulchra*, inferred from mitochondrial DNA sequence variation. *Evolution*, 54: 1041-1046.
- Paetkau D., Clavert W. & Stirling C., 1995 – Microsatellite analysis of population structure in

- Canadian polar bears. *Mol. Ec.*, 4: 374-354.
- Parker G.A., 1974 – Assessment strategy and the Evolution of fighting behaviour. *J. Theor. Biol.*, 47: 223—243.
- Pereira J.M. & Duckstein L., 1993 – A multiple criteria decision-making approach to GIS-based land suitability evaluation. *Intern. J. G.I.S.*, 7, 407– 424.
- Pérez-Mellado V. & Corti C., 1993 – Dietary adaptations and herbivory in Lacertid lizards of the genus *Podarcis* from Western Mediterranean islands. (Reptilia: Sauria). *Bonn. Zool. Beitr.*, 44 (3-4): 193-200.
- Perrin N., 1984 – Contribution à l'écologie du genre *Cepaea* (Gasteropoda): approche descriptive et expérimentale de l'habitat et de la niche écologique. PhD thesis. University of Lausanne. Switzerland.
- Piertney S., MacColl A.D.C., Bacon P.J. & Dallas J.F., 1998 – Local genetic structure in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): evidence from microsatellite DNA markers. *Mol. Ecol.*, 7: 1645-1654.
- Pigliucci M. & Barbujani G., 1991 – Geographical patterns of gene frequencies in Italian population of *Ornithogalum montanum* (Liliaceae). *Genet. Res.*, 58: 95-104.
- Pinho C., Harris D.J. & Ferrand N., 2003 – Genetic polymorphism of 11 allozyme loci in populations of wall lizards (*podarcis* sp.) from the iberian peninsula and North Africa. *Bioch. Genet.*, 41 (9/10): 343-359.
- Podnar M., Mayer W. & Tvrtković N., 2005 – Phylogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Mol. Ec.*, 14: 575-588.
- Poulakakis N., Lymberakis P., Valakos E., Zouros E. & Mylonas M., 2005 – Phylogenetic relationships and biogeography of *Podarcis* species from the Balkan Peninsula, by bayesian and maximum likelihood analyses of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, 37: 845–857.
- Primm S.A., 1996 – A pragmatic approach to grizzly bear conservation. *Cons. Biol.*, 10 (4): 1026-1055.
- Primmer C.R., Møller A.P., Ellegren H., 1995 – Resolving genetic relationship with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Mol. Ecol.*, 4(4): 493-498.
- Primmer C.R., Møller A.P., Ellegren H., 1996 – A wide-range survey of cross species microsatellite amplification in birds. *Mol. Ecol.*, 5: 365-378.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P., 2000a – Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- Pritchard J.K., Stephens M., Rosenberg N.A. & Donnelly P., 2000b – Association mapping in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.*, 67: 170-181.
- Queller D.C., Strassmann J.E. & Hughes C.R., 1993 – Microsatellites and kinship. *TREE*, 8: 285-288.
- Quinn V.S. & Hews D.K., 2003 – Positive relationship between abdominal coloration and

- dermal melanin density in phrynosomatid lizards. *Copeia*, 2003: 858-864.
- Radovanović M, 1956 – Rassenbildung bei Eidechsen auf Adriatischen Inseln. Denkschrift der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse, 110: 1–82.
- Radtkey R.R., Fallon S.M. & Case T.J., 1997 – Character displacement in some *Cnemidophorus* lizards revisited: a phylogenetic analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 94: 9740-9745.
- Randi E., 1993 – Genetica delle piccole popolazioni. *Suppl. Rich. Biol. Selvaggina*, 21: 151-166.
- Reed R.A., Johnson-Barnard J. & Baker W.L., 1996 – Fragmentation of a forested Rocky mountain landscape, 1950 - 1993. *Biol. Conserv.*, 75: 267-277.
- Rempel R.S. & Carr A.P., 2003 – Patch Analyst extension for ArcView: version 3. <http://flash.lakeheadu.ca/~rrempe/patch/index.html>.
- Reutter B.A., Helfer V., Hirzel A.H. & Vogel P., 2003 – Modelling habitat-suitability on the base of museum collections: an example with three sympatric *Apodemus* species from the Alps. *J. Biog.*, 30:581-590.
- Reynolds J., Weir B.S. & Cockerham C.C., 1983 – Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779.
- Reznick D.N. & Ghalambor C.K., 2001 – The population ecology of contemporary adaptation: what do empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution? *Genetica*, 112-113: 183-198.
- Ricklefs R.E. & Bermingham E., 2004 –History and the species-area relationship in Lesser Antillean birds. *Am. Nat.*, 163: 227-239.
- Robberts F.J.L., Liebowitz L.D. & Chalkley L.J., 2004 – Genotyping and coalescent phylogenetic analysis of *Pneumocystis jiroveci* from South Africa. *J. Clinic. Mic.*, 4 (42): 1505–1510.
- Rocha S., Carretero M.A., Vences M., Glaw F. & Harris D.J., 2006 – Deciphering patterns of transoceanic dispersal: the evolutionary origin and biogeography of coastal lizards (*Cryptoblepharus*) in the Western Indian Ocean region. *J. Biog.*, 33: 13–22.
- Rohwer S. & Ewald P.W., 1981 – The cost of dominance and advantage of subordination in a badge-signalling system. *Evolution*, 35: 441—454.
- Romano B., 1996 – Oltre i Parchi. La rete verde regionale. DAU. Università de L'Aquila. Andromeda editrice. Colledara. Terni, Italia, pp. 78.
- Rosenberg, N.A. & Nordborg M., 2002 – Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature*, 3: 380–390.
- Rosenblum E.B., Hoekstra H.E. & Nachman. M.W., 2004 – Adaptive reptile color variation and the evolution of the *Mclr* gene. *Evolution*, 58 (8): 1794-1808.
- Rosenzweig M.L., 1995 – Species diversity in space and time. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. pp. 435.

- Rugiero L., 1994 – Food habits of the ruin lizard, *Podarcis sicula* (Rafinesque –Schmaltz, 1810), from a coastal dune in Central Italy. *Herpetozoa*, 7 (1/2): 71-73.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977 – DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sá-Sousa P., Almeida A.P., Rosa H., Vicente L., & Crespo E.G., 2000 – Genetic and morphological relationships of the Berlenga wall lizard (*Podarcis bocagei berlengensis* Lacertidae). *J. Zool. Syst. Evol.*, 38: 95-102.
- Sá-Sousa P., Vicente L. & Crespo E.G., 2002 – Morphological variability of *Podarcis hispanica* (Sauria: Lacertidae) in Portugal. *Amph. Rept.*, 23 (1): 55-69.
- Saunders D.A., Hobbs R.J. & Margules C.R., 1991 – Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Cons. Biol.*, 5: 18-32.
- Scalera R., 2003 – Anfibi e Rettili italiani. Elementi di tutela e conservazione. Collana Verde, 104. CFS. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Roma. pp. 232.
- Schneider B, 1971 – Das Thyrrhenisproblem. Interpretation Auf Zoogeographischer Grundlage, Dargestellt an Amphibien und Reptilien. PhD thesis, University of Saarbrücken, Saarland, Deutschland.
- Schoener T.W., 1988 – Ecological interactions. In Myers A.A. & Giller P.S. (Eds) *Analytical Biogeography*. Chapman Hall, London. pp 255–297
- Schoener T.W., Losos J.B. & Spiller D.A., 2005 – Island Biogeography of Populations: An Introduced Species Transforms Survival Patterns. *Science*, 310 (5755): 1807-1809
- Scoccianti C., 2001 – Amphibia: aspetti di ecologia della conservazione. WWF Italia, Sezione Toscana. Editore Guido Persichino Grafica, Firenze. pp. 430.
- Seal U.S., Mace G. & Foose T.J., 1989 – Population viability analysis (PVA) for the intensive management and conservation of small population in the wild and in captivity. Abstract V International Theriological Congress: 715-717. Roma.
- Seehausen O. 1997 – Distribution of and reproductive isolation among color morphs of a rock-dwelling Lake Victoria cichlid (*Haplochromis nyererei*). *Ecol. Fresh. Fish* 6 (1): 57.
- Seehausen O., van Alphen J.J.M. & Lande R., 1999 – Color polymorphism and sex ratio distortion in a cichlid fish as an incipient stage in sympatric speciation by sexual selection. *Ecol. Lett.*, 2: 367-378.
- Servedio M.R., 2000 – The effects of predator learning, forgetting, and recognition errors on the evolution of warning coloration. *Evolution*, 54:751-763.
- Shaffer M.L., 1984 – Minimum viable populations: coping with uncertainty. In Soulé M.E. (Ed) *Viable Populations for Conservation*, pp. 69-86. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Shaw D.M. & Atkinson S.F., 1990 – An introduction to the use of geographic information systems for ornithological research. *Condor*, 92: 564-570.
- Sherbrooke W.C. & Frost S.K., 1989 – Integumental chromatophores of a color-change, thermoregulating lizard, *Phrynosoma modestum* (Iguanidae; Reptilia). *Am. Mus. Nat.*

Hist. NY. p 14.

- Shriver M., Jin L., Chakraborty R. & Boerwinkle E., 1993 – VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model: A computer simulation approach. *Genetics* 134:983-993.
- Simpson G.G., 1944 – *Tempo and Mode in Evolution*. Columbia University Press, NY. pp. 105.
- Sindaco R., 2000 – Priorità di conservazione dell'erpeto fauna italiana – analisi preliminare in base ai dati forniti dalla distribuzione geografica. In: Giacoma C. (Ed) *Atti I Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica*, Torino 1996. pp. 681-694. Mus. Reg. Sci. Nat., Torino.
- Sindaco R., Doria G., Razzetti E., Bernini F., (Eds) 2006 – *Atlante degli Anfibi e dei Rettili d'Italia/Atlas of Italian Amphibians and Reptiles*. Societas Herpetologica Italica. Edizioni Polistampa, Firenze, pp. 792.
- Smith G., 1976 – Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, 191: 528-535
- Sokal R.R. & Thomson B.A., 1998 – Spatial genetic structure of human populations in Japan. *Hum. Biol.*, 70: 1-22.
- Solow A.R., 1993 – Inferring extinction from sighting data. *Ecology*, 74: 962-964.
- Sorci G., 1989 – Lucertola campestre e lucertola siciliana. In: Massa B. (Coord.) *Atlante iconografico della fauna vertebrata della Riserva Orientata Naturale dello Zingaro (Sicilia)*. Azienda Forestale Demaniale Regione Siciliana, Palermo, pp 17-19.
- Sorci G., 1990 – Nicchia trofica di quattro specie di Lacertidae in Sicilia. *Natural. Sicil.*, 4 (14 suppl.): 83-93.
- Soulé M.E. & Orians G.H., 2001 – Conservation Biology research: its challenges and contexts. In: Soulé M.E. & Orians G.H. (Eds). *Conservazione Biology. Research priorities for the next decade*. Soc. Cons. Biol. Island Press: 271-285.
- Soulé M.E., 1985 – What is Conservation Biology? *Bioscience*, 35: 727-734.
- Soulé M.E., 1987 — *Viable population's for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Southwood T.R.E., 1979 – *Ecological methods with particular reference to the study of Insect Population*. 2nd edn John Wiley, NY. pp. 524.
- Stamps J.A. & Bauchner M., 1985 – The territorial defence hypothesis and the ecology of insular vertebrate. *Quart. Rev. Biol.*, 60: 155-181.
- Stenson A.G., Malhotra A., Thorpe R.S., 2002 – Population differentiation and nuclear gene flow in the Dominican anole (*Anolis oculatus*). *Mol. Ec.*, 1: 1679–1688.
- Summers K., Symula R., Clough M. & Cronin T., 1999 – Visual mate choice in poison frogs. *Proc. R. Soc. Lon B*, 266: 2141-2145.
- Tajima F., 1989 – Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

- Templeton AR, 1980 – The theory of speciation via the founding principle. *Genetics*, 94: 1011-1038.
- Templeton A.R., Crandall K.A. & Sing C.F., 1992 – A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.
- Thomas C.D., 1994 – Extinction, colonization, and metapopulations: environmental tracking by rare species. *Cons. Biol.*, 8: 373-378.
- Thompson C.W. & Moore M.C., 1991 – Throat colour reliably signals status in male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Anim. Behav.*, 42: 745-754.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994 – Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Thorpe R.S., 2005 – Population evolution and island biogeography. *Science*, 310 (5755): 1778-1779.
- Thorpe R.S., MacGregor D.P., Cumming A.M. & Jordan W.C., 1994 – DNA evolution and colonization sequence of island lizards in relation to geological history: mtDNA RFLP, cytochrome b, cytochrome oxidase, 12S rRNA sequence, and nuclear RAPD analysis. *Evolution*, 48: 230-240.
- Thorpe R.S., McGregor D.P., Cumming A.M., 1993 – Molecular phylogeny of the Canary Island lacertids (*Gallotia*): mitochondrial DNA restriction fragment divergence in relation to sequence divergence and geological time. *J. Evol. Biol.*, Basel, 6: 725-735.
- Thorpe R.S., Murielle R., 2000 – Evidence that ultraviolet markings are associated with patterns of molecular gene flow. *PNAS*, 98 (7): 3929-3934.
- Tome S., 1995 – Kritini pogled na taksonomki položaj primorske kuskarice *Podarcis sicula*. *Annales*, 7: 223-230.
- Tosini G., Foa A. & Avery R., 1992 – Body temperatures and exposure to sunshine of ruin lizards *Podarcis sicula* in central Italy. *Amph. Rept.*, 13: 169-175.
- Turrisi G.F., Vaccaro A., 2001 – Distribuzione altitudinale di Anfibi e Rettili sul Monte Etna (Sicilia orientale). Atti 3° Congresso Nazionale di Erpetologia, Pianura (Cr), 13: 335-338.
- Uy J.A.C. & Borgia G., 2000 – Sexual selection drives rapid divergence in bowerbird display traits. *Evolution*, 54: 273-278.
- van Damme R., Bauwens D., Castilla A.M. & Verheyen R.F., 1990 – Comparative thermal ecology of the sympatric lizards *Podarcis tiliguerta* and *Podarcis sicula*. *Acta Oecol.*, 11: 503-512
- Virgòs E.E., Telleria J.L. & Santòs T., 2002 – A comparison on the response to forest fragmentation by medium sized Iberian carnivores in central Spain. *Biodiv. Cons.*, 11: 1063-1079.
- Waser P.M., Sorbeck K. & Paetkau D., 2001 – Estimating interpopulation dispersal rates. In

- Gittleman J.L., Funk S.M., Macdonald D.W. & Wayne R.K. (Eds) Carnivore Conservation pp. 484–497. Cambridge University Press, Cambridge.
- Watson D.F., 1992 – Contouring: a guide to the analysis and display of spatial data. Pergamon Press, NY.
- Watterson G., 1975 – On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.*, 7: 256-276.
- Weir B.S. & Cockerham C.C., 1984 – Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wells R.D., Bushi H., Kossel H., Ohtsuka E. & Khorana H.G., 1967 – Studies on polynucleotides LXX Synthetic deoxyribopolynucleotides as templates for the DNA polymerase of *Escherichia coli*: DNA-like polymers containing repeated tetranucleotide sequences. *J. Mol. Biol.*, 27: 265-272.
- Wiens J.J., 1999 – Phylogenetic evidence for multiple losses of a sexually selected character in phrynosomatid lizards. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 266: 1529–1535.
- Wiens J.A., 2001 – The landscape context of dispersal. In: Clobert J., Danchin E., Dhondt A.A. & Nichols J.D. (Eds) *Dispersal*. pp. 96–109. Oxford University Press, Oxford, NY.
- Wright J., 1994 – Mutation at VNRTs: are minisatellite the evolutionary progeny of microsatellite? *Genome*, 37: 345-347.
- Zane L., Barcelloni L. & Patarnello T., 2002 – Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ec.*, 11: 1-16.
- Zardoya R., Vollmer D.M., Craddock C., Streelman J.T., Karl S. & Meyer A., 1996 – Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Pisciformes) *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 263: 1589-1598.
- Zimmermann F., 2004 – Conservation of the Eurasian Lynx (*Lynx lynx*) in a fragmented landscape – habitat models, dispersal and potential distribution. Doctoral thesis. Département of Ecology, Laboratory for Conservation Biology. University of Lausanne, Switzerland.
- Zucker N., 1994 – A dual status-signalling system: a matter of redundancy or differing roles? *Anim. Behav.*, 47: 15-22.
- Zunino M. & Zullini A., 1995. *Biogeografia. La dimensione spaziale dell'evoluzione*. Ambrosiana, Milano. pp. 318.

ALLEGATO FOTOGRAFICO

ALLEGATO FOTOGRAFICO



Foto di S. Guglielmi



Foto di A. Della Paolera

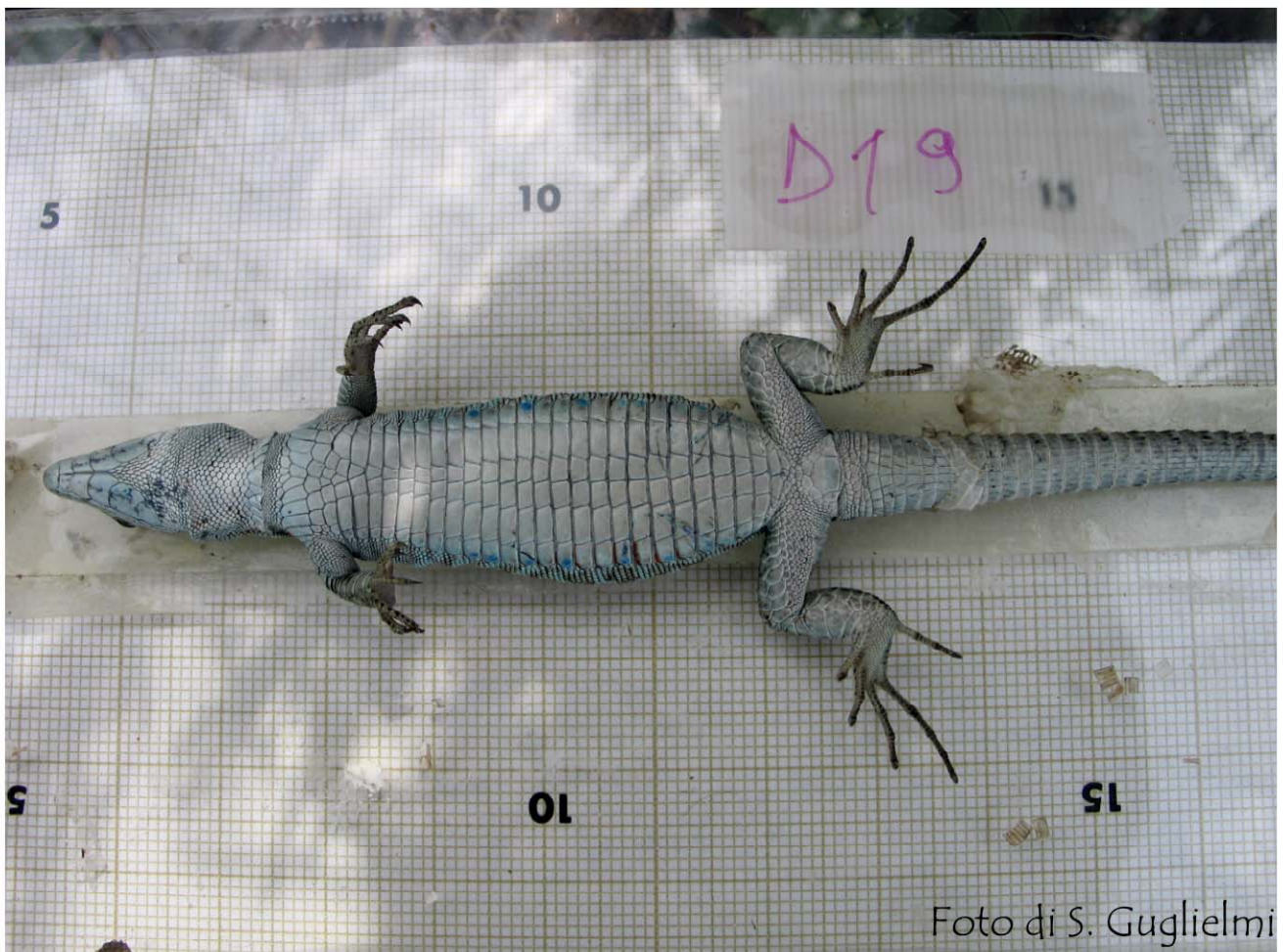
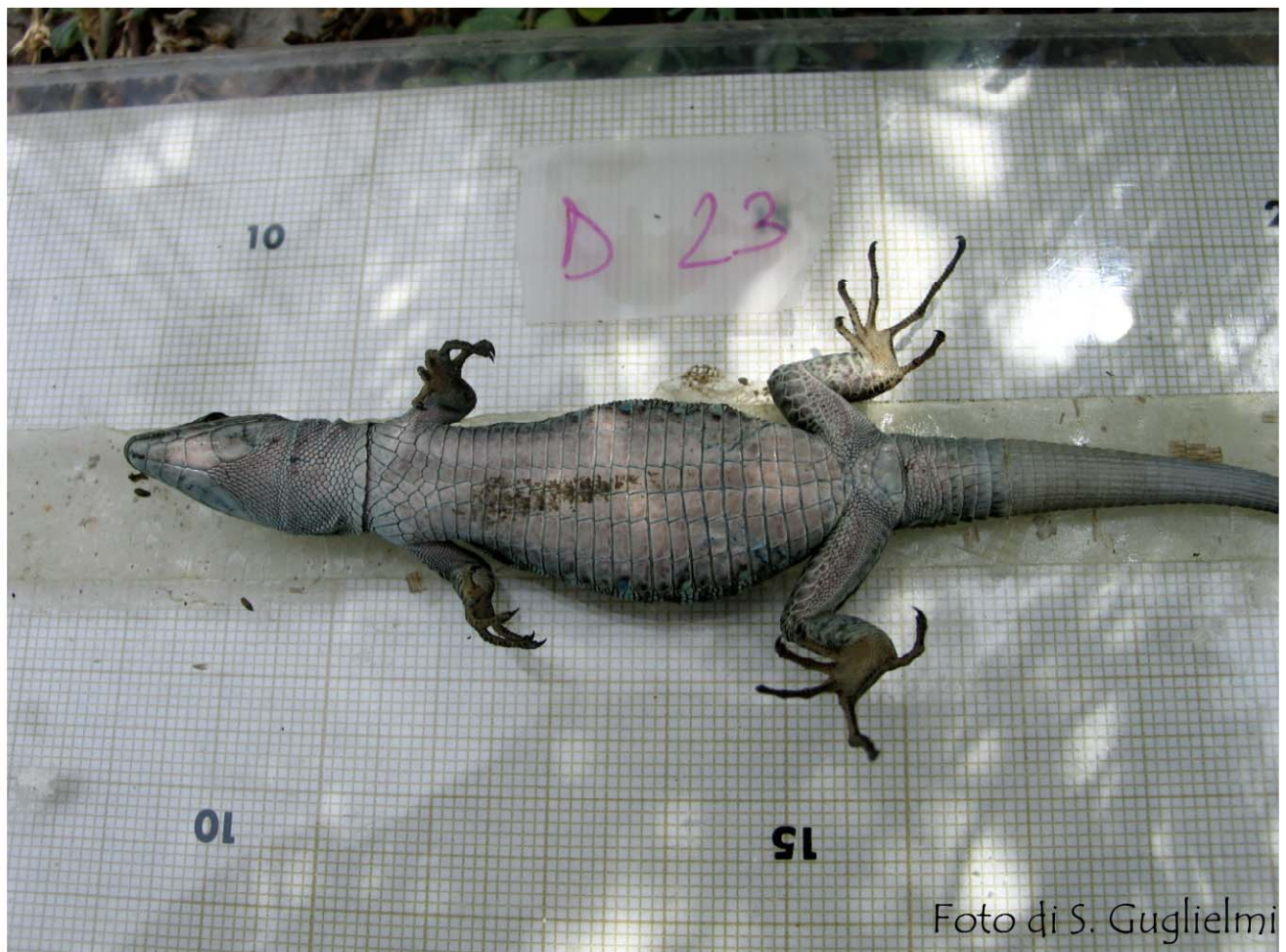
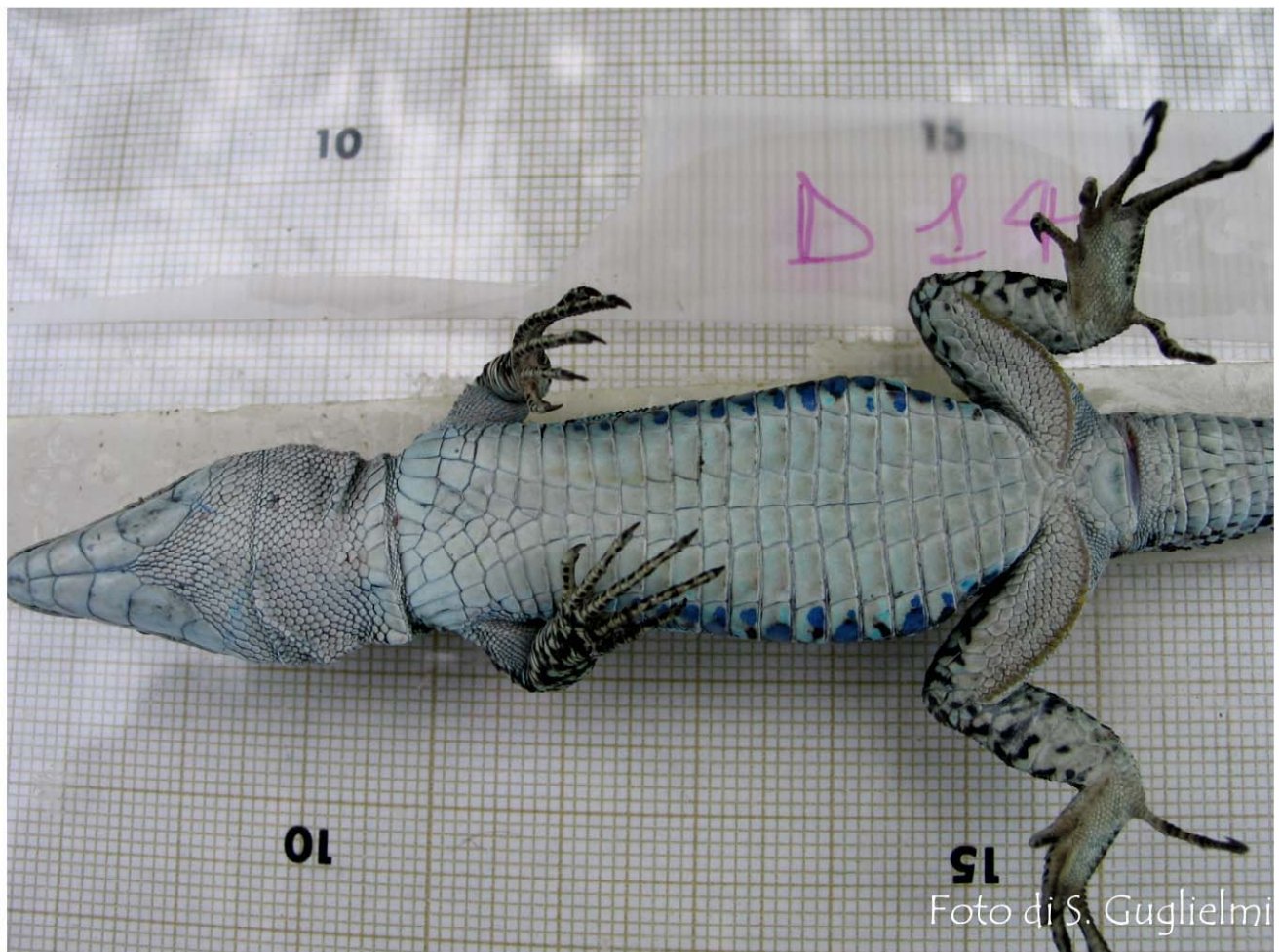


Foto di S. Guglielmi

Esempi di ventre bianco



Esempi di ventre rosa



Esempio di ventre celeste



Esempio di ventre azzurro



Esempi di ventre azzurro



Foto di S. Guglielmi



Foto di A. Della Paolera

Esempi di ventre nero



Foto di A. Della Paolera



Foto di S. Guglielmi

Esempi di ventre bianco e celeste



Esempi di ventre bianco e celeste



Foto di A. Della Paolera



Foto di S. Guglielmi

Esempi di ventre bianco e azzurro



Foto di S. Guglielmi



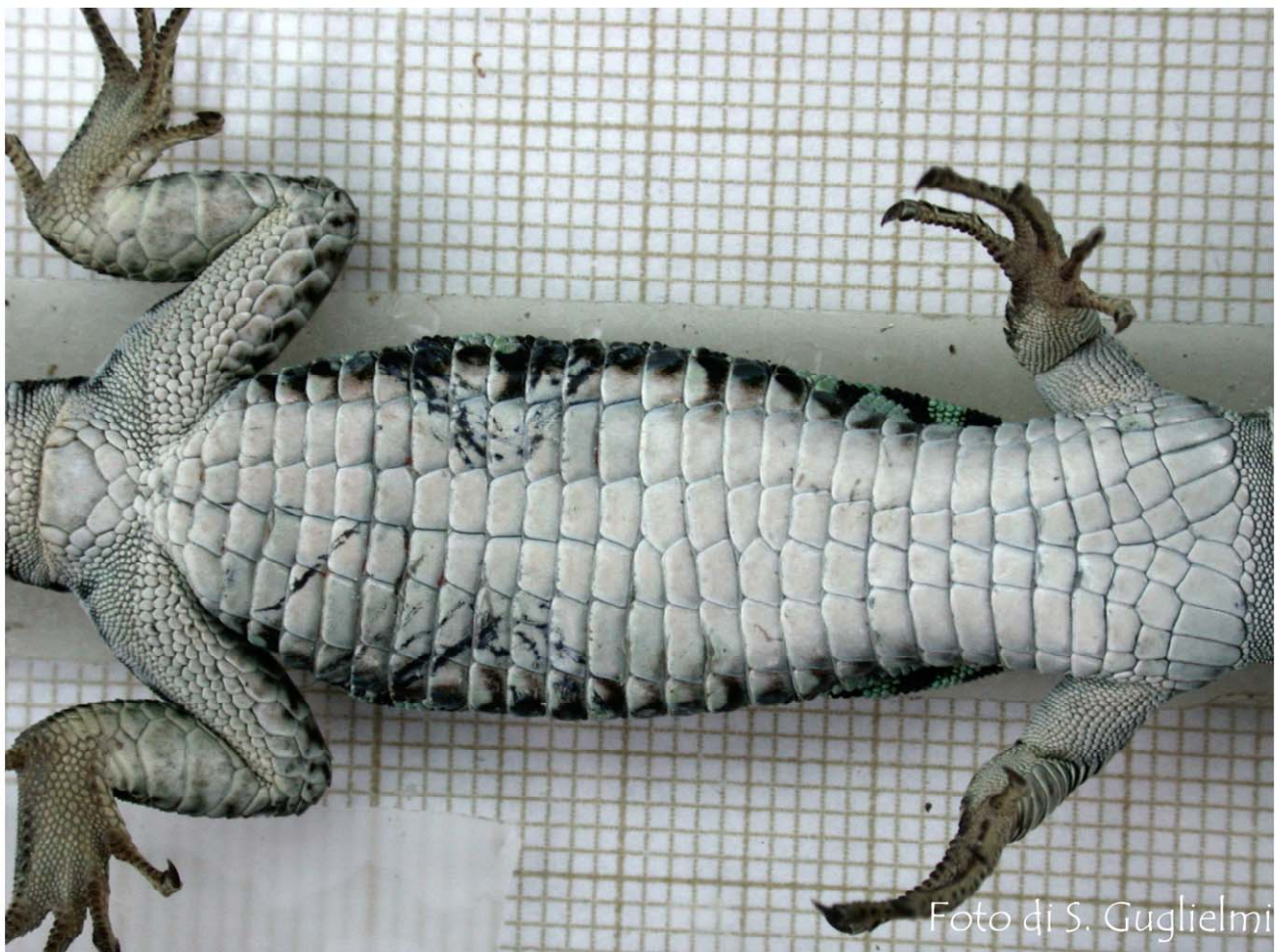
Foto di S. Guglielmi

Esempi di ventre celeste e azzurro



Esempi di ventre celeste e azzurro

Esempi di ventre bianco e azzurro



Esempi di ventre bianco e nero



Esempi di ventre bianco e nero



Foto di A. Della Paolera



Foto di S. Guglielmi

Esempi di fianco bianco



Foto di M. Scalisi



Foto di S. Guglielmi

Esempi di fianco verde

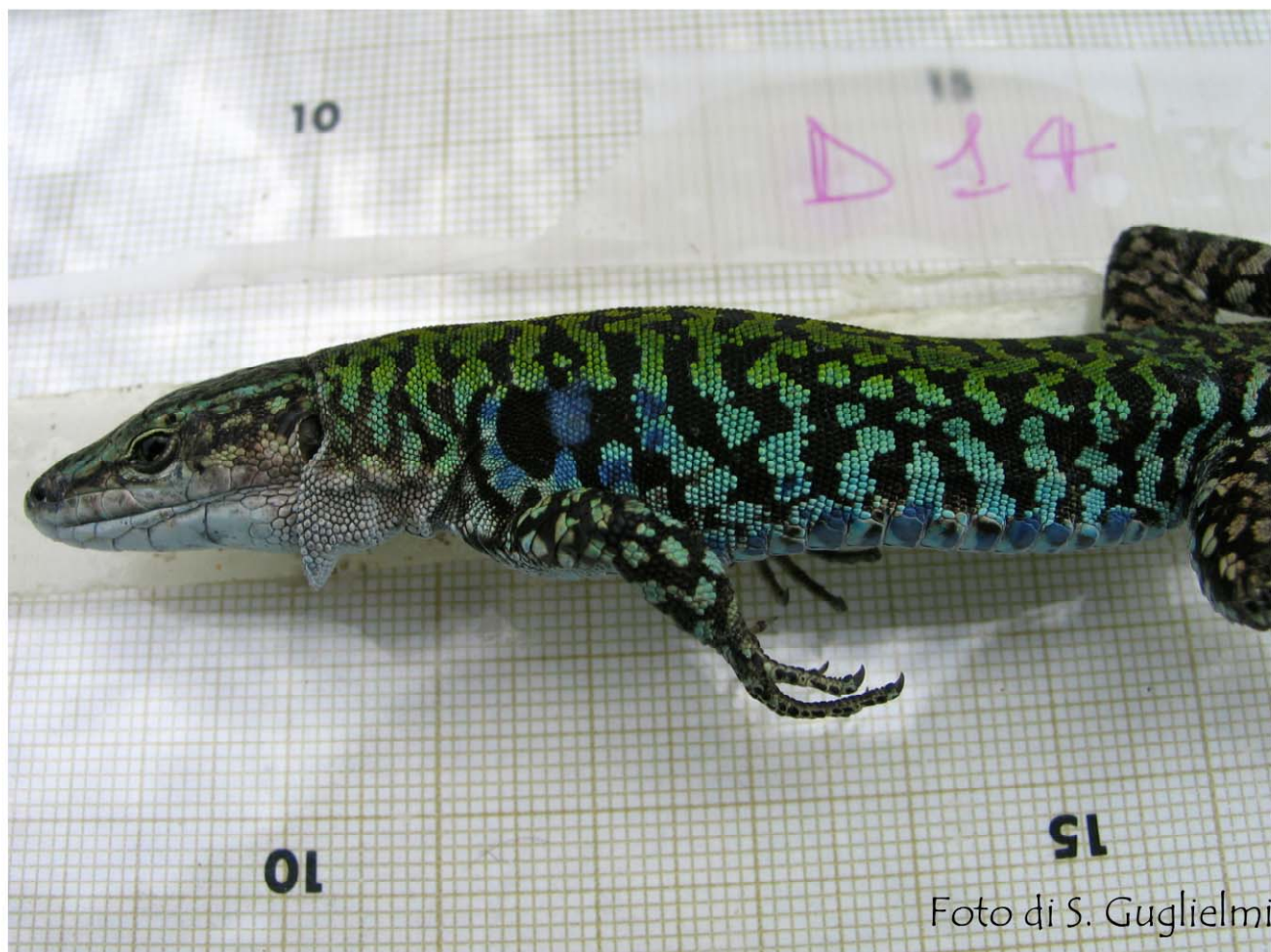


Foto di A. Della Paolera



Foto di A. Della Paolera

Esempi di fianco verde



Esempi di fianco celeste



Foto di S. Guglielmi

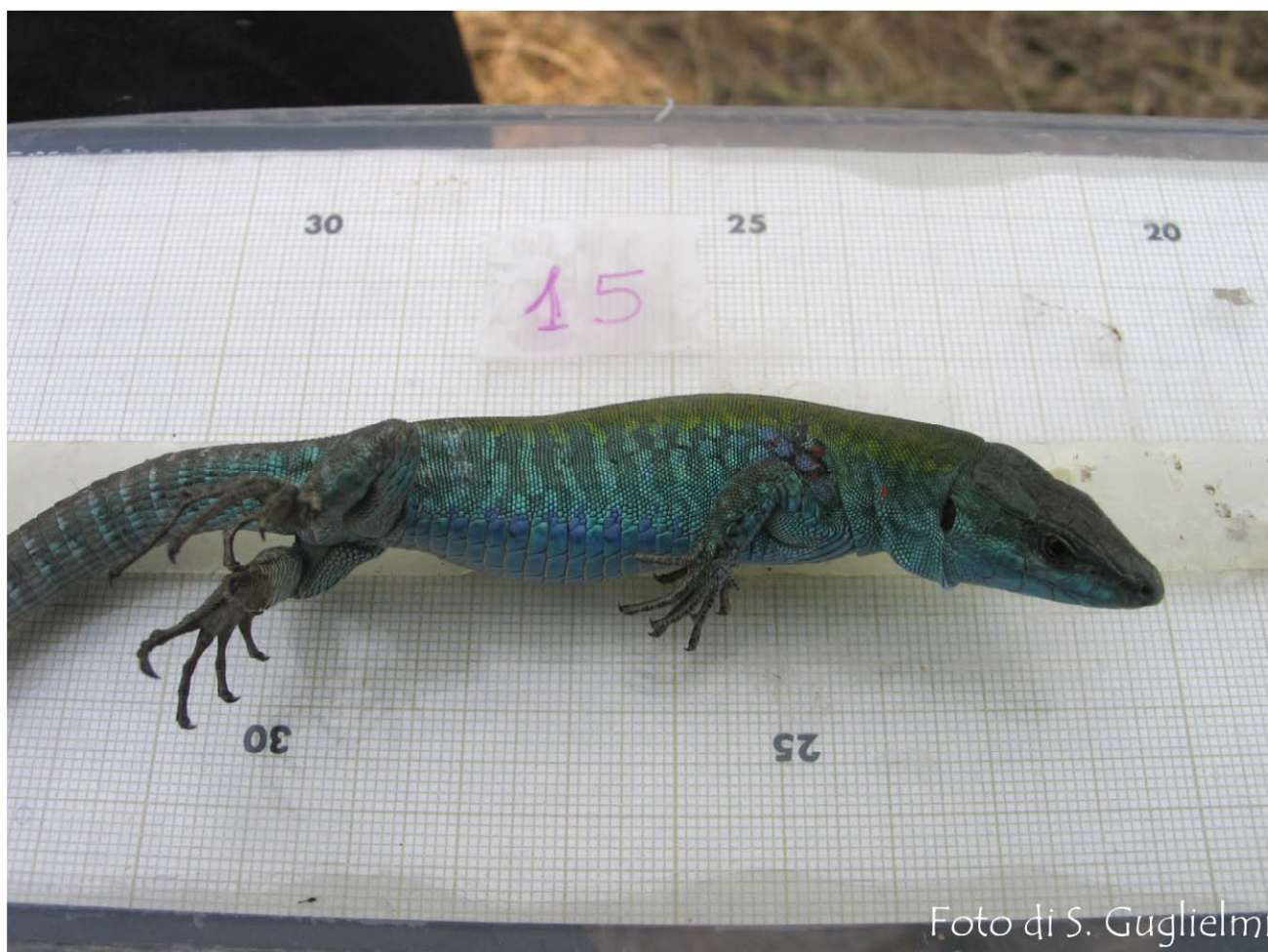


Foto di S. Guglielmi

Esempi di fianco celeste



Esempio di fianco azzurro



Esempio di fianco nero



Esempio di testa marrone senza screziature



Foto di A. Della Paolera

Esempio di capo marrone e verde



Foto di S. Guglielmi

Esempio di capo marrone, verde e nero



Foto di A. Della Paolera



Foto di M. Scalisi

Esempi di capo marrone e verde

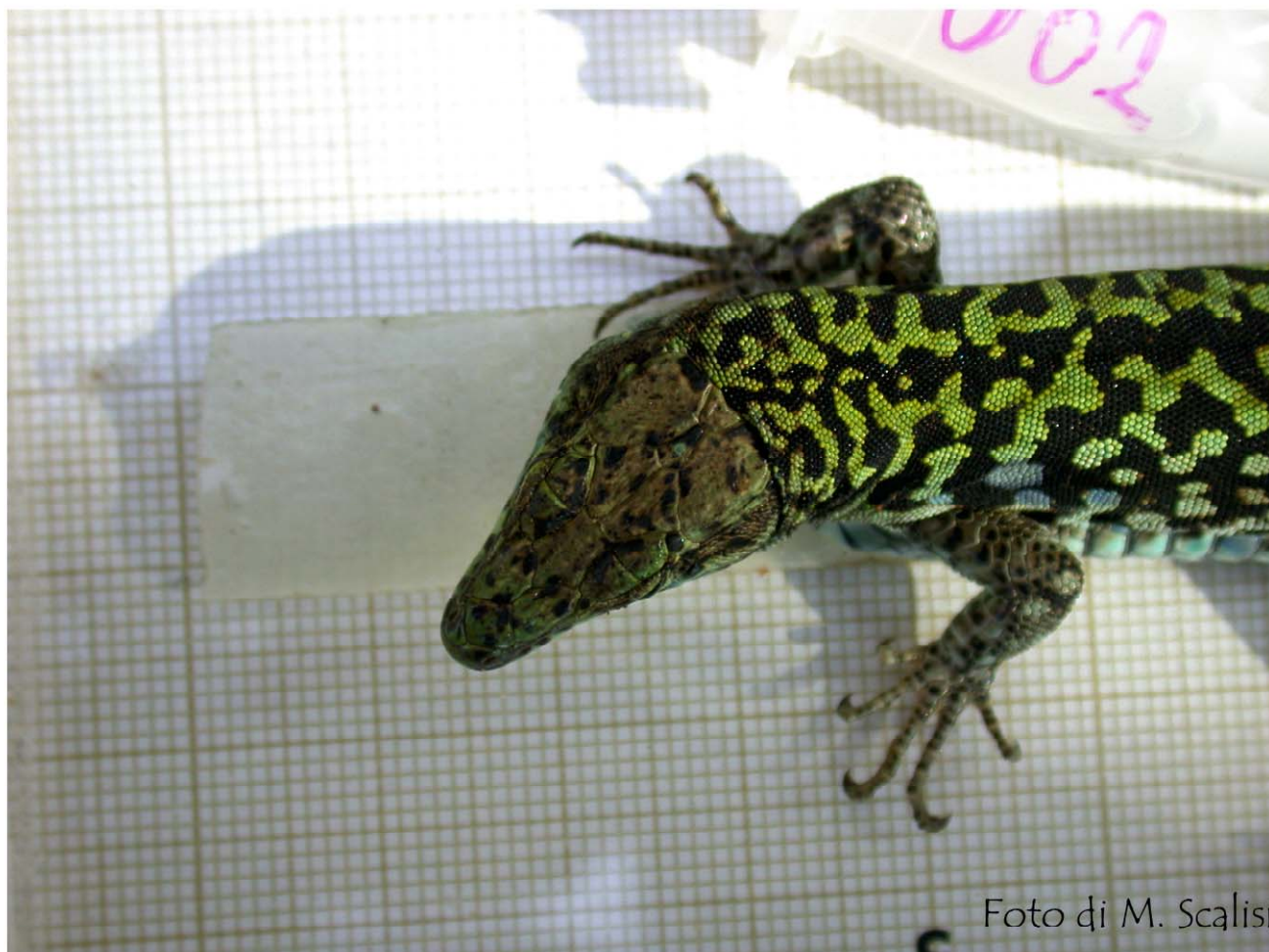


Foto di A. Della Paolera



Foto di A. Della Paolera

Esempi di capo con macchie disomogenee all'interno delle squame



Esempi di capo con macchie disomogenee sul bordo delle squame

Esempi di fenotipo con stria dorsale



Foto di M. Scalisi

PM1

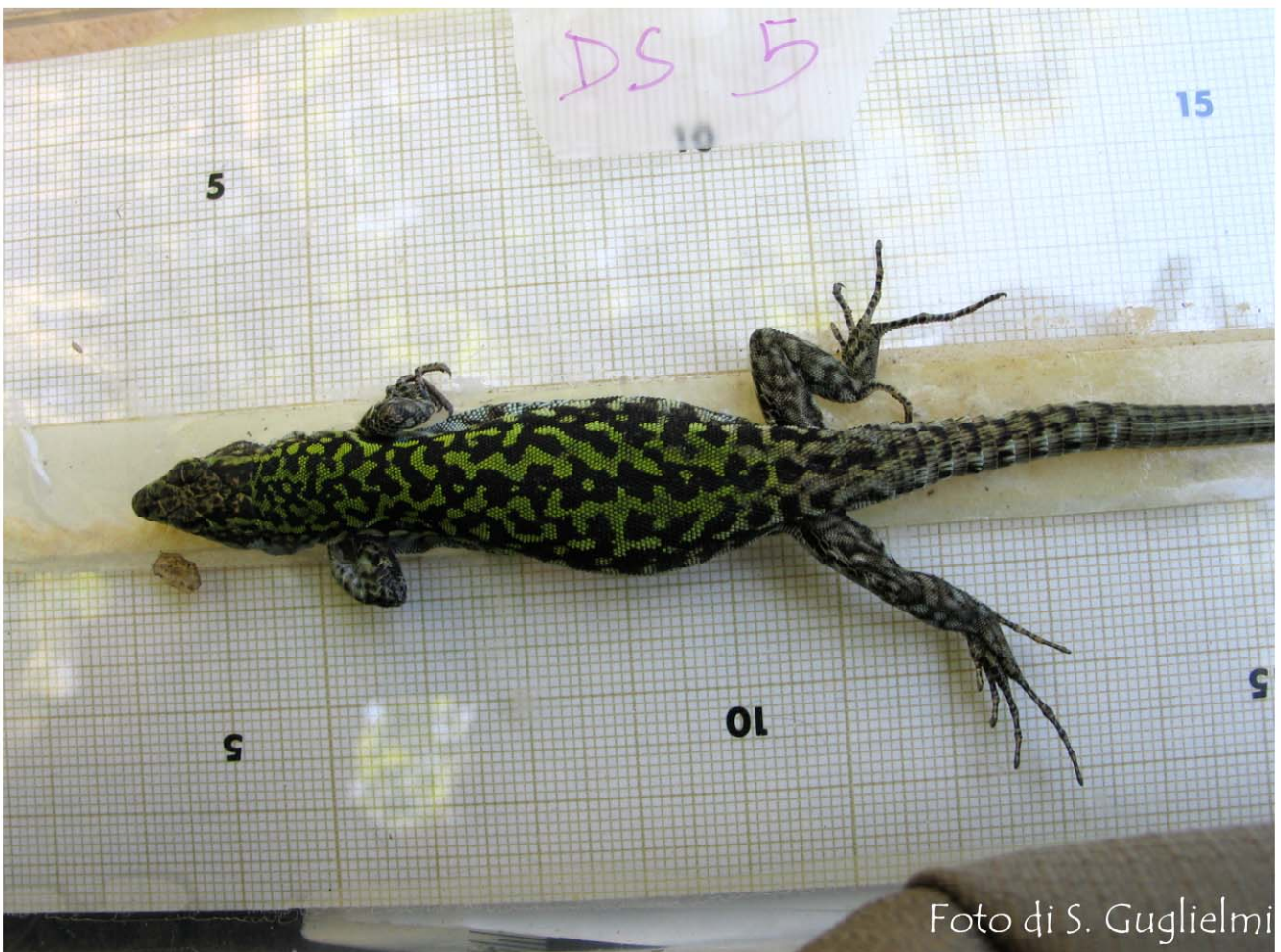
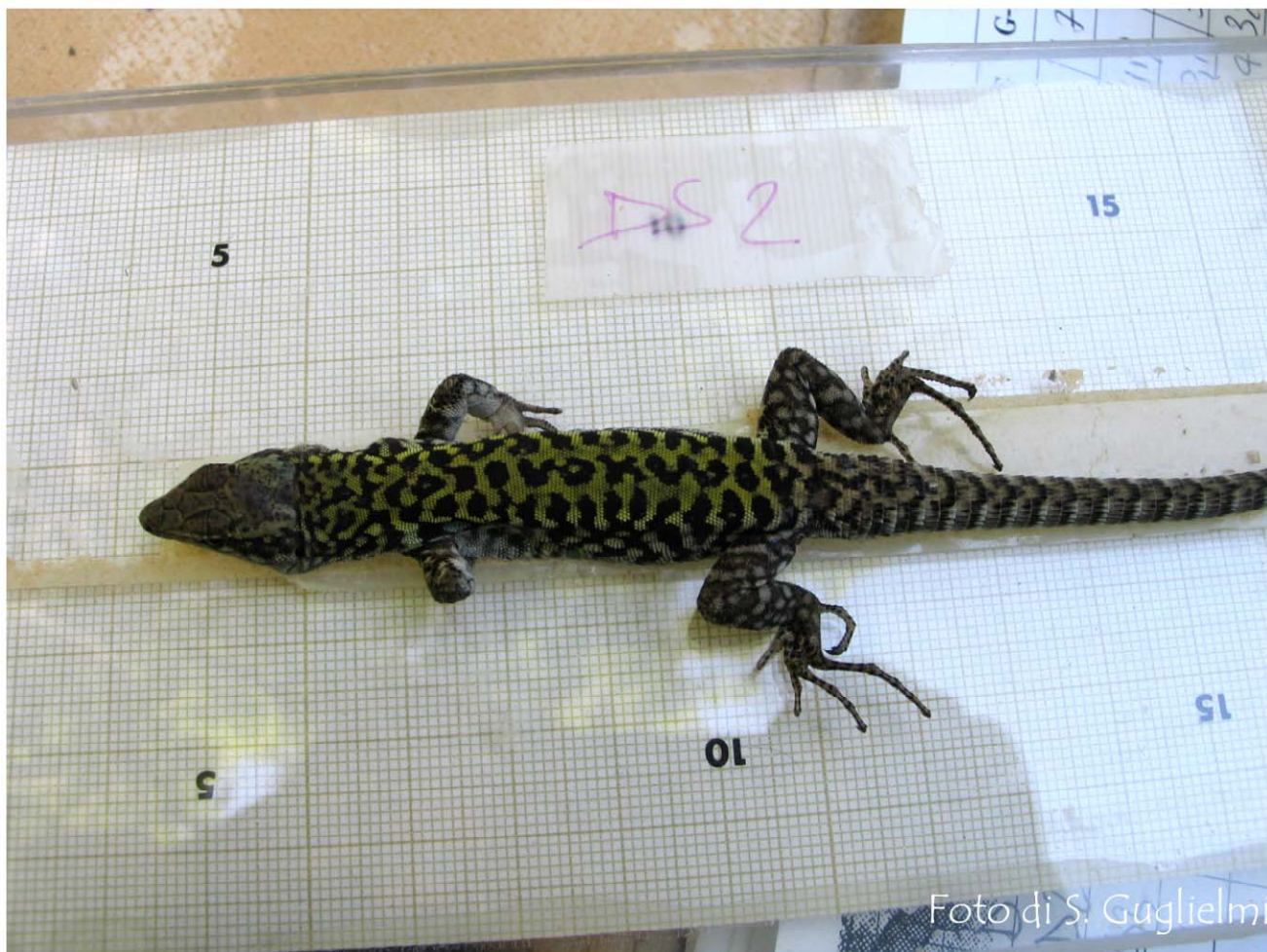
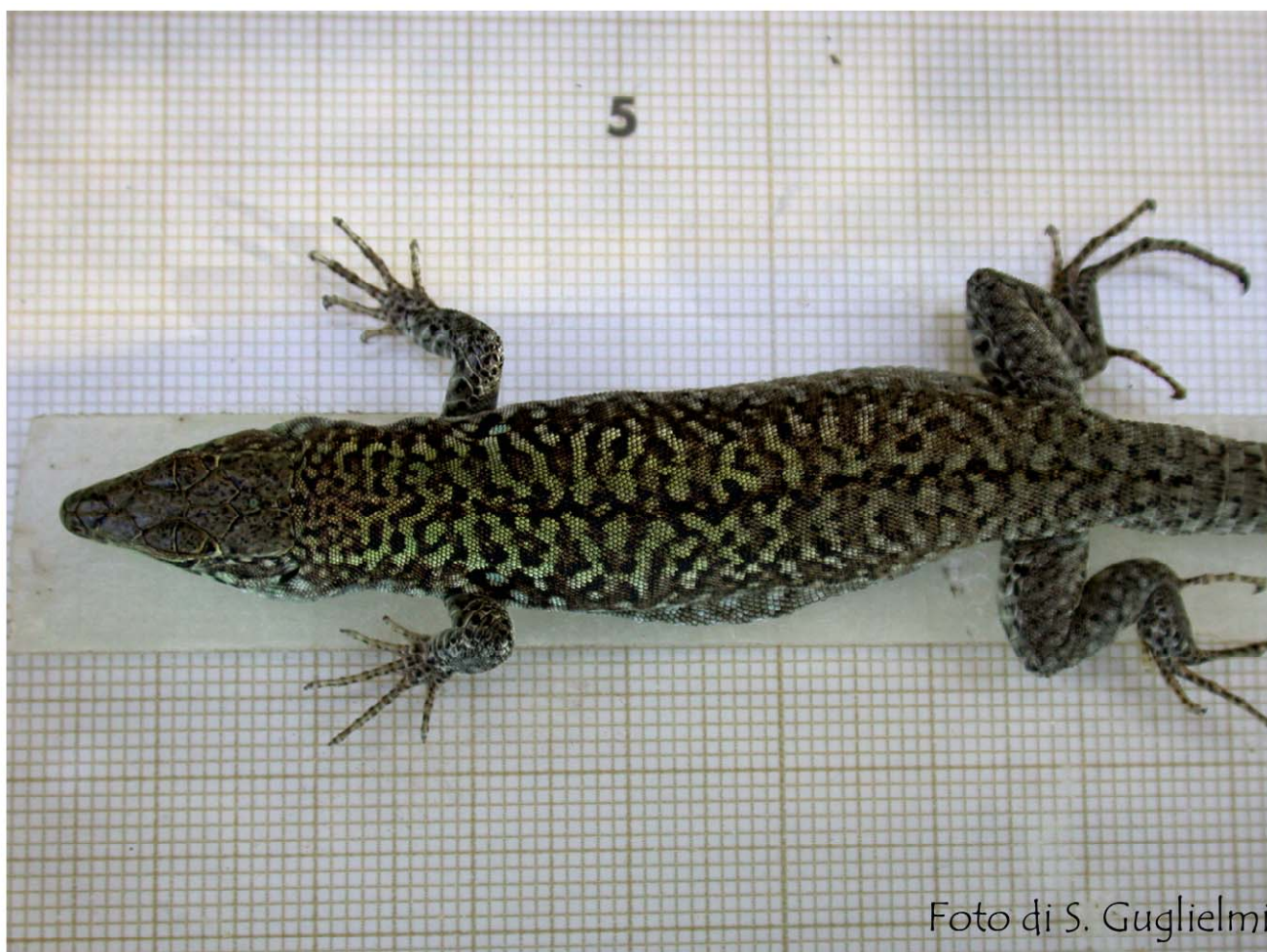


Foto di S. Guglielmi

PM2



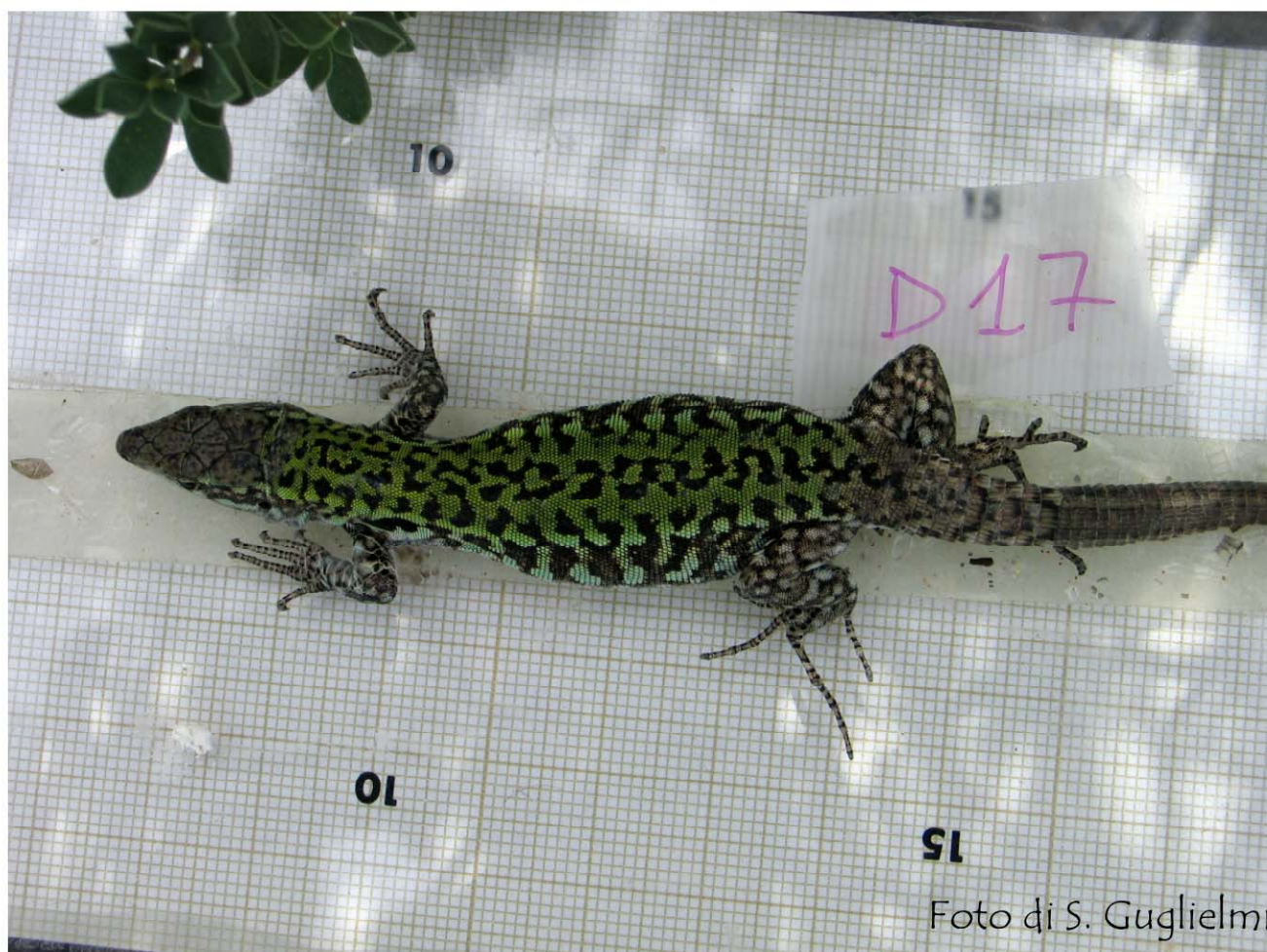
PM2



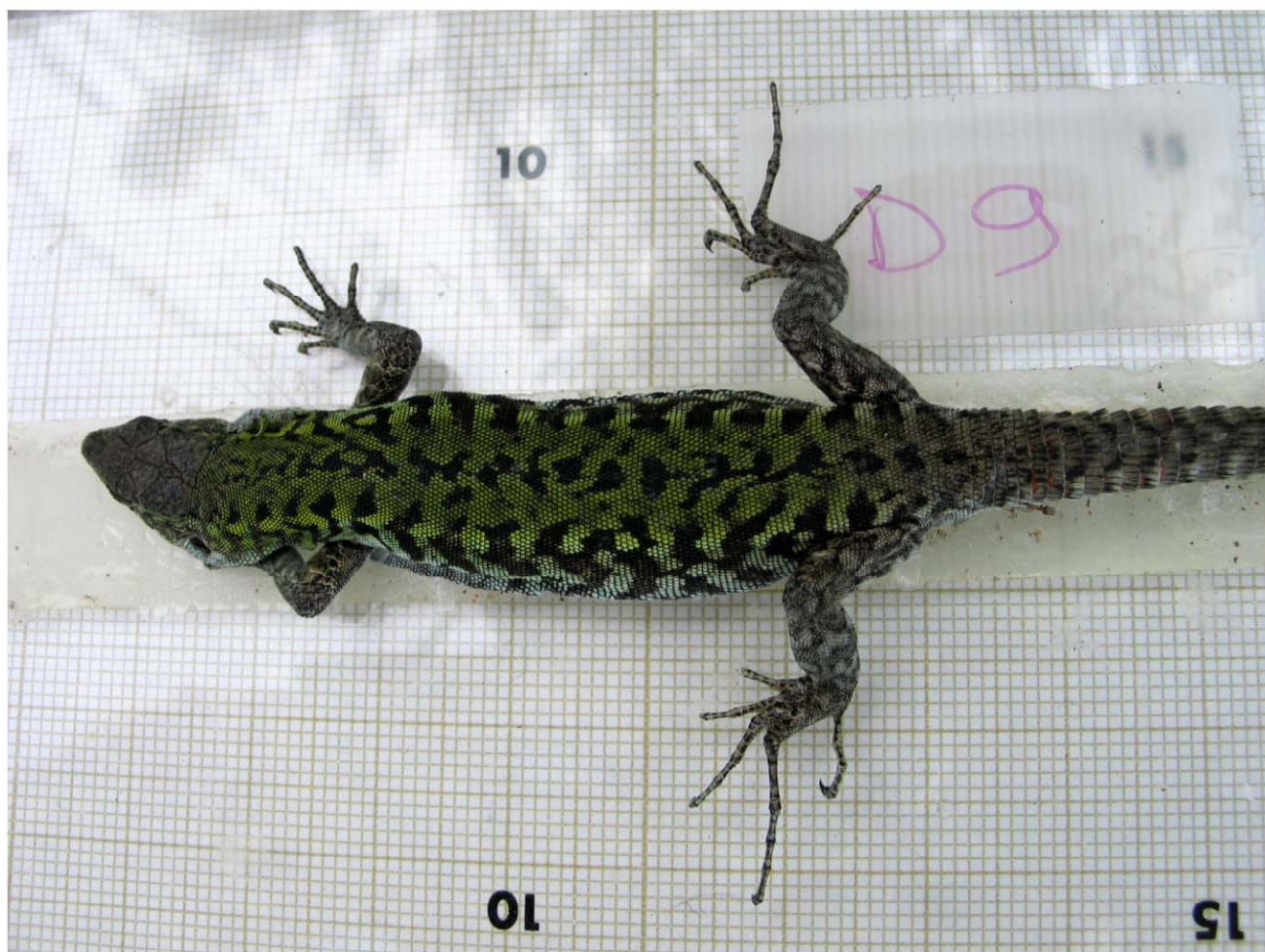
PM3



POD



POD



POL



POL



POL



Esempi di fenotipo privi di stria dorsale: AVA1

Esempi di fenotipo privi di stria dorsale



Foto di S. Guglielmi

AVA2

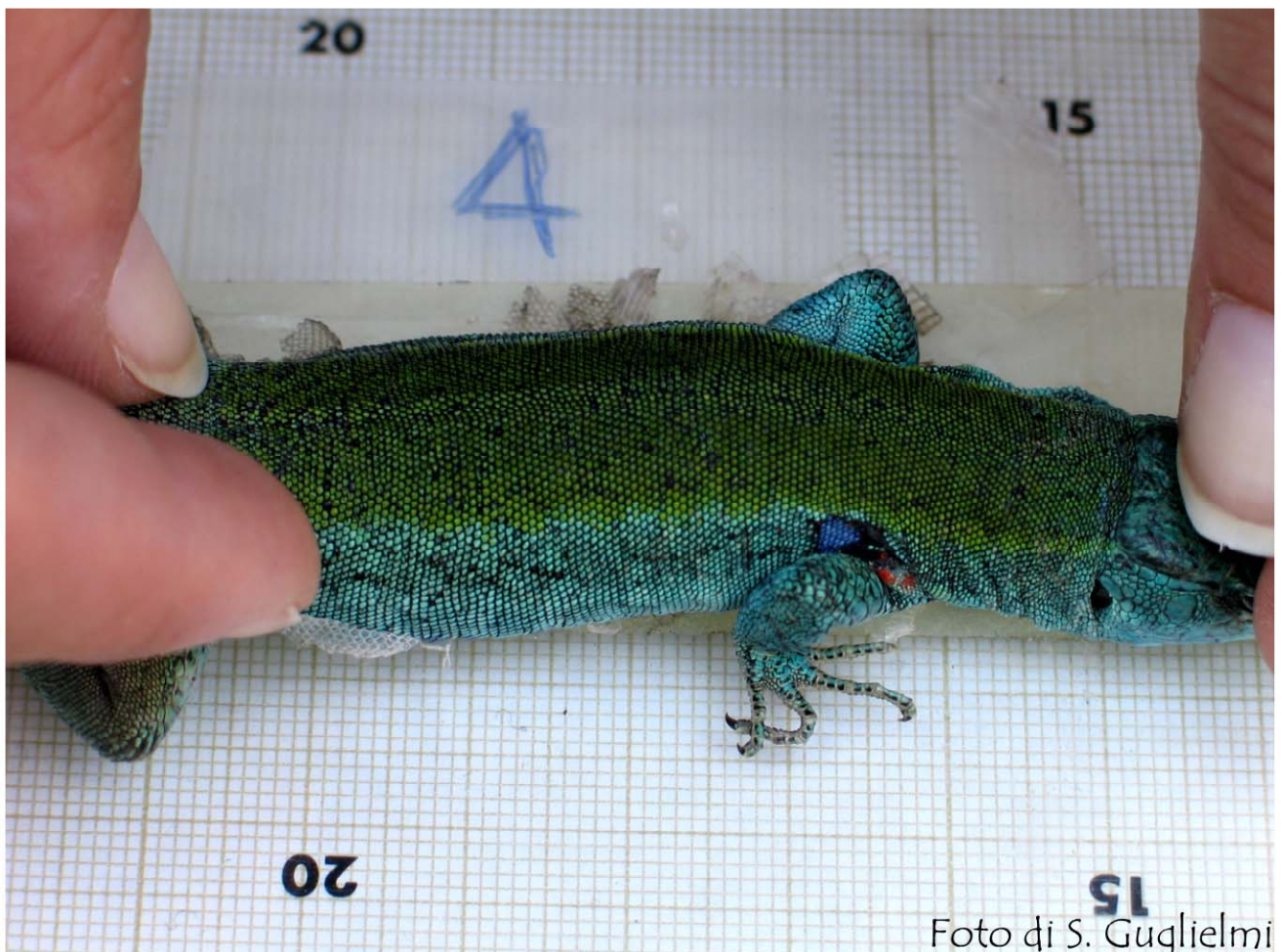
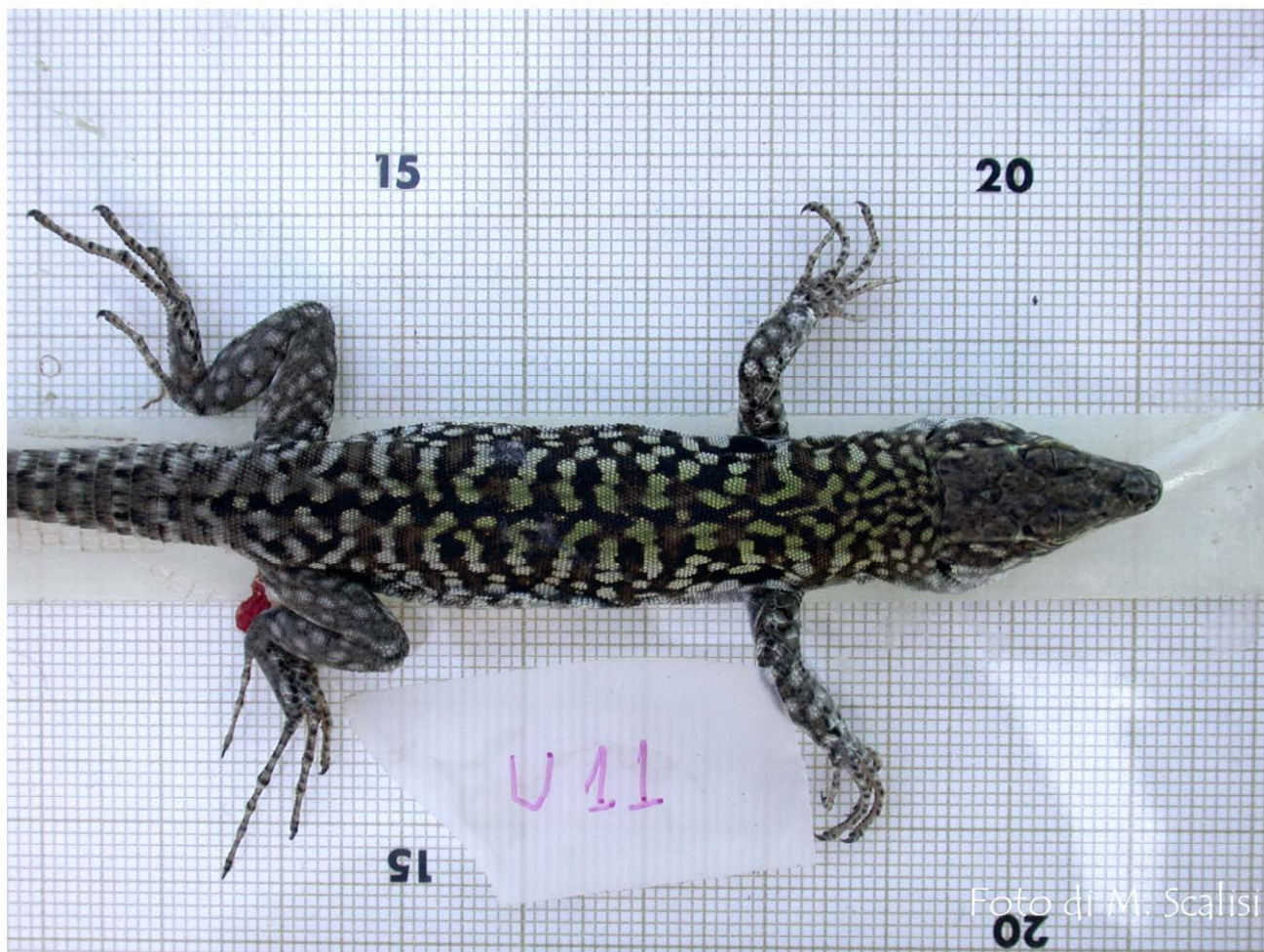
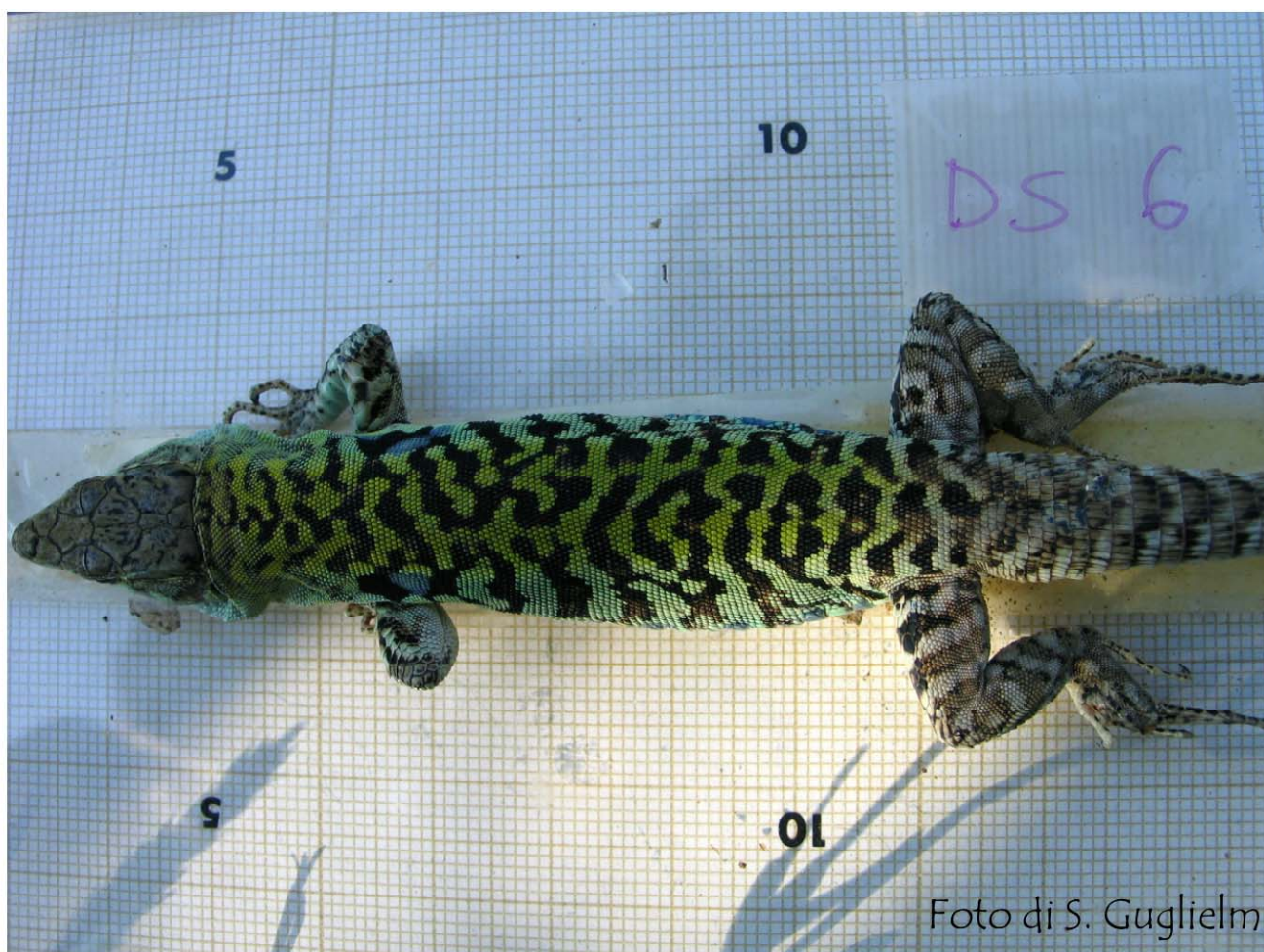


Foto di S. Guglielmi

AVA2



AVT



AVT



Foto di A. Della Paolera

AVN



Foto di S. Guglielmi

AVN

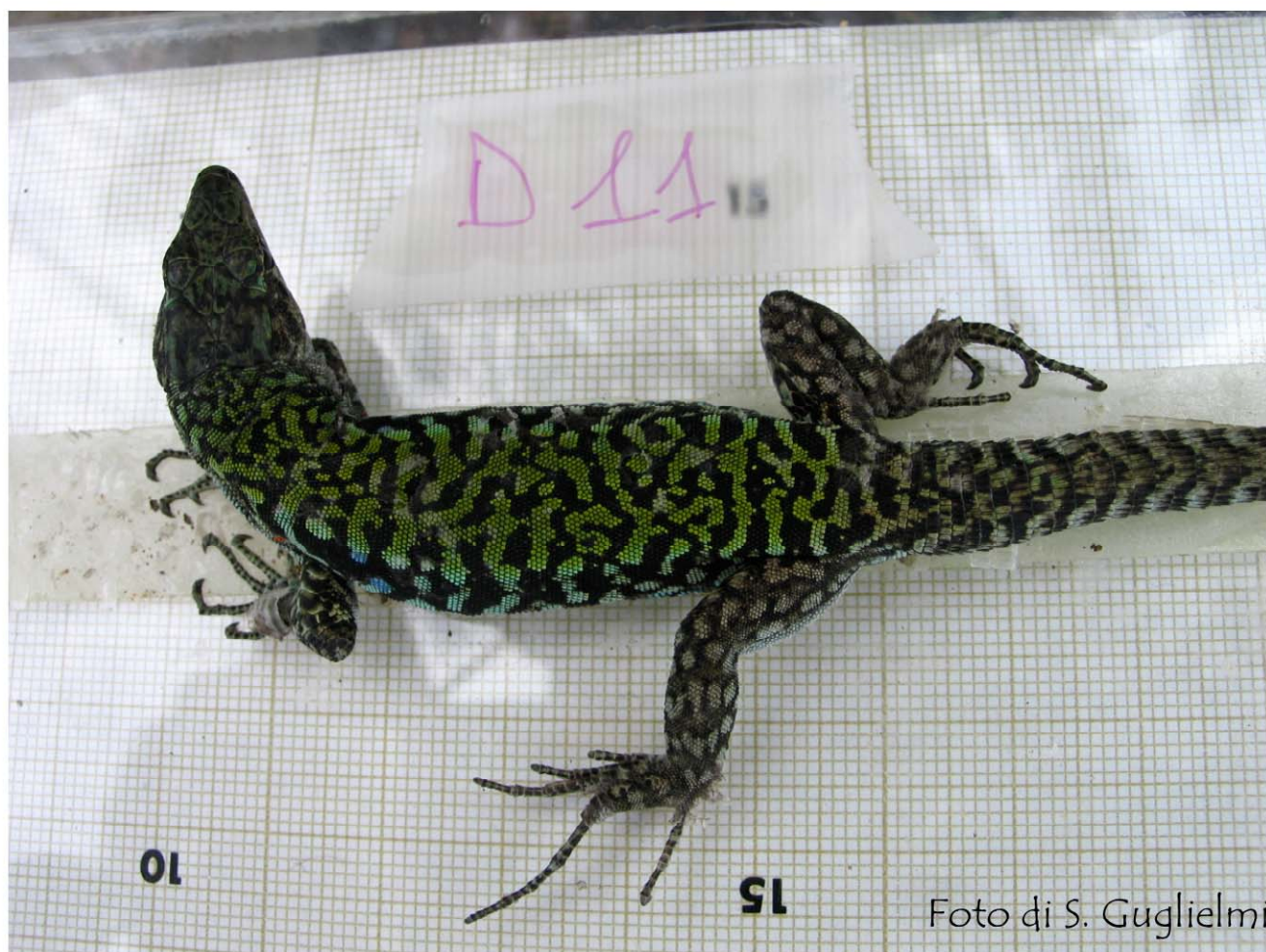


Foto di S. Guglielmi

AVN

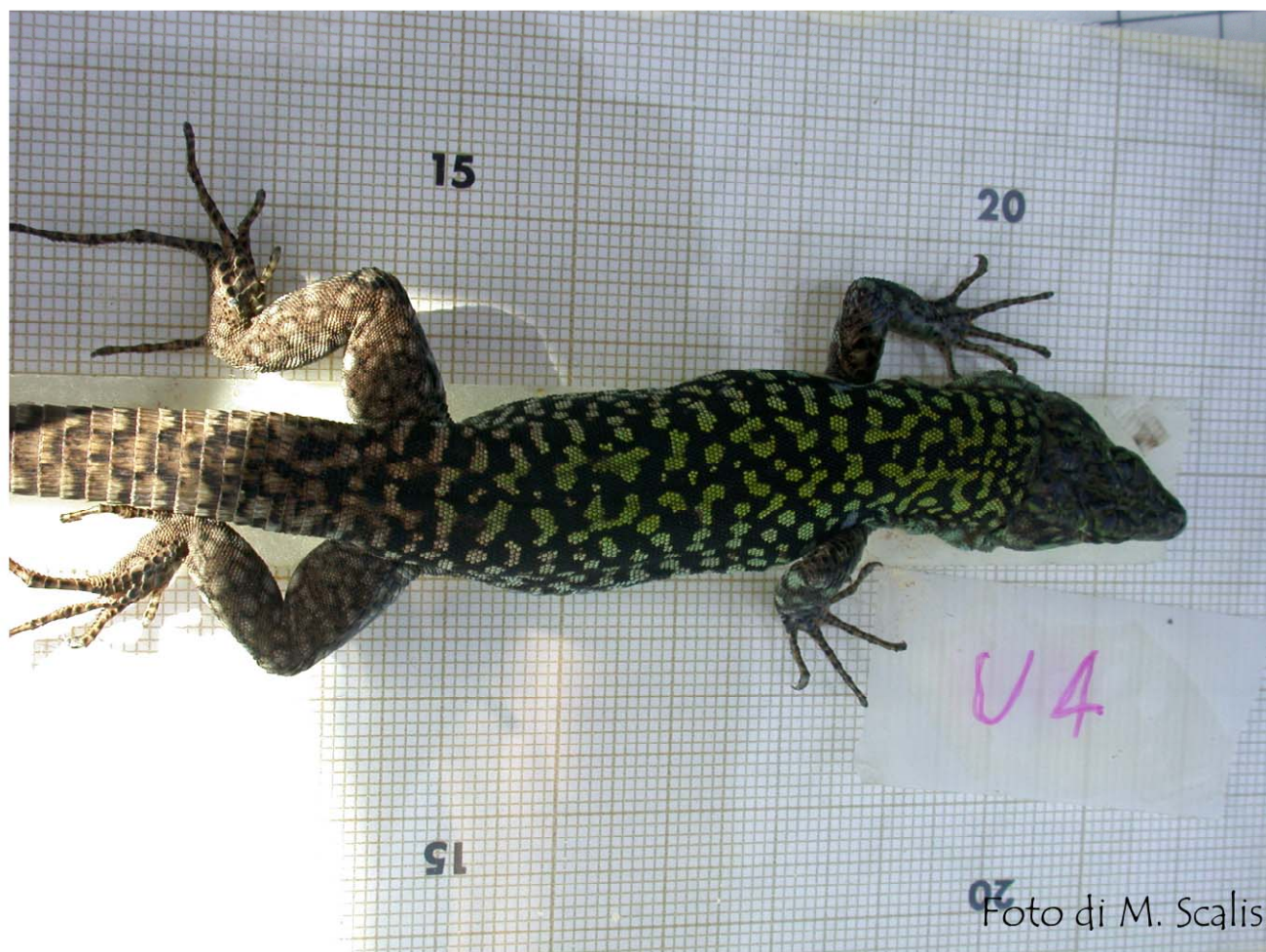
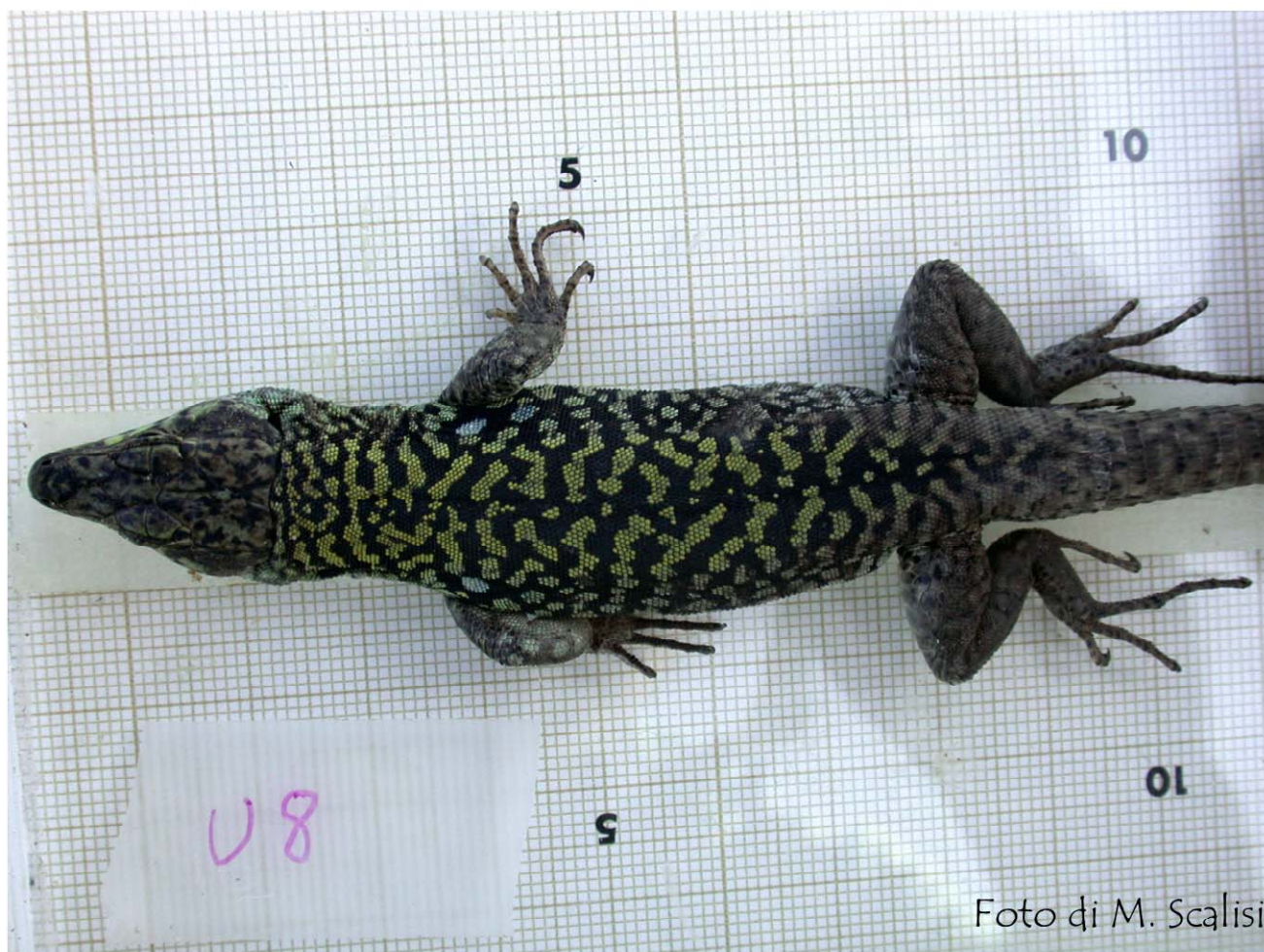


Foto di M. Scalisi

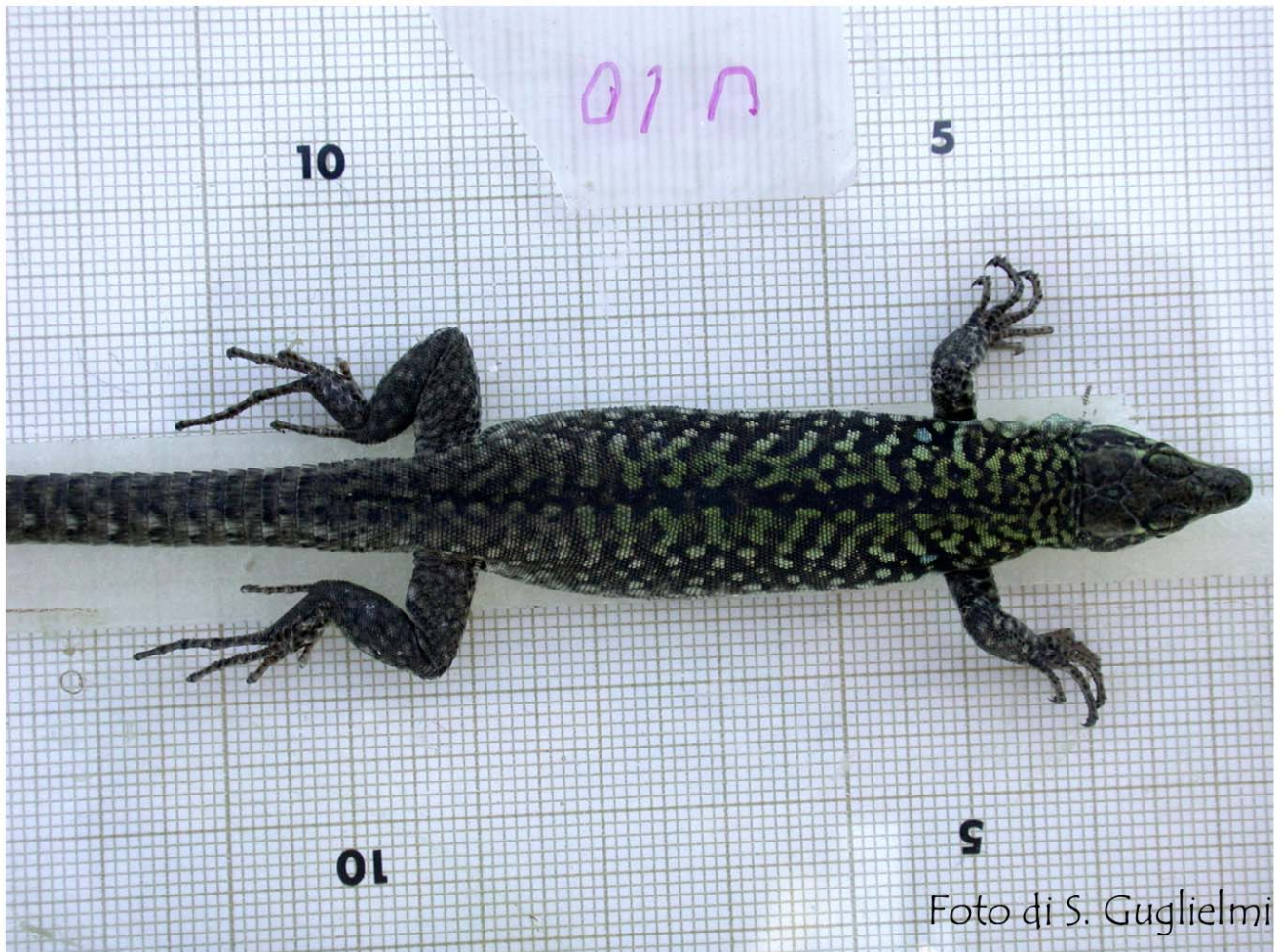
AVC



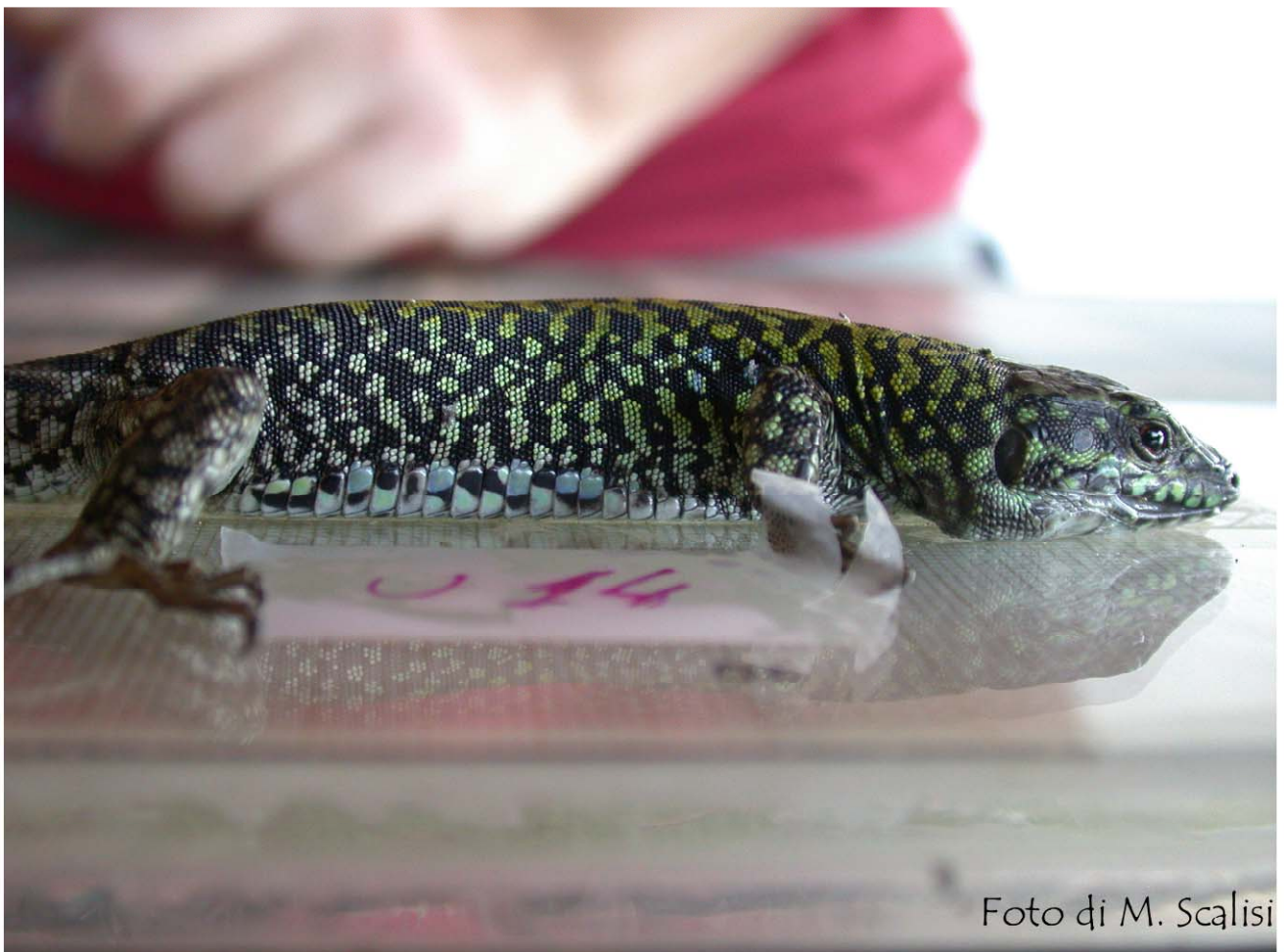
AN1



AN1



Esempio di difficile interpretazione tra due classi di fenotipi dorsali



Esempio di difficile interpretazione del fenotipo del fianco



Foto di S. Guglielmi

Isola di Cirella



Foto di A. Attisano

Isola di Licosa



Foto di S. Guglielmi

Un collaboratore in fase di cattura



Foto di A. Della Paolera

un individuo in attesa del campionamento bometrico



Una femmina mostra sul ventre i morsi dei maschi, segni di precedenti accoppiamenti



Un maschio espone gli emipeni



Foto di S. Guglielmi

Una ricrescita laterale ha creato una coda ad Y



Foto di S. Guglielmi

evidente melanismo di *Podarcis sicula klemmeri*



Foto di S. Guglielmi

maschio melanico, dell'isola di Licosà P. s. klemmeri



Foto di M. Ruocco

due individui di Licosà escono per mangiare biscotti

