

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



**DOTTORATO IN BIOLOGIA AVANZATA
XX CICLO**

**Struttura clonale e filogeografia del muschio di ambiente
Mediterraneo *Pleurochaete squarrosa*:
valutazione mediante marcatori nucleari e plastidiali**

Dr. Stefano Terracciano

TUTOR

Ch.ma Prof.ssa

Simonetta Giordano

COORDINATORE

Ch.ma Prof.ssa

Silvana Filosa

ANNO ACCADEMICO 2006/2007

INDICE

INTRODUZIONE

BRIOFITE

<i>Caratteristiche generali</i>	pag. 4
<i>Riproduzione e ciclo ontogenetico</i>	pag. 6
<i>Distribuzione ed ecologia</i>	pag. 8
<i>Life strategies e biologia riproduttiva</i>	pag. 10

GENETICA DI POPOLAZIONE NELLE BRIOFITE

<i>Introduzione</i>	pag. 12
<i>Biodiversità</i>	pag. 13
<i>Flusso Genico</i>	pag. 16
<i>Speciazione criptica</i>	pag. 19
<i>Struttura clonale</i>	pag. 20
<i>Frammentazione dell'habitat</i>	pag. 21
<i>Filogeografia</i>	pag. 23

MARCATORI MOLECOLARI

<i>ISSR</i>	pag. 27
<i>Regione plastidiale trnL</i>	pag. 29

PROGETTO	pag. 31
-----------------	---------

MATERIALI E METODI

LA SPECIE *Pleurochaete squarrosa* pag. 33

CAMPIONAMENTO

Campionamento su piccola scala pag. 35

Campionamento su scala locale – Punta Tresino pag. 35

Campionamento su ampia scala geografica in Europa pag. 36

ESTRAZIONE DEL DNA pag. 38

ISSR

Protocollo di amplificazione pag. 39

Analisi dei dati ISSR pag. 40

SEQUENZIAMENTO del *trnL*

Protocollo di amplificazione e sequenziamento pag. 42

Analisi sequenze pag. 44

RISULTATI E DISCUSSIONE

STRUTTURA CLONALE pag. 45

VARIABILITÀ GENETICA pag. 50

STRUTTURA GEOGRAFICA pag. 55

FILOGEOGRAFIA pag. 59

CONCLUSIONI pag. 64

FIGURE pag. 66

BIBLIOGRAFIA pag. 75

INTRODUZIONE

BRIOFITE

Caratteristiche generali

Le Briofite sono le più semplici piante fotosintetizzanti che siano riuscite a vivere fuori dall'acqua. Risalgono al Devoniano (più di 400 milioni d'anni fa) i più antichi fossili somiglianti alle Briofite e fossili sicuramente ascrivibili ad esse vivevano almeno 370 milioni d'anni fa. I primi fossili identificabili come muschi risalgono al Permiano (280 milioni di anni fa).

Dalla filogenesi ancora incerta, le Briofite presentano caratteristiche biochimiche come sostanze di riserva (amido) e pigmenti fotosintetici (clorofilla a come pigmento fotosintetico primario, clorofilla b e carotenoidi come pigmenti accessori) riscontrabili solo nelle clorofite e fra queste le Briofite sono più simili alle Charophyceae. Negli schemi tradizionali di organizzazione tassonomica dei vegetali, le briofite (dal greco βρυόν = muschio) costituiscono una divisione, Bryophyta, che comprende le classi: Bryopsida (muschi propriamente detti), Marchantiopsida (epatiche) e Anthocerotopsida (antocerote). Sono riconosciute come un'entità monofiletica, ma le relazioni tra i tre gruppi sono ancora argomento di studio (Hedderson et al., 1998; Lewis et al., 1997; Nickrent et al., 2000; Renzaglia et al., 2000). Recenti studi (Goffinet, 2000) hanno dimostrato che il gruppo delle briofite non è monofiletico, ma parafiletico, ciò ha portato all'elevazione di ciascuna delle singole classi al rango di divisione: Bryophyta (muschi), Marchantiophyta (epatiche), Anthocerophyta (antocerote). Non c'è comunque, nessun dubbio che ognuna delle tre classi di briofite sia monofiletica. Esistono due probabili ipotesi sulla storia evolutiva delle piante: secondo la prima ipotesi, le epatiche furono le prime a divergere, seguite dalle antocerote, mentre i muschi sono relativamente più vicini alle

piante vascolari. Nel secondo schema sono invece le antocerote a divergere per prima, seguite dalle piante vascolari, mentre muschi ed epatiche sono filogeneticamente più vicini.

Le briofite sono piante con organizzazione morfo-anatomica molto semplice, per molti aspetti intermedie tra tallofite e cormofite. Il loro corpo vegetativo può essere talloso (a forma di nastro appiattito, simile a quello di molte alghe), o cormoide, cioè somigliante a quello delle piante superiori, presentando una porzione assile chiamata fusticino, delle appendici espanse sessili, chiamate foglioline e dei filamenti che consentono l'attacco al substrato, chiamati rizoidi. Le briofite non posseggono comunque mai un vero corno, cioè non dispongono di apparati strutturalmente complessi che costituiscono il fusto, le foglie e le radici, rispetto ai quali cauloidi, filloidi e rizoidi presentano soltanto qualche analogia strutturale e funzionale.

Nell'ambito della vegetazione briofitica, i muschi costituiscono la classe più cospicua con circa 10000 specie.

Il gametofito dei muschi è sempre articolato in foglioline e fusticino ed è fissato al substrato tramite rizoidi ramificati e pluricellulari. Le foglioline possono essere mono o bistratificate e possono avere una nervatura mediana (di lunghezza variabile a seconda della specie) che non è mai in collegamento con un eventuale apparato di conduzione del fusticino. In diverse specie si trovano 2 tipi di cellule costituenti le foglioline: clorocisti disposte in file longitudinali con funzione fotosintetica e ialocisti con citoplasma degenerato, adatte all'assorbimento e all'immagazzinamento di acqua.

In alcuni muschi sono presenti tessuti semplici adibiti al trasporto di acqua e fotosintati. Gli idroidi, per la conduzione di acqua e sali minerali, sono costituiti da cellule allungate con pareti trasversali inclinate molto permeabili all'acqua. Tali cellule alla fine del loro sviluppo sono prive di nucleo e citoplasma, non sono lignificate e non hanno quindi funzione di sostegno. Attorno ad essi ci sono i leptoidi, cellule allungate e vive, con nucleo e citoplasma regrediti, che

provvedono alla conduzione dei fotosintati. Questi tessuti hanno analogia solo funzionale con xilema e floema delle piante superiori, ma solo un'omologia.

Riproduzione e ciclo ontogenetico

Il ciclo ontogenetico dei muschi è aplo-diplonte eteromorfo ossia presenta l'alternanza di una generazione aploide e una diploide diverse sia nella funzione riproduttiva sia nell'aspetto. La generazione aploide prende il nome di gametofito perché è quella che produce i gameti. La generazione diploide è invece denominata sporofito perché produce, appunto, spore. Il gametofito è la generazione dominante, è autotrofo e conduce una vita indipendente, mentre lo sporofito, di dimensioni generalmente più ridotte, presenta una vita più breve e rimane attaccato al gametofito da cui viene per lo più nutrito (gonotrofia).

Il ciclo ontogenetico ha inizio con la germinazione delle spore aploidi. Da esse si origina, in condizioni di umidità favorevole, una struttura giovanile, il protonema, dalla quale si sviluppano in seguito le singole piantine che costituiscono i gametofiti. Questi producono per mitosi, da gametangi ricoperti da pareti pluricellulari, gameti maschili (dagli anteridi) e femminili (dagli archegoni). Anteridi e archegoni possono essere formati dallo stesso gametofito in specie monoiche (omotalliche o bisessuali) o da gametofiti diversi in specie dioiche (eterotalliche o unisessuali) che portano anteridi o archegoni e che raramente presentano dimorfismo sessuale. Le briofite sono per lo più dioiche, la condizione monoica è più frequente negli ambienti in cui la disponibilità di acqua è limitata. Inoltre le specie monoiche sono caratterizzate da una minore variabilità genetica intra-specifica, rispetto alle dioiche perché mostrano di frequente fenomeni di autofertilizzazione (Wyatt et al., 1989b).

A maturità gli anteridi, di forma sferica o a clava sorretti da un corto peduncolo, liberano numerosi spermatozoidi biflagellati. Il rilascio avviene quando, per la presenza di pioggia o rugiada, un velo d'acqua copre le piantine, cosicché gli

anterozoidi possano nuotare e raggiungere gli archegoni. Questi, generalmente a forma di fiasco, a maturità si aprono all'apice e così gli anterozoidi possono penetrare nel loro collo, nel quale le cellule si sono gelificate e, attirati da sostanze chemiotattiche, nuotare fino all'unica ovocellula affinché uno di essi la fecondi. La fusione dei gameti porta alla formazione dello zigote; da questo inizia lo sviluppo della generazione diploide, che attraverso lo stadio embrionale, racchiuso e nutrito dall'archegonio, forma lo sporofito.

Esso è generalmente costituito da una parte basale, chiamata piede (austorio), che penetra nei tessuti del gametofito, da un peduncolo (seta), e all'apice di questo, da uno sporangio (capsula), una struttura specializzata nella formazione delle spore. La capsula può avere all'apice un opercolo che cadendo, grazie a movimenti igroscopici, permette la fuoriuscita delle spore che si sono formate per meiosi.

La riproduzione sessuale non avviene regolarmente e vi sono specie che formano sporofiti frequentemente, specie che sporificano di rado e specie che non sporificano affatto. In generale le specie monoiche presentano una maggior produzione di sporofiti rispetto alle specie dioiche. In queste ultime, infatti, può succedere che le piantine di sesso opposto si trovino ad una distanza tale da non consentire agli spermatozoidi, i quali possono nuotare solo per pochi centimetri, di arrivare all'ovocellula. Particolari meccanismi in alcune specie, come anteridi sulla superficie del tallo o portati su speciali ricettacoli, permettono la fecondazione a distanze maggiori, attraverso la pioggia. In questi casi, infatti, le gocce di pioggia, cadendo sugli anteridi aperti, si caricano di anterozoidi e danno luogo ad una serie di minuscole goccioline che si disperdono radialmente, consentendo agli anterozoidi di raggiungere distanze maggiori e diversi livelli di altezza.

Oltre alla riproduzione sessuale appena descritta, le briofite possono riprodursi anche asessualmente. Anche se sono stati descritti fenomeni di riproduzione vegetativa a partire da tessuti diploidi, generalmente è il gametofito ad andare

incontro a riproduzione asessuale (vegetativa), dando luogo a nuove generazioni aploidi. Nuove piantine possono originarsi da frammenti di tallo, foglioline, fusticini, rizomi in molte specie briofitiche. La riproduzione vegetativa può avvenire anche tramite propaguli (gemme) che si formano all'ascella fogliare o al loro apice, formati da una o poche cellule specializzate e che germinando danno origine a protonemi, o si accrescono direttamente in nuovi gametofiti. La riproduzione vegetativa consente di avere in tempi brevi un numero molto elevato di individui figli e viene spesso utilizzata dalle briofite, che sono organismi pionieri, quando vi sono ambienti liberi da colonizzare.

I muschi possono essere divisi per forma di crescita in due grandi gruppi: gli acrocarpi e i pleurocarpi. La distinzione è basata principalmente sulla posizione degli apparati riproduttivi femminili e quindi dello sporofito. Nei muschi acrocarpi gli sporofiti sono terminali, ossia, portati all'estremità dei fusticini o dei rami principali. Nei pleurocarpi gli sporofiti sono su brevi rametti laterali. Inoltre le colonie di muschi acrocarpi sono generalmente poco ramificate e i singoli gametofiti hanno portamento eretto mentre i pleurocarpi hanno fusticini molto ramificati e con portamento per lo più strisciante.

Distribuzione ed ecologia

Le briofite sono ampiamente diffuse in tutti i continenti. Anche se di struttura semplice, hanno sviluppato notevoli strategie adattative che hanno permesso loro di colonizzare i più disparati ambienti e sopravvivere nelle condizioni più estreme. Le troviamo dalle zone artiche fino ai tropici, dagli ambienti fortemente illuminati a quelli in piena ombra, dagli ambienti aridi a quelli acquatici, dove ci sono specie che vivono sommerse anche a profondità notevoli, solo in acqua dolce. Sono presenti nel sottobosco di foreste, su rocce (epilitiche), su terreno, su foglie (epifille), su tronchi e rami di albero (epifite).

Nei climi alpini e polari, assieme ai licheni, costituiscono la vegetazione

dominante. Qui la ricchezza in specie è determinata dal periodo di persistenza della neve sul substrato. Nelle zone temperate costituiscono una componente importante della vegetazione di sottobosco, ma è nelle foreste tropicali che si osserva la maggiore biodiversità e rigogliosità. Nei climi aridi e semiaridi generalmente la biodiversità è inferiore e le specie crescono in zone dove si creano microclimi più accoglienti, ad esempio nelle fessure delle rocce, o in luoghi generalmente ombreggiati. Molte sono le specie che hanno adattato il proprio ciclo biologico alla disponibilità di acqua limitata nel tempo, riducendo lo sviluppo vegetativo e trascorrendo la stagione secca sotto forma di spore o gemme sotterranee.

Le briofite, assieme a licheni ed alghe, sono organismi pionieri nella colonizzazione di nuovi ambienti, essendo capaci di crescere su substrati rocciosi nudi, avviando il processo di alterazione e disgregazione delle rocce e di formazione del suolo. Le briofite possono rapidamente colonizzare un suolo coperto solo di cenere dopo un incendio e impedirne il dilavamento ad opera degli agenti atmosferici. Generalmente le specie acrocarpe precedono quelle pleurocarpe nelle successioni vegetazionali. La maggioranza delle specie pioniere che si stabiliscono sulla corteccia degli alberi sono epifite obbligate. In seguito, la successione porta alla comparsa di specie epifite facoltative.

Le briofite, fatta eccezione per alcune specie di muschi particolarmente specializzati, prelevano l'acqua direttamente dall'atmosfera con tutto il tallo e assieme ad essa, si assicurano i sali minerali di cui hanno bisogno. In seguito cedono lentamente l'acqua all'atmosfera quando questa diviene secca; in uno stato di disidratazione possono condurre una sorta di vita latente fino a quando la disponibilità d'acqua non è sufficiente per la ripresa delle normali funzioni vitali; dal punto di vista dell'economia idrica si collocano pertanto tra le piante peciloidriche. Per questa loro proprietà intervengono significativamente sul bilancio idrico degli ecosistemi, soprattutto quelli forestali. Un esteso tappeto di muschi trattiene notevoli quantità di acqua per molto tempo, oltre che nelle

cellule, anche nel sistema di canalicoli capillari che si viene a creare tra le diverse parti dei vari gametofiti e tra gametofiti adiacenti. In questo modo si rallenta inoltre il deflusso delle acque piovane difendendo il suolo dal processo di erosione.

Life strategies e biologia riproduttiva

La strategia di vita di una specie o di una popolazione può essere considerata come un insieme di caratteristiche adattative co-evolute (Stearns, 1976). La maggior parte di esse sono comprese naturalmente nell'ambito riproduttivo. Molti modelli sono stati costruiti per cercare di semplificare le differenti strategie possibili. Quello che ha avuto grande influenza sulle linee di pensiero è il modello basato sui concetti di r- e K- selezione (McArthur & Wilson, 1967) e sul continuum tra questi due estremi (Pianka, 1970; Gadgil e Solbrig, 1972). In questo modello unidimensionale, le specie ad r-selezione, in cui sia la velocità riproduttiva sia l'utilizzo delle risorse sono massimizzati, sono contrapposte alle specie a K-selezione, le quali prediligono l'efficienza di utilizzo delle risorse per la sopravvivenza in habitat affollati. Bisogna tuttavia considerare non solo i due estremi, ma anche il continuum che li separa. La r-selezione è stata messa in relazione con habitat instabili e disturbati, la K-selezione, invece, con habitat stabili o caratterizzati da fluttuazioni costanti e prevedibili.

Altri modelli cercano di introdurre un numero più alto di dimensioni ambientali, rispetto al continuum uni-dimensionale r-K.

Un modello bidimensionale è quello proposto da Grime et al. (1990). Esso può essere rappresentato da un triangolo equilatero; sui tre lati sono riportati, in valori percentuali da 0 a 100, i gradienti di disturbo ambientale, di capacità competitiva e di resistenza allo stress. Le condizioni estreme favoriscono nell'ordine specie ruderali, competitrici e resistenti allo stress ambientale. Le categorie riconosciute da questo modello non sono, però, solo queste tre, in

quanto esiste uno spettro continuo in cui si trovano condizioni e quindi anche strategie intermedie. Mentre molte briofite, sulla base di caratteri morfologici, fisiologici e riproduttivi, possono essere definite ruderali o tolleranti, poche di esse possono essere definite competitive in senso tradizionale. In quegli habitat a biomassa ridotta in cui le briofite possono acquisire dominanza sulle altre forme vegetazionali, ciò non avviene per spiccata capacità competitiva delle prime, ma per il determinarsi di condizioni sfavorevoli alle seconde.

Una differente classificazione delle strategie di vita è stata proposta da During (1979; 1992). Essa descrive sei differenti categorie ecologiche per le briofite, sulla base di due principali percorsi evolutivi in cui si contrappongono tendenze antagoniste: longevità del gametofito opposta allo sforzo riproduttivo, grandezza delle spore opposta al numero di spore per sporofito. L'incremento delle risorse destinate alla riproduzione sessuale, comporta dunque una diminuzione della longevità. La produzione di spore è associata alla meiosi e quindi all'insorgenza di nuove combinazioni genetiche, importanti per tutte le specie legate ad habitat instabili e non prevedibili. Le specie perenni presentano una notevole promozione della riproduzione tramite propaguli vegetativi, in quanto essi sono più grandi, ricchi di sostanze nutritive e quindi adatti alla competizione in un ambiente stabile (Longton, 1997).

GENETICA DI POPOLAZIONE NELLE BRIOFITE

Introduzione

Fino alla diffusione delle metodologie molecolari basate sulla tecnica PCR, l'approccio metodologico maggiormente utilizzato per studiare l'ecologia di una comunità briofitica è stato quello descrittivo; esso consiste nel valutare quante e quali specie si rinvenivano in un determinato ambiente, e con quali valori di frequenza e copertura; nel registrare i modelli riproduttivi attuati da ciascuna specie; nel determinare come varia la struttura della comunità in risposta alla variazione dei fattori ambientali e in relazione allo stadio successionale; come coesistono le specie differenti; come una comunità riesce a persistere nel tempo. Più di recente, i progressi tecnologici legati alle metodiche biomolecolari hanno consentito di estrarre il DNA e le proteine a partire da porzioni di tessuto vegetale sempre più piccole, aprendo anche alle briofite la possibilità di essere sottoposte a ricerche su base molecolare. In seguito, lo sviluppo di marcatori molecolari idonei ad effettuare un fingerprinting, e cioè potenzialmente atti a distinguere ciascun organismo nell'ambito della specie, ha stimolato i ricercatori ad intraprendere studi di popolazione su base molecolare anche nelle briofite. Tali studi offrono notevoli potenzialità nella comprensione dell'ecologia di queste crittogame: in primo luogo è possibile osservare se in queste piante i livelli di biodiversità intraspecifica sono paragonabili a quelli trovati nelle tracheofite; e ancora, se nelle briofite con distribuzione intercontinentale vi è una differenziazione molecolare tra le popolazioni disgiunte; se, e in che modo, la biodiversità è correlata a gradienti ecologici; e questo, solo per dare alcuni esempi significativi.

Un contributo significativo all'ecologia molecolare delle briofite viene dalla genetica di popolazione; questa disciplina studia principalmente i cambiamenti spaziali e temporali delle frequenze alleliche all'interno di una popolazione; tali

cambiamenti, essendo determinati da una qualsiasi forza evolutiva (mutazione, ricombinazione meiotica, migrazione, selezione naturale, deriva genetica, cambiamenti nel livello del flusso genico e nelle dimensioni della popolazione) possono fornire dati interessanti sulle dinamiche vegetazionali, sulla biodiversità e sullo stato di salute degli ecosistemi, e predire con buona probabilità le sorti stesse della comunità, implementando la realizzazione di piani idonei alla conservazione di particolari specie e dell'ambiente. Questo tipo di studi permettono valutazioni sull'origine della diversità genetica, su come viene mantenuta, quale è la sua rilevanza evolutivistica ed ecologica.

Biodiversità

La biodiversità può essere considerata come la ricchezza e la varietà di informazioni genetiche che sono presenti nell'ambito di un ecosistema, di una specie oppure di una popolazione. A livello ecosistemico, la biodiversità generalmente fa riferimento al numero di specie presenti. Per quanto riguarda il livello specifico, la biodiversità si riferisce invece a differenze genetiche che esistono tra singoli individui: specie caratterizzate da elevati livelli di biodiversità saranno quindi costituite da individui dotati di informazioni genetiche diversificate in misura più o meno ampia; individui appartenenti a popolazioni dotate di ridotti livelli di biodiversità tenderanno al contrario ad essere simili tra di loro e, quindi, a reagire in maniera sostanzialmente uniforme alle sollecitazioni ambientali. Di conseguenza, la biodiversità viene in questo caso ad essere strettamente collegata con il potenziale adattativo delle popolazioni: più gli individui sono diversi maggiori sono le possibilità che almeno una parte di essi sia in grado di tollerare mutamenti che si verificano nelle condizioni ambientali. Al contrario, la comparsa di un nuovo parassita, oppure la modificazione delle caratteristiche climatiche, potrebbero avere effetti disastrosi se tutti gli individui delle popolazioni risultassero omogenei e carenti

di meccanismi genetici che conferiscono resistenza o tolleranza all'avversità.

L'adozione di tecniche di biologia molecolare, ormai da alcuni anni, ha permesso di approfondire ulteriormente il dettaglio dell'analisi genetica, andando ad analizzare quelli che sono comunemente noti come marcatori molecolari. Si tratta, in pratica, di specifiche sequenze di nucleotidi a livello del DNA. Il loro studio consente di determinare la variabilità genetica, ovviando ai problemi di mascheramento dell'espressione genotipica dovuta ad effetti ambientali.

Dall'analisi genetica è possibile valutare il livello di variabilità genetica presente e quindi il potenziale adattativo della specie che si sta studiando, nonché la struttura genetica della popolazione che fornisce indicazioni sulla sua stabilità genetica, cioè se la popolazione è in equilibrio con l'ambiente nel quale si sviluppa oppure se è in corso un processo evolutivo che porterà, in tempi più o meno brevi, alla modificazione delle sue caratteristiche genetiche. È anche possibile comprendere se i processi riproduttivi (fecondazione incrociata) funzionano regolarmente, garantendo un adeguato scambio genico tra gli individui, oppure se, per svariate cause, è in atto un'anomala tendenza all'autofecondazione, cosa che, nel lungo periodo, potrebbe portare ad un aumento dell'omozigosi e ad un possibile "indebolimento" degli individui.

Mediante l'uso di marcatori molecolari ipervariabili, e quindi potenzialmente in grado di discriminare un individuo in una popolazione, è possibile ottenere una stima della biodiversità tanto più significativa quanto più è elevato il numero di organismi e di popolazioni esaminate. La variabilità genetica, infatti, non è un parametro fisso per ciascuna specie, ma spesso mostra valori differenti nelle diverse popolazioni, in relazione alle condizioni microambientali.

Cummins e Wyatt (1981) hanno inizialmente descritto le briofite come piante considerate tradizionalmente lente nell'evoluzione, relitte da ere geologiche passate, nelle quali predomina la riproduzione asessuata e si osserva una scarsa variabilità genetica. Successivamente mediante l'uso dei marcatori isoenzimatici

è stato dimostrato che le briofite, ed in particolare i muschi, hanno livelli di variabilità genetica comparabili a quelli delle tracheofite (Stoneburner et al., 1991; Wyatt et al., 1989a e b). Più di recente, anche utilizzando altri marcatori, è stata confermata nei muschi una variabilità genetica molto maggiore di quella attesa per organismi aventi fase apolide dominante (Wilson & Provan, 2003; Spagnuolo et al., 2007a).

Gli studi di popolazione condotti sulle briofite inizialmente si sono avvalsi principalmente degli isoenzimi e del sequenziamento di regioni del genoma. In entrambi i casi, i risultati ottenuti spesso evidenziano livelli di variabilità molto diversi nelle differenti specie. Il sequenziamento diretto degli spaziatori interni trascritti del DNA ribosomale (ITS) ha rivelato alta variabilità tra popolazioni di *Mielichhoferia elongata* e *M. mielichhoferiana* (Shaw, 2000a), variabilità che include sia sostituzioni di singoli nucleotidi, che inserzioni e delezioni. D'altra parte, gli stessi spaziatori in 25 popolazioni di *Sphagnum magellanicum*, distribuite dal Cile all'Alaska, hanno sequenze praticamente identiche (Shaw, 2000b). Di più recente utilizzo nelle briofite sono i marcatori ISSR (internal simple sequence repeat), e analogamente a quanto detto per le sequenze, anche gli ISSR hanno evidenziato nei muschi la coesistenza di livelli di variabilità molto eterogenei; in particolare, due specie accomunate da crescita clonale, *Pleurochaete squarrosa* e *Sphagnum angermanicum*, mostrano livelli di variabilità genetica molto diversi: nella prima infatti, sono stati trovati 73 aplotipi su 75 gametofiti raccolti in due località della Campania (Spagnuolo et al., 2007a); nella seconda invece, sono stati identificati solo 28 aplotipi, dei quali uno rappresenta il 50% di tutti i gametofiti, ed è presente in tutte le popolazioni, su un totale di 128 gametofiti campionati in 11 popolazioni (Gunnarsson et al., 2005).

Nelle Briofite la diversificazione genetica intra-specifica è stata correlata essenzialmente a tre eventi: la riproduzione sessuata, la mutazione somatica e il

recruitment (cioè l'ingresso di nuovi organismi nella colonia, sotto forma di spore o di propaguli) (Skotniki et al., 1998 e 1999; Cronberg, 2002).

A tale riguardo, la mutazione somatica è stata suggerita per spiegare i livelli elevati di variabilità genetica nel muschio antartico *Sarconeurum glaciale* (Skotniki et al., 1999), che non effettua riproduzione sessuata. In *Bryum argenteum* le popolazioni antartiche, non sporificanti, mostrano livelli di variabilità genetica, valutata con primer RAPD (random amplified polymorphic DNA), paragonabili alle popolazioni che crescono e sporificano in regioni temperate dell'Australia e della Nuova Zelanda; gli autori ipotizzano che tale variabilità sia sostenuta dalla stessa riproduzione vegetativa, e quindi dalla dispersione di frammenti del gametofito, oltre che dalla mutazione somatica (Skotnicki et al., 1998). Per quanto riguarda invece il recruitment, Cronberg (2002) ha osservato che la variabilità genetica è relativamente bassa quando il recruitment ha luogo solo durante la fase iniziale di insediamento di una colonia, mentre elevati livelli di variabilità si osservano quando il recruitment si protrae durante le fasi di sviluppo e crescita della colonia, successive all'insediamento. La durata del recruitment è condizionata da vari fattori: la sporificazione, la produzione di propaguli, la disponibilità dello spazio fisico necessario all'attecchimento di nuovi organismi. In tutti i casi, l'ingresso di nuovi organismi in una colonia è uno dei meccanismi alla base dell'incremento del flusso genico, oltre a determinare un aumento della fitness, poiché gli immigranti possono sia apportare alleli nuovi, che aumentare la frequenza di alleli rari, incrementando comunque la variabilità genetica della popolazione.

Flusso genico

Diversi autori, hanno puntualizzato che nelle briofite il flusso genico risultante dalla dispersione dei gameti appare piuttosto limitato (Longton, 1976 e 1994; Wyatt, 1982). La maggior parte delle stime suggeriscono che la fecondazione si

attua entro uno spazio di 10 cm (Longton, 1976). La dispersione degli spermatozoidi può raggiungere maggiori distanze quando vi sono strutture specializzate: nelle *Polytrichaceae* le foglie perigoniali formano una coppa discoidale che spruzza a distanza gli spermatozoidi. In taxa come *Fontinalis*, che rilascia i gameti in acqua fluente, il potenziale di esoincrocio può raggiungere valori considerevoli. Per quanto riguarda le spore, anche esse per la maggior parte cadono entro 1 o 2 metri dallo sporofito parentale, ma una piccola percentuale, piccola ma significativa, può potenzialmente viaggiare per distanze anche lunghe prima di attecchire e sviluppare un nuovo protonema (Mc Daniel & Shaw, 2003 e 2005). La dispersione delle spore e forse anche dei gameti, può essere molto maggiore nei muschi epifiti, anche se la densità dei forofiti può condizionare l'ampiezza del raggio di dispersione (Spagnuolo et al., 2007b). Tuttavia, alcune evidenze suggeriscono una scarsa diversificazione genetica nelle briofite epifite. In uno studio condotto in Scandinavia su *Orthotrichum speciosum* e *O. obtusifolium* (Snäll et al., 2004), due muschi epifiti raccolti sulla corteccia del pioppo, e analizzati mediante marcatori AFLP (amplified fragment length polymorphism), è emerso che in entrambe le specie coefficienti di parentela (coefficient of kinship) significativi sono riscontrati tra individui che distano non più di 300-350 metri, indicando in questi valori della distanza il limite dell'intervallo di dispersione. Le due specie inoltre, mostrano livelli di variabilità genetica piuttosto bassi, confermando la scarsa diversificazione genetica già evidenziata per le briofite epifite. Tali livelli di variabilità sono anche simili nelle due specie, pur essendo caratterizzate da diverse modalità riproduttive; in particolare *O. speciosum* è monoico, probabilmente attua autofecondazione e si disperde solo mediante spore; mentre *O. obtusifolium* è dioico e si riproduce mediante spore ma anche gemme prodotte sulla superficie dei filloidi. Questo dato suggerisce che non sempre le modalità riproduttive trovano una correlazione con la variabilità, e, ancora una volta pone l'accento

sull'esistenza, nelle briofite, di dati spesso contraddittori e difficilmente riconducibili ad un modello unico.

Studi molecolari su scala molto ampia hanno dimostrato che in alcune specie di muschi vi è scarso o assente differenziamento genetico tra popolazioni a livello intercontinentale (Derda & Wyatt, 1990; Shaw & Schneider, 1995). Se tale situazione rifletta una effettiva ampia dispersione di spore soffiate dal vento, oppure un tasso evolutivo molto basso, è un argomento molto interessante per i briologi.

Grazie a metodi filogenetici è stato evidenziato, in uno studio condotto su base intercontinentale sul muschio cosmopolita *Ceratodon purpureus* (McDaniel & Shaw, 2005), un flusso genico su lunga distanza tra le popolazioni dei due emisferi. L'ipotesi di un flusso genico intercontinentale non è nuova per le briofite; gli stessi autori infatti (McDaniel & Shaw, 2003), già in precedenza avevano ipotizzato il trasporto delle spore su lunga distanza in *Pyrrhobryum mnioides*; pertanto, il fatto che una piccola, ma talvolta significativa aliquota di spore possa viaggiare ricoprendo lunghe distanze prima di attecchire e sviluppare un nuovo protonema, costituisce un determinante di importanza rilevante nella struttura genetica di una popolazione.

Uno studio condotto su tre specie di muschi, mediante un'analisi sia morfologica che molecolare attraverso il sequenziamento della regione ITS in popolazioni provenienti dal Vecchio e dal Nuovo Mondo, ha evidenziato uno scarso differenziamento interspecifico (Shaw et al., 2003a). Considerando che la divergenza (a livello continentale) può essere datata a più di 20-25 milioni di anni fa, una recente dispersione a lunga distanza è un'ipotesi più plausibile, piuttosto che un'antica distribuzione delle specie che supporrebbe un tasso di mutazione troppo lento.

Speciazione criptica

Una opposta tendenza è stata invece osservata in diversi studi: scarso differenziamento morfologico a fronte di un'alta diversità molecolare, cioè la presenza di specie criptiche. Uno studio condotto mediante AFLP sul muschio *Grimmia levigata*, caratterizzato da scarsa variabilità morfologica, ha evidenziato la presenza, in California, di popolazioni costituite da due distinte specie criptiche geograficamente sovrapposte (Fernandez et al., 2006), individuando due cladi con una distanza genetica pari a 0.61. *Conocephalum conicum* consiste almeno di 6 specie criptiche, con valori reciproci di identità genetica compresi tra 0.2 e 0.6 (Odrzykoski & Szweykowski, 1991; Akiyama & Hiraoka, 1994); in un recente studio, nuove evidenze morfologiche hanno portato al riconoscimento di due specie *C. conicum* e *C. salebrosum* (Szweykowski et al., 2005). *Pellia endiviifolia* consta di 4 specie criptiche: 2 in Europa, 1 in Asia e 1 in Nord America (Zielinski, 1987). L'analisi isoenzimatica indica che *Mielichhoferia elongata* consta di due popolazioni distinte: una tipica del Nord America, e l'altra presente sia in Nord America che in Europa (Shaw & Schneider, 1995); tuttavia, nessuna delle due popolazioni mostra differenze alleliche fissate. Le stesse due popolazioni però, sono fissate per sostituzioni nucleotidiche nell'rDNA e l'analisi filogenetica dimostra che si tratta di due cladi mutualmente monofiletici inclusi in *M. elongata*, e cioè di 2 specie criptiche (Shaw, 2000a). Una simile situazione è quella di *Fontinalis antipiretica*: la specie è costituita da 2 popolazioni (specie criptiche), Nord Americana ed Europea, morfologicamente indistinguibili, ma che hanno fissato sostituzioni nucleotidiche sia nell'rDNA che nel DNA plastidiale (Shaw & Allen, 2000). La presenza di 2 specie criptiche è stata anche suggerita per il muschio epifita *Neckera pennata* (Appelgren & Cronberg, 1999); analizzando mediante elettroforesi 12 loci enzimatici in 15 popolazioni svedesi di questo muschio, sono stati trovati 7 genotipi distinti in 2 gruppi tra i quali vi è una

identità genetica paragonabile ai valori ritrovati tra differenti specie incluse nel genere *Neckera*.

Struttura clonale

Uno dei fattori che influisce in modo significativo sui modelli di incrocio è la copertura fisica di un genet, e cioè la struttura clonale. In *Climacium americanum* la separazione tra gametofiti maschili e femminili impedisce la formazione degli sporofiti, portando alla formazione di cloni per riproduzione vegetativa (Meagher & Shaw, 1990). Anche gli estesi tappeti di *Polytrichum* sono spesso formati da settori contigui maschili e femminili e gli sporofiti si formano solo nelle aree ove sono presenti entrambi i gametofiti (Longton & Greene, 1967). Un caso estremo è quello di *Scopelophila cataractae*: in Nord America vi sono sia popolazioni maschili che femminili, ma esse sono sempre disgiunte quindi non sporificano (Shaw, 1993). Anche se la diversità genetica in molte briofite è sostanziale, l'efficacia della crescita clonale è evidente. Considerando le specie per le quali sono stati analizzati almeno 10 loci isoenzimatici, si riscontra che la percentuale di gametofiti fissati per un solo genotipo di un singolo isoenzima multilocus è il 70% in *Climacium americanum* (Meagher & Shaw, 1990), il 50% in *Mielichhoferia elongata* e il 100% in *Mielichhoferia mielichhoferiana* (Shaw & Rooks, 1994; Shaw & Schneider, 1995; Shaw, 2000a). L'effetto della crescita clonale è particolarmente interessante nelle paludi, dove alcune specie di *Sphagnum* possono addirittura coprire ettari. L'analisi isoenzimatica di 100 gametofiti di *S. rubellum* raccolti in una palude ha condotto all'identificazione di 7 aplotipi, due dei quali, da soli, coprivano il 66% delle piante (Shaw & Srodon, 1995). Questi studi provano che il fenomeno della crescita clonale, e la conseguente disomogeneità tra le frequenze alleliche, spesso nelle briofite può produrre effetti maggiori rispetto

al flusso genico che, al contrario, tende a rimescolare i genotipi omogeneizzando le loro frequenze all'interno delle popolazioni.

Va anche detto però, che non sempre la crescita clonale determina la formazione di genet distinti, identificabili come unità fisiche compatte; infatti, accanto a muschi come *Sphagnum* sp. o *Polytrichum* sp., vi sono specie che, a causa delle diverse modalità di crescita, tendono a formare genet frammentati in tante piccole unità. Nel muschio *Hylocomium splendens* (Cronberg et al., 2006) i differenti patches sono occupati da differenti sets di genets. La popolazione locale può essere descritta come un numero di patches di dimensioni limitate, ognuno dominato da un piccolo numero di cloni più o meno mescolati.

Un indicazione molecolare rilevante per stabilire se in una popolazione prevale la crescita clonale o la riproduzione sessuale si ottiene calcolando il grado di associazione tra i loci; se infatti è prevalente la crescita clonale, si avrà un'associazione elevata, se invece c'è riproduzione sessuale, l'associazione tra i loci avrà un valore piccolo a causa della ricombinazione meiotica (Hassel et al., 2005). L'indice più utilizzato per questa valutazione è il Multilocus linkage disequilibrium (r_d , Agapow and Burt, 2001), una modificazione dell'Indice di Associazione (I_A , Brown et al., 1980; Maynard Smith et al., 1993; Haubold et al., 1998) atta a rimuovere la dipendenza del valore dal numero di loci.

Frammentazione dell'habitat

Una delle principali minacce per la biodiversità è l'alterazione, la perdita e la frammentazione di habitat causata dai profondi cambiamenti del territorio condotti ad opera dell'uomo.

Frammentazione indica il processo di parcellizzazione di un territorio in sottoaree tra loro parzialmente connesse o totalmente isolate, così che gli habitat adatti ad una specie risultano distribuiti sul territorio a "macchia di leopardo". La frammentazione è dovuta sia alla perdita di habitat originari che alla

costruzione di barriere (quali strade, linee elettriche, canali artificiali). È utile introdurre il concetto di *patch* (termine inglese che vuol dire “chiazza”), con il quale si intende un'area che presenta condizioni ambientali omogenee. La frammentazione, quindi, ha l'effetto di ridurre le dimensioni dei *patches* e aumentare la distanza, e quindi l'isolamento, tra *patches* simili. Questo processo può anche modificare la qualità degli habitat rimasti e aumentare il disturbo causato da attività antropiche. *Patches* di ambienti naturali di per sé non alterati ma circondati da paesaggi modificati possono risultare non più adatti per certe specie. Queste sottopopolazioni sono ovviamente meno consistenti di quella originale e risultano, quindi, più vulnerabili alle fluttuazioni climatiche naturali, ai fattori di disturbo antropico, a possibili epidemie e al deterioramento genetico dovuto a inincrocio. In sostanza ciascuna di queste sottopopolazioni è sottoposta ad un maggior rischio di estinzione e l'assenza di contatto tra i vari *patches* impedisce o rallenta la ricolonizzazione di un'area in cui la popolazione si sia estinta. La specie corre perciò il rischio di sparire da un numero sempre maggiore di *patches* finché le probabilità di ricolonizzazione diventano praticamente nulle e la specie si può considerare estinta su tutto il territorio.

Le cime delle montagne, i tronchi caduti, le chiazze di vegetazione o, meno intuitivamente, le regioni di temperatura o umidità ottimale per una specie, sono tutte isole per gli organismi appropriati.

Un ulteriore problema che ha rilevanza nella frammentazione di un'area in sottoaree è l'aumento della lunghezza totale dei confini, il cosiddetto edge effect. Nelle zone al margine il cambiamento delle condizioni microclimatiche, come l'aumento delle temperature, l'aumento della radiazione solare, in molti casi la diminuzione dell'umidità ambientale (Kapos et al., 1997; Laurance et al., 2001), associato con l'esposizione a differenti condizioni delle matrici circostanti, impatta con la crescita di molte specie vegetali (Zartmann & Shaw, 2006).

Uno studio condotto su popolazioni naturali di *Polytrichum commune* (Wilson & Provan, 2003) evidenzia una relazione tra la variabilità genetica e il disturbo

ambientale, rappresentato dal taglio per l'estrazione della torba e dalla frammentazione dell'habitat. Le popolazioni disturbate mostrano una variabilità inferiore rispetto a quelle preservate dal disturbo, e appaiono più strutturate, suggerendo che in esse si avverte già l'azione della deriva genetica.

Risultati analoghi sono stati ottenuti recentemente in uno studio sulla variabilità genetica nel muschio epifita *Leptodon smithii* (Spagnuolo et al., 2007b) che mette a confronto popolazioni urbane con popolazioni provenienti da ambienti remoti. Le popolazioni urbane mostrano livelli di variabilità genetica più bassi, in relazione al maggiore disturbo antropico e alla frammentazione dovuta all'urbanizzazione e alla scomparsa di habitat idonei alla specie.

Molte briofite sono organismi ideali per indagare sia sugli impatti ecologici che evolutivi dell'alterazione dell'habitat. Gli studi biomolecolari di popolazione condotti sulle briofite, risultano ben integrabili con i dati raccolti mediante l'impiego di queste piante come biosensori. E' nota da tempo, infatti, la capacità delle briofite di rispondere ai cambiamenti ambientali come bioindicatori o bioaccumulatori di elementi chimici presenti nell'atmosfera (Giordano et al., 2004).

Filogeografia

La filogeografia si occupa dello studio della distribuzione geografica delle linee genetiche che sono presenti nelle popolazioni all'interno di una specie o in gruppi di specie filogeneticamente vicine. De Candolle (1820) fu il primo autore a proporre che l'attuale distribuzione geografica degli organismi viventi dipende sia da parametri storici che ambientali. In Europa la distribuzione geografica della diversità genetica viene interpretata nel contesto dei cambiamenti climatici del Pleistocene, assumendo che i ripetuti cicli glaciali ed interglaciali abbiano determinato profonde trasformazioni nella distribuzione delle comunità e delle singole specie. Circa trenta anni fa fu scoperto che cambiamenti nell'orbita

terrestre furono le cause fondamentali delle oscillazioni climatiche del Quaternario (Hays et al., 1976). Evidenze paleoecologiche e molecolari suggeriscono che le popolazioni di specie adattate ai climi temperati siano sopravvissute alle glaciazioni in aree rifugio meridionali (regioni Mediterranee ed Europa orientale), acquisendo caratteristiche genetiche peculiari. Nel corso di periodi interglaciali, queste popolazioni hanno ricolonizzato l'Europa centrale e settentrionale, seguendo vie di dispersione che sono ricostruibili tramite l'analisi di specifici marcatori genetici. Da un punto di vista biogeografico l'Europa ha delle caratteristiche distintive peculiari: il mar Mediterraneo a sud costituisce una forte barriera e ha limitato la possibilità del dislocamento meridionale della flora durante i periodi freddi; inoltre l'orientamento est-ovest dei confini delle montagne principali delle Alpi e dei Pirenei ha rappresentato una barriera alla espansione verso nord delle specie durante i periodi caldi. Gli effetti degli anni glaciali sulle specie Europee sono stati esaminati in dettaglio da Hewitt (1999): durante il Quaternario, ogni specie è andata incontro a molte riduzioni ed espansioni, caratterizzate da estinzioni di popolazioni del nord quando la temperatura diminuiva, e da un' espansione verso nord dalle zone rifugio nei periodi interglaciali. Un simile processo di colonizzazione implica successivi *bottlenecks* che possono portare ad una perdita di diversità genetica nelle popolazioni settentrionali, ad eccezione delle specie tolleranti il freddo. Le zone rifugio erano localizzate nelle montagne dell'Europa meridionale e, per il lungo periodo di tempo di permanenza delle specie in Europa, la sopravvivenza in queste zone rifugio potrebbe essere stata importante tanto durante i periodi caldi quanto durante i periodi freddi (Bennet et al., 1991). La scomparsa di specie nelle zone rifugio meridionali durante i periodi caldi potrebbe aver condotto alla completa estinzione di queste classi durante il successivo raffreddamento.

Con il perfezionamento di metodi molecolari è adesso possibile studiare le variazioni a livello geografico usando marcatori molecolari e dedurre così strutture filogeografiche intraspecifiche, in tale contesto si è cercato di applicare

i metodi della biogeografia storica sotto il livello di specie e comparare i vari modelli filogeografici intraspecifici di diverse classi sulla stessa area. Già da tempo diversi studi sono stati pubblicati in questo campo, con l'obiettivo principale di ricercare distribuzioni geografiche concordanti attraverso specie differenti che avrebbero indicato l'influenza di fattori storici. L'analisi filogeografica ha comunque indicato che ogni specie ha la propria storia.

Come documentato grazie ai fossili ritrovati, molte specie durante le glaciazioni del Quaternario trovarono rifugio in Italia, in Spagna e nelle regioni Balcaniche (Petit et al., 2003; Hewitt 1999, 2000, 2004; Vogel et al., 1999). Il ruolo di questi siti come possibili rifugi è supportato anche da recenti ricerche su muschi (Cronberg, 1998; Natcheva & Cronberg, 2003; Van der Velde & Bijlsma, 2003; Hedderson & Nowell, 2006).

Gli studi filogeografici contribuiscono quindi a mettere in evidenza le relazioni esistenti tra la struttura della diversità genetica e i processi migratori avvenuti nel post-glaciale e di conseguenza a comprendere la distribuzione dell'attuale vegetazione in base a processi storici ed evolutivi.

Il Bacino del Mediterraneo rappresenta una interessante area per lo studio dell'evoluzione delle piante, riconosciuta come un *hot spot* di biodiversità globale (Thompson, 2005). Quest'area è caratterizzata da un habitat a mosaico che conserva una ricchezza di specie con un alto valore di endemismo, soprattutto nelle isole. La presenza di acqua agisce da barriera per la dispersione, che causa isolamento genetico e deriva, che porta alla speciazione e all'endemismo (Bittkau & Comes, 2005). I continui isolamenti e ricolonizzazioni non hanno influenzato solo la composizione floristica a Nord delle Alpi ma hanno avuto un grande impatto sulla struttura spaziale delle attuali popolazioni del Mediterraneo stesso.

Le zone rifugio inoltre mostrano un'elevata differenziazione nelle frequenze geniche, ciò potrebbe essere la conseguenza di casuali eventi che portarono a isolamenti, deriva e frammentazione o in alternativa ad una differenziazione

adattativa. Proprio per questi fattori, il Bacino del Mediterraneo rappresenta una interessante area di studio riguardo l'evoluzione delle piante e la struttura spaziale nelle popolazioni di piante. Le analisi filogeografiche delle specie possono sia individuare risultati che riflettono processi storici ormai trascorsi, sia essere influenzate da recenti cambiamenti dovuti all'attività antropica, che ha sicuramente influenzato la distribuzione, le dimensioni, e l'abbondanza dei diversi tipi di habitat, intervenendo sul flusso genico, sulla struttura spaziale delle specie e sulla differenziazione della popolazione (Thompson, 1999).

In un lavoro sull'orchidea *Anacamptis palustris* sulle popolazioni del Mediterraneo (Cozzolino et al., 2003), è stato possibile ricostruire la sua storia filogeografica usando i loci altamente polimorfici delle regioni minisatellitari e microsattellitari del DNA plastidiale. La distribuzione di aplotipi plastidiali, in combinazione con le diverse sequenze microsattellitari e minisatellitari ripetute, mostrano un chiaro quadro filogeografico su larga scala geografica. Le popolazioni di *Anacamptis palustris* del Mediterraneo possono essere divise in quattro lignaggi: uno ovest-Europeo, uno riscontrabile nel Nord-Italia e nel centro-Italia, uno ben isolato nel sud-Italia e infine uno est-Europeo.

Uno studio filogeografico sulle specie con distribuzione simile *Sphagnum fimbriatum* e *Sphagnum squarrosum* in Europa (Szovenyi et al., 2007) mediante l'analisi di tre regioni nucleari, ha individuato due diversi patterns per le due specie in esame. Per *S. fimbriatum* tutte e tre le regioni nucleari supportano la presenza di due cladi uno Atlantico e uno non Atlantico, suggerendo un'area di rifugio per la specie durante la glaciazione sulle coste Atlantiche dell'Europa. Contrariamente per *S. squarrosum* gli aplotipi mostrano tre cladi ma nessuna struttura geografica.

MARCATORI MOLECOLARI

L'analisi della variabilità genetica nell' ambito di una popolazione, può essere effettuata mediante tecniche biomolecolari capaci di rilevare le diversità in regioni di DNA omologhe di individui diversi appartenenti alla stessa specie. Queste tecniche si basano sull' identificazione di specifici loci genomici che in virtù della loro presenza caratterizzano in modo univoco l'individuo a cui appartengono. Queste regioni di DNA, note come marcatori molecolari, non sono necessariamente riferibili all'attività di specifici geni, in quanto possono essere ubicati sia in regioni espresse che in regioni spaziatrici. La misura della variabilità genetica attraverso l'indagine dei marcatori molecolari, prevede l'identificazione delle variazioni nella sequenza nucleotidica dei marcatori stessi ovvero l'analisi dei loro polimorfismi.

Maggiore sarà il numero di polimorfismi associato ad un dato marcatore, migliore ne sarà il potere discriminante, fino a permettere di ottenere un' impronta molecolare (*fingerprinting*) dei singoli individui in esame. La scelta del tipo di marcatore da utilizzare dipende dagli scopi della ricerca e dai mezzi a disposizione.

ISSR

I primi studi in cui sono stati impiegati marcatori ISSR sono stati pubblicati nel 1994 (Zietkiewicz et al., 1994; Gupta et al., 1994). Inizialmente sono stati focalizzati per lo più sulle specie coltivate e hanno dimostrato la natura ipervariabile dei marcatori ISSR e il loro potenziale per studi a livello di popolazione (Wolff et al., 1995; Robinson et al., 1997; Wolfe & Liston, 1998). Per testare l'utilità del metodo nelle popolazioni naturali, Wolfe et al. (1998) hanno riesaminato un complesso ibrido di quattro specie di *Penstemon* (Scrophulariaceae), per il quale erano stati già utilizzati altri tre metodi

molecolari. I loro risultati hanno dimostrato chiaramente l'utilità di questi marcatori per risolvere problemi di ibridazione e di speciazione di ibridi diploidi anche in popolazioni naturali.

La tecnica ISSR permette di ottenere un *fingerprinting* caratteristico, cioè un'impronta molecolare dell'organismo in esame rappresentata da un profilo di bande di amplificazione. Essa è una modifica della tecnica di amplificazione PCR, dalla quale differisce nell'utilizzo di un unico oligonucleotide che funge da primer su entrambi i filamenti; la PCR invece richiede due differenti oligonucleotidi, un forward ed un reverse, la cui sequenza in basi è fissata in base alla regione che si vuole amplificare. I primers ISSR hanno una lunghezza compresa tra 18 e 23 nucleotidi e le loro sequenze sono disegnate all'interno delle regioni microsatellitari, loci ipervariabili che contengono ripetizioni in tandem di 2-5 bp. Quando uno di questi primer riconosce due siti complementari localizzati sulle due eliche ad una distanza di 1-2 kb, esso innesca la reazione di amplificazione della porzione di DNA compresa tra questi due siti. Non è quindi necessaria nessuna conoscenza a priori della sequenza, può essere utilizzata una piccola quantità di DNA (circa 25 ng per reazione), è richiesta una quantità minima di reagenti e i frammenti amplificati possono essere visualizzati rapidamente mediante elettroforesi su gel di agarosio. Le bande prodotte possono essere distinte in due classi: bande polimorfiche o individuo-specifiche e monomorfiche cioè filogeneticamente conservate. I polimorfismi, evidenziati come presenza o assenza di una banda, rappresentano il risultato di mutazioni nei siti di appaiamento del primer, come sostituzioni, inserzioni o delezioni di singoli o pochi nucleotidi, e sono ereditati generalmente come marcatori dominanti (Williams et al., 1990).

I marcatori ISSR mostrano diversi vantaggi rispetto ad altri marcatori molecolari:

- sono ampiamente distribuiti lungo tutto il genoma eucariotico (Condit & Hubbell, 1991; Wu & Tanksley, 1993)

- le regioni microsatellitari o non contengono informazioni o queste sono funzionalmente non importanti. Le bande ISSR rappresentano quindi marcatori neutrali in grado di evolversi rapidamente, e la ipervariabilità delle regioni microsatellitari potrebbe fornire stime più alte di diversità genetica rispetto ad altri marcatori che presentano costrizioni funzionali (Zietkiewicz et al., 1994; Parsons et al., 1997; Li & Ge, 2001).

I marcatori ISSR sono oggi molto utilizzati per studi di variabilità genetica (Deshpande et al., 2001; Barth et al., 2002; Hassel et al., 2005; Gunnarsson et al., 2005; Spagnuolo et al., 2007a-b) per definire la struttura clonale (Esselman et al., 1999; Spagnuolo et al., 2007a) e nel rilevare relazioni tassonomiche a livello di specie e sottospecie. Sono usati per studiare relazioni tassonomiche, quando i marcatori tradizionalmente impiegati non forniscono il necessario livello di polimorfismo. In diversi studi hanno fornito un quadro più chiaro delle relazioni tra specie congeneriche strettamente correlate (Blair et al., 1999; Huang & Sun, 2000; Hao et al., 2002; Vanderpoorten et al., 2003). I marcatori ISSR devono comunque essere usati con cautela in studi sistematici, poiché l'alto livello di polimorfismi potrebbe anche introdurre un alto livello di omoplasie in alcune specie geneticamente divergenti.

Trovano buona applicazione anche in indagini filogeografiche, dove l'analisi filogenetica è messa in relazione alle informazioni geografiche ed ecologiche (Selkirk et al., 1997; Freitas et al., 2001). Attraverso l'analisi dei profili di amplificazione è possibile individuare caratteri specifici propri di una determinata popolazione e mettere in relazione popolazioni provenienti da diverse aree geografiche.

Regione plastidiale *trnL*

L'introne *trnL*_{UAA} del gene plastidiale dell' RNA transfer per l'amminoacido leucina è, fin dalla sua introduzione nella sistematica molecolare da Taberlet et

al. (1991), uno dei marcatori molecolari più utilizzati in studi filogenetici, per la ricostruzione di relazioni a livello di genere e specie, nonché per studi di filogeografia e biodiversità nelle briofite ma anche in altre piante (McDaniel & Shaw, 2003; Shaw et al., 2003b; Szovenyi et al., 2006; Grundmann et al., 2007). Una rassegna dei lavori sulle briofite che utilizzano questo marcatore è fornita da Quandt e Stech (2003). Gli stessi autori (2005) presentano una visione d'insieme della complessa evoluzione molecolare dell'introne *trnL* basata su circa mille sequenze da tutte le classi di briofite, includendo analisi delle lunghezze, contenuto in GC, similarità delle sequenze, tasso evolutivo dei principali generi. Da questo studio il tasso evolutivo e la divergenza delle sequenze è generalmente maggiore nelle epatiche rispetto ai muschi, e in questi ultimi si osserva una tendenza alla riduzione della lunghezza della regione P8 (la regione più variabile in lunghezza). In media la variazione intraspecifica è minore dell'1%, corrispondente a 2-3 mutazioni nell'introne completo.

Le briofite in generale mostrano una diversità plastidiale estremamente bassa in Europa (Korpelainen et al., 2004; Shaw et al., 2004; McDaniel & Shaw, 2005). Anche quando sono state utilizzate regioni che evolvono più rapidamente, solo un limitato numero di aplotipi sono stati trovati nei taxa di briofite europee (Shaw et al., 2003a; 2004). Questo basso grado di divergenza in Europa è molto probabilmente il risultato di un severo *bottleneck* presumibilmente durante le glaciazioni del Quaternario. La variazione del DNA plastidiale potrebbe quindi identificare le principali linee filogeografiche, ma spesso non è in grado di riconoscere i pattern di discendenza tra popolazioni geograficamente vicine (Schaal et al. 1998). Inoltre tipicamente il basso tasso mutazionale di molti marcatori plastidiali (Wolfe et al. 1987; Provan et al. 1999) spesso non permette la discriminazione tra popolazioni che si sono separate solo recentemente.

PROGETTO

Il progetto di ricerca sulla specie *Pleurochaete squarrosa* al quale mi sono dedicato durante il Dottorato, nasce dai dati ottenuti in un precedente studio dal gruppo con il quale ho svolto la mia attività di ricerca e successivamente pubblicati su *Plant Ecology* (Spagnuolo et al., 2007a). In questo lavoro marcatori ISSR e il polimorfismo di lunghezza del *trnL_{UAA}* sono utilizzati per valutare la struttura genetica in cinque popolazioni campane del muschio. All'interno di ogni sito in 3 unità di campionamento 20x20cm sono stati campionati 5 gametofiti non connessi tra loro. Principali risultati sono i valori elevati di diversità genetica (ben rappresentata dai 73 aplotipi ritrovati su 75 campioni), un ridotto flusso genico, e il ritrovamento nei siti analizzati di due aplotipi del *trnL_{UAA}*, già noti in bibliografia (Spagnuolo et al., 2002), uno che chiameremo “non deleto” lungo 299bp, l'altro che chiameremo “deleto” con una delezione di 37bp tra la timina in posizione 186 e l'adenina in posizione 223 (Fig. 15).

Da questi dati nascevano alcune spunti di approfondimento:

- indagare sull'origine dell'elevata diversità genetica ritrovata in una specie clonale, e valutare quanto questa diversità molecolare sia legata alle condizioni e alla storia del sito di campionamento oppure a caratteristiche della specie in esame;
- definire la struttura clonale, ricostruendo l'aspetto di un clone, in dimensione, compattezza, livello di mescolamento ecc. In una popolazione di una specie clonale ci si aspetterebbe uno o pochi cloni diffusi, ma in studi precedenti su specie a riproduzione principalmente vegetativa sono emerse situazioni molto diverse;
- valutare la frequenza e la distribuzione geografica dei due aplotipi del *trnL*, quindi effettuare uno studio filogeografico in Europa. Il ritrovamento di due aplotipi plastidiali costituisce un dato molto interessante su cui indagare

considerando la diversità plastidiale estremamente bassa in Europa per le briofite ed il fatto che è l'unica diversità ritrovata per questa regione genomica anche in un recente studio su 30 popolazioni di *P. squarrosa* nel Mediterraneo (Grundmann et al., 2007).

Sono state programmate a questo scopo tre diverse strategie di campionamento:

- fitto su piccola scala per definire nel dettaglio le caratteristiche di un clone;
- su scala locale, con un campionamento simile a quello effettuato nel precedente studio a Castelvoturno (Spagnuolo et al., 2007a) ma in un sito con caratteristiche ambientali molto diverse. I due siti differiscono in particolare per substrato e microclima;
- su ampia scala geografica in Europa, soprattutto nel bacino del Mediterraneo dalla penisola Iberica alla Turchia.

Nonostante l'elevata biodiversità, l'area del Mediterraneo resta comunque una regione poco studiata. Relativamente pochi studi sono stati intrapresi su briofite allo scopo di stabilire le dinamiche di popolazione tanto in specie rare che comuni.

L'analisi molecolare è stata condotta mediante l'utilizzo di cinque marcatori ISSR e mediante il polimorfismo di lunghezza del *trnL*. La scelta dei marcatori potrebbe influenzare comunque i risultati riguardanti la struttura di popolazione e l'analisi filogeografica (Estoup et al. 2002). Idealmente la scelta di combinare marcatori con differente tasso mutazionale potrebbe fornire utili indicazioni sia per i processi storici che per quelli più recenti nella storia della specie.

MATERIALI E METODI

La specie *Pleurochaete squarrosa*

La specie in studio è il muschio clonale di ambiente mediterraneo *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb. (Fig. 1), un muschio acrocarpo, xerofilo e tollerante il disseccamento. *Pleurochaete* cresce prevalentemente su suolo calcareo, sabbioso o ghiaioso in luoghi incolti e scoperti (Cortini – Pedrotti, 2001) vicino al mare dove spesso risulta localmente abbondante. Presenta piante abbastanza robuste con fusti irregolarmente ramificati alti 3–5 cm; le foglie sono crespato-contorte se asciutte, squarroso-ricurve se umide e lunghe 3-5 mm, da qui il nome della specie che fa riferimento proprio alla caratteristica forma che le foglie assumono allo stato umido.

La distribuzione di *P. squarrosa* (Fig. 2) ha un optimum sub-mediterraneo sebbene sia diffusa ampiamente anche in Europa, Asia e Nord America ed abbia alcuni avamposti isolati in Africa centrale ed in America centro meridionale (Fernandez Mendoza et al., 2002). E' molto abbondante anche nella penisola iberica dove, specialmente nelle formazioni aperte di querce sempreverdi (*Quercus ilex* L. e *Q. faginea* Lam.), è coinvolta nel recupero del suolo nelle successioni post-incendio.

P. squarrosa è un muschio dioico prevalentemente a riproduzione asessuale, gli sporofiti sono raramente prodotti sia in Nord America (Crum & Anderson, 1981), che nel Nord Europa (Smith, 1978) che nelle regioni mediterranee (Cortini Pedrotti, 2001). In particolare in Europa la presenza degli sporofiti è talmente rara che il loro ritrovamento, in alcune località della provincia di Zamora (Spagna), è stato riportato come un evento eccezionale (Fernandez Mendoza et al., 2002). Recentemente uno studio sulla specie nel bacino del Mediterraneo (Gunnarsson et al., 2007) ha riportato una maggiore frequenza di riproduzione sessuale, ritrovando sporofiti in diverse aree del mediterraneo

(Maiorca, Sardegna, Pantelleria, Portogallo, Sud della Spagna, Croazia, Turchia, Tunisia, Peloponneso). Per quanto riguarda la nostra diretta osservazione, nel solo sito portoghese di Amareleja abbiamo riscontrato la presenza di sporofiti.

La riproduzione vegetativa avviene per rigenerazione da foglie (o loro frammenti), che rappresentano quasi certamente il principale *shuttle* di propagazione per la dispersione e la colonizzazione. Un sistema di filamenti (fillonemi) si origina esclusivamente dalle cellule tra la lamina e la nervatura centrale (prima dalla zona apicale poi dal centro e dalla base), mentre le gemme crescono sia direttamente da queste cellule che dai fillonemi. Queste gemme, prodotte in numero maggiore sui filloidi (o parte di essi) staccati dal gametofito piuttosto che su filloidi ancora attaccati, rappresentano probabilmente il reale sistema di propagazione, mentre il sistema dei filamenti svolge una funzione meccanica e trofica (Giordano et al., 1996; Giordano et al., 2002). Queste gemme, una volta staccatesi dalla pianta madre, si accrescono diventando gametofiti adulti.

Il genere *Pleurochaete* è parte di una famiglia di muschi più grande, le Pottiaceae, che comprendono circa 1500 specie (Zander, 1993). *Pleurochaete* è generalmente inserito nella famiglia delle Trichostomoideae. Attualmente sono comunemente riconosciute 2 specie: *Pleurochaete luteola* interamente tropicale (Sud-Est degli Stati Uniti, Golfo del Messico e Sud America); *Pleurochaete squarrosa* largamente distribuita in Nord-America, Europa, Nord-Africa, Asia; lo stato delle altre specie (*P. beccarii*, *P. malacophylla*, *P. squamosa*, *P. ecuadoriensis*) è dubbio.

Un recente studio filogenetico sul genere *Pleurochaete* basato su marcatori plastidiali e nucleari ha confermato la monofilia di *Pleurochaete*, ed ha individuato tre cladi monofiletici: il neotropico *P. luteola*, l'europeo *P. squarrosa* e il Nord-Americano *P. squarrosa* (Grundmann et al., 2005). I due cladi, europeo e americano, geneticamente isolati ma morfologicamente

indistinguibili di *P. squarrosa* potrebbero rappresentare un esempio di speciazione criptica.

CAMPIONAMENTO

Campionamento su piccola scala

Il campionamento è stato effettuato nella Riserva Naturale di Castelvolturo nella regione Campania. Il sito occupa una fascia costiera pianeggiante con un'altezza massima di 9 metri sul livello del mare. Il suolo è caratterizzato da depositi alluvionali e da sabbie silicio-calcaree di formazioni risalente al quaternario. Il clima è tipicamente mediterraneo, precipitazioni abbondanti in autunno-inverno e scarse in estate, periodo in cui si determinano condizioni di notevole aridità.

Gli individui sono stati raccolti all'interno di una griglia 40x35cm con maglie di 5x5cm (costituita quindi da 8 colonne e 7 righe). Al centro di ogni maglia è stato campionato un individuo, per un totale di 56 gametofiti, ed ognuno è stato sottoposto ad estrazione del DNA e quindi analizzato con entrambi i marcatori molecolari.

Campionamento su scala locale - Punta Tresino

Il campionamento su scala locale è stato effettuato a Punta Tresino, un promontorio situato lungo la costa all'interno del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. La punta massima di altezza è di 357 metri ed è caratterizzato da una ricca vegetazione tipicamente mediterranea.

In questo sito sono stati scelti 3 punti (A, C ed E) distanti tra loro almeno 100 metri; il punto E è situato ad una distanza maggiore di circa 200 metri. Dai punti A e C sono stati campionati 10 gametofiti, dal punto E che presentava

maggiori valori di copertura ed estensione, ne sono stati raccolti 15. In tutti e tre i punti i campioni sono stati prelevati da tre aree poste ad intervalli regolari di circa 1/2 metri.

Campionamento su ampia scala geografica in Europa

Nell'ambito dello studio filogeografico in Europa, è stato effettuato un ampio campionamento che comprende 16 popolazioni in 5 differenti nazioni. Dieci popolazioni sono situate in Italia, e comprendono alcune aree del centro-nord-sud Italia e delle due isole maggiori Sicilia e Sardegna, le altre in Spagna, Portogallo, Croazia, Turchia (Fig. 3). Il numero di campioni varia nelle diverse popolazioni. Nella Tabella 1 sono riportate le provenienze ed il numero di campioni analizzati per popolazione.

Popolazioni campionate	Latitudine Nord	Longitudine Est	N° campioni analizzati
Campania - Castevolturmo (griglia 40x35cm)	41°02'33"	13°56'25"	56
Campania – Amalfi (Am)	40°38'70"	14°36'26"	10
Campania - Punta Tresino (PT)	40°27'13"	15°01'38"	35
Marche – Monti Sibillini (MS)	42°54'0"	13°13'0"	5
Toscana – Grosseto (Gr)	42°46'0"	11°7'59"	5
Toscana – Siena (Si)	43°19'0"	11°21'0"	5
Friuli Venezia Giulia – Trieste (Tri)	45°38'54"	13°46'48"	5
Friuli Venezia Giulia – Duino (Du)	45°46'23"	13°36'6"	5
Sardegna – Buggerru (Bug)	39°23'48"	8°24'9"	3
Sicilia – Ragusa (Rag)	36°55'0"	14°43'59"	2
Croazia – Peljesac (Pj)	42°58'42"	17°3'55"	10
Croazia – Hvar (Hv)	43°8'26"	16°43'41"	10
Portogallo – Abrantes (Ab)	39°28'0"	-8°12'0"	10
Portogallo – Amareleja (Amj)	38°12'0"	-7°13'59"	10
Spagna – Estremadura (Es)	39°0'0"	-6°0'0"	10
Turchia – Izmir (Izm)	38°25'54"	27°7'59"	8

Tabella 1 – Localizzazione delle popolazioni campionate con numero di individui analizzati per sito. Tra parentesi le abbreviazioni utilizzate nel testo.

ESTRAZIONE DEL DNA

Singoli gametofiti sono stati puliti accuratamente con un pennello e lavati con Triton X-100, allo scopo di eliminare qualsiasi potenziale fonte di DNA estraneo quali i funghi presenti nei residui di terreno e le alghe epifite. Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA mediante estrazione con CTAB (esadeciltrimetilammonio bromuro). Partendo dal protocollo descritto da Doyle & Doyle (1990), la procedura è stata ottimizzata come segue:

- I gametofiti vengono pestati con azoto liquido direttamente in microtubi Eppendorf da 2 ml.
- Incubazione a 60°C per 30 min. in buffer CTAB 2X (100mM Tris-HCl a pH 8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA a pH 8, 2% CTAB, 0.5 % 2-mercaptoetanololo).
- Incubazione su ghiaccio per 5 min. per favorire la precipitazione delle proteine.
- Estrazione in fenolo/cloroformio/alcol isoamilico 25:24:1 e successiva centrifugazione.
- Gli acidi nucleici si trovano ora nella fase acquosa superiore. Il supernatante viene recuperato e trattato per due volte consecutive con cloroformio/alcol isoamilico 24: 1 al fine di rendere più pura la componente di acidi nucleici.
- Dopo ciascun passaggio il campione viene centrifugato prelevando sempre la fase superiore fino all' interfaccia.
- Precipitazione degli acidi nucleici ottenuta aggiungendo alcol isopropilico, in quantità pari ai 2/3 del volume totale, incubando a -80 ° C per 30 min e centrifugando a freddo per 20 min alla velocità di 10000 rpm.
- Il pellet viene risospeso in 0.5 ml etanolo 70% e riprecipitato nuovamente per centrifugazione a 10000 rpm per 20 min (a freddo).
- Il pellet viene liofilizzato e poi risospeso in 20-30 µl di buffer TE 1X.

ISSR

Protocollo di amplificazione

Le miscele di amplificazione sono state preparate usando 5 primers ISSR (Tabella 2) selezionati, dopo uno screening di circa 25 primers, in quanto producevano un bandeggio chiaro e riproducibile.

Primer	Sequenza 5'-3'	N°basi	N° loci
14	TGTCACACACACACACAC	18	7
17	CAGCACACACACACACAC	18	7
18	GTGCACACACACACACAC	18	7
HAD	CTCCTCCTCCTCRC	14	6
TE	GTGGTGGTGGTGRC	14	7

Tabella 2 – Sequenza nucleotidica dei 5 primers ISSR utilizzati, con numero di loci analizzati per primer.

La miscela di reazione utilizzata è la seguente:

- DNA 1.0 µl
- primer (50 µM) 0.3 µl
- PCR buffer (10X) 2.5 µl
- dNTPs (2,5 mM) 2.0 µl
- Taq polimerasi (5 U/µl) 0.2 µl
- MgCl₂ (25 mM) 1.0 µl
- ddH₂O fino ad un volume di 25 µl

La miscela di reazione, allestita in ghiaccio per preservarne i componenti, è stata incubata nel thermocycler Apollo ATC 401. Il programma del termocycler comprende uno step iniziale di denaturazione a 95°C per 3', seguito da un numero variabile di cicli (38/40) ognuno dei quali comprende 1' a 94°C, 1' di annealing e 2' di extension a 72°C. Il ciclo termina con uno step finale di extension per 6' e la discesa della temperatura a 4°C. I programmi sono settati in modo da effettuare per i primi 10/12 cicli un touch-down delle temperature di annealing, diminuendo di 1°C ogni 2 cicli. Per ciascun primer le condizioni sono state settate variando la concentrazione di MgCl₂, le temperature di annealing ed il numero di cicli, in modo da ottenere condizioni di maggiore o minore stringenza, ottimizzando così la resa e la qualità dei prodotti di amplificazione.

I frammenti amplificati sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% con buffer TEB 1X e visualizzati mediante bromuro di etidio tramite un transilluminatore a lampade UV. È stato caricato l'intero volume della reazione di amplificazione addizionato con Blu di Bromo Fenolo (BBF) 1X. Insieme agli amplificati è stato fatto migrare un DNA ladder 100bp (Fermentas) come misura standard di riferimento.

Il gel è stato fotografato sul transilluminatore a raggi UV con fotocamera digitale.

Sono state allestite almeno due prove parallele per ogni primer e solo le bande riproducibili ed inequivocabili sono state considerate nell'analisi finale.

Analisi dei dati ISSR

Dai profili di bande ottenuti sono derivate matrici binarie di 1 e 0, in base al criterio di presenza/assenza, che rappresentano il dato "grezzo" sul quale viene condotta una serie di analisi statistiche. Tale analisi è stata realizzata per mezzo di alcuni software specifici:

- “Syn-tax” (Podani, 2001) è stato utilizzato per l’analisi del tipo Neighbor Joining, una rappresentazione grafica delle distanze genetiche.
- “Arlequin ver. 3.1” (Excoffier et al., 2006) è stato utilizzato invece per analizzare la struttura genetica delle singole popolazioni, calcolando le sequenze aplotipiche e gli indici di diversità molecolare (Nei, 1987); lo stesso programma è servito per determinare i valori di F_{st} (fixation index), come misura del grado di divergenza e del flusso genico tra le popolazioni e per il test AMOVA (Analysis of Molecular Variance).
- “GenALEX ver.6” (Peakall and Smouse, 2006) è stato utilizzato per la Principal Coordinates Analysis (PCA) e per calcolare l’indice Genetic Distance (Nei, 1972).
- “Multilocus 1.3” (Agapow and Burt, 2001) è stato impiegato per valutare il grado di linkage tra i loci mediante l’indice Multilocus linkage disequilibrium r_d (Agapow and Burt, 2001). È stato utilizzato inoltre per valutare la presenza nella specie in esame di una partizione in due gruppi caratterizzati da isolamento riproduttivo (Koupofonau et al., 1997). Il test di significatività è stato effettuato mediante 1000 randomizzazioni.
- “XLSTAT ver. 8.01” è stato utilizzato per eseguire il Mantel test per controllare la possibile correlazione tra distanze genetiche (F_{st} , pairwise genetic distance di Nei, 1972) e distanze geografiche (km).

SEQUENZIAMENTO DEL *trnL*

Protocollo di amplificazione e sequenziamento

Il *trnL* è stato amplificato utilizzando la coppia di *primers* omologhi (Tabella 3) alla regione 5' del *trnL* (*trnL1*) ed alla regione 3' del *trnL* (*trnL2*).

Coppia di primer	Sequenza 5'-3'	N° basi
<i>trnL1</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG	20
<i>trnL2</i>	GGGGATAGAGGGACTTGA	18

Tabella 3 - Sequenza nucleotidica della coppia di primers utilizzati per l'amplificazione della regione *trnL*.

La reazione di amplificazione della regione *trnL* è stata così allestita:

- DNA	1.0 µl
- Primer (50 µM)	0.6 µl
- PCR buffer (10X)	5.0 µl
- dNTPs (250 µM)	4.0 µl
- Taq polimerasi	0.6 µl
- ddH ₂ O fino ad un volume di 50 µl	

La miscela di reazione, allestita in ghiaccio per preservarne i componenti, è stata incubata nel termocycler Apollo ATC 401 e prevede il seguente ciclo:

T (°C)	durata	n°di cicli
94	3'	1
94	30''	30
55	1'	
72	45''+ 3''/ ciclo	
72	7'	1
4		

Il prodotto di amplificazione così ottenuto è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio 1.5%, con un marcatore di peso molecolare per valutarne la concentrazione.

Gli amplificati sono stati successivamente purificati mediante il *kit GFX PCR and gel band purification* (Amersham Biosciences). I frammenti purificati sono stati poi sottoposti a sequenziamento diretto, impiegando il *BigDye™ Terminator Version 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems), il cui enzima è l'AmpliTaq DNA polimerasi.

Ogni reazione è stata allestita nel seguente modo:

Big Dye	1.0 µl
Buffer	1.0 µl
DNA	1.0 µl
primer (1 µM)	0.75 µl
ddH2O fino ad un volume di 5µl	

I *primer* utilizzati sono stati i medesimi della reazione di PCR. La miscela di reazione, allestita in ghiaccio per preservarne i componenti, è stata incubata nel termocycler Apollo ATC 401 e prevede il seguente ciclo:

T (°C)	durata	n° di cicli
96	10''	1
50	5''	25
60	4'	
4		

Il prodotto della reazione di sequenza è stato poi precipitato mediante l'aggiunta di 2.5 µl di Na-acetato (3 M pH 5), 50 µl di etanolo assoluto, incubazione per 30' a -80°C e centrifugato per 30' a 4°C a 10000rpm.

Sono stati effettuati 2 lavaggi del precipitato con etanolo 70% ed il pellet è stato liofilizzato sottovuoto. La risospensione dei campioni è avvenuta utilizzando 30µl di formammide. I campioni sono stati poi denaturati a 94°C per 3' e caricati nel sequenziatore ABI 3730 DNA Analyzer.

Analisi sequenze

Gli elettroferogrammi ottenuti sequenziando un singolo filamento in entrambe le direzioni, sono stati in seguito processati servendosi del *software* Sequenze Navigator al fine di ottenere sequenze consenso del campione. Le sequenze sono state poi importate nel programma BioEdit ver. 5.0.9, che è stato impiegato per tutte le operazioni di *editing*. Per l'allineamento è stato impiegato il *software* ClustalW (Thompson et. al., 1994), utilizzando i parametri di *default* del *software*.

RISULTATI E DISCUSSIONE

STRUTTURA CLONALE

L'analisi ISSR condotta sui 56 campioni raccolti all'interno della griglia ha individuato 9 aplotipi. Questi mostrano una distribuzione non uniforme (Fig. 4): un aplotipo (in rosso) costituisce circa il 60% degli individui campionati, mentre il restante 40% è suddiviso nei rimanenti 8 aplotipi. Il clone principale sembra non esaurirsi all'interno dell'unità di campionamento mostrando quindi dimensioni almeno di 20x20cm. Nella Figura 5 sono rappresentate le frequenze relative degli aplotipi. Circa una metà della griglia è occupata quasi totalmente dalla parte compatta dell'aplotipo prevalente, l'altra metà, invece, è occupata da cloni misti con una frequenza equiparabile. Anche nella porzione più compatta è possibile ritrovare almeno altri tre aplotipi. I cloni si presentano quindi frammentati con zone di sovrapposizione e mescolamento.

Sono stati ritrovati entrambi gli aplotipi noti del *trnL*, non delecto e delecto (Fig. 15). Nessun aplotipo ISSR è condiviso tra gli individui con diverso aplotipo *trnL*. Dei 9 aplotipi ISSR, 7 comprendono campioni che non presentano delezione del *trnL* (46 campioni), gli altri 2 aplotipi comprendono campioni con l'aplotipo plastidiale delecto (10 campioni) (Tab. 4).

La variabilità genetica riscontrata è ben rappresentata dagli indici riportati nella Tabella 4.

Popolazione	N° aplotipi	N° loci polimorfici	Gene diversità (Nei,1972)
Totale griglia (56)	9	6	0.4266 +/- 0.1110
aplotipo <i>trnL</i> non delecto (46)	7	5	0.3865 +/- 0.0902
aplotipo <i>trnL</i> delecto (10)	2	1	0.4667 +/- 0.1318

Tabella 4 – Variabilità genetica totale all'interno della griglia e variabilità genetica all'interno dei due gruppi con diverso aplotipo plastidiale. Tra parentesi il numero di campioni.

Il risultato ottenuto conferma la diversità aplotipica ritrovata nel precedente studio (Spagnuolo et al., 2007a): se la griglia viene suddivisa in quattro parti abbiamo 4 unità di campionamento 20x20cm, ed in ognuna è possibile ritrovare dai 3 ai 5 aplotipi.

I livelli di diversità genetica a fronte di un area di campionamento ridotta sembrano comunque elevati, con ben 9 aplotipi e una Gene Diversity pari a circa 0.43 .

Dalle distanze interaplotipiche, riportate nella Tabella 5, emerge che i valori più elevati (in rosso) li ritroviamo tra gli aplotipi ISSR i cui individui hanno diverso aplotipo plastidiale.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.000								
2	1.000	0.000							
3	1.000	2.000	0.000						
4	5.000	4.000	4.000	0.000					
5	4.000	5.000	5.000	1.000	0.000				
6	2.000	1.000	3.000	7.000	6.000	0.000			
7	1.000	2.000	2.000	6.000	5.000	3.000	0.000		
8	1.000	2.000	2.000	6.000	5.000	3.000	2.000	0.000	
9	2.000	3.000	3.000	7.000	6.000	4.000	1.000	1.000	0.000

Tabella 5 – Distanze euclidee interaplotipiche. Le distanze interaplotipiche tra aplotipi deleti (4;5) rispetto a quelli non deleti sono evidenziate in rosso.

La Principal Coordinates Analysis (PCA) (Fig. 6) e l'analisi Neighbour Joining (NJ) (Fig. 7) effettuata con l'algoritmo di Jaccard (Saitou & Nei, 1987), condotte sulla sola matrice binaria ricavata dai profili di amplificazione ISSR, concordano nel segregare in due *clusters* i campioni con diverso aplotipo del *trnL*.

Gli individui con diverso aplotipo plastidiale sono stati a questo punto considerati come due gruppi distinti e analizzati valutando sia la diversità genetica che la distribuzione della varianza mediante l'analisi AMOVA.

La percentuale di varianza è molto più alta tra le popolazioni (89.11%) che all'interno di una stessa popolazione (10.89%). Su piccola scala quindi la diversità tra i gametofiti che condividono lo stesso aplotipo *trnL* è molto più bassa rispetto a quella tra i gametofiti con aplotipo plastidiale diverso. Gli individui con aplotipo deleto mostrano una Gene Diversity (Nei, 1987) più alta degli individui con aplotipo non deleto, a fronte di un minor numero sia di campioni (10 su 56) che di aplotipi ritrovati (2 su 9) (Tabella 4).

Tutti i risultati (PCA, NJ, AMOVA, Distanze interaplotipiche), ottenuti dall'analisi della sola matrice binaria degli ISSR, concordano nell'individuare una maggiore distanza genetica tra gli individui con diverso aplotipo *trnL* all'interno della griglia.

Pur individuando una certa diversità molecolare tra i due gruppi, l'indice Gene Identity (Nei, 1972) è piuttosto alto mostrando un valore pari a 0.816.

Nei tre punti di campionamento nel sito Punta Tresino sono stati identificati 12 aplotipi ISSR. La variabilità genetica ritrovata nei tre punti della popolazione Punta Tresino è indicata dai valori riportati in Tabella 6.

Punto di campionamento	N° campioni	N° campioni con aplotipo <i>trnL</i> deleto	N° di aplotipi	N° loci polimorfici	Gene diversity (Nei,1972)
PT-A	10	0	2	1	0.2000 +/- 0.1541
PT-C	10	7	6	5	0.9111 +/- 0.0773
PT-E	15	5	4	5	0.7524 +/- 0.0561

Tabella 6 – Diversità genetica nei tre punti di campionamento all'interno del sito Punta Tresino.

Il punto di campionamento C mostra la diversità genetica maggiore e la maggiore frequenza dell'aplotipo deleto del *trnL* (7 individui su 10), mentre il

punto di campionamento A mostra i valori più bassi, con 9 individui su 10 con lo stesso aplotipo e nessuno aplotipo deleto del *trnL*.

Nella Figura 8 sono rappresentate le frequenze relative degli aplotipi. Dal grafico si nota la presenza di un aplotipo maggiormente diffuso nella popolazione con una frequenza pari a 0.34, che rappresenta anche quello condiviso tra individui provenienti da due diversi punti di campionamento (PT-A e PT-C). 7 aplotipi sono invece presenti in un solo punto di campionamento (PT-C) (Fig. 9).

I valori di *Fst* (fixation index) calcolati confrontando tra loro i tre punti di campionamento (Tabella 7) ci forniscono una misura del grado di divergenza e del flusso genico.

	PT-A	PT-C	PT-E
PT-A	-		
PT-C	0.23896	-	
PT-E	0.48951	0.17353	-

Tabella 7 – Valori *Fst* calcolati tra i tre punti di campionamento del sito Punta Tresino.

La popolazione del punto E mostra una maggiore distanza genetica quindi un minore flusso genico, collegato probabilmente alla maggiore distanza dagli altri due punti. Considerando l'assenza di riproduzione sessuale nel sito, il flusso genico mediato da propaguli vegetativi come foglie o parti di esse sembra quindi decrescere rapidamente con l'aumentare della distanza.

Dei 35 individui analizzati 13 presentano l'aplotipo deleto del *trnL*. Nessuno aplotipo ISSR è condiviso tra gli individui con aplotipo *trnL* diverso.

Dei 10 individui campionati nel punto C, gli unici 3 con aplotipo non deleto condividono l'aplotipo ISSR con 9 dei 10 individui del punto A di campionamento (Fig. 9). La presenza di individui con uguale aplotipo nei punti A e C di campionamento fa pensare allo spostamento di un propagulo

probabilmente dal punto A al punto C. La probabile direzione dello spostamento emerge dalla maggiore presenza dell'aplotipo condiviso nel punto A e dal fatto che gli unici 3 campioni con aplotipo non deleto del *trnL* nel punto C sono proprio quelli con aplotipo condiviso.

L'analisi AMOVA ha evidenziato una percentuale di varianza tra i tre punti di campionamento pari a 31.9 % e all'interno pari a 68.1%.

A fronte di un campionamento simile, abbiamo a Punta Tresino un numero di aplotipi significativamente inferiore a quello ritrovato a Castelvoturno nello studio precedente (Spagnuolo et al., 2007a): 12 aplotipi su 35 individui a Punta Tresino contro i 43 aplotipi su 45 individui a Castelvoturno. Compattezza del substrato e condizioni microclimatiche, le principali caratteristiche che differenziano i due siti, sembrano quindi influenzare la struttura clonale, determinando l'importanza relativa tra la crescita laterale e la formazione e lo spostamento di propaguli (come parti di foglie), responsabili del rimescolamento. Un substrato meno compatto e un clima arido, che porta ad un maggiore distacco di propaguli da frammentazione del gametofito, come nel sito di Castelvoturno, favoriranno lo spostamento dei propaguli, e quindi il rimescolamento e cloni compatti di minore dimensione; contrariamente un substrato più compatto e un clima relativamente più umido, come ritroviamo a Punta Tresino, porteranno a cloni più grandi e ad un minore rimescolamento.

In generale quindi in una popolazione della specie in esame non abbiamo uno o pochi cloni diffusi, come nei muschi *Sphagnum rubellum* (Shaw & Srodon, 1995) e *Polytrichum formosum* (Van der Velde et al., 2001), ma i differenti *patches* sono occupati da differenti gruppi di cloni di dimensioni limitate, come ritrovato nella specie *Hylocomium splendens* (Cronberg et al., 2006).

Nelle specie clonali è stato proposto un modello che prevede due differenti strategie di crescita: le cosiddette “*guerrilla species*” che mostrano un grado elevato di frammentazione e mescolamento dovuto alla formazione di stoloni e rizomi dispersi, e le cosiddette “*phalanx species*” dove i cloni rimangono più

compatti e la colonia si espande essenzialmente per ramificazione laterale dei gametofiti (McLellan et al., 1997). La nostra specie può sicuramente essere annoverata tra le “*guerrilla species*”: i cloni si presentano in ogni caso frammentati e di dimensioni limitate, ed il livello di mescolamento, pur variando in relazione alle condizioni ambientali, è comunque elevato e caratteristico della specie.

La Gene Identity (Nei, 1972) calcolata considerando come due popolazioni i gametofiti di Punta Tresino con diverso *trnL* mostra un valore pari a 0.960.

VARIABILITÀ GENETICA

In tutte le 16 popolazioni analizzate (189 gametofiti) i livelli di diversità genetica intrapopolazione, evidenziati dai diversi indici molecolari ricavati dall’analisi ISSR, si mostrano generalmente elevati in relazione alle diverse modalità di campionamento (Tabella 8). Per la regione *trnL* sono stati ritrovati soltanto i due aplotipi già noti.

Contrariamente a quanto ci si aspetterebbe per una specie clonale, il livello di diversità molecolare si mostra quindi molto elevato e in diversi casi (Monti Sibillini, Siena, Duino, Amareleja) anche con campionamenti piccoli e su piccole aree è possibile ritrovare aplotipi diversi per i diversi individui e comunque valori di Gene Diversity (Nei, 1987) elevati.

Per altre specie clonali in cui è stato ritrovato un simile risultato è stato ampiamente ipotizzato che all’origine di tale diversità ci sia la mutazione somatica. Per esempio Esselman et al. (1999) suggerisce che la mutazione somatica a carico di regioni ipervariabili del DNA possa spiegare l’elevata diversità genetica in popolazioni della pianta clonale *Calamagostis porteri* ottenuta mediante marcatori ISSR. Skotniki et al. (1999) suggerisce che la mutazione somatica sembra essere la più probabile causa della variabilità

Popolazione	N° campioni	N° aplotipi	N° loci polimorfici	Gene Diversity (Nei, 1987)	r_d	$P r_d$
Campania - Castevolturno (griglia 40x35cm)	56	9	6	0.426 +/- 0.111	0.193	<0.001
Campania - Amalfi	10	5	6	0.755 +/- 0.129	0.276	<0.001
Campania - Punta Tresino	35	12	9	0.843 +/- 0.044	0.245	<0.001
Marche - Monti Sibillini	5	4	3	0.900 +/- 0.161	-0.194	1.000
Toscana - Grosseto	5	3	2	0.700 +/- 0.218	-0.250	1.000
Toscana - Siena	5	5	5	1,000 +/- 0.126	0.050	0.518
Friuli Venezia Giulia - Trieste	5	3	3	0.800 +/- 0.164	0.222	0.108
Friuli Venezia Giulia - Duino	5	4	3	0.900 +/- 0.161	-0.250	1.000
Sardegna - Buggerru	3	2	2	0.666 +/- 0.314	1.000	0.355
Sicilia - Ragusa	2	2	1	1,000 +/- 0.500	-	-
Croazia - Peljesac	10	4	3	0.644 +/- 0.151	0.287	0.059
Croazia - Hvar	10	8	7	0.955 +/- 0.059	0.096	0.015
Portogallo - Abrantes	5	3	6	0.800 +/- 0.164	0.555	<0.001
Portogallo - Amareleja	5	5	4	1.000 +/- 0.126	-1.927	0.649
Spagna - Estremadura	5	1	0	-	-	-
Turchia - Izmir	8	3	4	0.607 +/- 0.164	0.575	0.007

Tabella 8 – Indici di diversità genetica nelle 16 popolazioni analizzate. r_d è l'indice Multilocus linkage disequilibrium (Agapow and Burt, 2001), $P r_d$ è il P-value per r_d nelle popolazioni analizzate valutato mediante 1000 permutazioni.

genetica nel muschio Antartico *Sarconeurum glaciale*. Le modalità di rigenerazione da propagulo della specie in esame (Giordano et al., 1996; Giordano et al., 2002) combinata con un elevato tasso mutazionale potrebbero spiegare i valori di diversità ritrovati, poiché le mutazioni somatiche a carico delle cellule poste tra la lamina e la nervatura centrale saranno presenti nei gametofiti che si origineranno dalle gemme. L'accumularsi di queste mutazioni porterà a genotipi differenti mescolati tra loro in spazi molto ridotti. Soprattutto dove le popolazioni sono più grandi, con crescita più veloce e una produzione di biomassa maggiore, come nel sito di Castevoldturno dove abbiamo estesi tappeti di *Pleurochaete squarrosa*, la mutazione somatica potrebbe risultare un fenomeno più rilevante e contribuire a generare una maggiore variabilità. Secondo Magdefrau (1982) le specie con forma di crescita "tall turf" come *P. squarrosa*, che forma tappeti lassi, dovrebbero avere un tasso di crescita maggiore rispetto, ad esempio, alle specie "annual cushions" (forma di crescita a cuscino) che danno origine a tappeti più compatti.

La diversità genetica ritrovata in *Pleurochaete squarrosa* può sicuramente essere collegata anche al recruitment di propaguli asexuali da aree circostanti. Cronberg (2002) suggerisce che i livelli di diversità genetica dipendono anche dalla durata del recruitment: un recruitment continuo porta ad una maggiore diversità per l'ingresso di nuovi genets, mentre se il recruitment avviene solo nella prima fase di stabilizzazione della specie in una nuova area, i livelli di diversità diminuiranno nel tempo per la perdita di cloni. Il grado del recruitment è naturalmente influenzato da alcune caratteristiche ecologiche dell'habitat e dal livello del disturbo ambientale.

L'analisi AMOVA condotta sulle 15 popolazioni ha individuato una varianza interna (20.83%) minore di quella tra i siti (79.17%). Risultato opposto ritroviamo invece su scala locale analizzando il sito Punta Tresino, dove la varianza interna (68.1%) è maggiore di quella tra i tre punti di campionamento (31.9 %). Questo evidenzia come il flusso genico mediato dai propaguli funzioni

bene a piccole distanze portando ad una minore diversità tra gli individui di diverse aree a livello locale, mentre su lunghe distanze la scarsa produzione di spore, responsabili di migrazione a lunga distanza, porta ad una maggiore differenziazione delle popolazioni.

L'elevata diversità genetica sembra quindi legata alla specie, indipendente dalle caratteristiche e dalla storia del sito di campionamento. In particolare la mutazione somatica - ancora da dimostrare - combinata con le modalità di riproduzione vegetativa, sembra possa svolgere un ruolo importante nel mantenere alti livelli di diversificazione genetica tra gli individui.

L'indice Multilocus linkage disequilibrium (r_d) (Agapow and Burt, 2001) fornisce una misura del grado di associazione tra i loci, dell'ammontare della ricombinazione dovuta a meiosi, e quindi una stima della frequenza della riproduzione sessuale. Rispetto ai valori ritrovati in altri studi effettuati mediante ISSR su altre specie di muschi (Hassel et al., 2005; Gunnarsson et al., 2005), i nostri valori mostrano un alto livello di linkage tra i loci (Tab. 8). Ad esclusione del sito Hvar dove il valore è basso e significativo, i valori bassi di r_d risultano negli altri casi non significativi per $p < 0.5$. Questo parametro, come già ritrovato in uno studio sul muschio epifita *Leptodon smithii* (Spagnuolo et al., 2007b), appare ben correlato alla presenza/assenza di sporofiti: i valori più bassi di associazione riguardano infatti la popolazione del Portogallo Amareleja dove sono stati ritrovati sporofiti, e le popolazioni che mostrano un maggiore flusso genico a lunga distanza, come quelle del Centro-Nord Italia, che potrebbe indicare una maggiore presenza nell'area di sporofiti.

Anche nella popolazione di Punta Tresino, così come nei gametofiti campionati all'interno della griglia (Tab. 4), la diversità genetica degli individui con aplotipo *trnL* deleto è più alta di quella degli individui con aplotipo non deleto (Tab. 9). Anche dall'analisi effettuata nella popolazione di Amalfi ritroviamo un risultato simile: la Gene diversity (Nei, 1972) considerando la deviazione standard è paragonabile nei due gruppi ma il numero di aplotipi e di loci

polimorfici è maggiore nel gruppo dei deleti (Tab. 9).

	N° individui	N° aplotipi	N° loci polimorfici	Gene diversity (Nei,1972)
Punta Tresino – gruppo non deleti	22	4	6	0.645±0.081
Punta Tresino – gruppo deleti	13	8	8	0.859±0.089
Amalfi – gruppo non deleti	3	2	1	0.667±0.314
Amalfi – gruppo deleti	7	3	3	0.524±0.209

Tabella 9 - Diversità genetica tra gli individui con lo stesso aplotipo plastidiale nelle popolazioni di Punta Tresino ed Amalfi.

Stessa indicazione proviene anche dall'analisi effettuata considerando i tre siti in cui sono stati ritrovati entrambi gli aplotipi plastidiali (Punta Tresino, Amalfi e Peljesac) come un'unica popolazione divisa in due gruppi in base al *trnL* (Tab. 10). La differenza è meno evidente per il ritrovamento a Peljesac di un solo individuo su 10 con aplotipo plastidiale delecto.

	N° individui	N° aplotipo	N° loci polimorfici	Gene diversity (Nei,1972)
Gruppo non deleti	34	9	16	0.823±0.044
Gruppo deleti	21	12	18	0.900±0.046

Tabella 10 - Diversità genetica tra gli individui con lo stesso aplotipo plastidiale considerando le tre popolazioni in cui sono presenti entrambi gli aplotipi (Amalfi, Punta Tresino, Peljesac).

Gli individui con aplotipo plastidiale delecto pur essendo meno diffusi mostrano quindi una maggiore diversità molecolare, risultato che potrebbe indicare una presenza più antica di quell'aplotipo in quelle aree geografiche.

STRUTTURA GEOGRAFICA

L'analisi condotta su ampia scala non evidenzia una chiara struttura geografica. Dall'analisi Neighbour Joining (Fig. 10) si evidenzia la presenza di due gruppi distinti, uno che comprende le popolazioni del sud Italia, la Croazia e la Turchia, l'altro comprende le popolazioni del centro-nord Italia e quelle delle penisola iberica. La separazione appare meno netta dalla Principal Coordinates Analysis (Fig. 11), che individua una maggiore gradualità con aplotipi intermedi tra i due gruppi. Due aplotipi della penisola iberica si trovano in una posizione intermedia tra i due gruppi principali. Questi due aplotipi sono stati entrambi ritrovati nella popolazione campionata nel sito Abrantes del Portogallo.

Il Mantel test individua una debole ma significativa correlazione positiva ($r = 0.279$) tra le distanze geografiche (km) e le distanze genetiche (F_{st}) delle 15 popolazioni analizzate (Tab. 11), con un livello di significatività del 5%. Il tipo di correlazione utilizzato è quello di Pearson mediante test bilaterale ed il P-value calcolato mediante 10000 permutazioni è 0.007. Stesso risultato si ottiene considerando i soli individui con aplotipo plastidiale non deleto ($r = 0.222$, P-value = 0.022).

Ritroviamo solo tre aplotipi condivisi tra diverse popolazioni e tutti riguardano le popolazioni del Centro-Nord Italia: uno tra la popolazione Toscana di Grosseto e quella delle Marche, uno tra le due popolazioni del Friuli Venezia Giulia, il terzo condiviso tra Marche ed entrambe le popolazioni del Friuli Venezia Giulia che condividono quindi due aplotipi (Fig. 10).

In Tabella 12 sono riportate le Genetic Distance (Nei, 1972) tra le popolazioni. I valori più elevati sono tra le popolazione della Campania e quelle del Centro-Nord Italia, e proprio i siti campani mostrano in generale i valori più alti di distanza genetica. Un minore isolamento interessa invece le popolazioni iberiche, dato che concorda con la maggiore frequenza di sporofiti riportata

	Amalfi	Punta Tresino	Trieste	Duino	Monti Sibillini	Grosseto	Siena	Buggerru	Ragusa	Peljesac	Hvar	Abrantes	Amareleja	Estremadura	Izmir
Amalfi	-	0.193	0.226	0.184	0.184	0.267	0.140	0.273	0.184	0.300	0.144	0.226	0.140	0.526	0.314
Punta Tresino	45	-	0.172	0.135	0.135	0.206	0.097	0.207	0.120	0.237	0.108	0.172	0.097	0.400	0.247
F. V. G. – Trieste	563	598	-	-0.012	-0.012	0.250	0.100	0.253	0.139	0.292	0.111	0.200	0.100	0.600	0.310
F. V. G. – Duino	577	614	20	-	0.022	0.200	0.050	0.194	0.069	0.250	0.069	0.150	0.050	0.550	0.266
Marche-Monti Sibillini	277	320	309	321	-	0.167	0.050	0.194	0.069	0.250	0.069	0.150	0.050	0.550	0.266
Toscana - Grosseto	373	418	384	388	171	-	0.150	0.313	0.212	0.333	0.153	0.250	0.150	0.650	0.353
Toscana – Siena	402	446	323	326	159	64	-	0.137	0.000	0.207	0.025	0.100	0.000	0.500	0.221
Sardegna – Buggerru	547	570	823	827	561	439	500	-	0.208	0.349	0.144	0.253	0.137	0.764	0.374
Sicilia – Ragusa	413	380	973	988	677	719	767	619	-	0.274	0.032	0.139	0.000	0.773	0.299
Croazia – Peljesac	331	343	396	415	314	485	466	828	701	-	0.200	0.292	0.207	0.590	0.373
Croazia – Hvar	330	345	364	384	288	458	437	812	711	33	-	0.111	0.025	0.416	0.210
Portogallo – Abrantes	1994	1976	1924	1913	1832	1661	1686	1427	2023	2145	2118	-	0.100	0.600	0.310
Portogallo – Amareleja	1895	1924	1922	1913	1804	1634	1665	1363	1941	2116	2090	164	-	0.500	0.221
Spagna – Estremadura	1769	1800	1784	1775	1671	1500	1530	1243	1832	1983	1958	197	139	-	0.635
Turchia – Izmir	1102	1106	1366	1385	1274	1472	1472	1627	1107	1026	1058	3047	2990	2902	-

Tabella 11 – Distanze in Km (sotto la diagonale) e distanze genetiche Fst (sopra diagonale) tra le 15 popolazioni analizzate.

	Amalfi	Punta Tresino	FVG Trieste	FVG Duino	Marche M.Sibillini	Toscana Grosseto	Toscana Siena	Sardegna	Sicilia	Turchia Izmir	Croazia Peljesac	Croazia Hvar	Portogallo Abrantes	Portogallo Amareleja	Spagna
Am	0.000														
PT	0.268	0.000													
Tri	0.787	0.831	0.000												
Du	0.719	0.786	0.009	0.000											
MS	0.712	0.722	0.028	0.015	0.000										
Gr	0.806	0.723	0.053	0.050	0.027	0.000									
Si	0.704	0.830	0.091	0.072	0.098	0.133	0.000								
Bug	0.291	0.426	0.516	0.469	0.471	0.538	0.456	0.000							
Rag	0.266	0.457	0.587	0.540	0.553	0.625	0.527	0.035	0.000						
Izm	0.359	0.516	0.400	0.366	0.399	0.460	0.342	0.126	0.174	0.000					
Pj	0.291	0.213	0.515	0.482	0.451	0.538	0.510	0.196	0.232	0.346	0.000				
Hv	0.426	0.382	0.324	0.316	0.318	0.380	0.418	0.284	0.317	0.376	0.124	0.000			
Ab	0.341	0.446	0.255	0.233	0.232	0.295	0.338	0.149	0.205	0.225	0.238	0.223	0.000		
Am	0.568	0.631	0.153	0.147	0.152	0.157	0.169	0.511	0.585	0.392	0.408	0.334	0.250	0.000	
Es	0.452	0.572	0.209	0.182	0.170	0.221	0.199	0.422	0.499	0.374	0.318	0.359	0.186	0.059	0.000

Tabella 12 – Genetic Distance (Nei, 1972) tra le popolazioni analizzate.

per la specie in Spagna. Il maggiore flusso genico che riguarda le popolazioni iberiche è probabilmente legato alla maggiore produzione di spore.

Sia dalla Genetic Distance che dalla PCA è possibile osservare una minore distanza genetica tra le popolazioni del Centro e Nord Italia. Queste formano un cluster compatto molto vicino alle popolazioni della penisola iberica.

Le popolazioni campane risultano geneticamente vicine tra loro e più vicine alle popolazioni croate che non alle altre popolazioni italiane. La minore distanza genetica delle popolazioni campane con quelle croate viene confermata anche dalla presenza in entrambe le aree geografiche dell'aplotipo deletato. Vista la scarsa presenza di sporofiti in queste aree che rende poco probabile un flusso genico mediato da spore e considerando le principali rotte migratorie degli uccelli in Europa dal Nord-Est Europa verso l'Africa, il flusso genico potrebbe essere forse anche addebitato al trasporto di propaguli dovuti agli uccelli (che hanno la capacità di trasportare sulle piume e sulle zampe foglie o parti di esse a lunga distanza), supportato da rare occasioni di dispersione a lunga distanza mediata da spore.

Gli aplotipi ritrovati in Turchia sono molto vicini a quelli croati, riflettendo la minore distanza geografica tra i siti.

Ritroviamo una ridotta distanza genetica anche tra Sicilia e Sardegna, ma il valore è poco significativo per l'esiguo numero di campioni analizzati.

Oltre alla popolazione di Castelvoturno per la quale è stato effettuato il campionamento su piccola scala, nelle altre 15 popolazioni analizzate soltanto in tre, Punta Tresino ed Amalfi in Campania e Peljesac in Croazia, abbiamo ritrovato entrambi gli aplotipi del *trnL*.

Le popolazioni si mostrano geograficamente isolate ma la distanza genetica appare debolmente correlata alla distanza geografica. L'isolamento geografico è dovuto probabilmente alla ridotta capacità di dispersione a grandi distanze dei propaguli asessuali che in questa specie rappresenta il principale mezzo di

dispersione. Questo aspetto insieme alla deriva genetica e l'accumulo di nuovi mutanti potrebbe portare quindi alla differenziazione geografica.

FILOGEOGRAFIA

L'aplotipo non deleto del *trnL* è ampiamente più diffuso e comune di quello deleto, e quindi putativamente quello ancestrale, risultato che coincide con quanto riportato in Grundmann et al. (2007). A sostegno dell'ipotesi della derivazione dell'aplotipo deleto, originatosi in seguito ad una delezione che ha modificato la struttura dell'introne tipica della specie, il *trnL* del muschio *Tortella flavovirens*, che studi filogenetici hanno indicato essere una specie filogeneticamente prossima a *P. squarrosa* (Spagnuolo et al., 1999; Grundmann et al., 2004), ha la stessa lunghezza dell'aplotipo non deleto e differisce solo per tre mutazioni puntiformi (Fig. 15).

Le tre popolazioni che mostrano entrambi gli aplotipi plastidiali (Amalfi, Punta Tresino, Peljesac) sono state analizzate separatamente al fine di verificare la capacità dei marcatori ISSR di individuare una maggiore distanza genetica tra gli individui con aplotipo *trnL* diverso, risultato emerso dal campionamento su piccola scala (Fig. 6 - Fig. 7).

Per tutti i tre siti nessun aplotipo ISSR è condiviso tra i campioni con *trnL* diverso, e l'analisi Neighbour-joining separa i campioni con diverso *trnL* in cluster o sub-cluster diversi in base solo ai dati ISSR.

Il cluster di Amalfi è diviso in due subcluster che corrispondono proprio ai due gruppi con diverso *trnL* (Fig. 9). Su 10 gametofiti campionati 3 presentano aplotipo deleto del *trnL*.

Nella popolazione di Peljesac, l'unico individuo con *trnL* deleto mostra una diversità maggiore dando origine da solo ad un cluster separato (Fig. 12).

Nel sito Punta Tresino, nell'ambito di una maggiore diversità genetica interna, la separazione sembra meno evidente ma comunque i campioni con *trnL* diverso

sono separati in subcluster diversi (Fig. 9).

La separazione degli individui con aplotipo plastidiale diverso dai dati ISSR risulta evidente se i diversi siti di campionamento sono analizzati singolarmente o entro una certa distanza fisica, come nel caso dei due siti campani. Questo dato però non emerge se si effettua un'analisi totale dei siti (Fig. 13) o anche se si analizzano insieme le sole tre popolazioni con entrambi gli aplotipi del *trnL* (Fig. 14): in questo caso gli individui sono raggruppati prevalentemente in base alla provenienza.

La Gene Identity (Nei, 1972) calcolata considerando come due popolazioni distinte gli individui con diverso aplotipo plastidiale, mostra un valore elevato (0.801) anche considerando tutti gli individui analizzati.

La maggiore distanza genetica tra i due gruppi (nessun aplotipo ISSR condiviso tra i campioni con *trnL* diverso, separazione in cluster o sub-cluster diversi) emerge dall'analisi ISSR in tutti i quattro siti che presentano entrambi gli aplotipi plastidiali. Questo, considerando l'aplotipo deleto quello derivato, ci fa pensare che la delezione sia un evento ancestrale all'interno della specie. Se fosse una delezione recente non ci aspetteremmo un simile risultato, se non ipotizzando che la mutazione provochi una segregazione all'interno della specie, ma al momento non ci sono evidenze a riguardo. Anche il "test for partition" (Koufopanou et al., 1997) effettuato sulla base dei polimorfismi condivisi non ha individuato una partizione in due gruppi che può far pensare ad un isolamento riproduttivo.

Il fatto che due set indipendenti di dati siano in grado di distinguere due gruppi all'interno di una popolazione porta a diverse ipotesi, tra le quali le più plausibili sono la possibile presenza all'interno della specie di due specie criptiche, oppure la presenza di due linee genetiche separate.

Uno degli indici molecolari più utilizzati in letteratura per individuare la presenza di specie criptiche, la Gene Identity di Nei (1972), mostra valori maggiori di 0.8 a qualsiasi scala di campionamento (Tab. 14). Solo per valori di

questo indice inferiori a 0.6 sono state ipotizzate specie criptiche nelle briofite (Shaw, 2000a; Fernandez et al., 2005).

	Gene Identity (Nei, 1972)
Castelvolturmo (griglia)	0.816
Punta Tresino	0.960
Tutte le popolazioni	0.801

Tabella 13 – Valori di Gene Identity (Nei, 1972) calcolati considerando come due popolazioni i campioni con diverso aplotipo plastidiale a diverse scale di campionamento.

Riguardo alla seconda ipotesi, bisogna ricordare che la distribuzione spaziale della diversità genetica in Europa e i pattern generali trovati in molti studi sono stati principalmente attribuiti agli effetti dell'ultima glaciazione durante il quaternario (Petit et al., 2003). I possibili rifugi in Europa durante la glaciazione, per le briofite ma non solo, sono stati riconosciuti nel Nord della Spagna/Sud Inghilterra, nei Balcani, nel sud Italia (Hewitt, 2004; Natcheva & Cronberg, 2003; Van der Velde & Bijlsma, 2003; Hedderson & Nowell, 2006). Naturalmente le cause demografiche e filogeografiche possono ritrovarsi anche in alcune caratteristiche della specie, come ad esempio le condizioni favorevoli alla stabilizzazione, la capacità di dispersione a lunga distanza, la tolleranza al disseccamento.

Anche se la separazione tra i due aplotipi del *trnL* dai dati ISSR risulta evidente solo se i diversi siti di campionamento sono analizzati singolarmente, mentre viene persa se si effettua un'analisi totale dei siti, l'ipotesi della presenza di due lignaggi non può essere scartata. Questa condizione può essere dovuta al forte isolamento geografico delle popolazioni, cioè alla maggiore distanza genetica tra gli individui provenienti da siti diversi rispetto alla attuale distanza genetica tra le due ipotetiche popolazioni originarie. Questo dato di isolamento geografico può sicuramente essere spiegato considerando la riproduzione quasi

esclusivamente asessuale della specie in esame. La mancanza di riproduzione sessuale, e quindi di produzione di spore responsabili della dispersione a lunga distanza, limita il gene flow e porta a una maggiore distanza genetica tra i siti come risultato della deriva genetica. Il dato può essere sicuramente collegato anche alla natura iper-variabile del marcatore utilizzato.

Tenendo anche conto delle caratteristiche di elevata resistenza e tolleranza al disseccamento della specie (il periodo della glaciazione è anche un periodo arido oltre che freddo), l'ipotesi più probabile al momento sembra che durante l'ultima glaciazione ci siano state più aree di rifugio in Europa. Dai dati presenti in letteratura per altre specie di muschi, queste zone di rifugio erano forse concentrate probabilmente in Spagna e nel centro del Mediterraneo (sud Italia e Balcani).

L'ipotesi è che proprio nel centro del Mediterraneo la delezione del *trnL* si è conservata sopravvivendo al bottleneck causato dalla glaciazione.

L'aplotipo deleto è probabilmente quello derivato, quindi sicuramente quello già meno frequente prima del Quaternario. Naturalmente il bottleneck causato dalle glaciazioni ha portato alla scomparsa maggiormente degli aplotipi meno frequenti, e l'aplotipo deleto ha trovato rifugio solo in una o in poche aree del centro del Mediterraneo. A sostegno di questa ipotesi c'è non solo la maggiore diffusione dell'aplotipo deleto del *trnL* nel centro del Mediterraneo, emersa sia dal nostro studio che dai dati riguardo la diffusione riportati in Grundmann et al. (2007), ma anche la maggiore diversità che gli individui con aplotipo plastidiale deleto mostrano rispetto a quelli non-deleti su scala locale (Tab. 10-11-12), che potrebbe indicare una presenza più antica di quell'aplotipo all'interno dell'area, e quindi che in quelle aree geografiche la popolazione "deleta" rappresenta la popolazione rifugio (Cronberg, 1998).

La minore diffusione dell'aplotipo plastidiale deleto in Europa rispetto a quello non deleto potrebbe essere dovuta alla minore dimensione della popolazione sopravvissuta che mostrava la delezione e alla minore capacità di sporificare e

quindi di dispersione a lunga distanza, ritrovata ancora oggi, in questa area rispetto, ad esempio, alla Penisola Iberica.

Un'ipotesi alternativa potrebbe essere la migrazione intercontinentale, cioè l'arrivo dell'aplotipo deleto, meno frequente, da un altro continente grazie ad un flusso genico a lunga distanza mediato da spore. Questa ipotesi appare meno probabile perché presuppone una significativa migrazione di spore in una specie caratterizzata da scarsa sporificazione.

Riguardo questa ultima ipotesi dati esistono solo per il continente Nord Americano. Uno studio condotto sulla specie (Grundmann et al., 2006) individua una chiara disgiunzione tra le popolazioni dell'Europa e del Nord America, che quindi esclude o comunque considera non significativo il possibile flusso intercontinentale di spore. Secondo gli autori i due cladi geneticamente isolati, ma morfologicamente indistinguibili, potrebbero rappresentare un esempio di speciazione o quasi speciazione criptica.

L'ipotesi non può comunque essere esclusa considerando che non è nota la frequenza degli sporofiti nella specie in passato, non essendoci dati riguardo la presenza e la frequenza dell'aplotipo deleto del *trnL* in altri continenti, ma soprattutto considerando la scarsa disgiunzione genetica ritrovata in molte specie di muschi tra popolazioni provenienti ad esempio dal vecchio e dal nuovo continente (McDaniel & Shaw, 2003; Shaw et al., 2003a), che hanno portato ad ipotizzare come non infrequente un massiccio flusso genico a lunga distanza mediato da spore.

Comunque bisogna ricordare che l'attuale localizzazione degli aplotipi non corrisponde necessariamente alle loro putative aree di rifugio. L'insediamento e l'estinzione di popolazioni avvengono probabilmente in modo frequente, portando quindi ad una complessa storia delle popolazioni sopravvissute.

CONCLUSIONI

Nel muschio clonale *Pleurochaete squarrosa* i differenti *patches* che formano una popolazione sono occupati da gruppi diversi di cloni. I cloni si presentano di dimensioni limitate, frammentati ed il grado di rimescolamento sembra correlato ad alcune caratteristiche ambientali del sito, in particolare substrato e microclima. Un substrato incoerente ed un clima arido sembrano favorire il rimescolamento tra i cloni, grazie al maggiore distacco di propaguli per frammentazione del gametofito.

La variabilità genetica si presenta generalmente elevata, indipendentemente dal sito e dalle modalità di campionamento. La frammentazione dei cloni e il rimescolamento durante la crescita vegetativa contribuisce all'elevata variabilità genetica evidenziata anche su piccola scala. Naturalmente altri fattori influiscono sui livelli di diversità, primo tra tutti il grado e la durata del recruitment, cioè l'ingresso di nuovi cloni da aree circostanti. La mutazione somatica, combinata con le modalità di riproduzione vegetativa tipiche della specie, sembra possa svolgere un ruolo importante nel mantenere alti livelli di diversità genetica, e potrebbe anche spiegare la presenza di genotipi differenti mescolati tra loro in spazi molto ridotti.

Una notevole variabilità genetica può quindi essere trovata anche nelle specie a prevalente riproduzione asessuale.

Il flusso genico mediato dai propaguli sembra funzionare bene a piccole distanze portando ad una bassa diversità tra gli individui di diverse aree a livello locale, su grandi distanze invece le popolazioni si mostrano geograficamente isolate. Gli aplotipi tendono a raggrupparsi principalmente in base alla provenienza a causa probabilmente della ridotta capacità di dispersione a grandi distanze dei propaguli asessuali che in questa specie rappresentano il principale mezzo di dispersione. La scarsa produzione di spore, quindi, insieme alla deriva genetica e l'accumulo di nuovi mutanti, potrebbe essere all'origine dell'isolamento

ritrovato. Il Mantel test ha comunque evidenziato una debole correlazione tra distanza genetica e distanza geografica.

In tutte le 16 popolazioni analizzate sono stati ritrovati soltanto due aplotipi del *trnL*. L'aplotipo "non delecto" è ampiamente più diffuso, mentre l'aplotipo "delecto", meno frequente, è concentrato soprattutto nel sud Italia. L'aplotipo delecto è probabilmente quello derivato in seguito ad una delezione che ha modificato la struttura dell'introne tipica della specie.

La maggiore distanza genetica ritrovata mediante l'analisi ISSR tra gli individui con aplotipo *trnL* diverso sembra dovuta alla presenza in Europa di due linee genetiche, geograficamente sovrapposte almeno nell'area del bacino del Mediterraneo. Queste si sarebbero originate durante le glaciazioni del Quaternario in seguito al *bottleneck* che ha relegato la specie in alcune aree rifugio. In una di queste aree, localizzata probabilmente nel centro del Mediterraneo, è sopravvissuto l'aplotipo delecto che ha originato una delle due linee genetiche.

Ampliare il numero di popolazioni analizzate al Nord Europa, ma anche verificare la presenza dell'aplotipo delecto del *trnL* in altri continenti, potrebbe sicuramente fornire elementi utili a sostegno dell'ipotesi avanzata oppure fornire nuove evidenze.

FIGURE

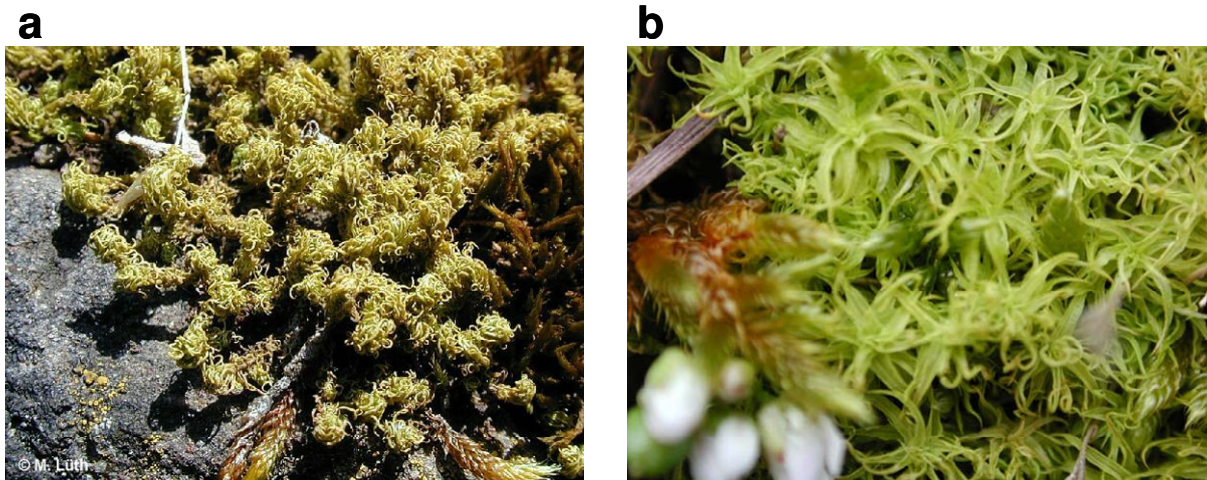


Figura 1 – Il muschio *Pleurochaete squarrosa* in condizioni di aridità (a) e in condizioni umide (b).



Figura 2 – Distribuzione della specie *Pleurochaete squarrosa* (<http://zipcodezoo.com/default.asp>).



Figura 3 – Distribuzione geografica delle 16 popolazioni campionate in Europa.

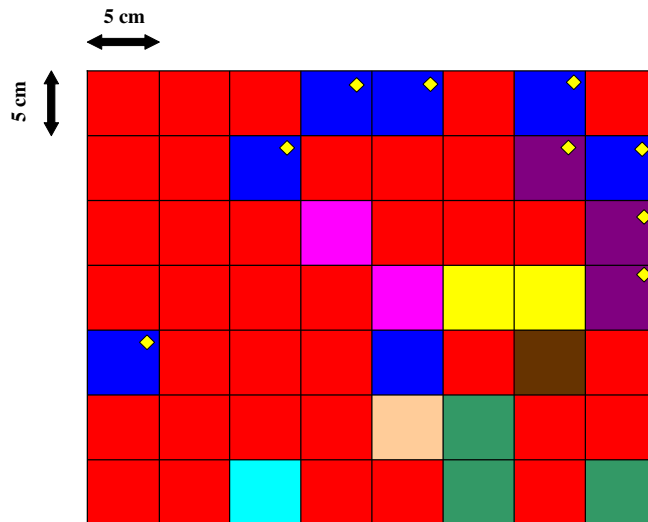


Figura 4 – Rappresentazione grafica della distribuzione dei 9 aplotipi all'interno della griglia di dimensioni 40x35 cm, con maglie di 5x5 cm. Stesso colore rappresenta stesso aplotipo ISSR.

◆ Gametofiti con aplotipo plastidiale deletto.

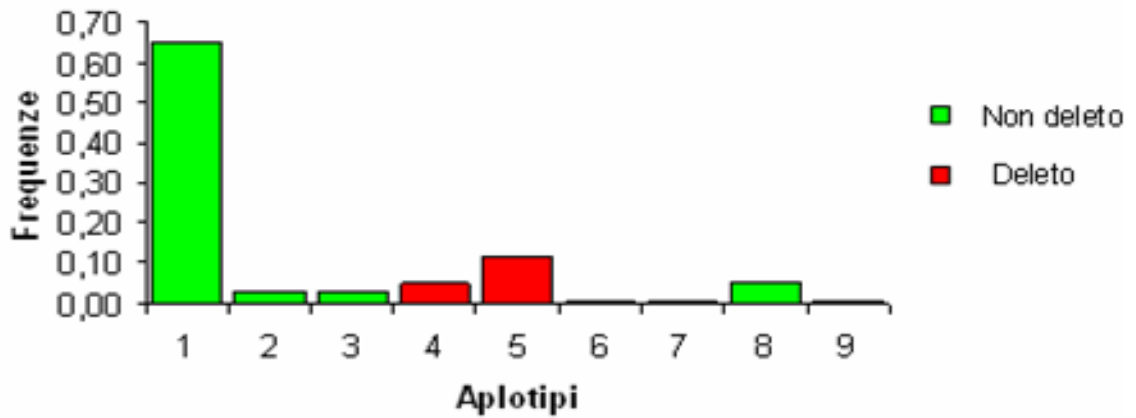


Figura 5 – Frequenza relativa dei 9 aplotipi ritrovati all'interno della griglia. Gli aplotipi ISSR che hanno diverso aplotipo *trnL* sono indicati con colori diversi.

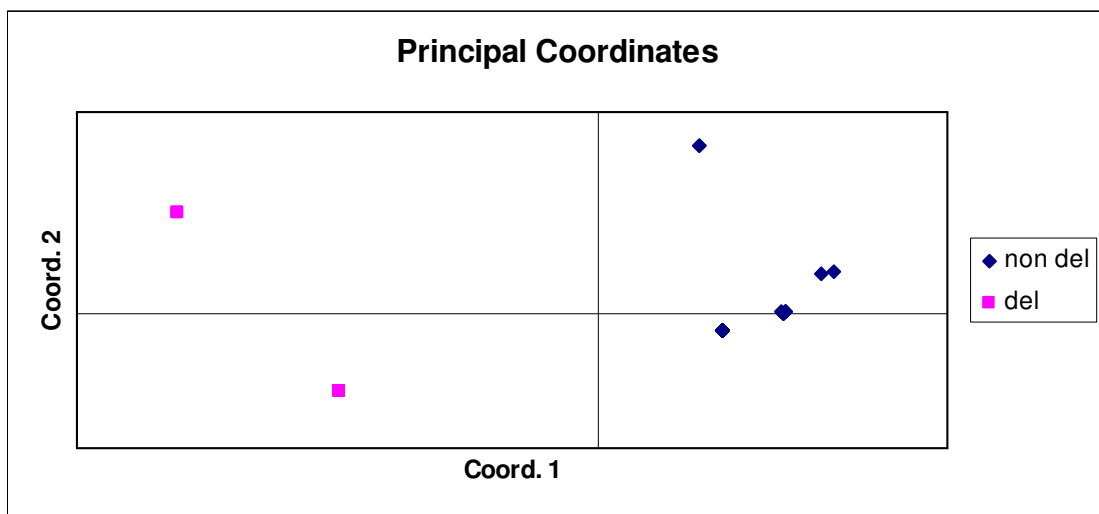


Figura 6 – Principal Coordinates Analysis dei 9 aplotipi evidenziati nei 56 gametofiti campionati all'interno della griglia 40x35 cm nel sito Castelvoturno.

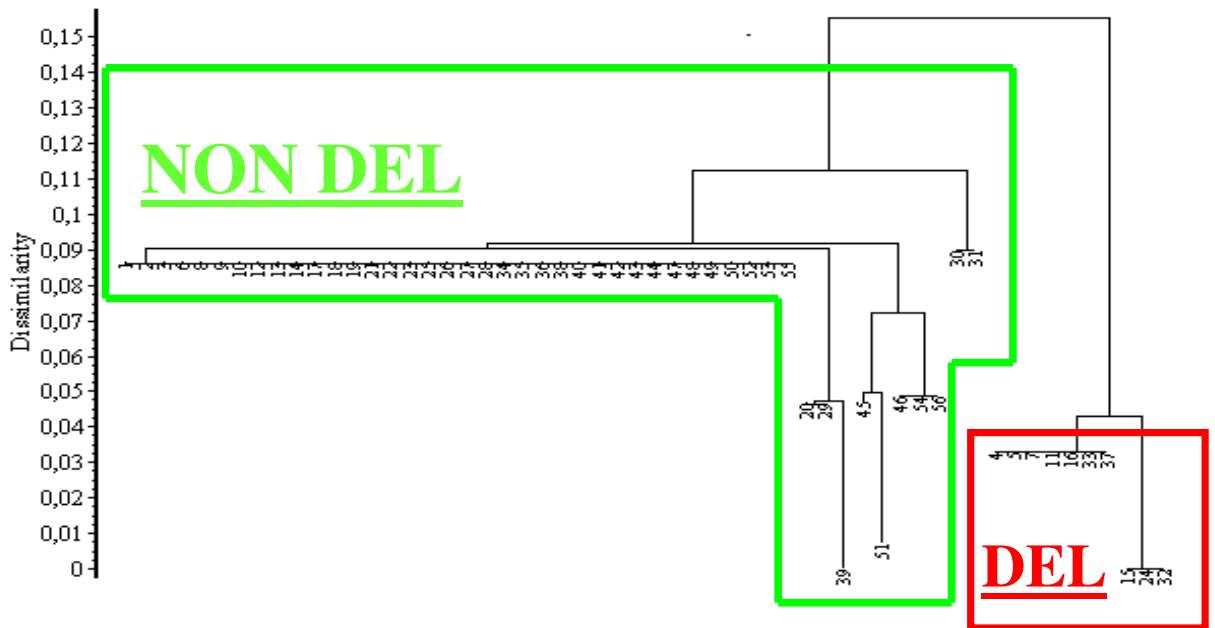


Figura 7 – Analisi Neighbour joining dei 56 gametofiti campionati all'interno della griglia nel sito Castelvoturno.

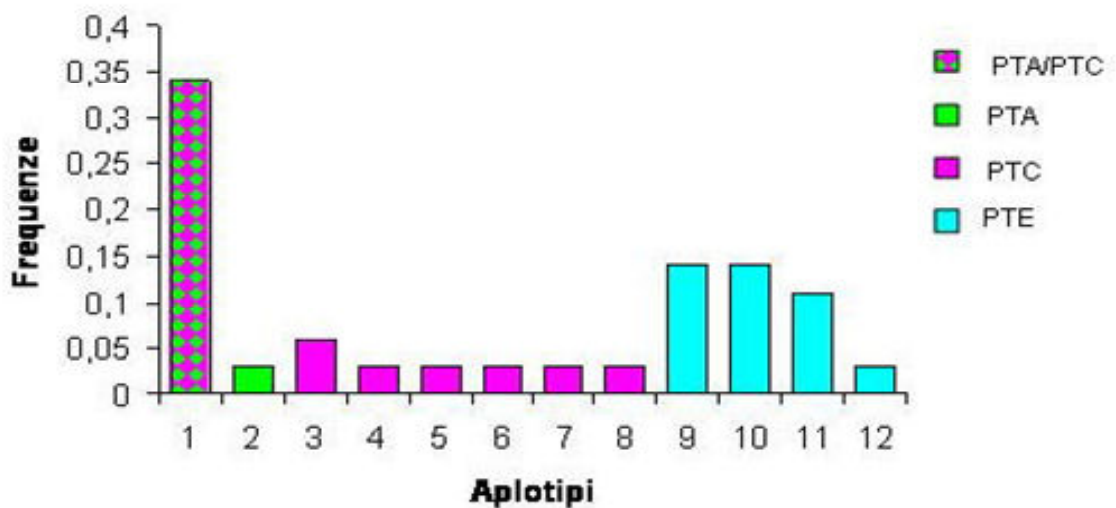


Figura 8 – Frequenze relative degli aplotipi ritrovati nel sito Punta Tresino.

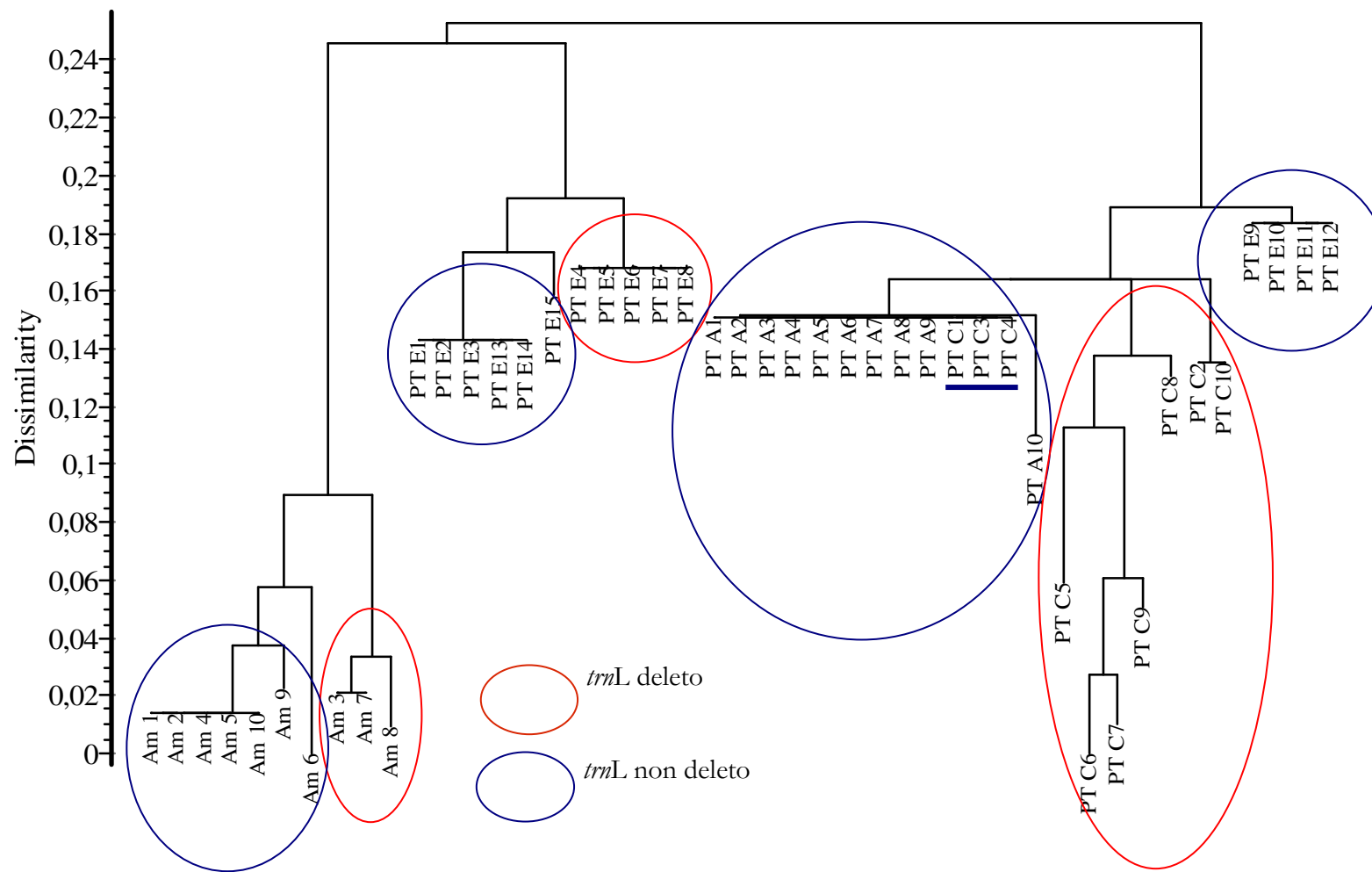


Figura 9 – Analisi Neighbour joining delle popolazioni di Punta Tresino ed Amalfi.

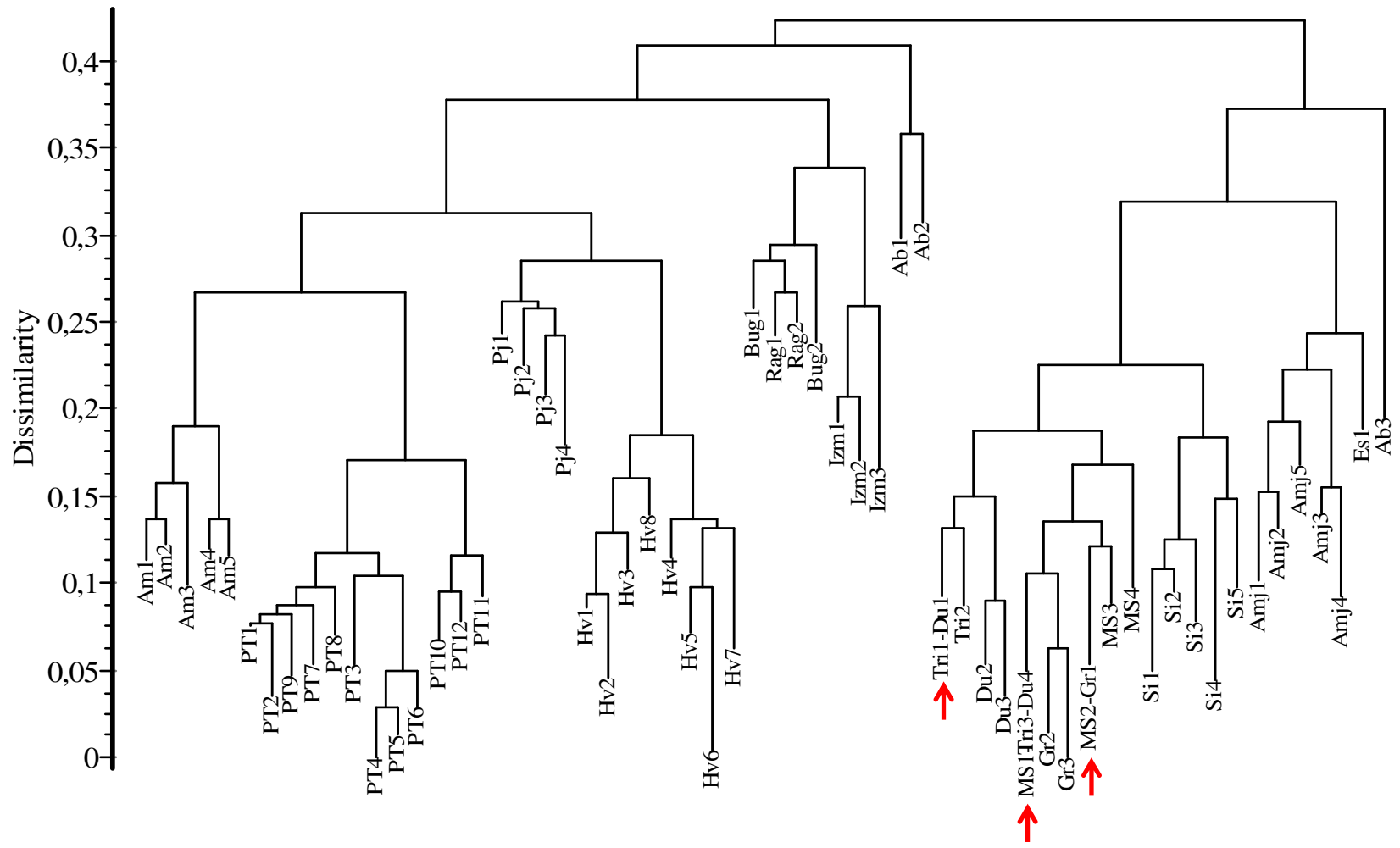


Figura 10 – Analisi Neighbour Joining condotta su tutti gli aplotipi ritrovati nelle 15 popolazioni analizzate. La freccia rossa indica gli aplotipi condivisi tra diverse popolazioni.

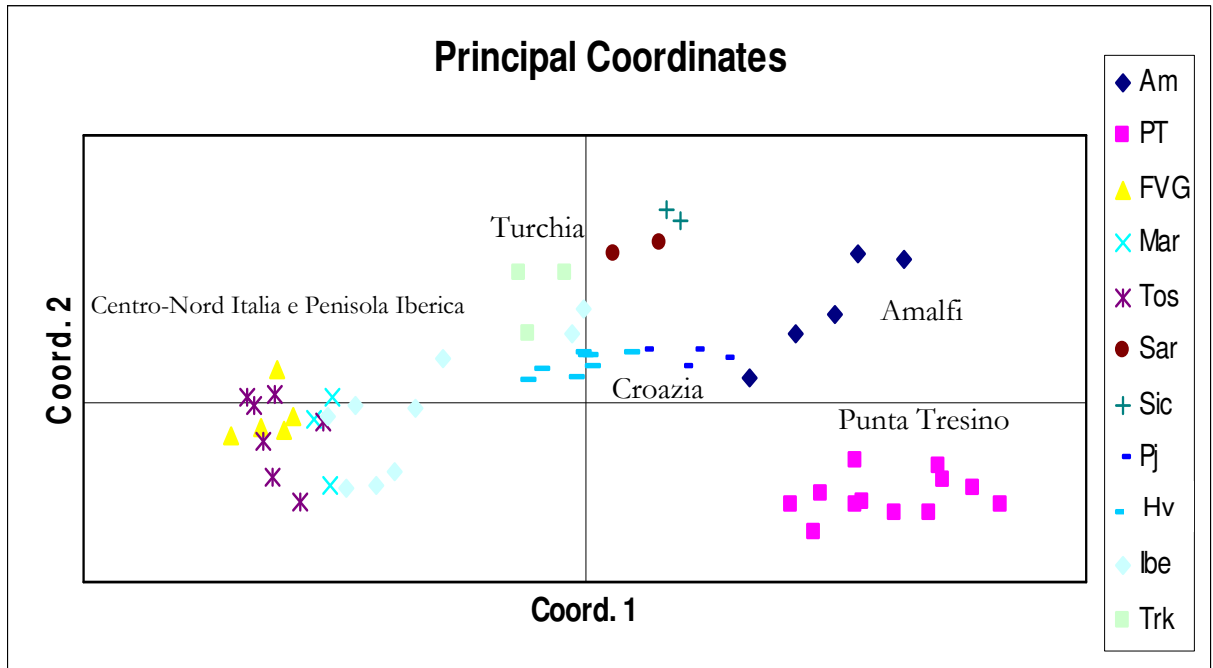


Figura 11 – Principal coordinates analysis di tutte le popolazioni.

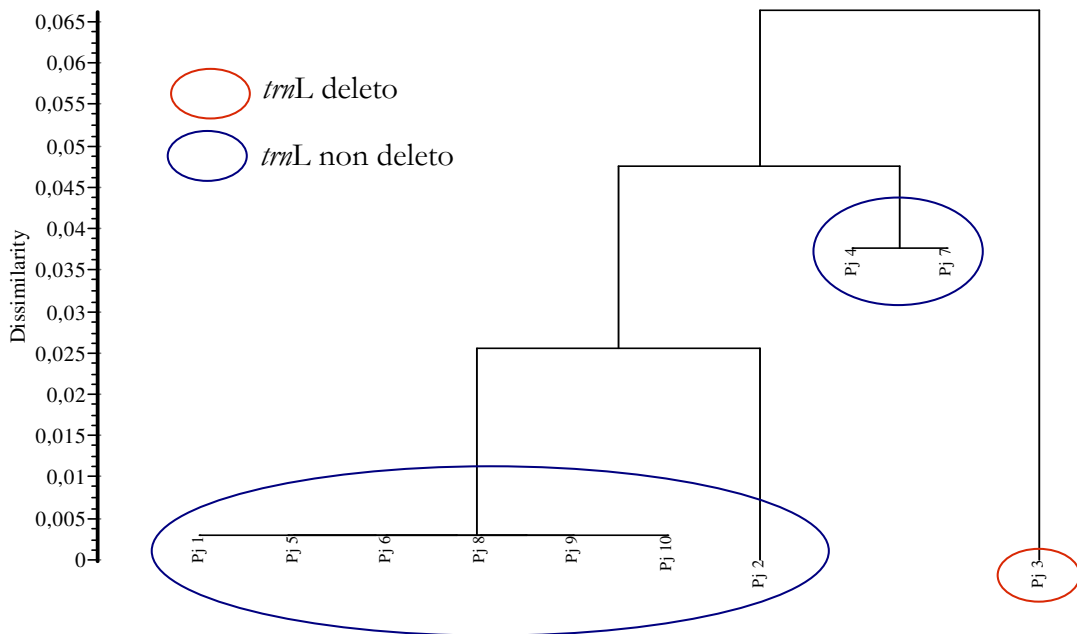


Figura 12 - Analisi Neighbour-joining della popolazione Peljesac.

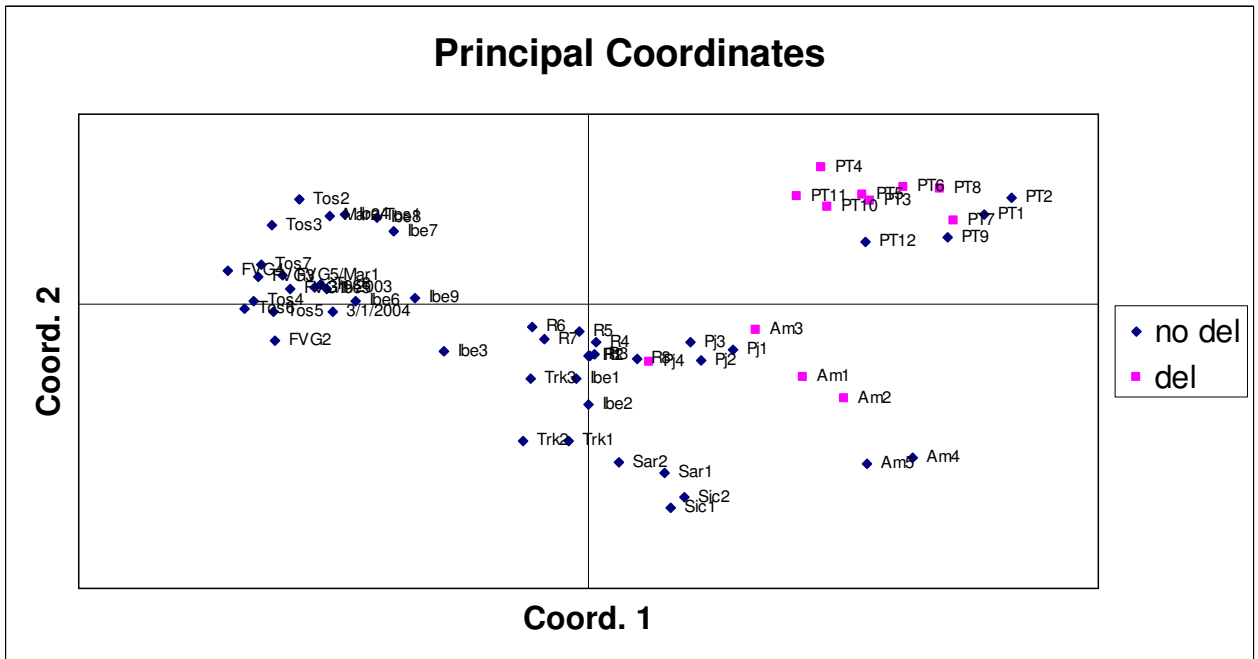


Figura 13 – Principal coordinates analysis di tutte le popolazioni campionate.

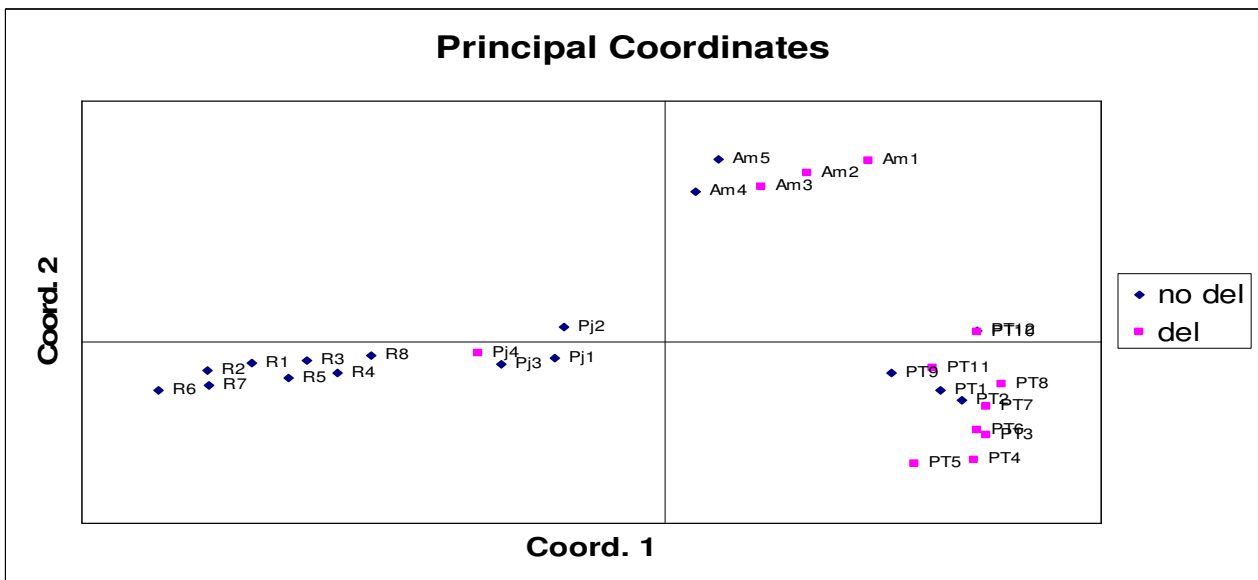


Figura 14 – Principal coordinates analysis delle tre popolazioni che presentano entrambi gli aplotipi plastidiali.

<i>P. squarrosa</i> non delete	AAATAATTTG AGCTTTGATA GAAAACTTA
<i>P. squarrosa</i> delete	AAATAATTTG AGCTTTGATA GAAAACTTA
<i>T. flavovirens</i>	AAATAATTTG AGCTTTGATA GAAAACTTA

TTAAATGCTA GCTTTCAGAT TCAGGGAAAC TTAGGTTGAA AAAAGTATAA
TTAAATGCTA GCTTTCAGAT TCAGGGAAAC TTAGGTTGAA AAAAGTATAA
TTAAATGCTA GCTTTCAGAT TCAGGGAAAC TTAGGTTGAA AAAAGTATAA

GCGATCCTGA GCCAAATTTT ACATTTAAAA AACAAAATAG GTGCAGAGAC
GCGATCCTGA GCCAAATTTT ACATTTAAAA AACAAAATAG GTGCAGAGAC
GCGATCCTGA GCCAAATTTT **C**ATTTAAAA AACAAAATAG GTGCAGAGAC

TCGATGGAAG CTATCCTAAC GCAAAAAGAT TTAAGAGTTA TTTAATAAAA
TCGATGGAAG CTATCCTAAC GCAAAAAGAT TTAAGAGTTA TTTAATAAAA
TCGATGGAAG CTATCCTAAC GCAAAAAGAT TTAAGAGTTA TTTAATAAAA

TTTTTTGATT TAATAAAAGA AAAAAATTC ATTAAAATTT TTTAATTTAC
-----AATTTAC
TTTTTTG**C**TT TAATAAAAGA AAAAAATTC ATTAA**C**TTT TTTAATTTAC

AAGCAAGGAT AAAGATAGAG TCCAATTTTA CATGTTAATT TTAACAACAA
AAGCAAGGAT AAAGATAGAG TCCAATTTTA CATGTTAATT TTAACAACAA
AAGCAAGGAT AAAGATAGAG TCCAATTTTA CATGTTAATT TTAACAACAA

TTTAAATTGT AGTAAAAAG **299**
TTTAAATTGT AGTAAAAAG **262**
TTTAAATTGT AGTAAAAAG **299**

Figura 15 - Allineamento delle sequenze della regione *trnL* del muschio *Pleurochaete squarrosa* e *Tortella flavovirens*.

BIBLIOGRAFIA

- Agapow P.M. & Burt A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1: 101-102
- Akiyama H. & Hiraoka T. (1994). Allozyme variability within and divergence among populations of the liverwort *Conocephalum conicum* (Marchantiales: Hepaticae) in Japan. *Journal of Plant Research* 107: 307-320
- Appelgren L. & Cronberg N. (1999). Genetic and morphological variation in the rare epiphytic moss *Neckera pennata* Hedw. *Journal of Bryology* 21: 97-107
- Barth S., Melchinger A.E., Lubberstedt T. (2002). Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heink investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (caps) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 11: 495–505
- Bennet K.D., Tzedakis P. C., Willis K. J. (1991). Quaternary refugia of North European trees. *Journal of Biogeography* 18: 103-115
- Bittkau C. & Comes H.P. (2005). Evolutionary processes in a continental island system: molecular phylogeography of the Aegean *Nigella arvensis* alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA. *Molecular Ecology*, 14: 4065–4083
- Blair, M. W., Panaud, O. & McCouch, S. R. (1999). Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 780–792
- Brown A. H. D., Feldman M. W., Nevo E. (1980). Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96:523-536
- Condit R. & Hubbell S.P. (1991). Abundance and DNA sequences of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66–71
- Cortini Pedrotti C., (2001). *Flora dei muschi d'Italia* (ed. Delfino A., Roma)

- Cozzolino S., Cafasso D., Pellegrino G., Musacchio A., Widmer A. (2000). Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation *Molecular Ecology* Vol. 12 Page 2783-2792
- Cronberg N. (1998). Population structure and interspecific differentiation of the peat moss sister species *Sphagnum rubellum* and *S. capillifolium* (Sphagnaceae) in northern Europe. *Plant Systematics and Evolution* 209: 139–158
- Cronberg N. (2002). Colonization dynamics of the clonal moss *Hylocomium splendens* on islands in a Baltic land uplift area: reproduction, genet distribution and genetic variation. *Journal of Ecology* 90: 925-935
- Cronberg N., Rydgren K., Okland R. H. (2006). Clonal structure and genet-level sex ratios suggest different roles of vegetative and sexual reproduction in the clonal moss *Hylocomium splendens*. *Ecography* 29: 95-103
- Crum H. A. & Anderson L. E., (1981). Mosses of Eastern North America Vol II. Columbia University Press, New York
- Cummins H. & Wyatt R. (1981). Genetic variability in natural populations of the moss *Atrichum angustatum*. *The Bryologist* 84: 30–38
- De Candolle (1820) *Geographie botanique*. In: *Dictionnaire des Sciences Naturelles*. pp 359-422
- Derda G.S. & Wyatt R. (1990). Genetic avriation in the common hair-cap moss *Polytrichum commune*. *Systematic Botany* 14: 155-167
- Deshpande A.U., Suresh H.S., Port A., Ranjeker P.K. (2001). Genetic diversity across natural populations of tree montane plant species from the Western Ghats, India, revealed by inter simple sequence repeats. *Molecular Ecology* 10: 2397–2408
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- During H. J. (1979). Life strategies of bryophytes: a preliminary review. *Lindbergia* 5: 2-18

- During HJ (1992). Ecological classification of bryophytes and lichens in a changing environment. Oxford Clarendon press: 1-31
- Esselman, E.J.; Jianqiang, L.; Crawford, D.J., Windus J. L., Wolfe A. D. (1999). Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*. 8: 443-451
- Estoup A., Jarne P., Cornute J.M. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591-1604
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2006). An integrated software for population analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland
- Fernandez C. C., Shevock J. R., Glazer A. N., Thompson J. N. (2006). Cryptic species within the cosmopolitan desiccation-tolerant moss *Grimmia laevigata*. *PNAS* 103: 637-642
- Fernández-Mendoza F, Estébanez B, Gómez-Sanz D, Ron E (2002). Sporophyte bearing specimens of *Pleurochaete squarrosa* in Zamora, Spain. *Cryptogamie Bryologie*, **23**: 211–215
- Freitas H. & Brehm A. (2001). Genetic diversity of the Macaronesian leafy liverwort *Porella canariensis* inferred from RAPD markers. *Journal of Heredity* 92: 339–345
- Gadgil M. & Solbrig O.T. (1972). The concept of r- and K-selection: evidence from wild flowers and some theoretical considerations. *American Naturalist* 106: 14–31
- Giordano S, Alfano F, Esposito A, Spagnuolo V, Basile A, Castaldo Cobiانchi R (1996). Regeneration from detached leaves of *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb. in culture and in the wild. *Journal of Bryology* 19:219–227

- Giordano S, Basile A, Spagnuolo V, Reça N, Castaldo Cobiñchi R (2002) Modulation of protonemal morphogenesis in *Bryum capillare* and *Pleurochaete squarrosa*: a comparison with the *Funaria hygrometrica* model system. *Plant Biosystem* 136: 101–108
- Giordano S., Sorbo S., Adamo P., Basile A., Spagnuolo V., Castaldo Cobiñchi R. (2004). Biodiversity and trace element content of epiphytic bryophytes in urban and extraurban sites of southern Italy. *Plant Ecology*: 170: 1-14
- Goffinet B. (2000). Origin and phylogenetic relationships of bryophytes. In A. Jonathan Shaw & Bernard Goffinet (Eds.), *Bryophyte Biology*, pp. 124-149 Cambridge: Cambridge University Press
- Grime J. P., Rincon E. R., Wickerson B. E. (1990). Bryophytes and plant strategy theory. *Botanical Journal of the Linnean Society* 104: 175-186
- Grundmann M., Ansell S.W., Russel S.J., Koch M.A., Vogel J.C. (2007). Genetic structure of the widespread and common Mediterranean bryophyte *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb. (Pottiaceae) — evidence from nuclear and plastidic DNA sequence variation and allozymes. *Molecular Ecology* 16: 709–722
- Grundmann M., Schneider H., Russell S.J., Vogel J.C. (2006). Phylogenetic relationships of the moss genus *Pleurochaete* Lindb.(Bryales: Pottiaceae) based on chloroplast and nuclear genomic markers. *Organisms, Diversity & Evolution* 6 33–45
- Gunnarsson U., Hassle K., Söderström L. (2005). Genetic structure of the endangered peat moss *Sphagnum angermanicum* in Sweden: a result of historic or contemporary processes? *Bryologist* 108: 194–203
- Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., Owen J.L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998–1006
- Hao G., Lee D.H., Lee J.S., Lee N.S. (2002). A study of taxonomical relationships among species of *Korean Allium* Sec. *Sacculiferum* (Alliaceae) and

related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica 43: 63-68

- Hassel K, Såstad S.M., Gunnarsson U., Söderström L (2005). Genetic variation and structure in the expanding moss *Pogonatum dentatum* (Polytrichaceae) in its area of origin and in a recently colonized area. American Journal of Botany 92: 1684–1690
- Haubold B., Travisano M., Rainey P. B., Hudson R. R. (1998). Detecting linkage disequilibrium in bacterial populations. Genetics 150: 1341-1348
- Hays J.D., Imbrie J., Shackleton N.J. 1976. Variations in the Earth's orbit: pacemaker of the ice ages. Science 194: 1121-1132
- Hedderson T. A. & Nowell T. L. (2006). Phylogeography of *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Br. Eur.; toward a reconstruction of glacial survival and postglacial migration. Journal of Bryology, 28: 283-292
- Hedderson T.A., Chapman R.L., Cox C.J. (1998). The origins and diversification of land plants: new evidence from molecules. In: Ashton, N.W., Bates J.W., Duckett J.G. (Eds.), Bryology for the Twenty-first Century. Maney, Leeds: 65-77
- Hewitt G. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. Biological Journal of the Linnean Society 68: 87–112
- Hewitt G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405: 907–913
- Hewitt G. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 359: 183–195
- Huang, J.C. & M. Sun (2000). Genetic diversity and relationship of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. Theoretical and Applied Genetics 100: 1050-1060

- Kapos V, Wandelli E, Camargo J, Ganade G (1997). Edge-related changes in environmental and plant responses due to forest fragmentation in central Amazonia. In: Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities (eds Laurance WF, Bierregaard RO Jr.), pp. 33–44. University of Chicago Press, Chicago
- Korpelainen H, Laitinen R, Pohjamo M. (2004). Lack of intraspecific variation in cpDNA in *Trichocolea tomentella*. Journal of Bryology 26: 221–222
- Koufopanou V., Burt A., Taylor J. W. (1997). Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. PNAS. USA 94: 5478-5482
- Laurance W.F., Diego P.S., Delamonica P., Fearnside P.M. (2001). Rain forest fragmentation and the structure of Amazonian liana communities. Ecology 82: 105-116
- Lewis L.A., Mishler B.D., Vilgalys R. (1997). Phylogenetic relationships of the liverworts (Hepaticae), a basal embryophyte lineage, inferred from nucleotide sequence data of the chloroplast gene *rbcL*. Molecular Phylogenetics and Evolution 7: 377-393
- Li A. & Ge S. (2001). Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. Annals of Botany 87: 585–590
- Longton R. E. (1997). Reproductive biology and life-history strategies. Advances in Bryology 6: 65-101
- Longton R.E. & Greene S.W. (1967). The growth and reproduction of *Polytrichum alpestre* Hoppe on South Georgia Island. Philosophical Transactions of the Royal Society B 252: 295-327
- Longton R.E.(1976). Reproductive biology and evolutionary potential in bryophytes. Journal of the Hattori Botanical Laboratory 41: 205-223
- Longton R.E.(1994). Reproductive biology in bryophytes. The challenges and the opportunities. Journal of the Hattori Botanical Laboratory 76: 159-172

- MacArthur R. H. & Wilson E. O. (1967). *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press, Princeton, N.J. 203 pp
- Magdefrau K. (1982). Life forms of Bryophytes. In: Smith A.J.E. (ed.) *Bryophyte ecology*, pp. 45-48. London, New York: Chapman and Hall
- Maynard Smith J., Smith N. H., O'Rourke M., Spratt B. G. (1993). How clonal are bacteria? *PNAS USA* 90:4384-4388
- McDaniel S.F. & Shaw J. (2003). Phylogeographic structure and cryptic speciation in the trans-antarctic moss *Pyrrhobryum mnioides*. *Evolution* 57: 205-215
- McDaniel S.F. & Shaw J. (2005). Selective sweeps and intercontinental migration in the cosmopolitan moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.)Brid. *Molecular Ecology* 14: 1121-1132
- McLellan, A.J., Prati, D., Kaltz, O. & Schmid, B. (1997). Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants. *The Ecology and Evolution of Clonal Plants* (eds H. de Kroon & J. van Groenendael), pp. 185–210. Backhuys, Leiden
- Meagher T.R. & Shaw A.J. (1990). Clonal structure of the moss *Climacium americanum* Brid. *Heredity* 64: 233-238
- Natcheva R. & Cronberg N. (2003). Genetic diversity in the populations of *Sphagnum capillifolium* (Ehrh.) Hedw. from the mountains of Bulgaria, and their possible refugial role. *Journal of Bryology* 25: 91–99
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-392
- Nei M., (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Nickrent D.L., Parkinson C.L., Palmer J.D., Duff R.J. (2000). Multigene phylogeny of land plants: hornworts are basal and mosses are sister to liverworts. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1885-1895

- Odrzykosky I.J. & Szweikowski J. (1991). Genetic differentiation without concordant morphological divergence in the thallose liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Systematics and Evolution* 178: 135-151
- Parsons B.J., Newbury H.J., Jackson M.T., Ford-Lloyd B.V. (1997). Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oriza sativa* L.) using different marker types. *Molecular Breeding* 3: 115–125
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295
- Petit R.J., Aguinagalde I., de Bealuiei J.L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohatny A., Müller-Starck G., Demesure-Musch B., Palmé A., Martin J.P., Rendell S., Vendramin G.G. (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563–1565
- Pianka E.R. (1970). On r- and K-selection. *American Naturalist* 104: 592–597
- Podani J., 2001. Syn-Tax 2000. Computer programs for data analysis in ecology and systematics. Scientia Publishing, Budapest
- Provan J., Soranzo N., Wilson N.J., Goldstein D.B., Powell W (1999). A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153: 943-947
- Quandt D. & Stech M. (2005). Molecular evolution of the *trnLUAA* intron in bryophytes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 429–443
- Quandt D. & Stech M., (2004). Molecular evolution and phylogenetic utility of the chloroplast *trnT-trnF* region in bryophytes. *Plant Biology* 6: 545–554
- Renzaglia K.S., Duff R.J., Nickrent D.N., Garbary D.J. (2000). Vegetative and reproductive innovations of early land plants: implications for a unified phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355: 769-793

- Robinson W.A., Liston A., Doescher P.S., Svejcar T. (1997). Using ISSR markers to quantify clonal vs sexual reproduction in *Festuca idahoensis* (Poaceae). *American Journal of Botany* 84: 89
- Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method : A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425
- Schaal B.A., Hayworth D.A., Olsen K.M., Rauscher J.T., Smith W.A. (1998). Phylogeography studies in plant: problems and prospect. *Molecular Ecology* 7: 465-474
- Selkirk P.M., Skotnicki M.L., Adam M.B., Connet T. (1997). Genetic variation in Antarctic populations of the moss *Sarconeurum glaciale*. *Polar Biology* 18: 344–350
- Shaw A. J. & Allen B. H. (2000). Phylogenetics relationships, morphological incongruence, and geographic speciation in the *Frontinalaceae* (Bryophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 225-237
- Shaw A. J. (2000b). Population ecology, population genetics, and microevolution. In: Shaw A. J. & Goffinet B. (Eds.) *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press, Cambridge pp: 369-402
- Shaw A. J., Cox C. J., Boles S. B. (2003b). Polarity of peatmoss (Sphagnum) evolution: who says mosses have no roots? *American Journal of Botany*, 90: 1777-1787
- Shaw A. J., Werner O., Ros R. M. (2003a). Intercontinental Mediterranean disjunct mosses: morphological and molecular patterns. *American Journal of Botany* 90: 540-550
- Shaw A.J. & Rooks P.E. (1994). Systematics of *Mielichhoferia* (Bryaceae: Musci). Morphological and genetic analysis of *M. elongata* and *M. mielichhoferiana*. *Bryologist* 97: 1-12
- Shaw A.J. & Schneider R.E. (1995). Genetic biogeography of the rare copper moss *Mielichhoferia elongate* (Bryaceae). *American Journal of Botany* 82: 8-17

- Shaw A.J. & Srodon M. (1995). Clonal diversity in *Sphagnum rubellum* Wils. Bryologist 298: 261-264
- Shaw A.J. (1993). Population biology of the rare copper moss *Scopelophila cataractae*. American Journal of Botany 80: 1034-1041
- Shaw A.J. (2000a). Molecular phylogeography and cryptic speciation in the mosses *Mielichhoferia elongata* and *M. mielichhoferiana* (Bryaceae). Molecular Ecology 9: 595-608
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. (2004). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. American Journal of Botany 91: 142–166
- Skotniki M.L., Ninham J.A., Selkirk P.M. (1998). Genetic diversity in the moss *Bryum argenteum* in Australia, New Zealand and Antarctica. Bryologist 101: 412-421
- Skotniki, M.L., Ninham, J.A. & Selkirk, P.M. (1999). Genetic diversity and dispersal of the moss *Sarconeurum glaciale* on Ross Island, East Antarctica. Molecular Ecology 8: 753-762
- Smith A. J. E., (1978). The Moss flora of Britain and Ireland. Cambridge University Press
- Snäll T., Fogelqvist J., Ribeiro Jr. P.J., Lascoux M. (2004). Spatial Genetic structure in two congeneric epiphytes with different dispersal strategies analysed by three different methods. Molecular Ecology 13: 2109-2119
- Spagnuolo V., Caputo P., Cozzolino S., Castaldo R., De Luca P. (1999). Patterns of relationships in *Trichostomoideae* (Pottiaceae, Musci). Plant Systematic and Evolution, 216: 69-79
- Spagnuolo V., Muscariello L., Cozzolino S., Giordano S., Castaldo Cobiانchi R. (2002). Polimorfismo di lunghezza del *trnL* (cpDNA) nel muschio *Pleurochaete squarrosa* (Brid) Lindb. Proceedings of annual congress of Società Botanica Italiana, Lecce (Italy), 24-26 September

- Spagnuolo V., Muscariello L., Terracciano S., Giordano S. (2007b) Molecular biodiversity in the moss *Leptodon smithii* (Neckeraceae) in relation to habitat disturbance and fragmentation. *Journal of Plant Research* 120: 595–604
- Spagnuolo, V., Muscariello, L., Cozzolino S., Castaldo Cobiauchi, R., Giordano S. (2007a). Ubiquitous genetic diversity in ISSR markers between and within populations of the asexually producing moss *Pleurochaete squarrosa*. *Plant Ecology* 188: 91-101
- Stearns S.C. (1976). Life-history tactics: a review of the ideas. *The Quarterly Review of Biology* 51: 3–47
- Stoneburner A., Wyatt R., Odrzykosky I.J. (1991). Applications of enzyme electrophoresis to bryophyte systematics and population biology. *Advances in Bryology* 4: 1-27
- Szövényi P., Hock Z., Schneller J.J., Tóth Z. (2007). Multilocus dataset reveals demographic histories of two peatmosses in Europe. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 144-157
- Szövényi P., Hock Z., Urmi E., Schneller J.J. (2006). Contrasting phylogeographic patterns in *Sphagnum fimbriatum* and *S. squarrosus* (Bryophyta, Sphagnopsida) in Europe. *New Phytologist*, 172: 784-794
- Szweykowski J, Buczkowska K., Odrzykoski I.J. (2005). *Conocephalum salebrosum* (Marchantiopsida, Conocephalaceae) - a new Holarctic liverwort species. *Plant Systematics and Evolution* **253**: 133-158
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of the chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994). ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680

- Thompson J.D. (1999). Population differentiation in mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity*, 82: 229-36
- Thompson J.D. (2005). *Plant Evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford
- Van der Velde M. & Bijlsma R. (2003). Phylogeography of five *Polytrichum* species within Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 78: 203–213
- Van der Velde M., Van de Zande L., Bijlsma R. (2001). Genetic structure of *Polytrichum formosum* in relation to the breeding system as revealed by microsatellites. *Journal of evolution Biology*, 14: 288–295
- Vanderpoorten A., Hedenäs L., Jacquemart A.L. (2003). Differentiation in DNA fingerprinting and morphology among species of the pleurocarpous moss genus, *Rhytidiadelphus* (Hylocomiaceae). *Taxon* 52: 229-236
- Vogel J.C., Rumsey F.J., Schneller J., Barrett J.A., Gibby M. (1999). Where are the glacial refugia in Europe? Evidence from pteridophytes. *Biological Journal of the Linnean Society* 66: 23–37
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Tingley S.B., (1990). Dna polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535
- Wilson P.J. & Provan J. (2003). Effect of habitat fragmentation on levels and patterns of genetic diversity in natural populations of the peat moss *Polytrichum commune*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences (London)* 270: 881–886
- Wolfe A.D. & Liston A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: *Plant Molecular Systematics II* (D.E. Soltis, P.S. Soltis, J.J. Doyle eds.), Kluwer: pp. 43–86
- Wolfe A.D., Xiang Q.Y., Kephart S.R. (1998). Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Molecular Ecology* 7: 1107–1125

- Wolfe K. H., Li W.H., Sharp P.M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 84: 9054-9058
- Wolff K., Zietkiewicz E., Hofstra H. (1995). Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 439–447
- Wu K.S. & Tanksley S.D. (1993). Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular and General Genetics* 241: 222–235
- Wyatt R. (1982). Population ecology of bryophytes. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 52: 179-198
- Wyatt R., Odrykoski I. J., Stoneburner A. (1989a). High levels of genetic variability in the haploidy moss *Plagiomnium ciliare*. *Evolution* 43: 1085-1096
- Wyatt R., Stoneburner A., Odrzykoski I.J. (1989b). Bryophyte isozymes: systematic and evolutionary implications. In Soltis D.E. & Soltis P.M. (Eds.), *Isozymes in Plant biology*: pp.221-234. Dioscoride press, Portland
- Zander R.H., (1993). Genera of the Pottiaceae: mosses of harsh environments. *Bulletin of the Buffalo Society of Natural Science* 32: 1-378
- Zartman C.E. & Shaw A.J. (2006). Metapopulation extinction thresholds in rainforest remnants. *The American Naturalist* 167, 177–189
- Zielinski R. (1987). Interpretation of electrophoretic patterns in population genetics of bryophytes. VI. Genetic variation and evolution of the liverwort genus *Pellia* with special reference to Central Europe territory. *Lindbergia* 12: 87-96
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.