

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA AVANZATA XXIII CICLO**

**“ Valutazione dello stato di conservazione di ambienti del  
Mediterraneo attraverso lo studio della variabilità  
genetica in popolazioni di muschi”**

**Dott.ssa Claudia Zingaretti**

Relatore

Ch.ma Prof.ssa

Simonetta Giordano

Coordinatore

Ch.mo Prof.

Luciano Gaudio

**ANNO ACCADEMICO 2009/2010**

# INDICE

PARTE I: INTRODUZIONE	Pag.6
1 <u>LE BRIOFITE</u>	Pag.6
1.1 Caratteristiche generali	Pag.6
1.2 Distribuzione ed ecologia	Pag.9
1.3 Ciclo riproduttivo	Pag.11
2 <u>GENETICA DI POPOLAZIONI</u>	Pag.14
2.1 Genetica di popolazioni: definizioni	Pag.14
2.2 Genetica di popolazioni: applicazioni all'ecologia delle briofite	Pag.18
3 <u>VARIABILITA' GENETICA</u>	Pag.28
3.1 Marcatori molecolari	Pag.28
3.2 Marcatori molecolari: utilizzo in studi di popolazione in briofite	Pag.32
4 <u>BIOMONITORAGGIO</u>	Pag.36
4.1 Biomonitoraggio: definizioni	Pag.36
4.2 Utilizzo delle briofite in studi di biomonitoraggio	Pag.37
PROGETTO DI DOTTORATO	Pag.39
PARTE II: MATERIALI E METODI	Pag.43
1 <u>LE SPECIE</u>	Pag.43
1.1 <i>Sphagnum palustre</i>	Pag.43
1.2 <i>Leptodon smithii</i>	Pag.46

2	<u>AREA DI STUDIO: <i>S. palustre</i></u>	Pag.48
2.1	Riserva Naturale Lago di Posta Fibreno (FR)	Pag.48
2.2	Riserva Naturale Lago di Sibolla (LU)	Pag.49
2.3	Riserva Naturale Lago di Massaciuccoli (LU)	Pag.49
2.4	Riserva Naturale Lagoni di Mercurago (NO)	Pag.50
3	<u>AREA DI STUDIO: <i>L. smithii</i></u>	Pag.51
3.1	Bosco di Capodimonte (NA)	Pag.51
3.2	Riserva Naturale Cratere degli Astroni (NA)	Pag.51
3.3	Ottati (SA)	Pag.52
3.4	Villa Patrizia (SI)	Pag.52
3.5	Belcaro (SI)	Pag.52
3.6	Cala Violina (GR)	Pag.52
4	<u>CAMPIONAMENTO: <i>S. palustre</i></u>	Pag.55
4.1	Campionamento Lago di Posta Fibreno (FR)	Pag.55
4.2	Campionamento Lago di Sibolla (LU)	Pag.55
4.3	Campionamento Lago di Massaciuccoli (LU)	Pag.56
4.4	Campionamento Lagoni di Mercurago (NO)	Pag.56
5	<u>CAMPIONAMENTO: <i>L. smithii</i></u>	Pag.58
6	<u>ESTRAZIONE DEL DNA</u>	Pag.61
6.1	Preparazione dei campioni	Pag.61
6.2	Protocollo di estrazione	Pag.61
7	<u>ISSR</u>	Pag.64
8	<u>ANALISI DEI DATI MOLECOLARI</u>	Pag.70
	<u>PARTE III: RISULTATI</u>	Pag.71
1	<i>SPHAGNUM PALUSTRE</i>	Pag.71
2	<i>LEPTODON SMITHII</i>	Pag.82

PARTE IV: DISCUSSIONE	Pag.96
1 <i>SPHAGNUM PALUSTRE</i>	Pag.96
2 <i>LEPTODON SMITHII</i>	Pag.104
CONCLUSIONI	Pag.112
BIBLIOGRAFIA	Pag.114

**Abstract:** This study investigated the genetic variation in moss populations related to environmental gradients.

- The genetic diversity and structure were studied in the endangered peatmoss *Sphagnum palustre* along a geographic gradient to evaluate its conservation status in Italy.

After the last glaciations, wet environments have undergone a swift degradation and fragmentation in Italy, due to direct and/or indirect effects of the human activity and today these environments are only found in very limited, marginal areas. These areas house rare plant species, exposed to a real extinction risk such as *Sphagnum* bogs.

In total, 138 shoots belonging to four populations of *S. palustre* from Lazio, Toscana, and Piemonte (centre-north Italy) were analyzed. Among these shoots 30 haplotypes were identified by 7 ISSR primers (7; MAN; OH; DAT; TE; CHR;HAD). There was genetic isolation among populations; particularly, Lazio shoots were isolated from Toscana and Piemonte ones; most of the genetic variation was found within populations from Toscana and Piemonte. The within population fixation index ( $F_{st}$ ) highlighted a clear relation between genetic and physic distances between populations and stressed the isolation of population from Lazio. A relict population model is suggested to explain the observed pattern. Based on the current knowledge of the species habitat requirements, life history, and the small population size, I conclude that the species will have an uncertain future in Italy.

- Bryophytes seem particularly suitable to investigate genetic diversity in relation to habitat disturbance due to their large employment as bioindicators. The genetic structure and diversity were analysed in six urban, extraurban and remote populations of *Leptodon smithii* in the Campania region (southern Italy) and in the Toscana region (central Italy).

A total of 180 individual shoots of *Leptodon smithii*, an epiphytic moss of *Quercus ilex*, a phanerogamic species of Mediterranean climax vegetation, were DNA extracted and amplified with 5 Internal Simple Sequence Repeat (ISSR) primers (17; 18; DAT; CHR;HAD), and 58 haplotypes were identified; 32 haplotypes belonged to populations from Campania and 26 belonged to populations from Toscana. An uneven distribution of haplotype number and frequencies was observed among sites, with a higher number of haplotypes and more homogeneous haplotype frequencies in the extraurban/remote populations for both regions. Molecular diversity indices were overall higher in the remote sites than in the urban ones and were higher in

Campania than in Toscana. The within population fixation index ( $F_{st}$ ) did not show any clear relation between genetic and physic distances among populations, but suggested a limited dispersal range for *L.smithii*'s spores for both regions.

The genetic structure was mainly affected by population size, wood structure and extent, and genetic drift consequent to habitat fragmentation and human-induced disturbance.

# **PARTE I: INTRODUZIONE**

## **1. LE BRIOFITE:**

### **1.1. Caratteristiche generali:**

Le Briofite, un gruppo di circa 10.000 specie, rappresentano l'anello di congiunzione fra piante acquatiche e terrestri; costituiscono, infatti, le più semplici piante che siano riuscite a vivere fuori dall'acqua alla quale, però, restano legate per esigenze riproduttive.

La loro comparsa sulla Terra risale al Devoniano. Infatti i più antichi fossili conosciuti che somigliano a Briofite risalgono a più di 400 milioni di anni fa; questa antica presenza sulla Terra è una misura del loro successo evolutivo (Shaw 1991).

Rappresentano piante di piccole dimensioni caratterizzate da un'organizzazione morfo-anatomica molto semplice, definite non vascolari in quanto prive di tessuti conduttori a parete lignificata.

Negli schemi tradizionali di organizzazione tassonomica dei vegetali, le Briofite costituiscono una divisione, Bryophyta, che comprende 3 classi: Muschi (Musci), Epatiche (Hepaticae) e Antocerote (Anthocerotae); le relazioni esistenti 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).

I Muschi rappresentano sicuramente il gruppo di Briofite più numeroso e diffuso. Hanno tallo cormoide con fusticino e foglioline che possono essere mono o bistratificate e presentare una nervatura mediana che non è mai in collegamento con un eventuale apparato di conduzione del fusticino.

La classe delle Epatiche viene divisa in due sottoclassi: le epatiche fogliose, con filloidi privi di nervatura centrale, e le epatiche tallose caratterizzate da un gametofito con aspetto nastriforme a morfologia dorsoventrale appiattito al suolo.

Alcune epatiche tallose presentano epidermide provvista di cuticola, con rivestimenti cerosi, interrotta da aperture non regolabili dette pori, funzionalmente simili a stomi rudimentali, ma privi di cellule di guardia e sempre aperti.

Le Antocerote rappresentano il gruppo di Briofite meno rappresentato; sono caratterizzate da gametofiti tallosi e da sporofiti a forma di corno e privi di seta, verdi e fotosintetizzanti con epidermide dotata di stomi muniti di cellule di guardia.

Le Briofite possono presentare corpo vegetativo talloso, simile a quello di molte alghe, o cormoide, cioè somigliante a quello delle piante superiori presentando una porzione assile chiamata cauloide, delle appendici espanse sessili, chiamate filloidi, e dei filamenti pluricellulari che consentono l'attacco al substrato, chiamati rizoidi; queste strutture (cauloide, filloidi e rizoidi) sono anatomicamente diverse da quelle corrispondenti nelle Tracheofite rispetto alle quali presentano soltanto qualche analogia strutturale e funzionale.

L'assorbimento e il trasporto dell'acqua e dei soluti avvengono soprattutto per capillarità e interessano tutta la superficie della pianta, assorbimento ectoidrico anche se in alcune specie la conduzione ectoidrica è affiancata dalla presenza di cordoni di idroidi, cellule allungate con pareti trasversali inclinate molto permeabili all'acqua che alla fine del loro sviluppo sono prive di nucleo e citoplasma. Intorno agli idroidi sono presenti i leptoidi, cellule allungate e vive,

con nucleo e citoplasma regrediti, che provvedono alla conduzione dei fotosintati.

Il ciclo ontogenetico delle Briofite viene definito aplo-diplonte eteromorfo in quanto presenta l'alternanza di una generazione aploide e una diploide diverse sia nella funzione riproduttiva che nell'aspetto. La generazione aploide prende il nome di gametofito perché è quella che produce i gameti; la generazione diploide è, invece, lo sporofito e produce, le spore.

Il gametofito rappresenta la generazione dominante, è autotrofo e conduce una vita indipendente, mentre lo sporofito, di dimensioni generalmente ridotte, presenta una vita più breve e rimane attaccato al gametofito dal quale riceve nutrimento, questa rappresenta un'enorme differenza rispetto alle piante vascolari nelle quali lo sporofito rappresenta la generazione dominante.

Il gametofito è rappresentato da due fasi distinte: il protonema, prodotto direttamente dalla germinazione delle spore, ed il gametofito adulto che nei muschi è sempre foglioso.

Nel gametofito dei muschi sono comuni due forme di crescita (Meusel 1935, Gimmingham & Birse 1957, Barkman 1958, Magdefrau 1969); una prima, che identifica i gametofiti acrocarpi, in cui i gametofiti sono eretti e poco ramificati e, di solito, portano gli sporofiti in posizione apicale, ed una seconda, che identifica i gametofiti pleurocarpi, caratterizzata da gametofiti molto ramificati, di aspetto piumoso con portamento strisciante e sporofiti inseriti lateralmente.

Lo sporofito, invece, è costituito da un piede basale che penetra nei tessuti del gametofito, mediante il quale trae nutrimento dal gametofito stesso e da un peduncolo, detto seta costituito da cellule idroconduttrici, all'apice del quale è presente una capsula o sporangio,

in cui avviene la meiosi e vengono prodotte le spore aploidi. A maturità la capsula si apre, in genere con meccanismi di deiscenza regolati da meccanismi igroscopici e libera le spore nell'aria.

Lo sporofito rappresenta la generazione che meglio realizza la conquista dell'ambiente aereo; infatti molte briofite sono prive di cuticola di rivestimento, ma gli sporofiti di antocerote e muschi sono provvisti di cutina e rivestimenti cerosi, per ridurre l'evaporazione, e di stomi che assicurano gli scambi gassosi. In alcuni muschi gli stomi sono costituiti da un'unica cellula di guardia a forma di ciambella con una struttura molto diversa rispetto alle piante vascolari. Nelle antocerote gli stomi si differenziano progressivamente così come lo sporofito e come le spore stesse, mentre nei muschi e nelle epatiche le spore si formano e maturano tutte simultaneamente nelle antocerote esse maturano prima all'apice e poi alla base dello sporofito.

### **Distribuzione ed ecologia:**

Le Briofite sono ampiamente diffuse in tutti i continenti in particolare nelle regioni circumpolari dove, a volte, rappresentano, insieme ai licheni, la forma vegetale dominante.

A causa della loro semplicità morfologica, delle scarse esigenze nutrizionali, dell'elevata capacità di resistere all'essiccamento, infatti, esse sono in grado di colonizzare gli ambienti più disparati, caratteristica, questa, che rende la loro ecologia notevolmente complessa e non riconducibile ad un modello unico.

In condizioni estreme, infatti, possono rimanere in uno stato di vita latente (criptobiosi) per anni, e sono capaci di riprendere rapidamente le loro attività fisiologiche al ripristinarsi delle condizioni favorevoli di umidità. Sono molte, infatti, 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.

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, possono, inoltre, rapidamente colonizzare un suolo coperto solo di cenere dopo un incendio e impedirne il dilavamento ad opera degli agenti atmosferici. Un esteso tappeto di muschi, infatti, 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 singoli gametofiti e tra gametofiti adiacenti; in questo modo si rallenta il deflusso delle acque piovane difendendo il suolo dal processo di erosione.

I muschi, insieme ai licheni, sono i vegetali che colonizzano anche le regioni terrestri più estreme, in condizioni di vita acquatica e poca luminosità hanno capacità adattative superiori a qualsiasi altro concorrente. Li troviamo, infatti, dalle zone artiche fino ai tropici, dagli ambienti fortemente illuminati a quelli in piena ombra, dagli ambienti aridi e desertici a quelli acquatici, 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 ombreggiati.

Le Briofite possono, inoltre, svilupparsi su diversi substrati in base ai quali vengono suddivise in: epifite, epilite ed epigee. Le prime sono piante il cui ciclo vitale si svolge prevalentemente sopra altre piante, ma nonostante ciò, non ne sono parassite, le seconde formano estesi

rivestimenti sulle rocce asciutte esposte al sole. Le briofite epifite, insieme con le specie epilite, sono spesso utilizzate come bioindicatori o bioaccumulatori di elementi in traccia essendo capaci di assorbire acqua e altri nutrienti direttamente dall'atmosfera ed in quanto indipendenti dal substrato per l'accumulo di nutrienti (Bargagli 1998). Le ultime crescono, invece, su substrato terroso.

A causa del loro peculiare ciclo vitale, e della loro strategia di vita tollerante condizioni ambientali estreme, le Briofite possono essere considerate un interessante modello alternativo per comprendere le basi dei processi biologici nelle piante (Shaw 1991).

### **Ciclo riproduttivo:**

Le Briofite comprendono specie che si riproducono sia sessualmente che asessualmente.

La riproduzione sessuale avviene per oogamia.

Le spore vengono liberate dalla capsula dello sporofito, in seguito al distacco di un piccolo coperchio (opercolo); in condizioni di umidità favorevole da una spora aploide si origina una struttura giovanile; il protonema che aderisce al substrato grazie all'azione dei rizoidi (fig. 1). Dalla rete protonemica si possono differenziare centinaia e persino migliaia di individui o gametofiti. Questo apparato costituisce un'unità clonale definita *genet*, comprendente un gran numero di gametofiti geneticamente identici e al tempo stesso destinati a diventare indipendenti l'uno dall'altro, denominati *ramets* (Cronberg 2002).

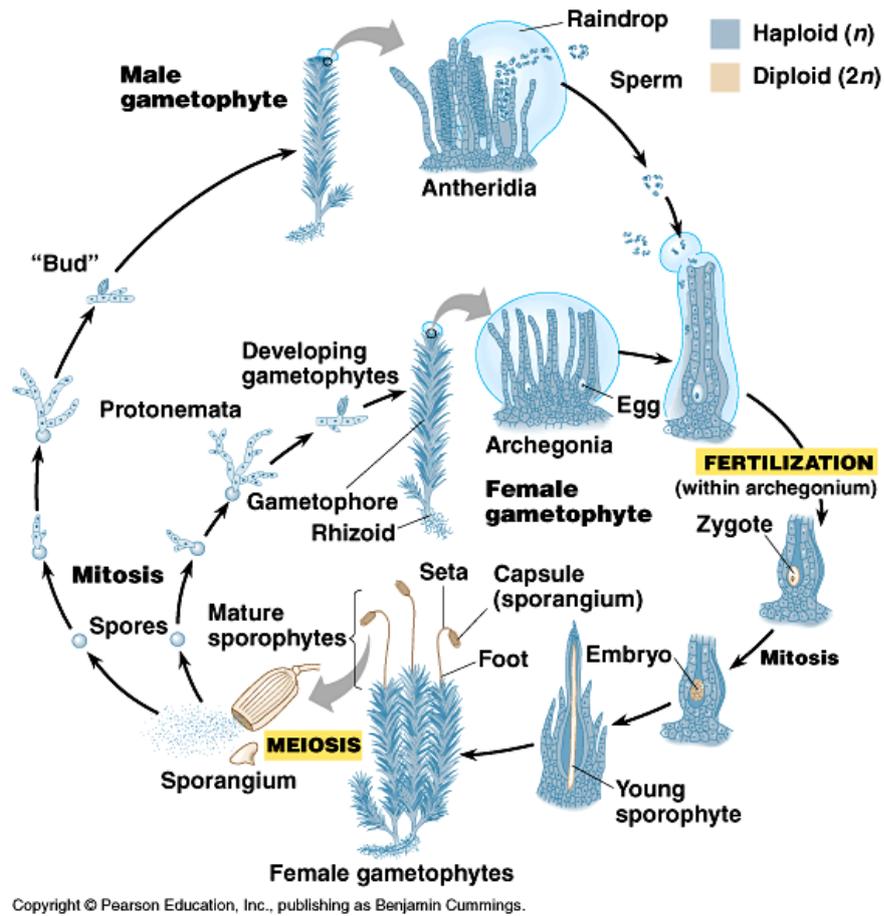


Fig. 1: Ciclo vitale di un muschio

La frequenza degli sporofiti varia notevolmente tra le diverse specie di Briofite. During (1979, 1992) ha sottolineato che le specie con strategie di vita contrastanti, come i “colonizzatori” e le “specie stanziali”, tendono ad avere, rispettivamente, un’alta ed una bassa frequenza di sporofiti. Le specie perenni (stanziali) presentano, infatti, 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).

Le Briofite presentano anche un'elevata capacità di propagazione clonale che si realizza attraverso diversi meccanismi che, generalmente, coinvolgono il gametofito.

Un primo meccanismo si realizza attraverso la crescita orizzontale di fusti sotterranei (rizomi) o di un protonema secondario; entrambe le strutture possono dare origine ad una nuova serie di piante geneticamente identica e vicino alla pianta madre. Un secondo, ma non meno importante, meccanismo si realizza attraverso il distacco di frammenti e di propaguli specializzati (Anderson 1980, During 1990). Tutti i propaguli sono aploidi, suggerendo che la riproduzione asessuale si concretizza ancora in una progenie (risultato della mitosi) sempre identica al genitore, ma non necessariamente vicina alla pianta madre.

Questa scelta riproduttiva, se rigidamente eseguita, restringe di molto le possibilità delle popolazioni di adattarsi a condizioni diverse.

La propagazione vegetativa è il mezzo più importante di dispersione a lunga distanza nelle specie dioiche in cui la formazione delle spore è limitata dalla distanza tra i gametofiti maschili e femminili se tale distanza è maggiore di 2 metri, infatti, non c'è fertilizzazione (Shaw 2000).

Se si paragonano gli organismi clonali con quelli a riproduzione sessuale obbligatoria si nota una struttura genetica totalmente diversa (Murawski & Hamrick 1990; Shapcott 1995; McFadden 1997) che, naturalmente, avrà profonde conseguenze sull'evoluzione e sull'ecologia delle specie coinvolte (Schmid 1990; Callagan et al. 1992; Cofforth & Lasker 1998).

## **2. GENETICA DI POPOLAZIONI**

### **2.1 Genetica di popolazioni: definizioni**

Un contributo significativo all'ecologia molecolare delle briofite viene dalla genetica di popolazioni.

La genetica di popolazioni è quel campo della genetica che studia 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), possono fornire dati interessanti sulle dinamiche vegetazionali, sulla biodiversità, sullo stato di salute degli ecosistemi e permettere di predire con buona probabilità le sorti stesse della comunità, implementando la realizzazione di piani idonei alla conservazione di particolari specie e dell'ambiente (Wyatt 1992).

La biodiversità molecolare 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 in senso classico, generalmente, fa riferimento al numero di specie presenti e alla loro frequenza e copertura; a livello intraspecifico, la biodiversità classica si riferisce alla presenza di varietà, mentre la biodiversità molecolare si riferisce 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 i mutamenti che si verificano nelle condizioni ambientali.

In questa disciplina, la prospettiva si concentra su una popolazione mendeliana, ossia su di un gruppo di individui interfertili, che condividono un insieme di geni assortiti mediante incroci casuali. La somma degli alleli di tutti i geni degli individui di una popolazione mendeliana, costituisce il pool genico.

Lo studio della composizione di una popolazione mendeliana dal punto di vista genetico, viene effettuato calcolando le frequenze genotipiche ed alleliche all'interno di essa. Una frequenza può essere espressa in percentuali o con un numero compreso tra 0 ed 1. Nella maggior parte dei casi i genetisti utilizzano le frequenze degli alleli per descrivere un pool genico; tale approccio è essenziale per una corretta comprensione dell'evoluzione intesa come il cambiamento progressivo subito dalle frequenze alleliche nelle popolazioni.

Alla base della genetica di popolazioni c'è la legge di Hardy-Weinberg.

Nel 1908 G. H. Hardy e W. Weinberg introdussero il concetto di "popolazione in equilibrio"; ossia di una popolazione all'interno della quale né le frequenze alleliche né la distribuzione dei genotipi mutano col succedersi delle diverse generazioni; una popolazione nella quale, di conseguenza, non si avrebbe evoluzione.

Una popolazione resta in equilibrio solo se in essa si verificano le seguenti condizioni:

- non devono verificarsi mutazioni;
- non deve verificarsi un flusso di geni tra popolazioni;
- la popolazione deve essere ampia (teoricamente infinita);
- non si deve verificare selezione naturale (tutti i genotipi devono possedere le stesse capacità adattative e riproduttive).

Soddisfatte tali condizioni, le frequenze alleliche all'interno di una popolazione, rimarranno costanti per un periodo di tempo indefinito.

Tale equilibrio è espresso dalla seguente equazione:

$$(p + q)^2 = 1$$

da cui:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Dove p indica la frequenza di un allele e q quella dell'altro allele. L'espressione  $p^2$  indica la frequenza di individui omozigoti per l'allele p;  $q^2$ , la frequenza di individui omozigoti per l'allele q e  $2pq$  la frequenza degli eterozigoti.

Il venir meno di una o più di queste condizioni determina un cambiamento delle frequenze alleliche, cioè un'evoluzione.

Per la legge di Hardy-Weinberg, i mutamenti evolutivi a carico di una popolazione sono governati dai cinque fattori seguenti:

1. **Selezione naturale:** agisce sul fenotipo che è determinato dall'interazione del genotipo con l'ambiente in cui l'individuo vive. Affinché ci sia una reale evoluzione, è necessario che compaiano delle variazioni nell'individuo: in questo modo esso potrà adattarsi meglio all'ambiente che lo circonda. Si parla di fitness darwiniana, invece, quando ci si riferisce alla capacità riproduttiva di un dato genotipo.
2. **Mutazioni:** forniscono il materiale grezzo per il cambiamento. Ma le frequenze di mutazione sono generalmente così basse che, di per sé, le mutazioni non determinano la direzione del cambiamento evolutivo.

3. **Flusso genico:** (movimento di alleli verso l'interno o verso l'esterno del pool genico) può introdurre nuovi alleli o alterare la proporzione di quelli già presenti. Controbilancia spesso la selezione naturale.

4. **Deriva genica:** il fenomeno per cui certi alleli aumentano o diminuiscono di frequenza e, talvolta, scompaiono come risultato di eventi casuali, è un evento che si verifica nelle popolazioni di piccole dimensioni.

Vi sono esempi di deriva genica che si verificano con maggiore facilità nelle popolazioni molto piccole, essi sono:

- L'effetto del fondatore:

Si verifica quando piccole o piccolissime popolazioni, o parti di una popolazione più grande, colonizzano un nuovo ambiente. I colonizzatori possono portare con sé un campione incompleto del pool genico parentale. Nella nuova area colonizzata, pertanto, è possibile riscontrare, con frequenza elevata, individui portatori di geni rari, persino una certa frazione di eterozigoti o addirittura geni disadattativi.

Tale principio, come pure quello della deriva genica, è stato rifiutato dalla scuola darwiniana adducendo come giustificazione il fatto che in natura sarebbero poco frequenti le piccole popolazioni, presupposto indispensabile perché i suddetti processi si possano realizzare. Oggi, al contrario, numerosi studi hanno dimostrato come, a causa della frammentazione degli habitat, la maggior parte delle specie siano suddivise in piccole o piccolissime popolazioni considerate unità evolutive indipendenti (Pharo & Zartman 2007). Conseguenza dell'effetto del fondatore è la perdita di eterozigoti nelle nuove

popolazioni dovuta a fenomeni di inincrocio (inbreeding) tra i suoi componenti.

- Bottleneck:

Si verifica quando una popolazione viene drasticamente ridotta in numero da eventi non collegati con la selezione naturale. Questo evento porta a una riduzione degli alleli.

**5. Accoppiamento non casuale:** provoca cambiamenti nelle proporzioni dei genotipi, ma può anche non influire sulle frequenze alleliche.

Vi sono alcuni meccanismi che permettono invece di mantenere o incrementare la variabilità.

La variabilità genetica nelle popolazioni, infatti, viene garantita dalla riproduzione sessuata e dai meccanismi che favoriscono l'esoincrocio, come gli alleli per l'autosterilità e gli elementi anatomici che impediscono l'autofecondazione nelle piante.

## **2.2 Genetica di popolazioni: applicazioni all'ecologia delle briofite.**

Gli studi di genetica di popolazioni applicati alle Briofite, offrono la possibilità di verificare:

- a) se in queste piante i livelli di biodiversità sono paragonabili a quelli delle tracheofite;
- b) se nelle briofite con distribuzione intercontinentale vi è una differenziazione molecolare tra le popolazioni disgiunte;
- c) se, ed in che modo, la biodiversità è correlata a gradienti ecologici.

La variabilità genetica non è un parametro fisso per ciascuna specie. Nelle briofite la diversità genetica intra-specifica è stata correlata a tre eventi:

- Riproduzione sessuata;

- Mutazione somatica;
- Temporalità del “recruitment” (cioè dell’ingresso di nuovi genotipi/pool genici nella colonia, sotto forma di spore o propaguli) rispetto alle fasi di crescita della popolazione considerata (Skotniki et al. 1998 e 1999; Cronberg 2002).
- Riproduzione sessuata: 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 2 mt (Shaw, 2000). La dispersione delle spore e forse anche dei gameti, può essere maggiore nei muschi epifiti, anche se la densità dei forofiti può condizionare l’ampiezza del raggio di dispersione (Spagnuolo et al., 2007b).
- Mutazione somatica: ci si può aspettare che le popolazioni di organismi clonali, dominate dalla nascita e dalla morte dei ramets prodotti dalla riproduzione asessuale, spesso consistano in un ridotto numero di genets e perciò esibiscano un basso livello di variabilità genetica (Silander 1985; Silvertown 1987; Widen et al. 1994).

Contrariamente a quanto atteso, molti studi non osservano una marcata riduzione dei livelli di variabilità genetica all’interno di tali popolazioni (Ellstrand & Roose 1987; Hamrick & Godt 1990; Widen et al. 1994; Spagnuolo et al. 2007a).

Questi risultati non possono far escludere la mutazione somatica come ipotetica fonte della variabilità riscontrata.

Esempi derivano dagli studi condotti sui muschi clonali antartici *Sarconerum glaciale* e *Bryum argenteum* (Skotniki et al. 1999); per queste specie gli autori ipotizzano che la variabilità, rilevata con

marcatori RAPD, sia sostenuta dalla stessa riproduzione vegetativa oltre che dalla mutazione somatica (Skotniki et al. 1998).

La presenza di un alto livello di variabilità genetica nelle specie di muschi a crescita clonale è stata ulteriormente verificata da diversi studi con differenti marcatori molecolari (Akiyama 1999; Appelgren & Cronberg 1999; Cronberg 2002; Cronberg et al. 2003; Gunnarson et al. 2005; Skotniki et al. 1998, 1999; Zouhair et al. 2001).

Temporalità del “recruitment”: per quanto riguarda la temporalità del “recruitment” rispetto alle fasi di crescita e sviluppo di una colonia, 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 sue fasi di sviluppo e crescita, 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.

Inoltre studi su *Hylocomium splendens* hanno dimostrato che un continuo “recruitment” produce un aumento del numero di cloni e del livello di variabilità genetica (Cronberg 2002).

Quindi l’ingresso di nuovi individui all’interno di una colonia rappresenta uno dei meccanismi alla base dell’incremento del flusso genico, oltre che un determinante nell’aumento della fitness; questo perché i nuovi individui possono sia apportare alleli nuovi che aumentare la frequenza di alleli rari, incrementando in ogni caso la variabilità genetica della popolazione.

Un indice che permette di misurare la struttura genetica di una popolazione è il  $G_{st}$  che quantifica, a livello intraspecifico, la frazione

della diversità genetica che può essere attribuita alla variabilità tra le popolazioni.

Il  $G_{st}$  viene espresso dalla relazione:

$$G_{st} = D_{st} / H_t$$

dove  $D_{st}$  è la variabilità genetica tra le popolazioni e  $H_t$  è la variabilità genetica totale.

$G_{st}$  varia da 0 ad 1.

$G_{st} = 0$  indica assenza di variabilità tra le popolazioni.

$G_{st} = 1$  indica, invece, che tutta la variabilità riscontrata è tra popolazioni, ovvero che dal punto di vista genetico le popolazioni considerate sono un'unica popolazione omogenea.

Questi valori, espressi in percentuale, riflettono il livello di scambi tra le popolazioni analizzate e/o gli effetti della deriva genica.

Consideriamo ora il caso in cui l'habitat di una popolazione naturale subisca una frammentazione e, quindi, essa venga suddivisa in sotto-popolazioni.

Ciascuna sotto-popolazione è isolata dalle altre ed è sottoposta a deriva genetica in maniera tanto più marcata quanto più piccole sono le sue dimensioni; in occasione di tali eventi, una popolazione naturale può diventare anche molto piccola e subire un cosiddetto "bottleneck effect".

In queste circostanze si può realizzare un effetto della deriva genica, cioè un cambiamento evolutivo indipendente dalla selezione naturale. Con il passare del tempo, nelle sotto-popolazioni si avrà un progressivo eccesso di omozigoti; ossia un ristagno genetico che comporta generalmente una riduzione della fitness e della vitalità (Charlesworth & Charlesworth 1987).

L'indice che misura l'eccesso di omozigoti causato dalla frammentazione della popolazione totale in tante piccole sotto-popolazioni è l' $F_{st}$ .

L' $F_{st}$  rappresenta un indice di distanza genetica tra le popolazioni (più le popolazioni sono differenziate maggiore sarà l'eccesso di omozigoti dovuto alla frammentazione e, pertanto, maggiore sarà l' $F_{st}$ ).

A partire dai valori di  $F_{st}$ , si può calcolare il flusso genico tra popolazioni, secondo la formula di Wright (1951):

$$Nm=(1-F_{st})/4F_{st}$$

dove  $Nm$  è il numero di migranti per generazione.

Se  $Nm$  è maggiore di 1, il flusso genico può essere forte e quindi prevenire le differenze tra le sotto-popolazioni dovute alla deriva genica.

Se  $Nm$  è minore di 1 le popolazioni sono sufficientemente isolate.

Derda e Wyatt (1990) hanno trovato per *Polytrichum commune*, valori di  $Nm$  compresi tra 0.4 e 0.7; i valori minori di 1 sono ritenuti abbastanza bassi perchè la deriva genetica sia il maggior determinante della struttura di popolazione.

La genetica di popolazioni, fornisce, quindi, la possibilità di evidenziare gli effetti della suddivisione geografica e della estensione del flusso genico tra le popolazioni locali delle specie.

Tuttavia, in molte briofite che, come *Mielichoferia elongata* e *Polytrichum commune*, presentano una distribuzione in più continenti, è stato osservato mediante l'utilizzo degli isozimi che le popolazioni Nord-Americane sono poco o per niente differenziate da quelle europee (Derda & Wyatt 1990; Shaw & Schneider 1995); ci si domanda allora, se questa mancanza di diversità intercontinentale

derivi dal livello del flusso genico, oppure da un mescolamento di genotipi avvenuto in epoche remote.

Templeton (Templeton et al. 1995) ha sviluppato metodi filogenetici basati sulla teoria della coalescenza. La teoria della coalescenza studia la filogenesi dei geni.

Grazie a tali metodi filogenetici, è stato evidenziato, in uno studio condotto su base intercontinentale sul muschio cosmopolita *Ceratodon purpureus* (Mc Daniel & 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*; quindi, la possibilità che una piccola ma 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.

Molte specie di briofite definite su base morfologica tendono ad avere areali di distribuzione assai ampi. Se tale situazione rifletta un'effettiva ampia dispersione di spore trasportate dal vento, o un'antica distribuzione non seguita da differenziamento morfologico, è un argomento molto interessante per i briologi (Crum 1972; Van Zanten & Gradstein 1988). In ogni caso 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.

Il grado di identità genetica tra popolazioni si calcola con l'indice di Nei; (I).

Per molti muschi il valore intraspecifico di I è simile a quello delle piante vascolari.

L'identità genetica media (indice I di Nei 1972) per coppie di piante a seme congeneriche è pari a 0.67, mentre per molte coppie congeneriche di briofite è inferiore a 0.6. Ne deriva un elevato livello di differenziamento genetico in accordo con la più antica origine delle briofite.

In diversi studi è stato osservato uno scarso differenziamento morfologico a fronte di un'alta diversità molecolare, cioè la presenza di specie criptiche. La presenza di specie criptiche è stata suggerita, per esempio, 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* e in un'analisi effettuata con i marcatori AFLP sul muschio *Grimmia laevigata* nello stato della California individuando due cladi con una distanza genetica pari a 0.61 (Fernandez et al. 2006).

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 i 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). Anche se la diversità genetica in molte briofite è sostanziale, l'efficacia della crescita clonale è evidente.

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 anche estesi fisicamente, ma frammentati in tante piccole unità come nel caso del muschio *Hylocomium splendens* (Cronberg et al., 2006) e del muschio *Pleurochaete squarrosa* (Spagnuolo et al., 2009).

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 (rd, Agapow & Burt, 2001), una modificazione dell'Indice di Associazione (IA, Brown et al., 1980; Maynard Smith et al., 1993) atta a rimuovere la dipendenza del valore dal numero di loci.

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. Per frammentazione si intende 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 ha l'effetto di ridurre le dimensioni dei *patches* (aree con condizioni ambientali omogenee) e aumentare la distanza, e quindi l'isolamento, tra *patches* conspecifici. Le sottopopolazioni che si vengono a creare in seguito alla frammentazione dell'habitat originario sono meno consistenti di quella originale e risultano, quindi, più vulnerabili alle fluttuazioni climatiche naturali ed ai fattori di disturbo antropico e sono quindi sottoposte ad un maggior rischio di estinzione prima nei singoli *patch* e poi su tutto il territorio.

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. 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., 2009b) che ha confrontato 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.

In conclusione, possiamo affermare che la struttura genetica di una popolazione si modifica al verificarsi di un cambiamento delle frequenze alleliche; molti processi possono causare questo cambiamento, compresi la selezione naturale, la deriva genetica, i cambiamenti nel livello del flusso genico e nelle dimensioni della popolazione (Slatkin 1987).

In particolare va considerato che le popolazioni di grandi dimensioni dovrebbero conservare un maggior grado di variabilità genetica rispetto a quelle piccole, in quanto sono meno suscettibili agli effetti della deriva genica, che si traducono in una perdita di alleli rari e in una diminuzione dell'eterozigosità.

### **3. VARIABILITA' GENETICA**

#### **3.1 Marcatori molecolari:**

L'analisi della variabilità genetica nell'ambito di una popolazione, può essere effettuata mediante tecniche biomolecolari capaci di rilevare le diversità (mutazioni) di regioni di DNA omologhe in individui diversi, appartenenti alla stessa specie. Tali 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 sono note come marcatori molecolari e possono essere rilevate attraverso sonde (probes) o inneschi (primers) specifici.

I 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 e quindi le informazioni che fornirà; fino a permettere di ottenere un'impronta molecolare (fingerprinting) dei singoli individui in esame,.

I marcatori molecolari consentono quindi un'indagine genetica più dettagliata, analizzando anche quei tratti di DNA che in genere non sono espressi. I risultati così ottenuti sono ampiamente riproducibili. La scelta del tipo di marcatore da utilizzare dipende dagli scopi della ricerca e dai mezzi a disposizione.

I più antichi marcatori molecolari conosciuti sono i marcatori isozimatici; con il termine isozima si intendono le varie forme molecolari di un enzima, in grado di catalizzare la stessa reazione, diverse per dimensioni, struttura biochimica e carica elettrica. Tali forme isozimatiche poste in un apposito substrato, sotto l'azione di un campo elettrico, migrano in misura differenziata e, contestualmente alla loro localizzazione, è possibile risalire alla forma molecolare presente nei vari individui in esame e, di conseguenza, identificarne il genotipo.

Più di recente sono stati introdotti altri marcatori molecolari basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR).

Tra essi quelli che trovano maggiore applicazione negli studi di popolazione in piante sono: AFLP, SSR, RAPD, RFLP, ISSR.

- **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism): costituiscono una tecnica molto sensibile nel trovare polimorfismi in tutto il genoma. La procedura è stata applicata per la prima volta nel 1995 su *Arabidopsis* (Vos, Hogers et al. 1995) e presenta numerosi vantaggi come quello di essere universalmente applicabile a tutti gli organismi viventi e di permettere l'analisi contemporanea di un grosso numero di loci genetici.
- **SSR** (Simple Sequence Repeat o microsatelliti): rappresentano un metodo basato sull'identificazione di polimorfismi a livello delle sequenze di DNA ripetute. Disperse nel genoma esistono, infatti, sequenze ripetute in tandem molto semplici, cioè oligonucleotidi di 2-5 bp i microsatelliti. Attraverso l'utilizzo di primers specifici, complementari alle regioni fiancheggianti tali sequenze, è possibile amplificare queste zone del genoma e renderle, quindi, rilevabili mediante tecniche elettroforetiche. Gli SSR sono capaci

di mettere in evidenza all'interno delle popolazioni analizzate una diversità genetica difficilmente rilevabile con altri tipi di marcatori, poiché i polimorfismi individuati, tipicamente polimorfismi di lunghezza, sono localizzati in regioni ipervariabili e non espresse nel genoma.

- **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA): sono marcatori che presentano una modifica della tecnica di amplificazione PCR, dalla quale differiscono perché, mentre la PCR standard richiede due differenti oligonucleotidi che fungano da primers (forward e reverse) con sequenza in nucleotidica fissata in base alla sequenza del frammento da amplificare, i RAPD richiedono la presenza di un singolo oligonucleotide “scelto a caso”, che agisce come primer in entrambe le direzioni dell'elica. L'oligonucleotide usato come innesco nelle reazioni di amplificazione RAPD ha, in genere, una lunghezza di 10 nucleotidi. Esso si appaia in due siti localizzati sulle eliche opposte del DNA stampo e non distanti più di alcune kilobasi (1-2 kb). Il parametro critico per il successo dell'amplificazione RAPD è dato dalla riproducibilità dei risultati ottenuti.
- **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism): tale tecnica, basata sull'amplificazione di specifici frammenti di DNA e sulla loro digestione con opportune endonucleasi di restrizione, a livello intraspecifico è poco discriminante rispetto agli altri marcatori molecolari ed è per questo che viene utilizzata principalmente in studi filogenetici o per la caratterizzazione molecolare di una specie rispetto ad altre identità congeneriche.

Anche il genoma plastidiale, ad ereditarietà uniparentale, è particolarmente utile per studi di filogeografia; tuttavia non è facile

rilevare polimorfismi utili a livello di popolazione a causa del ridotto tasso di sostituzioni che avvengono nel genoma cloroplastico. I microsatelliti plastidiali, infatti, sono marcatori che, generalmente, manifestano un elevato livello di variabilità intraspecifica e, quindi, consentono di superare questo problema. Negli ultimi anni sono stati disegnati numerosi primers universali per l'amplificazione di microsatelli plastidiali in grado di generare frammenti che manifestano polimorfismo di lunghezza. Allo stato attuale sono ancora poche le informazioni disponibili sull'origine del polimorfismo; l'attenzione è stata focalizzata soprattutto sul *trnL*, l'introne del gene plastidiale del tRNA della Leucina, studiato e sequenziato in analisi condotte sul muschio clonale *Pleurochaete squarrosa* (Spanuolo et al. 2002).

- **ISSR** (Inter Simple Sequences Repeat): la tecnica si basa sull'amplificazione di frammenti di DNA usando primers relativamente brevi (10-30bp) complementari ai microsatelliti dello stampo. Le tecniche ISSR sono molto simili a quelle RAPD, dalle quali si sono evolute, eccetto per il fatto che le sequenze dei primers negli ISSR sono disegnate all'interno delle regioni microsatellitari e le temperature di annealing utilizzate sono più alte di quelle usate per i marcatori RAPD. I marcatori ISSR sono convenienti e veloci; il metodo, inoltre, non richiede la conoscenza a priori della regione da amplificare. Guardando la presenza o l'assenza di una o più bande su di un gel di agarosio è possibile identificare genotipi diversi presenti in una popolazione. Per tutte queste ragioni gli ISSR sono i marcatori molecolari più usati per studiare la diversità genetica e per caratterizzare le popolazioni naturali (Barth 2002).

I prodotti di amplificazione che si ottengono nelle tecniche per lo studio della variabilità genetica basate sulle PCR possono essere divisi in due classi: individuo-specifici (polimorfici) e filogeneticamente conservati (monomorfici).

Da un punto di vista genetico i polimorfismi, evidenziati come presenza\assenza di una banda, rappresentano il risultato di mutazioni nei siti di appaiamento dei primers, come sostituzioni, inserzioni o delezioni di singoli o pochi nucleotidi e sono ereditati, generalmente, come marcatori dominanti (Williams et al.1990).

### **3.2 Marcatori molecolari: utilizzo in studi di popolazione in briofite**

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 basato sulla valutazione del numero e del tipo di specie rinvenute in un determinato ambiente; sulla registrazione dei modelli riproduttivi attuati da ciascuna specie; sulla determinazione di come varia la struttura della comunità in risposta alla variazione dei fattori ambientali e in relazione allo stadio successionale; su come coesistono le specie differenti; e su come una comunità riesce a persistere nel tempo.

I progressi tecnologici delle metodiche biomolecolari hanno consentito, però, negli ultimi anni, di estrarre il DNA e le proteine a partire da porzioni di tessuto vegetale sempre più piccole, aprendo, così, anche alle briofite la possibilità di essere sottoposte a ricerche basate sull'utilizzo dei marcatori molecolari. L'utilizzo di tali tecniche consente di determinare la variabilità genetica, ovviando ai problemi

di mascheramento dell'espressione genotipica dovuta ad effetti ambientali.

L'applicazione dei marcatori molecolari in studi di popolazione sulle briofite permette di 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 descritto le briofite come piante lente nell'evoluzione nelle quali predomina la riproduzione asessuata e si osserva una scarsa variabilità genetica.

Successivamente, utilizzando marcatori isoenzimatici (Wyatt 1989) e il sequenziamento di regioni del genoma, è stato dimostrato che le briofite, ed in particolare i muschi, hanno livelli di variabilità genetica comparabili a quelle delle tracheofite (Stoneburner et al. 1991) e molto diversi nelle differenti specie. Inoltre, sempre con gli isozimi, è stato dimostrato che briofite unisessuali, come *Hylocomium splendens* (Cronberg et al. 1997) e *Pleurozium schreberi* (Zielinski & Wachowiak-Zielinska 1995), presentano una variabilità genetica più elevati rispetto a quanto atteso anche quando la riproduzione vegetativa è predominante.

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), d'altra parte, però, gli stessi spaziatori in 25 popolazioni di *Sphagnum magellanicum*, distribuite dal Cile all'Alaska, hanno sequenze

praticamente identiche (Shaw, 2000b) evidenziando nei muschi la coesistenza di livelli di variabilità molto eterogenei.

Più di recente, anche utilizzando altri tipi di marcatori molecolari, è stata confermata nei muschi una variabilità genetica maggiore di quella attesa per organismi aventi fase aploide dominante (Spagnuolo et al. 2007a; Wilson & Provan 2003).

Tra i marcatori molecolari basati sulla reazione di amplificazione della polimerasi gli SSR mostrano un'applicazione recente negli studi di popolazione condotti sulle briofite. In particolare, uno studio condotto su popolazioni naturali di *Polytrichum commune* (Wilson & Provan 2003), ha evidenziato una relazione tra variabilità genetica e disturbo ambientale; utilizzando gli stessi marcatori molecolari, inoltre, è stata effettuata un'analisi sugli sporofiti della stessa specie che ha evidenziato la formazione di una specie ibrida, che condivide alleli presenti in entrambe le specie simpatriche parentali (Van Der Velde & Bijlsma 2004).

I RAPD sono stati applicati, tra l'altro, negli studi sulla variabilità genetica nel muschio *Sarconeurum glaciale* sull'isola Ross in Antartide (Skotnicki et al. 1999).

I primi studi in cui sono stati applicati i marcatori ISSR sono stati pubblicati nel 1994 (Zietkiewicz et al. 1994; Gupta et al. 1994); questi marcatori, inoltre, sono stati recentemente utilizzati con buoni risultati nelle Briofite (Gunnarsson et al. 2005; Hassel et al. 2005; Spagnuolo et al., 2007a). In tali studi è stato evidenziato, tra l'altro, che 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).

Dunque sulla base di studi già pubblicati e di altri ancora in corso risulta chiaro che gli ISSR hanno un elevato potenziale per analizzare problematiche genetiche all'interno di popolazioni naturali.

Finora a parte gli isozimi ci siamo riferiti a marcatori molecolari neutri; una mutazione in uno di questi frammenti del genoma non altera la funzionalità dell'organismo e perciò non si riflette sulla fitness e sulla vitalità; il livello di variabilità genetica in un dato locus neutro è determinato dal tasso di mutazione e dalla deriva random (Stenoëin & Sastad 1999).

## **4. BIOMONITORAGGIO**

### **4.1 Biomonitoraggio: definizioni**

Con il termine biomonitoraggio si intende l'insieme delle metodologie basate sull'utilizzo di organismi sensibili per trarre informazioni sullo stato di salute dell'ambiente; il biomonitoraggio, rispetto alle tecniche analitiche tradizionali, ha il vantaggio di fornire stime sugli effetti combinati di più inquinanti sugli esseri viventi, ha costi di gestione limitati e offre la possibilità di coprire con relativa facilità vaste zone e territori diversificati, consentendo una adeguata mappatura del territorio.

Questi organismi sensibili possono essere utilizzati come "integratori di dati" in grado di registrare gli effetti dei cambiamenti ambientali nel tempo, evidenti ai diversi livelli di organizzazione, fino al livello di comunità (Nimis P.L. 2009; Sérgio C. & Sim-Sim M. 1985; Sim-Sim M. et al., 2000).

Nelle metodologie del biomonitoraggio si possono distinguere due diverse tipologie di organismi test:

- Bioindicatori : organismi che subiscono variazioni evidenti nella fisiologia, nella morfologia o nella distribuzione sotto l'influsso delle sostanze presenti nell'ambiente
- Bioaccumulatori: organismi in grado di sopravvivere in presenza di inquinanti che accumulano nei loro tessuti; con il loro uso è possibile ottenere dati sia di tipo qualitativo che quantitativo.

#### **4.2 Utilizzo delle briofite in studi di biomonitoraggio**

E' nota da tempo la capacità delle briofite di rispondere ai cambiamenti ambientali come bioindicatori o bioaccumulatori di elementi chimici presenti nell'atmosfera, come riportato in uno studio condotto sulle comunità epifite di *Quercus ilex* (Giordano et al., 2004), i cui risultati hanno dimostrato chiaramente che nei siti urbani la biodiversità è ridotta, i muschi acrocarpi e la riproduzione asessuata sono più frequenti, tutti segni di uno stadio pioniere nella successione, che può anche permanere nel tempo, in avverse condizioni ambientali. L'utilizzo delle briofite come biosensori dell'inquinamento atmosferico è legato ad alcune loro caratteristiche peculiari quali; l'elevato rapporto superficie/massa, l'elevata capacità di scambio cationico e di intercettazione superficiale che fa in modo che esse mostrino una composizione elementare che riflette, a lungo termine, i gas, il particolato e gli ioni metallici presenti nell'atmosfera, e vengono perciò considerate importanti biomonitors dell'inquinamento atmosferico (Bargagli 1998; Reimann et al., 2001; 2005).

Spesso però, l'assenza di specie di muschi ben adattate che vivono sia in ambiente urbano che extra-urbano, la difficoltà di realizzare condizioni di campionamento uniformi per numero e distribuzione delle misure, incoraggiano, in alcune condizioni, specialmente in ambiente urbano e a scala locale, l'uso dei muschi trapiantati (moss bags) per monitorare le deposizioni atmosferiche secche e umide, e in special modo quelle legate al particolato (Adamo et al., 2003,2007; Giordano et al., 2005; Tretiach et al., 2007; Vingiani et al., 2004); ciononostante quando è possibile si preferisce utilizzare le briofite epifite per evidenziare l'inquinamento atmosferico.

Tale scelta è legata al fatto che la corteccia degli alberi offre un substrato omogeneo (Bates, 2000) e la sensibilità agli inquinanti aumenta progressivamente dalle specie epigee, a quelle epilite, e infine alle epifite (Rao, 1982).

I dati che vengono raccolti utilizzando le briofite come biosensori risultano ben integrabili con i dati raccolti negli studi biomolecolari di popolazioni condotti proprio sulle briofite. La letteratura recente suggerisce, infatti, un interesse crescente verso gli studi basati sui determinanti ecologici della variabilità genetica (Gunnarson et al., 2005; Muller et al., 2004; Wyatt et al., 1989; Wyatt, 1992; Wilson & Provan, 2003) e come dimostrato da uno studio condotto sul muschio *Leptodon smithii* campionato in siti urbani e remoti della regione Campania che ha evidenziato, integrando tra di loro le due metodiche di analisi, l'esistenza in questa specie, di una relazione tra biodiversità molecolare e bioaccumulo di elementi in traccia assorbiti dall'atmosfera (Spagnuolo et al., 2009) .

E' noto infatti, che le attività dell'uomo hanno un notevole impatto sulla frammentazione degli habitat naturali, alterando le loro dimensioni e il loro arrangiamento, a danno delle comunità naturali (Gibbs, 2001). Alcuni fattori di disturbo, e i cambiamenti del paesaggio che ne conseguono, possono favorire la perdita di cloni e la divergenza genetica tra popolazioni, determinando un generale impoverimento genetico (Whitlock & Burton, 1997).

# PROGETTO DI DOTTORATO

Durante il Dottorato mi sono dedicata all'approfondimento delle due seguenti tematiche:

- ✓ Analisi di variabilità genetica intraspecifica in popolazioni relitte del muschio *Sphagnum palustre* lungo un gradiente geografico.
- ✓ Analisi della variabilità genetica intraspecifica in popolazioni di *Leptodon smithii* campionate lungo un gradiente di disturbo antropico.

Il gradiente considerato per *Sphagnum palustre* è un gradiente geografico che risulta interessante perché occupa una posizione marginale nell'areale di distribuzione della specie in Europa; mentre per *Leptodon smithii*, sulla base di dati pregressi, è stato scelto il gradiente di impatto antropico valutando la biodiversità in aree urbane e remote.

La scelta di realizzare questo progetto utilizzando come sistema di studio le briofite è legata ad alcune caratteristiche delle briofite stesse.

In primo luogo i muschi, essendo impiegati nel biomonitoraggio ambientale da oltre 50 anni, sono piante molto sensibili ai gradienti ambientali; le fluttuazioni ambientali possono, infatti, determinare nei muschi risposte a livello demografico, riproduttivo e molecolare.

Inoltre, avendo tempi di generazione più brevi rispetto alle piante vascolari, i muschi possono risultare utili come piante modello, permettendo di predire in tempi notevolmente ridotti le sorti delle comunità vegetali e realizzare piani idonei alla conservazione delle specie in seguito a cambiamenti ambientali causati sia da eventi naturali che dalla pressione antropica.

### *Sphagnum palustre:*

In Italia gli ambienti umidi sono ormai rinvenibili solo in aree limitate e marginali questo perché tali aree dal Dopoguerra ad oggi hanno subito un rapido degrado e una drastica riduzione a causa degli effetti diretti e indiretti dell'attività dell'uomo.

Negli ambienti umidi sopravvivono specie vegetali rare e a rischio di estinzione; associazioni vegetali (fitocenosi) tipiche di questi ambienti sono le sfagnete che, in Italia sono relativamente rare (circa 100.000 ettari) e ancora frequenti solo sulle Alpi e sull'Appennino Settentrionale (Gerdol R. et al., 1993).

Le sfagnete europee più meridionali si trovano nel centro Italia, in particolare nel Lazio e nelle aree umide di pianura e di montagna della Toscana (Bonini I. et al., 1998).

La sopravvivenza delle sfagnete in queste aree rifugio è messa continuamente a rischio dall'alterazione dell'idrografia dei luoghi e della qualità dell'acqua; dunque l'habitat ideale in cui lo *Sphagnum palustre* si sviluppa in Italia sta scomparendo.

Scopo di questa prima parte del mio progetto di Dottorato è stato quello di valutare lo stato di conservazione di popolazioni relitte di sfagni del centro/sud Italia, analizzando la variabilità genetica intraspecifica e l'entità del flusso genico tra le popolazioni stesse.

Sono state individuate quattro aree dove sono presenti popolazioni di muschi del genere *Sphagnum palustre*.

In particolare sono state oggetto di studio le popolazioni del Lago di Posta Fibreno (FR) nel Lazio, del Lago di Sibolla (LU), del Lago di Massaciuccoli (LU) in Toscana e dei Lagoni di Mercurago (NO) in Piemonte.

Le popolazioni sono state analizzate utilizzando marcatori molecolari: ISSR; i dati molecolari ottenuti sono stati sottoposti ad una approfondita analisi condotta con software specifici al fine di ottenere indici idonei alla valutazione della fitness delle popolazioni e della capacità delle stesse di contrastare la deriva genetica (che caratterizza in particolare le popolazioni piccole e geneticamente isolate) e quindi valutare il rischio di estinzione locale delle specie in esame.

Tale studio, quindi, assume maggior valore avendo ben presente che la diminuzione della diversità genetica è un indice di riduzione della fitness per le popolazioni naturali, implicando un minor potenziale adattativo e quindi un maggior rischio di scomparsa.

I risultati di questo studio potrebbero, dunque, avere un doppio valore: valutare il rischio di scomparsa delle popolazioni studiate, tenendo conto del valore ecologico intrinseco delle stesse in Italia centro/meridionale in termini di biodiversità, ma anche valutare l'efficacia delle politiche di conservazione attuate nelle aree umide già sottoposte a politiche di protezione o la opportunità di istituire riserve protette nelle aree non ancora sottoposte a vincoli normativi.

### ***Leptodon smithii:***

La seconda parte del progetto di ricerca a cui mi sono dedicata durante il Dottorato è incentrata sulla specie *Leptodon smithii*.

Tale progetto fa riferimento ai dati ottenuti in uno studio condotto sulla stessa specie dal gruppo con il quale ho svolto la mia attività di ricerca e successivamente pubblicati su *Chemosphere* (Spagnuolo et al., 2009) che hanno evidenziato, attraverso l'utilizzo di marcatori molecolari ISSR, l'esistenza di una relazione tra biodiversità e bioaccumulo di elementi in traccia nella specie.

Scopo di questa seconda parte del mio progetto di Dottorato è stato, quindi, quello di studiare e valutare gli effetti dell'inquinamento atmosferico sulla biodiversità briofitica a livello molecolare, in comunità epifite di *Quercus ilex* in un'area di studio ampliata comprendente oltre a siti urbani, extraurbani e remoti in Campania, lo stesso numero e tipologia di siti in Toscana.

La scelta di siti di studio peculiari nasce dall'esigenza di valutare la biodiversità intraspecifica in un gradiente di alterazione ambientale, valutato in base alla distanza dai grandi centri urbani, dalla densità demografica e di traffico veicolare.

La scelta di utilizzare *Leptodon smithii* come sistema di studio nasce, invece, dalle osservazioni ricavate da uno studio condotto in Campania sulla biodiversità delle briofite epifite del leccio in aree urbane ed extraurbane (Giordano et al., 2004) che hanno evidenziato che questo muschio ha le caratteristiche adatte ad un'analisi di biodiversità intraspecifica in quanto è pluriennale ed è presente con indici di frequenza e copertura sufficienti per un campionamento non distruttivo, anche nei siti urbani.

La valutazione della diversità genetica è stata effettuata mediante marcatori molecolari ISSR. La matrice binaria ottenuta dai profili degli amplificati è stata analizzata con opportuni software in modo da ottenere dei descrittori della variabilità genetica di popolazione (numero di aplotipi e frequenza relativa, percentuale di loci polimorfici, average gene diversity over loci, ecc).

## **PARTE II: MATERIALI E METODI**

### **1. LE SPECIE:**

#### ***1.1 Sphagnum palustre:***

Gli sfagni, di norma con areali tipici dell'Europa Settentrionale dove coprono grandi superfici, sono giunti alle nostre latitudini durante l'ultima glaciazione verificatasi nel Quaternario e sono rimasti in pochi luoghi favorevoli alla loro biologia.

Costituiscono una specie a riproduzione sessuale; la formazione degli sporofiti, dotati di capsule tipicamente sferiche, avviene solitamente in estate, ma possono riprodursi anche per via vegetativa attraverso la crescita orizzontale di un protonema secondario dal quale si origina una nuova serie di piante che derivano dalla pianta madre.

Rappresentano un gruppo uniforme, ben caratterizzato sul piano morfologico.

Un singolo sfagno è costituito, infatti, da un fusticino sottile ed eretto che porta ciuffi di rami laterali di piccole dimensioni alcuni dei quali perpendicolari al fusticino, altri flessi, cioè appressati al fusticino stesso; all'apice, infine, è presente una struttura particolare detta capitulum (fig. 2), ossia una rosetta compatta ricca di ramificazioni nella quale sono presenti anteridi ed archegoni.

Il fusticino, lungo fino a 25 cm, non contiene i vasi conduttori, ma uno strato centrale di cellule parenchimatiche circondato dallo ialoderma, formato da un numero variabile di strati di cellule morte, svuotate e intercomunicanti o aperte all'esterno mediante pori. Le foglioline sono costituite da due tipi di cellule specializzate; le ialocisti, con

citoplasma degenerato, capaci di assorbire ed immagazzinare acqua che consentono, quindi, agli sfagni di sopperire alla mancanza degli idroidi, e le clorocisti, disposte in file longitudinali, con funzione fotosintetica (fig. 3) (Cortini–Pedrotti 2006).

Tale struttura determina un vero e proprio tessuto acquifero per cui gli individui che costituiscono le colonie di sfagni agiscono come una spugna assorbendo e trattenendo l'umidità; questo, unitamente al fatto che i gametofiti di *Sphagnum* mostrano una crescita apicale che interessa il “capitulum,” fa in modo che, con l'invecchiamento, i tessuti basali muoiano e si stratifichino a formare la torba.

Le torbiere di *Sphagnum* occupano più dell'1% della superficie della Terra esse sono molto importanti nel ciclo globale del carbonio, poiché la torba accumula una quantità molto grande di carbonio organico, che non viene rapidamente decomposto in anidride carbonica dai microrganismi.



Fig 2: *Sphagnum palustre*

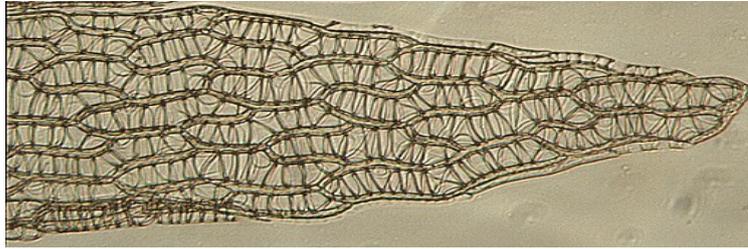


Fig. 3: Clorocisti e ialocisti in fogliolina di *Sphagnum palustre*

### **1.2 *Leptodon smithii*:**

*Leptodon smithii* rappresenta, un muschio epifita, dioico e pleurocarpo, appartenente alla famiglia delle Leptodontaceae (Buck, 1980).

Nell'area mediterranea rappresenta una epifita della comunità climax di *Quercus ilex*.

Il fusticino con aspetto strisciante, lungo 2,5-5 cm, presenta ramificazioni pennate o bipennate, uguali e molto corte (fig. 4). Le foglioline sono ovali, con apice arrotondato, nervatura singola e poco pronunciata; sono regolarmente distese e spaziate se umide, ma in condizioni di aridità il fusticino e le ramificazioni si ripiegano su se stesse, ed in particolare gli apici delle ramificazioni si avvolgono in maniera caratteristica (fig. 5). Non ci sono altri generi di muschi con la stessa capacità di attorcigliarsi in condizioni di aridità e di una così rapida risposta in seguito all'aumento di umidità, rivelando la regolare struttura pennata (Enroth, 1992).

Questa specie si riproduce sessualmente e la formazione degli sporofiti, dotati di seta molto corta, dritta o curvata, avviene solitamente in primavera. L'habitat ideale in cui la specie si sviluppa è rappresentato dalla corteccia degli alberi in boschi e foreste umide fino a 3000 m s.l.m. (soprattutto in ambienti basici), sulla quale forma chiazze appiattite di colore verde scuro originando spesso grossi intrecci. Viene considerata una specie epifita facoltativa poiché raramente può essere trovata anche su pareti rocciose o su pietra.



Fig. 4: *Leptodon smithii*



fig. 5: Caratteristico comportamento dei gametofiti di *Leptodon smithii* in condizione di aridità

## **2. AREA DI STUDIO: *S.palustre***

Sono state individuate quattro aree italiane in cui è presente *Sphagnum palustre*:

- Lago di Posta Fibreno (FR) nel Lazio
- Lago di Sibolla (LU)
- Lago di Massaciuccoli (LU)
- Lagoni di Mercurago (NO).

Nell'ambito di queste popolazioni è stato effettuato il campionamento.

### **2.1 Riserva Naturale Lago di Posta Fibreno (FR):**

Il sito di campionamento individuato nella regione Lazio è la Riserva Naturale Lago di Posta Fibreno in provincia di Frosinone; un'area estesa per circa 400 ettari.

Un fenomeno caratteristico del Lago di Posta Fibreno è la presenza di un'isola galleggiante formata da un accumulo di rizomi, torba, radici ed erbe palustri, dove, a causa della particolare composizione chimica del suolo, gli alberi non si sviluppano come gli altri simili che hanno radici sulla terraferma, ma crescono come poco più che semplici arbusti; tale isola è in grado di spostarsi all'interno di uno specchio d'acqua collegato al lago da alcuni canali.

Soltanto al centro dell'isola galleggiante, la "Rota", così viene chiamata localmente l'isola galleggiante per la sua forma rotonda, è presente un tappeto di *Sphagnum palustre* che rappresenta una popolazione relitta, probabilmente la più meridionale d'Europa; la stazione più vicina nella quale compare la specie in oggetto di studio, infatti, è il lago di Sibolla in provincia di Lucca (fig. 6).

Al centro della "Rota" è stato effettuato il campionamento.

## **2.2 Riserva Naturale Lago di Sibolla (LU):**

La Riserva Naturale del Lago di Sibolla è interamente situata nel Comune di Altopascio dove occupa la parte centrale di una conca imbrifera.

Nonostante le sue minuscole dimensioni, ha una superficie libera di appena 12000 mq, è caratterizzata dalla presenza di piante rarissime e per questo motivo è considerata uno degli ambienti naturali di maggior pregio nel nostro Paese.

Costituisce una delle sfagnete più meridionali del mondo, e rappresenta un'area di massimo interesse per la presenza di specie vegetali appartenenti di norma ad areali assai più settentrionali.

## **2.3 Riserva Naturale Lago di Massaciuccoli (LU):**

Il Lago di Massaciuccoli è un lago costiero della Toscana occidentale situato ai piedi delle Alpi Apuane. Misura circa 7 chilometri quadrati e presenta acque eutrofiche mediamente basse con 1,6 m di profondità media e punte massime di 3-4 m.

Il clima della zona è molto particolare con una elevata umidità ed una limitata escursione termica, sia in estate che in inverno. Ciò ha permesso la sopravvivenza di vegetazioni relitte dei climi che si sono succeduti nel corso dei millenni; sugli “aggallati”, piccole isole galleggianti che si formano dall'intreccio delle radici di canne, si possono osservare, infatti, relitti glaciali come le sfagnete e relitti di climi caldo-umidi come la grande felce *Osmunda regalis* e la rarissima liana *Periploca greca*; le sfagnete del Lago di Massaciuccoli sono le uniche, in tutto il bacino del Mediterraneo, che si trovano al livello del mare.

#### **2.4 Riserva Naturale Lagoni di Mercurago (NO):**

Il Parco naturale dei Lagoni di Mercurago, situato sulla zona collinare morenica dietro l'abitato di Arona, è stato istituito nel 1980, e rappresenta una delle zone umide più significative del nostro Paese.

Occupava un'area di 470 ettari caratterizzata da boschi misti, prati-pascoli, stagni e paludi. L'ambiente fisico è rappresentato da una torbiera in zona collinare morenica, con stagni e paludi di origine glaciale alcuni in via di progressivo interramento.

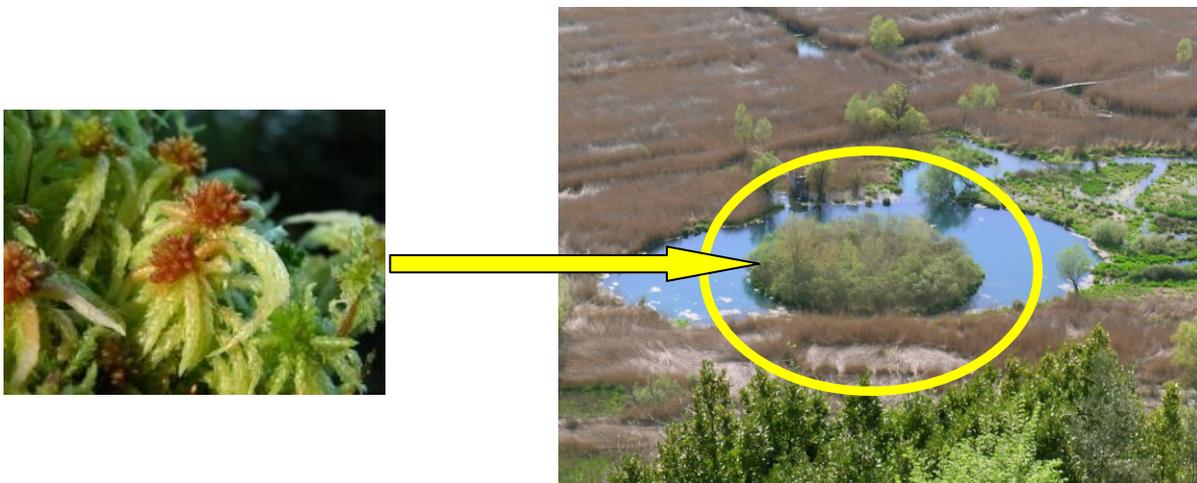


Fig. 6: Isola galleggiante nella Riserva Naturale di Posta Fibreno (FR)

### **3. AREA DI STUDIO: *L. smithii***

*Leptodon smithii* è stato raccolto in siti urbani, extra-urbani e remoti presenti in Campania e in Toscana selezionati lungo un gradiente di naturalità/condizioni di alterazione.

In particolare sono stati selezionati i 6 siti di campionamento seguenti:

- 2 siti urbani: Bosco di Capodimonte (NA) e Villa Patrizia (SI)
- 2 siti peri-urbani: Astroni (NA) e Belcaro (SI)
- 2 siti extra-urbani: Ottati (SA) e Cala Violina (GR).

Ad eccezione di quelli selezionati all'interno dei parchi urbani tutti gli altri siti sono localizzati in parchi nazionali o in aree protette.

#### **3.1 Bosco di Capodimonte (NA):**

Il Parco di Capodimonte è la maggiore area verde della città di Napoli. Si estende su un'area di 134 ettari. Si presenta con boschi intervallati da ampie praterie, valloni solcati da piccoli torrenti e aree ricche di cave, caratteristica tipica delle colline napoletane.

#### **3.2 Riserva Naturale Cratere degli Astroni (NA):**

La Riserva naturale Cratere degli Astroni è un'oasi del **WWF** che si trova tra **Napoli** e **Pozzuoli**. Al suo territorio appartiene il **Cratere degli Astroni** che fa parte del Cratere di Agnano inserito nell'area vulcanica dei Campi Flegrei. E' il più giovane dei crateri della zona dei Campi Flegrei e si estende per circa 250 ettari con un perimetro di 6,5 km.

A causa della particolare morfologia e dell'elevata umidità del punto più basso del cratere, nel sito si osserva il fenomeno dell'inversione termica che ne influenza la vegetazione. Per tale motivo, infatti, ritroviamo la tipica **macchia mediterranea** sull'orlo del cratere e la foresta umida sul fondo dello stesso.

### **3.3 Ottati (SA):**

Ottati è un comune situato in provincia di Salerno.

Si trova nella parte nord-orientale del Cilento, inserita nel contesto naturalistico del Parco nazionale del Cilento e Vallo di Diano, alle pendici meridionali dei Monti Alburni.

### **3.4 Villa Patrizia (SI):**

Villa Patrizia è un parco di lecci presente nella centro della città di Siena (fig. 9).

### **3.5 Belcaro (SI):**

Belcaro è un imponente castello senese fondato nel XXII secolo. E' circondato da un folto parco di lecci e dista circa 10 km dal centro della città di Siena (fig. 9).

### **3.6 Cala Violina (GR):**

Cala Violina è un suggestivo angolo della Maremma Grossetana, racchiuso tra due promontori, che si trova nel cuore della Riserva Naturale delle Bandite di Scarlino estesa per circa 8700 ettari (fig. 10).

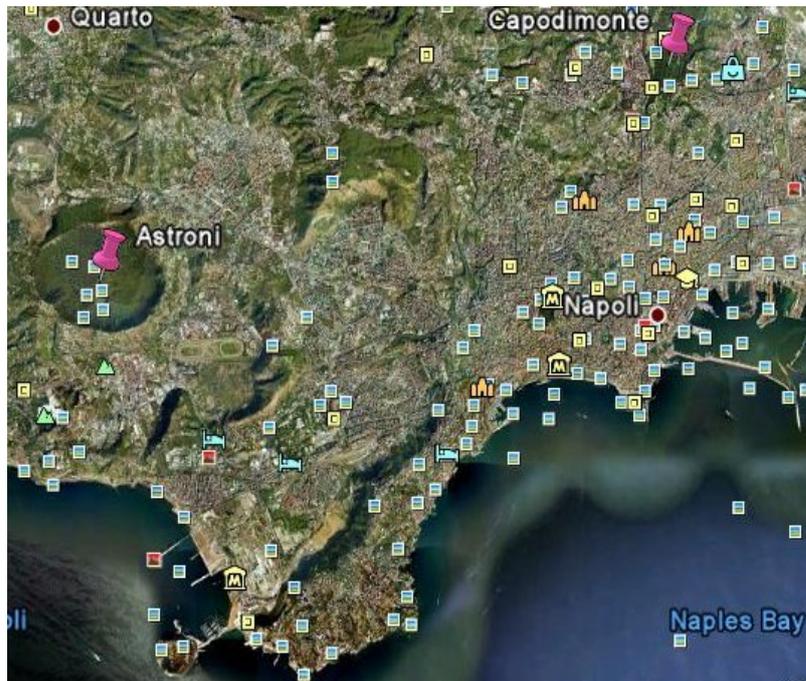


Fig. 7: Siti di campionamento urbano e peri-urbano di *Leptodon smithii* in Campania.



Fig. 8: Sito di campionamento remoto per *Leptodon smithii* in Campania.

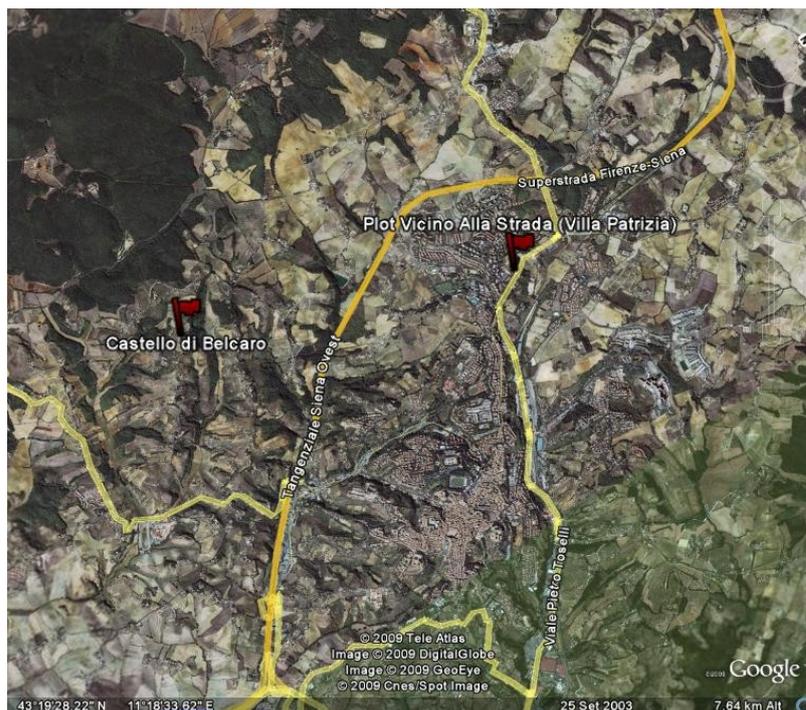


Fig. 9: Siti di campionamento urbano e peri-urbano di *Leptodon smithii* in Toscana

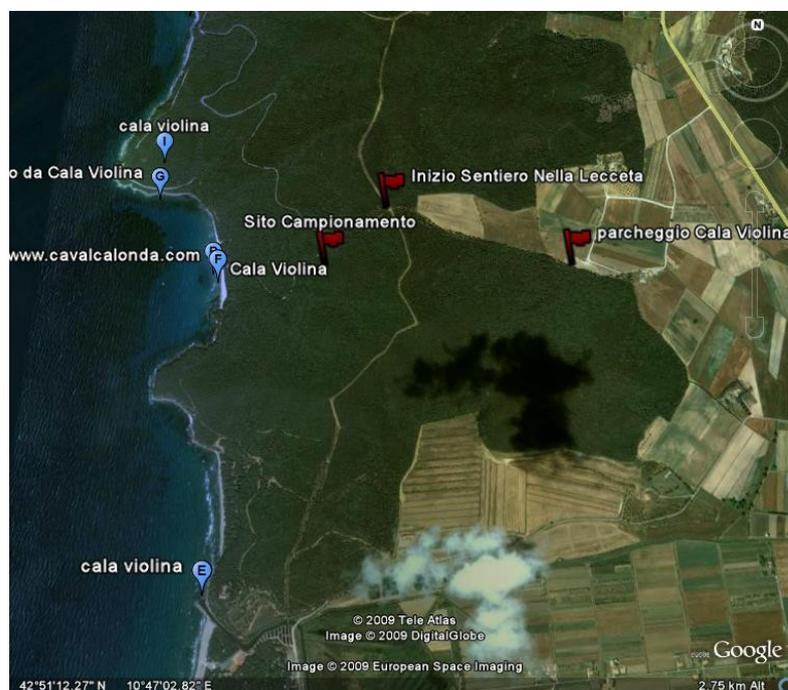


Fig. 10: Sito di campionamento remoto per *Leptodon smithii* in Toscana.

## **4. CAMPIONAMENTO: *S.palustre***

### **4.1 Campionamento Lago di Posta Fibreno (FR):**

Il campionamento in questo sito è stato effettuato lungo due ellissi concentriche ed in tre punti posti circa al centro dell'isola galleggiante.

Lungo l'ellissi più esterna sono stati individuati 27 punti di campionamento posti ad una distanza di circa un metro l'uno dall'altro, in ognuno dei quali sono stati raccolti 2 gametofiti (indicati con le lettere A e B) per un totale di 54 campioni indicati, globalmente, con la lettera E.

Lungo l'ellissi più interna, invece, sono stati identificati 12 punti di campionamento posti anch'essi a distanza di un metro l'uno dall'altro, in ognuno dei quali sono stati raccolti due gametofiti (A e B) per un totale di 24 indicati, globalmente, con la lettera I. Un ulteriore campionamento di 6 individui raccolti in tre punti distinti è stato effettuato nel centro dell'isola (indicati con la lettera C).

In totale sono stati, cioè, campionati 84 gametofiti successivamente sottoposti ad analisi molecolare (fig. 11).

### **4.2 Campionamento Lago di Sibolla (LU):**

In questo sito il campionamento è stato effettuato lungo un transetto esteso per tutta la lunghezza del pontile che circondava il lago.

Ad intervalli regolari di circa 1 metro l'uno dall'altro sono stati selezionati 14 punti di campionamento in ognuno dei quali sono stati raccolti piccoli gruppi di individui.

All'interno di ogni gruppo campionato sono stati selezionati due gametofiti indicati con le lettere A e B, per un totale di 28 individui, successivamente sottoposti ad analisi molecolare.

#### **4.3 Campionamento Lago di Massaciuccoli:**

In questo sito era presente un tappeto di *Sphagnum capillifolium* con intervalli di copertura rappresentati da zolle di *Sphagnum palustre*.

Sono stati identificati 8 punti di crescita di *Sphagnum palustre* nel sito e all'interno di questi è stato effettuato il campionamento.

In ogni punto sono stati raccolti piccoli gruppi di individui in ognuno dei quali sono stati selezionati due individui indicati con le lettere A e B per un totale di 16 gametofiti successivamente sottoposti ad analisi molecolare.

#### **4.4 Campionamento Laghi di Mercurago (NO):**

In tale sito il campionamento è stato effettuato solo in un punto lungo un transetto di circa 10 metri seguendo un sentiero.

All'interno di tale punto di campionamento, ad intervalli regolari di circa 1 metro l'uno dall'altro, sono stati raccolti piccoli gruppi di individui nell'ambito dei quali sono stati selezionati i singoli gametofiti, per un totale di 10, su cui sono state effettuate le analisi per lo studio della variabilità genetica.

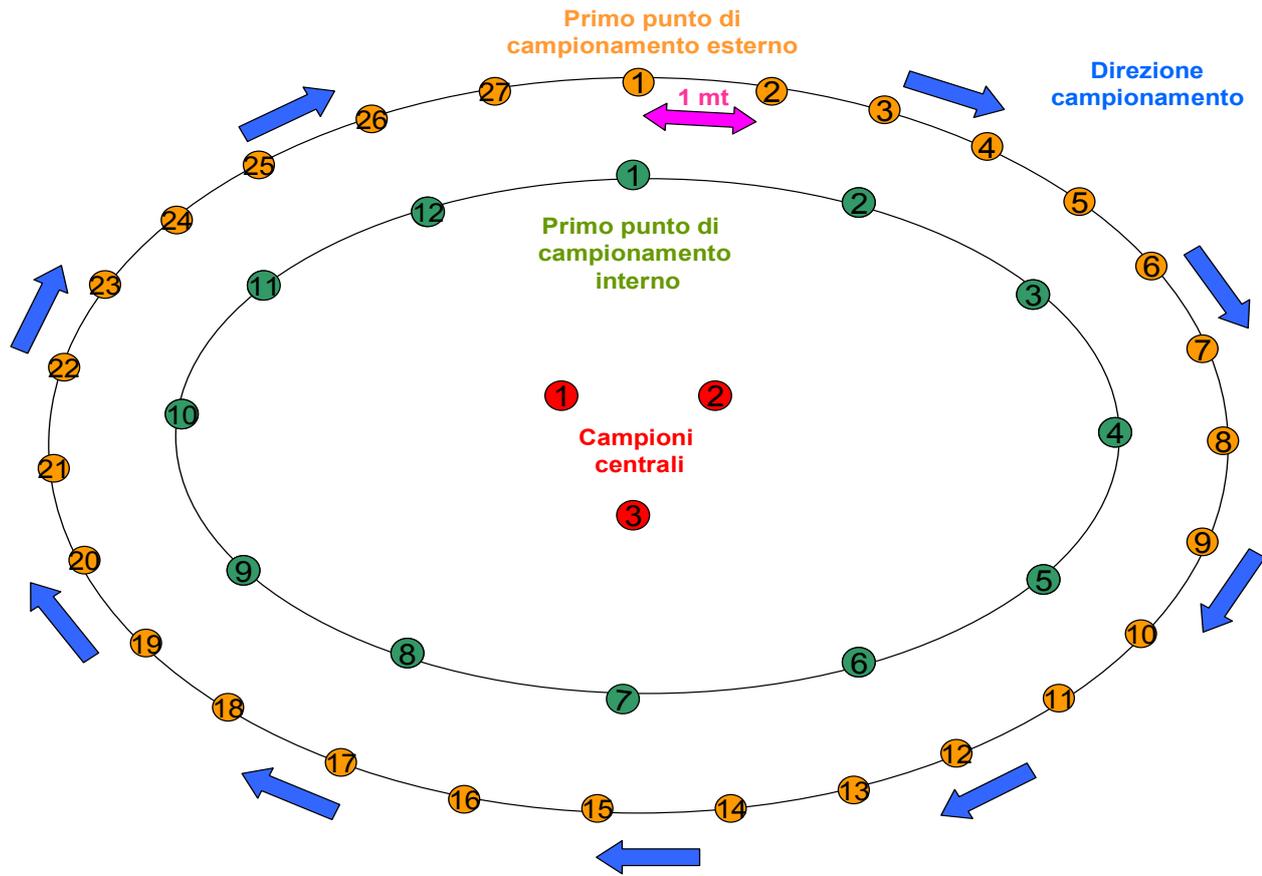


Fig. 11: Schema di campionamento di *Sphagnum palustre* sull'Isola di Posta Fibreno (FR)

## **5. CAMPIONAMENTO: *L.smithii***

Il campionamento è stato effettuato selezionando per ogni sito gli alberi di *Quercus ilex* su cui era presente la specie in esame e scegliendone almeno tre per sito con il più alto valore di copertura di *Leptodon smithii* (tabella 1).

Frequency value	Description of (F) value
1	Species are very rare, or have a very low degree of coverage.
2	Species are very infrequent, or have a low degree of coverage.
3	Species are infrequent, or have a medium degree of coverage on some wall sections.
4	Species are frequent, or have a high degree of coverage on most walls.
5	Species are very frequent, or have a very high degree of coverage on most walls.

Tab 1: Valori generali per la classificazione della frequenza di una specie.

Il valore di frequenza/copertura della specie in ogni sito è stato valutato considerando l'fi presente nella formula per il calcolo dell'Index of Atmospheric Purity (I.A.P.) (Le Blanc & De Sloover, 1970), un indice ecologico che permette di effettuare una valutazione quantitativa del livello di inquinamento atmosferico basata sul numero, la frequenza e la tolleranza delle specie presenti nell'area di studio considerata.

Il valore dell'I.A.P. viene calcolato mediante la formula seguente:

$$\frac{\sum_{i=1}^n (Q_i \times f_i)}{10}$$

dove:

**Qi** è il numero medio di tutte le briofite epifite che sono presenti insieme ad ogni specie in tutti i siti presi in esame;

**fi** è un indice di frequenza-copertura specie e stazione specifico con un valore compreso tra 1 e 5.

Le informazioni relative al nome e alle sigle dei siti, le georeferenze e gli indici di frequenza e copertura specifici per ogni sito sono riportate in tabella 2.

	<b>Siti</b>	<b>Sigla</b>	<b>Frequenza/ copertura</b>	<b>Latitudine</b>	<b>Longitudine</b>
1	<b>Capodimonte</b>	<b>CAP</b>	<b>3</b>	<b>40° 52' 23" N</b>	<b>14° 14' 3.09" E</b>
2	<b>Ottati</b>	<b>OTT</b>	<b>5</b>	<b>40° 27' 35" N</b>	<b>15° 19' 1.08" E</b>
3	<b>Astroni</b>	<b>AST</b>	<b>4</b>	<b>40° 51' 41" N</b>	<b>14° 10' 3.81" E</b>
4	<b>Villa Patrizia</b>	<b>PAT</b>	<b>4</b>	<b>43°20'94''N</b>	<b>11°18'25.73''E</b>
5	<b>Belcaro</b>	<b>BEL</b>	<b>5</b>	<b>43°18'08"N</b>	<b>11°17'23.95"E</b>
6	<b>Calaviolina</b>	<b>VIO</b>	<b>5</b>	<b>42°51'62"N</b>	<b>10°46'48.19"E</b>

Tab. 2: Indici geografici e di frequenza/copertura di *L.smithii* nel 6 siti di studio considerati.

Su ogni albero, dunque, raccogliendo piccoli ciuffi di muschio ad intervalli di 15–20cm lungo il tronco, sono stati selezionati 10 gametofiti della specie per un totale di almeno 30 individui raccolti in

ogni sito, in totale, cioè, sono stati campionati 180 individui successivamente sottoposti in laboratorio ad analisi molecolare.

Inoltre, in ogni sito, gli alberi scelti per il campionamento sono stati indicati con le lettere A, B e C; l'albero A e B erano più vicini tra loro mentre l'albero C è stato scelto ad una maggiore distanza.

## **6. ESTRAZIONE DEL DNA:**

### **6.1 Preparazione dei campioni:**

Sia i gametofiti di *Sphagnum palustre* che quelli di *Leptodon smithii* campionati 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. Al termine del lavaggio e prima di procedere all'estrazione i campioni sono stati asciugati su di un filtro di carta assorbente.

### **6.2 Protocollo di estrazione:**

Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA usando l'estrazione in C-TAB (esadeciltrimetilammonio bromuro), partendo dal protocollo descritto da Doyle & Doyle (1987). Il protocollo prescritto dal produttore è stato leggermente modificato per adattarlo alla limitata quantità di materiale vegetale di partenza (dell'ordine di pochi mg).

La procedura è stata ottimizzata come segue:

- ✓ I gametofiti sono stati congelati con azoto liquido e pestati usando pestelli di vetro direttamente in microtubi Eppendorf da 2,0ml.
- ✓ Sono stati incubati a 60°C per 30 min in buffer C-TAB 2X (100mM Tris-HCl a pH 8.0; 1.4M NaCl; 20mM EDTA pH 8.0; 2% C-TAB; 0,5% 2- mercaptoetanololo). Tale passaggio è stato eseguito sotto cappa.
- ✓ Sono stati nuovamente incubati su ghiaccio per 5 min al fine di favorire la precipitazione delle proteine.

- ✓ Successivamente è stato aggiunto fenolo/cloroformio/alcool isoamilico 25:24:1 e i campioni sono stati centrifugati a freddo (4°C).
- ✓ Gli acidi nucleici si trovano ora nella fase acquosa superiore. E' stato, quindi, recuperato il supernatante che è stato trattato per 2 volte consecutive con cloroformio/alcool isoamilico 24:1 al fine di rendere più pura la componente di acidi nucleici.
- ✓ Dopo ciascun passaggio il campione è stato centrifugato prelevando sempre la fase superiore fino all'interfaccia.
- ✓ La successiva precipitazione degli acidi nucleici è stata ottenuta aggiungendo alcool isopropilico, in quantità pari ai 2/3 del volume totale, incubando a -80°C per 30min e centrifugando a freddo per 20 min alla velocità di 10000 rpm.
- ✓ Il pellet è stato risospeso in 0.5ml etanolo al 70% e riprecipitato per centrifugazione a 10000 rpm per 20 min ancora a freddo.
- ✓ Il pellet è stato liofilizzato e poi risospeso in 20-30 µl di ddH<sub>2</sub>O sterile.

Per eliminare la componente di RNA presente, quando richiesto, è necessario incubare il campione per tre ore a 37°C o over-night a temperatura ambiente con RNAsi A in concentrazione finale 10 mg/ml.

I campioni di DNA estratti sono stati analizzati al NanoDrop; uno strumento che permette di determinare sia la concentrazione del DNA estratto dai gametofiti, che la qualità dello stesso, evidenziando, in particolare, la contaminazione da proteine e sostanze organiche, come fenolo e altri composti aromatici utilizzati per l'estrazione. Successivamente le concentrazioni di DNA ottenute sono state

uniformate a 10 ng/μl, in quanto tale valore sperimentalmente ha mostrato il migliore risultato.

## 7. ISSR:

La tecnica ISSR si basa sull'utilizzo di primers relativamente brevi (10-30bp) complementari ai microsatelliti ossia ai loci ipervariabili dello stampo; se tali regioni ripetute in tandem si trovano ad una distanza tale da permettere l'amplificazione della regione di DNA compresa tra loro verranno prodotte delle bande che potranno essere visualizzate su gel di agarosio o di poliacrilammide (Wolfe & Liston 1998).

In particolare due individui con le stesse regioni fiancheggianti i microsatelliti produrranno bande omologhe o monomorfiche; viceversa individui con diverse regioni fiancheggianti i microsatelliti produrranno bande polimorfiche o individuo specifiche. Guardando la presenza o l'assenza di una o più bande sul gel è possibile identificare i diversi genotipi presenti all'interno di un popolazione.

L'analisi molecolare dei campioni di *Sphagnum palustre* è stata condotta utilizzando i 7 primers ISSR: 7; MAN; HAD; CHR; DAT; OH; TE con le caratteristiche riportate nella tabella 3.

I campioni di *Leptodon smithii* sono stati analizzati utilizzando i 5 primers ISSR: CHR, HAD, DAT, 17 E 18 con le caratteristiche riportate in tabella 4.

	Sequence	T.A. (°C)	N° Loci Analizzati	N° Loci Polimorfici
7	CACACACACACACAAAG	54	5	5
MAN	CACCACCACCACRC	54	4	4
HAD	CTCCTCCTCCTCRC	57	4	4
CHR	CACACACACACACAYG	54	4	2
DAT	GAGAGAGAGAGAGARC	54	7	7
OH	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGRG	57	5	4
TE	GTGGTGGTGGTGRC	54	6	6

Tabella 3: Primers ISSR utilizzati per l'amplificazione dei campioni di *Sphagnum palustre*

	Sequence	T.A. (°C)	N° Loci Analizzati	N° Loci Polimorfici
CHR	CACACACACACACAYG	54	4	4
HAD	CTCCTCCTCCTCRC	57	7	7
DAT	GAGAGAGAGAGAGARC	54	4	3
17	CAGCACACACACACACAC	58	5	3
18	GTGCACACACACACACAC	54	5	3

Tabella 4: Primers ISSR utilizzati per l'amplificazione dei campioni di *Leptodon smithii*.

I primers utilizzati sono stati selezionati dopo una lunga serie di prove, all'interno di un gruppo di 40 disponibili in quanto

producevano un bandeggio idoneo come marker intra ed inter-popolazione, non ambiguo e riproducibile per la specie.

La miscela di reazione utilizzata è la seguente:

- ✓ 5 U Taq Polimerasi (SIGMA)
- ✓ 10 X PCR Buffer (SIGMA)
- ✓ 25 mM MgCl<sub>2</sub> (SIGMA)
- ✓ 2.5 mM dNTPs
- ✓ 15 pmol primer
- ✓ ddH<sub>2</sub>O fino al volume di 25 µl.

Per ciascun primer le condizioni sono state settate, variando la concentrazione di MgCl<sub>2</sub>, le temperature di annealing ed il numero di cicli per ottimizzare la resa e la qualità dei prodotti di amplificazione.

Le reazioni sono state incubate nel Swift Maxi Thermal Cycler (ESCO) programmato con uno step iniziale di denaturazione a 94°C per 3', seguito da 40 cicli con 1' a 94°C, 1' di annealing e 2' di extension a 72°C.

Le temperature di annealing sono state programmate secondo un touch-down; ad esempio 60°C per i primi 2 cicli, poi 59°C (2 cicli), 58°C (2 cicli), 57°C (2 cicli), 56°C (2 cicli), 55°C (2 cicli) ed infine 54°C (26 cicli).

Gli amplificati sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio orizzontale al 2% in tampone TBE dove è stato caricato l'intero volume della reazione di amplificazione addizionato con Blu di Bromo Fenolo (BBF) 1X.

Il gel deve essere visualizzato come una rete molecolare attraverso le cui maglie si fanno migrare le macromolecole, dal polo negativo verso quello positivo, sotto l'azione di un campo elettrico e con una velocità inversamente proporzionale al logaritmo del loro peso molecolare.

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati, previa colorazione del gel durante la sua preparazione con il Gel Red; una sostanza che si lega al DNA intercalandosi tra la doppia elica ed emette luce rosarancione per fluorescenza se colpito da raggi UV.

Il gel è stato posto su di un transilluminatore a lampade UV ed è stato osservato. Sono state individuate le bande scaglionate lungo tutta la corsia dall'origine fino al margine opposto (fig. 12; 13 e 14). Ogni banda è una classe di amplificati tutti della stessa lunghezza la cui grandezza è stata stimata con un ladder fatto migrare insieme ai campioni nel gel. Il gel è stato fotografato con una macchina fotografica digitale.

Ogni prova è stata ripetuta almeno in duplicato per identificare le bande riproducibili ed inequivocabili.

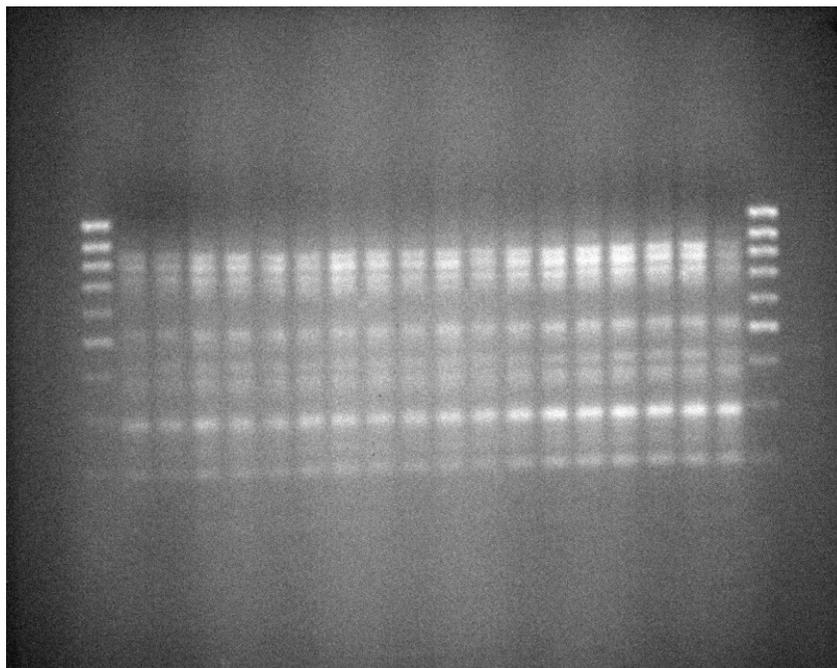


Fig. 12: Corsa elettroforetica di campioni di *Sphagnum palustre* amplificati con il primer DAT. Agli estremi è stato caricato il Ladder come riferimento. In questa immagine non sono presenti polimorfismi.

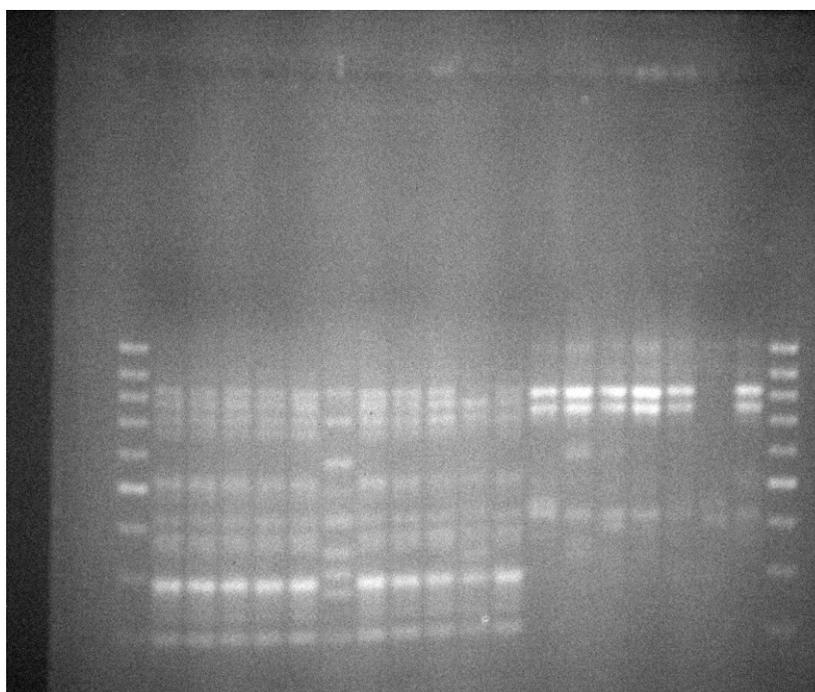


Fig. 13: Corsa elettroforetica di campioni di *Sphagnum palustre*. I primi 11 sono stati amplificati con il primer DAT, e notiamo un polimorfismo al campione 6. I campioni dal 12 al 18 sono stati amplificati con il primer MAN.

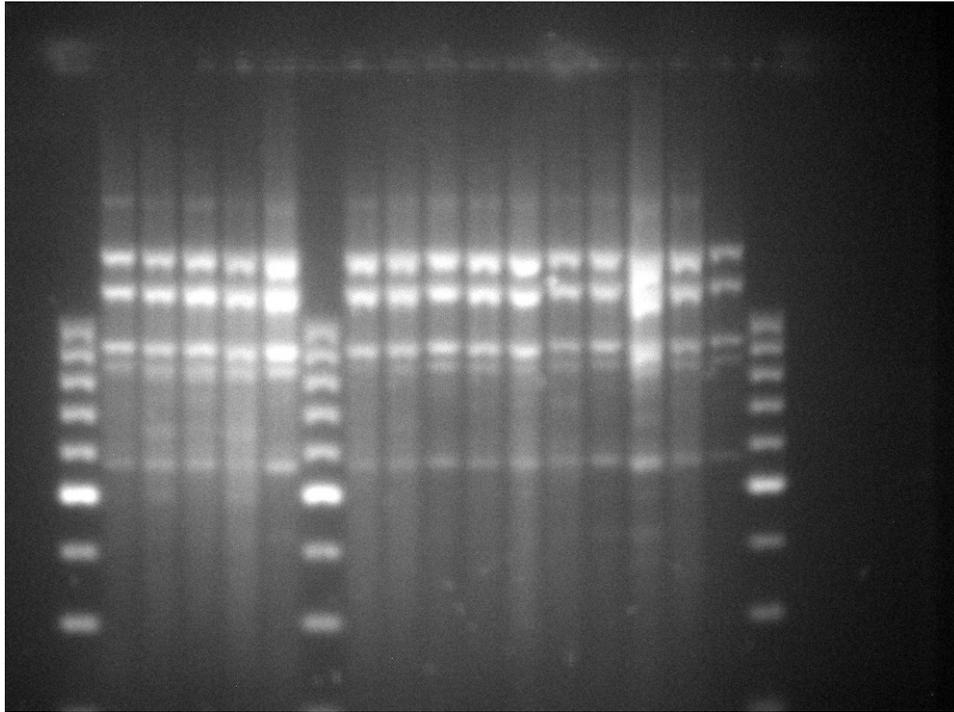


Fig 14: Corsa elettroforetica di campioni di *Leptodon smithii*. amplificati con il primer 18.

## **8. ANALISI DEI DATI MOLECOLARI:**

Dai profili di bande ottenuti con gli ISSR, sono state ottenute delle matrici binarie di 0 ed 1, in base al criterio di presenza/assenza, che rappresentano il dato “grezzo” sul quale è stata condotta una serie di analisi statistiche e genetiche quali: stima del polimorfismo, distanza genetica fra le popolazioni, scomposizione della varianza, stima dell'eterozigosità, analisi dei clusters e delle componenti principali.

Tale serie di analisi è stata realizzata per mezzo dei seguenti software specifici.

Il programma “Syn-tax” (Podani 2001) è stato utilizzato per analisi multivariate del tipo UPGMA e Neighbor Joining.

“Arlequin ver. 3.1” (Excoffier et al. 2006) è stato utilizzato, invece, per analizzare la struttura genetica delle singole popolazioni, calcolando le frequenze aplotipiche ed anche gli indici di diversità molecolare, “average diversity over loci” (Nei 1987; Tajima 1983). Lo stesso programma è stato utilizzato, inoltre, per determinare i valori di  $F_{st}$  (fixation index), come misura del grado di divergenza e del gene-flow tra le popolazioni, e per il test AMOVA (Analysis of Molecular Variance).

## **PARTE III:RISULTATI**

### **1. SPHAGNUM PALUSTRE**

#### **Neighbor-joining tree, Principal Coordinates Analysis e frequenze relative degli aplotipi:**

Il neighbor-joining tree (Saitou & Nei 1987), ottenuto dall'analisi della matrice binaria ricavata dai profili degli amplificati ISSR con l'algoritmo di Jaccard (fig. 13), mostra la presenza di 30 aplotipi all'interno dei 138 individui analizzati, appartenenti alle popolazioni di *Sphagnum palustre* campionate nel Lazio (PF), in Toscana (SIB/MAS) ed in Piemonte (LAG).

Il grafico evidenzia un grado di dissimilarità massima pari al 27%, e la presenza di 30 aplotipi, dei quali 10 appartengono alla popolazione di Posta Fibreno, 10 a quella di Sibolla, 6 a quella di Massaciuccoli e 4 a quella di Lagoni di Mercurago; non vi sono aplotipi condivisi tra i siti. Il rapporto tra individui campionati e numero di aplotipi in ogni sito evidenzia in generale una variabilità genetica maggiore nelle popolazioni toscane ed in quella piemontese, rispetto a quella laziale. Il dendrogramma mostra 2 cluster principali: uno con Posta Fibreno e Sibolla, l'altro con Massaciuccoli e Lagoni di Mercurago, ciascuno a sua volta suddiviso in 2 subcluster in base ai rispettivi siti.

In generale, si evidenzia che individui provenienti da diversi siti e da diverse popolazioni non mostrano mai aplotipi condivisi; aplotipi condivisi si osservano, invece, considerando individui provenienti dalla stessa popolazione.

La Principal Coordinates Analysis (PCoA) ottenuta dalla matrice degli individui (fig. 14) evidenzia maggiormente la struttura geografica,

indicando una maggiore vicinanza tra le popolazioni toscane ed un maggiore isolamento della popolazione di Lagoni di Mercurago.



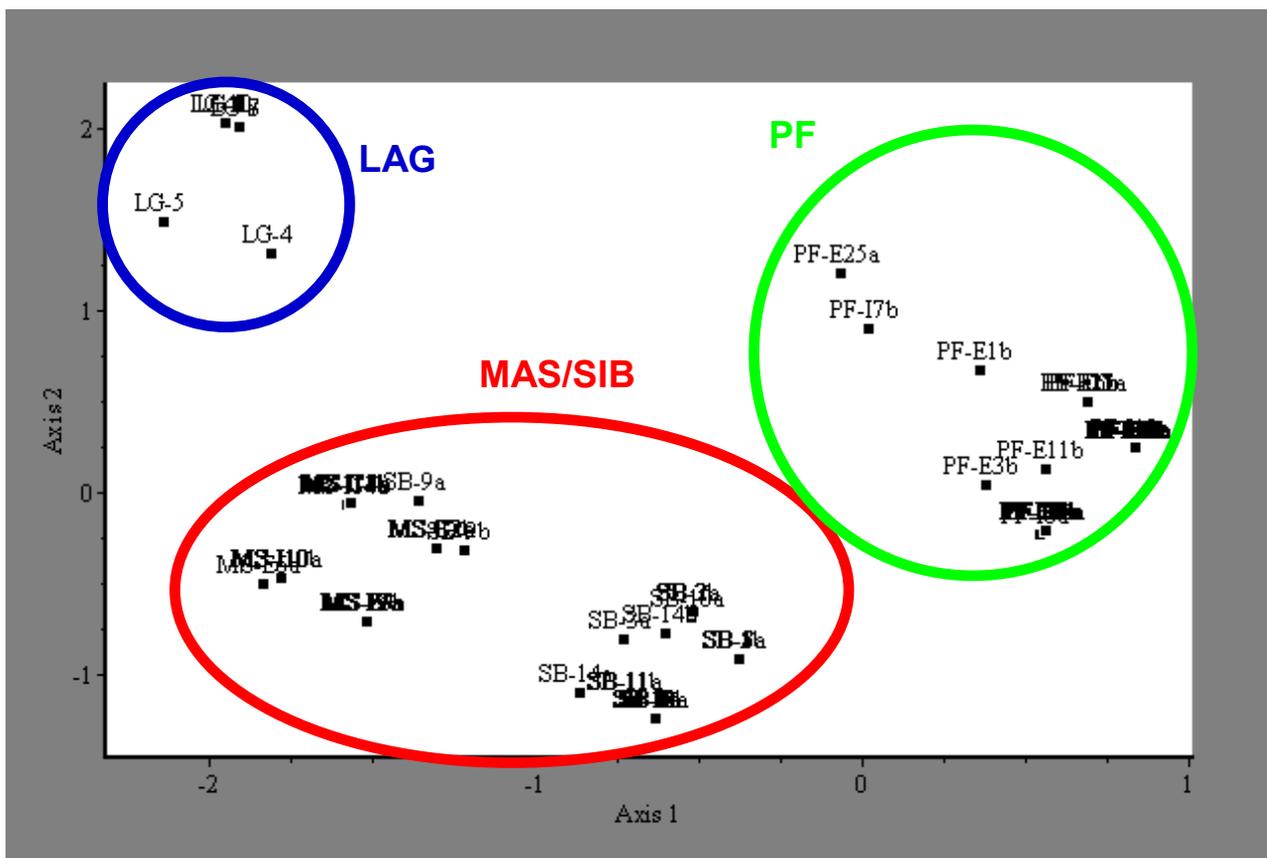


Fig. 16: PCoA degli aplotipi presenti nelle 4 popolazioni analizzate.

La distribuzione delle frequenze relative degli aplotipi nelle 4 popolazioni analizzate è riportata nella figura 17.

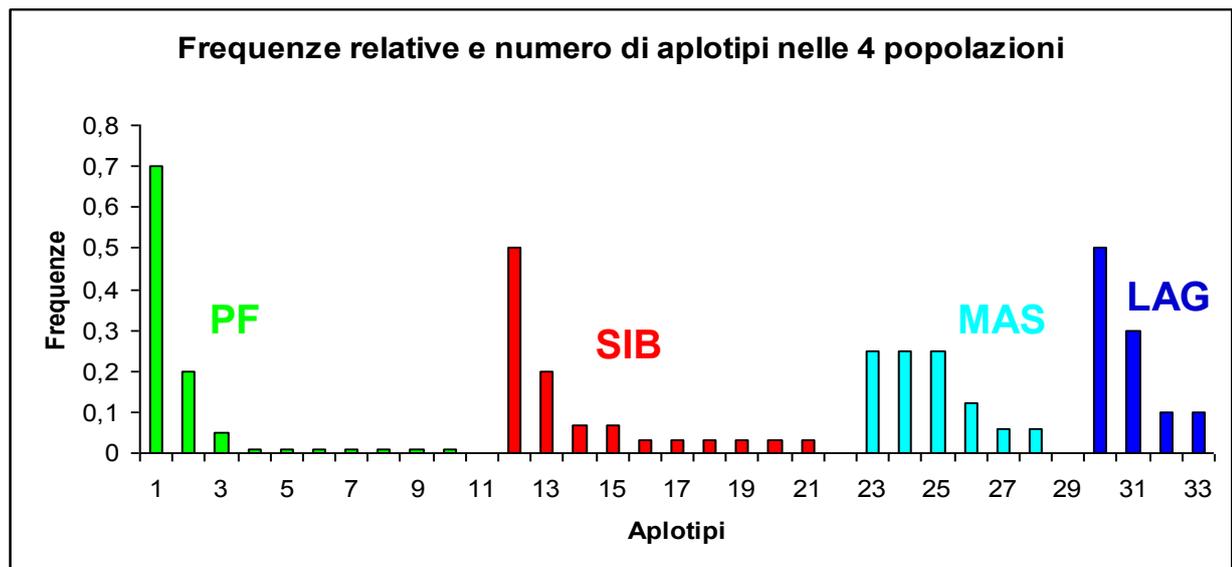


Fig. 17: Frequenze relative degli aplotipi nelle 4 popolazioni di *S.palustre* analizzate.

L'istogramma evidenzia la presenza di un aplotipo dominante all'interno della popolazione di Posta Fibreno, rappresentato da 57 individui sugli 84 costituenti tale popolazione, e di numerosi aplotipi rari, ben 7 sui 10 totali riscontrati in questo sito. Un andamento simile delle frequenze relative degli aplotipi si riscontra nella popolazione di Sibolla, dove è presente un aplotipo dominante rappresentato da 13 individui su 28, dei rimanenti 9 aplotipi ben 6 possono essere considerati rari ossia rappresentati da un solo individuo.

Nella popolazione di Massaciuccoli ed in quella di Lagoni di Mercurago, invece, si osserva una distribuzione più uniforme delle frequenze relative degli aplotipi ed un numero inferiore di aplotipi rari.

**Distribuzione degli aplotipi nel sito di Posta Fibreno:**

In figura 18 è riportata la distribuzione dei 10 aplotipi ISSR caratterizzanti la popolazione laziale di *S. palustre* analizzata, nelle tre ellissi di campionamento identificate nel sito di Posta Fibreno.

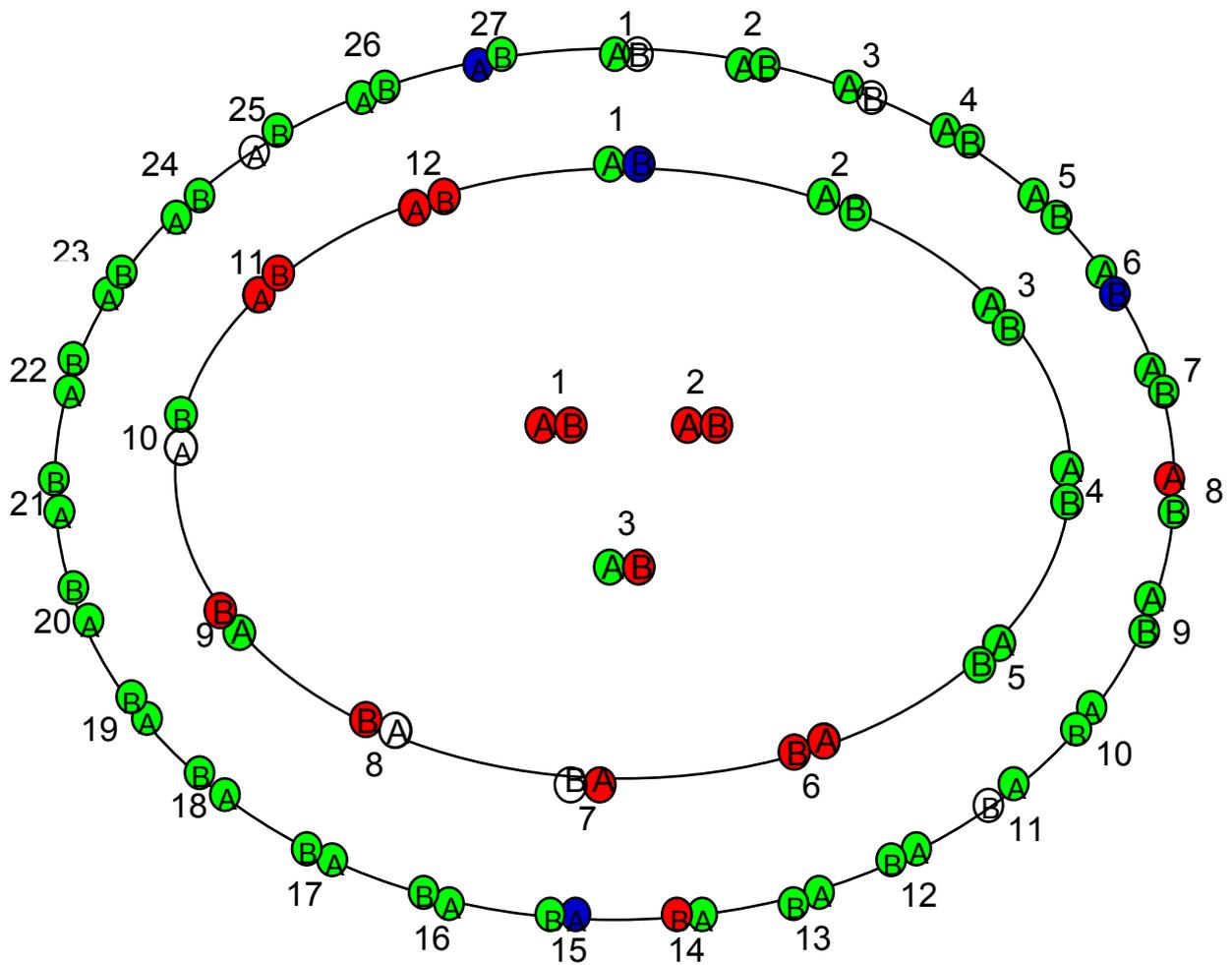


Fig 18: Distribuzione dei 10 aplotipi ISSR nell'unità di campionamento. In verde, rosso e blu sono indicati gli aplotipi più rappresentati, in bianco sono indicati gli aplotipi rari.

Il grafico evidenzia in generale l'esistenza di una relazione tra gli aplotipi e le ellissi di campionamento; infatti, gli individui provenienti dalla stessa ellissi di campionamento sono, generalmente, geneticamente più vicini tra di loro (coppie di individui o singoli individui con aplotipo identico appartengono alla stessa linea di campionamento); ad esempio, l'aplotipo indicato in verde sul grafico, è quello più frequente (43/54) negli individui raccolti nell'ellissi esterna di campionamento; similmente, quello indicato in rosso è il più diffuso tra gli individui campionati al centro (5/6). D'altra parte, numerosi individui provenienti dalle diverse ellissi di campionamento condividono lo stesso aplotipo. Queste osservazioni evidenziano perciò, sia l'effetto di un certo mescolamento tra i cloni, che l'effetto della crescita clonale.

Osservando la distribuzione dei 10 aplotipi ISSR si nota, inoltre, un decremento della variabilità genetica passando dall'interno verso l'esterno dell'unità di campionamento. Il maggior grado di variabilità, infatti, è presente tra gli individui campionati nel centro dove si osserva la presenza di 2 aplotipi diversi nei 6 individui campionati e diminuisce considerando gli individui campionati nel cerchio interno, dove sono presenti 6 aplotipi nei 24 individui campionati, e ancora di più considerando il cerchio esterno dove sono presenti 7 aplotipi diversi nei 54 individui campionati.

### Indici molecolari:

La variabilità genetica riscontrata nelle 4 popolazioni di *Sphagnum palustre* analizzate (Posta Fibreno (PF); Sibolla (SIB); Massaciuccoli (MAS); Lagoni di Mercurago (LAG)) è stata stimata utilizzando gli indici molecolari riportati in tabella 5.

Popolazione	N° di Aplotipi	N° loci polimorfici	H <sub>s</sub> gene diversity ± sd	π <sub>n</sub> average gene diversity over loci ± sd
PF	10	15	0.5060 +/- 0.0578	0.024736 +/- 0.019508
SIB	10	15	0.7619 +/- 0.0743	0.073998 +/- 0.045484
MAS	6	7	0.8417 +/- 0.0501	0.048095 +/- 0.033288
LAG	4	4	0.7111 +/- 0.1175	0.045079 +/- 0.033041

Tabella 5: Indici di diversità genetica in 4 popolazioni di *Sphagnum palustre*.

I valori di “gene diversity” riportati in tabella mostrano un livello di variabilità genetica maggiore nelle popolazioni di *Sphagnum palustre* campionate in Toscana e Piemonte rispetto alla popolazione laziale.

Lo stesso andamento è riscontrabile per π<sub>n</sub> (Average gene diversity over loci).

Il valore massimo di “gene diversity” è presente nella popolazione di Massaciuccoli; mentre valori di “gene diversity” tra loro paragonabili sono presenti nella popolazione di Sibolla ed in quella di Lagoni di Mercurago.

Il risultato è confermato anche dal numero di aplotipi riscontrato in ogni popolazione.

**AMOVA:**

I risultati dell’analisi AMOVA condotta sulle suddette 4 popolazioni sono riportati nella tabella 6.

<b>Source of variation</b>	<b>Percentage of variation</b>	<b>FST</b>
<b>Among populations</b>	<b>82.44</b>	<b>0.82436</b>
<b>Within populations</b>	<b>17.56</b>	

Tab. 6: analisi AMOVA. Livello di significatività di Fst 0.05 (110 permutazioni).

L’analisi AMOVA mette in evidenza una percentuale di varianza maggiore tra le 4 popolazioni piuttosto che all’interno delle singole popolazioni.

Tale risultato conferma, dunque, che gli individui appartenenti ad una stessa popolazione sono geneticamente più vicini tra di loro rispetto a quelli provenienti da popolazioni diverse.

Le distanze genetiche tra le 4 popolazioni sono riportate nella tabella 7.

	<b>PF</b>	<b>SIB</b>	<b>MAS</b>	<b>LAG</b>
<b>PF</b>	<b>0.00000</b>			
<b>SIB</b>	<b>0.75385</b>	<b>0.00000</b>		
<b>MAS</b>	<b>0.87555</b>	<b>0.70712</b>	<b>0.00000</b>	
<b>LAG</b>	<b>0.91981</b>	<b>0.81173</b>	<b>0.85004</b>	<b>0.00000</b>

Tab. 7: Valori di Fst tra 4 popolazioni di *S. palustre*. ( $0 \leq F_{st} \leq 1$ ).

I valori di Fst ottenuti sono tutti sufficientemente elevati da suggerire uno scarso flusso genico tra le 4 popolazioni, e riflettono le distanze geografiche tra i siti.

Nella tabella 8 è riportato il Numero di migranti per generazione (Nm) nelle 4 popolazioni esaminate; il valore è stato ottenuto utilizzando la formula di Wright (1951):

$$Nm = (1 - F_{st}) / 4F_{st}$$

Dove gli Fst rappresentano i valori specifici per le due popolazioni.

	<b>PF (FR)</b>	<b>SIB (LU)</b>	<b>MAS (LU)</b>	<b>LAG (NO)</b>
<b>Fst</b>	<b>0.82670</b>	<b>0.81831</b>	<b>0.82301</b>	<b>0.82381</b>
<b>Nm</b>	<b>0.05240</b>	<b>0.05550</b>	<b>0.05376</b>	<b>0.05346</b>

Tab. 8: Nm nelle 4 popolazioni di *Sphagnum palustre* esaminate (FR; LU; NO).

I valori di  $N_m$  ottenuti, tutti prossimi allo zero, indicano un elevato isolamento genetico delle 4 popolazioni e confermano il ridotto flusso genico tra le popolazioni evidenziato dai valori delle distanze genetiche riportati nella tabella 7.

Infine l'analisi condotta sulla popolazione di Posta Fibreno utilizzando il software "BOTTLENECK ver. 1.2.02" (Luikart & Comuet 1998) ha evidenziato la presenza di un evento di Bottleneck recente in tale popolazione.

## **2. LEPTODON SMITHII**

### **Principal Coordinates Analysis, Neighbor-joining tree e frequenze relative degli aplotipi:**

Il neighbor-joining tree (Saitou & Nei 1987), ottenuto dall'analisi della matrice binaria ricavata dai profili degli amplificati ISSR con l'algoritmo di Jaccard ha evidenziato la presenza di 58 aplotipi all'interno dei 180 individui analizzati appartenenti alle popolazioni della Campania e della Toscana costituite, a loro volta, rispettivamente da 3 sub-popolazioni; Capodimonte (Cap); Astroni (Ast); Ottati (Ott) per la Campania e Villa Patrizia (Pat); Belcaro (Bel); Cala Violina (Vio) per la Toscana.

La Principal Coordinates Analysis condotta sulla matrice dei 58 aplotipi (figura 19) mostra la suddivisione degli aplotipi in due gruppi principali, uno corrispondente alla Campania e l'altro corrispondente alla Toscana.

Il gruppo rappresentativo della Campania comprende 32 aplotipi, quello rappresentativo della Toscana 26 dei 58 aplotipi totali.

La struttura genetica globale indica, inoltre, che mentre in Campania le popolazioni dei 3 siti analizzati mostrano una vicinanza genetica tra di loro, in Toscana vi è un maggiore isolamento genetico del sito periurbano di Belcaro mentre la popolazione del sito remoto di Cala Violina mostra una vicinanza genetica con quella del sito urbano di Villa Patrizia pur essendo geograficamente disgiunta da essa.

La struttura geografica a livello di regione e a livello di ogni sito è evidente anche nel Neighbor joining tree degli aplotipi riportato in figura 20.

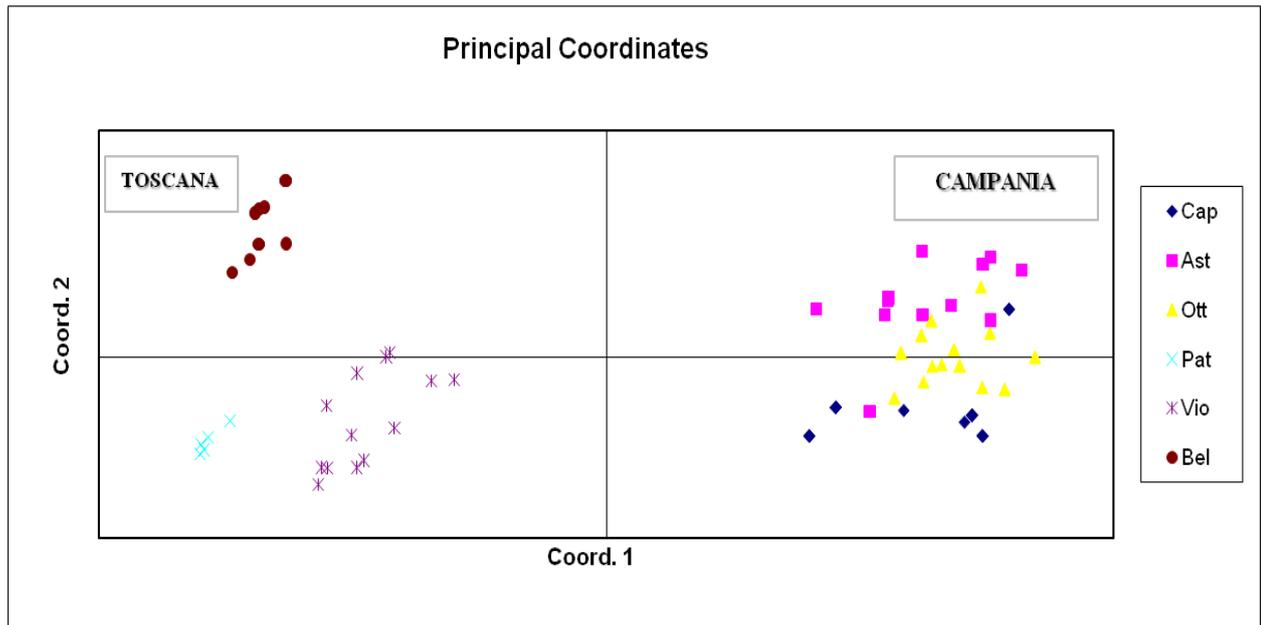


Fig. 19: PCoA su 6 popolazioni di *Leptodon smithii* esaminate.

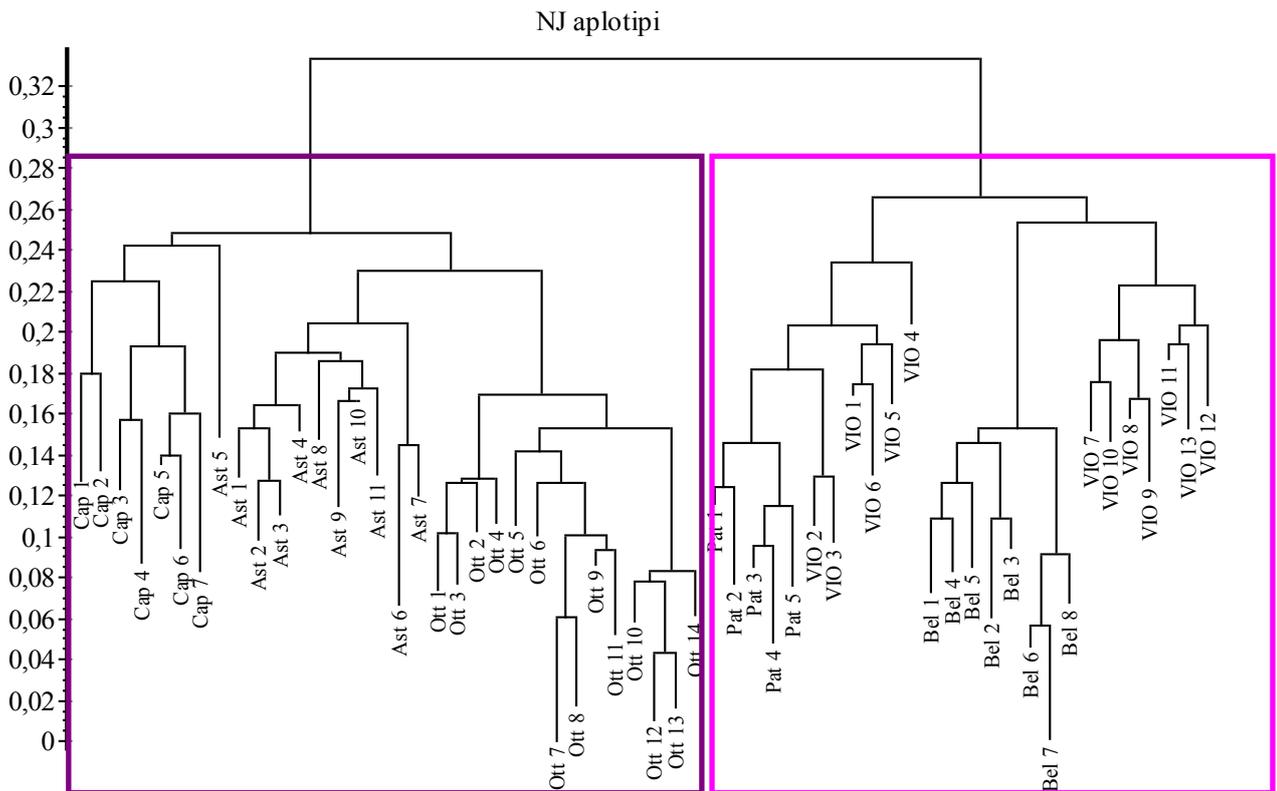


Fig. 20: Neighbour- joining tree degli aplotipi delle 6 popolazioni esaminate.

Il cluster costituito dagli individui campani risulta a sua volta suddiviso in 2 sub - clusters principali (fig. 21).

Il primo cluster è costituito dagli individui campionati nel sito urbano della regione (Capodimonte (Cap); in verde nel grafico) e da quelli campionati nel sito periurbano (Astroni (Ast); in rosso nel grafico); all'altro cluster appartengono, invece, gli individui campionati nel sito remoto (Ottati (Ott); in blu nel grafico).

Gli individui provenienti dal sito di Capodimonte presentano 7 dei 32 aplotipi riscontrati in Campania ed un grado di dissimilarità massima all'interno del sito pari circa al 16%; quelli provenienti dal sito degli Astroni presentano 11 dei 32 aplotipi totali della Campania ed un grado di dissimilarità massima pari a circa il 20%; gli individui campionati nel sito di Ottati, infine, presentano 14 aplotipi ed un grado di dissimilarità massima pari circa al 18%.

Il cluster costituito dagli individui campionati in Toscana, risulta a sua volta suddiviso in 2 sub - clusters (fig. 22).

Il primo cluster è costituito dagli individui campionati nel sito urbano della Toscana (Villa Patrizia (Pat); indicato in verde nel grafico) e dagli individui campionati nel sito remoto (Cala Violina (Vio); in blu nel grafico). Al secondo sub - cluster appartengono, invece, gli individui campionati nel sito extraurbano (Belcaro (Bel); in rosso nel grafico).

Gli individui provenienti dal sito di Villa Patrizia presentano 5 dei 26 aplotipi riscontrati in Toscana ed un grado di dissimilarità massima all'interno del sito pari a circa il 12 %; quelli provenienti dal sito di Belcaro presentano 8 dei 26 aplotipi totali della Toscana ed un grado di dissimilarità massima pari al 18%; gli individui campionati nel sito

di Cala Violina, infine, presentano 13 aplotipi ed un grado di dissimilarità massima pari al 20 %.

Non si osservano aplotipi condivisi tra le regioni e tra i siti, mentre aplotipi condivisi si osservano tra i forofiti.

Aplotipi condivisi nello stesso sito si osservano, in particolare, tra l'albero B e l'albero C campionati nel sito degli Astroni; tra l'albero A e l'albero B campionati nel sito di Belcaro e tra l'albero B e C campionati nel sito di Villa Patrizia.

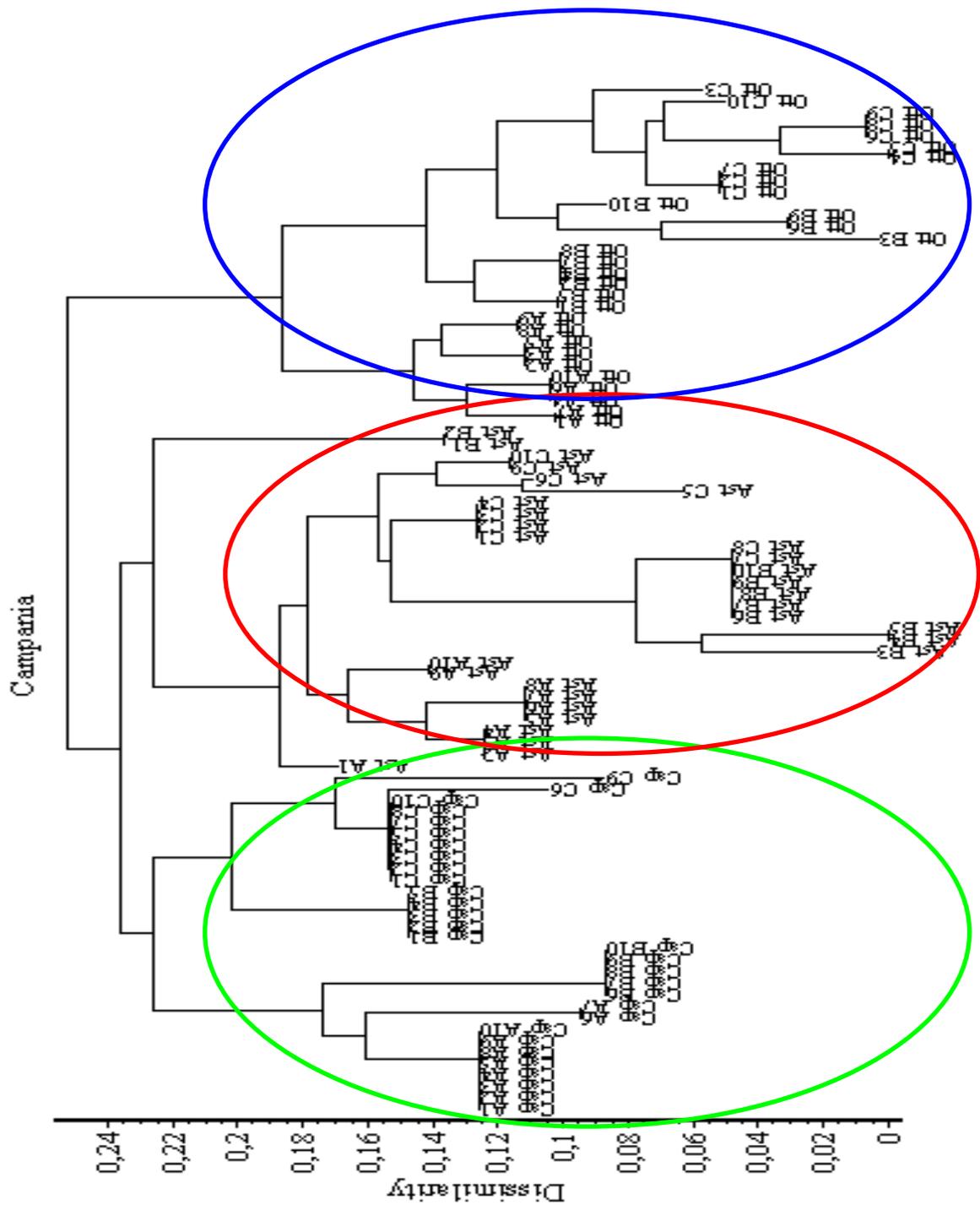


Fig. 21: Neighbour- joining tree per 90 gametofiti di *L. smithii* campionati in Campania ed ottenuto dall'analisi della matrice binaria ISSR.

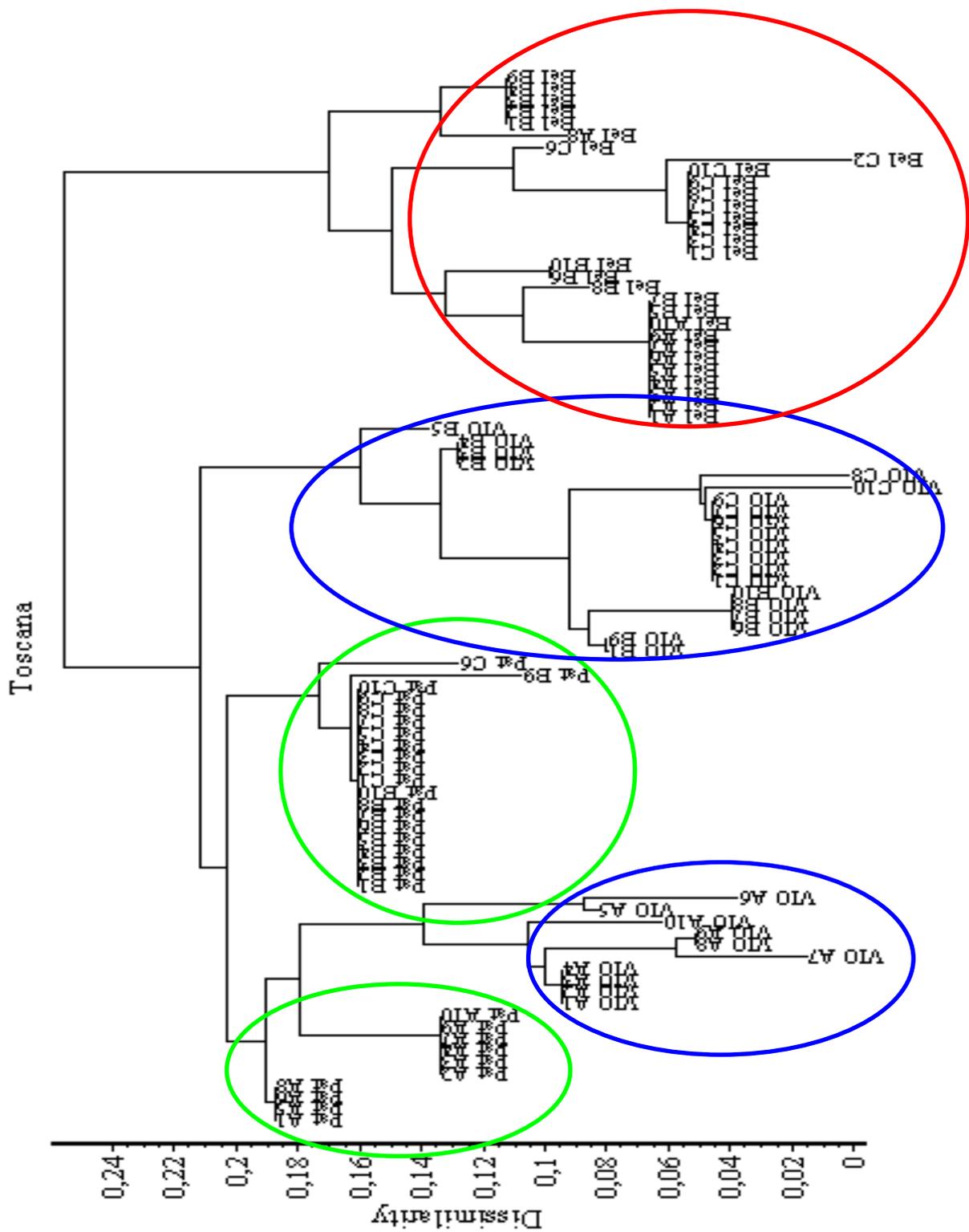


Fig. 22: Neighbour- joining tree per 90 gametofiti di *L. smithii* campionati in Toscana ed ottenuto dall'analisi della matrice binaria ISSR.

Le frequenze relative degli aplotipi all'interno delle 6 popolazioni analizzate sono riportate in figura 23.

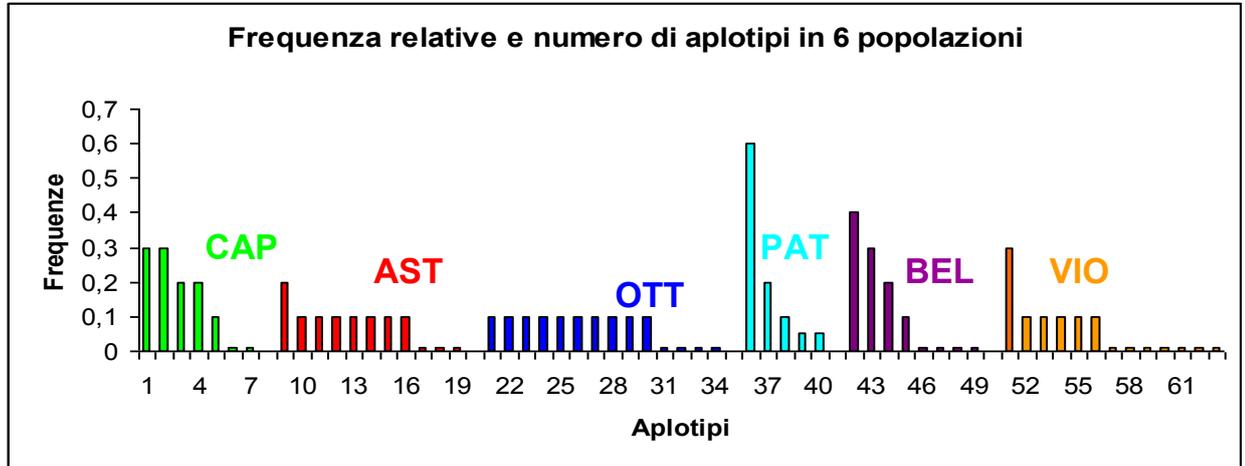


Fig. 23: Frequenza relativa e numero degli aplotipi nei 6 siti di studio

L'istogramma evidenzia una distribuzione non uniforme delle frequenze relative degli aplotipi nella popolazione di Villa Patrizia caratterizzata dalla presenza di un aplotipo dominante rappresentato da 18 individui su 30.

Tutte le altre popolazioni sono caratterizzate, invece, da una distribuzione più omogenea delle frequenze relative degli aplotipi.

**CONFRONTO TRA CAMPANIA E TOSCANA: Indici molecolari**

La variabilità genetica riscontrata in Campania e in Toscana è stata stimata attraverso gli indici molecolari riportati in tabella 9.

Indici quali numero di aplotipi, numero di loci polimorfici e la “gene diversity” mostrano una cospicua variabilità genetica nelle 2 popolazioni in esame.

Osservando gli indici di diversità molecolare, si nota, infatti, che le popolazioni esibiscono un livello di variabilità interna sempre elevato, espresso dal valore di  $H_s$  (gene diversity, Nei, 1987). Tutti gli indici mostrano valori maggiori per la popolazione della Campania rispetto a quella della Toscana.

Sito	N° di Aplotipi	N° loci polimorfici	$H_s$ gene diversity $\pm$ sd	$\pi_n$ average gene diversity over loci $\pm$ sd
Campania	32	16	0.9645 +/- 0.0064	0.207501 +/- 0.112319
Toscana	26	13	0.9218 +/- 0.0144	0.163546 +/- 0.091155

Tabella 9: Indici di diversità genetica in Campania e Toscana.

I risultati dell'analisi AMOVA condotta sulle suddette due popolazioni sono riportati nella tabella 10.

<b>Source of variation</b>	<b>Percentage of variation</b>	<b>FST</b>
<b>Among populations</b>	<b>54.36</b>	<b>0.54361</b>
<b>Within populations</b>	<b>45.64</b>	

Tab. 10: analisi AMOVA. Livello di significatività di Fst 0.05 (110 permutazioni).

Dalla tabella si evince che la percentuale di varianza è più alta del 9% tra le popolazioni piuttosto che all'interno di una stessa popolazione; dunque gli individui appartenenti ad una stessa popolazione sono geneticamente più vicini tra di loro rispetto a quelli che fanno parte di due diverse popolazioni come già evidenziato dall'analisi Nj.

### **AMOVA per la Campania e la Toscana:**

I risultati dell'analisi AMOVA condotta sulle 3 popolazioni campane sono riportati nella tabella 11.

<b>Source of variation</b>	<b>Percentage of variation</b>	<b>FST</b>
<b>Among populations</b>	<b>52.43</b>	<b>0.52428</b>
<b>Within populations</b>	<b>47.57</b>	

Tab. 11: analisi AMOVA. Livello di significatività di Fst 0.05 (110 permutazioni).

I risultati dell'analisi AMOVA condotta sulle 3 popolazioni toscane sono riportati nella tabella 12.

<b>Source of variation</b>	<b>Percentage of variation</b>	<b>FST</b>
<b>Among populations</b>	<b>66.21</b>	<b>0.66208</b>
<b>Within populations</b>	<b>33.79</b>	

Tab. 12: analisi AMOVA. Livello di significatività di Fst 0.05 (110 permutazioni).

Le tabelle 11 e 12 evidenziano, nuovamente, che la percentuale di varianza è maggiore tra le popolazioni piuttosto che all'interno di una stessa popolazione.

Tuttavia, mentre in Campania i due valori presentano uno scarto del 5%, suggerendo uno scambio genetico tra i 3 siti, in Toscana la varianza tra i siti, superiore a quella interna del 33% circa, indica un forte isolamento reciproco tra le 3 popolazioni confermando il risultato ottenuto dalla PCoA.

Il valore di Fst, calcolato confrontando le popolazioni, ci fornisce una misura del grado di divergenza e del gene flow; la significatività dei dati ottenuti ci viene fornita da un test eseguito mediante 110 permutazioni.

Il valore di Fst riportato nella tabella 10 è un valore significativo.

Nella tabella 13 è riportato il Numero di migranti per generazione (Nm) nelle due popolazioni esaminate; il valore è stato ottenuto utilizzando la formula di Wright (1951):

$$Nm=(1-Fst)/4Fst$$

Dove gli Fst rappresentano i valori specifici per le due popolazioni.

	<b>CAMPANIA</b>	<b>TOSCANA</b>
<b>Fst</b>	<b>0.54301</b>	<b>0.54421</b>
<b>Nm</b>	<b>0.21036</b>	<b>0.20938</b>

Tab. 13: Nm in due popolazioni di *Leptodon smithii* esaminate

I valori di Nm ottenuti, abbondantemente al di sotto dell'unità, indicano un elevato isolamento genetico delle due popolazioni.

### **CONFRONTO TRA 6 POPOLAZIONI: Indici molecolari**

La variabilità genetica riscontrata nelle 6 popolazioni oggetto di studio (Cap; Ast; Ott; Pat; Bel; Vio) è stata stimata utilizzando gli indici molecolari riportati in tabella 14.

Sito	N° di Aplotipi	N° loci polimorfici	H <sub>s</sub> gene diversity ± sd	πn average gene diversity over loci ± sd
Cap	7	9	0.8230 +/- 0.0334	0.112092 +/- 0.067764
Ast	11	9	0.9034 +/- 0.0286	0.117701 +/- 0.070563
<b>Ott</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>0.9471 +/- 0.0170</b>	<b>0.127356 +/- 0.075370</b>
Pat	5	4	0.6000 +/- 0.0837	0.036966 +/- 0.029198
Bel	8	6	0.7839 +/- 0.0481	0.061057 +/- 0.041937
<b>Vio</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>0.8966 +/- 0.0356</b>	<b>0.113379 +/- 0.068407</b>

Tabella 14: Indici di diversità genetica in 6 popolazioni di *Leptodon smithii* analizzate.

I valori ottenuti per indici molecolari quali la “gene diversity” e la “average gene diversity over loci” evidenziano in entrambe le regioni livelli maggiori di biodiversità nei siti remoti.

I risultati dell'analisi AMOVA condotta sulle suddette 6 popolazioni sono riportati nella tabella 15.

Source of variation	Percentage of variation	FST
Among populations	71.77	0.71769
Within populations	28.23	

Tab. 15: analisi AMOVA. Livello di significatività di Fst 0.05 (110 permutazioni).

L'analisi AMOVA mette, nuovamente, in evidenza che la percentuale di varianza è maggiore tra le 6 popolazioni piuttosto che all'interno di una stessa popolazione; fornendo una conferma del fatto che gli individui provenienti da una stessa popolazione sono geneticamente più vicini tra di loro rispetto a quelli che provengono da popolazioni diverse.

Le distanze genetiche tra le 6 popolazioni sono riportate nella tabella 16.

	Cap	Ast	Ott	Pat	Bel	Vio
Cap	0.00000					
Ast	0.48131	0.00000				
Ott	0.57962	0.49875	0.00000			
Pat	0.82000	0.81591	0.82014	0.00000		
Bel	0.80407	0.76396	0.79361	0.77962	0.00000	
Vio	0.68537	0.68993	0.66531	0.54776	0.63196	0.00000

Tab. 16: Valori di Fst tra 6 popolazioni di *L.smithii* . ( $0 \leq Fst \leq 1$ ).

I valori, tutti significativi, sono, in generale, sufficientemente alti da suggerire uno scarso gene – flow tra le 6 popolazioni.

Un valore più basso, ma comunque significativo, di  $F_{st}$  si riscontra tra la popolazione di Capodimonte e quella di Astroni ( $F_{st} = 0.48131$ ) e tra la popolazione di Astroni e quella di Ottati ( $F_{st} = 0.49875$ ).

I valori di  $F_{st}$  più elevati riscontrati tra Belcaro e Villa Patrizia ( $F_{st} = 0.77962$ ) e tra Belcaro e Cala Violina ( $F_{st} = 0.63196$ ) confermano l'isolamento genetico del sito già evidenziato dalla PCoA condotta sugli aplotipi.

Nella tabella 17 è riportato il Numero di migranti per generazione ( $N_m$ ) per le 6 popolazioni esaminate.

	<b>Cap</b>	<b>Ast</b>	<b>Ott</b>	<b>Pat</b>	<b>Bel</b>	<b>Vio</b>
<b>Fst</b>	<b>0.71597</b>	<b>0.71541</b>	<b>0.71445</b>	<b>0.72343</b>	<b>0.72104</b>	<b>0.71584</b>
<b>Nm</b>	<b>0.09917</b>	<b>0.09944</b>	<b>0.09999</b>	<b>0.09557</b>	<b>0.09672</b>	<b>0.09924</b>

Tab. 17:  $N_m$  in 6 popolazioni di *Leptodon smithii* esaminate

I valori di  $N_m$  ottenuti, tutti paragonabili e vicini allo zero, indicano un elevato isolamento genetico delle 6 popolazioni esaminate.

## **PARTE IV:DISCUSSIONE**

### **1. SPHAGNUM PALUSTRE:**

#### **Indici molecolari, numero di aplotipi e frequenze relative:**

La struttura genetica delle 4 popolazioni di *Sphagnum palustre* considerate, provenienti dal centro e dal nord Italia, è stata analizzata con lo scopo di valutare lo stato di conservazione in relazione alla progressiva scomparsa e frammentazione degli habitat ideali alla crescita e allo sviluppo della specie in Italia.

I risultati ottenuti dall'analisi dei dati molecolari rappresentati dai differenti indici di diversità genetica e dal numero di aplotipi riscontrati in ogni popolazione, evidenziano una variabilità genetica maggiore nelle popolazioni toscane ed in quella piemontese rispetto alla popolazione laziale. In quest'ultima, il campionamento fitto su 3 ellissi evidenzia sia un certo mescolamento fra i cloni, che l'effetto della crescita vegetativa in ciascun clone; inoltre, sembra confermato il modello di crescita centrifuga tipico degli sfagni, con gli individui fondatori della popolazione al centro.

Il grado di diversità generale riscontrato in *S. palustre* (specie dioica) è in linea con quello trovato in altri studi di variabilità effettuati con gli ISSR in un'altra specie dioica, *Sphagnum angermanicum* (Gunnarson et al., 2005), e che hanno mostrato la presenza di 28 aplotipi ISSR in 128 individui analizzati, ma risulta inferiore a quello riscontrato in studi analoghi condotti su altre specie dioiche, che raramente si riproducono sessualmente, ed è superiore a quello ottenuto in studi analoghi condotti su specie monoiche (Cronberg, 1996, 1998; Hassel & Gunnarsson, 2004; Stenøied & Sastad, 1999; Thinggaard, 2001). Le specie monoiche, infatti, spesso esibiscono un

livello di variabilità genetica inferiore rispetto a quelle dioiche in quanto possono essere influenzate da un maggiore grado di inbreeding (Cronberg 1996; Hamrick & Godt; 1989; Stenøied & Sastad, 1999); anche le specie dioiche, però, spesso mostrano riproduzione asessuale; la riproduzione asessuale in combinazione con la deriva genetica riduce i livelli di variabilità genetica e spesso aumenta le differenze genetiche tra le popolazioni (Baatout et al., 1991; Treu et al., 2001).

Il risultato è in accordo, inoltre, con la minore variabilità genetica riscontrata in studi condotti su specie rare rispetto a quelli condotti su specie comuni di piante (Cole 2003; Frankham 1996; Gitzendanner & Soltis 2000). Anche se *S. palustre* non è segnalato come specie rara in Italia, il rischio di estinzione per questo muschio può essere correlato soprattutto alla riduzione sempre maggiore degli ambienti umidi e paludosi nostro Paese, e anche alla posizione marginale delle popolazioni considerate. Quest'ultima è particolarmente evidente a Posta Fibreno, dove nonostante il campionamento numeroso, si osservano i livelli di biodiversità molecolare più bassi. La minore biodiversità di Posta Fibreno è evidente dai valori inferiori degli indici molecolari, dal minor numero degli aplotipi e dalle frequenze relative dei 10 aplotipi che hanno evidenziato la presenza di un solo aplotipo dominante, rappresentato da 57 individui su 84, e di numerosi aplotipi rari. Dunque l'eventuale scomparsa degli aplotipi rari, dovuta ad esempio a una drastica riduzione delle dimensioni della popolazione in seguito a cambiamenti microambientali, potrebbe portare ad una notevole riduzione della variabilità genetica, aumentando sensibilmente il rischio di estinzione locale.

La progressiva scomparsa nell'Italia Centro-Meridionale di habitat adatti alla sopravvivenza della specie avrebbe determinato nel tempo un maggiore isolamento geografico della popolazione laziale. Infatti, la posizione marginale è più esposta ai cambiamenti microambientali che determinano frammentazione delle popolazioni con conseguente aumento della lunghezza totale dei confini; questo fenomeno, noto come “edge effect” (Pharo et al., 2007), produce nel tempo fenomeni di interruzione del flusso genico, isolamento ed estinzione locale.

È' riportato nella letteratura, che nelle zone poste al margine degli areali di distribuzione delle specie, infatti, il cambiamento di condizioni microclimatiche quali l'aumento delle temperature, l'aumento della radiazione solare e la diminuzione dell'umidità ambientale (Kapos et al., 1997; Laurance et al., 2001), associato all'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) ha evidenziato, infatti, l'esistenza di 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, in generale, una variabilità inferiore rispetto a quelle preservate dal disturbo, e appaiono più strutturate.

Una delle principali minacce per la biodiversità, infatti, è costituita dall'alterazione, dalla perdita e dalla frammentazione di habitat, causata dai cambiamenti del territorio operati dall'uomo; in seguito alla frammentazione dell'habitat, una specie che occupa un'area più o meno vasta può in pochi anni mostrare una tipica distribuzione a “macchia di leopardo”. La frammentazione dell'habitat ha l'effetto di

ridurre le dimensioni / aumentare il numero dei *patches* (aree che presentano condizioni ambientali omogenee) aumentando la loro distanza reciproca -e quindi l'isolamento tra *patches* simili - e di modificare la qualità degli habitat rimasti; inoltre, *patches* di ambienti naturali di per sé non alterati, ma circondati da paesaggi modificati possono risultare non più adatti per certe specie.

In seguito alla frammentazione degli habitat si formano popolazioni piccole ed isolate che, come è noto, sono maggiormente suscettibili agli effetti della deriva genetica, che, a sua volta può portare ad una riduzione della eterozigosità ed alla perdita degli alleli rari (Ewens et al., 1987). L'isolamento genetico può, inoltre, causare la riduzione del flusso genico ed aumentare l'inbreeding (Frankham 1996; Nei 1987) tali fattori determinano una diminuzione della variabilità genetica che si traduce in una riduzione della fitness per le popolazioni naturali a cui segue un maggior rischio di estinzione locale delle specie.

La popolazione di Posta Fibreno rappresenterebbe, dunque, una popolazione relitta, il sito più vicino in cui compare la specie oggetto di studio, infatti, è il lago di Sibolla in provincia di Lucca che dista circa 400 chilometri dal sito laziale, che si troverebbe dunque in una situazione di maggiore rischio di estinzione rispetto alla popolazioni toscane ed a quella piemontese sottoposte ad un minore isolamento geografico, sia per la maggiore possibilità di scambio con le vicine popolazioni nord-europee, sia perché nel nord-Italia l'habitat ideale per la crescita di *Sphagnum palustre* è maggiormente diffuso.

Il risultato ottenuto suggerisce inoltre, che le dimensioni delle popolazioni studiate siano inferiori rispetto a quelle che esse potevano avere quando gli ambienti umidi erano più diffusi e rappresentino il risultato dei cambiamenti che si sono verificati durante i processi

naturali e storici che le hanno coinvolte (Linhart & Premoli 1994; Lonn & Prentice 2002). La segnalazione sporadica (Autorità Ambientale per i Fondi Strutturali della regione Calabria 2000-2006) della presenza di sfagnete in aree più meridionali della penisola italiana fa presupporre una maggiore espansione di *S. palustre* in passato, ed in particolare più a sud. Alla luce di queste conoscenze è realistico ipotizzare, dunque, un concreto rischio di estinzione per la popolazione di Posta Fibreno, un'ipotesi accreditata anche dall'evento recente di "bottleneck" che ha interessato la popolazione laziale.

### **Struttura genetica e flusso genico:**

I valori di  $F_{st}$  ottenuti per le 4 popolazioni sono tutti sufficientemente elevati da suggerire uno scarso flusso genico tra le popolazioni analizzate; tale risultato è confermato dai valori di  $N_m$ , tutti prossimi allo zero, ottenuti per ognuna delle 4 popolazioni analizzate.

In particolare i valori elevati di  $F_{st}$  che caratterizzano la popolazione laziale rappresentano un'ulteriore conferma dell'isolamento genetico della suddetta popolazione ed evidenziano un gene flow inferiore per la popolazione posta in posizione marginale.

La riduzione della riproduzione sessuale potrebbe essere la causa principale dell'andamento del flusso genico osservato in tale studio, non è stata osservata, infatti, produzione di sporofiti popolazioni analizzate, fatta eccezione per la popolazione di Lagoni di Mercurago; tale risultato è in accordo con quanto riportato in studi condotti in precedenza sulle briofite che hanno evidenziato l'importanza della produzione delle spore per la dispersione a lunga distanza (Longton & Shuster, 1983; Kimmerer, 1994; Laaka-Lindberg, 2001); il risultato è supportato, inoltre, da quanto riportato nel lavoro condotto da Shaw

nel 2000 in cui è stato sottolineato che la dispersione delle spore nelle briofite ha luogo in uno spazio limitato (1-2mt).

Dunque le popolazioni caratterizzate da prevalente riproduzione clonale esibiranno, in generale, un flusso genico ridotto se paragonate con le popolazioni di specie caratterizzate dalla produzione di spore (Kimmerer 1994; Laaka- Lindberg 2001; Longton & Schuster 1983). Conseguentemente le specie dioiche caratterizzate dalla produzione di propaguli asessuali mostreranno un'elevata differenziazione interpopolazione (Brakefield 1989); tale osservazione è in accordo con il risultati ottenuti dall'analisi AMOVA che ha evidenziato una percentuale di varianza pari circa all'82% ; un andamento analogo della variabilità genetica è stato osservato in uno studio condotto su 4 popolazioni cinesi di *Sphagnum imbricatum*, analizzate con marcatori molecolari SSR, che ha evidenziato che il 40% della variabilità genetica osservata nelle popolazioni esaminate può essere attribuita al differenziamento tra le popolazioni (Shaw et al., 2008).

I risultati ottenuti dunque evidenziano una scarsa incidenza del flusso genico sull'elevato livello di variabilità genetica nelle popolazioni toscane ed in quella piemontese la cui causa potrebbe, dunque, essere legata al mantenimento di una diversità genetica pregressa all'interno di tali popolazioni.

In generale i valori di  $F_{st}$ , ottenuti sono tutti in accordo con la distanza geografica tra i siti; un valore inferiore di  $F_{st}$  ( $F_{st} = 0.70712$ ) è stato trovato tra la popolazione di Sibolla e quella di Massaciucoli poste ad un distanza geografica di circa 40 chilometri, mentre il valore massimo di  $F_{st}$  ( $F_{st} = 0.91981$ ) è stato trovato tra Posta Fibreno e Lagoni di Mercurago posti ad una distanza geografica pari circa a 600 chilometri.

La relazione evidenziata tra i valori di  $F_{st}$  ottenuti e le distanze geografiche tra i siti suggerisce la presenza di un fenomeno di “isolation by distance” tra le popolazioni esaminate. Secondo tale teoria, infatti, la somiglianza genetica tra le popolazioni diminuisce in maniera esponenziale con l’aumentare della distanza geografica che le separa, a causa dell’effetto limitante che la distanza geografica ha sul flusso genico (Wilson & Provan 2003).

In generale, dai risultati ottenuti sulle limitate dimensioni attuali delle popolazioni di *Sphagnum palustre* in Italia e sull’assenza di riproduzione sessuale e sull’assenza di flusso genico nelle popolazioni analizzate possiamo concludere che tale specie mostra un futuro incerto in questo Paese.

I risultati di questo studio potrebbero, dunque, essere inseriti in un contesto più ampio basato sulla tutela ambientale; ossia oltre a permettere di valutare il rischio di scomparsa delle popolazioni studiate, i risultati ottenuti potrebbero permettere anche di valutare l’efficacia delle politiche di conservazione attuate nelle aree umide già sottoposte a politiche di protezione o servire come punto di partenza per valutare la necessità di istituire riserve protette nelle aree ancora non sottoposte a vincoli normativi.

Per limitare il rischio di estinzione della specie in Italia potrebbe essere interessante effettuare esperimenti di trapianto di parti del gametofito di *Sphagnum palustre* in siti caratterizzati dalle condizioni ambientali ideali per la crescita e lo sviluppo della specie; come già effettuato in uno studio condotto su di popolazioni svedesi di *Sphagnum angermanicum* che ha evidenziato che la parte della pianta che conferiva la maggiore stabilità alla specie nel nuovo territorio era

costituita dal *capitulum* del gametofito (Gunnarson U. & Soderstrom L. 2007).

Dunque il trasferimento sperimentale di nuovi propaguli in aree non ancora colonizzate dagli sfagni suggerisce che questo sistema potrebbe rappresentare un valido strumento per ridurre il rischio di estinzione della specie se gli habitat adatti per il suo sviluppo dovessero continuare a diminuire.

## **2. LEPTODON SMITHII:**

### **Indici molecolari, numero di aplotipi e frequenze relative:**

I risultati ottenuti dall'analisi dei dati molecolari rappresentati dai differenti indici di diversità genetica calcolati per le 6 popolazioni di *L. smithii* analizzate e provenienti da siti selezionati in Campania ed in Toscana, evidenziano una variabilità genetica maggiore nei siti remoti e periurbani, suggerendo l'esistenza di una relazione tra variabilità genetica e disturbo ambientale.

Il risultato ottenuto conferma l'ipotesi di un impoverimento genetico causato da disturbo e frammentazione dell'habitat, avanzata in studi analoghi e precedenti condotti sulla stessa specie campionata in siti selezionati della regione Campania (Spagnuolo et al., 2007; 2009).

Un risultato simile era stato già evidenziato utilizzando marcatori isozimatici per condurre un'analisi di variabilità genetica nel muschio *Plagiomnium ciliare* (Wyatt et al., 1989); in tale studio è stato, infatti, osservato che le popolazioni campionate nelle foreste disturbate in Piedmont (sud degli USA) mostravano minor polimorfismo rispetto alle stesse campionate nelle foreste non disturbate dei monti Appalachi.

La struttura genetica globale indica una maggiore vicinanza genetica tra le 3 popolazioni campane ed un maggiore isolamento genetico tra le popolazioni toscane; specialmente di quella periurbana di Belcaro.

Tale risultato, considerando che i valori di Nm sono simili e bassi per le 6 popolazioni, può essere legato a:

- Deriva genetica: nelle popolazioni toscane si potrebbe verificare una maggiore sensibilità alla deriva genetica dovuta alle minori dimensioni delle popolazioni urbana e periurbana.

➤ Origine da una popolazione ancestrale: l'omogeneità delle popolazioni campane rispetto a quelle toscane suggerisce l'ipotesi di un'origine delle popolazioni urbane e periurbane da un'unica popolazione ancestrale in Campania; popolazione che si sarebbe frammentata in varie sub-popolazioni in seguito al cambiamento dell'utilizzo del suolo dovuto all'attività dell'uomo. In Toscana, invece, il maggiore isolamento di Belcaro e la maggiore diversificazione delle 3 popolazioni, potrebbe essere dovuto ad una separazione più antica tra le popolazioni.

Anche il numero di aplotipi e le loro frequenze sono, generalmente, correlate al grado di naturalità/alterazione di ogni sito.

In entrambi i siti urbani analizzati (Cap e Pat) si osservano, infatti, un minor numero di aplotipi di cui quelli dominanti sono circa il 75% degli aplotipi totali di ogni sito; in particolare, nel sito di Capodimonte, la presenza di un più basso numero di aplotipi insieme alla perdita progressiva di sporofiti verificatasi durante gli ultimi 40 anni (Castaldo et al. 1993; Giordano et al. 2004), suggeriscono una crescita prevalentemente vegetativa e una sostanziale perdita dei cloni, con un conseguente progressivo impoverimento genetico.

Nei siti periurbani di entrambe le regioni (Ast e Bel) si osserva un numero intermedio di aplotipi; nei 2 siti remoti (Ott e Vio), infine, si osserva il numero maggiore di aplotipi.

La ridotta biodiversità osservata nel sito di Capodimonte ed in quello di Villa Patrizia potrebbe essere correlata, oltre che al più elevato grado di antropizzazione che caratterizza i siti urbani, alla giovane età dei lecci, che caratterizza in particolare il sito di Villa Patrizia, ed al fatto che in questi siti la specie sui tronchi era in compagnia di altre specie di briofite acrocarpe e pioniere, quali *Tortula* spp., *Zygodon* spp. e

*Orthotrichum* spp. (Giordano et al. 2004), che porta ad ipotizzare l'instaurarsi di uno stadio pioniero permanente, o di una successione retrograda in seguito al costante disturbo.

Gli indici standard di variabilità genetica evidenziano una maggiore diversità in Campania rispetto alla Toscana; tale maggiore variabilità probabilmente è fortemente influenzata dalla variabilità del sito degli Astroni, un sito periurbano molto peculiare, e, per molti aspetti, di elevata biodiversità. Qui, infatti, la lecceta sorge in un ampio cratere dove è evidente un'inversione microclimatica e, di conseguenza, vegetazionale, con una maggiore umidità al fondo del cratere, che, pertanto, ospita i lecci più antichi ed una maggiore biodiversità.

La maggiore variabilità riscontrata in Campania sembra, inoltre, correlata alla maggiore estensione della lecceta urbana e periurbana della regione; pertanto, la variabilità genetica, che è funzione diretta delle dimensioni della popolazione, è maggiore a Capodimonte e ad Astroni, rispetto a Villa Patrizia e Belcaro rispettivamente; le popolazioni più grandi dovrebbero, infatti, mantenere un livello più elevato di polimorfismo a causa della loro minore suscettibilità agli effetti della deriva genetica che porta ad una riduzione dell'eterozigosità ed alla perdita di alleli rari (Ewens et al. 1987).

### **Struttura genetica e flusso genico:**

I risultati dell'AMOVA, insieme ai valori di  $F_{st}$  e Numero di migranti per generazione ( $N_m$ ) ottenuti per le 2 regioni e per le 6 popolazioni di *L. smithii* analizzate, indicano un elevato isolamento genetico delle singole popolazioni esaminate, in particolare in Toscana, e una scarsa

incidenza del flusso genico sulla variabilità genetica trovata nelle suddette popolazioni.

Tale risultato è confermato dall'assenza di aplotipi condivisi tra individui provenienti da diverse popolazioni; ed anche dalla presenza di aplotipi condivisi tra individui che provengono da diversi alberi dello stesso sito come ad Astroni, Belcaro e Villa Patrizia; ciò suggerisce, che in tali siti avvenga un certo scambio di spore almeno tra gli alberi più vicini.

Tale osservazione è supportata dal lavoro condotto da Shaw nel 2000 in cui è riportato che la dispersione delle spore nelle briofite ha luogo in uno spazio limitato (1-2mt), ma che nelle briofite epifite si possono raggiungere distanze maggiori. Tale osservazione è legata da un lato alla presenza di barriere geografiche ed antropiche che interrompono la dispersione delle spore producendo una frammentazione della popolazione in un certo numero di demi ognuno con una propria identità genetica legata allo scambio interno delle spore, e dall'altro alla continuità dei forofiti nei siti esaminati.

In linea con questa osservazione si osserva la presenza di aplotipi condivisi tra individui provenienti da diversi alberi solo in siti che mostrano una maggiore continuità di forofiti (Astroni, Belcaro e Villa Patrizia); i risultati ottenuti, dunque, supportano l'ipotesi di una dispersione delle spore step-by-step (Hassel et al. 2005) e suggeriscono un limitato range di dispersione per le spore di *L. smithii* principalmente influenzato dagli alberi vicini.

Bisogna comunque ricordare che l'incrocio tra individui geneticamente simili, soprattutto in popolazioni di piccole dimensioni, può portare ad un ristagno genetico, con conseguente riduzione della fitness delle popolazioni naturali, implicando un minor potenziale

adattivo, (Charlesworth and Charlesworth 1987; Young et al. 1996), e che questo può portare perfino, in casi estremi, ad un'estinzione locale delle specie (Newman and Pilson 1997).

Nonostante la presenza della sporificazione in individui della specie provenienti anche dalle popolazioni urbane analizzate non si osserva dispersione a lunga distanza, tale osservazione è in disaccordo a quanto riportato in uno studio condotto da Kimmerer nel 1991 su *Tetraphys pellucida* in cui è stato evidenziato che le gemme promuovono la colonizzazione locale nell'ambito di un range di pochi centimetri, mentre le spore assicurano una dispersione su lunga distanza.

Dunque, il tipo di segregazione osservato nelle suddette popolazioni di *L. smithii* è correlabile all'assenza di flusso genico ed all'incidenza della deriva genetica random sulla variabilità genetica riscontrata nelle popolazioni analizzate.

Inoltre è interessante notare che il valore di  $F_{st}$  tra la Campania e la toscana,  $F_{st} = 0.54$ , è paragonabile ai valori di  $F_{st}$  riscontrati tra i siti campani; ciò suggerisce che le distanze genetiche non variano sensibilmente all'aumentare della distanza geografica, ma che una distanza di pochi chilometri, come quella tra Capodimonte ed Astroni, può produrre una divergenza simile ad una distanza di centinaia di chilometri.

Questo dato va messo in relazione con la biologia riproduttiva della specie, che, essendo una epifita di boschi chiusi ed umidi è piuttosto sfavorita nel trasporto a lunga distanza delle spore, rispetto alle specie che colonizzano ambienti aperti, aridi e maggiormente esposti ai venti. Alcuni studi, infatti, confermano questo dato, suggerendo 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, è emerso che in entrambe le specie coefficienti di parentela 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.

### **Ecologia delle popolazioni:**

Tale studio, in accordo con i risultati ottenuti in precedenti lavori condotti sulla stessa specie campionata in siti urbani e remoti selezionati nella regione Campania (Spagnuolo et al., 2007; 2009), sottolinea l'esistenza di una relazione tra:

- biodiversità briofitica espressa in termini di frequenza/copertura
- microclima locale
- grado di disturbo dovuto, direttamente o indirettamente, all'attività antropica.

In particolare, la riduzione della biodiversità emersa dai dati molecolari concorda con i risultati di uno studio condotto in Campania sulle briofite epifite (Giordano et al., 2004), nel quale sono stati presi in esame aspetti vegetazionali, fenologici e livelli di popolamento delle comunità.

Infatti dall'analisi degli indici di frequenza/copertura nei siti interessati, risulta che i siti urbani, in entrambe le regioni, sono caratterizzati da un minor numero di individui della specie ed, in generale, da un più basso valore di biodiversità, riconducibile al maggiore stress ambientale a cui gli individui sono sottoposti nei suddetti siti.

La sostanziale differenza di variabilità riscontrata tra i siti urbani selezionati e tra quelli periurbani e remoti di entrambe le regioni può essere rapportata, infatti, alle condizioni ecologiche e ambientali molto differenti che ritroviamo nei 6 siti.

La specie, infatti, è presente con elevati livelli di frequenza/copertura solo nei siti lontani dai contesti urbani e dalle industrie (Sim-Sim et al., 2000).

*Leptodon smithii*, infatti, si sviluppa sulla corteccia di *Quercus ilex*, una specie climax dell'area Mediterranea, preferendo le foreste chiuse dove la più elevata densità degli alberi favorisce la persistenza di un ambiente umido.

Una condizione simile non è presente sia nel sito di Capodimonte che in quello di Villa Patrizia, localizzati in contesti urbani, e caratterizzati da valori inferiori di frequenza/copertura. In questi siti si evidenzia maggiormente “l'edge effect” (Pharo et al., 2007) cioè la diminuzione della biodiversità dovuta alla posizione marginale all'interno di una popolazione o di un patch.

Nei siti remoti di Ottati e Cala Violina, in particolare, ma anche nei siti periurbani di Astroni e Belcaro, si osserva una maggiore biodiversità che può essere correlata alle condizioni ambientali ideali per la crescita e lo sviluppo della specie in questi siti.

Le leccete di Ottati e di Cala Violina si presentano, infatti, come boschi chiusi ed umidi dove il leccio, predomina sulle altre specie arboree, indice questo di un ambiente stabilizzato in cui le fluttuazioni ambientali sono ridotte o hanno andamento regolare; tale situazione rappresenta un habitat ideale per la specie *Leptodon smithii* condizione che si riflette nell'alto livello di frequenza e copertura osservato nelle aree e nella diffusa presenza di sporofiti in una specie

che impiega poche risorse nella riproduzione sia sessuale che asessuale. Significativa, inoltre, in questi siti, è la presenza di *Leptodon smithii* non solo sul leccio, ma anche su substrati diversi, rappresentati dalla roccia e dal tronco di altre specie arboree.

## CONCLUSIONI:

I risultati ottenuti confermano, in generale, la validità del sistema biologico utilizzato.

Le Briofite, infatti, presentano alcune caratteristiche fondamentali quali:

- semplicità morfologica
- tempi di generazione brevi rispetto alle piante vascolari
- generazione aploide dominante
- distribuzione ubiquitaria

tutte caratteristiche rilevanti per lo studiare l'effetto dei gradienti ambientali sulla biodiversità, offrendo in più, rispetto alle piante arboree, l'opportunità di raccogliere dati predittivi sulle sorti delle comunità vegetali.

Nello studio fin qui esposto e commentato, i risultati ottenuti mostrano chiaramente il gradiente geografico lungo l'asse Lazio-Toscana-Piemonte in *S. palustre*; similmente, il diverso grado di disturbo delle leccete urbane, periurbane e remote, si evince dai livelli di biodiversità molecolare del muschio epifita *L. smithii*.

In particolare le caratteristiche elencate rendono le briofite piante ideali per la valutazione delle conseguenze ecologiche delle frammentazione dell'habitat dovuta ad attività antropica; è noto, infatti, che le attività dell'uomo hanno un notevole impatto sulla continuità e la stabilità degli habitat naturali, alterando le loro dimensioni e il loro arrangiamento, a danno delle comunità naturali; alcuni fattori di disturbo, e i cambiamenti del paesaggio che ne

conseguono, possono favorire la perdita di cloni e la divergenza genetica tra popolazioni, determinando un generale impoverimento genetico.

I risultati ottenuti hanno evidenziato nei muschi la ridotta incidenza del flusso genico sulla variabilità genetica e, viceversa, una maggiore incidenza della deriva genetica rispetto alle piante vascolari, indicando nelle briofite un modello più sensibile per gli studi di variabilità genetica in popolazioni naturali. Accanto a questa maggiore sensibilità, di particolare interesse nelle briofite è il breve ciclo riproduttivo e il breve “generation time”, rispetto a quello delle fanerogame; infatti, nelle prime il susseguirsi rapido delle generazioni nel tempo consente di evidenziare i cambiamenti genetici in anticipo e di predire i possibili effetti sulle piante vascolari e quindi sulle comunità naturali, fornendo anche l'opportunità di pianificare eventuali interventi di risanamento.

## Bibliografia:

Autorità Ambientale per i Fondi Strutturali 2000-2006. Nuova stesura della valutazione Ex ante Ambientale; capitolo 5 “Natura e Biodiversità”. Catanzaro, dicembre 2002

Adamo P., Giordano S., Vingiani S., Castaldo Cobiانchi R., Violante P. (2003). Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy). *Environmental Pollution* 122: 91-103.

Adamo P., Giordano S., Minganti V., Modenesi P., Monaci F., Pittao E., Tretiach M., Bargagli R. (2007). Lichen and moss bags as monitoring device in urban areas. Part II: trace elements content in living and dead biomonitors and comparison with synthetic materials. *Environmental Pollution* 146, 392-399.

Agapow P.M. & Burt A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1: 101-102

Akiyama H. (1999). Genetic variation of asexually reproducing moss, *Takakia lepidozoides*. *J. Bryol.* 21 : 177 – 182.

Anderson L. E. (1980). Cytology and reproductive biology of mosses. In : Taylor R. J. and Leviton A. E. (eds), *The mosses of North America*, American association for the advancement of science, pp 37 – 76.

Appelgren L. & Cronberg N (1999). Genetic and morphological variation in the rare epiphytic moss *Neckera pennata*. *Hedw. Journal of Bryology* 21: 97 – 107.

Baatout H., Combes D., & Marrakchi M. (1991). Reproductive system and population structure in two *Hedysarum* subspecies. I. Genetic variation within and between populations. *Genome* 34: 396-406.

Bargagli R. (1998). *Trace Elements in Terrestrial Plants. An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery*. Springer, Berlin. 324 pp.

Barkman J.J. (1958). Phytosociology and ecology of cryptogamic epiphytes. In: Koninklyke Van Gorcum, Comp. NV (eds), Assen

Barth S., Melchinger A.E., and Lubberstedt T.H. (2002). Genetic diversity in *Arabidopsis italiana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (caps) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Mol. Ecol. 11: 495 – 505.

Bates J.W. (2000). Mineral nutrition, substratum ecology, and pollution. pp. 248-311. In: Shaw A.J. & Goffinet B. (eds.), Bryophyte Biology. Cambridge University Press, Cambridge, New York.

Bonini I., Aleffi M., Morrocchi D., Chiarucci A., De Dominicis V. (1998). A New site with *Sphagna* in Tuscany in the Belgaio forest. Webbia 53: 171-179

Brakefield P.M. (1989). The variance in genetic diversity among subpopulations is more sensitive to founder effects and bottlenecks than is the mean: a case study, pp. 145–161. In A. Fontdevila (ed.), Evolutionary Biology of Transient Unstable Populations. Springer Verlag, Berlin.

Brown A.H.D., Feldman M.W., Nevo E. (1980). Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. Genetics 96:523-536

Buck W.R. (1980). Animadversions on Pterigynondrum with special commentary on Forsstroemia and Leptopterigynondrum. Bryologist, 83: 451–465. Cortini- Pedrotti C., 2006. Flora dei muschi d'Italia (Prima parte). Delfino A. Roma Italy.

Callagan T.V., Carlsson B.A., Jons Dottir I.S., Svenson B.M., Jonasson S. (1992). Clonal plants and environmental change: introducing to the proceeding and summary. Oikos, 63, 341 – 347.

Castaldo Cobiانchi R., Giordano S., Esposito A., Granato M., (1993): La brioflora epifita dei parchi urbani di Napoli: 1963-1993. Un confronto a distanza di 30 anni. Giornale Botanico Italiano, 127:538.

Charlesworth D. & Charlesworth B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Annual review of Ecology and Systematics 18: 237 – 268.

Cofforth M.A., Lasker H.R. (1998). Population structure of a clonal Gorgoral coral: the interplay between clonal reproduction and disturbance. *Evolution*, 52, 379 – 393.

Cole C.T. (2003). Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 34: 213-237.

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

Cronberg N., Andersson K., Wyatt R., e Odrzykoski I. J. (2003). Clonal distribution, fertility and sex ratios of the moss *Plagiomnium affine* (Bland.) T. Kop. In forests of contrasting age. *Journal of bryology* 25: 155 – 162.

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., Molou U., and Sonnerson M., (1997). Genetical variation in the clonal bryophyte *Hylocomium splendens* at hierarchical geographical scales in Scandinavia. *Heredity* 78: 293 – 301.

Cronberg N. (1996). Isozyme evidence of relationships within *Sphagnum* sect. *acutifolia* (Sphagnaceae, Bryophyta). *Plant Systematic and Evolution* 203: 41-64.

Crum H.A. (1972). The geographic origins of the mosses of eastern north America's eastern deciduos forest. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 35: 269 – 298.

Cummins H., Wyatt R., (1981). Genetic variability in natural population of the moss *Atricum angustatum*. *Bryologist* 84 : 30 – 38.

Derda G.S. & Wyatt R. (1990). Genetic avriation in the common hair – cap moss, *Polytricum commune*. *Sistematic Botany* 14 :155 – 167.

Doyle J.J. & Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* v.19(1):11-15.

During H. J. (1992): Ecological classification of bryophytes and lichens in a changing environment. Oxford Clarendon press, 1 – 31.

During H. J. (1990): Clonal growth patterns among bryophytes. In: Van Groenendahl J. , and De Kroon H. (eds), *Clonal growth in plants: regulation and function*. SPB Academic publ. pp 153 – 176.

During H. J. (1979). Life strategies of bryophytes: a preliminary review. *Lindbergia* 5: 2 – 18.

Ellstrand N.C., Roose M.L. (1987). Patterns of genotypic diversity in clonal plants. *American Journal of botany* , 74, 123 – 131.

Enroth J. (1992). Corrections to *Criptoleptodon*, *Forsstroemia* and *Leptodon* (Leptodontaceae, Musci). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 71: 75–82.

Excoffier (2006). Arlequin ver. 3.1. An integrated software for population analysis.

Ewens J., Brockwell P.J., Gani J.M., Resnick S.I. (1987). Minimum viable population size in the presence of catastrophes. In: M Soulé (ed) *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 59-68

Fernandez C.C., Shelock J. R., Glazer A. N., Thompson J. N. (2006). Cryptic species within the cosmopolitan desiccation. Tolerant moss *Grimmia laevigata*. *PNAS* (3) : 637 – 642.

Gerdol R., Tomaselli M. (1993). The vegetation of wetlands in the northern Apennines (Italy). *Phytocoenologia*, 21: 421-469

Gibbs J.P. (2001). Demography versus habitat fragmentation as determinants of genetic variation in wild populations. *Biol Conserv* 100: 15-20.

Gimingham C. M., and Birse E. M. (1957). Ecological studies on growth form in bryophytes. Correlation between growth form and habitat. *J.Ecol.* 45 :533 – 545.

Giordano S., Adamo P., Sorbo S., Vingiani S. (2005). Atmospheric trace metal pollution in the Naples urban area based on results from moss and lichen bags. *Environmental Pollution*: 136: 431-442.

Giordano S., Sorbo S., Adamo P., Basile A., Spagnuolo V., Castaldo Cobianchi R. (2004). Biodiversity and trace elements content of epiphytic bryophytes in urban and extraurban sites of southern Italy. *Plant Ecology*: 170:1-15.

Gitzendanner M.A. & Soltis P.S. (2000). Patterns of genetic variation in rare e widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.

Gunnarsson U. & Soderstrom L. (2007). Can artificial introductions of diaspore fragments work as a conservation tool for mantaining populations of rare peatmoss *Sphagnum angermanicum*?. *Biological Conservation* 135:450-458.

Gunnarson U., Hassle K., Soderstrom L. (2005). Genetic structure of the endangered peat moss *Sphagnum angermanicum* in Sweden: a result of historic or contemporary processes? *Bryologist* 108 (2) . 194 – 203.

Gupta M., Chyi Y.-S., Romero-Severson J., and 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.

Hamrick J.L., Godt M. J.W. (1990). Allozyme diversity in plants in: plant population genetics, breeding and genetic resources (Eds Brown AHD , Clegg MT , Kahler AL , Weir BS), pp 43 – 63 . Sinauer Associates Inc , Sunderland, MA.

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

Hassel K. & Gunnarsson U., (2003). The use of inter simple sequence repeat (ISSR) in bryophyte population studies. *Lindbergia* 28: 152-157.

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

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

Kimmerer R. (1994). Ecological consequences of sexual versus asexual reproduction in *Dicranum flagellare* and *Tetraphis pellucida*. *THE BRYOLOGIST* 97: 20–25.

Kimmerer R. W. (1991). Reproductive ecology of *Tetraphis pellucida* II. Differential success of sexual and asexual propagules. *Bryologist* 94: 284-288.

Laaka-Lindberg S. (2001). Biomass allocation to sexual and asexual reproduction in a leafy hepatic *Lophozia silvicola* Buch. *Journal of Bryology* 23: 3–8.

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

Le Blanc F. & De Sloover J. (1970). Relation between industrialization and the distribution and growth of epiphytic lichens and mosses in Montreal. *Canadian Journal of Botany* 7: 1485–1496

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

Linhart Y.B. & Premoli A.C. (1994). Genetic variation in central and disjunct populations of *Lilium parryi*. Canadian Journal of Botany 72: 79–85.

Longton R. E. (1997). Reproductive biology and life-history strategies. Advances in Bryology 6: 65-101

Longton R.E. (1994). Reproductive biology in bryophytes. The challenges and the opportunities. Journal of the Hattori Botanical Laboratory 76: 159-172

Longton R.E. & Schuster R.M. (1983). Reproductive ecology, pp. 386–462. In R. M. Schuster (ed.), New Manual of Bryology. Hattori Botanical Laboratory, Nichinan.

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

Magdefrau K. (1969). Die lebensforme der laubmoose. Vegetatio 16 : 285 – 297.

Lohnn M. & Prentice H.C. (2002). Gene diversity and demographic turnover in central and peripheral populations of the perennial herb *Gypsophila fastigata*. Oikos 99: 489–498.

Luikart G., Cornuet J.M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. Conserv Biol 12:228–237

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. (2005). Selective sweeps and intercontinental migration in the cosmopolitan moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. Molecular Ecology 14: 1121-1132

Mc Daniel S. F. & Shaw J. (2003). Phylogeographic structure and cryptic speciation in the trans – antarctic moss *Pyrrhobryum mnioides*. Evolution 57 (2): 205 – 215.

Mc Fadden C. S. (1997). Contribution of sexual and asexual reproduction to population structure in the clonal soft coral, *Alcyonium rudyi*. *Evolution*, 51: 112 – 126.

Meagher T.R. & Shaw A.J. (1990). Clonal structure of the moss *Climacium americanum* Brid. *Heredity* 64: 233-238

Meusel H. (1935) Wuchisformen und wuchstypen der europäischen laubmoosen. *Nova acta leopoldina N. F.* 3 (12): 123 – 277.

Muller L.A.H., Lambaerts M., Vangronsveld J. et al (2004). AFLP-based assessment of the effects of environmental heavy metal pollution on the genetic structure of pioneer populations of *Suillus luteus*. *New Phytol* 164: 297-303.

Murawski D. A., Hamrik. L. (1990) : Local genetic and local structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. *American Journal of Botany* 77, 1201 – 1208.

Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Newman D., Pilson D., (1997). Increased probability of extinction due to genetic effective population size: experimental population of *Clarkia pulchella*. *Evolution* 51: 354-362.

Nimis P.L. (1999). Il biomonitoraggio della "qualità dell'aria" in Italia. Workshop Proceedings: Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale. Roma, 26-27 Novembre 1998. ANPA Serie Atti 2: 173-189.

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

Pharo E.J., Zartman C.E. (2007). Bryophytes in a changing landscape: the hierarchical effects of habitat fragmentation on ecological and evolutionary processes. *Biol Conserv* 135:354-362.

Podani J. (2001). SYN.tax 2000 computer program for multivariate analysis in ecology and taxonomy.

Rao DN (1982). Responses of Bryophytes to Air Pollution. In: Smith AJE (ed) Bryophyte Ecology. Chapman & Hall, London, New York, pp 445-471.

Reimann C., de Caritat P. (2005). Distinguishing between natural and anthropogenic sources for elements in the environment: regional geochemical surveys versus enrichment factors. *Sci Tot Environ* 337: 91-107.

Reimann C., Koller F., Frengstad B., Kashulina G., Niskavaara H., Englmaier P. (2001). Comparison of the element composition in several plant species and their substrate from a 1500000-Km<sup>2</sup> area in Northern Europe. *Sci Tot Environ* 278: 87-112.

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

Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* Jul, 4(4): 406 – 425.

Schimd B. (1990). Some ecological and evolutionary consequences of modular organization and clonal growth in plants. *Evolutionary Trends in plant* , 4, 25 – 34.

Sérgio, C.& Sim-Sim, M. (1985). Estudo da poluição atmosférica no estuário do Tejo. A vegetação epifítica como bioindicadora. *Portug. Acta Biol. (B)* 14: 213-244.

Shapcott A. (1995). The spatial genetic structure in natural population of the Australian temperate rain forest tree *Atherosperma moscatum* (Labill.) (Monimiaceae).

Shaw A.J., Cao T., Wang L.S., Flatberg K.I, Flatberg B., Shaw B., Zhou P., Boles s., Terracciano S., (2008). Genetic variation in three

Chinese peat mosses (*Sphagnum*) based on microsatellite markers, with primer information and analysis of ascertainment bias. *The Bryologist* 111 (2), pp. 271-281.

Shaw A.J. (2000a). Molecular phylogeography and cryptic speciation in the mosses *Mielichhoferia elongata* and *M. mielichhoferiana* (Bryaceae). *Molecular Ecology* 9: 595-608

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. & Scheneider R. E. (1995). Genetic biogeography of the rare copper moss *Mielicoferia 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. (1991). Ecological genetics, evolutionary constraints and systematics of bryophytes. *Advances in bryology* 11: 29- 74.

Skotnicki 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.

Skotnicki M. L., Ninham J. A. , Selkirk P. M. (1998). Genetic diversity in the moss *Bryum argenteum* in Australia, New Zeland and Antarctica. *Bryologist* 101: 412 – 421.

Silander J. A. (1985). Microevolution in clonal plants. In :*Population Biology and Evolution of Clonal Organism* pp. 107 – 152. Yale University Press, New Haven CT.

Silverton J. W. (1987). *Introduction to plant population ecology*. Longman London

Sim-Sim M, Carvalho P, Sérgio C (2000). Cryptogamic epiphytes as indicators of air quality around an industrial complex in the Tagus valley, Portugal. Factoral analysis and environmental variables. *Cryptog Bryol* 21: 153-170.

Sèrgio C., Sim-Sim M., (1985): Estudo da poluição atmosférica no estuário do tejo. A vegetação epifítica como bioindicadora. Portug. Acta. Biol. (B)14: 213-244.

Slatkin M. (1987). The average numbers of sites separating DNA sequences drawn from a subdivided population. Theoretical Population Biology 32: 42 – 49.

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., Terracciano S., Giordano S., (2009a). Clonal diversity and geographic structure in *Pleurochaete squarrosa* (Pottiaceae): different sampling scale approach. Journal of Plant Research 122: 161-70.

Spagnuolo V., Terracciano S., Giordano S. (2009b). Trace element content and molecular biodiversity in the epiphytic moss *Leptodon smithii*: Two independent tracers of human disturbance. Chemosphere 74 :1158–1164.

Spagnuolo, V., Muscariello, L., Cozzolino S., Castaldo Cobiانchi, 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

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., Giordano S., Castaldo Cobiانchi R. (2002). Polimorfismo di lunghezza del *trnL* (cp DNA) nel muschio *Pleurochaete squarrosa* (Brid) Lindb. Proceedings of annual congress of Società Botanica Italiana , Lecce (Italy), 24 – 26 September.

Stennøien H.K. & Sastad S.M. (1999). Genetic structure in three haploid peat mosses (*Sphagnum*). *Heredity* 82: 391-400.

Stoneburner A., Wyatt R., Odrzykosky I.J. (1991). Applications of enzyme electrophoresis to bryophyte systematics and population biology. *Advances in bryology* 4 : 1 – 27.

Tajima F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* Oct ; 105(2): 437 – 460.

Templeton A.R., Rowtmann E., Philips C.A. (1995). Separating population structure from population history: a cladistic analysis of geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander *Amblystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767 – 782.

Thingsgaard K. (2001). Population structure and genetic diversity of the amphiatlantic haploid peat moss *Sphagnum affine* (Sphagnopsida). *Heredity* 87: 485-496.

Tretiach M., Adamo P., Bargagli R., Baruffo L., Carletti L., Crisafulli P., Giordano S., Modenesi P., Orlando S., Pittao E. (2007). Lichen and moss bags as monitoring device in urban areas, part I: influence of exposure on vitality. *Environmental Pollution* 146, 380-391.

Treu R., Holmes D.S., Smith B.M., Astley M.A., Johnson T. & Treuman L.J. (2001). *Allium ampeloprasum* var. *babingtonii* (Alliaceae): an isoclonal plant found across a range of habitats in SW England. *Plant Ecology* 155: 229-235.

Turner I.M., Chua K.S., Ong J.S.Y., Soong B.C. Tan H.T.W. (1995). Century of plant species loss from an isolated fragment of lowland tropical rain forest. *Conserve Biol* 10: 1229-1244.

Van der Velde M., & Bijlsma R. (2004). Hybridization and asymmetric reproductive isolation between the closely related bryophyte taxa *Polytricum commune* and *P. uliginosum*. *Mol. Ecol.* 13 : 1447 – 1454.

Van Zanten B.O. & Gradstein S. R. (1998). Experimental dispersal geography of neotropical liverworts. *Beihefte Zur Nova Hedwigia* 90: 41 – 94.

Vingiani S., Adamo P., Giordano S. (2004). Sulphur, nitrogen and carbon content of *Sphagnum capillifolium* and *Pseudevernia furfuracea* exposed in bags in the Naples urban area. *Environmental pollution*: 129: 145-158.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Pelemn J., Kuiper M., et al. (1995) : AFLP : a new technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acid Res* (Nov).

Whitlock M.C., Burton N.H. (1997). The effective size of a subdivided population. *Genetics* 146: 427-441.

Widen B., Cronberg N., Widen M. (1994). Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia Geobotanica and Phytotaxanómica* 29: 245 – 263.

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 pattern of genetic diversity in natural population of the peat moss *Polytricum commune*. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Science* 270 (1517): 881 – 886.

Wolfe A.D., Liston A. (1998). Contributions of the polymerase chain reaction to plant systematics of plants II : DANN sequencing (Eds Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ), pp 43 – 86. Kwwer, New York.

Wyatt R. (1992). Conservation of rare and endangered bryophytes: input from population genetics. *Biological conservation*, 59: 99 – 107.

Wyatt R., Stoneburner A., Odrzykosky (1989). High levels of genetic variability in the haploid moss *Plagiomnium ciliare* . *Evolution* 43 : 1085 – 1096.

Wyatt R. (1982). Population ecology of bryophytes. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 52: 179-198

Yeh F.C., Yang R., Boyle T. (1999). Pop Gene Version 1.31. University of Alberta, Edmonton AB Canada.

Young F.C., Boyle T., Brown T., (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol* 11:413-418.

Zartman C.E. & Shaw A.J. (2006). Metapopulation extinction thresholds in rainforest remnants. *The American Naturalist* 167, 177–189

Zielinski R., and Wachowiak – Zielinska M. (1995). Genetic variation of the aploid moss *Pleurozium schreberi* from Poland. *Fragm. Flor. Geobot* 40: 417- 423.

Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176-183.

Zouhair R., Corradini P., Hallet J. N., Defontaine A. (2001). Growth morphology and genetic diversity in *Polytricum* population. *J. Bryol.* 23 : 109 – 118.

