



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI TECNOLOGIE, INGEGNERIA E SCIENZE DELL'AMBIENTE E DELLE
FORESTE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE PER LA GESTIONE FORESTALE E AMBIENTALE
XXII Ciclo

Applicazione del metodo DNA Barcoding allo studio della biodiversità in una zona umida del Centro Italia

Settore scientifico-disciplinare: AGR/05

Coordinatore: Prof. Gianluca PIOVESAN

Tutor: Prof. Bartolomeo SCHIRONE

Dottoranda: Laura Sáenz de Buruaga Aldave

ABSTRACT

DNA barcoding is a technique in which species identification is performed using universal DNA sequences from a small fragment of the genome (Lahaye et al. 2007). Biodiversity characterization/conservation would be one of the main benefits of the widespread application of barcoding, in terms of speed, low cost, reliability, and improved resolution power. In combination with scuba diving, it could become a useful complement for ecological and taxonomical assessments of aquatic vegetation. Here, this method was tested for the first time on plants inhabiting a wetland area. Our objective was to provide a test for future *in situ* application of DNA Barcodes by evaluating the efficacy of species discrimination under the criteria of methods and natural co-occurrence of the species in the ecosystem. After collecting and identifying ca. 40 specimens, DNA Barcoding was performed using the three most efficient markers (trnH-psbA, rbcL, rpoC1) proposed by the Consortium for the Barcode Of Life (CBOL). Investigated plants were collected in the WWF protected wetland area “Lago di Alviano” which covers around 900 hectares of ecosystems important for migratory birds as well as many other animals and plants. Among the studied species, many are typically present in natural eutrophic lakes with Magnopotamion or Hydrocharition-type vegetation in Europe. Two of them are floating on the water, five are submerged, thirteen emerged or living very close to water and five sampled species are trees closely related to water *habitats*. Nine species are also widely used for phytoremediation. Finally, we performed DNA Barcoding of *Amorpha fruticosa*, an invasive plant nowadays becoming a serious problem in European wetlands.

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE

1.1. La Biodiversità.....	4
1.2. La sistematica.....	5
1.3. Il Dna Barcoding.....	6
1.3.1. Progetto DNA Barcode.....	7
1.3.2. CBOL: consortium for the Barcode of life.....	9
1.3.3. iBOL: International Barcode of life.....	10

2. LE ZONE UMIDE.....12

2.1. L'importanza delle zone umide.....	13
2.2. Degrado delle zone umide.....	14

3. L'OASI WWF LAGO DI ALVIANO.....16

3.1. La Flora dell'Oasi.....	18
3.2. Fauna.....	21

4. SCOPO DEL LAVORO.....23

5. MATERIALI E METODI.....23

5.1. Lista delle specie.....	23
5.2. Campionamento e conservazione.....	31
5.3. La scelta delle sequenze.....	31
5.4. Descrizione delle regioni plastidiali utilizzate.....	32
5.4.1. Il frammento trnH-psbA.....	32
5.4.2. Il frammento rbcL.....	33
5.4.3. Il frammento rpoC1.....	34
5.5. La tecnica di estrazione del DNA.....	35
5.6. Le analisi di sequenze nucleotidiche.....	36
5.6.1. L'amplificazione del frammento desiderato.....	36
5.6.2. La purificazione del DNA amplificato.....	38
5.6.3. La determinazione delle sequenze nucleotidiche.....	38
5.7. L'elaborazione dei dati.....	40
6. RISULTATI.....	41
7. CONCLUSIONI.....	49
8. BIBLIOGRAFIA.....	51

1.1. LA BIODIVERSITA'

Il termine biodiversità include i livelli di organizzazione biologica, da quello genetico a quello delle comunità vegetali e animali che compongono gli ambienti terrestri e acquatici, considerandone tutti gli aspetti “funzionali”, inclusi i processi ecologici ed evolutivi. La distribuzione spaziale della biodiversità è influenzata dal clima, dalla geologia e dalla geomorfologia (Eldredge, 2004). Secondo questo autore con il termine biodiversità si intende:

-*Diversità genetica*: determinata da diverse forme di ogni singolo gene codificate individuo e alle variazioni di geni e cromosomi tra individui.

-*Diversità degli organismi*: legata alla variabilità delle caratteristiche anatomiche, fisiologiche, comportamentali di ogni singolo individuo.

-*Diversità delle popolazioni*: variabilità delle caratteristiche delle popolazioni sul piano quantitativo e su quello spaziale, come la numerosità degli individui presenti e la distribuzione geografica delle popolazioni stesse.

-*Diversità specifica*: variabilità nella numerosità e nella diversificazione filogenetica (prossimità o distanza dal punto di vista evolutivo) delle specie presenti in un' area.

-*Diversità delle comunità*: variabilità delle interazioni ecologiche tra organismi, popolazioni, specie che condividono un ambiente e diversificazione delle comunità che in esso si formano.

-*Diversità degli ecosistemi*: variabilità dell'interdipendenza tra le varie comunità di esseri viventi e le caratteristiche abiotiche dell'ambiente in cui le comunità stesse si trovano.

-*Diversità tra contesti ecologici terrestri e acquatici*: variabilità legata alla diversità degli ecosistemi di questi due tipi di ambienti.

-*Diversità biogeografia*: variabilità della storia evolutiva delle forme viventi di una regione correlata alla storia geologica e geografico-climatico della regione stessa e del contesto.

Il patrimonio attuale di biodiversità della Terra è ancora pressoché sconosciuto. L'elenco delle specie finora individuate arriva a circa 2 milioni, ma il numero totale di specie è stimato pari a circa 10 milioni. Foreste pluviali tropicali, barriere coralline, estuari dei fiumi ospitano circa la metà degli esseri viventi del pianeta, anche se ricoprono solo il 6% della superficie terrestre. Si ritiene che il tasso corrente di estinzione delle specie, indotto dal pesante intervento della specie umana, sia di almeno mille volte superiore al tasso naturale di estinzione (Primack, 2001), stimato mediamente intorno a 11 milioni di anni per gli invertebrati e di 1-2 milioni di anni per i vertebrati (Barbault, 2001). Il biologo Edward O. Wilson ritiene che all'attuale ritmo di deforestazione, supponendo che

sulla Terra siano presenti 10 milioni di specie, dovrebbero scomparire almeno 27 mila specie all'anno, ovvero una media di 74 specie al giorno.

Questi dati evidenziano, dunque, l'importanza di occuparsi della conservazione di specie e ambienti che rischiano di sparire, a causa del pressante impatto antropico, ancora prima di essere scoperti e che costituiscono il serbatoio da cui attinge l'evoluzione per attuare tutte le modificazioni genetiche e morfologiche che danno origine a nuove specie.

Nel vertice tenutosi a Johannesburg nel 2002, i Governi che hanno ratificato la Convenzione sulla Diversità Biologica si sono impegnati a *“raggiungere una riduzione significativa del tasso di perdita di biodiversità entro il 2010 (Countdown 2010), a livello globale, regionale e nazionale, come contributo per la riduzione della povertà e a beneficio di tutta la vita sulla Terra”*.

1.2. LA SISTEMATICA

La sistematica è la scienza della diversità degli organismi attualmente viventi sulla terra e della loro storia evolutiva. Essa implica la scoperta, la descrizione e l'interpretazione della diversità biologica nonché la sintesi dell'informazione sulla diversità sotto forma di sistemi di classificazione predittivi. Nel 1943 Camp e Gilly proposero il termine *“biosistematica”* per intendere quella scienza che *“tenta di delimitare le unità biotiche naturali e di applicare a queste unità un sistema di nomenclatura adeguata al fine di convogliare precise informazioni riguardanti i loro limiti definiti, relazioni, variabilità e struttura dinamica”*.

Secondo il paleontologo George Gaylord Simpson (1961) *“la sistematica è lo studio scientifico dei tipi e delle diversità degli organismi e di ogni relazione fra di essi”*.

Le attività base della sistematica sono la classificazione e la denominazione. Questi metodi sono stati e vengono usati dall'uomo per gestire le conoscenze riguardo il mondo naturale e, già agli inizi dell'evoluzione della cultura umana, condussero alla realizzazione di classificazioni notevolmente sofisticate di organismi importanti. Grazie alla conoscenza sistematica dei viventi l'uomo utilizza le piante o parti di esse come cibo, per riparo, per vestiti, carta, medicine, tinture, strumenti per il proprio benessere psico-fisico nonché per mantenere gli ecosistemi e i paesaggi.

L'importanza della conservazione delle specie è facilmente comprensibile: ogni specie ha caratteristiche differenti (morfologia, ecologia, fenologia, usi, proprietà, etc.), e pertanto l'individuazione e la descrizione di tali caratteristiche hanno un senso solo se si possono rapportare alla specie che le presenta.

Riguardo ad una specie non è possibile enunciare a priori un campo di variabilità di caratteri (spesso però alcuni caratteri suggeriscono l'appartenenza ad un gruppo sistematico mentre altri caratteri suggeriscono la sua appartenenza ad un altro gruppo) né quali variazioni di aspetto siano sufficienti ad indicare che ci troviamo in presenza di quella o di un'altra specie. Linneo si era posto il problema e l'aveva risolto teorizzando che le specie avessero una reale esistenza nel quadro di una concezione idealistica della realtà; principio insostenibile oggi, perché non spiega fenomeni quali l'evoluzione, la mutazione o la variabilità di popolazione (Pignatti, 1982).

La presenza di una determinata specie, in un determinato ambiente è conseguenza di diversi fattori, quali l'autoecologia, l'interazione con le altre specie, con la storia climatica e geografica delle aree che la ospitano, con le attività antropiche. In generale si può affermare che lo studio degli organismi viventi porti a notare la presenza di uno stretto legame che unisce la variabilità genetica alla capacità di adattamento all'ambiente.

1.3. IL DNA BARCODING

Nel 2003 Paul D.N. Hebert, ricercatore presso la Università di Guelph in Canada, propose il Dna Barcone come metodo per la identificazione delle specie. Il metodo Barcoding si basa sul uso di una piccola sequenza di DNA, estrapolata dal genoma, per la identificazione univoca delle diverse specie. Questa sequenza, come un codice a barre genetico, permette la catalogazione e definizione degli organismi allo stesso modo uno scanner di un negozio distingue i diversi prodotti tramite il codice a barre. Uno dei pionieri dell'approccio molecolare nelle ricerche tassonomiche fu Carl Woese che applicò tecniche di filogenesi molecolare, tramite lo studio del RNA ribosomale 16S, e che permesse la identificazione dei Archaea come organismi procarioti diversi dai batteri. Lo studio della variabilità di marcatori molecolari si è poi ampiamente diffuso per le analisi di popolazione, includendo svariati marcatori: rRNA, allozimi, microsatelliti, AFLP, ecc.

Fino ad ora, i campioni biologici sono stati identificati utilizzando le caratteristiche morfologiche, come forma, dimensione o colore, essendo il buon stato di conservazione del campione e la esperienza professionale fondamentali per una identificazione corretta. Il *barcode* si propone come un nuovo strumento della tassonomia classica che consente di caratterizzare una specie vivente e di differenziarla anche da un'altra molto simile con uno strumento pratico ed economico. Inoltre nei casi di campioni danneggiati o in uno stato immaturo di sviluppo può risultare uno strumento fondamentale.

La disciplina della tassonomia ha ritrovato nuovi stimoli grazie a numerosi e promettenti lavori apparsi sull'argomento (Hebert et al. 2003a, 2003b, 2004) che hanno aperto la strada a nuove

proposte (Tautz et al. 2003), ma anche, e soprattutto, a numerose critiche (Lee 2004; Seberg et al. 2003; Lipscomb et al. 2003; Moritz & Cicero 2004). Gli scopi del codice a barre basato sul DNA (Hebert et al. 2004), operando uno screening molto ampio e utilizzando pochi geni di riferimento, sono quelli di assegnare gli esemplari studiati alle specie e di permettere più facilmente di scoprirne di nuove. Lo scopo ultimo è quello di ottenere un database del codice a barre delle specie per permettere l'identificazione sicura degli esemplari raccolti. Poiché la tassonomia tradizionale non è né semplice né tantomeno rapida, una proposta alternativa come quella del codice a barre basato sul DNA, che ha il suo punto di forza nella vastità e semplicità dello screening adottato, non poteva non suscitare reazioni favorevoli, talora entusiaste (Janzen 2004). La tassonomia basata sul DNA è molto più "sicura" e "oggettiva", essendo basata sulla molecola che è alla base dell'evoluzione, tanto che le sequenze di DNA sono state acclamate come il possibile sistema di riferimento per la tassonomia (Tautz et al. 2003). Inoltre permette la identificazione dei campioni in modo definitivo anche a personale non specializzato in un specifico taxa come tradizionalmente necessario. La grande sfida prodotta dal progetto del Barcode è riuscire ad individuare una sequenza di DNA universale, che possa, cioè, andare bene per tutte le specie.

1.3.1. Progetto DNA barcode

Il progetto del "*Barcode of life*", ovvero "Codice a barre della vita" fornisce una chiave aggiuntiva per la conoscenza sulle specie: compilando un database pubblico delle sequenze collegate ai tipi già aventi una nomenclatura, sequenziando più velocemente e in modo più economico, si renderà la nuova chiave del codice a barre sempre più pratica ed utilizzata. Questo processo è già stato avviato nel regno animale, dove è stata identificata la sequenza valida a discriminare efficientemente le diverse specie. Tale sequenza è un breve frammento di ADN mitocondriale di solo 640 paia di basi, Cox1 (cytochrome c oxidase 1- CO1), dotato di una variabilità tale da poter individuare ogni specie ma da non distinguere differenze intra-especifiche. CO1 ha dato risultati di elevata efficienza nella identificazione di uccelli, insetti, pesci, e molti altri gruppi animali. Tuttavia COI è risultata del tutto inefficiente come sequenza barcode per le piante, conseguenza della lenta evoluzione di questo frammento di DNA nel regno vegetale.

Di fatto, nel regno vegetale per il quale le conoscenze a livello genetico e molecolare sono ancora limitate, il progetto *Barcoding* si trova ancora in una fase iniziale (messa a punto dei protocolli standardizzati, verifica dell'universalità delle tecniche approntate). La ricerca di una sequenza universale non ha dato risultati positivi, infatti è stato suggerito di utilizzare la combinazione di varie sequenze come alternativa alla mancanza di una unica universale.

Nel lavoro di Chase M.V. Et al., 2007 è stato proposto di utilizzare tre regioni di DNA plastidiale, come protocollo standard, per determinare il barcoding di tutte le piante terrestri. Gli stessi autori hanno discusso sui vantaggi e gli svantaggi dei marcatori precedentemente utilizzati. I bassi livelli di variazione nel DNA plastidiale rendono necessario l'utilizzo di tre regioni, non ci sono infatti regioni codificanti o non codificanti, che mutano così rapidamente come il DNA mitocondriale degli animali. Nel loro lavoro hanno valutato l'importanza di considerare: (1) rpoC1, rpoB e matK o (2) rpoC1, matK e psbA-trnH come marcatori fondamentali per le piante terrestri.

La applicazione del Barcoding nel regno vegetale permetterebbe tra le altre possibilità :

- Lavorare con frammenti di tessuti: Attraverso la tecnica del *barcoding* si può identificare una specie a partire da una piccola parte o tessuto vivente e/o fossile. Ad esempio può essere utilizzata per identificare velocemente animali, parassiti o materiali vegetali indesiderati all'interno di generi alimentari o prodotti commerciali.
- Riconoscere le specie a tutti gli stadi della vita: semi, semenzali, pollini...
- Discernere i “tipi” simili: il *barcoding* può smascherare gli organismi pericolosi che apparentemente sembrano innocui e permettere un'accurata analisi della biodiversità differenziando: specie dubbie, sottospecie, varietà, endemismi...
- Ridurre ambiguità: scritta come una sequenza di quattro nucleotidi (CATG) lungo una località uniforme del genoma, un codice a barre della vita fornisce una caratteristica digitale identificativa. Pertanto, una banca dati dei codici a barre digitali potrebbe fornire una referenza univoca e non ambigua, che potrebbe facilitare l'identificazione delle specie diffondendosi in tutto il mondo e rimanendo nel tempo.
- Accrescere le conoscenze sulle specie: la sconcertante biodiversità di circa 2 milioni di specie già conosciute ed identificate su base morfologica potrebbe ampliarsi e, attraverso il progetto *barcoding*, gli scienziati sarebbero facilitati nel riconoscimento rapido di nuove specie.
- Rendere pubblico l'accesso alle informazioni: una banca dati dei codici a barre standardizzata porterebbe sempre più persone a conoscere correttamente le specie intorno ad esse.
- Aprire la strada per la creazione di una guida elettronica tascabile di campo: la tecnica del *barcoding* lega l'identificazione biologica al sequenziamento del DNA e all'informatizzazione e immagazzinamento dei dati su computer.
- Fornire una nuova ricchezza di dettagli genetici aiutando a disegnare l'albero della vita sulla terra.

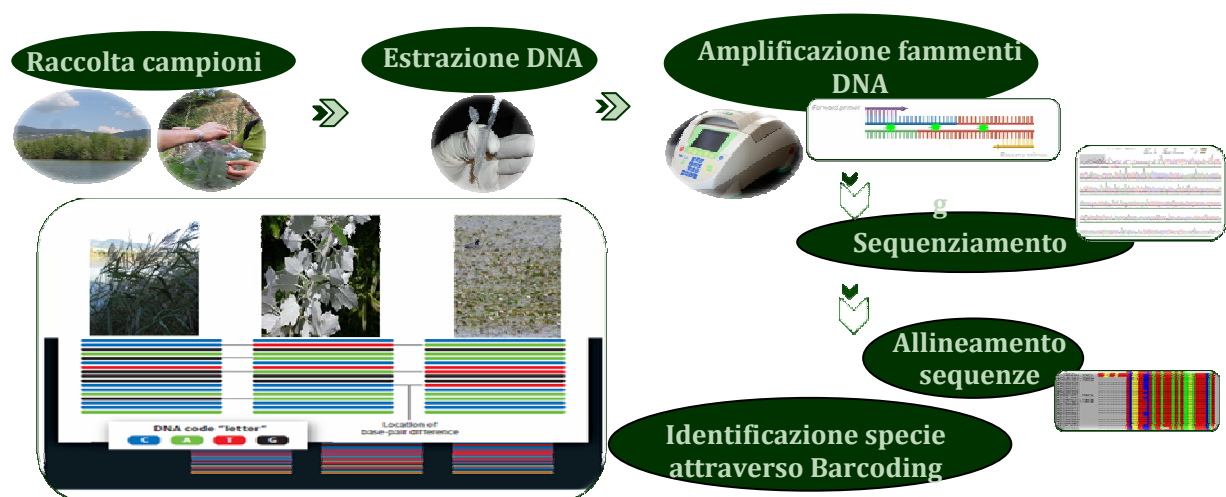


Fig 1. Metodo Dna barcoding per la identificazione e valutazione della Biodiversità.

1.3.2. CBOL: consortium for the Barcode of life

Il Consorzio per il Codice a Barre della Vita (*Consortium for the Barcode of Life*, CBOL) è un'iniziativa internazionale dedicata allo sviluppo di codici a barre del DNA come uno standard globale per l'identificazione delle specie biologiche, al quale prendono parte diverse Istituzioni di Ricerca tra le quali: I Giardini Botanici di Londra (*Kew Garden*), New York ed Edimburgo, i Musei di Storia Naturale di Londra, Copenhagen, varie Università di Inghilterra, Canada, Stati Uniti, Messico, Brasile, Sudafrica, etc., oltre a vari Istituti Nazionali di Ricerca sulla Biodiversità, per un totale di 200 membri di 50 paesi. La missione del CBOL è quella di promuovere l'uso e lo sviluppo del DNA Barcoding come metodo globale per la identificazione delle specie. Per raggiungere il suo scopo il CBOL propone:

- La raccolta veloce di archivi di alta qualità di DNA Barcode in una biblioteca di sequenze di DNA.
- Lo sviluppo di nuovi strumenti e processi che faranno del Barcoding un metodo più economico, veloce e portatile/trasferibile.
- La partecipazione di tassonomi e gruppi di ricerca tassonomica di tutte le regioni e paesi.
- L'uso del DNA Barcoding per il beneficio della scienza e della società

L'Italia si sta attivando solo recentemente, grazie all'interessamento della Professoressa Saccone (CNR di Bari, membro ufficiale del CBOL) per il settore Animale, mentre il settore vegetale è ancora nella fase di costituzione dei gruppi di lavoro. Il Dipartimento di tecnologie, ingegneria e

scienze dell'Ambiente e delle Foreste (DAF) dell'Università della Tuscia di Viterbo è recentemente entrato a far parte attiva del CBOL, iniziando le proprie attività di ricerca nel settore forestale, grazie alle sue competenze in biologia molecolare e genetica delle specie forestali, e soprattutto potrebbe rappresentare il centro di raccolta e conservazione dei campioni analizzati e da analizzare grazie alla Banca Centrale del DNA Forestale, localizzata presso il laboratorio di Genetica della sede distaccata di Cittaducale (RI).

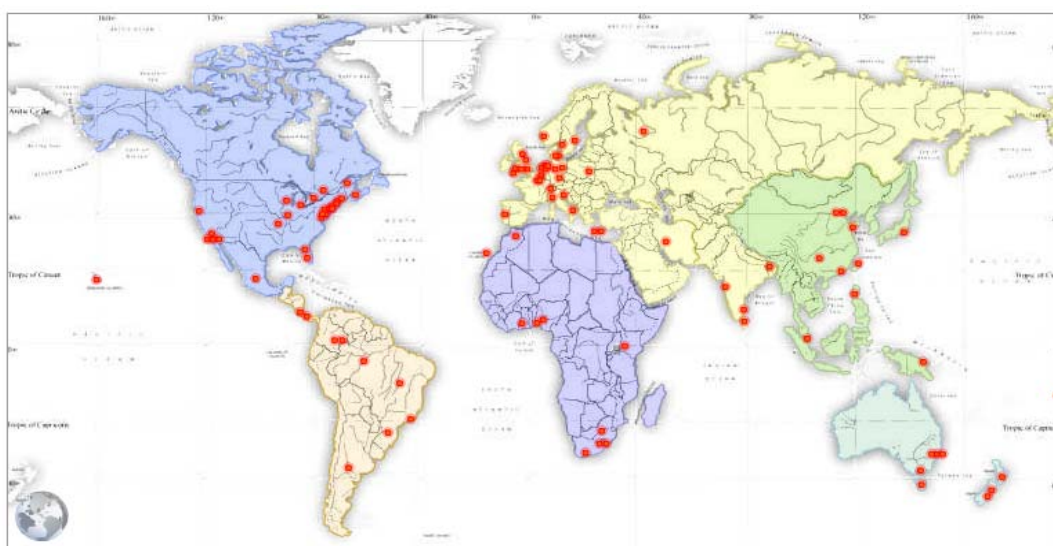


Fig.2- Paesi partecipanti al progetto CBOL

1.3.3. iBOL: International Barcode of life

A fronte della globalizzazione degli scambi commerciali, dei cambiamenti climatici e degli appelli alla tutela della biodiversità, la rapida identificazione delle specie costituisce, a livello mondiale, una necessità. Il DNA Barcode aggiunge agli approcci morfologici tradizionali importanti vantaggi: le identificazioni possono essere automatizzate e l'analisi può essere applicata a tutti gli stadi vitali così come a frammenti di organismi.

Inoltre, per il loro formato digitale, i database di DNA Barcode renderanno possibile l'identificazione completamente automatizzata della maggior parte degli esemplari. Tale automatizzazione migliorerà considerevolmente la capacità dell'uomo di monitorare, comprendere e amministrare la biodiversità con notevoli giovamenti in campo scientifico, medico-legale, epidemiologico ed economico. Ricercatori provenienti da 25 nazioni hanno espresso il loro sostegno a favore di un progetto su larga scala il cui obiettivo è la realizzazione di un ampio database che

raccolga i DNA Barcode di tutti gli organismi eucarioti. Per la prima fase di questo sforzo si pensa ad un progetto, della durata di 5 anni, gestito congiuntamente da un consorzio di finanziatori e gruppi di ricerca, che porterà ad acquisire i dati relativi ai DNA Barcode di 5.000.000 campioni rappresentativi di 500.000 specie. Oltre a creare una banca dati di riferimento per le sequenze di DNA Barcode, il Progetto Internazionale “Barcode of Life” (iBOL) svilupperà nuove tecnologie di analisi e amplierà le piattaforme bioinformatiche già in uso.

I ricercatori leader canadesi che studiano il DNA Barcode di animali, funghi, piante e protisti, collaboreranno con più di 100 scienziati di alto livello provenienti da 25 altri paesi. Questa partnership creerà la banca di sequenze, i mezzi informatici e le tecnologie necessarie affinché il DNA Barcode emerga come elemento indispensabile nell’infrastruttura totale delle scienze biologiche. Si prospetta, per ogni singola nazione aderente al progetto, un diverso coinvolgimento sulla base delle risorse disponibili e degli interessi della ricerca a livello locale.

La stretta cooperazione tra l’iBOL e il CBOL (il Consorzio per il “Barcode of Life”) permetterà al progetto stesso di mantenere legami con tutta la comunità internazionale impegnata nello studio del DNA Barcode e con le infrastrutture scientifiche di tutto il mondo attive nella biodiversità.

Per una sola nazione, la creazione su larga scala di una banca dati di DNA Barcode è sia estremamente costosa sia logisticamente impossibile. Di conseguenza, sono chiari i vantaggi derivanti da un partenariato internazionale. Le sinergie create in seno al progetto permetteranno a tutte le nazioni partecipanti di sviluppare il proprio programma di ricerca ad un costo ed uno sforzo individuale molto ridotti. L’iBOL sarà una vera e propria rete di collaborazioni: ogni nazione aderente al progetto determinerà le priorità di ricerca e verificherà i progressi fatti, tutte godranno di un supporto diretto nelle diverse aree di ricerca. Per esempio, il Canada dispone di importanti strutture tecniche e analitiche, di una piattaforma informatica e di una rete di ricerca nazionale che aiuterà i suoi partner:

- nella produzione e analisi dei DNA Barcode degli esemplari;
- ad accedere al database BOLD (Barcode of Life Datasystem) e alla creazione di siti-specchio;
- nella formazione professionale all’analisi dei DNA Barcode e alla gestione dati;
- fornendo assistenza tecnica nello sviluppo e funzionamento di strutture di produzione e analisi di DNA Barcode.

2. LE ZONE UMIDE

La Convenzione Internazionale di Ramsar (Iran, 1971) definisce zone umide “le aree palustri, acquitrinose o torbose, o comunque specchi d’acqua, naturali o artificiali, permanenti o temporanei, con acqua ferma o corrente, dolce, salmastra o salata, compresi tratti di mare la cui profondità non ecceda i sei metri con la bassa marea”. Le zone umide presentano un’ampia variabilità tipologica, sotto questa denominazione ricadono numerosi tipi di ecosistemi tra loro differenti ma accomunati dall'abbondanza dell'elemento acqua. Sono tra i pochi ecosistemi al mondo oggetto di un trattato internazionale di protezione.

Esse possono classificarsi, in Italia, come ambienti naturali (grandi laghi interni, piccoli laghi interni, laghi montani, laghi costieri, sponde e letti fluviali, estuari, delta, acquitrini, stagni, paludi, torbiere, valli da pesca, lagune) o come ambienti artificiali (casse di espansione, invasi di ritenuta, vasche di colmata, saline, canali). Le aree umide rimaste tali rappresentano oggi gli unici grandi spazi naturali, a tratti ancora selvaggi, gli ultimi rifugi di comunità biotiche particolarmente ricche in termini di biodiversità ed efficienti a livello di produttività fotosintetica.

Sotto il profilo della biodiversità, poste a confronto con gli altri ecosistemi terrestri delle regioni temperate, le zone umide detengono generalmente il primato per numero di invertebrati e, fra i vertebrati, per numero di uccelli oltre che, ovviamente, di pesci e anfibi. Tale ricchezza di specie è conseguenza diretta della elevata eterogeneità di habitat che le caratterizza (bosco igrofilo, prato umido, canneto, salicornieto, acque libere). Inoltre essa è conseguenza di un microclima particolarmente favorevole: la presenza dell’acqua, infatti, consente l’assorbimento e la restituzione graduale del calore, mitigando localmente il clima.

Le comunità biotiche delle zone umide presentano caratteri del tutto peculiari: l’evoluzione in un ambiente spesso di frontiera, fra terra ed acqua, ha indotto gli organismi che in esse hanno trovato dimora a sviluppare una moltitudine di strategie di adattamento, talora sorprendenti, che ne rendono particolarmente interessante lo studio.

Di notevole interesse sono anche i numerosi casi di “convergenza evolutiva” che hanno portato a sviluppare notevoli somiglianze fra organismi filogeneticamente anche molto distanti, ma che condividono la stessa “nicchia ecologica”.

Dal punto di vista ecologico colpisce la complessità delle reti alimentari e la notevole produttività di questi ambienti, così come la straordinaria dinamicità dovuta alle marcate variazioni stagionali del paesaggio.

Le zone umide hanno una notevole importanza come punto di sosta durante uno dei fenomeni più straordinari riguardante il mondo animale: la migrazione degli uccelli. Non a caso il più importante

provvedimento a livello internazionale a difesa delle aree umide, la Convenzione di Ramsar del 1971, sottolinea (anche nel titolo) il ruolo di questi ambienti come “habitat degli uccelli acquatici”. Per la sua posizione e conformazione, di ponte sul Mediterraneo, l'Italia assume sotto questo profilo una particolare importanza e, per alcune specie acquatiche, come ad esempio il combattente (*Philomachus pugnax* L.) e la pittima reale (*Limosa limosa* L.), le zone umide italiane costituiscono i più importanti punti di sosta durante l'intero percorso migratorio.

Anche per quanto riguarda gli uccelli nidificanti, alcune specie acquatiche sono rappresentate, in Italia, da porzioni numeriche molto importanti dell'intera popolazione europea. Basti citare come esempio i contingenti italiani di nitticora (*Nycticorax nycticorax* L.) e garzetta (*Egretta garzetta* L.)

2.1. L'importanza delle zone umide

Le zone umide rivestono un ruolo di notevole importanza sotto diversi aspetti:

- idrogeologico, in quanto svolgono la funzione di attenuazione e regolazione di fenomeni quali le piene dei fiumi. Le paludi adiacenti i corsi d'acqua, ad esempio, creano un effetto spugna cioè raccolgono le acque durante le piene - rallentando il deflusso delle acque e riducendo il rischio di alluvioni - restituendole poi durante i periodi di magra. Sono, inoltre, importanti serbatoi per le falde acquifere;
- chimico e fisico, infatti sono trappole per nutrienti. La ricca e diversificata vegetazione delle zone umide conferisce a questi ambienti la capacità di assimilare nutrienti, cioè composti di potassio e azoto, e la possibilità di creare condizioni favorevoli per la decomposizione microbica della sostanza organica. Svolgono un importante ruolo nella fitodepurazione degli inquinanti organici derivanti, principalmente, da scarichi urbani e attività agricola;
- biologico, perché rappresentano, a livello mondiale, una delle tipologie di habitat più importanti per la conservazione della biodiversità. Tra gli uccelli minacciati di estinzione, ad esempio, 146 specie dipendono dalle zone umide che, dopo le foreste e le praterie/savane, rappresentano il terzo gruppo di ambienti per numero di specie minacciate;
- produttivo, per la loro importanza nei settori dell'itticoltura o della molluscicoltura, e per la produzione di sale;
- educativo e culturale, grazie alle svariate attività, tra cui in particolare il birdwatching, legate a questi luoghi. In Italia le oasi naturalistiche del WWF e della LIPU, molto frequentate dai visitatori, costituiscono luoghi elettivi per l'osservazione dell'avifauna acquatica;

- scientifico: dallo studio dei profili pollinici nelle torbiere, ad esempio, è possibile ricostruire le vicende ecologiche, climatiche ed evolutive del territorio in cui questi ambienti sono situati.

2.2. Degrado delle zone umide

Lo stato di attuale degrado delle zone umide è determinato da diversi fattori. Uno dei più importanti è la **bonifica**, che consiste nel prosciugare i terreni sottoposti a temporaneo o permanente allagamento, sia per fini igienici (lotta alla malaria) che per acquisire nuovi territori da destinare allo sfruttamento agricolo e alla creazione di infrastrutture (strade e case rurali, impianti di irrigazione, trasformazioni del regime fondiario e colturale, miglioramento delle tecniche lavorative, ecc.) che determinano un incremento della popolazione.

Inoltre, le zone umide sono particolarmente soggette ad **inquinamento** in quanto, per la loro natura ‘stagnante’, presentano uno scarso ricambio idrico. Inoltre la ricchezza di acqua di queste aree ha favorito l’insediamento umano e di importanti attività industriali, molto spesso con conseguenze disastrose a causa dell’elevata tossicità delle sostanze utilizzate durante i processi produttivi.

Le acque reflue urbane ed industriali determinano inquinamento biologico (immissione di organismi patogeni), fisico (aumento della torbidità e della temperatura, diminuzione della trasparenza, alterazione della colorazione) e, negli ultimi decenni, anche chimico (immissione di detersivi ed altre sostanze di scarto).

Un effetto molto diffuso dell’inquinamento è l’eutrofizzazione. Questo fenomeno è causato soprattutto dall’immissione nelle acque di elevate quantità di fosfati e nitrati. Questi, in sinergismo con le condizioni idrografiche (bacini chiusi e riscaldamento delle acque per la bassa profondità), producono un eccessivo sviluppo di vegetazione natante. Questa, impedendo il passaggio dell’ossigeno e dei raggi solari fondamentali per la fotosintesi, determina condizioni di asfissia, incrementata dal fenomeno di ossidazione della ingente massa vegetale presente, con innesco di processi fermentativi e putrefattivi.

Un altro fattore che contribuisce al degrado delle zone umide è l’ **introduzione di specie alloctone**. Soprattutto nell’ultimo secolo in molte aree della nostra penisola sono state introdotte numerose specie vegetali ed animali provenienti da altri paesi o da diverse regioni geografiche che, in qualche caso, hanno alterato gli equilibri ecologici degli ecosistemi.

Nelle zone umide, così come in altre aree, si è così evidenziata la necessità di controllare l’espansione di alcune specie vegetali “esotiche”, quali la Robinia (*Robinia pseudoacacia* L.), l’Indaco bastardo (*Amorpha fruticosa* L.) e altre piante alloctone che hanno la tendenza a prendere il sopravvento sulle specie autoctone.

Per quanto riguarda le specie animali “aliene” i problemi maggiori sono rappresentati dalla crescente diffusione della nutria (*Myocastor corpus* Molina) e del gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii* Girard) recentemente introdotto e rapidamente diffusosi in molte zone umide dell'Italia e dell'Europa occidentale.

La nutria è un grande roditore di origine sudamericana portato in Italia con lo scopo di allevarlo per utilizzarne la pelliccia, ma in vari momenti e per varie cause alcuni contingenti di animali si sono progressivamente diffusi in fiumi e paludi, acclimatandosi perfettamente. In Italia questo mammifero non ha predatori e la sua grande prolificità gli ha permesso di raggiungere densità molto elevate. Essendo un erbivoro, esso consuma grandi quantità di vegetali e questo può incidere negativamente su vari gruppi di piante, alcune anche rare.

Infine è da ricordare che nell'ultimo secolo, per incrementare l'attività di pesca sportiva in Italia, sono state introdotte molte specie esotiche di pesci. A questo riguardo la diffusione del pesce gatto (*Ictalurus melas* Rafinesque), specie altamente competitiva, vorace (in particolare verso le uova degli altri pesci) e resistente all'inquinamento, ha contribuito a determinare la rarefazione di molte specie autoctone “pregiate”.

Altri fattori che compromettono la salvaguardia e conservazione delle zone umide sono l'acquacoltura intensiva, il prelievo di acqua dalla falda freatica con impoverimento della portata dei corpi idrici, le opere di dragaggio e canalizzazione di torrenti e fiumi, lo sviluppo di strutture turistiche (soprattutto lungo la fascia costiera) e le trasformazione di alcuni ambienti umidi salmastri in saline.



3. L'OASI WWF LAGO DI ALVIANO

Il Lago di Alviano è nato nel 1964 dalla costruzione di una diga sul Tevere allo scopo di sfruttarne, per usi idroelettrici, le acque fluviali. Nell' arco di più di quaranta anni dalla sua formazione, l'ambiente del lago ha subito continue trasformazioni fino a costituire un importante punto di richiamo per gli uccelli acquatici lungo la linea di migrazione del Tevere.

Nel 1970 il Lago di Alviano è stato incluso tra i biotipi da salvare in Italia, ma solo nel 1978 è stato dichiarato Oasi di Protezione ai sensi della Legge n. 968 del 27/ 12 / 1977.

L'Oasi di Alviano ha un'estensione di circa 902 ettari, che comprendono oltre al bacino artificiale (circa 450 ettari) anche le aree limitrofe di bosco igrofilo e prati umidi. Ricade nei comuni di Alviano, Guardea e Montecchio nella provincia di Terni e Civitella d'Agliano in provincia di Viterbo.

La gestione dell'area è di competenza del WWF Italia attraverso una convenzione con la Provincia di Terni. Questa, a sua volta, ha una convenzione con E.On, proprietaria del lago (bacino idroelettrico), ereditata dall'ENEL, proprietario fino al 2001.

L'Oasi di Alviano è inserita nel Parco Fluviale del Tevere ed inoltre è un'area SIC (codice IT5220011) e ZPS.

Come tutti i laghi, ed in special modo quelli legati allo sbarramento artificiale di un asse idrico, anche nel Lago di Alviano il fenomeno predominante risulta quello della sedimentazione del carico solido trasportato dal fiume Tevere.

Si ha, infatti, un netto abbassamento della velocità delle acque dell'immissario, con conseguente perdita di energia cinetica delle stesse, tale da far depositare il carico solido sospeso, attraverso meccanismi di semplice decantazione.

A monte dello sbarramento, il fiume Tevere, prima di far confluire le proprie acque nel lago di Alviano, viene a costituire il bacino artificiale di Corbara, nel quale, presumibilmente avviene il deposito della maggior parte del materiale litoide trasportato, dato che, come noto, un lago di sbarramento si comporta come bacino di decantazione nei confronti dell'immissario.

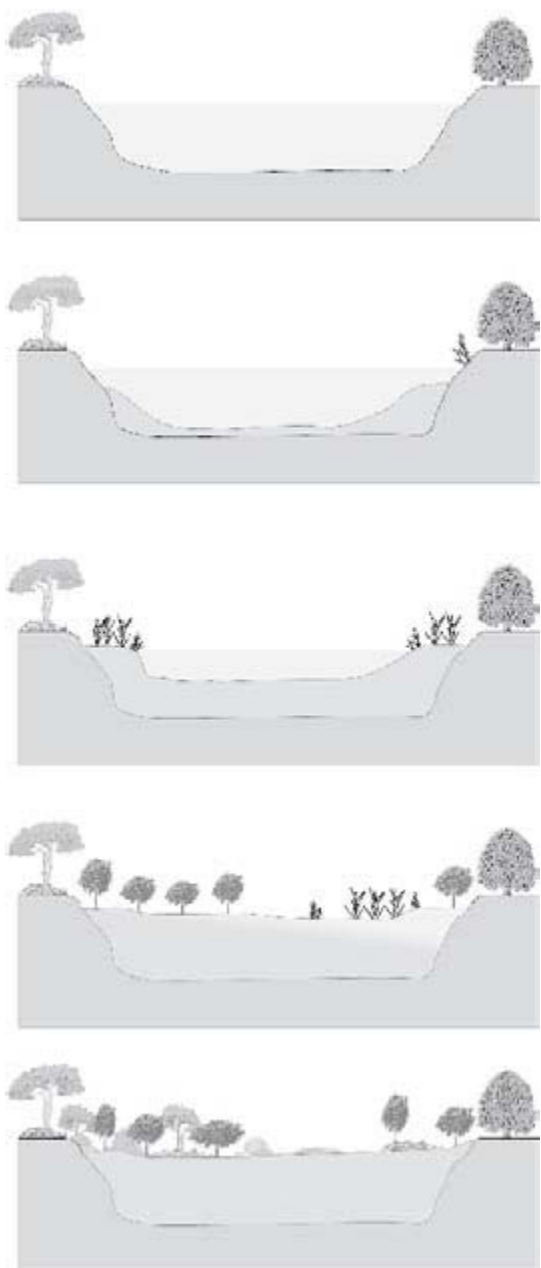
Le acque provenienti dal bacino di Corbara si immettono nel vecchio alveo del Tevere solo pochi chilometri a monte del lago di Alviano, drenando quindi, una piccola area tale da non creare seri problemi di interrimento dello stesso lago.

E' necessario, inoltre, prendere in considerazione l'influenza del bacino dal fiume Paglia, il quale confluisce nel Tevere poco a monte del bacino di Alviano. Il fiume Paglia drena, principalmente, i sedimenti argilloso-sabbiosi, le coltri alloctone di argilloscisti liguridi e le varie formazioni flyschoidi costituite da alternanze di arenarie e marme talvolta argillose.

Infatti la tendenza all'interrimento del Lago di Alviano dipende principalmente dal deposito di sedimenti fini derivanti dal bacino del fiume Paglia..

L'evoluzione dei sedimenti, in alcuni tratti misurabili in oltre tre metri di spessore, ha portato alla formazione di un tipico delta lacustre con sviluppo di cordoni longitudinali e con costante diminuzione dell'ampiezza dello specchio d'acqua.

Il Lago di Alviano ha un'estensione di circa 350 ettari, con un perimetro di 7,5 km: la profondità dell'acqua è inferiore o uguale a 30 cm in circa il 80% del bacino, ovvero in corrispondenza delle zone di esondazione, mentre è superiore lungo il corso dell'alveo originario del Tevere con una profondità massima in vicinanza dello sbarramento, di circa 6 m.



Evoluzione di un lago. Da Felicioni e Zarri (2007)

A causa dalla variabilità delle portate che affluiscono al bacino e di quelle che ne defluiscono per la produzione di energia elettrica, i livelli del lago oscillano generalmente tra la quota di massimo invaso di 77,40 m s.l.m. e i 77,10 m s.l.m. con un'escursione abituale di 30 cm.

Questo aspetto rende il Lago di Alviano, a differenza di quanto avviene in molti laghi artificiali in cui l'utilizzazione dell'acqua invasata in periodi di scarsi afflussi provoca escursioni di livello di parecchie decine di metri, del tutto simile ad un lago naturale.

Le ridotte dimensioni del lago e soprattutto la sua limitata profondità fanno sì che non si verifichi il fenomeno della stratificazione termica, si verifica però, nei periodi estivi, un significativo aumento della temperatura delle acque che raggiunge in alcuni punti ben oltre i 32°C. Questo fenomeno influenza il contenuto di ossigeno delle acque e quindi la vita degli organismi acquatici.

Al Lago di Alviano, come conseguenza del processo di interrimento tipico dei laghi artificiali, si verifica la presenza di una gran diversità di habitat. Questa diversificazione è dovuta ad alcuni fattori come la profondità dell'acqua, la permanenza di essa nel tempo, le caratteristiche del substrato e molti altri. Si sono nel tempo differenziati: il bosco igrofilo, i prati umidi, lo stagno, le pozze temporanee, la palude e il fiume. La maggior parte di questi habitat trovano corrispondenza in una associazione vegetale



3.1. La Flora dell'Oasi

Vegetazione arborea e arbustiva

La parte principale è costituita dal bosco igrofilo che si è sviluppato lungo il corso del Tevere e sulle sponde del lago, caratterizzate da ristagno idrico, in cui il terreno può essere inondato anche per diversi mesi all'anno. Le formazioni sono a dominanza di Salice bianco (*Salix alba* L.), Ontàno nero

(*Alnus glutinosa*(L.)Gaertner), Pioppo bianco (*Populus alba* L.), Pioppo nero (*Populus nigra* L.), Olmo (*Ulmus minor* Miller) e Acero campestre (*Acer campestre* L.).

Nello strato arbustivo ed erbaceo sono presenti il Sanguinello (*Cornus sanguinea* L.), il Sambuco nero (*Sambucus nigra* L.), il Nocciolo (*Corylus avellana* L.) e il Prugnolo (*Prunus spinosa* L.), il Biancospino (*Crataegus monogyna* Jacq.), il Rovo comune (*Rubus ulmifolius* Schott.), il rovo bluastro (*Rubus caesius* L.), l'Edera (*Hedera helix* L.), l'Ortica comune (*Urtica dioica* L.), l'attaccamano (*Valium aparine* L.), la Vitalba (*Clematis vitalba* L.) l'Equiseto dei campi (*Equisetum arvense* L.), l'Equiseto massimo (*Equisetum telmateja* Ehrh.), il Gigaro chiaro (*Arum italicum* Miller), il Vilucchio bianco (*Calystegia sepium* (L.)R.Br.)

Sono presenti alcune specie avventizie naturalizzate, legate agli ambienti umidi, quali il Caprifoglio giapponese (*Lonicera japonica* Thunb.) e l'Indaco bastardo (*Amorpha fruticosa* L.) questa ultima presente a livelli tali da poter essere definita infestante.

Vegetazione acquatica

Nelle acque lente ed eutrofiche, formano un denso laminato le Lenticchie d'acqua maggiore e minore (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid e *lemna minor* L.) e, nelle acque poco profonde, popolamenti molto estesi di Brasca comune (*Potamogeton natans* L.) insieme alla Brasca delle lagune (*Potamogeton pectinatus* L.) , il Ceratofillo comune (*Ceratophyllum demersum* L.) e la Erba-vescica (*Utricularia minor* L.)



Potamogeton natans

Vegetazione palustre

Domina la Cannuccia d'acqua (*Phragmites australis* (Cav) Trin.) che, quando trova condizioni ottimali per il suo sviluppo, tende a formare popolamenti molto densi. E' accompagnata da più specie di Carici (*Carex riparia* Curtis, *Carex pseudocyperus* L.), Scirpi (*Schoenoplectus lacustris* (L.) Palla, *Scirpus holoschoenus* L.), Giunchi (*Butomus umbellatus* L., *Eleocharis palustris* (L.) R. et S.) e Tife (*Thypha angustifolia* L.). Sono presenti anche la Menta acquatica (*Mentha acquatica* L.), il Tabacco di palude (*Rumex hydrolapatum* Hudson) e la Scutellaria palustre (*Scutellaria galericulata* L.).



Scirpus holoschoenus

Il Lago di Alviano è stato oggetto di studi a carattere floristico e fitosociologico (WWF Italia 1990) che hanno messo in evidenza il notevole dinamismo delle associazioni vegetali. Per effetto dell'accumulo di detrito solido sul fondo (interrimento), si è trasformato in una palude e successivamente in un bosco igofilo, inondato solo per brevi periodi. La vegetazione subisce di conseguenza dei cambiamenti per effetto del graduale ingresso di specie che sostituiscono le precedenti, dando luogo ad associazioni vegetali diverse, secondo schemi tipici definiti "successioni vegetazionali". In questo modo si tende al consolidamento del canneto e del bosco igrofilo a discapito di altre associazioni "più delicate" come lo scirpeto, il giuncheto e il laminato.

3.2 Fauna

L'Oasi oltre a conservare ancora una flora e una vegetazione piuttosto ricche, costituite da specie acquatiche e palustri che oggi sono scomparse dagli altri ambienti umidi dell'Umbria, ha una notevole importanza per la presenza di numerose specie animali.

La diversità di ambienti offre habitat ideali per molte specie di insetti come, Emitteri, Coleotteri, Lepidotteri o Odonati, questi ultimi hanno bisogno di una notevole varietà di prede per svilupparsi, per cui, la loro presenza, indica l'esistenza di una ricca microfauna.

Nel bacino del Lago di Alviano vivono oltre alle specie indigene proprie del corso medio dei fiumi appenninici, specie introdotte per scopi commerciali e sportivi, tra queste il Pesce gatto (*ictalurus natalis* Le Sueur), il Carassio (*Carassius carassius* L.), il Lucioperca (*Stizostedion lucioperca* L.). Da poco è segnalata la presenza del Pesce siluro (*Silurus glanis*, L.), vorace predatore di origine centro europea. Le principali specie indigene presenti sono: la Rovella (*Rutilus rubilio* Bonaparte), il Cavedano (*Leuciscus cephalus* L.), l'Alborella (*Alburnus albidus* L.), il Barbo (*Barbus barbus* L.), la Carpa (*Cyprinus carpio* L.), la Scardola (*Scardinus erythrophthalmus* L.) tutti della famiglia dei Ciprinidi. Altre specie presenti nel lago sono il Luccio (*Esox lucius* L.), l'Anguilla (*Anguilla anguilla* L.), il Persico reale (*Perca fluviatilis* L.) e il Ghiozzo (*Gobius* spp.)

Gli Anfibi sono abbondanti nelle pozze temporanee, gli stagni o i prati allagati. Tra gli appartenenti all'ordine degli Urodeli è presente il Tritone italiano (*Triturus italicus* Peracca) e il Tritone crestatto (*T. cristatus* Laurenti). Il Rospo comune (*Bufo bufo* L.), Rospo smeraldino (*B. viridis* Laurenti), la Raganella (*Hyla arborea* L.), la Rana agile (*Rana dalmatina* Bonaparte), e la Rana verde minore (*Rana esculenta* L.) sono i rappresentanti del ordine degli Anuri.



Tritone crestatto

I rettili sono rappresentati da due ordini: i Sauri e gli Ofidi. Dei Sauri sono presenti: il Ramarro (*Lacerta viridis* Laurenti), la Lucertola campestre (*Podarcis sicula* Rafinesque), la Lucertola muraiola (*Podarcis muralis* Laurenti) e l'Orbettino (*Anguis fragilis* L.). Tra gli Ofidi: la Biscia dal collare (*Natrix natrix* L.), il Biacco (*Coluber viridiflavus* L.) e la Vipera comune (*Vipera aspis* L.)

Non sono stati realizzati studi specifici sui mammiferi presenti all'Oasi. Insettivori, come il riccio (*Erinaceus europeus*) o la talpa (*Talpa europea*) sono stati osservati insieme a diverse specie di

Chiroteri così come toporagni del genere *Sorex* e *Crocidura*, ma non sono stati classificati, come il resto dei micromammiferi presenti. Tra i carnivori sono stati osservati volpi (*Vulpes vulpes*), tassi (*Meles meles*), faine (*Martes foina*) e donnole (*Mustela nivalis*). Tra gli ungulati sono molto numerosi i cinghiali (*Sus scrofa*). Questa elevata densità della loro popolazione è dovuta alle immissioni per scopi venatori compiute anni fa, come d'altronde è accaduto in altre zone d'Italia. Questo soprannumero crea danni sia alla vegetazione, a causa dell'attività di scavo che questi animali realizzano, sia alla fauna, soprattutto durante il periodo di riproduzione. Durante la ricerca di cibo possono, infatti, distruggere le nidi di specie che nidificano a terra, come le anatre o i fagiani. Come nel resto d'Italia, in particolar modo nelle zone umide, è numerosa la presenza della nutria (*Myocastor coypus* Molina) specie dannosa in quanto in soprannumero per mancanza di predatori.



Nutria cibandosi di *Potamogeton natans*

Sicuramente una delle caratteristiche più interessanti dell'Oasi del Lago di Alviano è la possibilità di osservare i numerosi uccelli migratori che frequentano questo ambiente. Seguendo la valle del Tevere come percorso durante la migrazione, numerosi uccelli acquatici e non, trovano nel lago un luogo dove sostare. Tra stanziali, svernanti, estivi e occasionali sono state censite più di 160 specie diverse, con presenze massime durante l'autunno di 12.000 individui.

La maggior parte degli uccelli che frequentano il Lago di Alviano appartengono a famiglie tipiche delle acque interne: Anatidae, Rallidae; Ardeidae, Falacrocoracidae e Laridae. Le famiglie dei Rallidi e degli Anatidi, sono quelle che maggiormente contribuiscono a popolare il lago, con concentrazioni di più di 3000 individui per le folaghe (*Fulica atra*) durante il periodo di svernamento.

Inoltre l'Oasi offre ad alcune specie un luogo adatto per la nidificazione, in particolar modo negli ultimi anni per alcune specie della famiglia degli Aldeidi (Ardeidae). Numerose coppie hanno nidificato sugli alberi di una delle isole della palude, dando luogo a una ricca garzaia di più di 70 nidi appartenenti a 5 specie diverse, due delle quali sono rare: la sgarza ciuffetto (*Ardeola ralloides*) e la nitticora (*Nyticorax nycticorax*).



Sgarza ciuffetto

4. SCOPO DEL LAVORO

- stimare l'efficacia del DNA-Barcoding in un approccio floristico in un area protetta in Italia.
- testare l'efficacia delle tre frequenze trnH-psbA, rbcL e rpoC1.
- valutare la capacità del DNA-Barcoding come strumento per studiare e monitorare la biodiversità.

5. MATERIALI E METODI

5.1. Lista delle specie

Per verificare l'efficienza del metodo Barcoding sono state campionate 40 specie di angiosperme appartenenti sia a taxa monocotiledoni che a taxa dicotiledoni che vanno dalle piante arboree a quelle arbustive, rampicanti ed erbacee, per un totale di 35 generi e 23 famiglie (Tab.1). Questa diversità di campioni permetteva di verificare l'applicabilità dei primer selezionati. Sempre per verificare la efficienza del metodo, ma questa volta nella discriminazione delle specie, sono state campionate 4 coppie di specie appartenenti allo stesso genere.

	Famiglia	Specie
monocotiledoni	Alismataceae	<i>Alisma plantago-aquatica</i> L.
	Cyperaceae	<i>Carex pendula</i> Huds. <i>Eleocharis palustris</i> (L.) Roem. et Schult. <i>Schoenoplectus lacustris</i> (L.) Palla <i>Scirpus holoschoenus</i> L.
	Iridaceae	<i>Iris pseudacorus</i> L.
	Lemnaceae	<i>Lemna minor</i> L. <i>Spirodela polyrhiza</i> (L.) Schleiden
	Najadaceae	<i>Najas minor</i> All.
	Poaceae	<i>Paspalum paspalodes</i> (Michx) Scribn. <i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.
	Potamogetonaceae	<i>Potamogeton natans</i> L. <i>Potamogeton pectinatus</i> L.
	Typhaceae	<i>Typha latifolia</i> L.
dicotiledoni	Aceraceae	<i>Acer campestre</i> L.
	Adoxaceae	<i>Sambucus nigra</i> L.
	Apiaceae	<i>Sium latifolium</i> L.
	Araliaceae	<i>Hedera helix</i> L.
	Betulaceae	<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertner <i>Corylus avellana</i> L. <i>Humulus lupulus</i> L.
	Ceratophyllaceae	<i>Ceratophyllum demersum</i> L.
	Fabaceae	<i>Amorpha fruticosa</i> L.
	Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i> L. <i>Mentha aquatica</i> L.
	Lentibulariaceae	<i>Utricularia minor</i> L.
	Lytraceae	<i>Lythrum salicaria</i> L.
	Moraceae	<i>Ficus carica</i> L. <i>Morus alba</i> L.
	Rosaceae	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq. <i>Prunus spinosa</i> L. <i>Rosa canina</i> L.

		<i>Rubus caesius</i> L. <i>Rubus ulmifolius</i> Schott
	Salicaceae	<i>Populus alba</i> L. <i>Populus nigra</i> L. <i>Salix alba</i> L. <i>Salix triandra</i> L.
	Tamaricaceae	<i>Tamarix gallica</i> L.
	Ulmaceae	<i>Ulmus minor</i> Miller

Tab. 1. Specie campionate

Le 40 specie campionate appartengono a diverse tipologie di ambienti umidi presenti nell'Oasi di Alviano. Alcune di queste sono strettamente legate all'acqua e, quindi, dipendenti dalla sua presenza. Basandoci su una classificazione che tiene conto della forma biologica e della distribuzione all'interno dell'habitat, possiamo dividere i campioni in:

- **idrofite**, specie che si ritrovano nelle zone con acqua libera e profonda e possono essere considerate le vere e proprie piante acquatiche.
 - 2 specie sono **galleggianti** con le radici libere nella colonna d'acqua, non connesse al substrato del fondale. Il galleggiamento di queste specie (di piccole dimensioni, leggere e con foglie grandi alcuni millimetri) è garantito, oltre che dalla presenza di tessuti auriferi, dalla tensione superficiale.

Lemna minor L.

Spirodela polyrhiza (L.) Schleiden



Lemna minor

- 5 sono specie **sommerse**. Le radici sono scarse o con la sola funzione di sostegno e ancoraggio, mentre in altre sono assenti o si può avere la formazione di pseudoradici dette "rizoidi". I gas, l'acqua e gli elementi nutritivi sono assorbiti direttamente da

fusti e foglie; queste ultime, pertanto, hanno epidermide sottile e cuticola assente, gli spazi intercellulari sono numerosi ed ampi ed i tessuti meccanici scarsi o assenti anche nei fusti.

Ceratophyllum demersum L.

Najas minor All.

Potamogeton natans L.

Potamogeton pectinatus L.

Utricularia minor L.



Ceratophyllum demersum

Una tra queste (*Utricularia minor*) appartiene al singolare gruppo delle piante carnivore. Sono definite carnivore quelle piante in grado di attrarre, catturare e digerire prede di origine animale. Per fare questo, hanno elaborato una serie di adattamenti di vario tipo fra cui il più importante è la trasformazione delle foglie in vere e proprie trappole. Nel genere *Utricularia*, le foglie sono dotate di piccole vescicole di 3-4 mm (otricoli), provviste di un opercolo mobile affiancato da peli sensibili. La pressione all'interno degli otricoli viene mantenuta inferiore rispetto all'esterno: quando un microrganismo acquatico urta i peli la valvola si apre bruscamente, aspirando l'acqua e la preda al suo interno dove verrà digerita. Questo tipo di trappola viene definita ad aspirazione ed è la più complessa e sofisticata che sia possibile rinvenire fra le piante carnivore.



Utricularia minor e otricolo

- **9** sono le specie appartenenti al gruppo delle **elofite**, le cosiddette piante palustri che abitano prevalentemente le zone con acqua bassa e le rive. Vivono con le radici immerse nel terreno intriso d'acqua per periodi più o meno lunghi, in terreni asfittici e melmosi, mentre la parte aerea (foglie, fusti e fiori) si sviluppa in emersione. L'assimilazione dell'acqua e degli elementi nutritivi avviene tramite l'apparato radicale che insieme ai fusti modificati sotterranei, svolge anche l'importante funzione di ancorare la pianta al terreno e di immagazzinare sostanze di riserva. In molte piante acquatiche e palustri possiamo osservare, infatti, la presenza di rizomi, stoloni, bulbi e tuberi, organi perennanti utilizzati per superare i periodi sfavorevoli (il freddo in inverno e i periodi siccitosi in estate) o come sistemi di propagazione vegetativa. Questi fusti modificati rappresentano anche delle strutture efficacissime per garantire una rapida colonizzazione di habitat instabili e sottoposti a notevoli variazioni ambientali. Gli organi emersi, oltre a svolgere la fotosintesi, sono i responsabili dell'approvvigionamento dell'ossigeno che viene trasportato agli organi sommersi; i fusti, pertanto, si dimostrano tubulosi, cavi all'interno e spugnosi, in maniera simile alle foglie, ricche di parenchima aurifero. L'abbondante presenza di tessuto spugnoso risulta preziosa nel caso di piene ed improvvisi aumenti del livello dell'acqua, assicurando il galleggiamento e garantendo la riemersione.

Alisma plantago-aquatica L.

Carex pendula Huds.

Eleocharis palustris (L.) Roem. et Schult.

Schoenoplectus lacustris (L.) Palla

Scirpus holoschoenus L.

Iris pseudacorus L.

Paspalum paspalodes (Michx) Scribn.

Phragmites australis (Cav.) Trin. Ex Steud

Typha latifolia L.



Paspalum paspalodes

- 5 specie arboree che prediligono crescere vicino all'acqua. Gli alberi delle zone umide presentano una serie di adattamenti indispensabili per poter vivere su terreni sottoposti a periodiche inondazioni. Per esempio i salici (*Salix spp.*) sono in grado di svilupparsi senza problemi lungo i corsi d'acqua o sui bordi di stagni e paludi. L'esteso apparato radicale permette un forte ancoraggio anche nel caso di piene e, allo stesso tempo, i rami flessibili e le foglie con lamine strette e allungate oppongono poca resistenza alla forza della corrente. Le variazioni del livello idrico e la modificazione dell'assetto del terreno a causa del apporto di detriti e materiale organico vengono superate grazie alla produzione di ricacci dal colletto e con la formazione di radici avventizie: i rami che si trovano sommersi o ricoperti dal substrato dopo una piena possono, così, prosperare e sviluppare nuovi individui separati dalla pianta madre. Le specie campionate appartenenti a questa tipologia sono:

Alnus glutinosa (L.) Gaertner

Populus alba L.

Populus nigra L.

Salix alba L.

Salix triandra L.



Il bosco idrofilo allagato durante parte del inverno

- **4** specie **igrofile**, che pur non vivendo con gli organi sommersi, prediligono suoli costantemente umidi e che vengono allagati periodicamente:

Sium latifolium L.

Mentha aquatica L.

Lythrum salicaria L.

Amorpha fruticosa L.

Tra questo gruppo di piante l'ultima (*Amorpha fruticosa*) è una specie alloctona di origine nordamericana. Negli ultimi anni è diventata un problema nelle zone umide europee poiché infesta i cariceti costituendo, al di sopra del piano erbaceo, un secondo piano legnoso con intensa copertura.



Amorfa fruticosa

- Le restanti **15** specie sono ubiquitarie, non necessariamente associate agli ambienti umidi, e di ampia distribuzione. Tra queste ci sono specie arboree, arbustive, erbacee e rampicanti.

Acer campestre L

Sambucus nigra L

Hedera helix L

Corylus avellana L

Ficus carica L.

Morus alba L

Crataegus monogyna Jacq.

Prunus spinosa L.

Rosa canina L.

Rubus caesius L.

Rubus ulmifolius Schott

Humulus lupulus L

Ulmus minor Miller.

Tamarix gallica L.



Humulus lupulus

5.2. Campionamento e conservazione

Il metodo di campionamento stabilito prevedeva la raccolta di due esemplari per ogni specie. I campioni sono conservati presso Banca Centrale del DNA Forestale (acronimo BCD) nata per iniziativa del Dipartimento DAF dell'Università della Tuscia (Viterbo) e della Scuola Centrale del Corpo Forestale dello Stato. La BCD ha sede a Cittaducale (Rieti) ed è in funzione dal 2007 con l'obiettivo di raccogliere, conservare in modo indefinito campioni di DNA vegetale, permettendo scambi per la ricerca e garantendo la conservazione dell'informazione genetica.

Le piante raccolte all'Oasi WWF Lago di Alviano sono conservate sia sotto forma di campioni di erbario che di liofilizzati tissutali per consentire l'estrazione del DNA

.

5.3 La scelta delle sequenze/marcatori

Dall'ampio gruppo di loci recentemente considerati/valutati (Kress et al. 2005; Shaw et al. 2007; Chase et al. 2007; Newmaster et al. 2008), sette sono quelli che hanno suscitato maggiore interesse: *rpoB*, *rpoC1* e *rbcL* (tre regioni codificanti da facile allineamento), un frammento di *matK* (una regione codificante di rapida evoluzione), e *trnH-psbA*, *atpF-atpH* e *psbK-psbI* (tre regioni spaziatrici di rapida evoluzione). Sulla base della capacità di amplificazione, sequenziamento, multiallineamento e della variabilità dimostrata (sufficiente a discriminare specie prossime dal punto di vista evolutivo), diversi gruppi di ricerca hanno proposto differenti combinazioni di questi loci (Kress & Erickson 2007; Lahaye et al. 2008; Fazekas et al. 2008; Hollingsworth et al. 2009; CBOL Plant Working Group 2009) come possibili risposte per il barcoding in studi vegetazionali.

Le combinazioni che vengono consigliate con maggiore frequenza per future applicazioni sembrano essere: *rbcL* + *trnH-psbA* (Kress & Erickson 2007), *matK* + *trnH-psbA* (Newmaster et al. 2008; Lahaye et al. 2008), *rbcL* + *trnH-psbA* + *matK* o *rpoC1* + *rbcL* + *matK* (Hollingsworth et al. 2009). Il CBOL Plant Working Group (2009) suggerisce *rbcL* + *matK* come la combinazione più adatta in termini di universalità, qualità delle sequenze e capacità di discriminazione. Nonostante ciò, Fazekas et al (2008) sostiene che ci saranno sempre alcune specie sulle quali le sequenze adottate per il barcoding vegetale non daranno risultati positivi, ma sulle quali altre sequenze, forse con peggiori risultati complessivi, riusciranno a funzionare.

Sulla base di queste proposte sono stati selezionati i seguenti tre frammenti: *trnH-psbA*, *rbcL* e *rpoC1*. *MatK* non è stato selezionato anche se è, attualmente, una delle sequenze consigliate perché all'inizio del presente studio i primers non fornivano risultati soddisfacenti.

5.4. Descrizione delle regioni plastidiali utilizzate

In accordo con le direttive del CBOL, sono stati selezionati tre frammenti dalle regioni cloroplastiche prescelte, corrispondenti alle seguenti regioni geniche:

- trnH-psbA, regione spaziatrice compresa tra i 2 geni;
- rbcL, regione codificante;
- rpoC1, regione intronica

5.4.1. Il frammento trnH-psbA

Gli studi su questa regione cominciarono con Aldrich (Aldrich *et al.*, 1988) che mostrò come fosse caratterizzata da inserzioni e delezioni (indel) anche tra specie vicine. Studi successivi hanno mostrato il suo valore a livello sistematico (Sang *et al.*, 1997) evidenziando anche la sua alta variabilità rispetto a *matK* e *trnL-trnF*. La sua utilità è stata anche mostrata da Hamilton (1999b) e Holdregger and Abbott (2003) che la hanno utilizzata anche per studi intraspecifici. Purtroppo la sua alta variabilità rende difficile il suo allineamento a livelli più alti (intergenere) (Laurales: Renner, 1999, Saxifragaceae: Soltis et al 2001, Lecythidaceae: Hamilton et al., 2003). Sebbene diversi studi abbiano mostrato che *trnH-psbA* contenga un alto numero di siti variabili (Hamilton et al., 2003) questa regione è usualmente accoppiata con altre regioni a causa della sua lunghezza che è mediamente di 465 bp (Shaw et al. 2005) e quindi potrebbe non possedere caratteri sufficienti per costruire una filogenia ben risolta. Queste caratteristiche, oltre che il fatto di essere facilmente amplificabile e sequenziabile nei diversi *taxa*, ne hanno determinato il suo largo utilizzo e ne hanno fatto una delle regioni candidate a diventare “sequenza barcode” per le specie vegetali (Pennini, 2007).

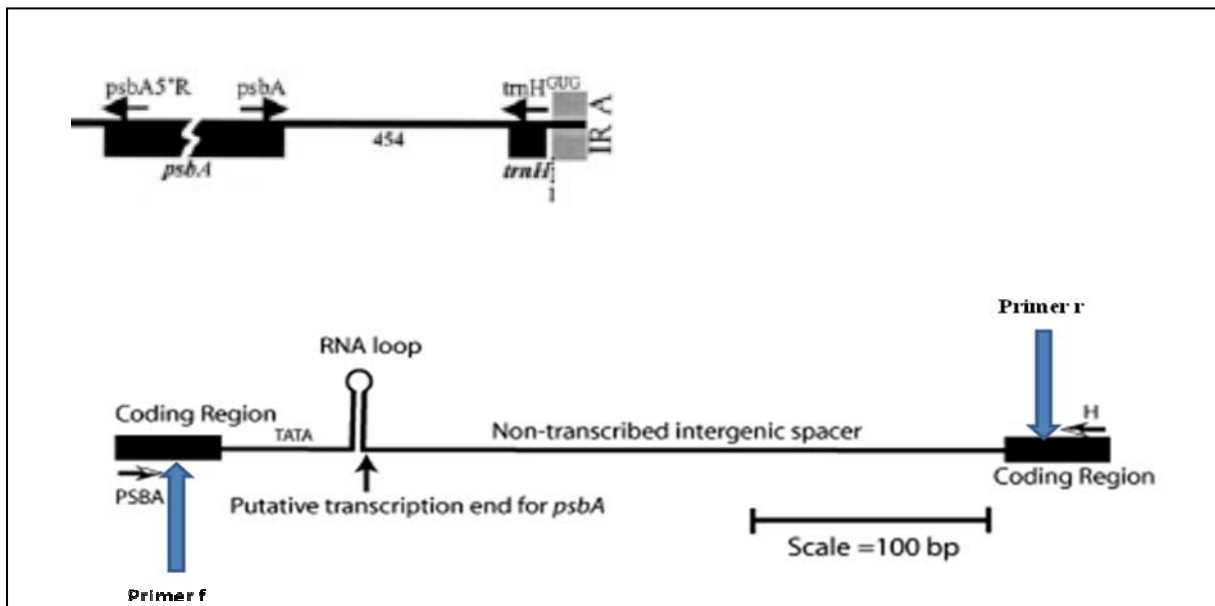


Fig.1 -Rappresentazione dei due geni *psbA* e *trnH* evidenziati nelle estremità, tra di loro vi è un' ampia regione non codificante, la quale risulta essere ricca di numerose mutazioni. La regione da noi utilizzata è localizzata all'interno di questo frammento, è stata chiamata *trnH-psbA 2* ed è riferita ad una sequenza di dimensioni maggiori ottenuta utilizzando la coppia di primers suggerita da Shaw et al. 2007.

5.4.2. Il frammento *rbcL*

Questo gene *rbcL* del DNA cloroplastico, codifica per la subunità grande dell'enzima ribulosio-1,5-difosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO), è il più importante accettore di carbonio in tutti gli eucarioti fotosintetici e nei cianobatteri. Questo gene è stato scelto per la sua universalità nell'ambito vegetale (fanno eccezione solo gli organismi vegetali parassiti), per la sua discreta lunghezza (1428 bp), perché non presenta problemi di allineamento. E' stato il primo e sicuramente uno dei più utilizzati marcatori in studi filogenetici nell'ambito di generi e famiglie. La scelta di questo gene nasce dalla sua ampia diffusione e la sua natura altamente conservativa, sebbene in un recente lavoro venga indicato come soggetto a selezione positiva nella maggior parte delle piante terrestri (Kaprlov e Filatoy, 2007). La sua efficienza come possibile Barcode è stata ripetutamente proposta da Kress et al. (2005; 2007).

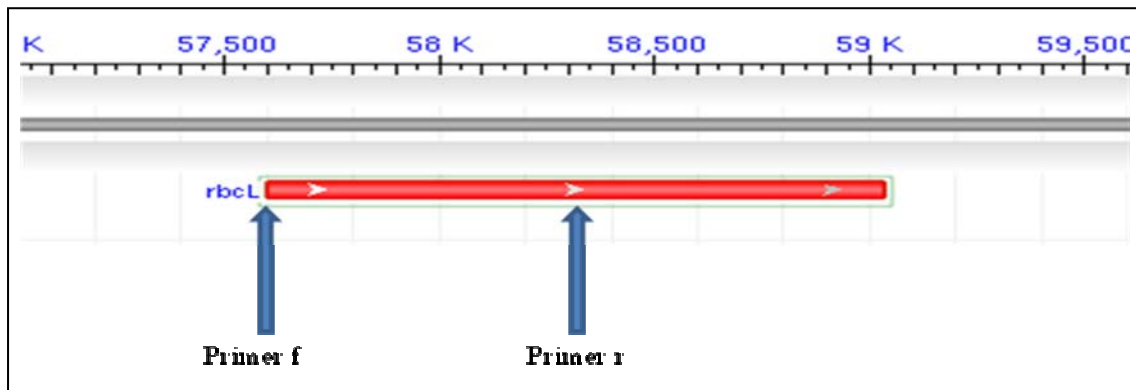


Fig.2 -Rappresentazione del gene *rbcL* costituito da un unico esone di 1434 bp in *Nicotiana*, 1440 in *Arabidopsis* e 1428 in *Populus alba*. Il frammento utilizzato nelle analisi è compreso tra i 2 primers riportati.

5.4.1. Il frammento *rpoC1*

Il gene cloroplastico *rpoC1*, insieme a *rpoC2*, costituisce la regione *rpoC* che si trova localizzata nella regione LSC (Large Single Copy) del genoma plastidiale nella maggior parte delle Angiosperme (Hudson et al 1988). Questi 2 geni, insieme a *rpoB* codificano le tre subunità della cpRNA polimerasi. Il gene *rpoC1* è interrotto da un singolo introne nella maggior parte, ma non in tutte, le piante terrestri.

Anche questo gene è stato ampiamente utilizzato per studi filogenetici, sebbene con limitati successi nella risoluzione di livelli tassonomici più bassi (Downie *et al* 1996).

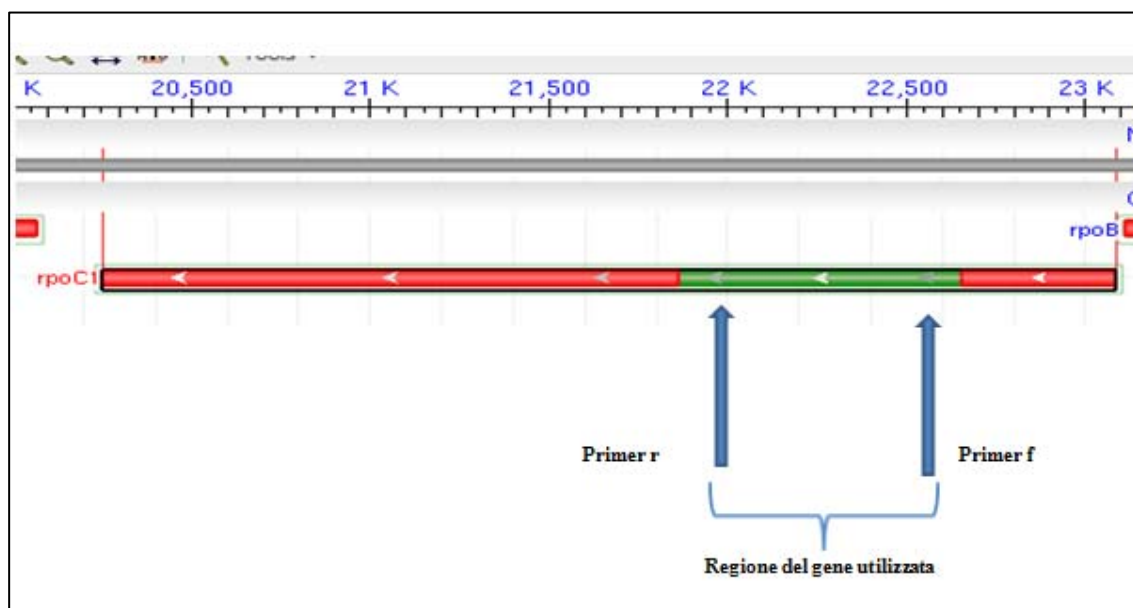


Fig.3-Il gene *rpC1* è costituito da due esoni identificati in rosso, quello di destra si trova tra 1-432 bp e quello di sinistra tra 1224-2834 bp, e da un introne evidenziato in verde, posizionato tra 433-1223 bp. Il frammento da noi utilizzato si colloca all'interno dell'introne esattamente tra 497-1050 bp come mostrato in figura.

5.5. La tecnica di estrazione del DNA



E' stato utilizzato un kit commerciale specificamente preposto per l'estrazione del DNA (*DNAeasy Plant Minikit*, Qiagen) che si caratterizza per la mancanza del fenolo e del cloroformio, sostanze altamente tossiche, e per la rapidità di esecuzione delle varie operazioni che portano ad un'ottima purificazione dell'acido nucleico.

Il kit comporta l'uso di vari tamponi e di due diverse colonnine "*Microspin*" per la purificazione dell'acido nucleico.

Il materiale vegetale utilizzato è stato o liofilizzato presso la Banca Centrale del DNA Forestale di Cittaducale (RI) o frantumato in piccoli mortai con azoto.

La procedura di estrazione del DNA a partire da 20 mg di liofilizzato ha percorso le seguenti fasi: lisi cellulare; digestione mediante l'uso di RNAsi; precipitazione e filtrazione dei residui cellulari, il legame del DNA ad una colonna scambio molecolare, successivo lavaggio della colonna ed eluizione del DNA estratto.

Le fasi in dettaglio:

- **La lisi cellulare:** 30 mg di liofilizzato tissutale sono stati trasferiti in un tubo da microcentrifuga della capacità di 2,0 ml dove sono stati aggiunti 400 µl del Buffer AP1 (soluzione di lisi).
- **Digestione con RNAsi:** al fine di evitare delle contaminazioni di RNA, sono stati aggiunti 2 µl di enzima per campione. Dopo l'omogeneizzazione della mix contenuta nel tubo su vortex, si è proceduto con l'incubazione a 65°C per 10 minuti.
- **Precipitazione dei residui cellulari:** a fine incubazione, sono stati aggiunti 130 µl di Buffer AP2 (Soluzione di precipitazione); omogeneizzando la mix per inversione e mantenendo i campioni in ghiaccio per 5 minuti, si è favorita la precipitazione del detergente, delle proteine e dei polisaccaridi; i campioni sono stati successivamente centrifugati in una microcentrifuga per 5 minuti alla massima velocità (13.000 rpm) al fine di allontanare i residui cellulari;
- **Filtrazione dei residui cellulari:** il sovranatante prelevato è stato posto su un tubo da 2,0 ml provvisto di colonna per filtrazione (QIAshredder Minispin) e centrifugato alla massima velocità per 2 minuti; a fine centrifugazione è stata scartata la colonna su cui si sono depositati i residui cellulari mantenendo il filtrato all'interno del tubo;
- **Legame del DNA ad una colonna a scambio molecolare:** al filtrato, ottenuto dalla precedente fase, si sono aggiunti 700 µl di Buffer AP3/E (diluito precedentemente con 60 ml di etanolo al

95%), una soluzione contenente guanidina tiocianato in grado di creare le condizioni per legare il DNA alla colonna a scambio molecolare (Soluzione di legame); 700 µl della mix, omogeneizzata per inversione, sono stati prelevati e trasferiti in tubo da microcentrifuga di 2,0 ml fornito di una colonna in silice (Colonna di legame) e sottoposti a centrifugazione per 1 minuto; tale operazione è stata ripetuta sulla restante mix utilizzando lo stesso tubo con colonna in silice e scartando il filtrato;

- **Lavaggio della colonna:** la colonna, la cui funzione è quella di trattenere il DNA, è stata trasferita in un tubo da microcentrifuga pulito; sono stati aggiunti 500 µl di Buffer AW (soluzione di lavaggio, precedentemente diluita con 40 ml di etanolo al 95%) ed è stata eseguita una centrifugazione ad 8000 r.p.m. per un minuto; scartando il filtrato, l'operazione è stata ripetuta con altri 500 µl della soluzione di lavaggio avendo cura che nessun residuo di questa fosse trattenuto dalla colonna;
- **Eluizione del DNA:** dopo il lavaggio la colonna è stata trasferita in un tubo da microcentrifuga pulito; ad essa sono stati aggiunti 150 µl di una soluzione di eluizione a basso contenuto salino (Buffer AE) lasciando incubare per 30 minuti a temperatura ambiente; è seguita una centrifugazione ad 8000 r.p.m. per un minuto.

Il DNA, estratto col metodo descritto, può essere conservato nella soluzione utilizzata per l'eluizione per breve tempo a 4°C o, per lungo tempo, a -20°.

5.6. Le analisi di sequenze nucleotidiche

L'analisi delle sequenze nucleotidiche, nelle specie prescelte, prevede i seguenti passaggi:

- Amplificazione del frammento desiderato;
- Purificazione del frammento amplificato;
- Determinazione delle sequenze nucleotidiche.

5.6.1. L'amplificazione del frammento desiderato

L'amplificazione è stata condotta mediante la tecnica della "PCR" utilizzando un *thermal cyclor* (termocicizzatore) Gene Amp PCR System 2400 della Perkin Elmer.

Aliquote definite dei DNA sono state fatte reagire con un preparato commerciale liofilizzato contenente tutti gli elementi necessari alla reazione di amplificazione (enzima TAQ polimerasi, tampone, deossinucleotidi) a cui sono stati aggiunti segmenti specifici di DNA di pochi nucleotidi denominati *primers*, che hanno permesso l'innescio della amplificazione della regione del DNA che interessa grazie ad una loro specifica



temperatura di appaiamento. le sequenze dei primers e i *files* utilizzati per la PCR sono riportati in tabella 2

Geni cloroplasti		Primers	Riferimento
trnH-psbA	f	CGCGCATGGTGGATTTCACAATCC	Shaw et al. 2007
	r	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	
rbcL	f	ATGTCACCACAAACAGAAAC	Kress et al. 2005
	r	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	
rpoC1	f	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	CBOL
	r	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	

Tab.2 I Primers utilizzati per ogni frammento

L'amplificazione, condotta nel termocicizzatore, prevedeva un ciclo di reazioni a catena che hanno consentito la separazione delle due eliche di DNA, l'appaiamento dei primers alle regioni omologhe e la produzione di nuove copie dei filamenti nucleari; ogni ciclo è stato ripetuto più volte. L'amplificazione si è conclusa con 10 minuti a 72°C, in modo da terminare i frammenti eventualmente rimasti incompleti.

L'amplificazione mediante PCR, la determinazione e l'analisi delle sequenze è stata effettuata seguendo le procedure suggerite dal protocollo *Barcoding* (Tab.3)

	CONDIZIONI
STEP 1	94°C per 3 min.
STEP 2	94°C per 30 sec.
STEP 3	53°C per 30 sec.
STEP 4	72°C per 1 min.
STEP 5	go to STEP2, 35 times
STEP 6	72°C per 10 min.
STEP 7	4°C forever

Tab.3. Protocollo per PCR

Il volume finale è stato di 25µl di cui 50 ng di DNA genomico, 20 ng di primers per reazione, una dose di puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham) ed acqua quanto basta per raggiungere il

volume desiderato, per raggiungere una concentrazione finale di 200 μM di ciascun nucleotide e 1,5 mM di MgSO_4 .

Per verificare il successo della PCR e delle relative amplificazioni, è stata effettuata un' elettroforesi su gel d'Agarosio. La polvere di Agarosio è stata sciolta a caldo in tampone TBE 1X, con l'aggiunta di bromuro di etidio, una sostanza a struttura aromatica che intercalandosi nella doppia elica del DNA la rende visibile ai raggi ultravioletti. La soluzione così ottenuta è stata fatta gelificare su un apposito vassoio e con l'ausilio di un "pettine" sono stati prodotti dei pozzetti, in ognuno di essi sono stati caricati: 6 μl di H_2O , 2 μl di Blu di Bromofenolo e 2 μl di DNA derivato dalla miscela di amplificazione.

Il gel solidificato è stato posto in una cella elettroforetica contenente il buffer TBE 1X ed applicando agli elettrodi una differenza di potenziale elettrico di 80 V (d.d.p.) per circa 30 min.

Al termine della corsa elettroforetica è stato possibile osservare, mediante un transilluminatore a raggi UV, le bande di DNA, il loro grado di pulizia e di integrità.

5.6.2. La purificazione del DNA amplificato

I prodotti delle PCR sono stati purificati seguendo il protocollo del manuale di utilizzo del kit commerciale GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

Il campione (25 μl) è stato stabilizzato con un tampone in grado di denaturare le proteine e/o dissolvere l'agarosio.

Esso, inoltre, applicato nella colonna microspin, fa sì che il

DNA, dopo successive centrifugazioni, si leghi alle membrane. Un seguente lavaggio rimuove i sali e le altre contaminazioni dalle membrane legate al DNA. Il campione così purificato viene diluito con un tampone e lasciato incubare a temperatura ambiente per un paio di minuti. Dopo aver eseguito un'ultima centrifugazione, si preleva il DNA che sarà conservato in freezer a -20°C .



5.6.3. La determinazione delle sequenze nucleotidiche

Le sequenze purificate sono state sottoposte a reazioni di sequenziamento presso i laboratori della Eurofins MWG Operon (Germania). La sequenza nucleotidica di ciascun frammento è stata determinata su entrambe le eliche, utilizzando in ciascuna reazione il corrispettivo primer in posizione 5'.

La lettura dei tracciati grezzi, detta anche identificazione delle basi (*base-calling*) ad oggi viene effettuata tramite un software che legge automaticamente le basi, allinea le sequenze simili e fornisce una base intuitiva per il lavoro di correzione di bozze (*editing*). Mentre leggono i tracciati,

questi programmi assegnano punteggi di probabilità all'accuratezza d'identificazione di ciascuna base.

Le quattro tracce corrispondenti ai quattro spettri di fluorescenza sono fuse in un unico file, mantenendo le caratteristiche grafiche dei picchi. Al passaggio successivo il computer calcola il punto in cui si attende di trovare un picco, usando un procedimento di calcolo basato sulla distanza media tra i picchi in alcune regioni della sequenza. Gli algoritmi migliori sono in grado di effettuare aggiustamenti per l'aumento della distanza tra i picchi che avviene con l'avanzamento della corsa elettroforetica e per le variazioni locali nel contenuto di GC. In seguito, l'algoritmo rileva i valori massimi locali per ciascuna delle quattro serie di tracciati e controlla se ciascun picco ricade nello spazio previsto rispetto ai picchi adiacenti. Poiché non tutti i picchi sono della stessa altezza, per decidere se un picco è reale gli algoritmi usano di solito un valore soglia, che calcola la grandezza relativa di un minimo e massimo locale.

I risultati delle reazioni di sequenza sono stati visualizzati sotto forma di elettroferogrammi (Fig.4.) con il programma CHROMAS 2.1 (Technelysium), in cui la successione dei diversi picchi rappresenta la sequenza nucleotidica reale del DNA studiato.

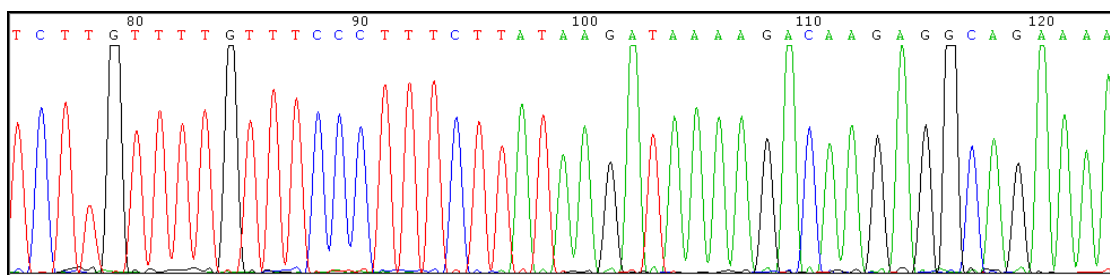


Fig 4. Esempio di elettroferogramma di sequenza

Le prime 30/50 basi di un elettroferogramma sono normalmente indistinguibili dal “rumore di fondo”, a causa della migrazione anomala di brevi frammenti di DNA che contengono agglomerati di coloranti. Inoltre i tracciati diventano progressivamente meno uniformi con l'avanzare della corsa: aumentano gli effetti della diffusione molecolare e contemporaneamente diminuiscono le differenze relative di massa tra frammenti successivi.

Poiché gli algoritmi automatici sovente commettono alcuni errori nell'identificazione delle basi, si è proceduto manualmente alla correzione delle sequenze.

Tutte le sequenze sono state verificate, controllate e assemblate con il programma DNAMAN 2.3 (Lynnon-Biosoft).

Si è proceduto alla correzione nel caso in cui l'elettroferogramma della sequenza fornito dall'*Eurofins* considerasse la coda di un picco precedente come se fosse una base, nel caso in cui non

fosse stata considerata l'eterozigosità in alcuni nucleotidi, nel caso di sbagliato conteggio di una serie numerosa di basi uguali.

5.7. L'elaborazione dei dati

L'elaborazione dei dati è stata svolta in collaborazione con il laboratorio di Bioinformatica dell'università degli studi di Bari (Dipartimento di Biochimica e Biologia Cellulare) diretto dalla Prof.ssa M. Attimonelli, sotto la guida della Dott.ssa R. Piredda.

L'allineamento multiplo finale di tutte le sequenze prodotte è stato ottenuto con il programma CLUSTALW 1.81 (Thompson et al., 1994).

I polimorfismi sono stati analizzati usando DnaSP 4.50.2. I dendrogrammi sono stati creati con MEGA 4.0 mentre le analisi filogenetiche, condotte con il programma PAUP 4.0b1 (Swofford, 1998), sono state dedotte usando i metodi del “*Neighbor-Joining*” e della Massima Parsimonia.

Le distanze evolutive sono state calcolate secondo il criterio dei 2 parametri di Kimura.

Il test di *bootstrap* è stato ottenuto dopo 500 repliche ed i valori riportati vicino alle ramificazioni degli alberi filogenetici.

Le sequenze ottenute per il frammento trnH-psbA sono state analizzate con BLASTClust, metodo che non si basa sul multiallineamento delle sequenze. L'ampia variabilità delle dimensioni del frammento trnH-psbA (269-989 pb) non permette di realizzare l'allineamento delle sequenze. La qualità dell'allineamento altera i risultati del hierarchical clustering (o clustering gerarchico), causando la perdita di informazioni ed errori nella identificazione degli aplotipi.

RISULTATI

La amplificazione delle tre sequenze testate nel Barcoding in condizioni standard è riuscita nel 100% dei campioni per quanto riguarda due loci (trnH-psbA e rbcL). La PCR di RpoC1 non ha prodotto nessun risultato in due specie appartenenti alla famiglia delle Cyperaceae (*Carex pendula* e *Eleocharis palustris*), probabilmente a causa di mancanza di complementarietà con una delle sequenze del primer.

Elettroferogrammi inequivocabili sono stati ottenuti per rpoC1 e rbcL, con il 100% di sovrapposizione tra sequenze complementari in tutti i taxa (Fig.1-3, esempi di elettroferogrammi dei tre loci). Al contrario, si ripete una sequenza mononucleotide insolitamente lunga nella regione trnH-psbA di *Amorpha fruticosa* e di *Utricularia minor* dando come risultato un notevole disturbo alla qualità delle tracce successive, quindi richiedendo un maggiore sforzo per la loro determinazione. Per lo stesso motivo, non è stato possibile ottenere la sequenza per *Carex pendula*.

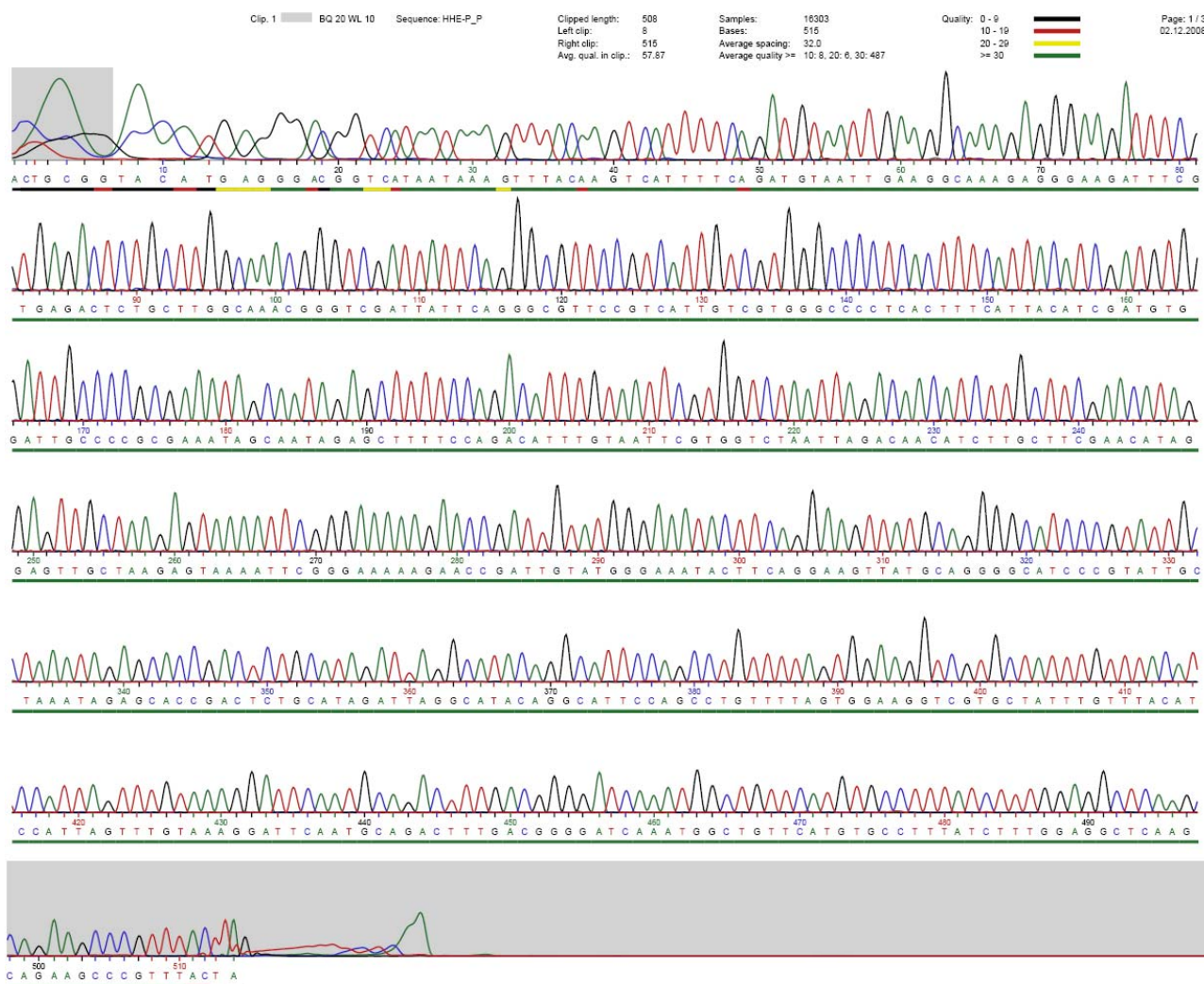


Fig.5. Electropherogramma della sequenza rpoC1 di *Hedera helix*.

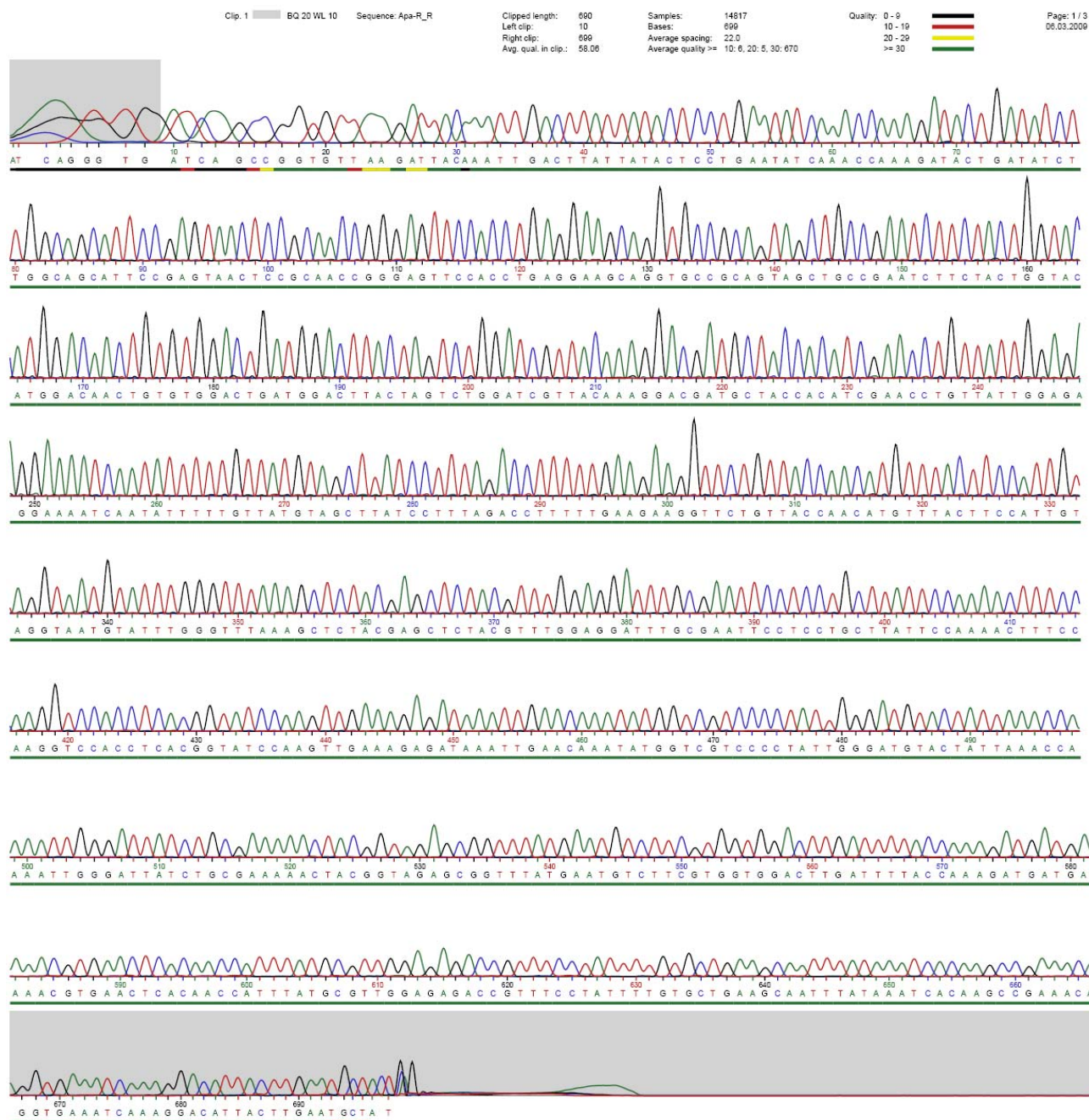


Fig.6. Electroferogramma della sequenza *rbcL* di *Alisma plantago-aquatica*.

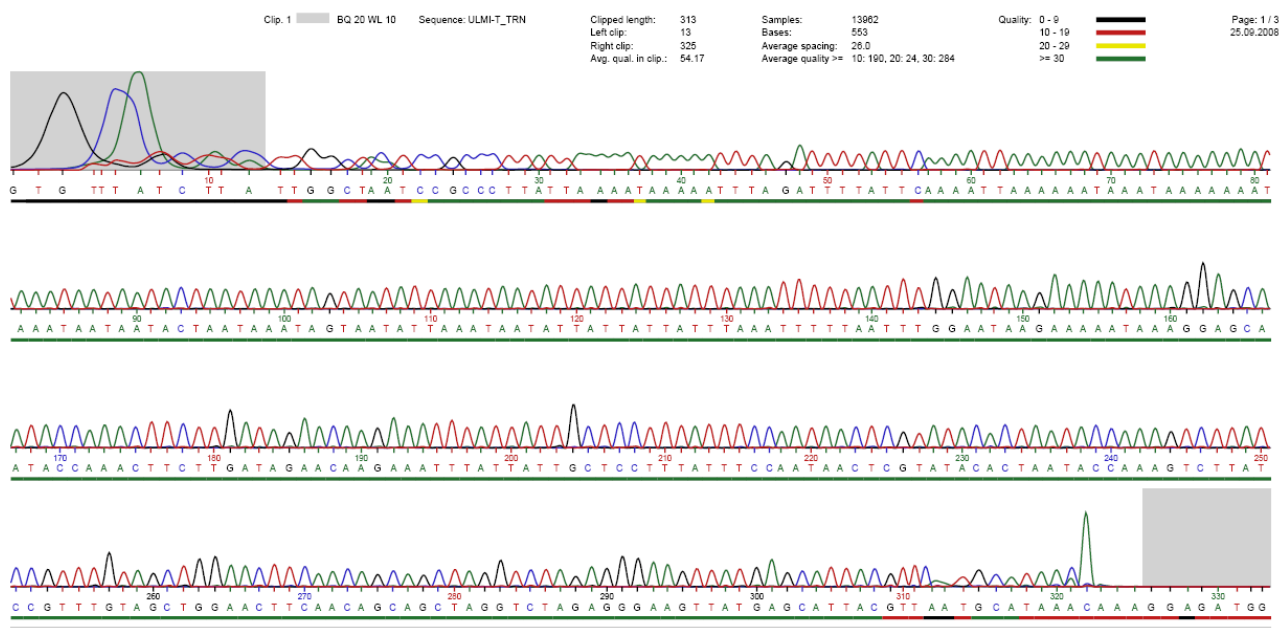


Fig. 7. Electroferogramma della sequenza trnH-psbA di *Ulmus minor*.

Le sequenze delle regioni codificanti sono state allineate facilmente, in quanto non presentavano eventi di inserzioni/delezioni. In questo modo sono stati prodotti dei dendrogrammi che permettono di confrontare la capacità discriminativa dei frammenti. (Fig. 8 e 9). D'altra parte, i protocolli basati su allineamenti multipli non potevano essere applicati alla regione spaziatrice trnH-psbA a causa di una elevata variabilità della lunghezza di questo locus (269-989 pb) nel nostro gruppo di dati. Il metodo di allineamento libero BlastClust ha permesso di assegnare ad ogni campione la sua sequenza. (Fig. 10)

I risultati sono 40 sequenze per ogni marcatore la cui efficacia viene mostrata nella Tab. 4. Il locus trnH-psbA ha permesso di identificare una percentuale molto più elevata di campioni rispetto alle due regioni codificanti rbcL o rpoC1.

Frammenti Barcode	Successo PCR	Successo sequenza	Corretta discriminazione
trnH-psbA	100%	97.5%	92,5%
rbcL	100%	100%	85%
rpoC1	95%	95%	85%

Tab. 4. Efficacia dei tre marcatori sia nella amplificazione che nel sequenziamento che nella discriminazione delle specie

La efficacia dei frammenti testati, dal punto di vista della capacità di discriminare specie affini (appartenenti allo stesso genere), è stata verificata attraverso 8 specie appartenenti a 4 generi diversi: *Rubus* (*R.ulmifolius* e *R.caesius*), *Potamogeton* (*P.pectinatus* e *P.natans*), *Populus* (*P.nigra* e *P.alba*) e *Salix* (*S.nigra* e *S.Triandra*). RbcL non è riuscito a discriminare correttamente le specie *R. ulmifolius* da *R. caesius*, nemmeno *Populus alba* da *P. nigra* e neanche *Salix alba* da *S. triandra*.

TrnH-psbA è in grado di differenziare le specie campionate appartenenti al genere *Rubus* così come entrambe le specie del genere *Salix*, ma non differenzia le due specie appartenenti al genere *Populus*. I risultati della sequenza RpoC1 sono stati una via di mezzo: *Rubus* spp. sono state differenziate ma le coppie di specie dei generi *Populus* e *Salix* non sono state discriminate. La quarta coppia di specie appartenenti ad uno stesso genere (*Potamogeton natans* e *P. pectinatus*) sono state discriminate in modo semplice con tutti e tre i marcatori. La capacità di discriminazione per tipologia ambientale e per le specie affini viene riportata in Tabella 5 e 6.

Combinazioni multiregionali non hanno identificato gli ulteriori aplotipi e non sono state raggiunte percentuali di discriminazione tra le specie, superiori a quelle ottenuti con trnH-psbA .

Tipologia ambientale	Numero di specie	Corretta discriminazione		
		rbcl	rpoC1	trnH-psbA
Idrofite galleggianti	2	100%	100%	100%
Idrofite sommerse	5	100%	100%	100%
Elofite	9	100%	100%	100%
Erbacee igrofile	4	100%	100%	100%
Alberi igrofili	5	20%	20%	60%
Comuni in altri ambienti	15	86%	100%	100%

Tab.5 Efficacia nella discriminazione delle specie dei tre marcatori a seconda della tipologia ambientale di appartenenza del campione.

Specie	rbcL	rpoC1	trnH-psbA
<i>Rubus ulmifolius</i> <i>Rubus caesius</i>	no	discriminate	discriminate
<i>Populus nigra</i> <i>Populus alba</i>	no	no	discriminate
<i>Potamogeton pectinatus</i> <i>Potamogeton natans</i>	discriminate	discriminate	discriminate
<i>Salix nigra</i> <i>Salix Triandra</i>	no	no	no

Tab 6. Capacità discriminazione dei tre loci per le specie affini.

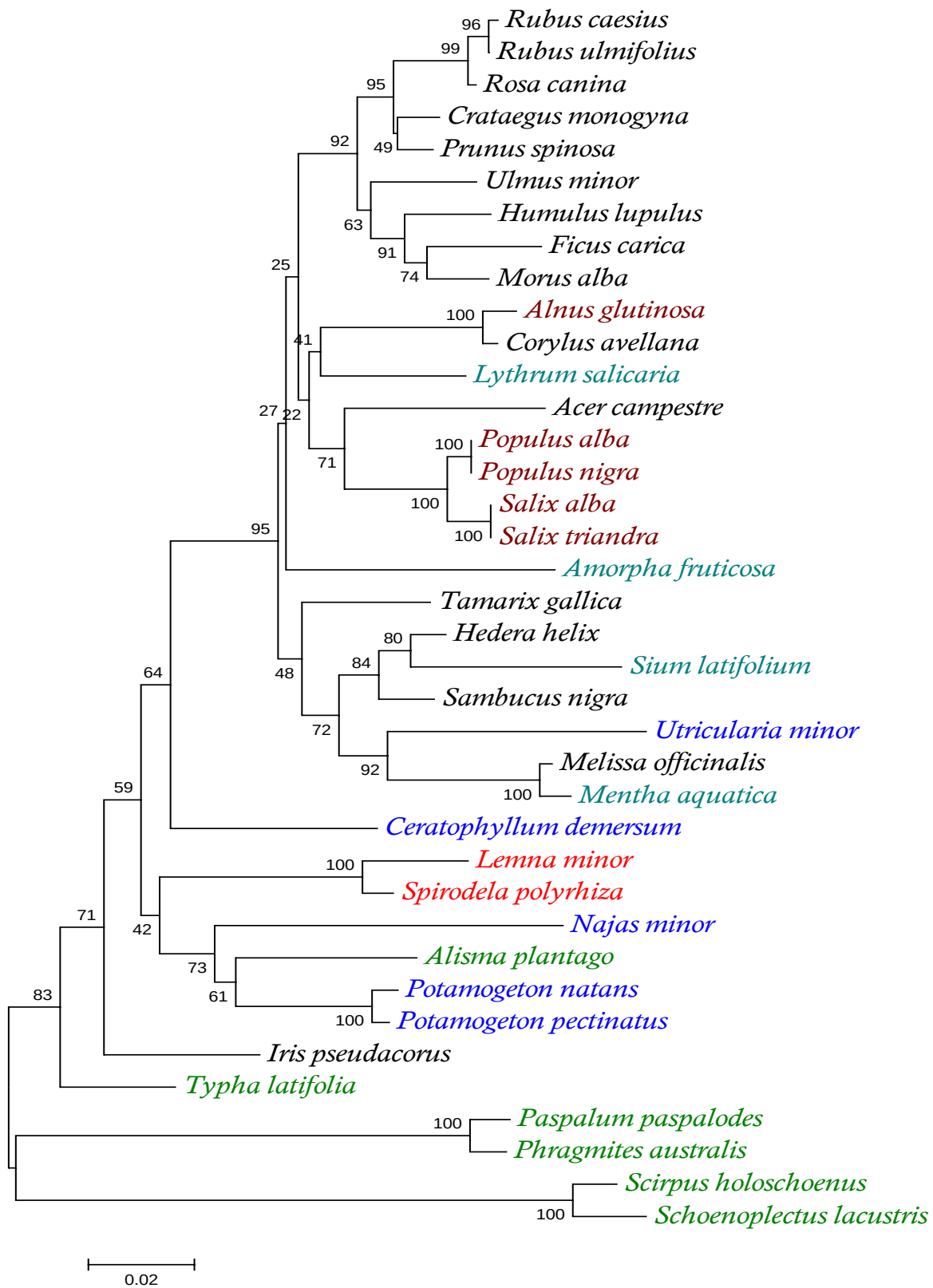


Fig. 8. NJ dendrogramma delle sequenze di rpoC1

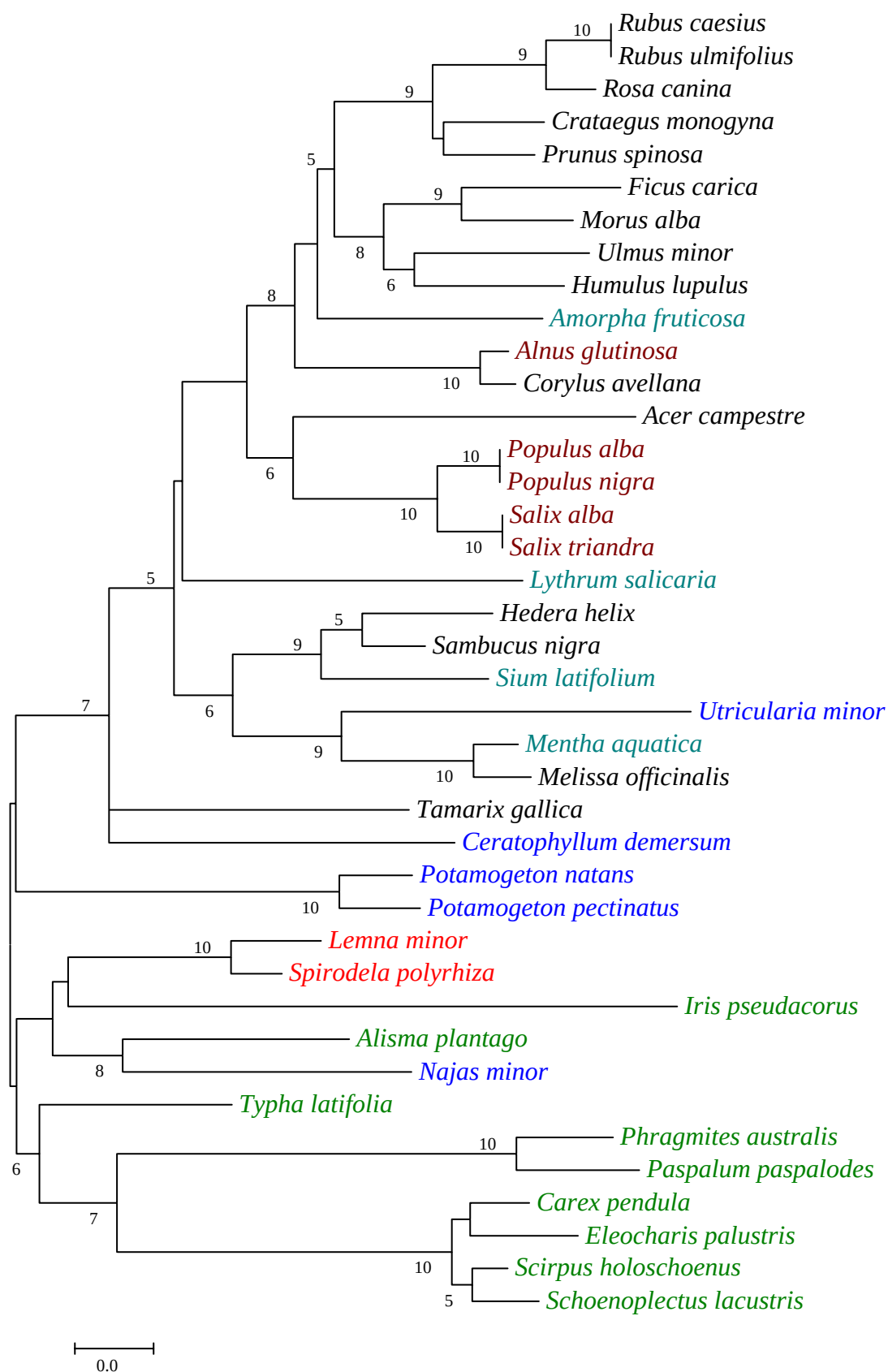


Fig 9. NJ dendrogramma delle sequenze di rbcL

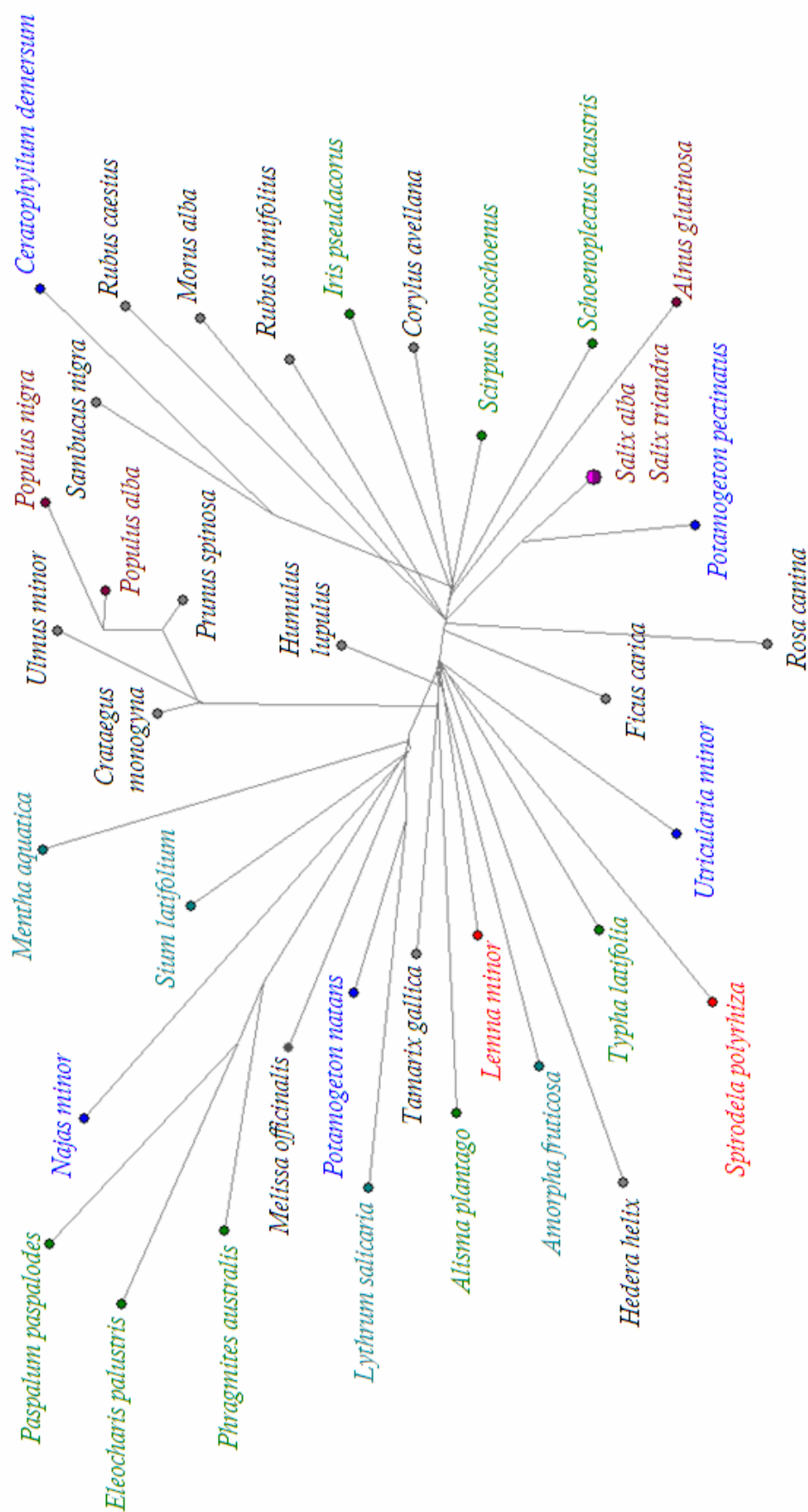


Fig. 10. Network degli aplotipi trnH-psbA generati con il metodo BlastClust.

CONCLUSIONI

Questo lavoro fornisce una prima relazione sulla applicabilità della tecnica del DNA-Barcoding come strumento utile per studiare e monitorare la biodiversità in un ecosistema di zona umida in Italia. La tassonomia e i campi ad essa correlati (la ecologia, la tutela o la gestione) potrebbero beneficiare di un metodo standard a basso costo per l'identificazione univoca delle specie. Questo metodo, tra l'altro, può fornire nuovi dati utili ai progetti per la conservazione e la salvaguarda della Biodiversità. I dati dimostrano che la maggior parte delle piante di un ecosistema specifico (o un habitat) possono essere soggetto di studio per l'applicazione del Barcoding in modo efficiente portando alla scoperta di taxon e migliorando la gestione dell'inventario delle specie.

Sono stati utilizzati diversi contesti biologici (strategie di campionamento) per comparare la efficacia dei loci per il barcoding delle piante. Da una parte è stata verificata la universalità delle regioni grazie al campionamento e posteriore analisi di 40 specie appartenenti a 23 famiglie diverse, sia di monocotiledone che di dicotiledone. Tra l'altro tra le 40 specie campionate si trovano piante morfologicamente e fisiologicamente molto diverse tra di loro, come piante acquatiche, palustri, arbusti, o rampicanti. I risultati hanno fornito una visione della applicabilità e universalità delle regioni Barcode. Si pensi che è stato possibile discriminare tutte le piante galleggianti libere, le piante sommerse e le piante che vivono in zone periodicamente inondate. Inoltre sono state identificate l'89% delle piante emerse e il 60% degli alberi che crescono vicino all'acqua. Le specie ubiquitarie e quelle considerate invasive sono state discriminate in modo efficiente.

La capacità di discriminazione dei tra loci è stata verificata grazie alla presenza di 4 paia di specie affini con diversi risultati per ogni frammento.

Il tasso complessivo di risoluzione finora descritto (Fazekas et al.2009) indica un limite di carattere generale (ca. 72%) per la precisione nella differenziazione delle specie vegetali attraverso dei marcatori derivanti da un singolo linkage genetico. Nel gruppo delle specie vegetali campionate sono risultate differenziate, a livello specifico, con successo il 92,5% del totale, risultando la combinazione di marcatori trnH-psbA+ rbcL come quella più efficiente. Ciò nonostante, esistono delle limitazioni prevedibili. I membri della famiglia Cyperaceae sono stati identificati unicamente con un marcatore (rbcL), che potrebbe risultare valido per l'identificazione del genere, ma di scarsa risoluzione per determinare le specie in studi futuri. Per questo gruppo di piante, è necessario utilizzare un primer specifico supplementare come è già stato evidenziato in precedenti lavori (Starr, J.R. et al 2009). E' risultato anche poco efficiente per le specie legnose di tre generi. Questa mancanza di monofilia può essere dovuta alla limitata variazione del DNA del marker scelto così come altre ragioni dovute alle caratteristiche genetico- evolutive delle specie stesse. Negli alberi è

stata accertata una particolare lentezza nelle mutazioni, nella sostituzione dei nucleotidi e nei tassi di specificazione rispetto ad altre piante, apparentemente dovuta ai tempi di riproduzione più lunghi e più lenti tassi metabolici (Petit, RJ & Hampe A 2006). La mancata discriminazione delle due specie di *Salix* può pertanto essere imputata a queste ipotesi, oltre alla riconosciuta attitudine di questo genere all'ibridazione inter-specifica.

Ciononostante, crediamo che il maggiore ostacolo della mancanza di successo in generi “difficili” non può essere superato aggiungendo analisi con nuovi frammenti di DNA plastidiale. Il DNA Nucleare potrebbe fornire vantaggi, avendo tassi di mutazione e sostituzione più alti. La regione a rapida evoluzione nrITS, regione spaziatrice trascritta interna di DNA ribosomale, potrebbe essere un utile Barcode addizionale per quelli generi dove altri non funzionano, anche se non completamente libero di insidie (Feliner & Rossellò 2007) che richiederanno miglioramenti nei protocolli attuali.

Una delle sfide per le future applicazioni in campo ambientale del DNA Barcoding è quella di aumentare il numero di studi pratici concentrandosi su protocolli standardizzati, campionamenti logistici locali, e indagini sulle popolazioni regionali nell'ambito di diverse specie appartenenti allo stesso genere. DNA Barcode applicato allo studio della vegetazione di un dato ecosistema può fornire informazioni non solo dal punto di vista tassonomico, tramite la identificazione univoca delle specie, ma anche filogenetiche. In effetti sta diventando un utile strumento per studi approfonditi di ecologia delle comunità (per descrivere le interazioni pianta-animale e le dinamiche della vegetazione), di ricerche sulla biodiversità (finalizzata alla tutela degli habitat e delle specie), di gestione (per valutare la rinnovazione), e anche nella regolamentazione del mercato (per creare prodotti secondari e per la certificazione del germoplasma). Sono molti i campi che possono beneficiare della applicazione della tecnica del DNA Barcode; tra questi, lo studio ed il monitoraggio della biodiversità vegetale delle zone umide rivestono certamente una grande rilevanza scientifica e applicativa per la conservazione di questi ecosistemi a rischio.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aldrich J. B. W. Cherney E. Merlin L. Christopherson 1988 The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *psbA* and *trnH* in the chloroplast genome. *Current Genetics* 14: 137- 146.
- Barbault R.(2001)- *Dictionnaire de l'écologie*. Encyclopædia Universalis, Parigi.
- Bartolini A. e Pellegrini R. SOS Piante acquatiche. Caratteristiche, declino e conservazione della flora delle zone umide toscane. Relazioni con la fauna. WWF Serie Scientifica –N.8.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Van Den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L., Wilkinson, M.(2007)- *A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants*. International Association for Plant Taxonomy.Taxon, 2, 295-299.
- Downie SR, Llanas E & Katz-Downie DS, 1996. Multiple independent losses of the *rpoC1* intron in angiosperm chloroplast DNA's. *Systematic Botany*, 21:135-151.
- Eldredge N. (2004)- *La vita sulla Terra. Un'enciclopedia della biodiversità, dell'ecologia e dell'evoluzione*. Codice edizioni, Torino.
- Fazekas et al. 2009, Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources* 9, 130-139.
- Felicioni e Zarri. Le Zone Umide della Toscana Settentrionale. Quaderni della Palude di Fucecchio. N.5
- Feliner G, Rossello JA (2007). Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Mol Phylogenet Evol* 44: 911–919.
- Hamilton M. B. 1999b Tropical tree gene flow and seed dispersal: deforestation affects the genetic structure of the surviving forest fragments. *Nature* 401: 129-130.
- Hamilton M.B. , Braverman J. M., and Soria-Hernanz D. F. (2003). Patterns and Relative Rates of Nucleotide and Insertion/Deletion Evolution at Six Chloroplast Intergenic Regions in New World Species of the Lecythidaceae . *Mol. Biol. Evol.* 20(10):1710-1721.

- Hebert, P. D., Ratnasingham, S. & deWaard, J. R. 2003a Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270(Suppl.), S96–S99. (DOI 10.1098/rsbl.2003.0022.)
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. 2003b Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 313–321.(DOI 10.1098/rspb.2002.2218.)
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biol.*, 2:e312 (DOI: 10.1371/journal.pbio.0020312).
- Holdregger R. R. J. Abbott 2003 Phylogeography of the Arctic-Alpine *Saxifraga oppositifolia* (Saxifragaceae) and some related taxa based on cpDNA and ITS sequence variation. *American Journal of Botany* 90: 931-936.
- Hollingsworth ML, et al. (2009) Selecting barcoding loci for plants: Evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Mol Ecol Res* 9:439–457.
- Janzen D.H., 2004 - *Now is the time*. *Philos. Trans. R. Soc. London, B Biol. Sci.*, 359: 731-732.
- Kapralov M. V. and Filatov D. A., 2007. Widespread positive selection in the photosynthetic Rubisco enzyme. *BMC Evol. Biol.*; 7: 73. Published online 2007 May 11. doi: 10.1186/1471-2148-7-73. PMCID: PMC1884142.
- Kress J, Erickson DL (2008) DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2761–2762.
- Kress W. J. and Erikson D.L., 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non – Coding trnH-psbA Spacer Region. *PloS ONE* 2(6): e508. doi: 10.1371/journal.pone.0000508.
- Kress W. J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L. A. e Janzen D. H. *Use of DNA barcodes to identify flowering plants*. *PNAS* 23, 8360-8374.
- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. (2006) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8369-8374
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *PLoS ONE* 2(6): e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508

- Lahaye R., van der Bank M., Bogarin D., Warner J., Pupulin F., Gigot G., Maurin O., Duthoit S., Barraclough T.J., Savolainen V. (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2923-2928.
- Lee M.S.Y., 2004 - *The molecularisation of taxonomy*. *Invertebrate Systematics*, 18: 1-6.
- Lipscomb D., Platnick N. & Wheeler Q., 2003 - *The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy*. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (2): 65- 66.
- Moritz C. & Cicero C., 2004 - *DNA barcoding: promise and pitfalls*. *PLoS Biol.*, 2 (10): 354 pp.
- Newmaster SG, Fazekas A, Steeves R, Janovec J (2008) Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources*, 8, 480–490.
- Pennisi E (2007). Taxonomy. Wanted: a barcode for plants. *Science* 318: 190–191.
- Petit, RJ & Hampe A 2006, Some Evolutionary Consequences of Being a Tree Annual, *Revue of Ecology Evolution and Systematics* 37, 187-214.
- Pignatti S. (1982)- *Flora d'Italia*. Vol I, Edagricole. Bologna.
- Primack R. (2001)- *Causes of extinction*. In *Encyclopedia of Biodiversity*, Vol II, 697-714. S. Levin et al. (eds.). Academic Press, San Diego.
- Renner S. S. 1999 Circumscription and phylogeny of the Laurales: evidence from molecular and morphological data. *American Journal of Botany* 86: 1301-1315.
- Sang T. D. J. Crawford T. F. Stuessy 1997 Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120-1136.
- Seberg O., Humphries C.J., Knapp S., Stevenson D.W., Petersen G., Scharff N. & Andersen N.M., 2003 - *Shortcuts in systematics? A commentary on DNA-based taxonomy*. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (2): 63-65.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripum K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L.(2005)- *The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences, for phylogenetic analysis*. *American Journal of Botany* 92, 142-166.
- Shaw J., Lickey E.B., Beck T.J., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. (2007) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analyses. *American Journal of Botany* 92(1): 142–166. 2005.

- Soltis D. E., P. S. Soltis, and J. J. Doyle (eds.) 1998. *Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing*. Kluwer, Boston.
- Soltis DE, Tago-Nakazawa M, Xiang QY, Kawano S, Murata J, Wakabayashi M, Hibschi-Jetter C.. Phylogenetic relationships and evolution in Chrysosplenium (Saxifragaceae) based on matK sequence data. Am J Bot. 2001 May;88(5):883-893.
- Starr, J.R. Et al 2009, Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (Carex, Cyperaceae) Molecular Ecology Resources 9, 151–163.
- Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R.H. & Vogler A.P., 2003 - *A plea for DNA taxonomy*. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (2): 70-74.

Ringraziamenti

Alla fine di questo lavoro vorrei esprimere la mia gratitudine a le persone che hanno collaborato, in tanti modi incoraggiandomi e supportandomi, alla sua realizzazione.

Vorrei ringraziare, il tutor che mi ha dato la opportunità di svolgere questa ricerca.

Marco Cosimo Simeone per la sua dedizione, grazie per la pazienza, la conoscenza e sostegno con cui mi ha supportato durante lo svolgimento delle fasi di questo lavoro. La preziosa, oltre che insostituibile collaboratrice a questo progetto: Roberta Piredda, per l'appoggio tecnico, senza il quale molto di quanto qui riportato non avrebbe visto la luce.

Le dottorande, T. Kirin, A. Laiou , M.P. Tomasino, per l'impulso alla perseveranza fornitomi nella parte finale di questo lavoro.

Inoltre, ulteriori ringraziamenti vanno ai miei colleghi Alessio Capoccia e Marianeve Medori, per la comprensione, la disponibilità dimostratemi e l'appoggio fornitomi nel giustificare e riempire le mie assenze.

Mio marito, correttore in lingua italiana e, a volte, enigmista risolutore delle mie frasi.

Ringrazio,il WWF e, soprattutto, l'Oasi di Alviano, scenario di unica e mutevole Biodiversità.

Febbraio 2011

Laura