

Università degli Studi di Napoli Federico II



Dottorato di Ricerca in Biologia (XXIX Ciclo)

Coordinatore Prof. Salvatore Cozzolino

**“Le popolazioni insulari di *Podarcis siculus*:
selezione e adattamento”**

Dottoranda

Tutor

Dott.ssa Martina Trapanese

Dott. Domenico Fulgione

Anni 2014-2017

University of Naples Federico II



Ph.D. in Biology (XXIX Cycle)

Coordinator Prof. Salvatore Cozzolino

**“Insular populations of *Podarcis siculus*:
selection and adaptation”**

Ph.D. Student

Tutor

Dr. Martina Trapanese

Dr. Domenico Fulgione, Ph.D.

Years 2014-2017

Indice

Riassunto	1
Summary	4
1. Introduzione	7
1.1 Le pressioni selettive di un'isola	8
1.1.1 Le isole	8
1.1.2 Instabilità geologica e condizioni climatiche variabili	9
1.1.3 La disarmonia delle isole: “filtro climatico” e “filtro di isolamento”	10
1.1.4 Dimensione limitata – numero di specie	11
1.1.5 La densità delle popolazioni sulle isole	12
1.2 Le regole e le sindromi	14
1.2.1 La Regola Insulare	14
1.2.2 La Sindrome Insulare	14
1.2.3 La Sindrome Insulare Inversa	16
1.2.3.1 Il marcato melanismo: un <i>flag</i> della RIS	17
1.3 Scopo della tesi	19
2. Materiali e Metodi	20
2.1 Area di studio	21
2.1.1 Altre isole	23
2.2 Raccolta dati in campo	26
2.2.1 Cattura	26
2.2.2 Fotografia, codificazione, misurazioni morfometriche e prelievo di tessuto	27
2.2.3 Analisi spettrofotometrica della pelle	29
2.2.4 Valutazione dell'aggressività intraspecifica	30
2.2.5 Analisi del carico parassitario e della pressione predatoria	31
2.2.6 Valutazione della complessità insulare e delle condizioni climatiche presenti sulle isole	33
2.3 Analisi molecolari	34

2.3.1 Analisi dei polimorfismi nella regione codificante del gene MC1R	34
2.3.2 Analisi dell'espressione genica differenziale del gene MC1R mediante real time-PCR	36
2.3.3 Analisi del trascrittoma (RNA-Seq) mediante tecnologia Illumina HiSeq 2500	40
2.3.4 Estrazione e sequenziamento del DNA mitocondriale	49
3. Risultati	55
3.1 Valutazione della complessità insulare	56
3.2 Cattura, misurazioni morfometriche e prelievo di tessuto	56
3.3 Analisi spettrofotometrica della pelle	58
3.4 Valutazione dell'aggressività intraspecifica	59
3.5 Analisi della pressione predatoria e del carico parassitario	59
3.6 Analisi dei polimorfismi nella regione codificante del gene MC1R	61
3.7 Analisi dell'espressione genica differenziale del gene MC1R	62
3.8 Il sequenziamento del DNA mitocondriale e la valutazione dei tassi di mutazione dN, dS e dN-dS	63
3.9 Analisi del trascrittoma (RNA-Seq)	64
3.10 mtDNA e <i>Divergence Time</i>	70
4. Discussione	73
Bibliografia	77

Riassunto

Le pressioni selettive che agiscono sulle popolazioni insulari sono spesso differenti da quelle esistenti sulla terraferma, tendendo a diversificare gli animali che vivono in questi ambienti.

Tali variazioni sono state ampiamente descritte per molti animali e piante, e possono essere inquadrare in almeno tre modalità dette sindromi o regole. La Regola Insulare, evidenzia il gigantismo nei mammiferi piccoli e il nanismo in quelli grandi. La Sindrome Insulare (IS) descrive la ridotta aggressività, il gigantismo, la riduzione nella dimensione della prole e il ritardo nella maturità sessuale. Infine, la Sindrome Insulare Inversa (RIS) descritta solo per la lucertola campestre, pone al centro dell'adattamento insulare gli adattamenti che favoriscono il rapido trasferimento del contributo genetico alle generazioni successive (Raia *et al.*, 2010). Tra le condizioni necessarie al manifestarsi della RIS sembrerebbero necessarie l'instabilità ambientale e la scarsa aspettativa di vita da parte delle popolazioni animali.

In questa ricerca si è cercato di svelare le basi genetiche della RIS e le implicazioni temporali che sono necessarie allo sviluppo degli adattamenti fenotipici (Monti *et al.*, 2013).

Lo studio è stato condotto su tre popolazioni che potevano rappresentare: la condizione wild-type (le lucertole della terraferma Punta Campanella), la condizione insulare senza evidenze di sindrome (le lucertole dell'isola di Capri) e la condizione insulare in cui erano evidenti i segnali della sindrome (le lucertole del faraglione Scopolo, a largo di Capri, noto anche come faraglione di Fuori).

Come marcatori di sindrome sono stati esaminati la larghezza del capo, il grado di melanizzazione della pelle e il comportamento aggressivo. Per ognuno degli ambienti che ospitavano le tre popolazioni sono state studiate le pressioni selettive, considerando la pressione predatoria e il carico parassitario cutaneo.

Le lucertole di Scopolo hanno un capo più largo, sono più aggressive e sono caratterizzate da un forte melanismo. La validità di questi marker ha reso questo approccio sperimentale un futuro strumento di indagine per investigare la RIS in altre popolazioni insulari.

Le pressioni selettive indagate (predazione e carico parassitario) si sono rivelate nettamente più forti su Scopolo rispetto alle altre due aree di studio esaminate. Molto probabilmente queste estreme condizioni ecologiche rappresentano alcune delle spinte adattative alla base dei caratteri riconducibili alla RIS.

Il gene per il recettore della melanocortina 1 (MC1R), responsabile dei processi di melanizzazione nei lacertidi insulari (Fulgione *et al.*, 2015), si esprime diversamente nelle tre popolazioni, mostrando un forte incremento di mRNA in quella di Scopolo. Il mitogenoma è stato assemblato per approfondire eventuali variazioni tra le tre popolazioni, in termini di modalità di mutazione. Per questo marcatore, la popolazione sotto sindrome (Scopolo) evidenzia un basso numero di mutazioni nelle regioni codificanti, principalmente di tipo neutrale.

Tutte queste evidenze hanno suggerito che la variazione mostrata dai fenotipi sotto sindrome può dipendere da un set di geni diversamente espressi piuttosto che da mutazioni a livello genico. Per indagare la veridicità di questa ipotesi è stata allestita un'analisi trascrittomica su due organi principalmente implicati nei caratteri fenotipici della sindrome, i testicoli e il cervello.

L'elaborazione del trascrittoma mediante tecnologia *de novo* utilizzando più tessuti, è stata effettuata per la popolazione insulare (Scopolo) e per quella della terraferma (Punta Campanella). L'analisi trascrittomica ha rilevato un basso numero di SNPs nelle regioni codificanti e una maggiore espressione di molti geni legati alla RIS nella popolazione di Scopolo, dimostrando ancora una volta che la modalità regolativa può essere alla base delle variazioni osservate.

Una sostanziale differenza nelle variazioni imputabili alla regolazione/metilazione del DNA piuttosto che alla modifica del genoma, sta nei tempi in cui è possibile attuare questi cambiamenti. Lucertole insulari sottoposte a forti pressioni selettive, possono rispondere attraverso la regolazione in tempi brevi e con adattamenti specifici. È stato quindi deciso di stimare i tempi di divergenza delle tre popolazioni e in particolare di Scopolo, la popolazione sotto sindrome.

Utilizzando il genoma mitocondriale come *molecular clock*, è risultato evidente che la quantità di mutazioni nel mtDNA delle lucertole di Capri è proporzionata ai tempi di separazione di Capri dalla terraferma. Diversamente, la quantità di mutazioni accumulate sul genoma mitocondriale della popolazione di Scopolo è sensibilmente inferiore a quella attesa rispetto ai tempi di separazione del faraglione (Scopolo) dalla

sua terraferma (isola di Capri). Questi dati confermano l'ipotesi che il genoma dei lacertidi della popolazione sotto sindrome (Scopolo) non ha subito sostanziali cambiamenti strutturali a fronte di una forte variazione fenotipica. Quest'ultima sarebbe il frutto di una regolazione genica che potrebbe dipendere da diversi fattori trascrizionali o dalla metilazione del DNA.

Questa ricerca se da un lato ha aggiunto informazioni circa i modi e i tempi evolutivi del nostro caso di studio, dall'altro lato ha aperto numerosi spunti di indagine che riguardano appunto i meccanismi genetici alla base della strategia regolativa.

Summary

The selective pressures acting on insular populations are often different from those on the mainland, therefore diversifying insular animals.

Such variations have been amply described for many animals and plants, and they can be grouped in at least three syndromes or rules.

The Island Rule describes the gigantism in smaller mammals and dwarfism in larger species. The Island Syndrome (IS) predicts reduced aggressiveness, gigantism, reduced litter size and delayed sexual maturity. Finally, the Reversed Island Syndrome (RIS) described only for the Italian wall lizard, focuses on adaptations that are useful to ensure the early reproduction. In this way insular lizards optimize reproduction to guarantee the transfer of genetic information to the next generation in a shorter time (Raia *et al.*, 2010). Unpredictable environments and lower life expectancy seems to be the necessary conditions so that there is the RIS.

In this research we tried to reveal the genetic basis of RIS and the temporal implications that are necessary for the development of phenotypic adaptations (Monti *et al.*, 2013).

The study was conducted on three populations: one population of lizards from mainland (Punta Campanella), represented the wild-type condition, one population from an island without syndrome (lizards from Capri) and finally one population from an island most probably under syndrome (lizards from Scopolo, also known as external sea stack).

Head width, skin melanization and aggressive behavior were assayed to identify which of the examined populations were under the syndrome. Furthermore, for each of the three environments hosting the three populations, we estimated the selective pressures such as predatory pressure and ectoparasite load of the skin.

Lizards from Scopolo island had a larger head and they were more aggressive. Another typical feature was the strong melanization of the skin. The efficiency of these markers made this experimental approach a future instrument of RIS investigation in the case of other island populations.

The selective pressures (predation and ectoparasite load) were stronger on Scopolo island than in the other two study areas. These extreme ecological conditions most likely represent some of the driving forces at the base of RIS adaptations.

The Melanocortin 1 receptor gene (MC1R), involved in melanization of insular lizards (Fulgione *et al.*, 2015), was differently expressed in the three populations. In particular, its mRNA level was higher in lizards from Scopolo.

The mitochondrial genome was assembled to investigate variations among these populations, analyzing the types and modes of mutations. For this marker, lizards from Scopolo (population under syndrome) showed rare and neutral mutations in the coding regions.

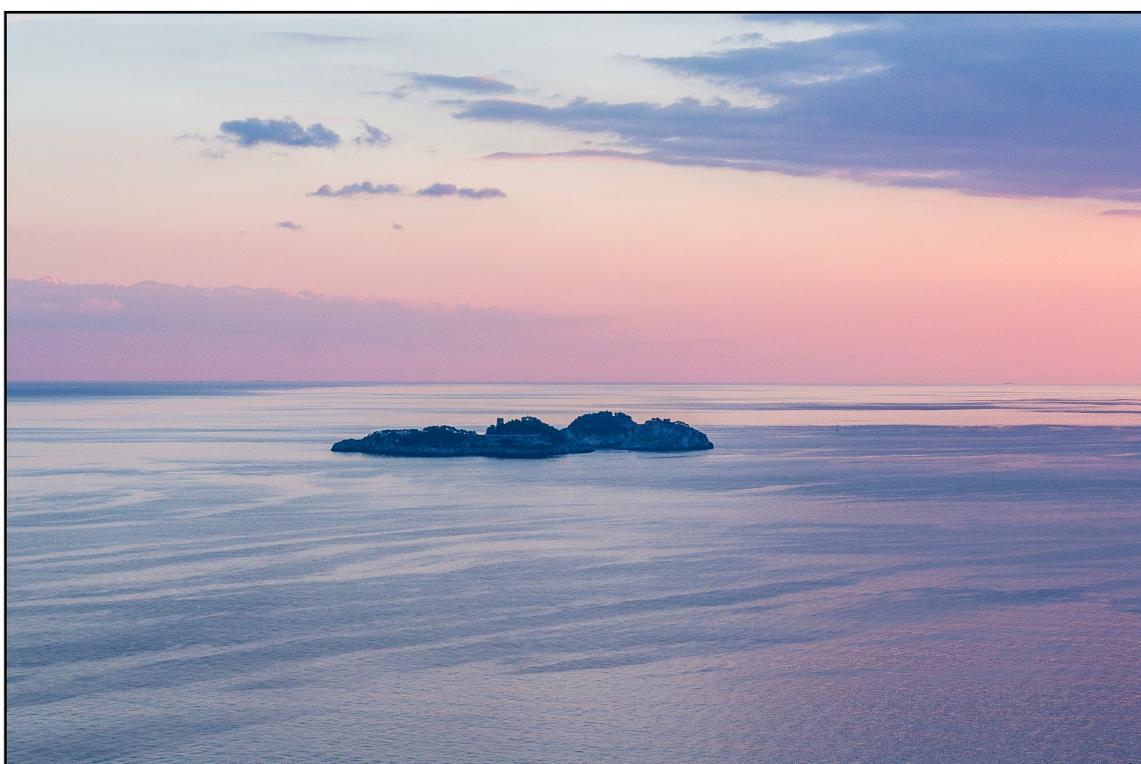
All these tests suggested that the variations shown by lizards under-syndrome may depend on a set of differently expressed genes rather than gene mutations. To investigate the veracity of this hypothesis, we conducted a transcriptome analysis using two tissues mainly implicated in the phenotypic characters linked to syndrome, testis and brain.

We assembled a *de novo* multi-organ transcriptome, for mainland (Punta Campanella) and island populations (Scopolo). The transcriptome analysis showed that insular lizards had a lower rate of SNPs in the coding regions of the genes but higher expression of the genes linked to RIS. This confirms that regulative mode could be at the base of the observed variations. A significant difference in phenotypic variations related to the regulation of gene expression/methylation of DNA rather than mutations in the genome-coding regions, is the time necessary to induce these changes. Insular lizards exposed to strong selective pressures can respond in a short time and with specific adaptations regulating their gene expression. Therefore, we decided to estimate the divergence times for these three populations and particularly for the population from Scopolo, the island under syndrome.

Using the mitochondrial genome (mtDNA) as *molecular clock*, it was evident that the amount of mutations occurred in mtDNA of lizards from Capri, was commensurate to the time of geological separation of Capri from mainland. On the contrary, the amount of mutations occurred in mtDNA of lizards from Scopolo was significantly lower than expected in relation to the time of geological separation of Scopolo from its mainland, Capri island. These data have confirmed the hypothesis that the genome of lizards from Scopolo didn't suffer structural changes despite great phenotypic changes. The latter could be the result of a gene regulation that could be due to diverse transcriptional factors or DNA methylation.

On the one hand, this research provides information about the mode and time of evolution of our case study. On the other hand, it has opened many opportunities of investigation concerning the genetic mechanisms underlying regulative strategies.

1. Introduzione



Li Galli - Positano (SA)

1.1 - Le pressioni selettive di un' Isola

“Le isole si muovono orizzontalmente e verticalmente e quindi in maniera grossolana modificano l'ambiente su di esse e attorno ad esse. Di conseguenza anche le forme di vita che le popolano devono evolvere, migrare, o estinguersi in seguito a tali cambiamenti”

(Menard, 1986)

1.1.1 - Le isole

“...dallo sterco di vacca al Sud America, è difficile definire ciò che è stato o non è stato un'isola”

(Mabberley, 1979)

Il concetto di “isola” può essere esteso ad un qualunque ecosistema a limitata estensione che, in qualche modo, sia isolato dalla biosfera circostante ed abbia ridotte possibilità di scambi con essa (Caloi *et al.*, 1988). Molte situazioni, più di quanto non sembri, sono riconducibili al concetto di isola. Tutti i continenti ad esempio, non sono che enormi isole circondate da oceani, le cime montuose che ospitano flora e fauna d'alta quota, separate da valli boschive o coltivate, sono isole. Anche un bosco circondato da una prateria è, a suo modo, un'isola forestata in mezzo a un “mare di erba” (Zunino & Zullini, 2004).

Ma la definizione forse più comune di Isola è quella di “un pezzo di terra circondata da acqua”. Possiamo pertanto dividere le isole in due tipologie: “vere e proprie isole”, ovvero zone di terra interamente circondate da acqua, e “habitat insulari”, cioè habitat circondati da ambienti fortemente contrastanti (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). Le “vere isole” possono essere a loro volta suddivise in continenti insulari (es. Australia), isole oceaniche, frammenti continentali, le isole che sono parte di un arco vulcanico e le catene montuose marine emergenti, che si formano nelle aree di connessione tra le faglie.

Le *isole oceaniche* si sono formate da placche oceaniche e non sono mai state collegate a masse continentali, sono state in genere formate da attività vulcanica (es. Islanda, Azzorre, Hawaii, Santorini, Eolie). Di solito le isole oceaniche sono prive di grandi predatori e hanno meno specie rispetto alle altre tipologie di isole (Williamson, 1981). I

primi organismi che arrivano su queste isole devono adattarsi ad ambienti nuovi e pertanto possono andare incontro a forti cambiamenti (Mayr, 1967; Carlquist, 1974; Thomas *et al.*, 2009; Raia & Meiri, 2011). Poichè tutte le specie su queste isole arrivano per dispersione e si diversificano *in situ*, le isole oceaniche hanno una fauna e una flora uniche, molto differenti da quelle della terraferma (Carlquist, 1974).

I *frammenti continentali* sono quelle isole che per la loro ubicazione (distanti dalla terraferma e con acque profonde che li separano dal continente) potrebbero essere considerate come isole oceaniche, ma hanno avuto origine da antichi frammenti di roccia continentale bloccati negli oceani da fenomeni tettonici (es. Corsica, Sardegna, Sicilia, Madagascar, Cuba, Jamaica, Capri) (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). Le isole continentali presentano generalmente la superficie più ampia e mantengono il collegamento alla piattaforma dalla quale possono essersi staccate per erosione, abbassamento del terreno, innalzamento delle acque, forti terremoti o semplicemente perché la piattaforma continentale è più bassa in alcuni punti del livello delle acque. La “vita insulare” per queste isole inizia con una pre-esistente comunità ecologica, simile a quella della terraferma a cui erano legate (Karr, 1982). Pertanto le specie su tali isole possono essere relativamente ben adattate all’ambiente e necessitano solo di “tenere il passo” con le nuove pressioni selettive che emergono quando la comunità insulare si adatta al suo stato isolato (Wilcox, 1978). Questo tipo di isole, molto rappresentate nel bacino del Mediterraneo, rappresentano la tipologia di cui ci si è occupati nel progetto di ricerca sviluppato.

1.1.2 - Instabilità geologica e condizioni climatiche variabili

Le isole possono andare incontro a diversi fenomeni naturali che possono alterare la loro ampiezza, come l’erosione o cambiamenti del livello del mare. Questi, nel corso degli ultimi millenni, anche se relativamente poco rilevanti, sono stati sufficienti ad apportare un impatto significativo su diversi elementi tipici delle coste del Mediterraneo: promontori, isole, arcipelaghi. Alcune di queste variazioni, come per esempio quella del livello del mare, sono dette eustatiche (cioè sono legate al cambiamento di volume del mare), altre sono dette isostatiche (dovute all’elevazione della superficie terrestre) (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). Altre variazioni, come quelle a seguito di un’attività vulcanica e ai continui processi di assestamento

delle placche terrestri, possono aumentare di estensione le isole esistenti o farne sorgere di nuove. Le eruzioni vulcaniche sono infatti le principali forze costruttive per le isole del Mediterraneo, sebbene i processi vulcanici possono anche danneggiarne gli ecosistemi presenti.

I processi di erosione da pioggia, vento e mare, rappresentano le forze opposte che riducono le estensioni delle isole fino al livello del mare o addirittura al di sotto di esso (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007).

La vita sulle isole è in genere molto più rischiosa rispetto a quella sulla terraferma in quanto gli eventi distruttivi hanno effetti molto più pesanti e mancano aree di rifugio.

Le condizioni climatiche caratterizzanti un'isola sono spesso dipendenti dalla sua altitudine e spesso si differenziano da quelle sul continente per una maggiore influenza da parte del mare circostante. Inoltre, le piogge che si riversano sulle isole sono chimicamente differenti rispetto a quelle che cadono nelle aree interne continentali (Waterloo *et al.*, 1997), in quanto la composizione chimica delle precipitazioni in un sito particolare non dipende solo dalla quantità e distribuzione stagionale dell'acqua piovana caduta (Lesack & Mellack, 1991), ma anche dalla velocità e direzione del vento (Weijers & Vugts, 1990a), così come la posizione del sito rispetto a potenziali fonti di nutrienti atmosferici (Sodio, Potassio, Magnesio, Calcio, Cloro, Nitrati, Bicarbonato, Ammonio) (Waterloo *et al.*, 1997). Tali fonti possono essere divise in “fonti da fondo” (come gli oceani) o “fonti periodiche e locali” (come le eruzioni vulcaniche, incendi, emissioni industriali o agricole) (Clayton, 1976; Dugan & Ekern, 1984; Veneklaas, 1990; Weijers & Vugts, 1990b; Gunadi, 1993; School & Ingebritsen, 1995).

1.1.3 - La disarmonia delle isole: “filtro climatico” e “filtro di isolamento”

Le isole tendono ad avere un diverso “bilanciamento” delle specie, se confrontate con la terraferma, pertanto sono dette *disarmoniche*. Ci sono due aspetti legati a questa disarmonia, il primo è che sia il clima, e di conseguenza, le comunità vegetali ed animali tendono ad essere più “polari” di quelle dei vicini continenti (es. le isole Canarie localizzate ad ovest del Sahara, hanno una flora mediterranea, le isole Kerguelen nell'oceano indiano sono fredde e per la loro latitudine sono simili all'Antartico) (Williamson, 1981). Quindi c'è un “filtro climatico” coinvolto nella distribuzione delle specie sulle isole. Secondo, le isole sono disarmoniche in quanto

solitamente (principalmente le isole oceaniche) effettivamente “assaggiano” solo la porzione dispersiva del pool di individui della terraferma, pertanto è presente un filtro di isolamento o di dispersione (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007).

1.1.4 - Dimensione limitata – numero di specie

L'area dell'isola è un fattore determinante per le faune insulari per due motivi: in primo luogo, come la dimensione dell'isola diminuisce, così si riduce la dimensione della popolazione di una specie (Blondel & Aronson, 1999). Pertanto la probabilità di estinzione aumenta con il diminuire dell'estensione dell'isola, inoltre quando una specie si estingue è più difficile che venga rimpiazzata attraverso la dispersione, rispetto a quanto avviene sulla terraferma. Anche per queste ragioni le isole tendono ad avere meno specie rispetto alle aree continentali della stessa dimensione.

In secondo luogo, come la dimensione dell'isola aumenta, diventa più probabile la colonizzazione da parte di nuove specie, in ragione della presenza di una maggiore varietà di habitat (Blondel & Aronson, 1999).

Secondo il modello di equilibrio dinamico di MacArthur e Wilson (1963, 1967), il numero di specie di un dato taxa su di un'isola è il prodotto di forze opposte che portano rispettivamente all'aggiunta o alla perdita di specie, determinando così un continuo turnover di specie presenti sull'isola. La loro teoria è stata sviluppata per spiegare l'apparente regolarità nella relazione numero di specie-area isola. Nel loro modello, che rappresenta una pietra angolare della biogeografia insulare (Modello di Equilibrio della Biogeografia Insulare = EMIB) (Fig. 1.1), è possibile osservare come il tasso di immigrazione decresce esponenzialmente mentre il tasso di estinzione aumenta esponenzialmente in relazione al numero di specie presenti su di un'isola. La curva dei tassi di immigrazione si appiattisce con l'aumentare dell'isolamento, mentre il tasso di estinzione con l'aumento dell'area dell'isola, pertanto generando una famiglia di curve che forniscono uniche combinazioni di ricchezza, e di turnover, per la combinazione di ogni area e condizione di isolamento. Più l'isola è distante dalla terraferma, maggiore è la probabilità che nuove specie si presentino come risultato di una radiazione *in situ* piuttosto che immigrazione. Inoltre isole di differente dimensione o differente grado di isolamento possono avere lo stesso turnover o lo stesso numero di specie, ma non possono avere contemporaneamente sia uguale turnover e numero di specie (Whittaker

& Fernández-Palacios, 2007). Poichè sembra che la ricchezza in specie diminuisca con l'aumentare dell'isolamento, ambienti insulari sembrerebbero offrire più opportunità per la diversificazione e per l'adattamento, determinando un alto grado di endemismi (Carlquist, 1974; Case & Cody, 1987; Rosindell & Phillimore, 2011). Inoltre isole grandi e più vicine alla terraferma, sono più simili a quest'ultima per le condizioni ecologiche (come la ricchezza in specie) e per i caratteri degli organismi che le popolano (Heaney, 1978; Melton, 1982; Lomolino, 2005; Meiri *et al.*, 2005).

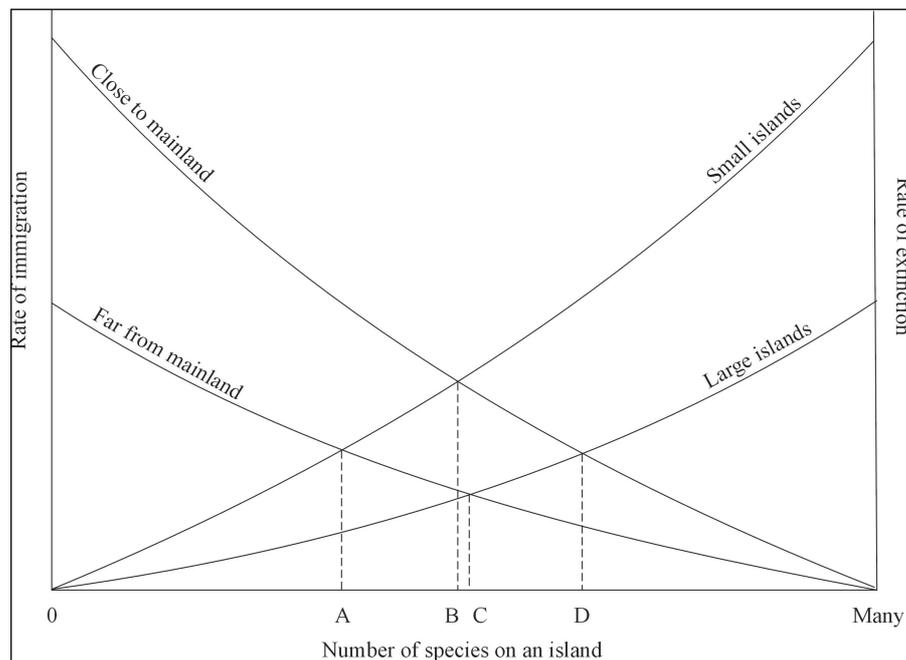


Figura 1.1: Modello di equilibrio della biogeografia insulare (EMIB) dove A, B, C e D rappresentano i diversi valori circa il numero di specie presenti su un'isola.

1.1.5 - La densità delle popolazioni sulle isole

Le specie sulle isole tendono ad avere una densità di popolazione più alta di circa un ordine di grandezza delle specie sulla vicina terraferma (MacArthur *et al.*, 1972; Blondel, 2000; Rodda & Dean-Bradley, 2002; Buckley & Jetz, 2007), questo fenomeno viene chiamato *compensazione della densità*. Il manifestarsi e il grado di *compensazione della densità* è variabile da specie a specie e da isola ad isola (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). La *compensazione della densità* è spesso legata ad una ridotta ricchezza complessiva dell'isola e indica il più delle volte una forma di rilascio competitivo ovvero quando una delle due specie che compete per una nicchia viene

rimossa, determinando così l'accrescimento dell'altra specie rimanente. Ciò, per esempio, è stato riscontrato da Crowell (1962) in uno studio comparativo sugli uccelli delle Bermuda e quelli di simili habitat della terraferma del Nord America. Durante tale studio Crowell osservò che la densità degli uccelli sulle isole Bermuda era più elevata della terraferma del 43%. Crowell dedusse che la densità di popolazione di una specie non era tanto legata al numero di altre specie presenti, ma alla presenza di poche specie competitive. Questa regolazione della densità può però a volte manifestarsi in misura apparentemente eccessiva, in questo caso viene definita *overcompensazione della densità* (Wright, 1980).

Per molte specie insulari in concomitanza con l'elevata densità di popolazione si osserva una maggiore dimensione del corpo. Ad esempio per alcuni vertebrati insulari (es. *Notechis scutatus* e *Podarcis gaigeae*) la densità di popolazione e la dimensione del corpo sono correlati alla presenza di uccelli marini, che attraverso l'accumulo di materiale fecale, avanzi di cibo e carcasse, aumentano la disponibilità di nutrienti sulle isole inducendo così anche un accrescimento della popolazione (Bonnet *et al.*, 2002; Pafilis *et al.*, 2009).

Per le lucertole sono noti diversi fattori che possono influenzare la loro densità, come la vegetazione presente sull'isola, i competitori (anche intraspecifici) e i predatori, il grado di "disturbo" da parte dell'uomo e l'abbondanza di cibo (MacArthur *et al.*, 1972; Case & Bolger, 1991; Rodda *et al.*, 2001; Pérez-Mellado *et al.*, 2008; Novosolov *et al.*, 2016).

Inoltre poichè la ricchezza di predatori e competitori aumenta con la dimensione dell'isola, generalmente si prevede che la densità di popolazione diminuisca con l'area dell'isola (Case, 1975; Rodda & Dean-Bradley, 2002; Lomolino *et al.*, 2010).

1.2 - Le regole e le sindromi

Le popolazioni di organismi insulari spesso sviluppano cambiamenti morfologici e comportamentali in breve tempo (Lister, 1989). Piccole piante erbacee assumono la forma di alberi, uccelli e insetti perdono la capacità di volare, e molte forme di vertebrati insulari diventano nane o giganti rispetto ai loro conspecifici della terraferma. Tutte queste variazioni sono state diversamente descritte come “regole” o “sindromi”:

- 1) La Regola Insulare
- 2) La Sindrome Insulare
- 3) La Sindrome Insulare Inversa

1.2.1 - La Regola Insulare

Nei mammiferi insulari, la variazione nelle dimensioni del corpo sembrava così “regolare” che Van Valen (1973) la definì la “Regola Insulare”. Nella prima versione, Foster (1964) ha descritto la Regola Insulare come un insieme di tendenze diverse tra i vari gruppi tassonomici; cioè verso il nanismo per i carnivori, lagomorfi (conigli e lepri), artiodattili (cervi e altri ungulati) e proboscidiati (elefanti) (Van der Geer *et al.*, 2010), e verso il gigantismo per i roditori, per gli insettivori (Van der Geer *et al.*, 2010) e forse anche per i marsupiali insulari. Più tardi, il modello è stato ancora reinterpretato come una tendenza graduale, all’interno dei taxa, che va dal gigantismo nelle specie di mammifero tipicamente più piccole, al nanismo nelle specie più grandi (Heaney, 1978; Lomolino, 1985).

Potenziati spiegazioni, includevano gli effetti delle risorse insulari limitate, la scarsità di competizione interspecifica e predazione (soprattutto quella dei grandi mammiferi, che sono spesso assenti nelle isole oceaniche).

1.2.2 - La Sindrome Insulare

Non solo la dimensione degli organismi cambia, ma anche aspetti comportamentali possono essere suscettibili a variazioni. Adler e Levins (1994), sulla base di studi empirici, costruirono un modello per i roditori, principalmente per topi e arvicole. Notarono che le popolazioni insulari erano caratterizzate da densità più alte e stabili,

una migliore sopravvivenza, un aumento della massa corporea e una ridotta aggressività, capacità riproduttiva e dispersione. Adler e Levins chiamarono queste differenze tra isola e terraferma “Sindrome Insulare” (IS) (in Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). McNab inoltre osservò che gli organismi affetti da Sindrome Insulare avevano un ridotto tasso metabolico e una propensione ad entrare in letargo, riducendo così il dispendio energetico (McNab, 2002). Adler e Levins collegarono la Sindrome Insulare ad una ridotta competizione interspecifica, ad una ridotta pressione predatoria, fattori tipici delle isole, alla dimensione e al grado di isolamento dell’isola stessa (isole piccole e lontane con maggior probabilità manifestano la IS) (Fig. 1.2).

Queste condizioni insulari, rendono pertanto adattativo investire più energia nella crescita piuttosto che nella riproduzione.

Inoltre in condizioni di sovraffollamento, adulti più grandi e prole di taglia maggiore, hanno più alta fitness e una maggiore probabilità di sopravvivenza (Shuster & Wade, 2003).

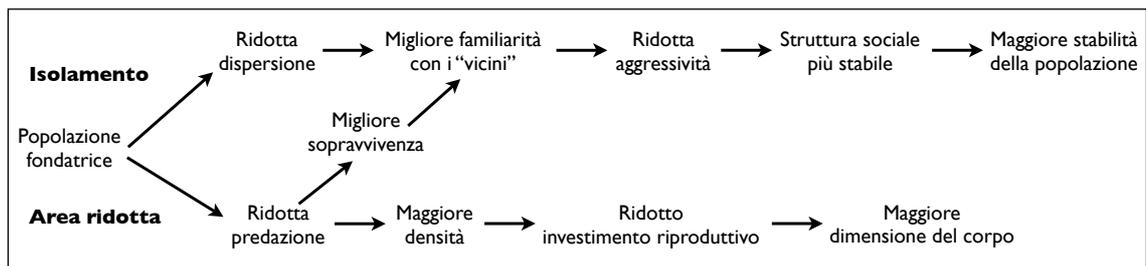


Figura 1.2: Schematizzazione degli effetti dell’isolamento e dell’ampiezza dell’isola sulle popolazioni di roditori secondo la Sindrome Insulare.

Sebbene la IS sia stata formulata per i roditori, sono state riscontrate alcune similitudini anche per i passeriformi e per i rettili.

I passeriformi insulari hanno evoluto un corpo più grande, un becco più largo, un minore dimorfismo sessuale e sono meno aggressivi verso i conspecifici. Inoltre, raggiungono la maturità sessuale tardi, depongono covate più piccole, con uova più grandi, vivono in condizioni di alta densità e sono più fedeli al loro habitat rispetto alle popolazioni della terraferma (in Blondel, 2000). Per quanto concerne i rettili, sulle isole spesso le lucertole mostrano una differente proporzione degli arti, gigantismo, ridotta aggressività e covate più piccole (Pafilis *et al.*, 2009; Pafilis *et al.*, 2011; Novosolov *et al.*, 2013).

1.2.3 - La Sindrome Insulare Inversa

Per spiegare le osservazioni in popolazioni insulari, di caratteri che non potevano essere riferibili alla Sindrome Insulare, ma che in molti casi erano addirittura opposti, recentemente è stata formulata una nuova ipotesi: la Sindrome Insulare Inversa (RIS) (Raia *et al.*, 2010; Monti *et al.*, 2013).

Le popolazioni su cui è stata descritta la RIS riguardano i lacertidi del genere *Podarcis*, e le variazioni osservate sono riferibili alla forma (spiccato dimorfismo del capo), alle dimensioni (grandi dimensioni corporee con lunghezza muso-cloaca 71 mm sull'isola vs 65 mm sulla terraferma), al colore (marcato melanismo) e al comportamento. Queste lucertole insulari sono, infatti, fameliche (le lucertole della terraferma si cibano ad intervalli di circa 7 minuti, mentre gli esemplari insulari ad intervalli di circa 3 minuti), sono aggressive a livello inter e intra-specifico, tendono ad anticipare e incrementare gli eventi riproduttivi rispetto alle conspecifiche della terraferma e investono maggiore energia in tale attività. Infatti le femmine depongono uova più grandi e i maschi hanno nel plasma più alti livelli di 5α -DHT dei conspecifici della terraferma.

Le osservazioni sulla RIS sono state interpretate come un adattamento atto a garantire un rapido e sicuro trasferimento del pool genico alla generazione successiva in condizioni ambientali imprevedibili. Gli effetti negativi di tale imprevedibilità ambientale erano evidenti dalle pronunciate fluttuazioni demografiche delle popolazioni esaminate.

Alla luce della sindrome inversa, probabilmente anche quanto osservato nei mammiferi insulari nani potrebbe trovare una spiegazione nel maggiore investimento riproduttivo (Roff, 2002).

In accordo con la Sindrome Insulare di Adler e Levins, la densità di popolazione è in genere alta e individui che investono più energia nella crescita sono favoriti perché hanno un rendimento migliore in competizioni territoriali e in conflitti per la scelta del partner (Case, 1978; Stamps & Buechner, 1985; Adler & Levins, 1994). Al contrario, la Sindrome Insulare Inversa, prevede che l'energia disponibile sia deviata dall'accrescimento alla riproduzione, perché il rischio di mortalità è elevato e imprevedibile.

Alcuni caratteri riferibili alla Sindrome Insulare Inversa sono stati riscontrati anche in altre popolazioni di lacertidi come quelle delle isole Izu (Hasegawa, 1990) e Skyros (Pafilis *et al.*, 2011).

1.2.3.1- Il marcato melanismo: un *flag* della RIS

La variazione cromatica è una delle diversificazioni fenotipiche degli animali più evidenti. In generale questa può essere promossa dalla selezione naturale, dalla selezione sessuale o dalla deriva genica (Panhuis *et al.*, 2001; Sobel *et al.*, 2010; Butlin *et al.*, 2012), mentre l'eterogeneità dell'habitat e l'isolamento geografico di solito contribuiscono a livello popolazionistico (Rundle & Nosil, 2005; Maan & Seehausen, 2011).

Nelle popolazioni naturali i pattern cromatici sono coinvolti in diversi processi biologici, come la termoregolazione (De Jong *et al.*, 1996; Forsman, 1997; Vences *et al.*, 2002; Reguera *et al.*, 2014), la comunicazione intraspecifica (Majerus, 1998) e per evitare la predazione (Thayer, 1909; Cott, 1940; Fulgione *et al.*, 2014) migliorando l'abilità mimetica (Jambrich & Jandzik, 2012). La forte melanizzazione può a volte servire anche come protezione ai raggi UV durante l'esposizione al sole (Reguera *et al.*, 2014).

Alcune prove dimostrano inoltre che la colorazione rappresenta un compromesso tra la selezione sessuale, per funzioni di segnalazione (ad esempio segnali sessuali/territoriali e per il riconoscimento delle specie), e la selezione naturale (Endler, 1978; Lythgoe, 1979; Andersson 1994; Houde, 1997; Espmark *et al.*, 2000; Dreher & Pröhl, 2014).

Diverse ipotesi sono state sviluppate per spiegare l'ipercromatismo e i suoi vantaggi selettivi nelle popolazioni insulari della comune lucertola campestre. Ad esempio Eimer nel 1874 ipotizzò che i tratti cromatici della lucertola di Capri (più precisamente del faraglione di Fuori, Scopolo) erano la conseguenza delle pressioni selettive ambientali (avevano funzione mimetica). Più tardi Kramer nel 1949 sostenne che l'ipercromatismo aveva funzione protettiva durante l'esposizione al sole. Ancora, nel 1950 Eisentraut ipotizzò che l'ipercromatismo era la conseguenza di una dieta prevalentemente vegetariana sulle isole, causando un aumento di pigmenti nelle cellule, invece Mertens (1963) e Lanza (1979) enfatizzarono che la pelle ipercromatica poteva avere un ruolo

importante nella termoregolazione, consentendo alle lucertole di ottimizzare il *time budget* durante il giorno.

E' importante ricordare che nei vertebrati la forte melanizzazione è spesso associata all'aumentata attività sessuale e aggressività (West & Packer, 2002; Roulin, 2004; Ducrest *et al.*, 2008). A tal proposito Ducrest *et al.*, (2008) suggerirono l'esistenza di una sindrome comportamentale derivante dagli effetti pleiotropici del gene propiomelanocortinico POMC, i cui prodotti, le melanocortine alfa, beta e gamma-MSH e ACTH, legano i recettori delle melanocortine (MC1-5R). Nei vertebrati POMC e i 5 recettori sono molto conservati e la loro distribuzione nei tessuti e la loro funzione sono simili tra le specie. I recettori MCR sono coinvolti nella regolazione della pigmentazione, aggressività, fameicità, attività sessuale, risposta immunitaria e nel bilanciamento del consumo energetico.

In recenti lavori (Raia *et al.*, 2010; Monti *et al.*, 2013; Fulgione *et al.*, 2015) condotti sulla popolazione di lacertidi per cui è stata descritta la RIS, è stato osservato che:

- non vi è alcuna correlazione tra il tipo di alimentazione e il colore della pelle dei lacertidi insulari;
- agisce una selezione neutrale sul gene MC1R (principale imputato nel processo di melanizzazione) sia negli esemplari insulari che della terraferma, indicando quindi che molto probabilmente la selezione per i colore non si verifica;
- vi è un'elevata espressione del gene MC1R, un'elevata concentrazione delle proteine MC3R e 4R e alti livelli plasmatici di alfa MSH negli esemplari insulari, dimostrando quindi una maggiore espressione del sistema melanocortinico.

Proprio l'aumentata attività del sistema melanocortinico, che sembra controllare i caratteri adattativi comportamentali e morfologici della RIS, induce il melanismo come effetto "collaterale", uno "spandrel". Pertanto si considera la colorazione blu come un *flag* che consente di rivelare facilmente la presenza della RIS.

1.3 - Scopo della tesi

Le varie sindromi insulari hanno evidenziato come la risposta alle pressioni selettive dell'ambiente insulare da parte di popolazioni naturali debba far riferimento a tempi e modi molto differenti da quelli registrati sulla terraferma. In alcuni casi è necessario sviluppare adattamenti in tempi relativamente brevi e non sempre le modalità possono essere tali da introdurre novità nel genoma delle nuove popolazioni, attendendo il vaglio della selezione naturale. Come è emerso per gli studi sulla Sindrome Insulare Inversa, per altro indagata in popolazioni relativamente giovani (le lucertole dell'isolotto di Licosa, quest'ultimo si sarebbe staccato dalla terraferma non più di 5000 anni fa), nei fenomeni di adattamento alle condizioni insulari il genoma risponde con variazioni di espressione piuttosto che con variazioni nelle sequenze codificanti.

La ricerca è stata condotta su tre popolazioni provenienti da contesti ecologicamente diversi: una popolazione della terraferma e due popolazioni insulari continentali. Un'isola di dimensioni relativamente grandi, capace di offrire condizioni ambientali simili alla terraferma prospiciente, una seconda isola invece di estensione ridotta e con una ridotta complessità ecologica.

Nello specifico la popolazione di lucertole della terraferma è stata campionata su Punta Campanella, quella dell'isola di maggiori dimensioni su Capri e la popolazione del faraglione di Fuori (Scopolo), l'isola più piccola, ha rappresentato la popolazione isolata presumibilmente sotto Sindrome.

Prima di avviare le indagini sul sistema scelto, sono state visitate e studiate 7 isole del Mediterraneo, di diversa dimensione e distanza dalla costa per meglio interpretare i risultati derivanti dal sistema scelto.

Nella prima fase della ricerca sul sistema selezionato, sono state studiate le caratteristiche delle tre popolazioni per identificare quale delle tre fosse affetta da sindrome. In una seconda fase sono state approfondite le caratteristiche fenotipiche e genetiche di questa popolazione sotto sindrome al fine di individuare il meccanismo adattativo coinvolto. Pertanto si è cercato di scoprire in che modo la popolazione insulare fosse capace di trovare le "soluzioni" alle particolari pressioni selettive che inducono la sindrome.

2. Materiali e Metodi



Attività di arrampicata e posizionamento dei modellini di plastilina

2.1 - Area di Studio

Il progetto si è incentrato sull'analisi di tre popolazioni di lacertidi presenti in tre diverse aree geografiche: Punta Campanella, l'isola di Capri e Scopolo (un faraglione di Capri) (Fig. 2.1; 2.2).

•**Punta Campanella**, è così chiamata l'estremità rocciosa della Penisola Sorrentina ($40^{\circ}34'47.3''N$, $14^{\circ}19'54.2''E$) che scende con ripido pendio sullo stretto braccio di mare tra il continente e l'isola di Capri (Fig. 2.1). Rappresenta l'elemento morfologico che collega il Golfo di Napoli a quello di Salerno. E' ubicata a circa 8 km da Sorrento e ricade nel comune di Massa Lubrense e nel comune di Positano. La popolazione di lucertola è ascrivibile a *Podarcis siculus* (Rafinesque, 1810).

•**Capri**, un'isola del Mar Tirreno ($40^{\circ}33'03.5''N$, $14^{\circ}13'35.4''E$) con un'estensione di 1,030 ettari e un'altezza massima di 589 metri. Situata nella parte meridionale del Golfo di Napoli, 5 km a ovest dell'estrema punta (Campanella) della Penisola Sorrentina (Fig. 2.1; 2.2). Anche qui è presente la comune lucertola *Podarcis siculus*.

•**Scopolo**, o faraglione di Fuori ($40^{\circ}32'24.31''N$, $14^{\circ}15'11.74''E$), è un isolotto a sviluppo verticale che raggiunge un'altezza di 104 metri, ha un'estensione di 0.76 ettari e una distanza da Capri di 153.40 metri tra cui si interpone il faraglione Stella (o faraglione di Mezzo) (Fig. 2.1; 2.2). Su quest'isolotto è stata distinta da Eimer (1872) una sottospecie nominata *P. siculus coeruleus* per l'intensa colorazione blu.

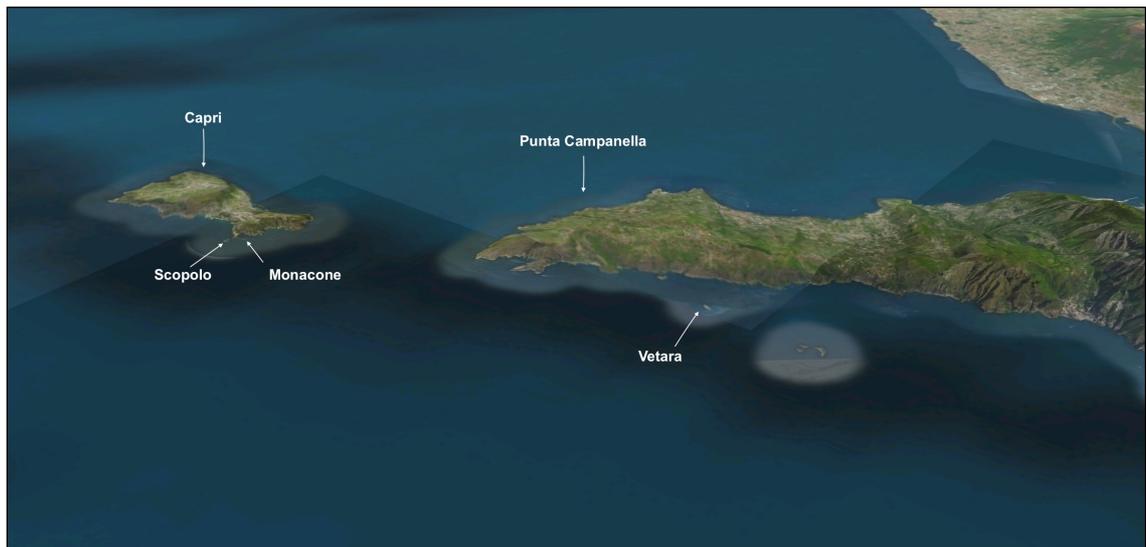


Figura 2.1: Punta Campanella, le isole considerate nello studio (Capri e Scopolo) e alcune di quelle utilizzate come comparazione (Vetara e lo Scoglio del Monacone).



Figura 2.2: L'isola di Capri con il faraglione Scopolo, il faraglione Stella e lo Scoglio del Monacone sulla sinistra.

Capri è un'isola stabile tettonicamente, come suggerito dall'altezza (6 ± 3 m sul livello del mare attuale) dell'ultima tacca interglaciale (LIg) (rappresenta il livello della marea intagliata nella costa rocciosa calcarea, in quanto durante l'ultimo periodo interglaciale, ~ 125,000 anni fa, il livello del mare aumentò di diversi metri rispetto allo stato attuale, con sostanziale variabilità osservata in diverse siti) (Ferranti *et al.*, 2006; Ferranti & Antonioli, 2007; Antonioli *et al.*, 2015).

A differenza delle altre isole partenopee, tutte di natura vulcanica, Capri ha origine sedimentaria e le rocce che ne costituiscono l'ossatura si sono in massima parte formate nel mare mesozoico come quelle della Penisola Sorrentina. A questo promontorio, di cui rappresenta l'estremo lembo occidentale, Capri è stata congiunta anche in tempi geologici non molto lontani facendosi risalire all'ultima regressione würmiana il più recente episodio di emersione dell'istmo di collegamento (Ricciardi, 1996).

Capri e Scopolo sono relativamente vicine alla terraferma Punta Campanella, da cui sono attualmente separate mediante uno stretto braccio di mare con una profondità di circa 80 metri (bocca piccola). Tale profondità conferma che queste isole sono state connesse alla terraferma durante l'ultima glaciazione; i tratti di terra che fungevano da collegamento sono stati poi progressivamente inondati in seguito all'innalzamento del livello del mare (Raia *et al.*, 2016). Infatti i faraglioni di Capri, esistevano come speroni di roccia prima dell'Olocene e ancor prima di 125 mila anni fa, quando la tacca LIg è stata scolpita su di essi. In seguito all'aumento del livello del mare, dopo l'ultimo massimo glaciale (circa 8-10 mila anni fa), i faraglioni hanno iniziato ad isolarsi dalla terraferma diventando così delle vere e proprie isole (Raia *et al.*, 2016).

2.1.1 - Altre isole

La scelta del sistema di studio sopra descritto è stata subordinata allo scopo della ricerca ma è anche stata preceduta da un'indagine su un sistema di isole più ampie (il faraglione Stella (NA) (Fig. 2.2), lo Scoglio del Monacone (NA) (Fig. 2.1; 2.2), Vetara (NA) (Fig. 2.1), Cirella (CS), Licosa (SA), Sa Mesalonga (OR) e Mal di Ventre (OR)) al fine di individuare le condizioni che potevano essere considerate ottimali per lo studio di popolazioni insulari affette e non da RIS.

Di seguito sono riportate le principali caratteristiche delle isole investigate per la valutazione del sistema di studio.

•**Il faraglione Stella**, o faraglione di Mezzo, raggiunge un'altezza di 81 metri ed ha un'area di 0.44 ettari. La sua distanza da Capri è di 79.76 metri e da Scopolo circa 20 metri (Fig. 2.2). Anche su questo isolotto è stata segnalata la sottospecie *P. siculus coeruleus*.

•**Scoglio del Monacone**, un altro faraglione che ha un'estensione di 0.5 ettari, è distante da Capri 90.14 metri ed è alto 40 metri sul livello del mare (Fig. 2.1; 2.2). La popolazione residente di lucertola è stata distinta come sottospecie *P. siculus monaconensis* (Eimer, 1881).

•**Vetara**, un'isola che si trova all'interno dell'Area Marina Protetta di Punta Campanella, nel golfo di Salerno (Fig. 2.1). Quest'isola si estende per 1.55 ettari, ha una distanza dalla corrispondente terraferma (Costiera Amalfitana) di circa 1,300 metri e un'altimetria di 36 metri sul livello del mare. La popolazione residente di lucertola è stata nominata *P. siculus salfii* (Lanza, 1954).

•**Cirella**, un'isola localizzata sul versante nord occidentale del Tirreno calabrese, in provincia di Cosenza. Ha una superficie di 6.29 ettari e raggiunge un'altezza massima di circa 40 metri. La distanza dalla vicina terraferma è di circa 684 metri. La popolazione residente di lucertola è stata assegnata alla specie nominale *P. siculus siculus* (Rafinesque, 1810).

•**Licosa**, è una piccola isola presente nel golfo di Salerno, nel comune di Castellabate in provincia di Salerno. Ha una superficie di 0.46 ettari e un'altezza massima di circa 5 metri. La distanza dalla vicina terraferma è di circa 350 metri. La popolazione residente di lucertola è stata distinta come *P. siculus klemmeri* (Lanza & Capolongo, 1972).

•**Sa Mesalonga**, un'isola della Sardegna, in provincia di Oristano, nella località di Putzu Idu, nel comune di San Vero Milis. Ha un'estensione di 0.6 ettari, una distanza dalla terraferma di circa 40 metri e un'altimetria di circa 1 metro. Nel visitare quest'isola abbiamo osservato caratteristiche riconducibili a molti altri isolotti che presentavano lucertole melaniche, essendo di ridotte dimensioni e vicina alla terraferma. Purtroppo non è stata rinvenuta alcuna specie di lacertide. Riportiamo questa informazione perchè potrebbe essere utile nelle considerazioni dei fattori selettivi e dell'imprevedibilità della sopravvivenza della popolazione.

•**Mal di Ventre**, un'isola della Sardegna, antistante la costa della penisola di Sinis, provincia di Oristano, è inclusa nel perimetro dell'Area Marina Protetta Penisola del Sinis. Ha un'estensione di 84.28 ettari e un'altezza di 18 metri. La distanza dalla costa prospiciente è di circa 7,150 metri. La popolazione residente di lucertola è stata nominata *P. siculus oristanensis* (Taddei, 1949).

In figura 2.3 si può osservare una distribuzione di tutte le isole visitate durante il periodo di ricerca, ordinate in base alla dimensione e alla distanza dalla costa. Nel grafico, il colore di ogni isola indica la presenza o meno (in blu o in grigio, rispettivamente) di lucertole melaniche, assumendo tale carattere come indice di sindrome insulare in accordo con Raia *et al.*, 2010 e Monti *et al.*, 2013.

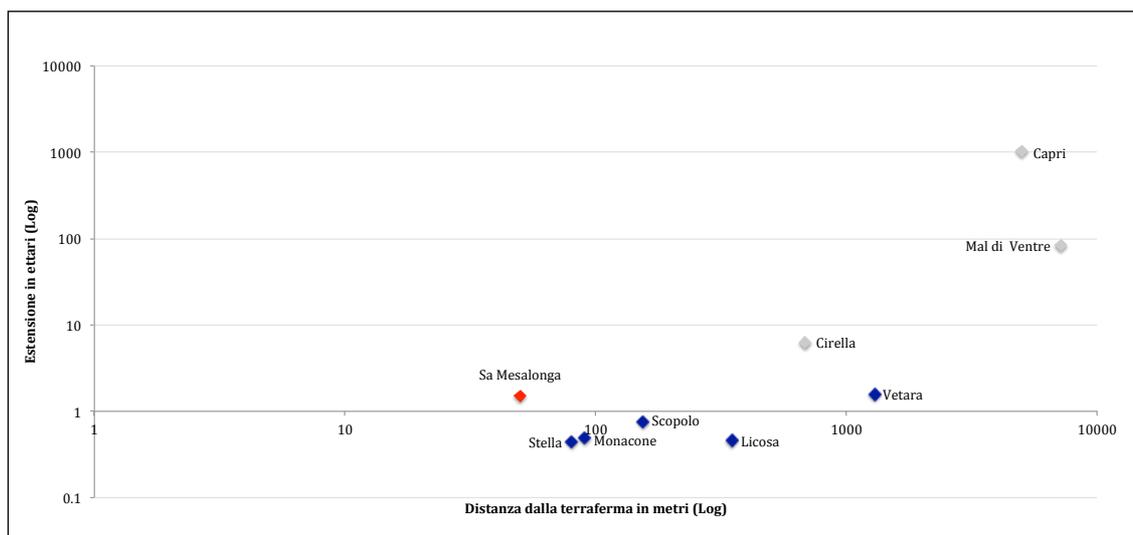


Figura 2.3: Distribuzione delle isole visitate per la scelta dell'area di studio, considerando la loro dimensione e la loro distanza dalla terraferma. L'isola di Sa Mesalonga è indicata in rosso in quanto su di essa non è stata ritrovata alcuna specie di lacertide.

Nella distribuzione di figura 2.3 si nota come la melanizzazione compaia preferenzialmente in isole piccole e vicine alla terraferma piuttosto che su grandi isole anche molto lontane, probabilmente le dimensioni dell'isola che incidono direttamente sulle variazioni ambientali imprevedibili, sono determinanti riguardo la pressione selettiva che agisce su queste isolette o scogli. Guardando il grafico, la scelta di Scopolo come isola potenzialmente affetta da sindrome e Capri come isola potenzialmente non affetta da sindrome, risulta pertanto la più adeguata.

2.2 - Raccolta dati in campo

Ancor prima di avviare l'attività di campionamento, è stato necessario richiedere un'autorizzazione al Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (Prot. 0013996 del 14/07/2015), per poter svolgere l'attività di studio e di ricerca scientifica nelle aree di indagine da noi scelte e sulla specie *Podarcis siculus*, in quanto specie di importanza comunitaria (Allegato IV Direttiva Habitat).

Il raggiungimento delle aree di studio non sempre è stato semplice, alcune di queste hanno richiesto campi molto impegnativi, con diverse giornate di attività. Per alcune isole, quelle più impervie, è stato necessario operare in collaborazione con alpinisti professionisti, ad esempio per il campionamento sui faraglioni dell'isola di Capri in cui si è dovuto lavorare in arrampicata.

La raccolta dati in campo ha previsto lo svolgimento di diverse attività:

- Cattura dei lacertidi;
- Fotografia, codificazione, misurazioni morfometriche e prelievo di tessuto;
- Analisi spettrofotometrica della pelle;
- Valutazione dell'aggressività intraspecifica;
- Analisi del carico parassitario e della pressione predatoria;
- Valutazione della complessità insulare e delle condizioni climatiche presenti sulle isole.

2.2.1 - Cattura

Per la cattura sono state utilizzate due diverse metodologie non invasive, in quanto non sempre le condizioni insulari hanno consentito l'uso della stessa tecnica.

1) Il Cappio, consiste nell'utilizzo di una canna in carbonio flessibile al cui apice viene applicato un piccolo cappio realizzato con filo in fibra di 0.3 mm di diametro (Fig. 2.4a).

2) Le Trappole Sherman, (di solito usate per micromammiferi) sono dotate di un sistema a scatto sensibile al peso dell'animale, che viene attirato al suo interno con un attrattore alimentare (Fig. 2.4b). Le trappole sono state alloggiare in luoghi non soleggiati in

modo da evitare la morte dell'esemplare durante le ore più calde. Per evitare che potessero essere danneggiate da parte di altri animali presenti sulle isole, le trappole sono state posizionate in luoghi non facilmente visibili e ricoperte con della vegetazione al fine di mimetizzarle con l'ambiente circostante.

Una volta catturate, le lucertole sono state mantenute singolarmente in sacchetti di tela fino alle prime misurazioni eseguite in campo. Dei 250 individui previsti dall'autorizzazione ministeriale, circa 74 sono stati trasportati nello stabulario come previsto dalla procedura (Prot. 0013996 del 14/07/2015). Durante la stabulazione gli esemplari sono stati monitorati giornalmente. Un'eventuale esemplare deceduto è stato immediatamente sezionato in ogni sua parte, e tutti gli organi interni ed esterni (pelle e muscoli) sono stati conservati a -80°C per successive analisi genetiche. Di questi esemplari 6 rientrano nell'analisi del trascrittoma, descritta in seguito. Successivamente alle analisi eseguite in laboratorio, constatato che le condizioni fisiche dei lacertidi fossero idonee al loro reinserimento in natura, questi sono stati rilasciati nei siti di cattura.

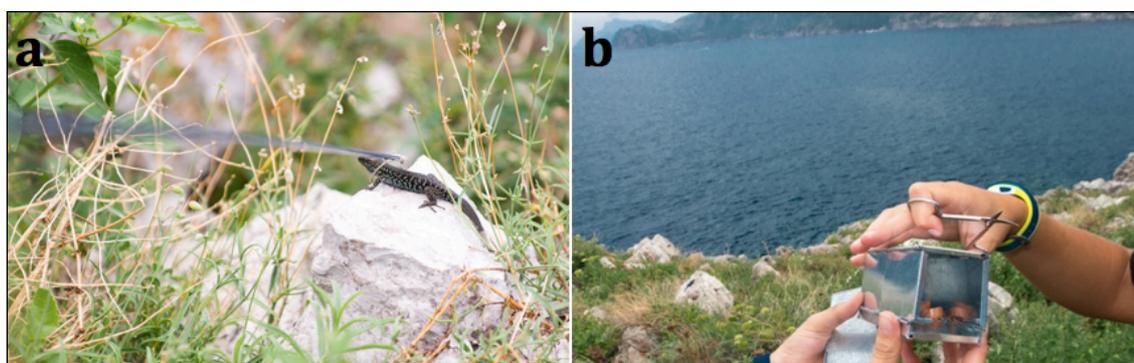


Figura 2.4: Sistemi di cattura: a) il Cappio; b) la Trappola Scherman.

2.2.2 - Fotografia, codificazione, misurazioni morfometriche e prelievo di tessuto

Gli esemplari catturati, una volta associatogli il codice alfa-numerico (rappresentativo del luogo di cattura e dell'individuo), sono stati fotografati su carta millimetrata, per la costruzione di un archivio fotografico utile per ricavare tratti distintivi di difficile interpretazione immediata. Per ogni campione è stata compilata una tabella contenente diversi campi informativi, come: sesso, la lunghezza del tronco, il peso, le dimensioni del capo, la lunghezza degli arti posteriori e la distanza che intercorre tra l'inserzione sul tronco degli arti anteriori e quella degli arti posteriori. Le misurazioni sono state

effettuate con un calibro elettronico (Fig. 2.5). In tabella 1 sono riportati i parametri biometrici considerati, riferibili alla figura 2.6.



Figura 2.5: Misurazione della larghezza del capo di una lucertola mediante l'utilizzo del calibro elettronico.

Per ogni individuo catturato è stato effettuato un microprelievo di tessuto (tips di coda, a volte ottenuto mediante autotomia) che è stato poi utilizzato per le successive analisi molecolari. Tutti gli esemplari accidentalmente deceduti durante i campionamenti, sono stati conservati in azoto liquido e trasportati in laboratorio.

Tabella 1: Parametri biometrici misurati.

Capo	SP	larghezza massima delle squame parietali
	LMT	larghezza massima del capo
	AT	altezza massima del capo
	RO	lunghezza massima del <i>pileus</i> , dalla squama rostrale alla squama occipitale
Zampa anteriore	AG	lunghezza compresa tra l'attaccatura della zampa anteriore ed il gomito
	GD	lunghezza compresa tra il gomito e la commessura tra il quarto e il quinto dito della zampa anteriore
	DAM	lunghezza del quarto dito della zampa anteriore

Zampa posteriore	CS	lunghezza della zampa, dal margine interno della fila dei pori femorali al ginocchio
	ZP	lunghezza dello zigopodio della zampa posteriore, dal ginocchio al calcagno
	T	lunghezza del tarso, dal calcagno alla commessura tra il secondo e il terzo dito
Tronco	AI	distanza ascella-inguine, dal margine posteriore dell'attaccatura della zampa anteriore al margine posteriore della fila dei pori femorali del medesimo lato
	MC	distanza muso-cloaca, dalla squama rostrale all'apertura cloacale

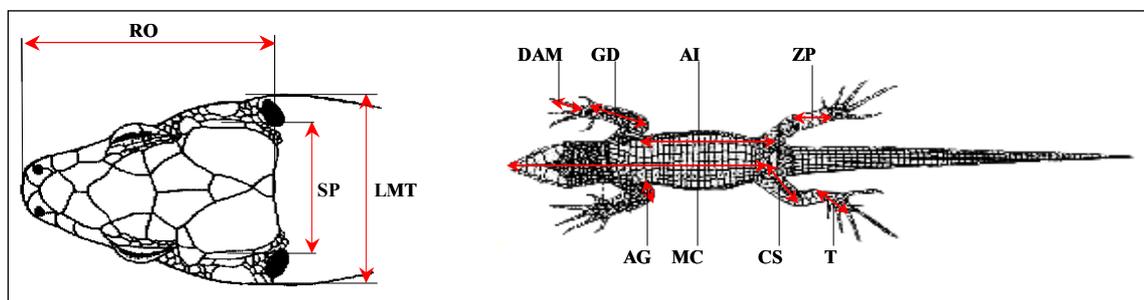


Figura 2.6: Rappresentazione grafica dei parametri biometrici valutati.

2.2.3 - Analisi spettrofotometrica della pelle

La melanizzazione nei lacertidi, e in particolare in *Podarcis*, si traduce spesso in un ipercromatismo del blu o del verde. Molte delle popolazioni insulari sono contraddistinte da questo carattere e la sua misurazione oggettiva deve necessariamente essere fatta con metodi spettrofotometrici.

Come dimostrato da precedenti studi (Shekar *et al.*, 2008), la riflettanza è uno dei migliori metodi indiretti per quantificare oggettivamente il livello di melanizzazione della pelle. La percentuale di riflettanza (R[%]) è intesa come il rapporto tra l'intensità della luce che colpisce la superficie e quella che quest'ultima riflette. Questa, calcolata per ogni lunghezza d'onda nel visibile, definisce il comportamento spettrale della superficie in esame.

Per quantificare il diverso melanismo della porzione ventrale delle lucertole è stato utilizzato lo spettrofotometro AvaSpec 2048 (Avantes), ponendo la sonda dello strumento perpendicolare alla superficie del corpo degli animali (Fig. 2.7) e rilevando i

valori di riflettanza in un range compreso tra i 380 e i 700 nm. Il diametro dell'estremità della sonda copre una superficie più piccola (0.2 mm) di una singola squama. Le misurazioni spettrofotometriche sono state effettuate su 5 diverse regioni ventrali del corpo (gola, tra gli arti anteriori, ventre, tra gli arti posteriori e coda). Tutte le misurazioni sono state espresse in relazione ad una piastrella bianca di riferimento (WS2; Avantes).



Figura 2.7: Misurazione spettrofotometrica eseguita sulla regione ventrale della gola di una lucertola.

I dati ottenuti sono stati successivamente elaborati con il software AvaSoft 8 con il quale è stato possibile calcolare l'integrale (I) dell'area sottostante le 5 curve di riflettanza ottenute per ciascun campione (Delgido *et al.*, 2010; Fulgione *et al.*, 2014). Per ogni individuo è stata poi effettuata una media dei diversi valori degli integrali ottenuti.

2.2.4 - Valutazione dell'aggressività intraspecifica

L'aggressività dei lacertidi presenti nelle tre aree di studio: Punta Campanella, Capri e Scopolo, è stata valutata mediante osservazioni in campo che sono state eseguite tra la fine dell'inverno e l'inizio dell'autunno (da Febbraio a Novembre), quando le lucertole in Sud Italia sono in piena attività (Foà *et al.*, 1994). Tali osservazioni sono state così svolte: ciascuna area di studio è stata divisa in diversi e non limitrofi plot sperimentali

di circa 10 metri quadrati, sono state condotte osservazioni di circa un'ora da una postazione fissa. Ogni plot è stato visitato una sola volta. Nel corso delle osservazioni sono state contate le interazioni aggressive intraspecifiche, considerando non solo i combattimenti ma anche i display aggressivi.

2.2.5 - Analisi del carico parassitario e della pressione predatoria

Il carico parassitario può rappresentare un buon indicatore delle pressioni selettive che agiscono sulle popolazioni naturali (Richner *et al.*, 1993), capace di influenzare la sopravvivenza degli animali e determinare l'insorgenza di particolari adattamenti fenotipici.

Per stimare l'intensità di tale pressione selettiva, per ogni individuo appartenente alle diverse popolazioni, è stato eseguito un prelievo degli ectoparassiti (ordine Acarina) con un metodo non invasivo, utilizzando strisce di nastro adesivo (Fig. 2.8). Il nastro adesivo è stato applicato in corrispondenza delle regioni corporee delle lucertole maggiormente infestate dai parassiti, come la gola, tra gli arti anteriori, il ventre e il dorso. La striscia di adesivo è stata successivamente fissata ad un vetrino portaoggetti che è stato poi osservato in dettaglio e con gli appropriati ingrandimenti al microscopio e allo stereomicroscopio. In questo modo è stata eseguita un'analisi quantitativa, discriminando il numero di parassiti presenti per campione.



Figura 2.8: Applicazione del nastro adesivo sul ventre di una lucertola per valutare il suo carico parassitario.

L'intensità della predazione può spesso cambiare tra isole e terraferma e rappresenta pertanto un'importante pressione selettiva da considerare nello studio della storia evolutiva delle animali insulari, in quanto può influenzare ad esempio la loro densità e la loro grandezza (Case, 1978; Adler & Levins, 1994; Rodda *et al.*, 2001; Losos *et al.*, 2004; Novosolov *et al.*, 2016).

Per stimare la frequenza degli attacchi predatori interspecifici sono stati utilizzati dei modellini di lucertole di plastilina (Fig. 2.9). La consistenza di tali modellini permette una buona “leggibilità” delle tracce lasciate da eventuali predatori e di conseguenza, ne facilita l'identificazione a posteriori (Lo Cascio & Corti, 2008).

I modellini sono stati posizionati in ugual numero (40) sulle isole e su un'area della loro terraferma prospiciente di estensione simile. Il colore dei modellini variava a seconda delle caratteristiche cromatiche della popolazione in esame.

Dopo aver distribuito i modellini in luoghi ben visibili ad eventuali predatori aerei e terrestri, è stata lasciata l'area di studio in modo da non disturbare i potenziali predatori e 24 ore dopo si è ritornati a raccogliere tali modellini.

E' stato considerato come “modellino attaccato”, il modellino che presentava evidenti segni di predazione o quando risultava scomparso (Vervust *et al.*, 2007). Successivamente i modellini sono stati analizzati allo stereomicroscopio per osservare nel dettaglio i segni di predazione che avevano subito.

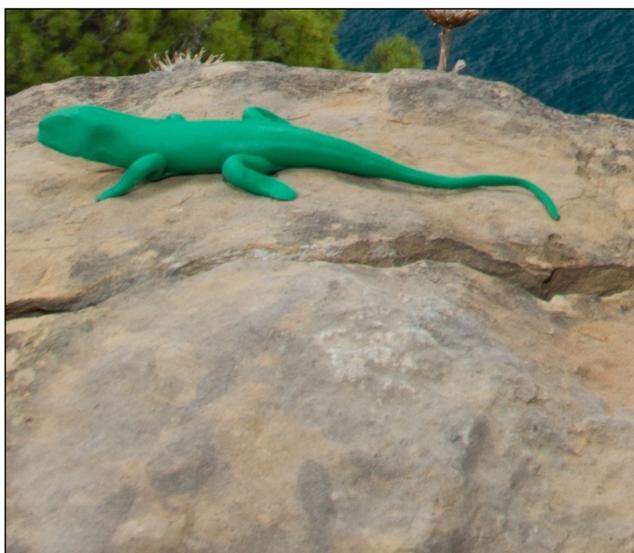


Figura 2.9: Modellino di lucertola di plastilina.

2.2.6 - Valutazione della complessità insulare e delle condizioni climatiche presenti sulle isole

Per determinare la complessità della comunità insulare, sono stati adottati vari strumenti di indagine indiretta e osservazioni dirette. Tra questi, sono state posizionate in più punti, in modo da coprire l'intera area di studio, 10 videotrappole con sensore PIR che sono state lasciate attive, in nostra assenza, per almeno 24 ore.

Il videotrappolaggio è una tecnica frequentemente utilizzata per il monitoraggio faunistico e ambientale. Basato su sistemi autonomi e indipendenti di ripresa foto e video, le videotrappole sono in grado di funzionare anche al buio, sono inoltre dotate di un sensore interno che attiva automaticamente la videocamera al passaggio di un soggetto. Ogni dato che viene registrato è poi archiviato su una scheda di memoria SD.

Questa metodologia ha consentito di osservare anche animali attivi prevalentemente di notte, nonché di confermare eventuali dati relativi alla predazione e all'aggressività dei lacertidi.

Ai dati delle videotrappole sono state affiancate le informazioni degli appunti di campo raccolte durante le attività di cattura e le informazioni della letteratura su ogni specifica isola.

Per l'analisi delle condizioni climatiche, anch'esse considerate come importanti fattori ambientali che spesso differiscono tra isola e terraferma, e che pertanto possono influenzare la vita degli animali insulari, sono stati utilizzati i data-logger. Quest'ultimi sono utili per monitorare la temperatura e l'umidità dell'ambiente in cui vengono posizionati grazie a dei sensori ed un sistema di registrazione dati. I data-logger sono stati posizionati in siti non soleggiati e per evitare il danneggiamento da parte degli animali sono stati posti in luoghi non facilmente visibili. Le misurazioni registrate per ogni isola sono state poi confrontate con quelle della terraferma prospiciente registrate durante lo stesso intervallo di tempo.

2.3 - Analisi molecolari

I reperti raccolti in campo e dagli esemplari stabulati, sono risultati utili per sviluppare un'intensa attività di laboratorio, che ha previsto lo svolgimento di diverse metodologie, come:

- Analisi dei polimorfismi nella regione codificante del gene MC1R;
- Analisi dell'espressione genica differenziale del gene MC1R mediante real time-PCR;
- Analisi del trascrittoma (RNA-Seq) mediante tecnologia Illumina HiSeq 2500;
- Estrazione e sequenziamento del DNA mitocondriale.

2.3.1 - Analisi dei polimorfismi nella regione codificante del gene MC1R

Un marcatore molecolare della variazione osservata relativamente al cromatismo, è il gene MC1R (recettore della melanocortina 1), il principale responsabile della melanizzazione della pelle (Takeuchi *et al.*, 1996; Theron *et al.*, 2001; Rosenblum *et al.*, 2004; Mundy, 2005; Kingsley *et al.*, 2009; Raia *et al.*, 2010).

Di solito i differenti melanismi osservabili nel mondo animale sono legati o a mutazioni nella regione codificante del gene MC1R o ad alterazioni nella produzione dei suoi ligandi (*MSH*) o dei suoi antagonisti (*ASiP*) o ad una sua differente espressione (Robbins *et al.*, 1993; Klungland *et al.*, 1995; Marklund *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1996; Våge *et al.*, 1997; Rieder *et al.*, 2001; Eizirik *et al.*, 2003).

Per tale scopo è stato effettuato il sequenziamento dell'intera regione codificante di questo gene, seguendo il seguente protocollo:

- Estrazione DNA da tessuto (tips di coda) utilizzando il kit QIAGEN DNeasy extraction;
- Amplificazione del gene MC1R mediante PCR;
- Sequenziamento della regione codificante del gene.

Estrazione DNA da tessuto

Il DNA è stato estratto dal tessuto (tips di coda di circa 25 mg) dei lacertidi appartenenti alle popolazioni di Scopolo e di Punta Campanella, utilizzando il kit QIAGEN DNeasy extraction e seguendo le istruzioni della casa produttrice. Successivamente il DNA è stato valutato quantitativamente e qualitativamente rispettivamente al Nanodrop 2000 e mediante corsa elettroforetica in gel di Agarosio all'1%.

Amplificazione del gene MC1R

Per amplificare una regione genica di circa 1500 bp (comprendente le regioni UTR) è stato eseguito il protocollo di PCR descritto nella tabella 2 utilizzando la seguente coppia di primer: MC1R-5' Pol-F (5'-CTCACAGCTCTGTTTGAGACATC-3') e MC1R-3' Pol-R (5'-CAGGTGCAGCAACATTTTCC-3') (Raia *et al.*, 2010). La PCR è stata condotta in un volume finale di 20 µl e utilizzando campioni di DNA concentrati circa 100 ng.

Tabella 2: Reagenti utilizzati per l'amplificazione di una regione di 1500 bp del gene MC1R.

Reagenti	Volume
Tris Buffer (comprendente MgCl ₂) 4X	4 µl
dNTP (ogni dNTP 2.5 mM)	1.6 µl
primer MC1R-5' Pol-F (50 µM)	0.2 µl
primer MC1R-3' Pol-R (50 µM)	0.2 µl
DNA polimerasi <i>Pfu</i> (Thermo Scientific)	0.2 µl
H ₂ O sterile Milli-Q	a volume

Il profilo di amplificazione utilizzato è il seguente:

1° step	98°C per 3 minuti
35 cicli	98°C per 10 secondi
	66°C per 30 secondi

	72°C per 1 minuto
2° step	72°C per 5 minuti

Al termine dell'amplificazione i campioni sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di Agarosio all'1.5 % per verificare l'efficienza della reazione.

Sequenziamento della regione codificante del gene MC1R

Successivamente alla reazione di amplificazione, i prodotti di PCR sono stati purificati da eventuali dimeri di primer, dNTP, DNA superavvolto e residui di proteine ancora presenti, utilizzando il metodo enzimatico che prevede l'utilizzo di due enzimi, l'Exo I, un'esonucleasi che degrada il DNA a singolo filamento in direzione 3'-5', e l'enzima Fap (*Fast Alkaline Phosphatase*) (Thermo Scientific) che catalizza il rilascio di gruppi fosfati 5' e 3'. A seguito dell'aggiunta degli enzimi, i campioni di amplificazione sono stati incubati a 37°C per 30 minuti e 85°C per 15 minuti. I campioni purificati sono stati sottoposti a reazioni di sequenza utilizzando la chimica dei BigDye Terminator (Applied Biosystems), successivamente sono stati purificati utilizzando le colonnine spin AutoSeq G-50 (Amersham) e analizzati con il sequenziatore automatico ABI 3100 (Perkin-Elmer Genetic Analyzer). Infine i cromatogrammi prodotti sono stati assemblati ed esaminati utilizzando il software Geneious (v 5.4.3) (Biomatters, disponibile su <http://www.geneious.com/>).

2.3.2 - Analisi dell'espressione genica differenziale del gene MC1R mediante real time-PCR

Per indagare i livelli di espressione del gene MC1R è stato eseguito il seguente protocollo sperimentale:

- Estrazione di RNA da tessuto (pelle della regione ventrale) mediante l'utilizzo del Trizol;
- Retrotrascrizione dell'RNA mediante la QuantiTec® Reverse Trascrizione (QIAGEN);

- Real time-PCR eseguendo il protocollo previsto dalla SYBER® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa) e utilizzando il macchinario Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Estrazione RNA da tessuto

Per l'estrazione di RNA dal tessuto degli esemplari appartenenti alle popolazioni di Punta Campanella, Capri e Scopolo, è stato necessario lavorare in condizioni di massima sterilità per evitare la facile degradazione dell'RNA; inoltre visto l'utilizzo di reagenti tossici è stato obbligatorio eseguire tutte le operazioni sotto cappa chimica.

Il protocollo utilizzato sfrutta come reagente il Trizol, una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, il quale durante la fase di omogenizzazione del tessuto consente di mantenere integro l'RNA, mentre distrugge le cellule e solubilizza i componenti cellulari (Simms *et al.*, 1993). Tale metodica richiede che il peso del tessuto da cui si effettua l'estrazione rientri in un range di 0.05g-0.1g. Il tessuto prelevato è stato sminuzzato e posto in una provetta da 2 ml sterile. Successivamente sono state aggiunte nella stessa provetta due palline di tungsteno e 1 ml di Trizol. Per favorire la degradazione del tessuto, la provetta è stata posta all'interno del Tissue Lyser (Qiagen) per circa 1 ora con un'oscillazione di 50 Hz. Successivamente è stata eseguita una centrifugata di 15 minuti a 4°C e 11000 rpm, in seguito è stato prelevato il surnatante e trasferito in una nuova provetta sterile da 2 ml all'interno della quale sono stati aggiunti 200 µl di Cloroformio. Dopo aver agitato la provetta manualmente, quest'ultima è stata posta a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente è stata eseguita una centrifugata di 15 minuti a 4°C e 11000 rpm. La fase acquosa incolore, contenente RNA, è stata prelevata e trasferita in una nuova provetta da 1.5 ml all'interno della quale sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo. Dopo aver agitato la provetta manualmente, quest'ultima è stata posta a temperatura ambiente per 15 minuti e poi è stata collocata in centrifuga per 15 minuti sempre a 4°C e 11000 rpm per consentire la formazione del pellet di RNA. Successivamente è stato rimosso il surnatante, ed è stato aggiunto, nella stessa provetta, 1 ml di etanolo al 75%. Il campione è stato lasciato overnight a 4 °C. Il giorno successivo, a seguito di una centrifugata di 1 ora a 4°C e 11000 rpm, è stato rimosso l'etanolo e il pellet è stato essiccato mediante l'utilizzo della silice. In seguito l'RNA è stato risospeso in 50 µl di H₂O RNase-Free e incubato a 60°C per circa 15 minuti. Infine l'RNA estratto è stato valutato qualitativamente e

quantitativamente con l'Agilent Bioanalyzer 2100 e con il Nanodrop 2000 rispettivamente.

Retrotrascrizione dell'RNA

L'utilizzo del kit QuantiTec® Reverse Trascrizione (QIAGEN) consente di eseguire un'efficiente retrotrascrizione dell'RNA e un'effettiva eliminazione del DNA genomico la cui presenza può inficiare le analisi successive.

Sono stati utilizzati in questa fase sperimentale per ogni campione, una quantità totale di RNA pari a 1000 ng e con valori di purezza elevati ($260/280 = 1.8$; $260/230 > 1.5$), a cui sono stati aggiunti 2 μ l di gDNA Wipeout Buffer 7X e H₂O RNase-Free per arrivare ad un volume totale di 14 μ l.

I campioni sono stati incubati nel termociclatore a 42°C per 2 minuti. Questa fase ha consentito la rimozione del DNA.

Successivamente è stata eseguita la reazione di retrotrascrizione aggiungendo ad ogni campione i seguenti componenti:

- 1 μ l di Quantiscript Reverse Transcriptase (contenente gli inibitori dell'RNase);
- 4 μ l di Quantiscript RT Buffer (5X) (comprendente Mg²⁺ e dNTPs);
- 1 μ l di RT Primer Mix.

Arrivando così ad un volume finale di 20 μ l.

I campioni sono stati infine incubati nel termociclatore utilizzando il seguente programma:

1° STEP 42°C per 15 minuti

2° STEP 95°C per 3 minuti (per inattivare l'enzima di retrotrascrizione)

HOLD 4°C.

Real time-PCR

La real time-PCR, denominata anche PCR quantitativa, è impiegata in un numero sempre maggiore di analisi, come nella quantificazione dell'espressione genica, nella discriminazione allelica e nella validazione di dati microarray. E' un metodo che simultaneamente amplifica e quantifica il DNA in tempo reale, ancor prima che la

riduzione dei reagenti, l'accumulo degli inibitori e l'inattivazione della polimerasi abbiano iniziato ad influenzare l'efficienza dell'amplificazione.

Nel nostro caso è stata eseguita una real time sul gene MC1R per valutarne la differente espressione genica nelle tre popolazioni studiate. La quantità del trascritto d'interesse è stata normalizzata rispetto alla quantità del trascritto di un gene housekeeping, il gene per la β -actina, già testato in altri lavori (Raia *et al.*, 2010; Fulgione *et al.*, 2015). Per quest'analisi è stato utilizzato il protocollo previsto dalla SYBER® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa). Ciascun campione è stato analizzato in duplicato e per ogni reazione (con i primer per MC1R e per la β -actina) sono stati inclusi i controlli negativi in cui il cDNA è stato sostituito con acqua Milli-Q.

La coppia di primer per il gene MC1R amplificano un tratto di 101 bp (*coding region* dalla posizione nucleotidica 275 alle posizione 375):

- 1) MC1R-F (5'-TGGAGACCCTCTTCATGCTTCT-3')
- 2) MC1R-R (5'-GCTGCAGATCAGCATGTCCA-3')

La coppia di primer per il gene dell'actina amplificano un tratto di 104 bp:

- 1) β -ACTINA F (5'-GATCTGGCACCACACCTTCT-3')
- 2) β -ACTINA R (5'-TCTTTTCTCTGTTGGCTTTGG-3')

La PCR è stata condotta in un volume finale di 25 μ l. Nelle tabelle 3 e 4 sono riportate le concentrazioni e le quantità dei componenti utilizzati per singolo campione e per le due diverse coppie di primer.

Tabella 3: Reagenti utilizzati per il gene MC1R.

Reagenti	Volume	Concentrazione finale
SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus) 2X	12.5 μ l	1X
Primer MC1R forward 10 μ M	1 μ l	0.4 μ M
Primer MC1R reverse 10 μ M	1 μ l	0.4 μ M
cDNA	2.5 μ l	
H ₂ O sterile Milli-Q	8 μ l	

Tabella 4: Reagenti utilizzati per il gene β -ACTINA.

Reagenti	Volume	Concentrazione finale
SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus) 2X	12.5 μ l	1X
Primer β -ACTINA forward 10 μ M	1 μ l	0.4 μ M
Primer β -ACTINA reverse 10 μ M	1 μ l	0.4 μ M
cDNA	2.5 μ l	
H ₂ O sterile Milli-Q	8 μ l	

I campioni sono stati amplificati con il termociclatore Rotor-Gene Q utilizzando il seguente profilo di real time-PCR:

1 step	95°C per 30 secondi
45 cicli	95°C per 15 secondi
	60°C per 30 secondi
	72°C per 20 secondi

La curva di reazione ottenuta, si è presentata come un diagramma sigmoide di amplificazione, in cui l'intensità di fluorescenza era espressa in funzione dei cicli di amplificazione.

Al termine dell'amplificazione è stata eseguita un'analisi della curva di dissociazione (Melting Curve) utile per confermare la specificità della reazione e che non si siano formati dimeri di primer, che potrebbero compromettere la quantificazione del prodotto amplificato.

L'analisi quantitativa della reazione di real time-PCR è stata eseguita utilizzando il metodo 2 ($-\Delta\Delta C/T$) (Livak & Schmittgen, 2001).

2.3.3 - Analisi del trascrittoma (RNA-Seq) mediante tecnologia Illumina HiSeq 2500

L'analisi trascrittomica è stata sviluppata sulla popolazione di Scopolo e della terraferma, utilizzando due tessuti di riferimento, i testicoli e il cervello.

Sull'mRNA dei due tessuti target è stato eseguito un sequenziamento di nuova generazione (RNA-Seq). Questa tecnologia ha una vasta gamma di applicazioni, tra cui la scoperta di nuovi geni coinvolti nei processi adattativi, il rilevamento di eventi di splicing alternativi, l'analisi di un'espressione genica differenziale, l'identificazione di varianti come gli SNPs (Polimorfismi a Singolo Nucleotide) ed eventi di editing post-trascrizionali (Wang *et al.*, 2009; Oszolak & Milos, 2011). L'RNA-Seq consiste nel selezionare una popolazione di RNA da studiare (totale o frazionata), questa viene convertita in una libreria di frammenti di cDNA. Ogni molecola, con o senza amplificazione, viene poi sequenziata in alta processività (attraverso un approccio di Next Generation Sequencing (NGS)) per ottenere sequenze nucleotidiche (reads) generalmente di lunghezza variabile (le reads sono tipicamente di 30-400 bp, a seconda della tecnologia di sequencing utilizzata). Il sequenziamento può avvenire solo ad una estremità (sequenziamento single-end) o da entrambe le estremità (sequenziamento paired-end). Il sequenziamento paired end è molto utile per produrre due reads associate tra di loro e derivanti da una regione di conosciuta lunghezza permettendo di effettuare analisi in silico più precise e performanti. Dopo la fase di sequenziamento, le reads, attraverso tecniche in silico, vengono sottoposte a controlli di qualità e processate per rimuovere errori di sequenza, contaminazioni ed artefatti dovuti alla tecnologia NGS utilizzata. Il "subset" filtrato di reads viene poi utilizzato per assemblare (ricostruire) gli RNA originali e per valutarne la loro abbondanza, attraverso un "conteggio di espressione" (Martin & Wang, 2011).

Le strategie di "assembly" del trascrittoma sono varie:

- strategia guidata da un genoma di referenza;
- strategia *de novo*;
- strategia "ibrido".

Quando si ha a disposizione un genoma di riferimento della specie in esame o di specie affini a quella di interesse, le reads prodotte vengono allineate al genoma. Le reads che si sovrappongono ad un certo locus genico vengono raggruppate e si costruisce così un grafico che rappresenta tutte le possibili isoforme per quel gene. I vantaggi di questa strategia sono:

- eventuali artefatti prodotti durante il sequenziamento non inficeranno sull'analisi, perché non si allineeranno al genoma di riferimento;
- è una tecnica molto sensibile, che può rilevare anche geni poco espressi;

- eventuali lacune nelle sequenze possono essere riempite usando la sequenza di riferimento.

Gli svantaggi sono:

- il successo dell'assembly dipende dalla qualità del genoma di riferimento (non sempre della stessa specie di interesse);
- molti genomi contengono delezioni che possono portare a trascrittomi parzialmente assemblati.

(Martin & Wang, 2011).

Quando nessun genoma di riferimento è disponibile, il trascrittoma può essere assemblato *de novo* attraverso software che assemblano milioni di reads usando l'approccio de Bruijn graph (Fig. 2.10). Per costruire un grafo di de Bruijn, tutte le reads sono divise in segmenti sovrapposti di lunghezza k (k -meri), ogni k -mero costituisce un nodo, un arco diretto esiste fra due nodi a e b se a (tolta la prima base) è prefisso di b e b (tolta l'ultima base) è suffisso di a (ad es. $a=acgtctgact$ e $b=cgtctgactg$). L'assembly si ottiene eliminando eventuali errori (es. bolle, ovvero percorsi che iniziano e finiscono nello stesso nodo, connessioni spurie ecc...) e cercando un percorso euleriano nel grafo, ovvero passando per ogni arco una sola volta.

Tuttavia, l'analisi di espressione differenziale su un trascrittoma assemblato *de novo* è impegnativa, perché sono riportati più contig (sequenze di trascritti) per gene, in quanto i programmi che assemblano il trascrittoma non riescono a distinguere tra isoforme dello stesso gene, e le riportano ognuna separatamente (Davidson & Oshlack, 2014).

Uno dei vantaggi dell'RNA-seq rispetto alla tecnologia usata precedentemente, come i microarray, è che permette l'analisi dell'intero trascrittoma anche di organismi non-modello, proprio perché il genoma di riferimento non è necessario per la generazione e l'analisi dei dati (Martin & Wang, 2011).

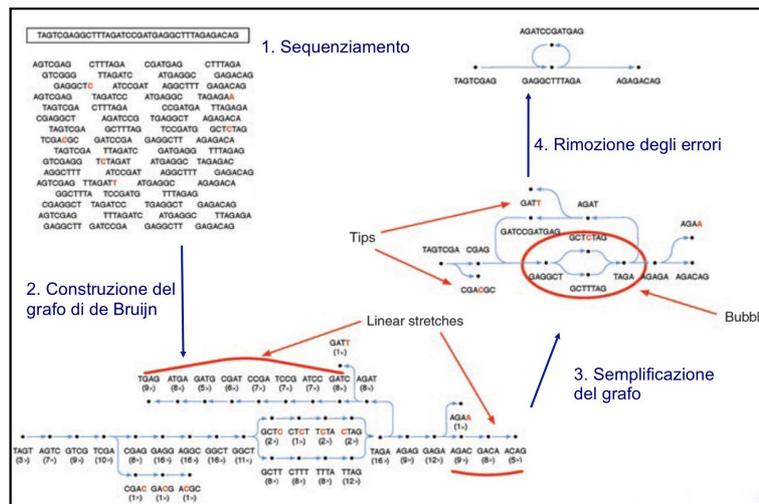


Figura 2.10: Assembly delle reads utilizzando l'approccio de Bruijn graph.

Invece la strategia “ibrido” consiste nell'unire entrambe le tecniche sopra menzionate, in due possibili modi:

- Allineamento e poi assembly: quando si ha un buon genoma di riferimento si inizia ad allineare i dati al genoma e poi si assemblano le reads che non si è riusciti ad allineare con il metodo “*de novo*”.
- Assembly e poi allineamento: quando il genoma di riferimento non è della specie di interesse, ma di una specie affine e non è di buona qualità, si esegue prima l'assembly *de novo* e successivamente si fa un allineamento dei contig al genoma di riferimento. Lacune tra i frammenti dello stesso trascritto possono essere unite facendo riferimento al genoma in questione (Martin & Wang, 2011).

Nel nostro caso abbiamo eseguito una strategia *de novo* per assemblare i due trascrittomi, che ha previsto il seguente protocollo:

- Estrazione di RNA da due tessuti target (cervello e testicoli) per 3 individui di ciascuna popolazione;
- Costruzione di librerie indicizzate e sequenziamento su piattaforma Illumina HiSeq 2500 (eseguito dai laboratori della Genomix4Life S.r.l. di Salerno);
- Pulizia delle reads e assembly dei trascrittomi con metodologia *de novo*;
- Filtraggio degli assembly e annotazione funzionale;
- Analisi degli SNPs;
- Analisi dell'espressione differenziale di geni target della Sindrome Insulare Inversa.

Le ultime 4 fasi sono state effettuate in collaborazione con la società Sequentia Biotech SL di Barcellona.

Estrazione RNA da tessuto

E' stato deciso di lavorare in triplicato in quanto questo numero di repliche rappresenta un buon compromesso per ottenere dati statisticamente affidabili, considerando una popolazione difficile da campionare, come quella di Scopolo. Nello specifico il dato ottenuto per ciascuna popolazione (Scopolo e Punta Campanella) è il risultato dell'RNA estratto da 3 esemplari maschi della stessa età. L'età degli esemplari è stata stimata considerando la distanza muso-cloaca in accordo con il tasso di crescita definito mediante scheletrocronologia (si veda in aggiunta la metodologia nel materiale supplementare di Raia *et al.*, 2010). Sono stati considerati i maschi adulti perchè sono facilmente distinguibili dagli esemplari giovani e perchè gran parte dei caratteri della RIS sono stati descritti per i lacertidi maschi.

Sono stati scelti come tessuti il cervello e i testicoli in quanto, il primo esprime uno dei trascrittomi più complessi tra tutti gli organi dei vertebrati e regola gran parte dei caratteri comportamentali, mentre il secondo tessuto esprime maggiormente, rispetto agli altri organi, geni legati alla riproduzione e all'aggressività, che sono i principali caratteri distintivi delle popolazioni insulari con Sindrome.

Il protocollo utilizzato sfrutta come reagente il Trizol e prevede le stesse procedure precedentemente esposte per l'analisi dell'espressione differenziale del gene MC1R.

L'RNA estratto è stato successivamente valutato per quantità e qualità con il Nanodrop 2000 e con l'Agilent Bioanalyzer 2100.

Costruzione di librerie indicizzate e sequenziamento su piattaforma Illumina HiSeq 2500

Librerie indicizzate sono state costruite a partire da 1 µg di RNA purificato per ogni campione, usando il kit TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kits (Illumina) e seguendo le istruzioni del produttore. Le librerie sono state quantificate utilizzando il Bioanalyzer 2100 (Agilent) e unite in modo che ogni campione indicizzato fosse presente in quantità equimolari, con una concentrazione finale di 2 nM. I campioni

pullati sono stati poi soggetti alla generazione di un cluster e sequenziati, usando il sistema Illumina HiSeq 2500 ed effettuando un paired-end di 2x100 cicli ad una concentrazione finale di 8 pmol.

Pulizia delle reads ed assembly dei trascrittomi con metodologia *de novo*

La qualità delle reads ottenute è stata valutata utilizzando il software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Successivamente i dati illumina (FASTQ), sono stati filtrati mediante l'utilizzo del programma Trimmomatic (v 0.33) (Bolger *et al.*, 2014) con il quale è stato possibile rimuovere gli adattatori dalle sequenze e tutti gli eventuali artefatti creatisi, che possono alterare le fasi successive di assembly.

Il processo di filtraggio, ovvero il Trimming è stato eseguito sia all'estremità 5' che 3' delle reads, eliminando basi che avevano un Phred-like score inferiore a 35 e le prime 10 basi dell'estremità 5' delle reads; solo le reads di lunghezza minima 35 nucleotidi sono state conservate. Le reads accoppiate sono state processate simultaneamente, mentre le reads orfane sono state rimosse. Le reads ad alta qualità sono state utilizzate per eseguire l'assembly dopo il processo di normalizzazione eseguito con Trinity (v 2.1.1) (Grabherr *et al.*, 2011). La normalizzazione delle reads è un processo molto importante in quanto riduce la ridondanza del dataset rendendo pertanto le analisi più veloci e aumentando la qualità degli assembly.

L'assembly delle sequenze è stato effettuato usando Transabyss (v.1.5.3) (Robertson *et al.*, 2010) e Trinity (v 2.1.1) (Grabherr *et al.*, 2011), scartando i trascritti che erano più corti di 250 bp. Questi due programmi si sono rivelati utili per produrre assembly di buona qualità con reads corte. Sia Transabyss che Trinity sono stati settati per eseguire assembly strend-specifici: il set di Trinity è stato impostato secondo i seguenti parametri: --min_kmer_cov 2, --min_per_id_same_path 95 e --max_diffs_same_path 4, il set di Transabyss è stato impostato con la seguente opzione: --pid 0.9. La resa dei trascritti è risultata molto variabile, come atteso in funzione dei livelli di espressione genica, non è stata quindi scelta una lunghezza prestabilita di Kmer che può fornire un assembly del trascrittoma ottimale (Surget-Groba & Montoya-Burgos, 2010). Trascritti altamente espressi sono stati assemblati meglio con alti Kmer, mentre quei pochi espressi sono stati assemblati con maggiore efficacia con Kmer basso. Per questo

motivo il set di Kmer con Trasabyss è stato impostato a 25, 48 e 71. Successivamente gli assembly sono stati uniti producendo così un unico non ridondante set di contig con Transabyss-merge. Gli assembly sono stati eseguiti separatamente per ogni campione. Ogni assembly è stato poi analizzato con Transrate (v 1.0.1) (Smith-Unna *et al.*, 2015) insieme con le reads, per calcolare le statistiche dell'assembly e filtrare possibili artefatti. I trascritti di ogni assembly che superavano il filtro Transrate sono stati poi uniti con Transabyss-merge e successivamente “ri-filtrati” con cd-hit-est, per ridurre ulteriormente la ridondanza. Ottenendo in fine i due distinti trascrittomi delle popolazioni considerate.

Filtraggio degli assembly e annotazione funzionale

Per rimuovere possibili contaminanti dai trascrittomi assemblati, le sequenze sono state mappate (v 2.2.30) contro il database nucleotidico di NCBI (l'e-value minimo è stato settato a 0.1 e un max-target-seqs di 1). I risultati BLAST ottenuti sono stati poi filtrati considerando solo le sequenze con un rapporto della lunghezza allineamento/trascritto più alto del 20%. E' stata ottenuta la classificazione tassonomica di ogni BLAST hit, e tutti i trascritti con un hit il cui taxa non era incluso nei Sauri sono stati scartati dall'assembly.

Le possibili proteine codificate dai trascritti assemblati sono state identificate usando il software Transdecoder (v 2.0.1) (Haas *et al.*, 2013). E' stato usato lo strumento LongOrfs per identificare tutte le possibili sequenze proteiche con una lunghezza maggiore di 50 aa in maniera strand-specifica. Le sequenze recuperate sono state analizzate usando blastp nel database di NCBI e HMMScan (v 3.1b2) (Mistry *et al.*, 2013) nel database PFAM di dominio del Modello di Hidden Markov. I risultati di entrambe le analisi sono stati usati come input per lo strumento Transdecoder Predict, per ottenere così un dataset finale delle proteine.

La classificazione Gene Ontology (GO) è stata eseguita usando Interproscan (v 5) (Quevillon *et al.*, 2005) sulle sequenze proteiche predette con PFAM e PANTHER come database di riferimento. I trascritti contenenti elementi ripetitivi sono stati identificati usando RepeatMasker versione 4.0.5 (Smit *et al.*, 1996-2010). Quest'ultimo è stato utilizzato nella modalità di default con rmbblastn versione 2.2.25+, le specie query sono state categorizzate come “altri vertebrati”.

Analisi degli SNPs

Per studiare la variabilità espressa a livello di SNPs tra la popolazione insulare e della terraferma, è stata eseguita un'analisi del *Variant calling*.

Le reads di ogni campione sono state mappate contro il trascrittoma di riferimento (terraferma) usando il software STAR (v 020201) (Dobin *et al.*, 2013). Per identificare gli SNPs, i file BAM ottenuti sono stati analizzati con la pipeline SUPER (v 1.0) (Sanseverino *et al.*, 2015). Sono stati considerati solo gli SNPs che sono stati confermati da almeno 6 reads e con un livello di qualità superiore a 30.

Successivamente è stata eseguita una Gene Ontology Enrichment Analysis (GOEA) dei geni polimorfici proprio per conoscere la funzione dei geni maggiormente colpiti dagli SNPs ed è stato calcolato il rapporto transizioni/transversioni per ogni trascritto contenente SNPs.

Analisi dell'espressione differenziale di geni target della Sindrome Insulare Inversa

Gli individui sotto RIS hanno una maggiore resistenza agli stressor (condizioni ambientali stressanti come l'alterata relazione preda-predatore, le densità insolite della popolazione, le condizioni climatiche estreme, il carico parassitario e l'esistenza a volte di patologie), sono più aggressivi e sessualmente attivi, sono di dimensioni maggiori e più voraci rispetto ai loro conspecifici della terraferma.

Per cogliere eventuali variazioni a livello di espressione genica è stato deciso di indagare un cluster di geni la cui azione, almeno in via teorica, è direttamente implicata in cambiamenti che possono essere ricondotti alla RIS. Si tratta di geni i cui trascritti possono agire a livello della immunocompetenza, della crescita corporea, della famelicità, dei comportamenti aggressivi e riproduttivi:

- MHC1, il Complesso Maggiore di Istocompatibilità di Classe 1, è coinvolto nelle risposte ai fattori di stress cellulari. Può giocare un ruolo importante nell'immunità innata o nell'induzione delle risposte immunitarie (Janeway *et al.*, 2001);
- Le Ig sono tipiche dei sistemi di risposta immunitaria adattativa di tutti i vertebrati, sono state infatti ritrovate nei pesci, negli anfibi, nei rettili, negli uccelli e nei mammiferi (Litman *et al.*, 1999; Flajnik, 2002). Queste molecole sono in generale responsabili della difesa degli animali contro le infezioni e gli agenti patogeni (Leslie

- & Clem, 1972; Faith & Clem, 1973; Marchanolis, 1977; Fella *et al.*, 1993; Flajnik *et al.*, 2003; Gambòn-Deza & Espinel, 2008);
- sempre per la risposta immunitaria è stato indagato anche il gene coinvolto della via di segnalazione mediata dai recettori Toll, questi ultimi infatti sono impegnati nella risposta immunitaria innata (Medzhitov, 2001; Takeda & Akira, 2005); il gene legato all'attivazione delle cellule Mast che sono attive nella difesa dell'organismo contro agenti patogeni (Urb & Sheppard, 2012); il gene che codifica per la Catelicidina BF, il primo peptide antimicrobico ad essere stato identificato nei rettili (Wang *et al.*, 2011); il gene coinvolto nella maturazione del fagosoma, un vacuolo intracitoplasmatico attivo nella fagocitosi, con il quale le cellule del sistema immunitario degradano materiale estraneo (Kagan & Iwasaki, 2012); e infine, più in generale, i geni che sono impegnati nella risposta immunitaria e nella risposta agli stress ossidativi;
 - NPY, il Neuropeptide Y, è probabilmente il peptide più studiato nel sistema centrale dell'alimentazione (Jensen, 2001). NPY stimola l'appetito nei rettili, come è stato visto nel serpente giarrettiera testa rossa, *Thamnophis sirtalis paretalis* (Morris & Crews, 1990);
 - Leptina, un ormone proteico codificato dal gene obeso (Ob) e generalmente secreto dagli adipociti. Questo ormone fornisce informazioni ai recettori centrali che controllano il peso del corpo (Friedman & Halaas, 1998). Alcuni studi hanno dimostrato che la leptina è espressa anche in altri tessuti, come il cervello (Morash *et al.*, 1999; Morash *et al.*, 2001);
 - PCNA, Antigene Nucleare di Proliferazione Cellulare, gioca un ruolo essenziale nella fase mitotica dell'epitelio germinale (Chieffi *et al.*, 2001);
 - StAR, proteina Regolatore della Steroidogenesi Acuta, ha un ruolo nella regolazione acuta della sintesi degli ormoni steroidei, consentendo la conversione del colesterolo a pregnenolone. StAR è una proteina mitocondriale che regola la produzione acuta di steroidi nel surrene e nelle gonadi rispettivamente in risposta alla corticotropina e all'ormone luteinizzante (Stocco, 2001);
 - geni coinvolti nel Metabolismo del Colesterolo, uno dei principali precursori del testosterone, pertanto questi geni possono essere associati alla maggiore aggressività e attività sessuale;
 - geni impegnati nella Proliferazione Cellulare e nella sua regolazione, che potrebbero essere correlati alle maggiori dimensioni corporee.

Per valutare l'espressione genica, è stato usato il programma RSEM (v 1.2.30) (Li & Dewey, 2011) con il quale sono state mappate le reads trimmate contro il trascrittoma della terraferma. Nello specifico sono state usate le seguenti opzioni per effettuare questa analisi: "--bowtie2--bowtie2-sensitivity-level very_sensitive --forward-prob 0". Gli effettivi count ottenuti sono stati usati per un'analisi dell'espressione differenziale con EBSeq (v 1.8.0) (Leng *et al.*, 2013), usando la normalizzazione TMM dei raw data. E' stata eseguita una Gene Ontology Enrichment Analysis su una lista di trascritti differenzialmente espressi usando l'annotazione della terraferma e script elaborati dalla stessa società Sequentia Biotech. Nello specifico un test ipergeometrico è stato effettuato per identificare categorie significativamente arricchite con GO (FDR ≤ 0.05 dopo una correzione BH dei valori di p -value). I possibili trascritti legati ai geni sopra citati, sono stati identificati effettuando una ricerca BLASTn (v 2.2.30+) (Camacho *et al.*, 2009) contro il trascrittoma assemblato per la terraferma. I risultati del BLAST sono stati poi filtrati in modo da ottenere solo quelli che avevano una percentuale di lunghezza di allineamento superiore al 50% del query e superiore del 30% dell'hit (e-value ≤ 0.05).

2.3.4 - Estrazione e sequenziamento del DNA mitocondriale

Il DNA mitocondriale (mtDNA) rappresenta uno strumento molto utilizzato per gli studi evolutivi; è usato per analisi di struttura di popolazione, per analisi di flusso genico, per la risoluzione di problematiche filogeografiche o riguardanti le ricostruzioni filetiche di specie e popolazioni.

In questo lavoro è stato deciso di effettuare il sequenziamento dell'intero mtDNA delle popolazioni di lucertola del faraglione Scopolo, dell'isola di Capri e di Punta Campanella, per poter indagare le modalità e i tempi con cui il cambiamento ha interessato, nello specifico, la popolazione di Scopolo.

L'mtDNA è una molecola di DNA circolare a doppio filamento, che possiede diverse proprietà che lo rendono un marcatore molecolare molto utilizzato, come:

- è presente in numerose copie nelle cellule;
- è un marcatore molecolare uniparentale, ovvero è ereditato esclusivamente per via materna;
- è facilmente isolabile;

- non subisce ricombinazione (Brown *et al.*, 1979);
- è una molecola piuttosto conservata tra i vertebrati. L'evoluzione dei geni mitocondriali varia da regione a regione: i geni del DNA ribosomale sono altamente conservati e possono essere utilizzati per analisi filogenetiche di taxa superiori fino ai phyla, la regione non codificante detta *control region* (contenente il D-loop e l'origine di replicazione) è molto più variabile non essendo soggetta a pressione selettiva e viene perciò usata in studi sulla struttura di popolazioni.

Per questo studio, la procedura di analisi dell'intero mtDNA delle 3 popolazioni di lacertidi, ha previsto il seguente protocollo:

- Estrazione del mtDNA da tessuto mediante l'utilizzo del kit PureLink HiPure Plasmid DNA Purification (Invitrogen);
- Sequenziamento su piattaforma Illumina HiSeq 2500 (eseguito dai laboratori della Genomix4Life S.r.l. di Salerno);
- Pulizia delle reads ed assembly dei mtDNA;
- Valutazione dei tassi di mutazione dN, dS e dN-dS;
- *Divergence Time*.

Estrazione del mtDNA da tessuto

E' stato utilizzato per l'estrazione del mtDNA da tessuto, un convenzionale kit per miniprep (PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kits (Invitrogen)), in accordo con quanto descritto in Quispe-Tintaya *et al.*, (2013).

Per ciascuna popolazione sono stati utilizzati 4 esemplari. 0.1 grammo di tessuto (tips di coda) è stato degradato in 400 µl di Resuspension Buffer contenente RNaseA, utilizzando 2 palline di tungsteno e usando lo strumento Tissue Lyser con un'oscillazione di 50 Hz per circa 1 ora.

I campioni così omogeneizzati sono stati centrifugati per 30 secondi a temperatura ambiente a 1000 g. In seguito, 400 µl di Lysis Buffer (precedentemente riscaldato in bagnetto termostato a 37°C) sono stati aggiunti a ciascun campione che è stato successivamente agitato manualmente e posto a temperatura ambiente per 5 minuti. In seguito 400 µl di Precipitation Buffer sono stati incorporati.

Una centrifugata a temperatura ambiente per 10 minuti a 14000 g è stata eseguita. Il surnatante trasparente così ottenuto è stato trasferito nelle colonnine HiPure Mini Column (precedentemente equilibrate con 2 ml di Equilibration Buffer). Successivamente sono stati eseguiti 3 lavaggi con 833 µl di Wash Buffer. In seguito, l'mtDNA eluito con 900 µl di Elution Buffer, è stato recuperato in tubi sterili da 1.5 ml. Dopo, 630 µl di Isopropanolo sono stati aggiunti ai campioni che sono stati agitati manualmente e centrifugati a 4°C per 30 minuti a 14000 g. Il surnatante ottenuto è stato eliminato, ed è stato aggiunto a ciascun campione 1 ml di Etanolo al 70%. Dopo aver agitato manualmente i campioni, questi sono stati centrifugati a 4°C per 5 minuti a 14000 g. Il surnatante è stato ancora una volta rimosso ed eventuali residui sono stati eliminati per evaporazione lasciando le provette aperte a temperatura ambiente per circa 10 minuti. Infine l'mtDNA è stato risospeso in 50 µl di H₂O RNase-Free.

La valutazione quantitativa dell'mtDNA estratto è stata eseguita al Nanodrop 2000, mentre l'analisi qualitativa è stata effettuata utilizzando il sistema Agilent 4200 TapeStation.

Sequenziamento su piattaforma Illumina HiSeq 2500

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS) del mtDNA completo è stato eseguito facendo uso della piattaforma Illumina HiSeq 2500. I campioni sono stati preparati per tale scopo utilizzando il protocollo Nextera XT DNA, in accordo con le istruzioni della casa produttrice.

Pulizia delle reads ed assembly dei mtDNA

La qualità delle reads ottenute è stata valutata utilizzando il software FastQC (v 0.11.4) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Successivamente i dati (FASTQ), sono stati filtrati mediante l'utilizzo del programma Trimmomatic (v 0.36) (Bolger *et al.*, 2014) con il quale è stato possibile rimuovere gli adattatori dalle sequenze e tutti gli eventuali artefatti creatisi, che possono alterare le fasi successive di assembly. Il processo di filtraggio, ovvero il Trimming è stato eseguito sia all'estremità 5' che 3' delle reads, eliminando basi che avevano un Phred-like score inferiore a 35, le

prime 10 basi dell'estremità 5' delle reads sono state eliminate e solo le reads di lunghezza minima 35 nucleotidi sono state conservate.

Per l'assembly delle reads di ciascun campione è stato utilizzato il software Geneious (v R9.1) (Biomatters, disponibile su <http://www.geneious.com/>) e il genoma completo mitocondriale di 17,297 bp di *Podarcis siculus* (NCBI: NC_011609.1).

Valutazione dei tassi di mutazione dN, dS e dN-dS

Le sequenze nucleotidiche di DNA mitocondriale linearizzato sono state elaborate con il software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Durante questa indagine tutte le posizioni nucleotidiche contenenti gaps o dati mancanti, sono state eliminate.

Sulla base di ricostruzioni filogenetiche ottenute con il metodo di Maximum Likelihood (ML), utilizzando i modelli MG (Muse & Gaut, 1994) e HKY (Hasegawa-Kishino-Yano, 1985), è stato stimato per ciascun codone il numero di sostituzioni sinonime (s) e non sinonime (n), che sono stati poi rapportati rispettivamente al numero di potenziali siti sinonimi (S) e non sinonimi (N), determinando così s/S e n/N . Le stime ML sono state eseguite utilizzando il software HyPhy (Pond *et al.*, 2004).

Il test statistico dN-dS, dove dN è il numero di sostituzioni non sinonime per sito (n/N) e dS è il numero di sostituzioni sinonime per sito (s/S), rappresenta un utile strumento per poter identificare codoni sotto selezione positiva. Valori positivi del test, indicano che c'è un'abbondanza di sostituzioni non-sinonime, quindi molto probabilmente sta agendo una selezione positiva, invece, valori negativi indicano con molta probabilità che sul codone sta agendo una selezione neutrale.

La normalizzazione dei valori del test è stata ottenuta utilizzando il numero totale di sostituzioni presenti nell'albero.

Divergence Time

Nella storia degli studi di filogenesi molecolare, in una prima fase i dati sembravano indicare che i geni e i loro prodotti proteici evolvevano con tassi costanti nel tempo e tra le differenti linee evolutive (Page & Holmes, 1998; Avise, 2000; Ho & Duchene, 2014). Pertanto, se la diversità genetica si accumulava in modo regolare con il passare del tempo, allora era possibile determinare i tempi di divergenza tra le linee filetiche anche

in assenza di reperti fossili. Questa è stata indicata come ipotesi dell'orologio molecolare (Zuckerkandl & Pauling, 1962-1965), inizialmente riferita alle proteine, in quanto intorno agli anni 60' vi erano ancora poche informazioni sul DNA.

Successivamente, studi condotti da Kimura e Ohta (1971), da Fitch (1976) e da Gillespie e Langley (1979), suggerirono che l'ipotesi dell'orologio molecolare proteico non poteva trovare applicazione per la maggior parte delle proteine, sia negli studi fra vertebrati che fra invertebrati, in quanto proteine diverse evolvevano con tassi molto diversi. Pertanto venne esclusa la possibilità di considerare un orologio proteico universale.

Successivamente, intorno agli anni 80', con lo sviluppo di nuove tecniche molecolari, e il sequenziamento di molti geni, l'idea dell'orologio molecolare fu applicata anche al DNA. Tuttavia, anche per il DNA, si osservarono differenze nei tassi di mutazione all'interno e tra le specie a causa di numerosi fattori tra cui differenze nel tasso metabolico, variazioni di efficienza di riparazione del DNA e differenze nei tempi di esposizione ad agenti mutageni (Martin & Palumbi, 1993) e i tempi di generazione.

Nonostante ciò il *molecular clock* ancora oggi fornisce stime temporali sui modelli dei cambiamenti evolutivi, oltre a fornire chiarimenti per ulteriori analisi biologiche.

Tutti gli orologi molecolari devono essere calibrati utilizzando informazioni temporali indipendenti in modo che possono produrre stime dei tempi in assoluto, piuttosto che relative. Le calibrazioni sono solitamente basate sui reperti fossili o sui dati geologici, e la loro scelta può influenzare le stime dei tempi evolutivi (Ho & Phillips, 2009; Inoue *et al.*, 2010; Parham *et al.*, 2012; Hipsley & Müller, 2014). Il *genetic divergence time* non sempre però è compatibile con i tempi geologici stimati; gli evoluzionisti spesso usano l'età delle isole o l'epoca della colonizzazione per calibrare l'orologio molecolare (Zamudio & Greene, 1997).

Il tasso di mutazione del DNA mitocondriale per i lacertidi è pari a 5.29×10^{-9} (Eo & DeWoody, 2010), questa stima non è stata comunque necessaria perché, essendo il nostro obiettivo la velocità di cambiamento mitogenomico verificatosi per la popolazione di Scopolo, abbiamo scelto di calibrare la velocità di cambiamento sulla base dei tempi di separazione di Punta Campanella da Capri. Tra i tre siti considerati esistono stime geologiche riguardo i tempi di separazione delle terre (Lambeck *et al.*, 2011). Le statistiche di *genetic divergence time* sono state elaborate per:

1) i mtDNA completi;

- 2) le sole regioni codificanti dei mtDNA;
- 3) le sole regioni non codificanti dei mtDNA.

Le analisi del *divergence time* sono state riferite alle topologie degli alberi filogenetici che legano le tre popolazioni costruite con il software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) utilizzando il metodo Neighbor joining e il modello Kimura 2-p.

L'analisi del TimeTree è stata eseguita con il software MEGA 7, in cui, per tutti i punti di ramificazione di un albero è stato stimato il *divergence time* utilizzando un approccio che si basa sul metodo RelTime (Tamura *et al.*, 2012) che non richiede ipotesi per le variazioni dei tassi tra i vari lignaggi. Con questo approccio possono essere forniti più limiti per la calibrazione, in tal caso il software MEGA produrrà *divergence time* assoluti e relativi, rispettando i limiti impostati.

L'affidabilità degli alberi ottenuti è stata valutata con 1000 repliche di bootstrap (Felsenstein, 1985). Gli alberi sono stati radicati utilizzando come outgroup la sequenza NC_011609.1 quando le elaborazioni sono state effettuate usando le sequenze complete dei mtDNA, e la sequenza di un campione di Punta Campanella, quando invece le elaborazioni sono state eseguite considerando solo le regioni codificanti e non dei mtDNA.

3. Risultati



La lucertola Podarcis siculus coeruleus mentre preda un modellino di plastilina

3.1 - Valutazione della complessità insulare

I tre siti di studio sono caratterizzati da una diversa estensione e complessità ambientale che decresce dalla terraferma (Punta Campanella) a Scopolo, passando per l'isola di Capri (Tabella 5).

Tabella 5: Principali caratteristiche ecologiche di Punta Campanella, Capri e Scopolo.

Condizioni ecologiche	Aree di studio		
	Punta Campanella	Capri	Scopolo
Presenza di acqua	si	si	no
Altezza massima sul livello del mare	500 m	589 m	104 m
Vegetazione (N specie)	> 300	> 300	<200
Vertebrati terrestri (N specie)	N	11	4
Presenza di colonie di gabbiano reale	si	si	si
Presenza del ratto	si	si	si

3.2 - Cattura, misurazioni morfometriche e prelievo di tessuto

Per ciascuno dei siti indagati è stato possibile catturare ed esaminare un differente numero di esemplari (Tabella 6) su cui sono state eseguite le misurazioni morfometriche e il prelievo di tessuto per le analisi genetiche. I prelievi di tessuto sono stati riservati ad esemplari morti accidentalmente durante le attività di campionamento o nel periodo di stabulazione nel dipartimento di Biologia.

Tabella 6: Aree di studio censite e rispettivo numero di lacertidi catturati, analizzati e la tipologia di tessuto raccolto per le analisi molecolari.

Area di Studio		N° animali catturati	N° animali analizzati	Tessuto prelevato
Isole	Scopolo	12	12	Pelle, cervello, testicoli, coda
	Capri	27	25	Pelle, cervello, testicoli, coda
Terraferma	Punta Campanella	35	35	Pelle, cervello, testicoli, coda

Per valutare la presenza di caratteri riconducibili alla RIS nelle popolazioni insulari (Capri e Scopolo), sono stati esaminati nelle tre popolazioni: il rapporto lunghezza/larghezza della testa, il cromatismo e i livelli di aggressività.

I maschi delle popolazioni di Punta Campanella e Capri evidenziano una larghezza della testa (rapporto RO/SP) significativamente minore di quella osservata nei maschi della popolazione di Scopolo (Fig. 3.1).

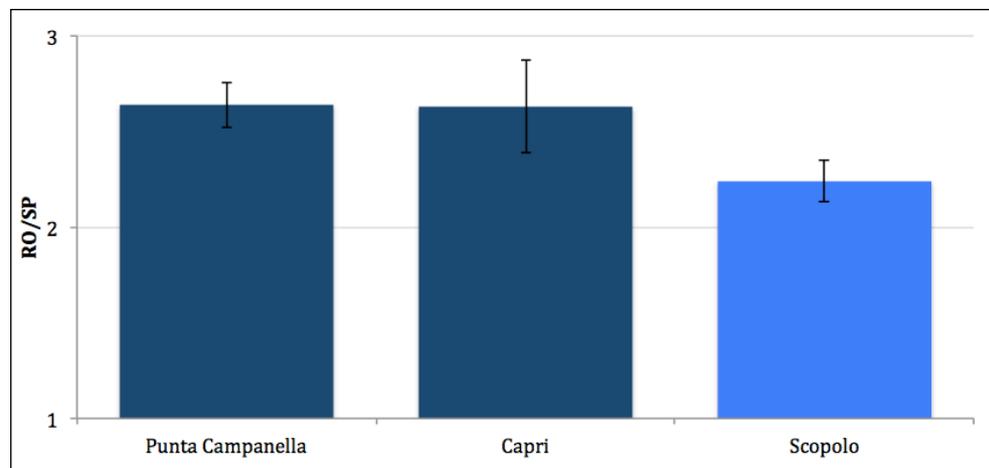


Figura 3.1: Valore medio di RO/SP nei maschi delle tre popolazioni di lacertidi (Test ANOVA One-Way: $d.f=23$; $F=14.84$; $p\text{-value} < 0.05$).

3.3 - Analisi spettrofotometrica della pelle

Dall'analisi spettrofotometrica della pelle, è emerso che le tre popolazioni di lacertidi pur se appartenenti alla stessa specie *Podarcis siculus*, mostrano diversi gradi di melanizzazione (Fig. 3.2). In particolar modo, la popolazione di Scopolo ha valori medi dell'ampiezza delle curve di riflettanza (utilizzando l'integrale come indice di ampiezza), significativamente più bassi rispetto a quelli delle popolazioni di Capri e di Punta Campanella ($I_{PC} = 6127.69 \pm 1982.34$; $I_{CPR} = 8205.38 \pm 2098.30$; $I_{SCOP} = 2538.68 \pm 1132.39$) (Fig. 3.2).

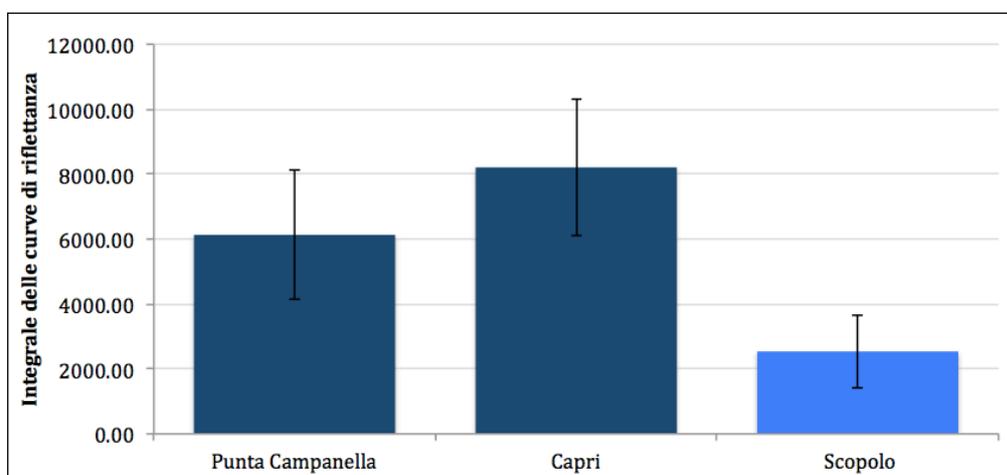


Figura 3.2: Media degli integrali delle curve di riflettanza per le tre popolazioni esaminate (Test ANOVA One-Way: d.f=25; $F=21.76$; $p\text{-value} < 0.05$).

3.4 - Valutazione dell'aggressività intraspecifica

La frequenza con cui si verificano le interazioni aggressive intraspecifiche nell'intervallo di un'ora di osservazione, è significativamente superiore nella popolazione di Scopolo (Fig. 3.3).

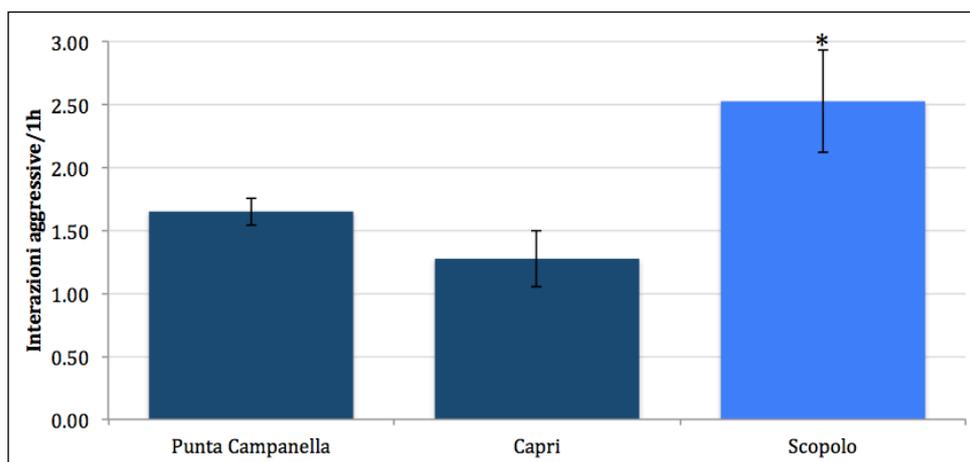


Figura 3.3: Valore medio nel numero di interazioni aggressive osservate nell'arco di un'ora (t-test, * $p < 0.05$).

3.5 - Analisi della pressione predatoria e del carico parassitario

Il videotrappolaggio ci ha informato che tra i predatori delle lucertole è possibile ascrivere il ratto e il gabbiano. I modellini di plastilina (Fig. 3.4) hanno riportato un numero di segni di predazione maggiore per il sito di Scopolo rispetto a quello osservato in Capri e in Punta Campanella (Fig. 3.5).

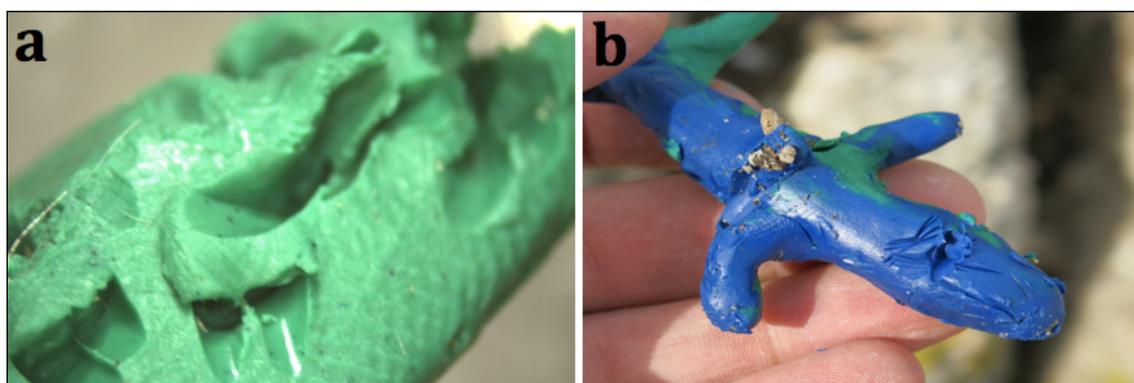


Figura 3.4: Modellini di plastilina con segni di predazione da parte di roditori (a) e uccelli (b).

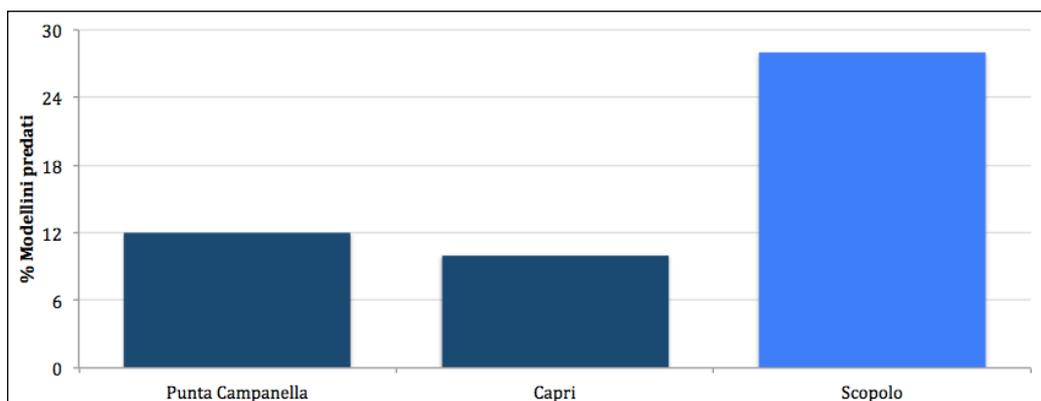


Figura 3.5: Intensità della pressione predatoria agente sulle tre aree di studio analizzando la percentuale di modellini predati nell'arco di 24 ore in ciascun sito.

Per quanto riguarda il livello di parassiti presenti nelle popolazioni dei lacertidi, è stato possibile constatare che la popolazione di Scopolo è caratterizzata da una quantità di ectoparassiti significativamente superiore rispetto a quella riscontrata nella popolazione di Punta Campanella e di Capri (Fig. 3.6).

Il numero di ectoparassiti (individui) su Scopolo potrebbe essere spiegato dalla combinazione di tre fattori: limitata estensione, presenza di gabbiano nidificante e presenza di ratto. Un confronto con un'altra piccola isola che ospita solo una popolazione di ratti (Licosa) infatti evidenzia un minor numero di parassiti rispetto a Scopolo (Fig. 3.6).

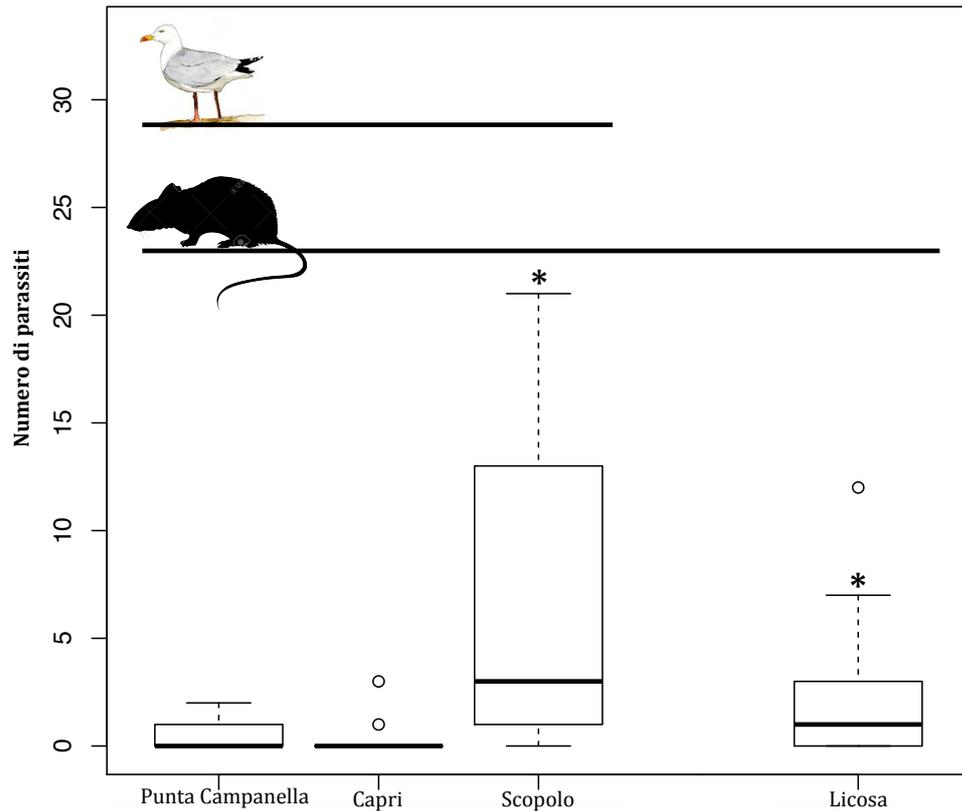


Figura 3.6: Carico parassitario delle lucertole insulari e della terraferma; t-test, $*p < 0.05$.

3.6 - Analisi dei polimorfismi nella regione codificante del gene MC1R

Il gene nucleare MC1R, codificante per il recettore della melanocortina 1, presenta un singolo esone di 945 bp. Le variazioni tra gli esemplari esaminati non evidenziano una relazione tra la sequenza genica e il livello di melanizzazione nelle lucertole di Scopolo. Nello specifico, tutti i polimorfismi riscontrati (12 sostituzioni) rispetto alla forma wild-type del gene (relativa al fenotipo chiaro della terraferma), sono mutazioni di tipo sinonimo (Test esatto di Fisher, $p > 0.05$) (Tabella 7).

Tabella 7: Polimorfismi della regione codificante (945 bp) del gene MC1R. Le varianti alleliche delle due popolazioni sono confrontate con la sequenza più frequente (78% nella popolazione di Punta Campanella) selezionata come riferimento (in grassetto).

	bp	42	54	108	123	150	180	270	351	390	594	732	930	#N
Punta Campanella		A	A	G	C	G	C	C	C	A	C	G	G	11

	G	C	A	-	-	G	-	-	G	T	-	C	2
	G	C	-	-	A	-	-	T	G	-	A	C	1
Scopolo	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	C	6
Tripletta codone	CCA	GCA	CAG	GGC	CTG	GCC	AAC	AAC	TCA	ATC	CTG	GTG	
Amminoacido	Pro	Ala	Gln	Gly	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Ile	Leu	Val	
Totale													20

3.7 - Analisi dell'espressione genica differenziale del gene MC1R

E' stata verificata l'ipotesi di una differente espressione del gene MC1R alla base del diverso grado di melanizzazione. Il risultato ottenuto (Fig. 3.7) è l'inverso di quello ricavato dall'analisi spettrofotometrica, ovvero il fenotipo scuro della popolazione di Scopolo, possiede circa 20 volte più mRNA per il gene MC1R rispetto ai fenotipi di Capri e Punta Campanella.

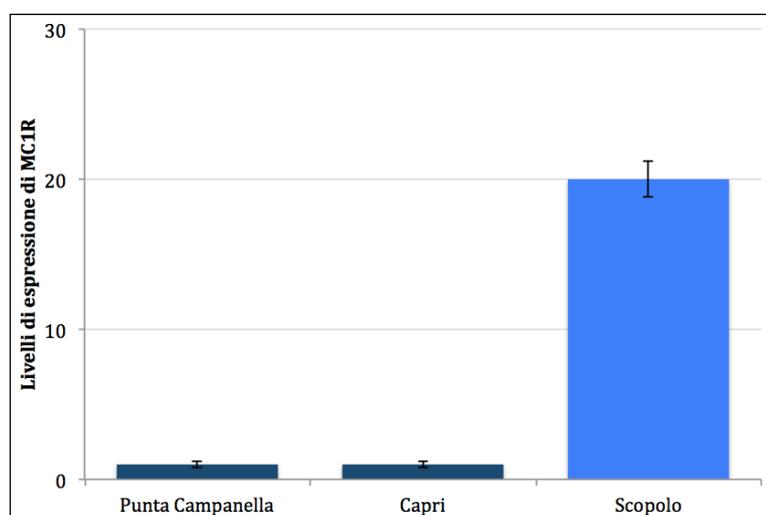


Figura 3.7: Livelli medi di espressione del gene MC1R determinati mediante real time-PCR sull'RNA estratto dalla pelle della regione ventrale degli individui appartenenti alle tre popolazioni di lacertidi (Test ANOVA One-Way: d.f=17; $F=1.45$; $p\text{-value} < 0.05$).

3.8 - Il sequenziamento del DNA mitocondriale e la valutazione dei tassi di mutazione dN, dS e dN-dS

Attraverso il sequenziamento del genoma mitocondriale è stato possibile osservare come le regioni codificanti nella popolazione di Scopolo evidenziano pattern mutazionali prevalentemente neutrali. Questo marcatore, infatti mostra come i tassi delle mutazioni non sinonime (dN), calcolati per i singoli codoni, siano poco frequenti nelle regioni codificanti e comunque statisticamente non significativi (Fig. 3.8).

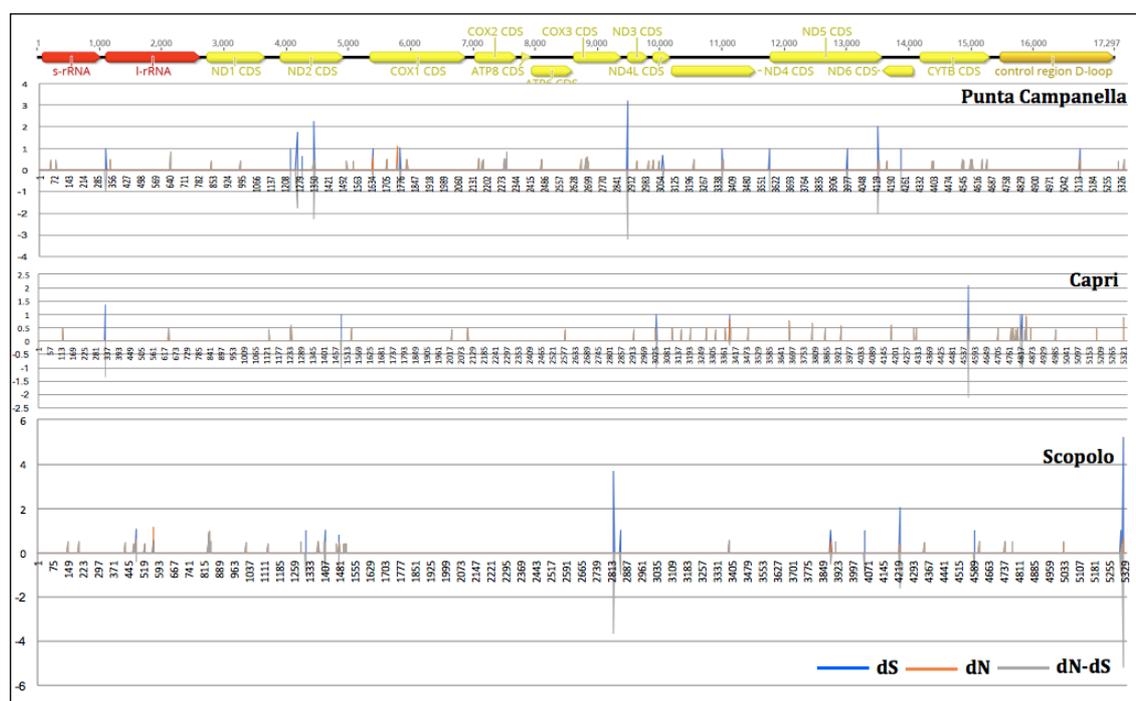


Figura 3.8: Risultati ottenuti dal programma HyPhy relativi ai tassi delle mutazioni sinonime (in blu), ai tassi delle mutazioni non sinonime (in arancione) e alla loro differenza (in grigio), calcolati per ciascun codone dei genomi mitocondriali di Punta Campanella, Capri e Scopolo.

In particolare, come si può osservare dalla figura 3.8 gli esemplari appartenenti alle popolazioni di Punta Campanella e di Capri, presentano distribuiti in modo omogeneo su tutto il genoma, i tassi delle mutazioni non sinonime, sinonime e la loro differenza. Analizzando gli esemplari di Scopolo, si può notare una bassa frequenza di mutazioni nelle regioni codificanti. Sebbene i campioni di Scopolo, presentino in alcuni geni mitocondriali tassi di mutazioni non sinonime, i loro valori risultano statisticamente non significativi (Fig. 3.9), ciò significa che viene rifiutata l'ipotesi di una selezione positiva ed invece è accettata l'ipotesi che sta agendo una selezione neutrale.

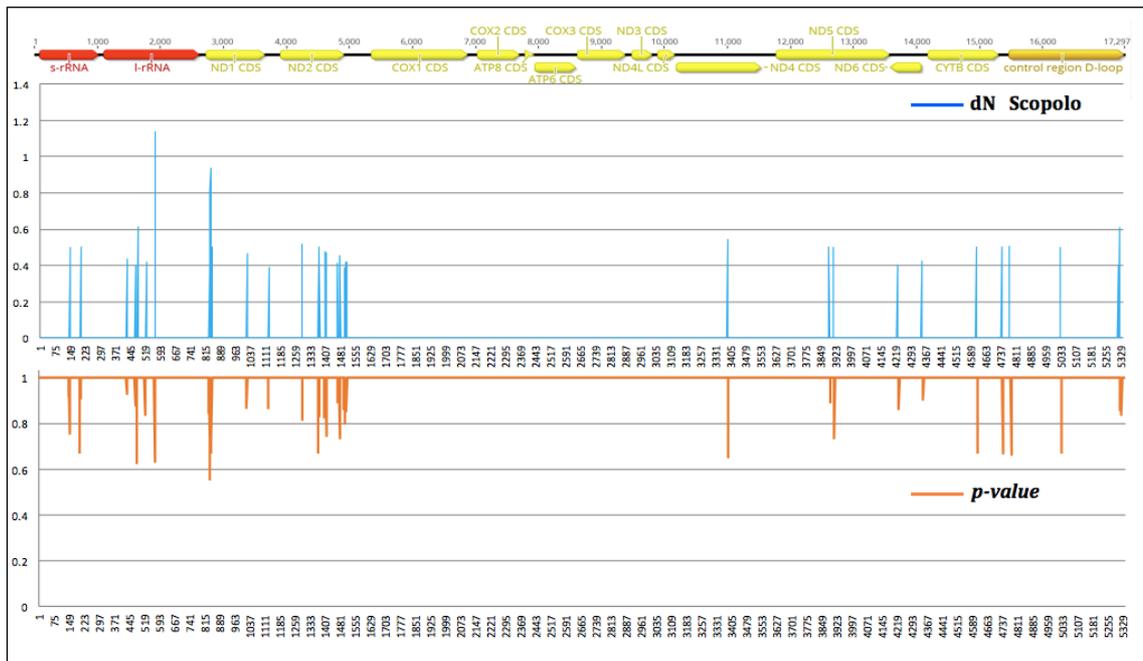


Figura 3.9: Valori di p -value (in arancione) calcolati per ciascun dN (in blu), mediante test probabilistico con distribuzione binomiale. Il valore di $p=dN$ è stato impostato ad 1.

3.9 - Analisi del trascrittoma (RNA-Seq)

Sull'RNA estratto da tessuto (cervello e testicoli) per tre campioni di ciascuna popolazione, è stata eseguita una strategia di sequenziamento paired-end per ottenere corte reads dall'estremità di frammenti di DNA più lunghi, in una procedura di sequenziamento ad alto rendimento ($34,453,675.8 \pm 11,995,068.4$ valore medio del numero di RawData \pm la deviazione standard) che ha permesso di stimare anche le concentrazioni di mRNA poco abbondanti. Un controllo della qualità è stato eseguito sui dati grezzi ottenuti dal sequenziamento per rimuovere sequenze di bassa qualità conservando invece reads più lunghe e di migliore qualità (% di reads trimate 86.07 ± 0.20 , media \pm deviazione standard).

E' stata verificata la possibilità di utilizzare il genoma della specie più vicina a *Podarcis siculus* e di cui è noto il genoma, ovvero *Anolis carolinensis*, per l'assemblamento dei trascrittomi. Per tale scopo le reads trimate sono state mappate sul genoma di riferimento, ma sfortunatamente solo il 3% delle reads mappava sul genoma, rendendo pertanto obbligatoria la procedura di un assembly mediante tecnologia *de novo*.

Con reads di alta qualità, dopo la normalizzazione, è stato effettuato l'assembly per ogni campione separatamente e poi sono stati uniti i diversi assembly per popolazione (3 maschi della terraferma e 3 maschi della popolazione insulare) (Tabella 8).

Gli artefatti sono stati rimossi insieme ad eventuali contaminati, mappando i trascritti ottenuti contro il database NCBI "nt", screenando in questo modo Batteri, Archea e sequenze che non appartenevano alla classe Sauropsida (Tabella 8).

Tabella 8: Riassunto delle statistiche ottenute per l'assembly *de novo*.

Dati grezzi dell'assembly	Terraferma	Isola
N trascritti	469,468	159,852
%GC	45	45
Range dimensione contig	250-18,833	250-13,350
Lunghezza media	1,273.93	860.94
N50	2,102	1,556
Basi assemblate (Mbp)	598	137
Dati dell'assembly post-filtraggio		
N trascritti	275,310	101,209
%GC	45	46
Range dimensione contig	250-18,833	250-13,350
Lunghezza media	1,036.72	820.04
N50	1,704	1,167
Basi assemblate (Mbp)	285	83

Il numero di trascritti costituenti i due trascrittomi rientra nel range del numero di trascritti previsti per gli animali pecilotermi (Fig. 3.10).

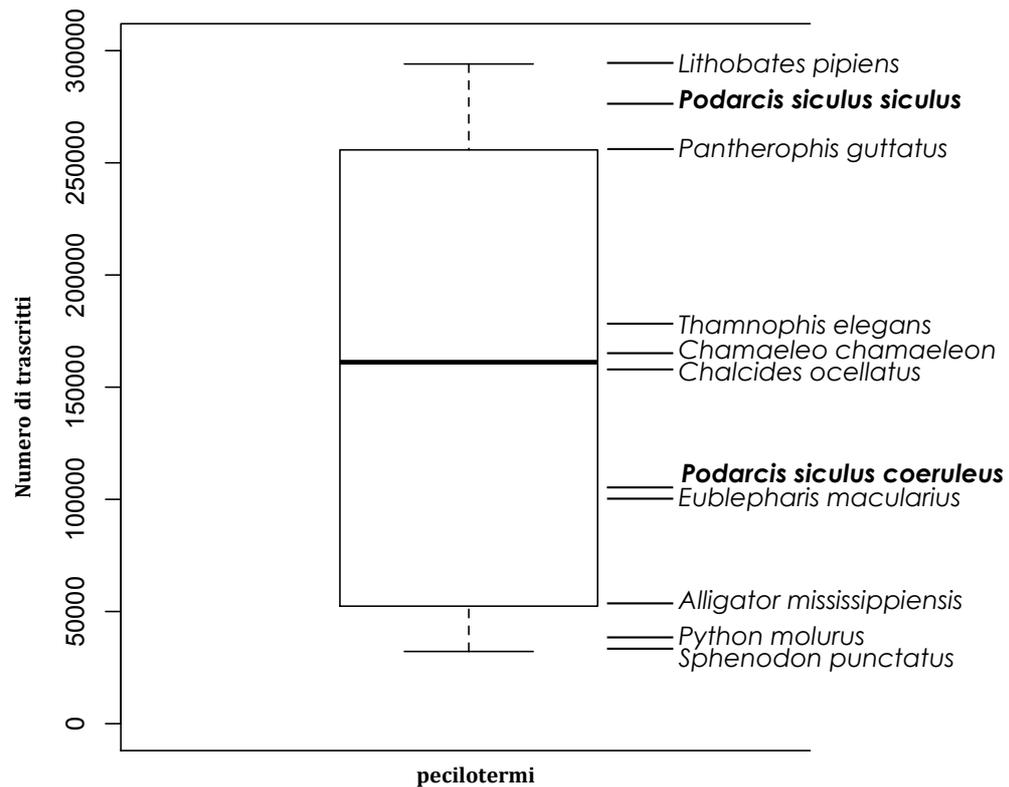


Figura 3.10: Numero di trascritti costituenti i trascrittomi di alcuni pecilotermi, in grassetto sono evidenziati i lacertidi oggetto di studio della popolazione insulare e della terraferma.

Il numero di trascritti sequenziato per le due popolazioni (terraferma e isola) è significativamente diverso (*Podarcis siculus siculus* > *Podarcis siculus coeruleus*).

Le sequenze dei trascritti assemblati per la popolazione della terraferma sono state tradotte in 146,285 proteine (56,919 per la popolazione insulare), considerando una lunghezza minima di 50 aa. Quando erano possibili traduzioni multiple, la priorità è stata data alle *Open Reading Frame* (ORF) più lunghe e complete, e quando le ORF complete non erano disponibili, sono state considerate le sequenze più lunghe. Tra queste sequenze, 72,690 (49.6% nella terraferma) e 21,488 (37.7% nell'isola) erano complete con un codone di inizio e un codone di stop, 39,302 (26.8% per la terraferma) e 4,976 (8.7% per l'isola) iniziavano con un codone di inizio ma mancavano del codone di stop, 18,435 (12.6% nella terraferma) e 19,089 (33.5% nell'isola) avevano solo il codone di stop, e 15,858 (10.8% nella terraferma) e 11,336 (19.9% nell'isola) non iniziavano con un codone di inizio e non avevano un codone di stop.

In seguito alla ricerca BLAST eseguita contro il database di proteine dei Sauropsida, è stata associata una descrizione a 85,240 trascritti della terraferma e 37,062 della

popolazione insulare. Successivamente è stata effettuata un'annotazione funzionale mediante la Gene Ontology per le 42,001 e le 16,881 proteine della terraferma e dell'isola rispettivamente.

Mediante l'analisi del *Variant Calling*, ovvero mappando le reads delle due popolazioni sul trascrittoma di riferimento della terraferma (Tabella 9) è stato determinato il numero dei polimorfismi (SNPs) presenti per entrambe (Fig. 3.11).

Tabella 9: Statistiche ottenute in seguito alla mappatura delle reads dei campioni sul trascrittoma di riferimento della terraferma.

Tipologia	N° medio reads mappate	Valore medio %
Terraferma cervello	17,582,134 ± 3,810,973.07	86.71 ± 1.79
Terraferma testicolo	15,624,553 ± 2,534,974.85	85.95 ± 2.26
Terraferma	16,603,344 ± 3,086,968.308	86.33 ± 1.87
Isola cervello	5,824,035 ± 5,161,757.61	59.2 ± 28.24
Isola testicolo	8,589,029 ± 3,449,312.84	59.96 ± 33.47
Isola	6,930,032 ± 4,311,596.904	59.5 ± 26.06

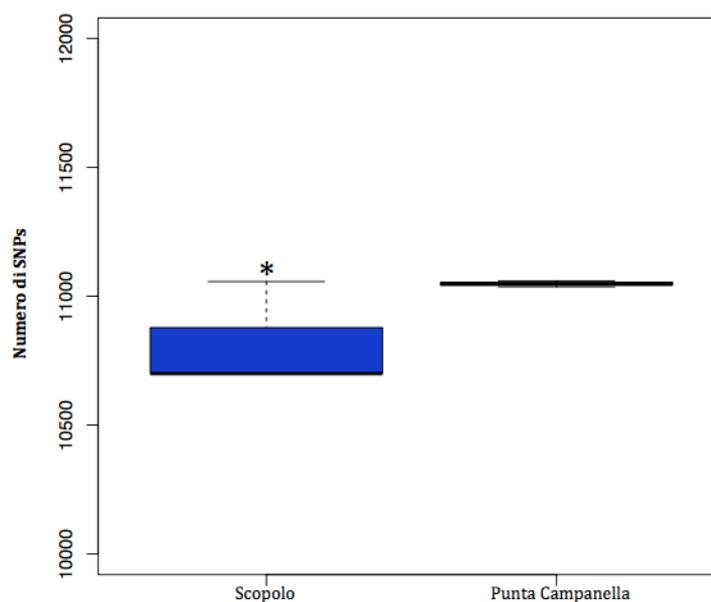


Figura 3.11: Numero di polimorfismi (media \pm deviazione standard del numero di polimorfismi) ritrovati nelle lucertole insulari e della terraferma; t-test, $*p > 0.05$.

Come si può osservare dalla figura 3.11, la differenza nel numero di polimorfismi tra le due popolazioni, considerando solo le regioni che sono trascritte del DNA, non è significativa.

Analizzando l'espressione genica differenziale tessuto specifica per geni che sono riconducibili alla sindrome della popolazioni insulare, è stato possibile osservare che 8 su 17 geni (nel cervello) e 10 su 17 geni (nei testicoli) sono maggiormente espressi (Fig. 3.12; 3.13). Nello specifico l'espressione di NPY è maggiore nel cervello delle lucertole insulari mentre si osservano bassi valori di espressione per la leptina (Fig. 3.12). Ancora, si osserva una maggiore espressione sia nel cervello che nei testicoli dei lacertidi insulari, del gene coinvolto nella Regolazione della Proliferazione Cellulare (Fig. 3.12; 3.13). I geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo, importante precursore del testosterone, sono stati analizzati solo nei testicoli, dove si osserva una maggiore espressione del gene legato alla Biosintesi del Colesterolo negli individui insulari (Fig. 3.13). Infine, i geni coinvolti nel sistema immunitario sono più espressi nei testicoli dei lacertidi insulari (Fig. 3.13).

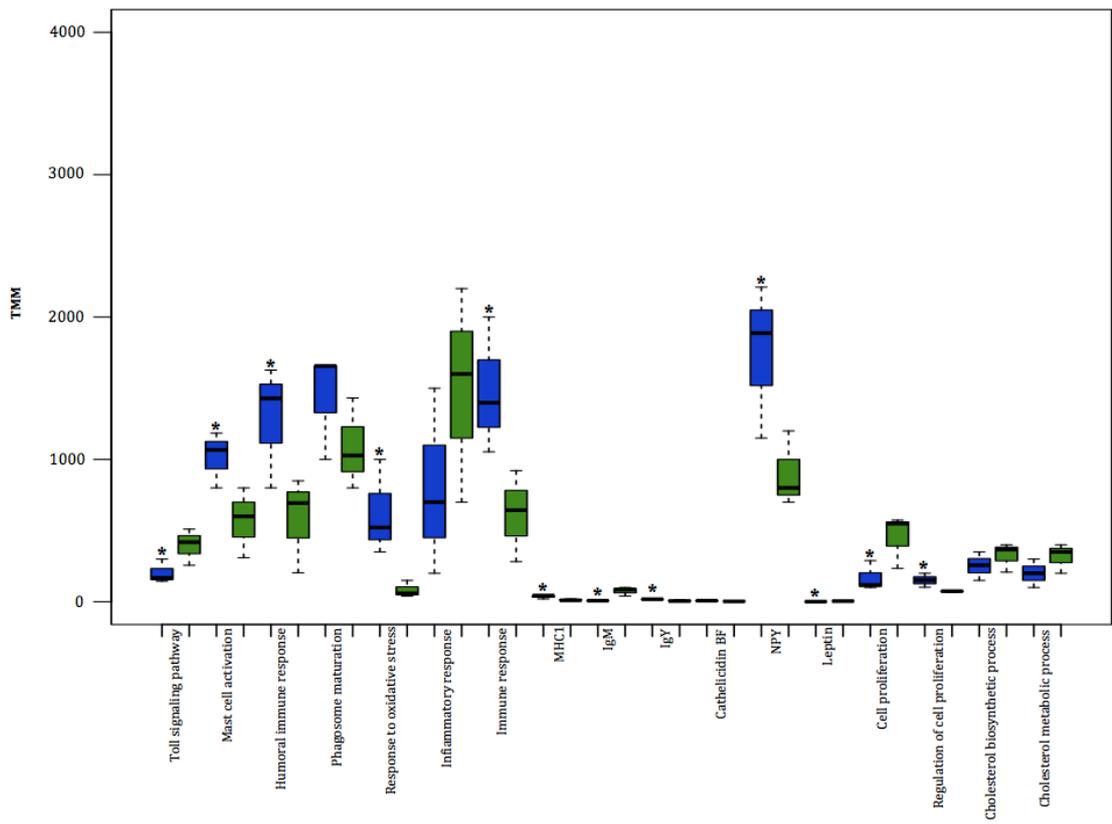


Figura 3.12: Espressione genica differenziale nel cervello (count normalizzati con TMM) dei lacertidi insulari (blu) e della terraferma (verde); t-test, $*p \leq 0.05$.

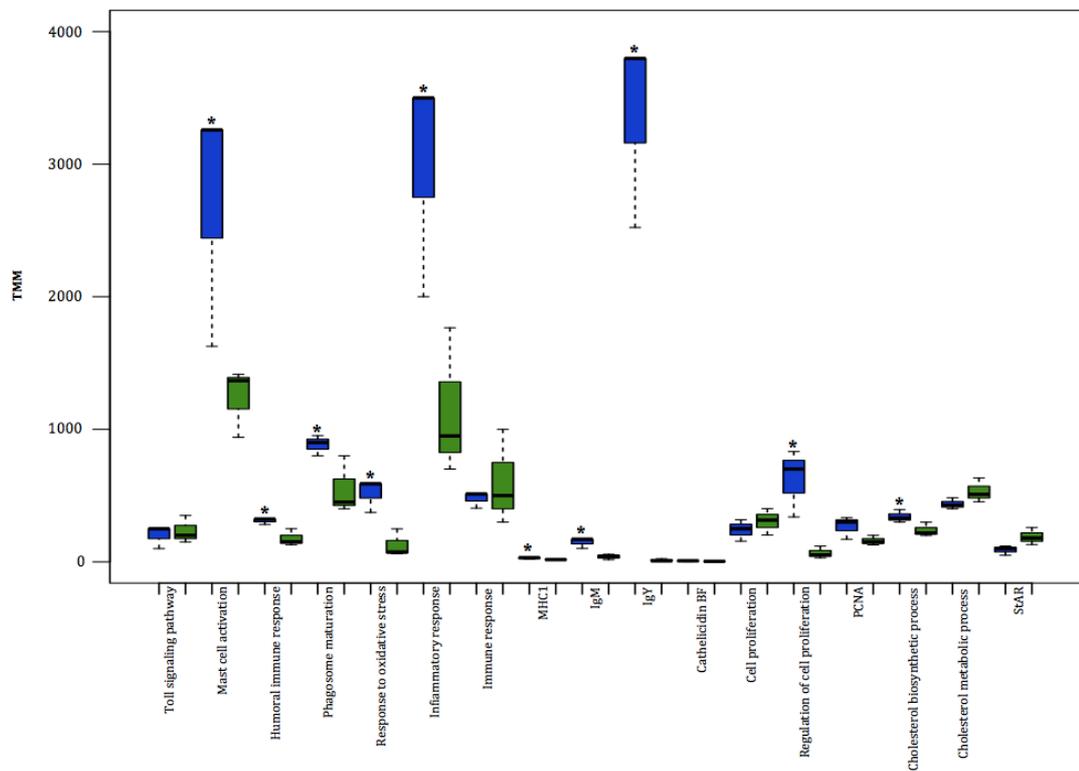


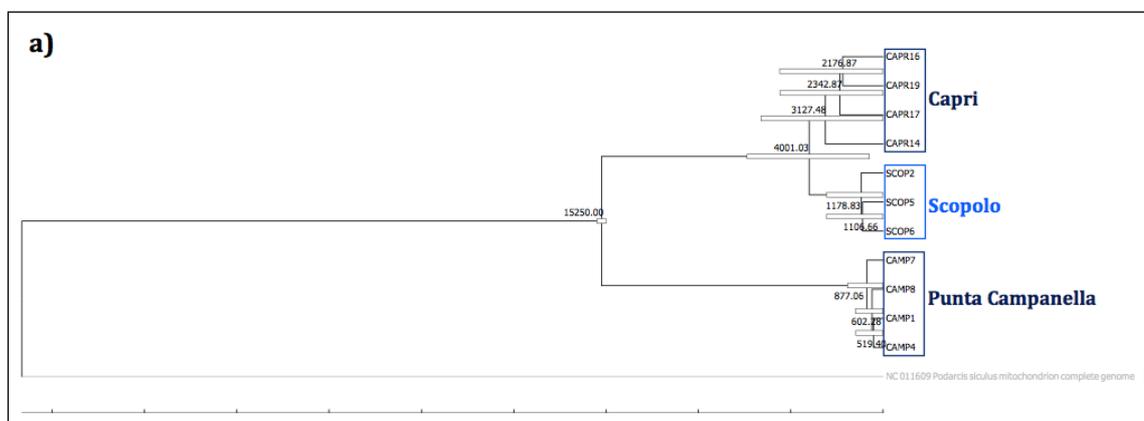
Figura 3.13: Espressione genica differenziale nei testicoli (count normalizzati con TMM) dei lacertidi insulari (blu) e della terraferma (verde); t-test, $*p \leq 0.05$.

Dall'analisi trascrittomico è stato valutato anche il rapporto transizioni su trasversioni Ts/Tv. Sia le transizioni (Ts) che le trasversioni (Tv) possono cambiare la composizione amminoacidica di una proteina, ma le trasversioni tendono a cambiare maggiormente, da un punto di vista biochimico, i prodotti proteici (Zhang, 2000). Di conseguenza geni sotto una selezione stabilizzante mostrano un minor numero di trasversioni rispetto alle transizioni. Inoltre alti valori di Ts/Tv sono comuni per i trascritti più conservati. Nella popolazione insulare, su un numero di circa 1300 trascritti con SNPs, è stato riscontrato un valore di Ts/Tv maggiore di uno (Ts/Tv = 2.21).

3.10 - mtDNA e *Divergence Time*

La trasgressione marina che ha interessato il Mar Tirreno, ha separato l'isola di Capri dalla terraferma Punta Campanella circa 15,000 anni fa (Appendice 1 in Lambeck *et al.*, 2011), mentre i faraglioni, e con questi Scopolo, si sarebbero distaccati dall'isola di Capri circa 8,000 anni fa (in Raia *et al.*, 2016).

L'analisi dei pattern di mutazione nei mitogenomi di Punta Campanella, Capri e Scopolo è stata sviluppata impostando il tasso di cambiamento sulla base delle differenze tra Capri e la terraferma (Fig. 3.14). La stima dei tempi di divergenza molecolare delle popolazioni insulari è risultata essere sempre più bassa dei tempi di divergenza geologica, questo sia se si considerano solo le regioni non codificanti del mtDNA (Fig. 3.14b), sia se si considerano solo le regioni codificanti (Fig. 3.14c).



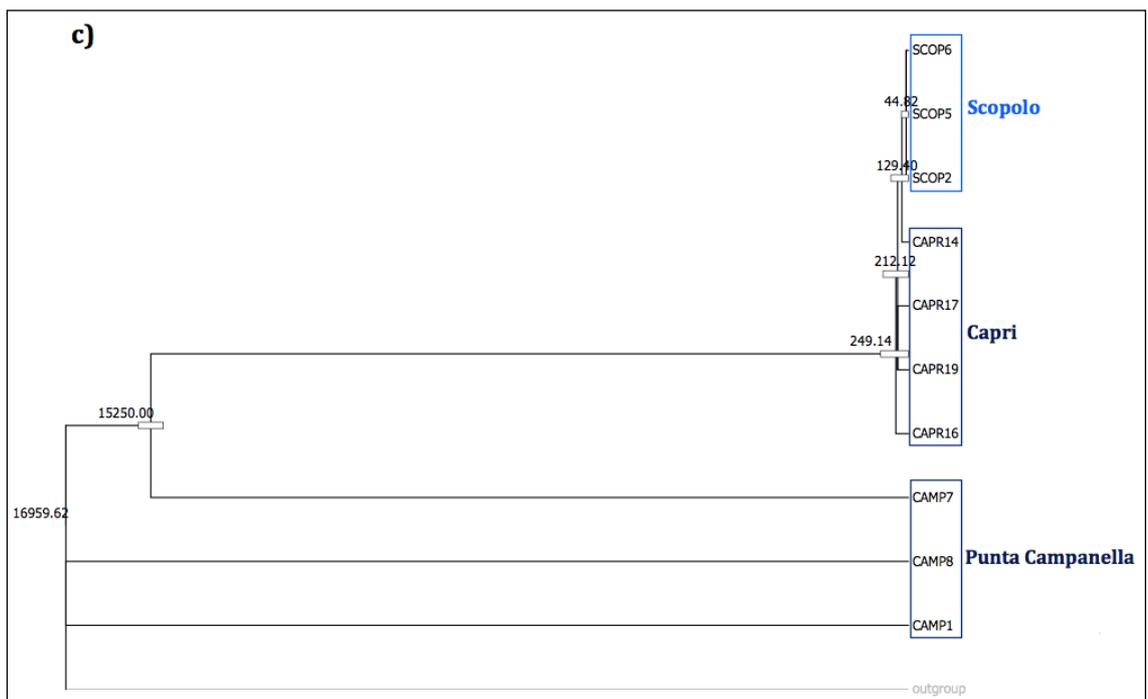
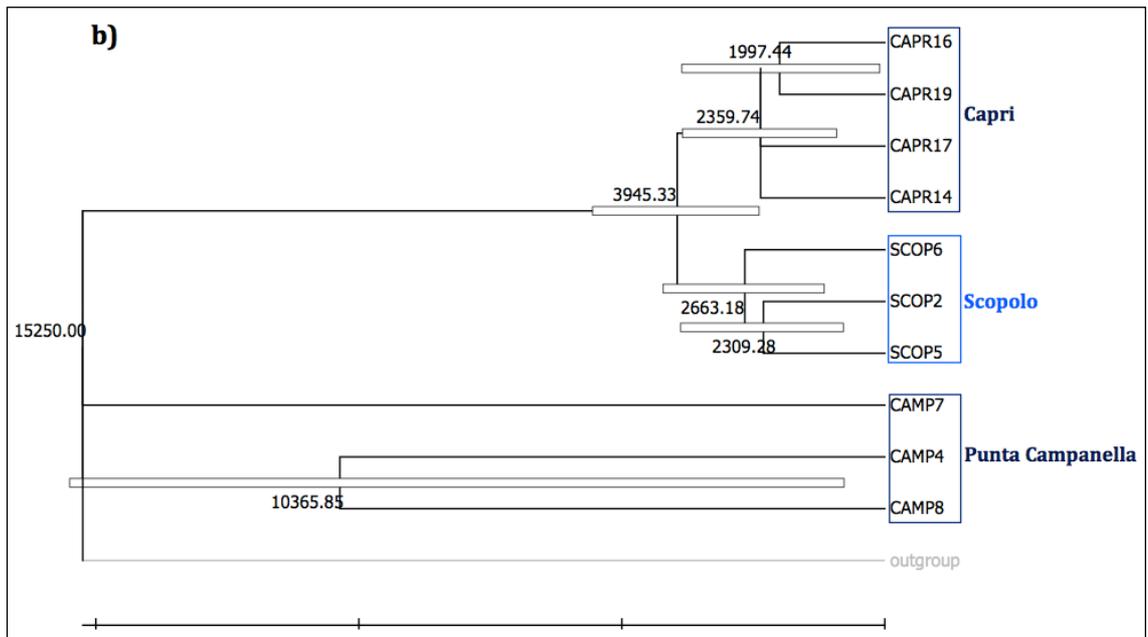


Figura 3.14: Il *genetic divergence time* stimato per le popolazioni di lacertidi di Punta Campanella, Capri e Scopolo, calibrando l'orologio molecolare sui tempi di separazione geologici dell'isola di Capri da Punta Campanella e utilizzando: a) le sequenze complete dei mtDNA; b) regioni non codificanti dei mtDNA; c) regioni codificanti dei mtDNA; è riportata l'età media e la variazione (con un intervallo di confidenza del 95%) per ogni nodo.

La popolazione di Scopolo evidenzia una stima di divergenza da Capri pari a 4001.03 ± 1600 considerando l'intero mitogenoma, 3945.33 ± 900 considerando le regioni non codificanti e 129.40 ± 50 se si considerano le sequenze codificanti del mtDNA (Fig. 3.14a, b, c).

4. Discussione



Il faraglione Stella (sulla sinistra) e il faraglione Scopolo (sulla destra) - Capri (NA)

Le isole spesso manifestano fattori ambientali, biotici e abiotici, differenti dalla terraferma, tali che possono influenzare la vita degli animali che le popolano (Blondel & Aronson, 1999). Le osservazioni raccolte nelle isole qui indagate, sono concordi con questa peculiarità, sottolineando le forti differenze presenti tra isole grandi e isole piccole.

I marker fenotipici come la larghezza della testa, il cromatismo e l'aggressività, si sono mostrati molto utili per identificare i segnali di una sindrome per la popolazione dell'isola piccola Scopolo, dove "piccola" si traduce in poche nicchie e, molto verosimilmente, maggiore suscettibilità ai cambiamenti ambientali. Questo, unito ad una selezione naturale differenziale, potrebbe essere alla base degli adattamenti osservati. Infatti, la pressione di predazione e il numero di parassiti (Richner *et al.*, 1993; Blanckenhorn, 2000; Losos *et al.*, 2004; Saino *et al.*, 2004; Nussey *et al.*, 2007; Herczeg *et al.*, 2009) sono risultati più elevati per l'isolotto di Scopolo.

Le piccole isole possono quindi rappresentare ambienti estremi, per popolazioni di piccoli lacertidi che devono necessariamente sviluppare rapidamente adattamenti per evitare una probabile estinzione. Si pensi al caso dell'isola Sa Mesalonga, in Sardegna, che con condizioni ambientali simili a quelle di Licoso e di Scopolo, è completamente disabitata da lucertole, anche se tutti gli isolotti dell'arcipelago a largo di Oristano sono abitati da lucertole. Adattarsi in questi casi può significare sopravvivere.

Uno degli obiettivi di questo studio riguardava la natura genica degli adattamenti sviluppati dalle popolazioni insulari che esprimono la sindrome inversa.

In particolare se le variazioni osservate potessero essere il frutto di mutazioni nelle regioni codificanti o variazioni di espressione.

In passato, diversi studi hanno ipotizzato che le mutazioni di tipo regolativo dei geni sono alla base dei cambiamenti fenotipici; basti ricordare il lavoro condotto da King e Wilson nel 1975 su uomo e scimpanzè. Analoga idea arrivò successivamente nel 1983 con Raff e Kaufman che, nel loro libro *Embryos, Genes, and Evolution*, esaltavano l'importanza dei cambiamenti nella regolazione genica per poter evolvere.

Ciò nonostante, ancora oggi la questione sul contributo dei cambiamenti nella regolazione genica per sviluppare nuovi adattamenti, è argomento dibattuto e meritevole di approfondimento (Hoekstra & Coyne, 2007; Carroll, 2008).

Il gene nucleare MC1R regola il differente grado di melanizzazione nelle lucertole insulari attraverso un'espressione differenziale.

L'ultimo decennio ha visto enormi sviluppi nelle tecnologie genomiche capaci di estendere ed approfondire le analisi di espressione genica cercando di svelare eventuali implicazioni epigenetiche (Romero *et al.*, 2012). Ad esempio la tecnica di sequenziamento dell'RNA (RNA-seq) consente di valutare i livelli di espressione genica considerando tutto il genoma (Perry *et al.*, 2012).

I risultati ottenuti dell'analisi trascrittomica eseguita sulla popolazione insulare e della terraferma sono molto interessanti. In particolare si è osservato come la popolazione insulare, pur manifestando notevoli differenze fenotipiche rispetto alla popolazione della terraferma, evidenzia un minor numero di mutazioni nelle regioni codificanti, avvalorando l'ipotesi che tali variazioni fenotipiche siano maggiormente legate a differenze nell'espressione genica. Questa metodologia non considera i polimorfismi che possono interessare altre regioni non codificanti del genoma, come quelle regolative. Tale eventualità, così come eventi di metilazione del DNA, potrebbero anche essere alla base delle differenze fenotipiche osservate su base regolativa.

Attraverso lo studio dell'espressione genica differenziale, l'analisi del trascrittoma ha quindi confermato che la "strategia regolativa" potrebbe essere responsabile degli adattamenti insulari.

Un esempio viene fornito dall'elevata espressione di NPY, confermando la possibilità che questo gene può essere coinvolto nella stimolazione del *food intake* e nella regolazione del bilanciamento energetico. Infatti, bassi valori di espressione della Leptina sembrano essere legati all'elevata voracità osservata nella popolazione insulare a confronto con la terraferma. Una maggiore espressione del gene coinvolto nella Regolazione della Proliferazione Cellulare, può spiegare la maggiore dimensione corporea dei lacertidi insulari come quella riscontrata nella popolazione di Licoso sotto RIS (Raia *et al.*, 2010; Monti *et al.*, 2013). Infine il gene legato alla Biosintesi del Colesterolo, la cui elevata espressione potrebbe spiegare la maggiore aggressività e attività sessuale dei lacertidi di Scopolo.

La forte "stabilizzazione" dei prodotti genici della popolazioni insulare è stata confermata anche dal valore di Ts/Tv che indica come i geni della popolazione insulare siano sotto selezione, pertanto se i geni non sono liberi di poter mutare in tempi brevi, la regolazione dell'espressione genica può rappresentare una soluzione ottimale.

Di solito sono le mutazioni a consentire alle popolazioni di diffondersi in ambienti in cui fenotipi diversi risultano essere meglio adattati e semmai con una fitness maggiore,

come per il caso della specie *Chaetodipus intermedius* (Nachman *et al.*, 2003) o per la lucertola delle spiagge bianche (Rosenblum *et al.*, 2010). Ma quando i “limiti temporali” impongono soluzioni “immediate”, il meccanismo molecolare alternativo alla mutazione genica, ovvero la regolazione dell’espressione genica, può governare il cambiamento (Lister, 1989; Garfield & Wray, 2010; Romero *et al.*, 2012).

Un’altra interessante spiegazione del perchè la strategia regolativa è favorita, emerge dalle stime del *genetic divergence time*.

Infatti la stima dei tempi di divergenza molecolare è sempre più bassa dei tempi di divergenza geologica. Le scarse variazioni mitogenomiche suggeriscono un basso livello di variazione imputabile a mutazioni nei geni codificanti e un maggiore livello di variazione di espressione che genera gli adattamenti fenotipici rilevati (Garfield & Wray, 2010; Romero *et al.*, 2012).

Questa ricerca se da un lato ha portato nuove prove sui tempi e sui modi con cui l’evoluzione opera il cambiamento in piccole popolazioni isolate, dall’altro lato ha aperto numerosi spunti di indagine che riguardano i meccanismi genetici alla base della strategia regolativa, che possono così completare le conoscenze riguardanti l’evoluzione dei lacertidi insulari.

Bibliografia

- Adler G.H. & Levins R., 1994, in The island syndrome in rodents. *Quarterly Review of Biology*, 69: pp 473-490.
- Andersson M., 1994, in Sexual selection: Princeton: Princeton Univ. Press.
- Antonioli F., Presti V.L., Rovere A., Ferranti L., Anzidei M., Furlani S., Mastronuzzi G., Orru P.E., Scicchitano G., Sannino G., Spampinato C.R., Pagliarulo R., Deiana G., de Sabata E., Sansò P., Vacchi M. & Vecchio A., 2015, in Tidal notches in Mediterranean Sea: A comprehensive analysis. *Quaternary Science Reviews*, 119: pp 66-84.
- Avise J.C., 2000, in Phylogeography. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Blanckenhorn W.U., 2000, in The evolution of body size: what keeps organisms small? *Q. Rev. Biol.*, 75: pp 385-407.
- Blondel J. & Aronson J., 1999, in Biology and Wildlife of the Mediterranean Region. Oxford University Press, USA.
- Blondel J., 2000, in Evolution and ecology of birds on islands: trends and perspectives. *Vie et Milieu*, 50: pp 205-220.
- Bolger A.M., Lohse M. & Usadel B., 2014, in Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*.
- Bonnet X., Pearson D., Ladyman M., Lourdais O. & Bradshaw D., 2002, in Heaven' for serpents? A mark-recapture study of tiger snakes (*Notechis scutatus*) on Carnac Island, Western Australia. *Austral Ecol*, 27: pp 442-450.
- Brown W.M., George M. Jr. & Wilson A.C., 1979, in Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 76: pp 1967-71.
- Buckley L.B. & Jetz W., 2007, in Insularity and the determinants of lizard population density. *Ecology Letters*, 10: pp 481-489.
- Butlin R., Debelle A., Kerth C., Snook R.R., Beukeboom L.W., Castillo Cajas R.F.C. *et al.*, 2012, in What do we need to know about speciation? *Trends Ecol. Evol.*, 27: pp 27-39.
- Caloi L., Kotsakis T. & Palombo M.R., 1988, in La fauna a vertebrati terrestri del Pleistocene delle isole del Mediterraneo. *Bull. Ecol.*, 19 (2-3): pp 131-151.
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K. & Madden T.L., 2009, in BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1): p 421.

- Carlquist S., 1974, in *Island biology*. Colombia University Press, New York
- Carroll S.B., 2008, in *Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution*. *Cell*, 134: pp 25-36.
- Case T.J., 1975, in Species numbers, density compensation, and colonizing ability of lizards on islands in the Gulf of California. *Ecology*, 56: pp 3-18.
- Case T.J., 1978, in A general explanation for insular body size trends in terrestrial vertebrates. *Ecological Society of America*, 59: pp 1-18.
- Case T.J. & Cody M.L., 1987, in Testing theories of island biogeography. *American Scientist*, 75: pp 402-411.
- Case T.J. & Bolger D.T., 1991, in The role of introduced species in shaping the distribution and abundance of island reptiles. *Evol. Ecol.*, 5: pp 272-290.
- Chieffi P., Nasti M., Fulgione D. & Franco R., 2001, in Expression of PCNA in the testis of the lizard, *Podarcis s.sicula*: an endogenous molecular marker of mitotic germinal epithelium proliferation. *Zygote* (Cambridge, England), 9(4): pp 317-322.
- Clayton J.L., 1976, in Nutrient gains to adjacent forest ecosystems during a forest fire: an evaluation. *Forest Science*, 22: pp 162-166.
- Cott H.B., 1940, in *Adaptive coloration in animals*. London: Methuen & Co. Ltd.
- Crowell K.L., 1962, in Reduced interspecific competition among the birds of Bermuda. *Ecology*, 43: pp 75-88.
- Davidson N.M. & Oshlack A., 2014, in Corset: enabling differential gene expression analysis for de novo assembled transcriptomes. *Genome Biology*, 15: p 410.
- De Jong P.W., Gussekloo S.W.S. & Brakefield P.M., 1996, in Differences in thermal balance, body temperature and activity between non-melanic and melanic two-spot lady-bird beetles (*Adalia bipunctata*) under controlled conditions. *J. Exp. Biol.*, 199: pp 2655-2666.
- Delgado J., Alonso L., González G. & Moreno J., 2010, in Estimating chlorophyll content of crops from hyperspectral data using a normalized area over reflectance curve (NAOC). *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.*, 12: pp 165-174.

- Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R., 2013, in STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1): pp 15-21.
- Dreher C.E. & Pröhl E.H., 2014, in Multiple sexual signals: calls over colors for mate attraction in an aposematic, color-diverse poison frog. *Front. Ecol. Evol.*, 2: pp 1-10.
- Ducrest A.L., Keller L. & Roulin A., 2008, in Pleiotropy in the melanocortin system, coloration and behavioural syndromes. *TREE*, 23: pp 502-510.
- Dugan G.L. & Ekern P.C., 1984, in Chemical constituents of rainfall at different locations on O'ahu, Hawaii. *Technical Report 160*. Water Resources Research Centre. University of Hawaii at Manoa Honolulu, USA. pp 25.
- Eimer T., 1874, in Zoologische studien auf Capri. II. Lacerta muralis coerulea, ein Beitrag zur Darwinischen Lebre Leipzig, Verlag von Wilhelm Engelmann, IV.
- Eisentraut M., 1950, in Die Eidechsen der spanischen Mittelmeerinseln und ihre Rassenaufspaltung im Lichte der Evolution. *Mitt Zool Mus Berlin*, 26: pp 1-228.
- Eizirik E., Yuhki N., Johnson W.E., Menotti-Raymond M., Hannah S.S. & O'Brien S.J., 2003, in Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr. Biol.*, 13: pp 448-453.
- Endler J.A., 1978, in A predator's view of animal color patterns. *Evol. Biol.*, 11: pp 319-364.
- Eo S.H. & DeWoody J.A., 2010, in Evolutionary rates of mitochondrial genomes correspond to diversification rates and to contemporary species richness in birds and reptiles. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1700): pp 3587-3592.
- Espmark Y., Amundsen T. & Rosenqvist G., 2000, in Animal signals: signalling and signal design in animal communication. Trondheim: Tapir Academic Press.
- Faith R.E. & Clem L.W., 1973, in Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken: biological fractionation of the mediating antibody population. *Immunology*, 25(1): pp 151-164.
- Fellah J.S., Kerfourn F., Wiles M.V., Schwager J. & Charlemagne J., 1993, in Phylogeny of immunoglobulin heavy chain isotypes: structure of the constant region of *Ambystoma mexicanum* ν chain deduced from cDNA sequence. *Immunogenetics*, 38(5): pp 311-317.

- Felsenstein J., 1985, in Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, pp 783-791.
- Ferranti L., Antonioli F., Mauz B., Amorosi A., Dai Prà G., Mastronuzzi G., Monaco C., Orrù P. *et al.*, 2006, in Markers of the last interglacial sea-level high stand along the coast of Italy: Tectonic implications. *Quat. Int.*, 145-146: pp. 30-54.
- Ferranti L. & Antonioli F., 2007, in Misure del solco tirreniano (MIS 5.5) nell'isola di Capri: Valutazione di attività tettonica durante il Pleistocene superiore. *Il Quaternario: Italian Journal of Quaternary Sciences*, 20(2): pp 125-136.
- Fitch W.M., 1976, in Molecular evolutionary clocks, in: *Molecular Evolution* (F. J. Ayala, ed.), pp. 160–178, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Flajnik M.F., 2002, in Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat Rev Immunol*, 2(9): pp 688-698.
- Flajnik M.F., Miller K. & Du Pasquier L., 2003, in *Evolution of the Immune System*. In: *Fundamental Immunology*. Edited by Paul. W.E. United States: Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; pp 519-570.
- Foà A., Monteforti G., Minutini L., Innocenti A., Quagliari C. & Flamini M., 1994, in Seasonal changes of locomotor activity patterns in ruin lizards *Podarcis sicula* I Endogenous control by the circadian system. *Behav Ecol Sociobiol*, 34: pp 267-274.
- Forsman A., 1997, in Thermal capacity of different color morphs in the pygmy grasshopper *Tetrix subulata*. *Ann. Zool. Fennici*, 34: pp 145-149.
- Foster J.B., 1964, in Evolution of mammals on islands. *Nature*, 202: pp 234-235.
- Friedman J.M. & Halaas J.L., 1998, in Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704): pp 763-770.
- Fulgione D., Trapanese M., Maselli V., Rippa D., Itri F., Avallone B., Van Damme R., Monti D.M. & Raia P., 2014, in Seeing through the skin: dermal light sensitivity provides cryptism in moorish gecko. *J. Zool. (Lond.)*, 294: pp 122-128.
- Fulgione D., Lega C., Trapanese M. & Buglione M., 2015, in Genetic factors implied in melanin-based coloration of the Italian wall lizard. *Journal of Zoology*, 296(4): pp 278-285.
- Gambòn-Deza F. & Espinel C.S., 2008, in IgD in the reptile leopard gecko. *Molecular immunology*, 45(12): pp 3470-3476.

- Garfield D.A., & Wray G.A., 2010, in The Evolution of Gene Regulatory Interactions. *BioScience*, 60 (1): pp 15-23.
- Gillespie J.H. & Langley C.H., 1979, in Are evolutionary rates really variable? *J. Mol. Evol.*, 13: pp 27-34.
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q. *et al.*, 2011, in Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotech.*, 29 (7): pp 644-652.
- Gunadi B., 1993, in Decomposition and nutrient flow in a pine forest plantation in Central Java. PhD thesis, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands. pp 153.
- Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., Eccles D., Li B., Lieber M. *et al.*, 2013, in De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protocols*, 8(8): pp 1494-1512.
- Hasegawa M., Kishino H. & Yano T.J., 1985, in Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Mol Evol*, 22: pp 160-174.
- Hasegawa M., 1990, in Demography of an island population of the lizard, *Eumeces okadae*, on Miyake-jima, Izu Islands. *Res Pop Ecol*, 32: pp 119-133.
- Heaney L.R., 1978, in Island area and body size of insular mammals: evidence from the tri-colored squirrel (*Callosciurus prevosti*) of Southeast Asia. *Evolution*, 32: pp 29-44.
- Herczeg G., Gonda A. & Merila J., 2009, in Evolution of gigantism in nine-spined sticklebacks. *Evolution*, 63: pp 3190-3200.
- Hipsley C.A., & Müller J., 2014, in Beyond fossil calibrations: realities of molecular clock practices in evolutionary biology. *Frontiers in Genetics*, 5: p 138.
- Ho S.Y.W. & Phillips M.J., 2009, in Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. *Systematic Biology*, 58: pp 367-380.
- Ho S.Y.W. & Duchêne S., 2014, in Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Molecular ecology*, 23(24): pp 5947-5965.
- Hoekstra H.E. & Coyne, J.A., 2007, in The locus of evolution: evo devo and the genetics of adaptation. *Evolution*, 61: pp 995-1016.

- Houde A.E., 1997, in Sex, color, and mate choice in guppies: Princeton: Princeton University Press.
- Inoue J., Donoghue P.C. & Yang Z., 2010, in The impact of the representation of fossil calibrations on Bayesian estimation of species divergence times. *Systematic Biology*, 59: pp 74-89.
- Jambrich A. & Jandzik D., 2012, in Melanism in the topotypic population of the Pannonian subspecies of the common lizard, *Zootoca vivipara pannonica* (Reptilia: Lacertidae). *Herpetology Notes*, 5: pp. 219-221.
- Janeway C.A.J., Travers P., Walport M. & Shlomchik M.J., 2001, in Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. *New York: Garland Science*.
- Jensen J., 2001, in Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology*, 128 (3): pp 471-479.
- Kagan J. C. & Iwasaki A., 2012, in Phagosome as the Organelle Linking Innate and Adaptive Immunity. *Traffic*, 13: pp 1053-1061.
- Karr J.R., 1982, in Population variability and extinction in the avifauna of a tropical land-bridge island. *Ecology*, 63: pp 1975-1978.
- King M.C. & Wilson A.C., 1975, in Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science*, 188: pp 107-116.
- Kingsley E.P., Manceau M., Wiley C.D. & Hoekstra H.E., 2009, in Melanism in *Peromyscus* Is Caused by Independent Mutations in *Agouti*. *PLOS ONE*, 4(7): p e6435.
- Kimura M. & Ohta T., 1971, in Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature*, 229: pp 467-469.
- Klungland H., Våge D.I., Gomez-Raya L., Adalsteinsson S. & Lien S., 1995, in The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome*, 6: pp 636-639.
- Kramer G., 1949, in Uber inselmelanismus bei eidechsen. *Z Indukt Abstamm Ver*, 83: pp 157-164.
- Kumar S., Stecher G. & Tamura K., 2016, in MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 33 (7): pp 1870-1874.
- Lambeck K., Antonioli F. & Anzidei M., 2011, in Sea level change along the Italian coast during the Holocene and projections for the future. *Quaternary International*, 232(1): pp 250-257.

- Lanza B., 1979, in *Universo in miniatura attorno alla Corsica. Geos*, 1: pp 34-51.
- Leng N., Dawson J.A., Thomson J.A., Ruotti V., Rissman A.I., Smits B.M.G., Haag J.D., Gould M.N., Stewart R.M. & Kendziorski C., 2013, in EBSeq: An empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments. *Bioinformatics*.
- Lesack L.F.W. & Melack J.M., 1991, in The deposition, composition, and potential sources of major ionic solutes in rain of the Central Amazon Basin. *Water Resources Research*, 27: pp 2953-2977.
- Leslie G.A. & Clem L.W., 1972, in Phylogeny of Immunoglobulin Structure and Function: VI. 17S, 7.5S and 5.7S anti-DNP of the Turtle, *Pseudamys Scripta. The Journal of Immunology*, 108(6): pp 1656-1664.
- Li B. & Dewey C.N., 2011, in RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1): p 323.
- Lister A.M., 1989, in Rapid dwarfing of red deer on Jersey in the Last Interglacial. *Nature*, 342: pp 539-542.
- Litman G.W., Anderson M.K. & Rast J.P., 1999, in Evolution of antigen binding receptors. *Annual review of immunology*, 17(1): pp 109-147.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D., 2001, in Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT. *Method*, 25: pp 402-408.
- Lo Cascio P. & Corti C., 2008, in Indagini sull'ecologia dei rettili sauri della R.N.O. e del S.I.C. "Isola di Lampedusa". *Naturalista sicil.,S.IV,XXXII,(3-4)*: pp 319-354.
- Lomolino M.V., 1985, in Body size of mammals on islands: the island rule re-examined. *American Naturalist*, 125: pp 310-316.
- Lomolino M.V., 2005, in Body size evolution in insular vertebrates: generality of the island rule. *Journal of Biogeography*, 32: pp 1683-1699.
- Lomolino M.V., Riddle B.R., Whittaker R.J. & Brown J.H., 2010, in *Biogeography*, 4th edn. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Losos J.B., Schoener T.W. & Spiller D.A., 2004, in Predator-induced behaviour shifts and natural selection in field-experimental lizard populations. *Nature*, 432: pp 505-508.
- Lythgoe J.N., 1979, in *The ecology of vision*: Oxford: Clarendon Press.

- Maan M.E. & Seehausen O., 2011, in Ecology, sexual selection and speciation. *Ecol. Lett.*, 14: 591-602.
- Mabberley D.J., 1979, in Pachycaul plants and islands. *Plants and islands* (ed. D. Bramwell), pp 259-277. Academic Press, London.
- MacArthur R.H. & Wilson E.O., 1963, in An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution*, 17: pp 373-387.
- MacArthur R.H. & Wilson E.O., 1967, in The theory of island biogeography. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- MacArthur R.H., Diamond J.M. & Karr J.R., 1972, in Density compensation in island faunas. *Ecology*, 53: pp 330-342.
- Majerus M.E.N., 1998, in Melanism: evolution in action: Oxford: Oxford University Press.
- Marchanolis J.J., 1977, in Immunity in Evolution.
- Marklund L., Johansson Moller M., Juneja R.K., Mariani P., Ellegren H., Andersson L., Høyheim B., Davies W., Fredholm M. & Coppieters W., 1996, in A comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig large white intercross. *Anim. Genet.*, 27: pp 255-269.
- Martin A.P. & Palumbi S.R., 1993, in Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: pp 4087-4091.
- Martin J.A. & Wang Z., 2011, in Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*.
- Mayr E., 1967, in The challenge of island faunas. *Australian Natural History*, 15: pp 369-374.
- McNab B.K., 2002, in Minimizing energy expenditure facilitates vertebrate persistence on oceanic islands. *Ecology Letters*, 5: pp 693-704.
- Medzhitov R., 2001, in Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1(2): pp 135-145.
- Meiri S., Dayan T. & Simberloff D., 2005, in Area, isolation, and size evolution in insular carnivores. *Ecology Letters*, 8: pp 1211-1217.
- Melton R.H., 1982, in Body size and island Peromyscus: a pattern and a hypothesis. *Evolutionary Theory*, 6: pp 113-126.
- Menard H.W., 1986, in Islands. Scientific American Library, New York.

- Mertens R., 1963, in Wie entstand das dunkle Farkleid der Inseleidechsen? *Umsch Wiss Techn*, 6: pp 180-192.
- Mistry J., Finn R.D., Eddy S.R., Bateman A. & Punta M., 2013, in Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic acids research*, 41 (12): p e121.
- Monti D.M., Raia P., Vroonen J., Maselli V., Van Damme R. & Fulgione D., 2013, in Physiological change in an insular lizard population confirms the reversed island syndrome. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.*, 108 (1): pp 144-150.
- Morash B., Li A., Murphy P.R., Wilkinson M. & Ur E., 1999, in Leptin Gene Expression in the Brain and Pituitary Gland. *Endocrinology*, 140(12): pp 5995-5998.
- Morash B., Wilkinson D., Murphy P., Ur E. & Wilkinson M., 2001, in Developmental regulation of leptin gene expression in rat brain and pituitary. *Molecular and cellular endocrinology*, 185(1-2): pp 151-159.
- Morris Y.A. & Crews D., 1990, in The effects of exogenous neuropeptide Y on feeding and sexual behavior in the red-sided garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*). *Brain Research*, 530 (2): pp 339-341.
- Mundy N.I., 2005, in A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. *Proc. Biol. Sci.* 272: pp 1633-1640.
- Muse S.V. & Gaut B.S., 1994, in A likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. *Mol Biol Evol*, 11 (5): pp 715-724.
- Nachman M.W., Hoekstra H.E. & D'Agostino S.L., 2003, in The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 100: pp 5268-5273.
- Novosolov M., Raia P. & Meiri S., 2013, in The island syndrome in lizards. *Journal of Global Ecology and Biogeography*, 22: pp 184-191.
- Novosolov M., Rodda G.H., Feldam A., Kadison A.E., Dor R. & Meiri S., 2016, in Power in numbers. Drivers of high population density in insular lizards. *Global Ecol. Biogeogr.*, 25: pp 87-95.

- Nussey D.H., Wilson A.J. & Brommer J.E., 2007, in The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 20: pp 831-844.
- Ozsolak F. & Milos P.M., 2011, in RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet*, 12: pp 87-98.
- Pafilis P., Meiri S., Foufopoulos J. & Valakos E., 2009, in Intraspecific competition and high food availability are associated with insular gigantism in a lizard. *Naturwissenschaften*, 96: pp 1107-1113.
- Pafilis P., Foufopoulos J., Sagonas K., Runemark A., Svensson E. & Valakos E. D., 2011, in Reproductive biology of insular reptiles: marine subsidies modulate expression of the “Island Syndrome”. *Copeia*, 2011: pp 545-552.
- Page R.D.M. & Holmes E.C., 1998, in *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science, Oxford.
- Panhuis T.M., Butlin R., Zuk M. & Tregenza T., 2001, in Sexual selection and speciation. *Trends Ecol. Evol.*, 16: pp 364-371.
- Parham J.F., Donoghue P.C., Bell C.J. *et al.*, 2012, in Best practices for justifying fossil calibrations. *Systematic Biology*, 61: pp 346-359.
- Pérez-Mellado V., Hernández-Estévez J.A., García-Díez T., Terrassa B., Ramón M.M., Castro J., Picornell A., Martín-Vallejo J. & Brown R., 2008, in Population density in *Podarcis lilfordi* (Squamata, Lacertidae), a lizard species endemic to small islets in the Balearic Islands (Spain). *Amphibia-Reptilia*, 29: pp 49-60.
- Perry G.H., Melsted P., Marioni J.C., Wang Y., Bainer R., Pickrell J.K., Michelini K., Zehr S., Yoder A.D., Stephens M., Pritchard J.K. & Gilad Y., 2012, in Comparative RNA sequencing reveals substantial genetic variation in endangered primates. *Genome Res.*, 22: pp 602-610.
- Pond S.L.K., Frost S.D.W. & Muse S.V., 2004, in HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*, 21: pp 676-679.
- Quevillon E., Silventoinen V., Pillai S., Harte N., Mulder N., Apweiler R. & Lopez R., 2005, in InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic acids research*, 33(suppl 2): pp W116-W120.
- Quispe-Tintaya W., White R.R., Popov V.N., Vijg J. & Maslov A.Y., 2013, in Fast mitochondrial DNA isolation from mammalian cells for next-generation sequencing. *Biotechniques*, 55(3), p 133.

- Raff R.A. & Kaufman T.C., 1983, in *Embryos, Genes, and Evolution: The Developmental-genetic Basis of Evolutionary Change*. Macmillan.
- Raia P., Guarino F.M., Turano M., Polese G., Rippa D., Carotenuto F., Monti D.M., Cardi M. & Fulgione D., 2010, in The blue lizard spandrel and the island syndrome. *BMC Evolutionary Biology*, 10: p 289.
- Raia P. & Meiri S., 2011, in The tempo and mode of evolution: body sizes of island mammals. *Evolution*, 65: pp 1927-1934.
- Raia P., Ferranti L., Castiglione S., Melchionna M., Saggese F., Raimondi R., Serio C., Carotenuto F., Passaro F. & Antonioli F., 2016, in Predicted sea-level changes and evolutionary estimates for age of isolation in Central Mediterranean insular lizards. *The Holocene*, pp 1-9.
- Reguera S., Zamora-Camacho F.J. & Moreno-Rueda G., 2014, in The lizard *Psammodromus algirus* (Squamata: Lacertidae) is darker at high altitudes. *Biol J Linn Soc*, 112 (1): pp 132-141. doi: 10.1111/bij.12250.
- Ricciardi M., 1996, in Flora di Capri (Golfo di Napoli). *Annali di Botanica*, 54: pp 7-169.
- Richner H., Oppliger A. & Christe P., 1993, in Effect of an Ectoparasite on Reproduction in Great Tits. *Journal of Animal Ecology*, 62 (4): pp 703-710.
- Rieder S., Taourit S., Mariat D., Langlois B. & Gu B., 2001, in Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mamm. Genome*, 12: pp 450-455.
- Robbins L.S., Nadeau J.H., Johnson K.R., Kelly M.A., Roselli-Rehfuss L., Baack E., Mountjoy K.G. & Cone R.D., 1993, in Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*, 72: pp 827-834.
- Robertson G., Schein J., Chiu R., Corbett R., Field M., Jackman S.D., Mungall K., Lee S., Okada H.M., Qian J.Q. *et al.*, 2010, in De novo assembly and analysis of RNA-seq data. *Nat. Meth.*, 7 (11): pp 909-912.
- Rodda G.H., Perry G., Rondeau R.J. & Lazell J., 2001, in The densest terrestrial vertebrate. *J. Tropical Ecol.*, 17: pp 331-338.

- Rodda G.H. & Dean-Bradley K., 2002, in Excess density compensation of island herpetofaunal assemblages. *Journal of Biogeography*, 29: pp 623-632.
- Roff D.A., 2002, in Life History Evolution Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Romero I.G., Ruvinsky I. & Gilad Y., 2012, in Comparative studies of gene expression and the evolution of gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 13: pp 505-516.
- Rosenblum E.B., Hoekstra H.E. & Nachman M.W., 2004, in Adaptive reptile color variation and the evolution of the Mc1r gene. *Evolution*, 58: pp 1794-1808.
- Rosenblum E.B., Römpler H., Schöneberg T. & Hoekstra H.E., 2010, in Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 107: pp 2113-2117.
- Rosindell J. & Phillimore A.B., 2011, in A unified model of island biogeography sheds light on the zone of radiation. *Ecology Letters*, 14: pp 552-560.
- Roulin A., 2004, in The evolution, maintenance and adaptive function of genetic colour polymorphism in birds. *Biol Rev*, 79: pp 815-848.
- Rundle H. & Nosil P., 2005, in Ecological speciation. *Ecol. Lett.*, 8: pp 336-352.
- Saino N., Szép T., Ambrosini R., Romano M. & Møller A.P., 2004, in Ecological conditions during winter affect sexual selection and breeding in a migratory bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1540): pp 681-686.
- Sanseverino W., Hénaff E., Vives C., Pinosio S., Burgos-Paz W., Morgante M., Ramos-Onsins S.E., Garcia-Mas J. & Casacuberta J.M., 2015, in Transposon insertion, structural variations and SNPs contribute to the evolution of the melon genome. *Molecular Biology and Evolution*.
- School M.A. & Ingebritsen S.E., 1995, in Total and non-seasalt sulphate and chloride measured in bulk precipitation samples from the Kilauea Volcano area, Hawaii. *Water-Resource Investigations- U.S. Geological Survey Report*. USGS California, USA. pp 32.

- Shekar S.N., Duffy D.L., Frudakis T., Montgomery G.W., James M.R., Sturm R.A. & Martin N.G., 2008, in Spectrophotometric methods of quantifying pigmentation human hair-influence of MC1R genotype and environment. *Photochem.*, 84: pp 719-726.
- Shuster S.M. & Wade M.J., 2003, in Mating systems and strategies Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Simms D., Cizdziel P.E. & Chomczynski P., 1993, in TRIZOL: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 15: pp 99-102.
- Smit A.F.A., Hubley R. & Green P., 1996-2010, in RepeatMasker Open. In., 3.0 edn.
- Smith-Unna R.D., Boursnell C., Patro R., Hibberd J.M. & Kelly S., 2015, in TransRate: reference free quality assessment of de-novo transcriptome assemblies. *bioRxiv*.
- Sobel J.M., Chen G.F., Watt L.R. & Schemske D.W., 2010, in The biology of speciation. *Evol.*, 64: pp 295-315.
- Stamps J.A. & Buechner M., 1985, in The territorial defence hypothesis and the ecology of insular vertebrates. *Quart. Rev. Biol.*, 60: pp 155-181.
- Stocco D.M., 2001, in StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual review of physiology*, 63: pp 193-213.
- Surget-Groba Y. & Montoya-Burgos J.I., 2010, in Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data. *Genome research*, 20(10): pp 1432-1440.
- Takeda K. & Akira S., 2005, in Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17 (1): pp 1-14.
- Takeuchi S., Suzuki J., Yabuuchi M. & Takahashi S., 1996, in A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in chicken. *Biochim. Biophys. Acta* 1308: pp 164-168.
- Tamura K., Battistuzzi F.U., Billing-Ross P., Murillo O., Filipinski A. & Kumar S., 2012, in Estimating Divergence Times in Large Molecular Phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: pp 19333-19338.
- Thayer G.H., 1909, in Concealing-coloration in the animal kingdom: an exposition of the laws of disguise through color and pattern: being a summary of Abbott H. Thayer's discoveries. New York: Macmillan.

- Theron E., Hawkins K., Bermingham E., Ricklefs R. & Mundy N.I., 2001, in The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: a point mutation in the melanocortin-1 receptor is perfectly associated with melanism in the bananaquit (*Coereba flaveola*). *Curr. Biol.*, 11: pp 550-557.
- Thomas G.H., Meiri S. & Phillimore A.B., 2009, in Body size diversification in Anolis: novel environment and island effects. *Evolution*, 63: pp 2017-2030.
- Urb M., & Sheppard D.C., 2012, in The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS Pathog*, 8(4), p e1002619.
- Våge D.I., Lu D., Klungland H., Lien S., Adalsteinsson S. & Cone R.D., 1997, in A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nat. Genet.*, 15: pp 311-315.
- Van der Geer A., Lyras G., de Vos J. & Dermitzakis M., 2010, in Evolution of Island Mammals. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Van Valen L.M., 1973, in A new evolutionary law. *Evol. Theory*, 1: pp 1-30.
- Vences M., Gal P., Vieites D.R., Puente M., Oetter K. & Wanke S., 2002, in Field body temperatures and heating rates in a montane frog population: the importance of black dorsal pattern for thermoregulation. *Ann. Zool. Fennici*, 39: pp 209-220.
- Veneklaas E.J., 1990, in Nutrient fluxes in bulk precipitation and throughfall in two montane tropical rain forests, Columbia. *Journal of Ecology*, 78: pp 974-992.
- Vervust B., Grbac I., VanDamme R., 2007, in Differences in morphology, performance and behaviour between recently diverged populations of *Podarcis sicula* mirror differences in predation pressure. *Oikos*, 116: pp 1343-1352.
- Wang Y., Zhang Z., Chen L., Guang H., Li Z., Yang H. *et al.*, 2011, in Cathelicidin-BF, a Snake Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptide, Could Be an Excellent Therapeutic Agent for Acne Vulgaris. *PLoS ONE* 6(7): p e22120.
- Wang Z., Gerstein M. & Snyder M., 2009, in RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10: pp 57-63.
- Waterloo M.J., Schelleken J., Bruijnzeel L.A., Vugts H.F., Assenberg P.N. & Rawaqa T.T., 1997, in Chemistry of bulk precipitation in southwestern Viti Levu, Fiji. *Journal of Tropical Ecology*, 13: pp 427-447.

- Weijers E.P. & Vugts H.F., 1990a, in An observational study on precipitation chemistry data as a function of surface wind direction. *Water, Air, and Soil Pollution*, 52: pp 115-132.
- Weijers E.P. & Vugts H.F., 1990b, in The composition of bulk precipitation on a coastal island with agriculture compared to an urban region. *Atmospheric Environment*, 24A: pp 3021-3031.
- West P.M. & Packer C., 2002, in Sexual selection, temperature, and the lion's mane. *Science*, 297: pp 1339-1343.
- Whittaker R.J. & Fernández-Palacios J.M., 2007, in *Island Biogeography: Ecology, Evolution, and Conservation*. Oxford University Press, USA.
- Wilcox B.A., 1978, in Supersaturated island faunas: a species-age relationship for lizards on post-Pleistocene land-bridge islands. *Science*, 199: pp 996-998.
- Williamson M.H., 1981, in *Island populations*. Oxford University Press, Oxford.
- Wright S.J., 1980, in Density compensation in island avifaunas. *Oecologia*, 45: pp 385-389.
- Zamudio K.R. & Greene H.W., 1997, in Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for Neotropical biogeography, systematics and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 62: pp 421-442.
- Zhang J., 2000, in Rates of Conservative and Radical Nonsynonymous Nucleotide Substitutions in Mammalian Nuclear Genes. *Journal of Molecular Evolution*, 50(1): pp 56-68.
- Zuckerkindl E. & Pauling L., 1962, in Molecular disease, evolution, and genic heterogeneity. In: *Horizons in Biochemistry* (eds Kasha M, Pullman B), pp. 189-225. Academic Press, New York, USA.
- Zuckerkindl E., & Pauling L., 1965, in Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving Genes and Proteins* (eds Bryson V, Vogek HJ), pp. 97-166. Academic Press, New York.
- Zunino M. & Zullini A., 2004, in *Biogeografia. La dimensione spaziale dell'evoluzione*.