

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Corso di Laurea Specialistica in Conservazione e Gestione del Patrimonio Naturale

CARATTERIZZAZIONE GENETICA
DELLE POPOLAZIONI ITALIANE DI PICCHIO NERO

Tesi di Laurea di:

DAVIDE ALBERTI

Relatore:

Prof. ETTORE RANDI

Correlatore:

Dott.ssa ELENA FABBRI

Sessione II

Anno Accademico 2008 - 2009

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 5
CAPITOLO 1: Biologia della specie	
1.1 Inquadramento sistematico	pag. 7
1.2 Tassonomia	pag. 10
1.3 Distribuzione	pag. 11
1.3.1 Presenza lungo l' Arco Alpino	
1.3.2 Presenza in Appennino	
1.3.3 Presenza in Romagna.	
1.3.4 Presenza all'interno del Parco delle Foreste Casentinesi	
1.4 Morfologia	pag. 17
1.5 Movimenti migratori	pag. 18
1.6 Vocalizzazioni	pag. 19
1.7 Biologia Riproduttiva	pag. 20
1.8 Ecologia	pag. 21
1.9 Importanza del Picchio nero all'interno di habitat forestali	pag. 22
CAPITOLO 2: Scopo della ricerca	pag. 27
CAPITOLO 3: Materiali e metodi	
3.1 Campionamento	pag. 31
3.2 Conservazione dei campioni	pag. 33
3.3 Scelta del marcatore genetico	pag. 34
3.4 Estrazione del DNA	pag. 38
3.5 Amplificazione del DNA	pag. 40
3.6 Controllo su gel di agarosio	pag. 46
3.7 Sequenziamento del DNA	pag. 47
3.8 Analisi filogenetica	pag. 51

CAPITOLO 4: Risultati	
4.1 Resa dei campioni	pag. 57
4.1.2 Resa del D-loop	
4.1.1 Resa del citocromo b	
4.2 Analisi del il β-fibrinogeno introne 7	pag. 59
4.3 Analisi del cytochromo b	pag. 59
4.4 Analisi del dominio ipervariabile I della regione di controllo del mtDNA	pag. 63
4.5 Analisi complessiva dei due marcatori utilizzati	pag. 68
CAPITOLO 5: Discussione	pag. 71
CONCLUSIONI	pag. 79
BIBLIOGRAFIA	pag. 81

INTRODUZIONE

La scelta di realizzare una ricerca riguardante il Picchio nero, *Dryocopus martius* (Linnaeus, 1758), nasce dall'interesse che la specie ha suscitato negli ultimi anni a seguito di nuove osservazioni al di fuori dell'areale riproduttivo italiano. Il picchio nero, presente in modo pressoché continuo lungo tutta la regione paleartica e l'Europa, ha mostrato un'evidente espansione territoriale a partire dagli anni '50, trend che è stato riconosciuto anche in Italia (Cramp *et al.*, 1985; BirdLife International, 2004). Questo ha portato da un lato ad una sua sempre più frequente presenza anche in aree a bassa quota lungo tutto l'arco alpino, dall'altra alla colonizzazione di nuovi siti lungo la catena appenninica (Brichetti e Fracasso, 2007). L'areale italiano oggi vede includere l'intero arco alpino ed in modo discontinuo la catena appenninica, in cui troviamo popolazioni consistenti in Campania, Basilicata e Calabria e nuclei riproduttivi minori in Abruzzo e sull'Appennino tosco-romagnolo. La notizia della presenza di alcune coppie riproduttive in quest'ultima zona, ed in particolare all'interno del Parco delle Foreste Casentinesi, Monte Falterona e Campigna (Ceccarelli *et al.*, 2003; Ceccarelli *et al.*, 2008), ha rappresentato una novità per l'Emilia-Romagna ed il Casentino, che conoscevano solamente poche segnalazioni storiche risalenti alla fine del '700 (Ginanni, 1774; Tramontani, 1801; Zangheri, 1938).

L'interesse per la conservazione del picchio nero, così come per l'intera famiglia dei picidi, è giustificato dal ruolo che essi rivestono all'interno di ecosistemi forestali, nel mantenere struttura e diversità delle comunità animali (Johnsson *et al.*, 1993; Martin e Eadie, 1999; Pirovano *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2004). Alla loro importanza dal punto di vista ecologica si accompagna tuttavia la totale mancanza in ambito italiano di dati di tipo genetico, discorso valido per tutte le specie nidificanti sul territorio nazionale. Nasce quindi la necessità di intraprendere un progetto a livello nazionale che miri ad approfondire le conoscenze genetiche sulla famiglia. Il presente lavoro va in questa direzione, nella speranza che un lavoro preliminare focalizzato su una singola specie possa rappresentare uno stimolo alla conservazione dell'intera famiglia.

CAPITOLO 1

BIOLOGIA DELLA SPECIE

1.1 Inquadramento sistematico.

L'ordine dei *Piciformes* comprende specie largamente distribuite in tutto il pianeta ad eccezione dell'Oceania, con particolare biodiversità ai tropici (Cramp, 1985). Viene riconosciuta da Wetmore (1960) l'origine monofiletica del taxon, suddivisibile in 6 famiglie:

- (1) *Galbulidae*, (*Jacamars*) presenti in America centro-meridionale;
- (2) *Bucconidea*, (*Puffbirds*) distribuite anch'esse in America centro-meridionale;
- (3) *Capitonidea*, (*Barbets*) presenti ai tropici nel vecchio e nel nuovo continente;
- (4) *Ramphastidea*, (*Toucans*) distribuite in America centro-meridionale
- (5) *Indicatoridea*, specie presenti in Africa e nel sud dell'Asia;
- (6) *Picidae*, distribuiti lungo la regione Palearctica.

L'ipotesi monofiletica del gruppo viene confermata, in modo del tutto indipendente, sia da Simpson e Cracraft (1981) tramite dati osteologici, che da Swierczewski e Raikow (1981) tramite l'analisi di caratteristiche miologiche. I due studi giungono alla medesima conclusione, ovvero la collocazione di *Bucconidae* e *Galbulidae* nel sottordine dei *Galbulae*, il quale presenterebbe caratteri primitivi rispetto ad i restanti gruppi collocati all'interno dei *Pici*, in cui troviamo maggiore affinità tra *Ramphastidea* e *Capitonidae*, e tra *Picidae* ed *Indicatoridae*.

Diversi autori hanno tuttavia messo in discussione il carattere monofiletico dei *Piciformes* sottolineando la maggiore affinità fra *Galbulae* e *Coraciformes* e fra *Pici* e *Passeriformes* sia su base morfologica (Burton, 1983; Olson, 1983) che molecolare (Lanyon e Zink, 1987; Sibley e Ahlquist, 1990). A queste valutazioni vanno tuttavia aggiunte le più recenti comparazioni genetiche, le quali sembrano confermare, la sostanziale origine monofiletica sia dei *Piciformes*, che dei sottordini *Pici* e *Galbulae*, così come la stretta parentela tra *Picidae* ed *Indicatoridea* e tra *Ramphastelidae* e *Capitonidae* (fig. 1.1) (Johansson *et al.*,

2000; Johansson e Ericson, 2003; Mayr *et al.*, 2003; Cracraft *et al.*, 2004; Ericson *et al.*, 2006; Mayr, 2007).

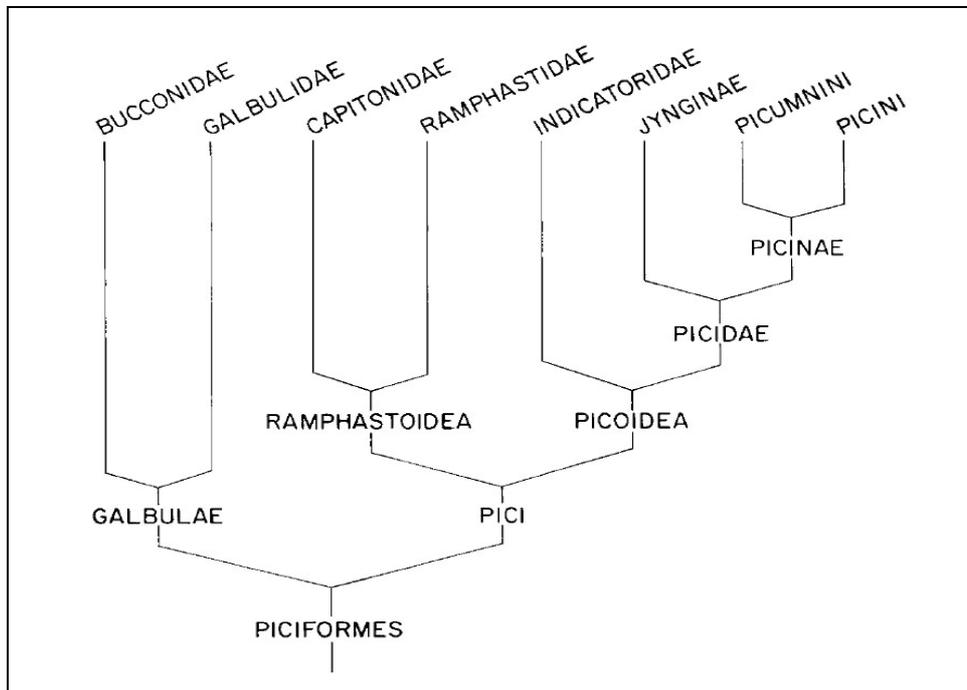


Figura 1.1 - Relazioni filogenetiche interne ai Piciformes (da Swierczewski e Raikow, 1981).

I caratteri sinapomorfi grazie ai quali è possibile proporre ed accettare l'origine monofiletica del gruppo sono principalmente correlati alle caratteristiche osteologiche e miologiche degli arti posteriori. Occorre sottolineare tuttavia che il carattere zigodattilo del piede, con il I ed il IV dito rivolti all'indietro ed il II ed il III in avanti, non sia esclusivo dei *Piciformes* ma compaia anche nei *Cuculidae* e negli *Psittaciformes* in cui però sembra essersi evoluto in modo indipendente (Simpson e Cracraft, 1981; Olson, 1983; Johansson e Ericson, 2003). A questo si aggiungono le caratteristiche dell'apparato alimentare, come il particolare sviluppo delle ghiandole salivari e dell'osso ioideo particolarmente lungo, tale da permettere una notevole estrusione della lingua (Cramp *et al.*, 1985).

Per quanto riguarda la famiglia di appartenenza di *D. martius*, recenti studi genetici su storia evolutiva e filogenesi dei *Picidae* hanno aiutato a chiarire l'organizzazione della famiglia, all'interno della quale vengono riconosciuti tre sottogruppi come mostrato in figura 1.2 (Cramp *et al.*, 1985; Webb e Moore, 2005; Benz *et al.*, 2006):

1. *Jynginae*, con due specie all'interno dell'unico genere *Jinx*, ovvero *J. torquilla* distribuito nella regione Palearctica, e *J. ruficollis* presente in Africa ai tropici;
2. *Picumninae*, con circa 29 specie distribuite in sud America, Africa centrale e sudest asiatico;
3. *Picinae*, raggruppati in *Megapicini*, *Dendropicini* e *Malarpicini*. All'interno dei *Malarpicini* troviamo, strettamente associato al sister-group *Mulleripicus*, il genere *Dryocopus*, comprendente: *D. pileatus* diffuso in Nord America, *D. lineatus*, *D. galeatus* e *D. schulzi* in Sud America, *D. javensis* e *D. hodgei* nelle foreste tropicali dell'Asia e *D. Martius* presente nella regione Palearctica.

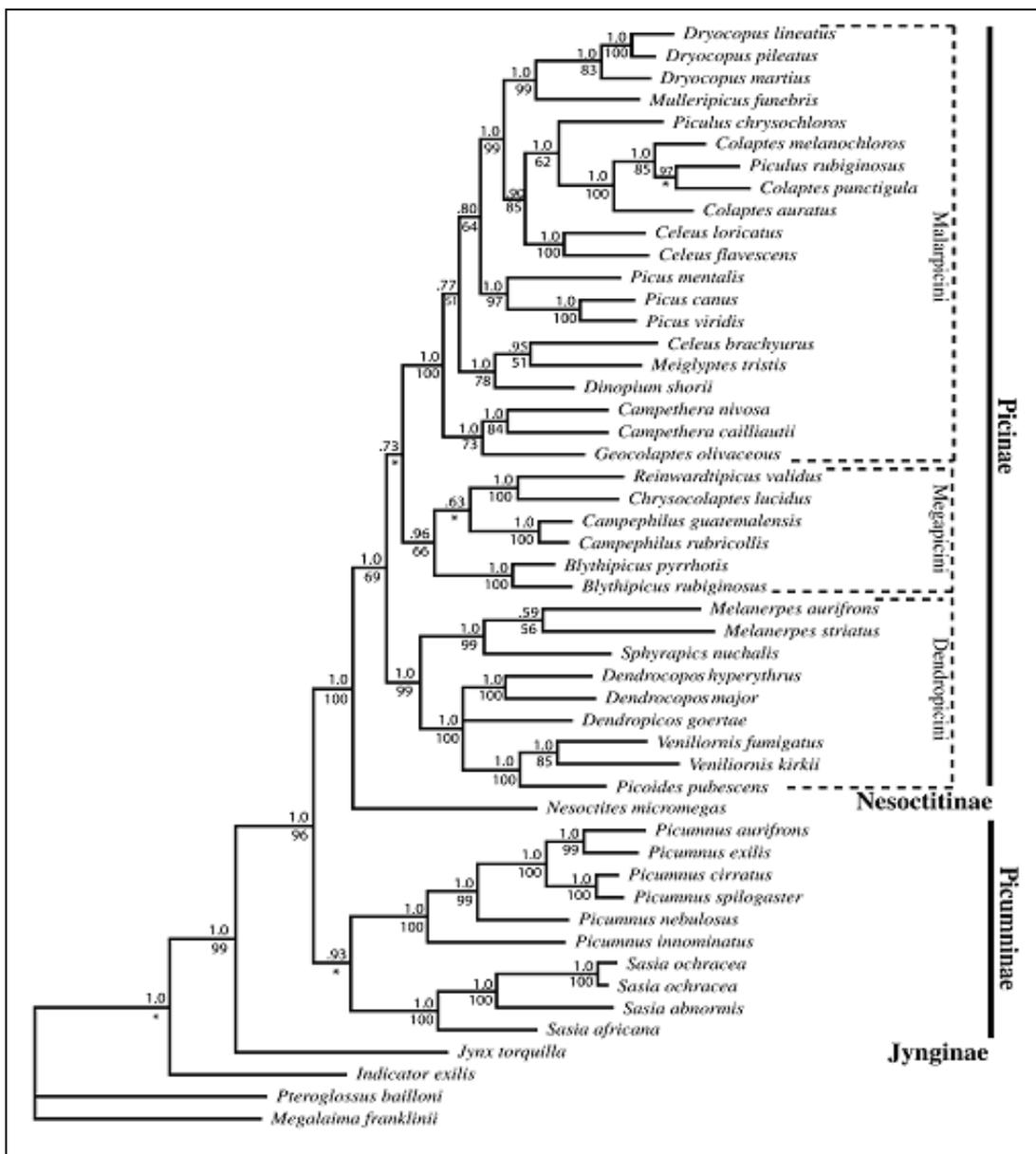


Figura 1.2 - Relazioni filogenetiche interne alla famiglia dei Picidae (da Benz *et al.*, 2006).

1.2 Tassonomia

Il Picchio nero, *Dryocopus martius* (Linnaeus, 1758), è specie politipica a distribuzione eurosibirica. Descritto per la prima volta da Linneo che lo collocava nel genere *Picus*, è stato successivamente ascritto al genere *Dryocopus* (dal greco “*drus*”, pianta e “*kopto*”, percuoto). Secondo Vaurie (1959) è possibile distinguere due sottospecie: *D. martius martius* (Linnaeus, 1758), sottospecie nominale presente in Italia e distribuita dalla Spagna fino a Cina ed al Giappone e *D. martius khamensis* (Buturlin, 1909), isolato geograficamente e limitato al sud-est della Cina. Quest’ultimo presenta alcuni caratteri differenziali, tra cui una colorazione nera maggiormente lucida ed un becco proporzionatamente più corto, leggero e di dimensioni minori.

Dementjew (1939) inoltre riconosce una terza sottospecie *Dryocopus martius pinetorum* (C.L. Brehm, 1832) distribuita dall’Europa ad est della Polonia fino al Caucaso ed Asia minore, che Vaurie non riconosce e colloca all’interno della specie nominale *martius*. Considerando le variazioni minime nei caratteri corporei delle popolazioni, procedendo dalla Scandinavia verso i settori più orientali, e l’ampia sovrapposizione nelle misure, è da escludere la conferma della sottospecie *pinetorum* (Vaurie, 1959).

In ogni caso, pur assumendo come valida la classificazione di Dementjew, gli esemplari presenti in Italia rimangono comunque da ascrivere alla sottospecie nominale *martius*. Rimane invece aperta la questione relativa alla caratterizzazione delle popolazioni relitte presenti in sud Italia, completamente isolate dai settori alpini. Perco (1978) in uno studio preliminare per la reintroduzione del picchio nero nel Parco Nazionale d’Abruzzo affermava: “*Non esistono elementi per separare la popolazione di Picchi neri dell’Italia meridionale da quella dell’Italia settentrionale da cui, eventualmente, si pensa di prelevare i soggetti per la reintroduzione*”.

La questione viene riproposta da Kalby (1985) il quale analizza la biometria di esemplari italiani conservati in collezioni museali e private trovando alcune differenze con cui poter discriminare le due popolazioni. Nonostante l’evidente ridotto campionamento e la non significatività dal punto di vista statistico delle differenze tra le lunghezze alari (utilizzate come indice di dimensione corporea),

l'autore suggerisce, a proposito delle ipotesi di reintroduzione, di “*riesaminare la questione approfondendo la biometria delle popolazioni provenienti dal sud Italia*”.

1.3 Distribuzione

Il picchio nero è una specie a distribuzione paleartica il cui areale coincide con la presenza di aree forestali sia boreali che temperate. Diffusa dal nord della Spagna, attraverso l'Asia centro-settentrionale fino in Giappone, Sachalin e Kamchatka, in Europa mostra una distribuzione continua in tutto il continente, ad eccezione di Gran Bretagna ed Irlanda. La popolazione è stimata in 740.000 - 1.400.000 coppie con trend di stabilità o espansione dell'areale ed incremento numerico negli ultimi anni che ha portato la specie ad occupare aree anche in pianura a partire dagli anni '50 in molte tra le popolazioni europee, inclusa quella russa stimata in circa 500.000 - 1.000.000 di coppie (Cramp *et al.*, 1985; BirdLife International, 2004). Le zone meridionali dell'areale ospitano popolazioni relitte, come nei Pirenei e negli stessi Appennini in corrispondenza di importanti sistemi montuosi (Bocca e De Franceschi, 1983). La figura 1.3 mostra l'areale di distribuzione di *D. martius* e dei congeneri *D. pileatus* e *D. lineatus*.

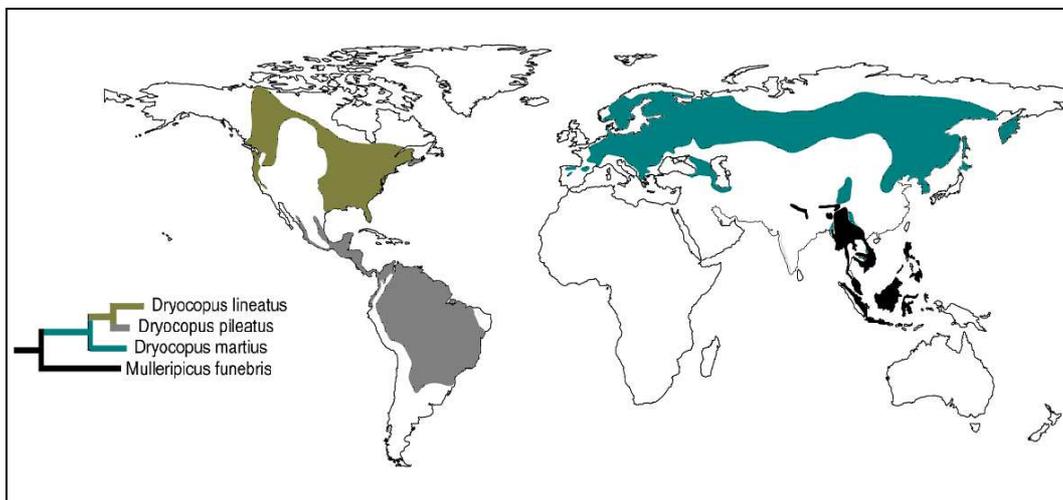


Figura 1.3 - Distribuzione di *D. martius* e dei congeneri *D. lineatus* e *D. pileatus* (da Benz *et al.*, 2006, modificata).

1.3.1 Presenza lungo l'Arco Alpino. Storicamente segnalato su tutto l'arco alpino in piccole colonie separate tra loro da grandi distanze, il picchio nero era considerato uccello raro e localizzato a causa dei grandi ed estesi disboscamenti

(Martorelli, 1906; Giglioli, 1907; Arrigoni Degli Oddi, 1929). Ad oggi sulle Alpi è presente una popolazione sedentaria e nidificante stimata in 1.300-3.700 coppie, disposte in modo discontinuo con evidenti lacune nei settori occidentali. Risulta più frequente in Trentino Alto Adige, Veneto e Friuli Venezia Giulia nonché in Val d'Aosta dove si è assistito ad una recente tendenza all'aumento (Brichetti, 1987; Pedrini *et al.*, 2005). Lo stesso trend lo si ritrova in molte aree a partire dagli anni '80 verso i settori prealpini e collinari, dove il mancato utilizzo dei cedui o i mutati metodi di gestione selvicolturale hanno migliorato l'idoneità ambientale per la specie (Zenatello, 2003).

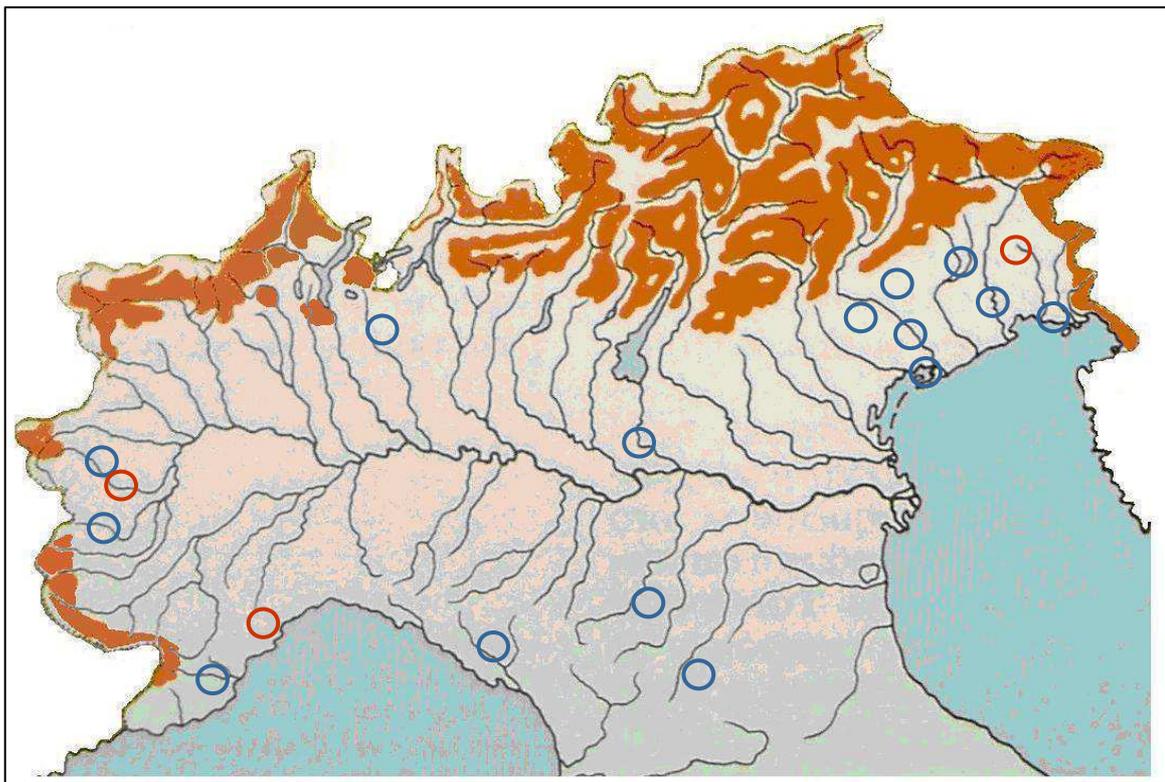


Figura 1.4 - Areale riproduttivo di *D. martius* sull'arco alpino; sono indicati i casi di riproduzioni accertate extra - areale in rosso e le segnalazioni in periodo non riproduttivo in blu (da Brichetti, 1987, modificata).

Esempi a dimostrazione del trend positivo della specie si possono trovare lungo tutto l'arco alpino, come dimostra la figura 1.4. In Friuli Venezia Giulia sono note segnalazioni per la bassa pianura pordenonese, nei pressi di Cordenons (Parodi, 2004). E' accertata la riproduzione in vari siti del carso Goriziano e Monfalconese nella zona del Lago di Doberdò (Felcher e Zorzeron, 1999), così come lo svernamento regolare nella Riserva Naturale Regionale "Foce dell'Isonzo" (Utmar, 2003). Recentemente è stata accertata l'espansione territoriale e

l'incremento sul Carso Triestino e confermata la riproduzione in pianura lungo il fiume Isonzo, con il ritrovamento in diversi siti di nidi su Pioppo nero, *Populus nigra* (Utmar e Padovan, 2005).

In Veneto la specie ha manifestato una progressiva diffusione che dagli anni '80 l'ha portata all'occupazione delle aree collinari e pedemontane, con nidificazioni accertate a quote comprese fra i 100 m ed i 480 m (Martignago, 1992; Martignago *et al.*, 2001). Numerose invece sono le segnalazioni relative al trevigiano in zone di pianura sia in inverno che in periodo riproduttivo (Mezzavilla *et al.*, 1999), tra cui l'avvistamento di un individuo persino presso Punta Sabbioni in provincia di Venezia (Bon *et al.*, 2006).

In Lombardia nel 2001 viene riportato un caso di svernamento in Pianura Padana presso il Bosco della Fontana in provincia di Mantova, fenomeno inedito per la pianura lombarda (Longo *et al.*, 2002), e presso Tradate in provincia di Varese a notevole distanza dai siti di riproduzione (Brichetti e Fracasso, 2007).

Nell'alta Ossola ed in Valle d'Aosta il Picchio nero è stato segnalato in pianura in periodo riproduttivo in un'area ripariale del torrente Dora Baltea (Passerin d'Entreves e Rolando, 1990) oltre che in altre zone pedemontane, in provincia di Torino, al di fuori dell'areale alpino noto, con alcune nidificazioni accertate (Alessandria *et al.*, 2002).

In Liguria, infine, viene data notizia nel 1994 di una prima nidificazione avvenuta in provincia di Savona. Successivamente giungono segnalazioni della specie in periodo non riproduttivo in diverse zone, in particolare viene avvistata nella parte orientale delle Alpi Liguri ed all'estremità orientale della Liguria in ambiente atipico ad un'altitudine di 400 m (Spanò e Truffi, 1987, 1988, Spanò *et al.*, 1998). Sono interessanti come dati, per quanto riguarda l'Appennino settentrionale, una segnalazione del 1984 nei Boschi di Faeto a Serramazzoni in provincia di Modena (Bertarelli, com. pers. in Ceccarelli *et al.*, 2008) e più recentemente nell'Appennino bolognese, nella zona dei laghi di Suviana e Brasimone (Zenatello, ined.).

1.3.2 Presenza in Appennino. La popolazione di picchio nero presente sulla catena appenninica viene stimata come inferiore a 100-150 coppie (Brichetti e Fracasso, 2007). L'areale riproduttivo si distribuisce, come evidenziato in figura 1.5, in stazioni relitte isolate dai settori alpini, confinate in Calabria, Campania,

Basilicata ed Abruzzo considerate da alcuni autori come relitti glaciali (Di Carlo, 1972). Le prime notizie riguardo alla specie in sud Italia risalgono agli anni '50 e '60, mentre è molto più recente la scoperta di un nucleo riproduttivo nell'Appennino tosco-emiliano all'interno del Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi.

Passando in rassegna le notizie storiche riguardanti la specie, vediamo come esistano numerose citazioni di diversi autori tra la fine dell'800 e l'inizio del '900. In Appennino centrale sono riportate come dubbie e da confermare le notizie relative alla presenza del Picchio nero (Giglioli, 1907; Arrigoni Degli Oddi, 1929); alcuni ipotizzano che “*sia meno raro di quanto si credeva*” (Martorelli, 1906). Notizie di uccisioni di individui di picchio nero e di esemplari conservati sono inoltre riportati da alcuni autori (Salvatori, 1872; De Leone, 1908; Arrigoni degli Oddi, 1929; Di Carlo, 1972). Per l'Appennino meridionale il Giglioli (1907) riporta di aver visto in Calabria “*una coppia di Picchi neri, in mezzo ad una folta pineta*”, il Martorelli (1906) ci parla di un individuo forse ucciso “*nelle alte selve del Gargano*”, Arrigoni Degli Oddi (1929) ci informa di esemplari di provenienza meridionale conservati in alcune collezioni.

In Appennino meridionale le conferme sulla presenza del Picchio nero arrivano a partire dagli anni '50-'60. Per primo Stresemann (1957) rileva la presenza di almeno sei esemplari nei boschi che dal Pollino vanno verso il monte Dolcedorme, seguito dal Moltoni (1964) per quanto riguarda la Sila. La specie viene ancora osservata negli anni successivi sia in Calabria (Di Carlo, 1965; Tralongo, 1978; Bevacqua, 1984) che in Campania in provincia di Salerno (Kalby, 1976; Massa e Massa, 1978; D'acunto, 1979). La lunga serie di segnalazioni porta nel corso degli anni '70 ed '80 a confermare la sicura esistenza di popolazioni vitali in Calabria su Aspromonte e Sila, tra la Calabria e la Basilicata, su Pollino e Dolcedorme, ed in tutti i maggiori complessi montuosi della Campania: Alburni, Picentini, Cervati e Gelbison (Kalby *et al.*, 1985).

In Appennino centrale, le prime notizie riguardanti la specie risalgono agli anni '70 per un'area “*molto a Nord del parco Nazionale d'Abruzzo*”, ovvero sui Monti Reatini nel Lazio vicino al confine con l'Abruzzo (Di Carlo, 1972; Castiglia *et al.*, 1976), cosa che indusse riflessioni sull'effettiva distribuzione delle due specie e sull'ipotesi di una possibile reintroduzione del Picchio nero in alcune foreste appenniniche, avanzata da Di Carlo (1976). A seguito della notizia della presenza

della specie in Appennino centrale ed in risposta alle considerazioni di Di Carlo (1972), viene realizzato uno “*Studio preliminare per la reintroduzione del Picchio nero nel Parco Nazionale d’Abruzzo*” su commissione del Centro Studi Ecologici Appenninici del Parco stesso (Perco, 1978).

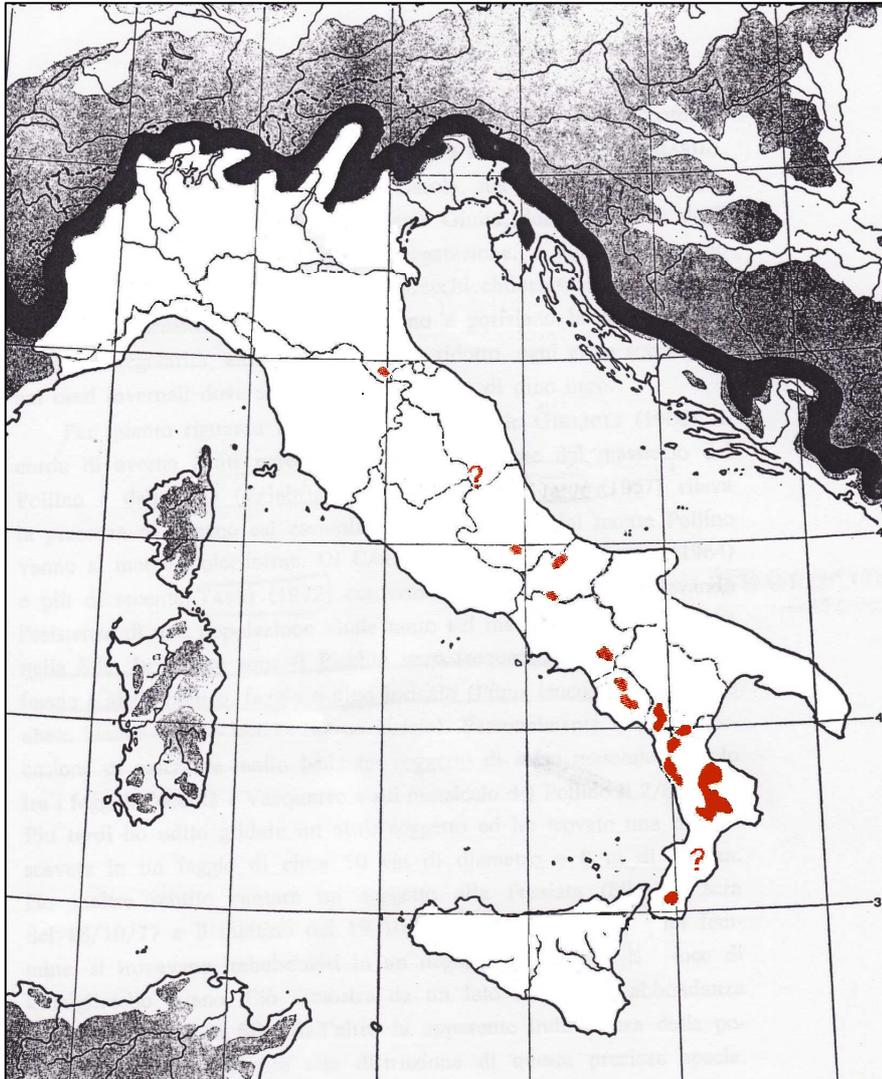


Figura 1.5 - Areale riproduttivo di *D. martius* in Appennino centro-meridionale (da Perco, 1978, modificata).

L'ipotesi che il Picchio nero non possa tornare spontaneamente in Appennino centrale per “*la condizione di isolamento in cui si trovano attualmente le zone idonee alla sopravvivenza di questa specie sull’Appennino*” (Perco, 1978), viene tuttavia smentita negli anni successivi dapprima da Bernoni (1992) e successivamente dal Pellegrini e De Marco (1995). Quest’ultimi confermano la riproduzione della specie nell’abetina di Rosello ed in altre località del massiccio

del Gran Sasso e dei Monti della Laga, confermando così la presenza di una piccola popolazione nei boschi misti ad Abete bianco tra l’Abruzzo ed il Molise (Pellegrini e De Marco, 1995; Pichera e Pellegrini, 1999).

In Sicilia, infine, il Picchio nero era considerato nidificante nell’ottocento (Benoit, 1840) anche se specie molto rara (Giglioli, 1907). Alcuni autori riportano, con qualche dubbio, la sua presenza fino all’inizio del secolo scorso (Salvadori, 1872; Martorelli, 1906; Arrigoni Degli Oddi, 1929), forse frutto di tentativi di immigrazione dal continente (Massa, 1985).

1.3.3 Presenza in Romagna. Sulla presenza del Picchio nero nell’Appennino settentrionale esistono alcune testimonianze storiche che inducono a ipotizzare che la specie potesse essere presente nei secoli passati. La segnalazione per il Pesarese, risalente al ‘500, fornita da Costanzo Felici da Piobbico, riferisce di un *“corvo con in capo una macchia rossa”* che *“volentieri d’inverno sta nascosto nelle cave d’arbori”*. Considerato che anche Aldrovandi collocava il Picchio nero tra i corvi, è verosimile che l’autore si riferisca ad esso, anche per il riferimento alle abitudini della specie (Pandolfi e Giacchini, 1995). Il Giglioli (1907) ci ricorda che il Savi collocava il Picchio nero nei fitti boschi di Sasso Forte della Maremma Toscana oggi scomparsi, così come la specie da quei luoghi.

Elencato fra le specie del Casentino a inizio ‘800, il quale a quei tempi comprendeva anche territori romagnoli (Tramontani, 1801), veniva già citato dal Ginanni (1774), il quale, riferendosi alle Pinete Ravennati, scrive: *“Forma egli nelle medesime il suo nido”*. La specie tuttavia risultava scomparsa e di conseguenza esclusa dall’avifauna dal ravennate già dai primi del novecento (Imparati, 1934).

Il Picchio nero viene considerato *“accidentale”* e *“rarissimo”* da Pietro Zangheri (1938), il quale afferma di non ritenere *“probabile che esso possa oggi presentarsi, anche accidentalmente, in Romagna”*. Riporta inoltre le parole dal Majoli verso la fine del ‘700 che ricorda *“di avere avuto, una sola volta, questo uccello dalle Pinete Ravennati”*, e le indicazioni di Don Giuseppe Bosi di Marradi che afferma di *“averne veduto un esemplare preso nel 1889 in quel di Casola Valsenio in una pineta”*. A tal proposito ricordiamo come il Doderlein assicurasse che il Picchio nero potesse essere incontrato *“talora nei boschi dell’alta montagna del Modenese”* (Salvadori, 1872).

1.3.4 Presenza all'interno del Parco delle Foreste Casentinesi. Le prime segnalazioni per quanto riguarda il picchio nero all'interno delle Foreste Casentinesi risalgono al 2000 (Agostini, oss. pers.), anno in cui sono iniziate le ricerche volte a chiarire l'effettiva distribuzione della specie.

La posizione dei fori di alimentazione, dei nidi ritrovati e la serie di osservazioni effettuate durante le ricerche avvalorano l'ipotesi della presenza di 4 coppie nidificanti, in altrettanti territori, e di una possibile quinta coppia. E' verosimile che l'insediamento sia avvenuto originariamente con pochi individui, forse solo una coppia, nell'area di Poggio Cornacchia e nella Riserva Naturale Integrale di Sasso Fratino, dalla quale sarebbe poi avvenuta la diffusione in altre zone del Parco (Ceccarelli *et al.*, 2003; Ceccarelli *et al.*, 2008). La provenienza degli individui non è tuttavia chiara: viene avanzata l'ipotesi di una probabile colonizzazione dai settori alpini dove il picchio nero presenta densità maggiori e fenomeni di espansione e dispersione verso zone collinari e di pianura, che sembrano coinvolgere anche l'Appennino settentrionale, come visto già visto per la Liguria e la provincia di Modena. Non si hanno tuttavia elementi certi per ipotizzare l'origine degli individui instauratisi nell'area del Parco: i siti riproduttivi più vicini si trovano a circa 200 km a Nord nelle Prealpi Venete, a circa 300 Km a Ovest nelle Alpi Marittime ed a circa 300 Km a Sud nell'Appennino abruzzese (Ceccarelli *et al.*, 2008).

1.4 Morfologia

Il Picchio nero è il più grande dei picchi europei, di dimensioni paragonabili a *Corvus corone* da cui tuttavia si distingue facilmente (Brichetti e Fracasso, 2007). Il piumaggio è completamente nero lucido, ad eccezione del capo che presenta una calotta rossa continua dalla fronte alla nuca nel maschio, limitata ad una semplice macchia sulla parte posteriore del vertice nella femmina, caratteristica che permette la distinzione nei due sessi già dall'ottavo-decimo giorno di vita (fig. 1.6). L'abito giovanile è del tutto simile all'adulto ma con colori meno brillanti e la calotta rossa macchiettata di grigio e meno estesa. Possiede caratteristiche strutturali peculiari tra cui il capo ben staccato dal corpo e di forma ovoidale, il collo lungo e sottile e la nuca angolata con un abbozzo di ciuffo. Il becco è massiccio, a base larga ed estremità assottigliata a scalpello. Le ali sono

arrotondate e provviste di 10 primarie, tra cui la p1 risulta ridotta negli adulti. Le 12 timoniere si presentano invece adattate morfologicamente, per struttura e rigidità, come supporto all'arrampicamento. Il volo, a differenza della maggior parte dei picidi, è potente, rettilineo e senza marcate ondulazioni con 1-2 forti battute seguite da una quasi completa chiusura delle ali e capo tipicamente sollevato.

Gli adulti effettuano solamente una muta completa, in periodo post-riproduttiva tra inizio giugno e fine ottobre; nei giovani la muta è parziale ma estesa a remiganti primarie e timoniere oltre che al piumaggio del corpo ed alle piccole e medie copritrici (Cramp *et al.*, 1985; Brichetti e Fracasso, 2007).

Di seguito riportiamo i principali valori sulle dimensioni della specie in ambito europeo ed italiano (Cramp *et al.*, 1985; Kalby e De Filippo, 1985; Brichetti e Fracasso, 2007):

Lunghezza totale: 450-570 mm;

Apertura alare: 640-680 mm;

Ala: M 230-240, F 229-242.....*Esemplari italiani, valori medi:* M 236, F 232;

Becco: M 59-69, F 55-63.....*Esemplari italiani, valori medi:* M 56,4, F 54,3;

Tarso: M 34-38, F 34-38..... *Esemplari italiani, valori medi:* M 37,9, F 36,6;

Coda: M 158-170, F 158-173....*Esemplari italiani, valori medi:* M 169,9, F 169,9;

Peso: M 272-315, F 255-300.....*Esemplari italiani, valori medi:* M 268,5-340, F 275-305.

1.5 Movimenti migratori

La specie è sedentaria. Gli adulti frequentano il territorio riproduttivo lungo tutto il corso dell'anno mentre i giovani presentano tendenza dispersiva talvolta anche in piccoli gruppi, più evidente tra novembre e marzo, anche se nella maggior parte dei casi sembrano insediarsi entro un raggio di 40 km dal luogo di nascita, effettuare anche movimenti in senso altitudinale con comparse in zone collinari e pianeggianti (Brichetti e Fracasso, 2007). Le distanze maggiori percorse si attestano attorno ad una o poche centinaia di chilometri, con eventi eccezionali registrati per due individui inanellati nell'ovest della Germania, dei quali uno ha percorso 500 km fino in Cecoslovacchia ed il secondo circa 1000 km fino a giungere nel nord della Francia (Cramp *et al.*, 1985).

Anche se i giovani tendono generalmente a rimanere nelle vicinanze del luogo di nascita, la capacità di compiere spostamenti rilevanti ha probabilmente facilitato l'espansione territoriale che la specie ha conosciuto in varie zone d'Europa così come la colonizzazione di nuove aree, come è avvenuto in Italia in diverse zone dell'Appennino (Cramp *et al.*, 1985; Bricchetti e Fracasso, 2007).

1.6 Vocalizzazioni

Il picchio nero presenta un repertorio sonoro ricco ed usato di frequente lungo tutto il corso dell'anno, condiviso da entrambi i sessi, comprendente anche segnali strumentali prodotti utilizzando il becco come strumento di percussione. Il comportamento territoriale della specie fa sì che, specialmente in periodo riproduttivo, le vocalizzazioni si facciano più frequenti e la specie risulti facilmente stimolabile. Inoltre quasi tutte le emissioni sono forti ed udibili anche da distanze considerevoli (Cramp *et al.*, 1985; Bricchetti e Fracasso, 2007).

Il tambureggiamento viene effettuato da entrambi i sessi principalmente tra febbraio ed agosto. L'emissione è costituita da una serie pronunciata ed uniforme di 35-43 colpi compresi in 2,5-3. L'emissione ha un significato di demarcazione territoriale ma anche di attrazione tra i partner e stimolazione sessuale. Importante è anche la scelta dell'albero utilizzato per l'emissione il cui timbro potrebbero risultare importante per il riconoscimento individuale. Anche nei richiami strumentali è tuttavia possibile riconoscere una serie di varianti, oltre al tipico tambureggiamento. Possono, infatti, essere emesse serie più brevi ed irregolari di colpi effettuati in situazioni di conflitto fra i partner, nella comunicazione con i piccoli od in altre situazioni di disturbo e di conflitto con l'uomo od altri predatori (Cramp *et al.*, 1985).

Il canto, simile a quello di *Picus viridis* ma più acuto, metallico ed uniforme, è costituito da una rapida sequenza di 10-20 "Kwih" della durata di 3-6 secondi, preceduta da una o due note più prolungate introduttive. Il canto ha un significato attrattivo e stimolante tra i partner sessuali, utilizzato anche per la localizzazione ed il contatto dei membri della famiglia successivamente all'involto dei piccoli (Cramp *et al.*, 1985).

Un frequente verso di allarme ed eccitazione è rappresentato dal malinconico "Kjah" o "Kijah", emesso quando la specie è disturbata ed indice di uno stato di agitazione, soprattutto se il verso è ripetuto a brevi intervalli. La variante

disillabica “*Klickje*” è anch'essa caratteristica di situazioni di conflitto ed eccitazione tra partner o rivolta nei confronti di minacce o predatori.

Tipica vocalizzazione effettuata durante il volo ed udibile a grandi distanze è il “*Kurr*” o “*Kru*”, emesso dall'animale nello spostarsi da un luogo all'altro, nell'avvicinarsi o nel lasciare un posatoio.

Caratteristico è anche il verso della taccola, “*Kijak*” tipica emissione legata alla sfera sessuale ma non solo. La variazione in dinamica e durata del richiamo è in relazione al contesto ed al significato dello stesso. Può essere rivolto a conspecifici nel riconoscimento sessuale, incoraggiando o scoraggiando l'approccio a seconda del timbro vocale, nei confronti di rivali, tra membri familiari come contatto ed in molti altri contesti.

Infine ricordiamo il verso di allarme costituito da una serie di “*Rurr*”, verso difficilmente udibile. L'allarme viene emesso nell'ambito di incontri tra rivali dello stesso sesso o tra individui di sesso opposto nell'atto di formazione della coppia riproduttiva.

1.7 Biologia Riproduttiva

Il picchio nero è, tra le specie di picchi europei, il meglio studiato dal punto di vista della biologia riproduttiva (Pasinelli, 2006). E' specie territoriale e solitaria in periodo non riproduttivo. E' stata riscontrata in molti casi una forte fedeltà sia al partner che al territorio riproduttivo, nonché ad alcuni specifici alberi con cavità (Cramp *et al.*, 1985). Il nido è rappresentato da una cavità scavata da entrambi i sessi su un albero, possibilmente rioccupato negli anni. Possono essere scelti una grande varietà di specie arboree tra cui i più comuni sicuramente *Fagus*, *Pinus* e *Picea*, ma anche *Populus*, *Betulla*, *Salix* e *Alnus*. Il foro di ingresso è ovale, di diametro di 8-11 x 11-12 cm, raramente ingrandito a partire da un foro di altri Picidi. Le coppie vengono formate a fine inverno ed effettuano un'unica covata annua. Il successo riproduttivo medio si attesta attorno all'80.2% ed il numero medio di pulli per le coppie è pari a 3.3 (Pasinelli, 2006). La specie depone tra aprile e maggio circa 4-6 uova. L'incubazione è a carico di entrambi i sessi e dura circa 12 - 14 giorni. La schiusa è per lo più sincrona e l'involo dei pulli avviene dopo circa 24 - 28 giorni. (Cramp *et al.*, 1985; Bricchetti e Fracasso, 2007). Di conseguenza a partire dalla deposizione dell'ultimo uovo fino all'abbandono dei pulli dal nido intercorre un periodo di circa 40 giorni, durante i quali la coppia

riproduttiva è costantemente occupata in attività di cova e di ricerca di cibo, operazioni che sono intraprese da entrambi i partner (Luise, 1990).

1.8 Ecologia

Il picchio nero è una specie sedentaria strettamente legata lungo tutto il corso dell'anno a foreste mature sia di conifere che di caducifoglie. Per questo motivo esso dipende fortemente dalla presenza di estese formazioni boschive, ed in particolar modo di boschi misti di faggio e abete.

In Appennino può essere trovato soprattutto in fustaie mature di faggio misto a conifere (soprattutto *Abies alba*) ed altre latifoglie (Boano *et al.*, 1985; Fraissinet e Kalby, 1989; Scebba, 1993; Mingozzi, 1994; Bricchetti e Fracasso, 2007). Sulle Alpi la specie raggiunge le massime densità nell'orizzonte montano dove il faggio entra in consorzio con l'abete bianco ed il peccio. Nelle vallate più interne lo si incontra anche in peccete con presenza di Abete bianco, Larice e qualche latifolia e sporadicamente in faggete frammiste a conifere (Bricchetti, 1987).

In centro Europa la specie necessita normalmente per ogni coppia riproduttiva di aree almeno pari a 300-400 ha o anche maggiori a seconda della disponibilità di risorse che il territorio offre, anche se non di rado possono essere trovate densità pari a 0.75-0.84 coppie per 100 ha o ancora maggiori. I territori non sono chiaramente definiti e contengono generalmente ampie porzioni neutrali ed aree verso cui vengono concentrati i comportamenti territoriali e di difesa, tra cui la zona di riproduzione, le zone di alimentazione ed i dormitoi (Cramp *et al.*, 1985). Dati provenienti da studi di *radio-tracking* sulle Alpi confermano l'alta fedeltà degli individui ai territori riproduttivi, che mostrano elevata variabilità in dimensioni e struttura e generalmente sembrano comprendere aree più ampie nella stagione non riproduttiva. Pur avendo verificato la presenza di zone di sovrapposizione fra *home range* lungo tutto l'anno, gli autori non hanno tuttavia riscontrato interazione territoriale tra individui (Bocca *et al.*, 2007).

La nicchia di nidificazione e quella di alimentazione non sempre coincidono. Ai fini riproduttivi è essenziale per la specie la presenza di piante sane di una certa mole, soprattutto Faggi, con diametro non inferiore a 40-50 cm, dove poter scavare la cavità che ospiterà il nido. A questo scopo predilige piante con tronco liscio, colonnare e privo di rami, situate nella vicinanza di aree ecotonali con ricca

presenza di alberi marcescenti e legna morta sul terreno (Perco, 1978; Bricchetti e Fracasso, 2007).

D'altro canto, per quanto riguarda la dieta, il picchio nero richiede soprattutto tratti di boschi a conifere con esemplari vecchi o deperenti, tronchi e legna morta al suolo dove poter trovare le larve di cui si nutre, oltre all'eventuale presenza di formicai, frequenti soprattutto in boschi di conifere (Perco, 1978). E', infatti, una specie insettivora che predilige larve, pupe e adulti di formiche in particolar modo dei generi *Camponotus*, *Formica* e *Lasius*, ma anche Coleotteri (soprattutto Scolitidi e Cerambicidi) ed in minor numero Imenotteri, Ditteri, Lepidotteri ed Aracnidi. Raramente la dieta comprende anche vegetali, talvolta frutti del genere *Prunus*, *Malus*, *Sorbus*, *Crataegus*, *Vaccinium*, *Viscum*. L'analisi del regime alimentare da Maggio a Novembre evidenzia una dieta composta da Formicidi per l'89-97%, mentre da Dicembre a Febbraio la dieta appare più diversificata, con un 54% di Formicidi ed un 43% di larve di Coleotteri (Cramp *et al.*, 1985).

In Italia la specie è più frequente ad altitudini comprese tra i 1000 ed i 1600 m, ma negli ultimi anni sembra mostrarsi con regolarità anche a basse quote ed in pianura, sia periodo riproduttivo che post-riproduttivo come dimostrano le diverse segnalazioni in Pianura Padana (Bricchetti e Fracasso, 2007).

1.9 Importanza del Picchio nero all'interno di habitat forestali.

Il concetto di “*keystone species*” viene introdotto da Robert T. Paine, il quale, nel 1969, riferendosi ad una specie predatrice di ambienti intertidali marini scrive: “*The species composition and physical appearance were greatly modified by the activities of a single native species high in the food web. These individual populations are the key-stone of the community's structure*”

La definizione comprende specie appartenenti a diversi livelli trofici, che mostrano una forte influenza nel mantenere l'organizzazione e la diversità della comunità in cui vive, rivestendo un ruolo eccezionale rispetto alle altre specie (Mills *et al.*, 1993). In ecosistemi di tipo forestale le comunità di vertebrati che necessitano di cavità naturali a fini riproduttivi possono rappresentare un modello organizzativo fortemente influenzato dalla presenza di specie *keystone*, la cui scomparsa provocherebbe una semplificazione della comunità. Dal punto di vista gestionale, ciò dovrebbe suggerire di concentrare gli sforzi nella protezione e

tutela di tali specie come presupposto per la conservazione dell'intera comunità (Mills *et al.*, 1993).

Le diverse specie di picchi, modificando le caratteristiche strutturali dell'habitat, influenzano la ricchezza specifica e l'abbondanza della comunità di uccelli forestali nidificanti in cavità. Essi rivestono il ruolo di “*primary cavity-nesting species*”, in quanto sono gli unici a poter creare cavità proprie a fini riproduttivi. Queste cavità potranno essere riutilizzate dalle “*secondary cavity-nesting species*”, le quali comprendono diversi uccelli e mammiferi non in grado di crearsi autonomamente una cavità. Infine, troviamo i “*weak cavity excavators*”, i quali possono scavare proprie cavità ma anche usare cavità create da altre specie (Martin e Eadie, 1999). Ne consegue una struttura gerarchica in cui alcune specie dipenderanno parzialmente (*weak cavity excavators*) o totalmente (SCNs) dalle modifiche sull'habitat operate da altre specie (PCNS) e da un limitato numero di cavità naturali. In questo contesto il principale fattore limitante che va a determinare il numero massimo di coppie riproduttive nella comunità non sarà la disponibilità di cibo, ma il numero di cavità disponibili (von Hartmaan, 1957; Edington e Edington, 1972; Martin *et al.*, 2004).

Johnsson *et al* (1993) mostrano come alcune specie di grandi dimensioni, come Taccola *Corvus monedula*, Quattrocchi *Bucephala clangula*, Colombella *Columba oenas* e Civetta capogrosso *Aegolius funereus*, in Svezia utilizzino e nidifichino quasi esclusivamente in cavità costruite dal Picchio nero. Infatti, se da un lato esistono ampie sovrapposizioni nelle caratteristiche delle cavità utilizzate da diverse specie, dall'altro sono state notate preferenze per alcuni parametri tra cui dimensioni, orientamento ed altezza dal suolo della cavità (Edington e Edington, 1972; van Balen *et al.*, 1982). Di conseguenza le specie più grandi sono costrette all'uso delle cavità più grandi disponibili ed in questo senso il Picchio nero, specie in grado di scavare le cavità con dimensioni maggiori in Europa, può essere considerato una specie *Keystone* (Johnsson *et al.*, 1993).

Altri lavori mostrano l'importanza della specie in habitat forestali. Dati provenienti dal Parco Regionale delle Orobie Valtellinesi hanno considerato l'ipotesi che nelle aree utilizzate dalla specie per la nidificazione fosse presente una maggior ricchezza specifica di uccelli nidificanti in cavità ed una maggiore presenza di acervi di *Formica rufa*, cosa che effettivamente si è verificata (Pirovano *et al.*, 2003). In provincia di Trento gli alberi con cavità scavate da

Picidi, oltre a fungere da riparo notturno per molte specie di uccelli, consentono la riproduzione di alcune specie di interesse comunitario presenti nell'area, come il Picchio cenerino *Picus canus*, la Civetta capogrosso *Aegolius funereus* e la Civetta nana *Glaucidium passerinum*, nonché la riproduzione di numerose altre specie di uccelli (Paridi, Turdidi, Anatidi, Columbidi ecc.) e di mammiferi (Gliridi, Sciuridi, Chiroteri, Mustelidi ecc...) (Marchesi *et al.*, 2009).

Landres, Verner e Thomas (1988) definiscono invece una specie indicatrice come: “*an organism whose characteristics (e.g., presence or absence, population density, dispersion, reproductive success) are used as an index of attributes too difficult, inconvenient, or expensive to measure for other species or environmental condition of interest*”.

L'utilizzo di specie indicatrici nel tentativo di semplificare problemi più complessi può fornire un forte contributo nella conservazione della biodiversità. Se il concetto di indicatore evidenzia la necessità di ottenere indicazioni sullo stato di salute della comunità tramite l'analisi di specie o gruppi tassonomici che riflettano lo status dell'intero ecosistema, il concetto di specie ombrello sottolinea gli effetti positivi che la conservazione delle specie maggiormente esigenti può avere sull'intera biocenosi. Questo avviene quando le esigenze ambientali ed ecologiche della specie considerata sono tali da comprendere quelli del resto della comunità (Caro e O'Doherty, 1999; Fleishman *et al.*, 2000).

Molti autori si sono recentemente domandati se la famiglia potesse rappresentare un'utile indicatrice di biodiversità in habitat forestali (Fernandez e Azkona, 1996; Mikusinski e Angelstam, 1997; Mikusinski *et al.*, 2001; Drever *et al.*, 2008). Le caratteristiche che una specie od un gruppo tassonomico deve presentare per poter essere considerata ed utilizzata come indicatore biologico sono diverse (Noss, 1990; Pearson, 1995), tra cui sicuramente una buona conoscenza tassonomica della famiglia e la presenza di popolazioni facilmente rilevabili ed ampiamente distribuite sul territorio. Inoltre si presuppone un'appropriata conoscenza della biologia delle singole specie, ma soprattutto che lo status dell'indicatore rifletta in qualche modo quello dell'intera comunità (Wubbenhorst e Sudbeck, 2002).

Il picchio nero, pur essendo rilevabile sul territorio con facilità per tutto l'anno per le forti vocalizzazioni ed il comportamento territoriale che rende la specie suscettibile a stimolazioni sonore, non soddisfa del tutto queste condizioni. Infatti, l'utilizzo di tradizionali metodi di censimenti per il picchio nero può spesso

portare a stime errate, indotte da alcune caratteristiche della biologia della specie, come l'elevata variabilità della struttura degli *home range*, la presenza di territori disgiunti e non chiaramente delineati e una scarsa territorialità, che può portare a concentrazioni temporanee di diversi individui in zone particolarmente ricche dal punto di vista trofico. Inoltre la condivisione da parte di entrambi i sessi dello stesso repertorio vocale e strumentale può rendere difficoltosa l'interpretazione dei contatti (Bocca *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda la relazione fra la specie indicatrice e la comunità, è già stata sottolineata l'importanza del picchio nero come “*primary cavity-nesting*” all'interno di comunità forestali (Johnsson *et al.*, 1993; Pirovano *et al.*, 2003; Marchesi *et al.*, 2009). E' bene anche considerare il suo ruolo nell'ambito dei processi di decomposizione dei materiali legnosi ed i benefici di cui godrebbero le comunità di invertebrati legati alla presenza di legno morto al suolo da una gestione naturalistica delle foreste (Perco, 1978). In pochi tuttavia si sono soffermati sulla relazione tra picchio nero *per se* e comunità ornitiche forestali ed alcuni lo hanno sconsigliato (Pirovano *et al.*, 2003; Bocca *et al.*, 2007). Diversi autori hanno invece evidenziato la correlazione fra ricchezza specifica nei picidi e ricchezza specifica di uccelli forestali ma non solo, sottolineando come il dato relativo alla singola famiglia possa essere usato come stima per l'intera comunità di uccelli a diverse unità di scala (Mikusinski e Angelstam, 1998; Mikusinski *et al.*, 2001; Drever *et al.*, 2008).

Considerando invece la relazione fra picchio nero e struttura dell'habitat, dati riguardanti il Parco Regionale delle Orobie Valtellinesi mostrano come la specie selezioni positivamente, per i siti di nidificazione aree con altezze maggiori delle chiome, con più bassa densità di alberi e, per le zone di alimentazione, con una maggior presenza di legna morta e di acervi di *Formica rufa* (Pirovano *et al.*, 2003). Nel Parco Naturale del Mont Avic, in Valle d'Aosta, la specie mostra preferenza per aree forestali con diametro medio e totale dei tronchi superiore, con maggiore copertura vegetale oltre i 10 m d'altezza ma con minor presenza di fronde negli strati bassi ed intermedi (Bocca e Falcone, 1999).

Altri dati riguardanti il Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi mostrano la predilezione del picchio nero per lembi di foresta con un maggior grado di maturazione dell'area nido rispetto al bosco circostante, con valori più alti per diametro e altezza degli alberi, altezza media dell'inserzione della chioma e

densità minori. Inoltre le piante scelte dalla specie per la costruzione del nido sono tra quelle di dimensioni maggiori nell'area, in molti casi proprio quelle con diametro più elevato (Colpi *et al.*, 1991).

Altri dati provenienti dalla porzione occidentale dei Pirenei spagnoli evidenziano la tendenza della specie a selezionare positivamente particelle forestali maggiormente sviluppate, in particolar modo per le aree riproduttive che ricadono nei tratti di bosco più maturo all'interno dei territori delle coppie (Fernandez e Azkona, 1996). Più in generale, Wubbenhorst e Sudbeck (2002) evidenziano in due aree di studio in Germania una correlazione positiva fra abbondanza totale di picidi e proporzione di alberi più vecchi di 80 anni all'interno dell'area di censimento nonché la tendenza del picchio nero e del picchio rosso mezzano di evitare i tratti più giovani i bosco.

Tuttavia recenti studi sull'ecologia alimentare e sull'uso dell'habitat della specie hanno messo in discussione il ruolo del Picchio nero come specie indicatrice (Rolstad *et al.*, 1998). Bocca *et al.* (2007) fanno notare come la specie mostri dipendenza verso certe caratteristiche dell'habitat in relazione alla sua biologia riproduttiva ed alle necessità trofiche, ma che, date per scontate queste premesse, possa evidenziare una certa flessibilità tale da permettergli di essere presente in foreste frammentate e governate dall'uomo (Angelstam e Mikusinski, 1994). Questa sua tolleranza a modificazioni antropiche assieme ad una certa difficoltà nel determinare con precisione la sua abbondanza tramite tradizionali tecniche di censimento, rende in definitiva il picchio nero non completamente adatto ad un suo utilizzo in programmi di monitoraggio dell'ecosistema, se non in combinazione con altre specie di picidi (Tjernberg *et al.*, 1993; Mikusinski, 1997; Rosltad *et al.*, 1998; Bocca *et al.*, 2007).

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA RICERCA

L'interesse per la conservazione dei picidi è giustificata dalla notevole importanza che queste specie rivestono all'interno di ecosistemi forestali. Diversi autori hanno evidenziato come la famiglia possa fornire indicazioni sull'intera comunità ornitica forestale e riflettere lo stato di salute dell'intero habitat (Mikusinski e Angelstam, 1998; Mikusinski *et al.*, 2001; Drever *et al.*, 2008; Virkkala, 2006). Tramite l'utilizzo di tali indicatori è quindi possibile ricavare informazioni sulla qualità dei boschi in Italia, ed orientare di conseguenza i metodi selvicolturali verso un approccio naturalistico, che tenga conto nelle diverse componenti ambientali.

Da questi aspetti di carattere gestionale e conservazionistico dipende anche la conservazione degli stessi picidi, i quali risentono notevolmente dell'impatto antropico e delle conseguenze dell'utilizzo dei boschi da parte dell'uomo. Il degrado dal punto di vista qualitativo degli habitat forestali, così come i processi di frammentazione, possono influenzare la distribuzione delle specie più esigenti dal punto di vista ecologico. Il picchio nero *Dryocopus martius* in particolare, anche se meno adatto al ruolo di indicatore biologico, riveste una notevole importanza come specie "Keystone", essendo in grado di scavare le cavità con dimensioni maggiori in Europa. Tramite la sua opera di modificazione della struttura dell'habitat, assieme a quella di altri picidi, consente quindi la presenza di numerosi altri "Cavity-nesters" (Johnsson *et al.*, 1993; Pirovano *et al.*, 2003).

Queste considerazioni spingono quindi ad approfondire le conoscenze in campo genetico, soprattutto nell'ambito di specie sedentarie e maggiormente sensibili, che presentino popolazioni isolate e ridotte numericamente. Affrontare questo aspetto potrebbe aiutare a comprendere come i processi di frammentazione e di degrado dell'habitat e le diverse scelte di gestione selvicolturale possano influenzare la struttura genetica di popolazioni forestali.

La maggior parte dei lavori presenti in bibliografia riguardanti i *Piciformes* sono stati rivolti soprattutto nel cercare di risolvere le relazioni filogenetiche fra le diverse famiglie della classe (Prychitko e Moore, 1996; Weibel e Moore, 2002;

Webb e Moore, 2005; Benz *et al.*, 2006). L'attenzione di numerosi autori su questioni filogenetiche e filogeografiche ha portato ad una buona conoscenza dell'organizzazione interna, sia della classe che della famiglia dei *Picidae*, unica ad essere presente nel Palearctico Occidentale. D'altro canto, sono relativamente pochi i lavori effettuati a livelli tassonomici inferiori. Le regioni, sia del DNA mitocondriale che nucleare, utilizzate nella maggior parte dei casi, in quanto codificanti, presentano un grado di polimorfismo ed una capacità di risoluzione insufficienti ad un'indagine all'interno della stessa specie. Studi di genetica di popolazione, finalizzati alla valutazione di variabilità e struttura genetica, sono fortemente limitati dallo scarso numero di marcatori polimorfici presenti in letteratura riguardanti i picchi (Rutkowski *et al.*, 2006).

Alcuni autori, spinti dalla necessità di trovare marcatori adatti a studi di genetica di popolazione, si sono concentrati sull'utilizzo di microsatelliti (Ellegren *et al.*, 1999; Rutkowski *et al.*, 2006; Vilà *et al.*, 2008; Valimaki *et al.*, 2008; Fike *et al.*, 2009) e della regione di controllo del DNA mitocondriale (Baker e Marshall, 1997; Rutkowski *et al.*, 2008). Per quanto riguarda l'Italia, va evidenziata la totale mancanza di dati, discorso che vale sostanzialmente per tutte le specie di picidi nidificanti sul territorio nazionale, anche per quelle che presentano, nei nuclei riproduttivi isolati in Appennino centro-meridionale, alcune tra le stazioni più a sud del loro areale di distribuzione. Stiamo parlando in particolare del picchio rosso mezzano, *Dendrocopos medius*, del picchio dalmatino, *Dendrocopos leucotos lilfordi*, nonché del picchio nero, *Dryocopus martius*.

Nel presente lavoro si è scelto di approfondire le conoscenze sul picchio nero, *Dryocopus martius*, cercando di effettuare una prima caratterizzazione genetica dei diversi settori dell'areale italiano della specie, tramite l'utilizzo di diversi marcatori. Si è quindi cercato di colmare la totale mancanza di dati genetici che si ha per l'Italia e di valutare l'effetto che l'isolamento genetico può aver avuto sulle popolazioni relitte dell'Appennino meridionale. A tal proposito si è voluto indagare il problema della loro collocazione e diversità rispetto alle popolazioni alpine e del centro Europa, questione tra l'altro già sollevata da alcuni autori (Kalby, 1985; Perco, 1978). Si è infine cercato di valutare la situazione nell'Appennino centro-settentrionale, nel tentativo di comprendere la provenienza dei nuclei riproduttivi di recente colonizzazione, anche a fronte di un'evidente espansione territoriale che sta interessando la specie e che potrebbe far pensare in

futuro, tenendo conto delle reali possibilità dispersive della specie, ad un possibile contatto fra i diversi settori. Per raggiungere questo scopo si è scelto di analizzare due regioni del DNA mitocondriale ed una del DNA nucleare: il gene codificante per il citocromo *b*, il dominio I della regione di controllo del DNA mitocondriale e l'introne 7 del gene codificante per il β -fibrinogeno. Tutti questi marcatori genetici sono stati già utilizzati in precedenti studi che hanno riguardato questioni sistematiche e filogenetiche della famiglia dei *Picidae*.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Nella scelta della strategia di campionamento ho dovuto considerare alcuni problemi derivanti dalle caratteristiche della biologia del picchio nero. Infatti, a causa dell'elusività della specie e della specificità dell'habitat in cui essa vive, non è stato possibile ricorrere all'inanellamento a scopo scientifico, il quale rappresenta un importante strumento nella raccolta di campioni biologici. E' raro, infatti, che individui della specie vengano catturati da stazioni di inanellamento. In tal senso, il progetto più incoraggiante è sicuramente il Progetto Alpi coordinato dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale e dal Museo Tridentino di Scienze Naturali, che ha lo scopo di monitorare la migrazione post-riproduttiva, attraverso una serie di stazioni poste sui valichi in modo tale da coprire tutto l'arco alpino. La tabella 3.1 riporta i dettagli riguardanti le catture di picidi dal 1997 al 2008, tra cui troviamo 56 esemplari di picchio nero, numero non sufficiente a supportare un campionamento esaustivo, se si considera la media di catture annue di circa 4,6 esemplari (Ferretti *et al.*, 2008).

		anno												totale
		1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	
Specie														
Torcicollo	(<i>Jinx torquilla</i>)		2	17	30	36	24	30	49	32	35	29	25	309
Picchio rosso minore	(<i>Dendrocopos minor</i>)									2			1	3
Picchio rosso maggiore	(<i>Dendrocopos major</i>)		6	6	27	14	13	22	31	66	22	35	26	268
Picchio nero	(<i>Dryocopus martius</i>)	3	1	5	4	4	6	6	3	6	7	6	5	56
Picchio verde	(<i>Picus viridis</i>)		4	3	5	4	3	2	12	12	3	5	6	59
Picchio cenerino	(<i>Picus canus</i>)			1		1		2	1	2	1			8

Tabella 3.1 - Picidi catturati nell'ambito del Progetto Api negli anni 1997-2008 (da Ferretti *et al.*, 2008).

E' bene considerare come lo studio di popolazioni di picchio nero, e di altre specie di picchi, sia reso difficoltoso da una serie di fattori. Primo fra tutti il fatto che essi non utilizzino nidi artificiali per la riproduzione, cosa che per altre specie facilita notevolmente le ricerche e lo studio della biologia riproduttiva. Inoltre presentano basse densità, molto minori rispetto ad altre specie forestali di simili dimensioni, cosa che rende difficoltosa la localizzazione dei nidi e moltiplica lo sforzo lavorativo richiesto. In più, anche se localizzati, i nidi non sono sempre facilmente

accessibili e spesso sono posizionati ad altezze considerevoli dal suolo. Infine la cattura di individui della specie non è semplice e necessita di tempo e di personale che deve poter seguire appositamente la specie e che sia a conoscenza della distribuzione dei territori riproduttivi delle coppie.

Di conseguenza, la realizzazione di un campionamento più consistente, a livello italiano, avrebbe richiesto uno sforzo organizzativo e di personale eccessivo, che non era previsto dalla presente ricerca. L'obiettivo, infatti, è stato quello di ottenere una prima indicazione, non certo esaustiva, sulla presenza o meno di struttura genetica all'interno delle popolazioni italiane della specie, a partire da un numero di campioni minimo rappresentativo delle diverse zone dell'areale. Non potendo ricorrere al prezioso supporto dell'inanellamento scientifico si è quindi cercato di seguire criteri diversi ed in alcuni casi del tutto opportunistici, da un lato coinvolgendo ricercatori che avevano già lavorato sulla specie, inanellatori ed appassionati che in qualche modo potessero contribuire al campionamento; dall'altro contattando istituti museali che potessero disporre di individui tassidermizzati di picchio nero o di campioni freschi di tessuto prelevati da individui trovati morti.

Nel primo caso si è giunti alla raccolta di *29 campioni non invasivi*, cioè raccolti senza catturare l'animale, costituiti da penne, in alcuni casi in più di una copia, ottenute in vari modi. Spesso si è trattato di penne ritrovate al di sotto o nelle vicinanze dei nidi, lasciate sul terreno dagli animali a seguito della pulizia del nido. In altri casi si è trattato di penne di muta e resti di predazioni ai danni del picchio nero rinvenuti in modo casuale, o di penne raccolte all'interno del nido stesso, dopo l'involto dei piccoli. Il maggior numero di campioni di tipo non invasivo provengono dalla Valle d'Aosta ed in particolar modo dal Parco di Mont Avic, dove uno studio di *radio-tracking* precedentemente condotto sul picchio nero ha consentito la raccolta di numerosi campioni, che è stato possibile utilizzare per le analisi genetiche. E' evidente come, in zone dove la specie sia stata già oggetto di studi da parte di ricercatori, la conoscenza dei territori di riproduzione ed in particolare dei nidi attivi abbia permesso il recupero di un maggior numero di campioni.

Per quanto riguarda invece la parte museale, ho provveduto a contattare strutture museali ed universitarie che disponessero di materiale utilizzabile ai fini della ricerca. In questo modo ho ottenuto *6 campioni freschi*, cioè di tessuto,

precedentemente conservati o prelevati da individui di picchio nero conservati in congelatore, nonché 60 campioni museali costituiti in parte da tessuto prelevato dal polpastrello dell'animale, in parte da penne prelevate dall'individuo tassidermizzato. Complessivamente i dati relativi al campionamento sono riassunti in tabella 3.2.

Tipo di Campione (n)	Alpi occidentali	Alpi orientali	Appennino Settentrionale	Appennino Meridionale	Ignota
Non-invasivo (29)	19	7	2	1	/
Polpastrelli museali (44)	9	29	/	2	4
Penne museali (16)	5	7	/	/	4
Invasivo (6)	3	3	/	/	/
Totale (95)	36	46	2	3	8

Tabella 3.2 - Consistenza del campionamento in relazione al tipo di campione ed all'origine geografica.

Complessivamente nel corso del 2009 sono riuscito ad ottenere 95 campioni, di cui tre provenienti dal sud Italia, due provenienti dal Parco delle Foreste Casentinesi ed i restanti rappresentativi dei diversi settori dall'arco alpino. Se per l'Emilia Romagna, due campioni possono essere considerati comunque informativi, date le ridottissime dimensioni del nucleo riproduttivo presente, è evidente invece la scarsa consistenza del campionamento riguardante il sud Italia, in cui le poche notizie e conoscenze riguardo allo status delle popolazioni presenti, nonché il ridottissimo numero di esemplari di certa provenienza meridionale conservati in strutture museali, hanno reso difficoltoso il reperimento di materiale biologico.

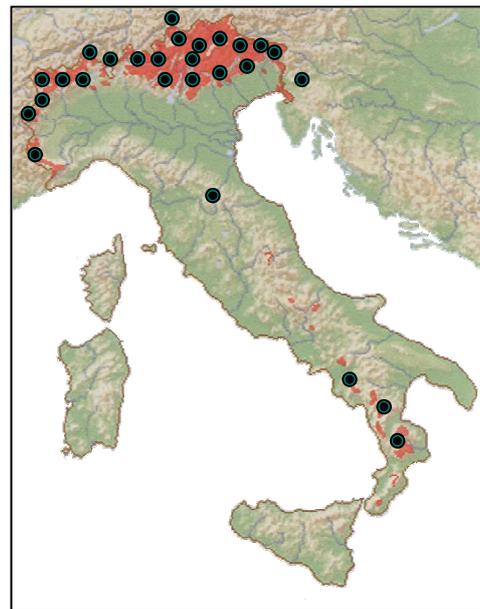


Figura 3.2 - Campionamento effettuato per l'areale italiano di *D. martius* (da Brichetti e Fracasso, 2007, modificata)

3.2 Conservazione dei campioni

I campioni ricevuti sono stati catalogati tramite una sigla indicante la specie ed un numero progressivo, e conservati in freezer ad una temperatura di - 20°C. L'invio è avvenuto nella maggior parte dei casi all'interno di provette safe-lock contenenti etanolo al 95% fornite direttamente dal laboratorio di genetica dell'*Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale* (ISPRA). L'etanolo disidrata e denatura i tessuti, bloccando le reazioni biochimiche che degradano il DNA, rendendolo stabile anche a temperatura ambiente. In questo modo si prevencono eventuali problemi che potrebbero insorgere durante la spedizione (Randi *et al.*, 2002).

In altri casi, l'invio è avvenuto semplicemente inserendo il campione in una busta di plastica, come nel caso di penne raccolte sul campo o prelevate da individui conservati in museo, per le quali è bastato, spesso, ricevere il calamo. Infatti, è possibile effettuare l'estrazione del DNA a partire dalla zona di attaccatura delle prime barbe in cui è spesso presente, anche se non sempre ben visibile, una goccia di sangue (fig. 3.2). Il DNA ottenuto in questo modo è in genere di qualità migliore rispetto a quello ottenuto utilizzando solamente l'estremità della penna (Horvath *et al.*, 2005).

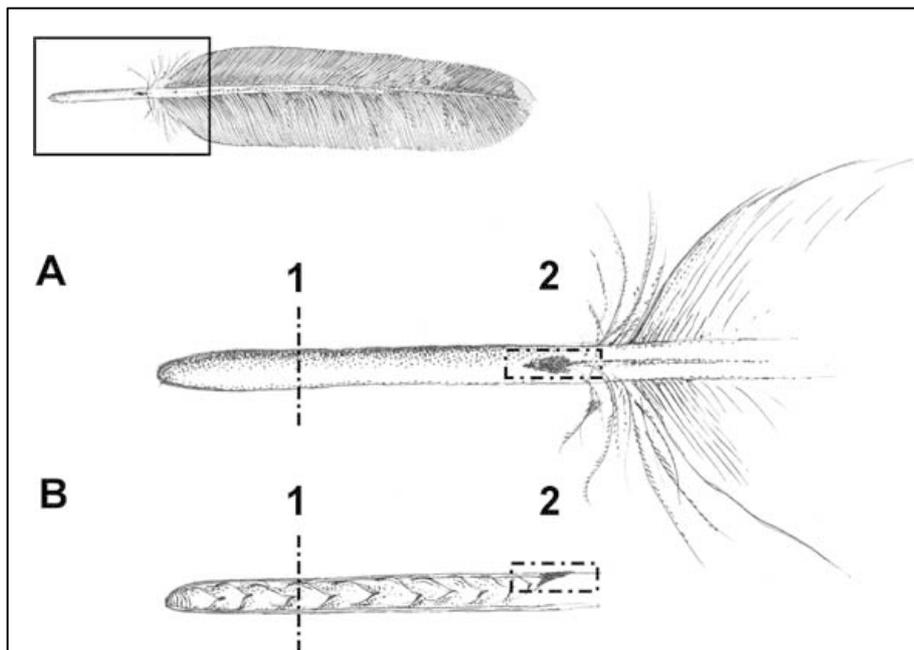


Figura 3.2 - Dettagli riguardanti l'estrazione del DNA da penna, tra cui (A) calamo visto posteriormente e (B) sezione longitudinale; le zone da cui viene effettuato il prelievo sono (1) la punta del calamo e (2) la goccia di sangue presente all'attaccatura delle prime barbe (da Horvath *et al.*, 2005).

3.3 Scelta del marcatore genetico

Un gene variabile, definito polimorfico, può essere utilizzato come marcatore per l'identificazione e la caratterizzazione di campioni di diverse specie o di diverse popolazioni all'interno di una sola specie. La scelta del giusto marcatore da utilizzare è strettamente legata al tipo di ricerca che si vuole realizzare ed al grado di “risoluzione” che si vuole ottenere. Alcune sequenze di DNA non sono codificanti per alcuna proteina e non sembrano quindi essere sottoposte ad alcuna pressione selettiva. Tali regioni del DNA di conseguenza tendono ad accumulare le mutazioni evolvendo in modo neutrale. Questi costituiscono i marcatori genetici più utili in studi di genetica di popolazione o nel confronto tra specie o sottospecie molto vicine tra loro (Randi *et al.*, 2002). Le mutazioni che compaiono all'interno di regioni codificanti del genoma di una specie sono invece sottoposte a selezione naturale, la quale tende ad eliminare dalla popolazione gli alleli sfavorevoli. Tali regioni presentano quindi un numero di mutazioni inferiore, ma possono comunque essere utilizzate in studi di filogenesi e filogeografia.

La scelta dovrà inoltre tenere conto delle diverse caratteristiche di DNA nucleare e DNA mitocondriale. Il mtDNA, a differenza del DNA nucleare, è una molecola aploide, circolare a filamento doppio. Essa è composta da alcune migliaia di nucleotidi che apparentemente non ricombinano, e viene ereditata generalmente per via materna. Le diverse sequenze di mtDNA sono definite “aplotipi” e non vengono modificate nel corso delle generazioni. Dal momento che esse evolvono in media 5-10 volte più rapidamente dei geni nucleari ed accumulano rapidamente differenze genetiche, possono essere utilizzate anche per caratterizzare popolazioni distinte dal punto di vista evolutivo, evidenziando il carattere matrilineare dell'eredità in specie (Moritz *et al.*, 1987; Randi *et al.*, 2002).

Il contenuto genetico del mtDNA è costante nei metazoi, e comprende geni codificanti per proteine enzimatiche coinvolte nella catena di respirazione cellulare (tra cui il citocromo *b*), geni che codificano per due RNA ribosomiali, circa 20 geni che codificano per RNA transfer ed una regione di controllo anche detta D-loop (Moritz *et al.*, 1987; Randi *et al.*, 2002). Possono invece verificarsi differenze per quanto riguarda l'ordine dei geni presenti al suo interno. All'interno della classe degli uccelli, Mindel *et al.* (1998) hanno descritto in 4 diversi ordini, tra cui i *Piciformes* con due specie (*Colaptes auratus* e *Sphyrapicus varius*), una

disposizione alternativa a quella già descritta da Desjardins e Morais (1990) per *Gallus gallus* (fig. 3.3). Quest'ultima a sua volta già si distingueva dal mtDNA dei mammiferi (Quinn, 1997).

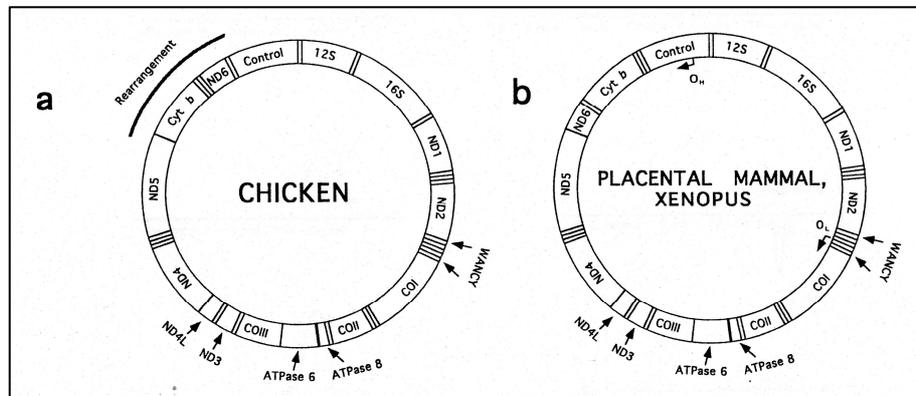


Figura 3.3 - Contenuto genico (a) del mtDNA di *Gallus gallus* e (b) dei mammiferi placentati ed in *Xenopus laevis* (da Quinn, 1997).

D'altro canto, il DNA mitocondriale presenta alcuni svantaggi rispetto al DNA nucleare, tra cui una diversa composizione nucleotidica tra i filamenti ed una diversa probabilità di sostituzione a seconda della posizione occupata dal nucleotide all'interno del codone. Inoltre l'albero ottenuto da aplotipi mitocondriali, in quanto rappresentativi solo dell'eredità materna, potrebbe non sempre corrispondere con l'albero della specie (Moritz *et al.*, 1987; Desjardins e Morais, 1990; Prychitko e Moore, 2000; Zynk e Barrowclough, 2008). Per evitare questi inconvenienti vengono spesso utilizzati introni del genoma nucleare, i quali sembrano particolarmente adatti per studi filogenetici. Infatti, la loro posizione non varia nel corso dell'evoluzione ed essi tendono ad evolvere con tassi minori rispetto al mtDNA, ma, non essendo codificanti, più alti rispetto agli esoni nucleari non essendo codificanti. Inoltre presentano sequenze fiancheggianti molto conservative, che ne facilitano l'amplificazione. (Prychitko e Moore, 2000) Nello studio delle popolazioni italiane di picchio nero ho scelto di utilizzare un marcatore nucleare e due marcatori mitocondriali con caratteristiche diverse fra loro. Il *citocromo b* (fig. 3.4) è il gene mitocondriale sequenziato con più frequenza nell'ambito di studi riguardanti specie ornitiche. Questo è dovuto sia alla disponibilità di *primer* universali proposti da Kocher *et al.* (1989), utilizzabili nell'amplificazione del gene in diverse specie animali (Sorenson *et al.*, 1999), che alla sua capacità di risolvere problematiche nel campo della tassonomia (Johns e

Avise, 1998). In più, oltre ad essere uno tra i marcatori più utilizzati, è forse il meglio conosciuto dal punto di vista evolutivo (Esposti *et al.*, 1993).

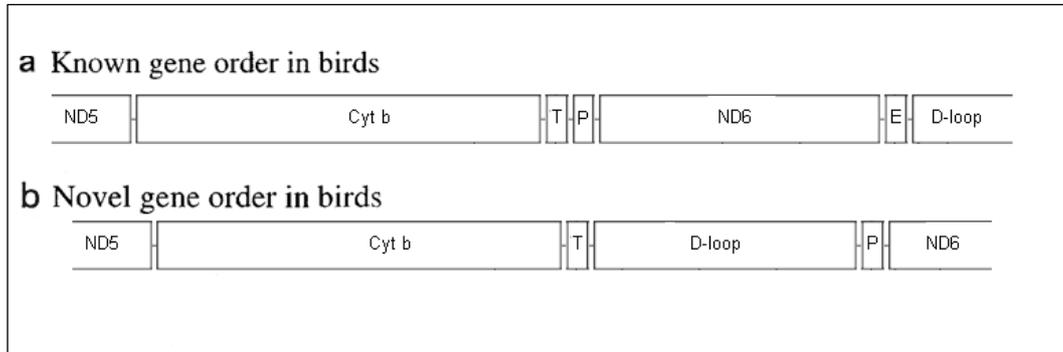


Figura 3.4 - Localizzazione di citocromo *b* e regione di controllo all'interno del mtDNA (a) in *Gallus gallus* ed in numerose altre specie, (b) come osservato in 4 diversi ordini tra cui i *Piciformes* (da Mindell *et al.*, 1998, modificata).

La regione di controllo del mtDNA (figura 3.5) è una regione non codificante che ha un ruolo di controllo e regolazione nella replicazione e nella trascrizione dell'intero genoma mitocondriale. In essa troviamo i due promotori della trascrizione di entrambi i filamenti (LSP e HSP, *heavy* e *light strand promoter*) e l'origine di replicazione del filamento pesante (O_H), la quale dà vita alla particolare struttura a tre filamenti che conferisce alla regione il nome di *D-loop* ("displacement loop"). Di lunghezza media negli uccelli pari a 1168 bp (Baker e Marshall, 1997), essa può essere divisa in tre domini: la maggior parte della variabilità è concentrata nei domini esterni I e III, in cui troviamo il numero più elevato di sostituzioni. Alcuni tratti di sequenze conservate e poco variabili sono invece presenti in tutta la sequenza (Ruokonen e Kvist, 2002).

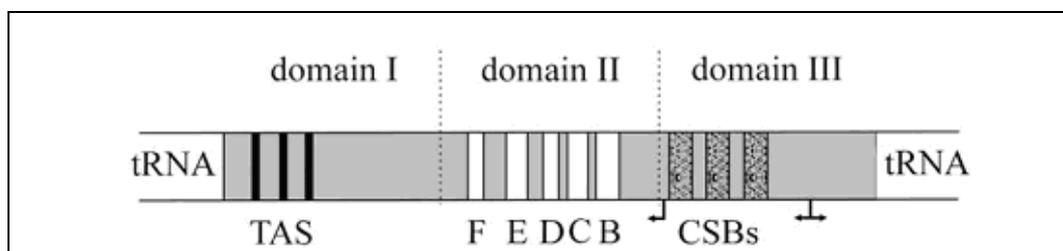


Figura 3.5 - Struttura generale della regione di controllo del mtDNA nei vertebrati. Le frecce indicano la posizione dell'origine di replicazione del filamento pesante (O_H) e dei promotori della trascrizione di entrambi i filamenti (LSP e HSP), TAS indica la posizione delle sequenze di terminazione, le lettere da F a B le sequenze conservate nel dominio centrale, CSBs le sequenze conservate nel dominio periferico (da Ruokonen e Kvist, 2002).

La regione di controllo del DNA mitocondriale è uno dei marcatori più frequentemente utilizzati. Essa contiene sequenze ipervariabili che evolvono molto più rapidamente rispetto al resto del genoma mitocondriale, con un tasso di sostituzione fino a 5-10 volte più elevato, che possono essere quindi utilizzate in genetica di popolazione (Randi *et al.*, 2002; Ruokonen e Kvist, 2002).

Inizialmente si è anche proceduto con l'amplificazione di un marcatore nucleare, la regione codificante per il β -fibrinogeno introne 7. Tuttavia, nelle fasi successive delle analisi si è deciso di concentrare gli sforzi nell'utilizzo dei primi due marcatori, nella convinzione che potessero fornire maggiori dettagli nello studio della specie. La scelta di utilizzare diversi marcatori è dovuta a diverse ragioni. L'utilizzo del citocromo *b* e del β -fibrinogeno è motivata dalla totale mancanza di dati provenienti dalle popolazioni italiane per quanto riguarda questi marcatori, utilizzati in numerosi studi di filogenesi in diverse famiglie dell'ordine dei *Piciformes*. La sua scelta del citocromo *b* è stata anche facilitata dall'esistenza e dalla disponibilità di *primer* universali. D'altro canto, l'utilizzo di una regione ipervariabile come il D-loop avrebbe assicurato una maggiore efficacia nel tentativo di analisi dei nuclei riproduttivi appenninici. Inoltre, dato che i tre marcatori erano già stati utilizzati da diversi autori sui picidi, si è potuto fare uso dei *primer* disponibili in bibliografia per amplificare con successo le regioni, e successivamente confrontare i dati ottenuti.

3.4 Estrazione del DNA

Lo scopo di un processo di estrazione è quello di ottenere una soluzione priva di contaminanti, contenente il DNA da analizzare. In generale si effettua l'estrazione del DNA totale contenuto in un campione assieme al DNA esogeno presente e, solo successivamente tramite la PCR, si selezionano le sequenze che si ha interesse ad analizzare. Ogni protocollo d'estrazione in genere prevede più passaggi. Primo di questi è la lisi delle membrane cellulari e di proteolisi, che ha lo scopo di distruggere le strutture proteiche cellulari e liberare in soluzione il DNA. Successivamente si provvede a separare il DNA da tutti i residui della proteolisi, così da ottenere una soluzione il più possibile priva da ogni altra sostanza biologica, per poi risospenderlo in una soluzione tampone. Le diverse fasi di un processo di estrazione sono mostrate in figura 3.6.

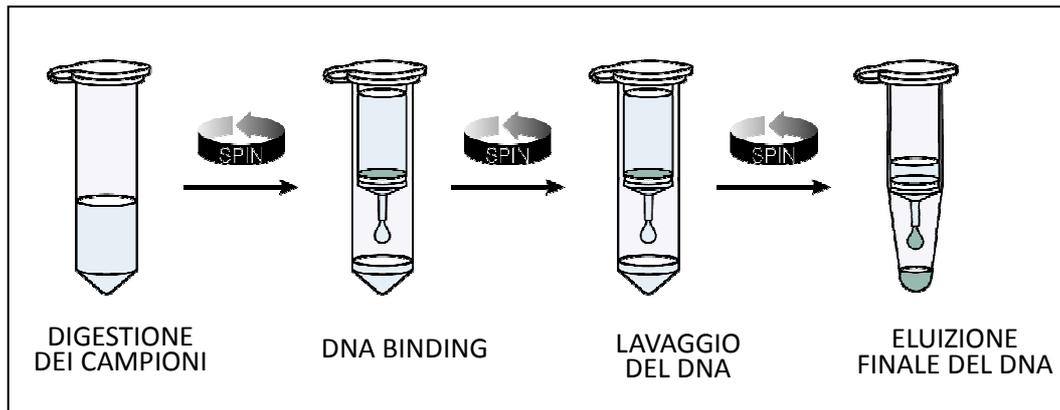


Figura 3.6 - Fasi dell'estrazione di DNA tramite l'utilizzo di *Spin column* e *Collection tube*.

Tramite l'utilizzo di bisturi e pinzette sterilizzate, ho prelevato l'intero calamo dalle penne di picchio nero disponibili. Il calamo è stato quindi inciso longitudinalmente, dopo essere stato ripulito dalle barbe presenti. Per quanto riguarda il tessuto fresco o da museo, si è provveduto a prelevarne una porzione sufficiente all'estrazione, ed a ridurla in piccoli frammenti. Sia i frammenti di tessuto che i calami, così ottenuti, sono stati asciugati dall'alcol ed inseriti in una eppendorf da 1.5 ml, riempita precedentemente con: 5 μ l di SDS (Sodio Dodecil Solfato) 10%, 20 μ l di Proteinasi K (PK) 10 mg/ml, 175 μ l di WCLB (*White Cell Lysis Buffer*), quest'ultimo composto da TRIS-HCl pH 7,6 10 mM, EDTA- Na_2 10 mM e NaCl 50 mM. I campioni sono stati quindi inseriti in un rotore elettrico, e messi in digestione ad una temperatura di 56°C, in alcuni casi per tutta la notte (rotazione *overnight*), in altri solamente per 3 ore.

Per le fasi successive alla digestione, ho utilizzato lo *ZR Genomic DNA II Kit* (*Zymo Research, Orange, CA*), il quale prevede inizialmente l'aggiunta di 800 μ l di *Genomic Lysis Buffer* alle provette contenenti il digerito. Dopo aver mescolato e lasciato i campioni a temperatura ambiente per 10 minuti, si centrifuga a velocità massima per 5 minuti in modo da far sedimentare i frammenti grossolani del calamo, i resti non digeriti di polpastrello e di tessuto. Si trasferisce quindi il sopranatante, cercando di lasciare il *pellet* sul fondo, all'interno delle *Zymo-Spin Column* inserite in un *Collection Tube*, centrifugando a 10.000 rpm per 1 minuto. In questo modo il liquido viene costretto dalla forza centrifuga a passare attraverso la membrana. A questa si lega il DNA ma non il lisato, che ricade nel *Collection tube*.

Dopo aver cambiato i *Collection Tube* si procede con due successivi lavaggi del DNA, prima aggiungendo 200 µl di *DNA Pre-Wash Buffer* e successivamente 500 µl di *g-DNA Wash Buffer*, centrifugando ad entrambi i passaggi a 10.000 rpm per 1 minuto.

Infine, dopo aver inserito le *Zymo-Spin Column* in una nuova eppendorf da 1.5ml, il DNA viene separato dalla membrana, aggiungendo *TE Buffer* 0.1 M (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0), una soluzione tampone che mantiene costante il valore di pH e inibisce l'azione degli enzimi che degradano il materiale genetico. Il quantitativo di TE aggiunto varia a seconda del tipo di campione da cui si sta estraendo il DNA, in quanto il tessuto fresco conterrà quantità di DNA superiori rispetto al materiale museale. La soluzione finale dovrà presentare concentrazioni né troppo basse, ma neppure eccessive di DNA, per evitare problemi in fase di PCR. Per il tessuto sono stati utilizzati 200 µl di TE, mentre per il materiale museale o di tipo non invasivo 120 µl.

3.5 Amplificazione del DNA

Il DNA che si ricava da campioni non invasivi e museali, utilizzati nello studio di popolazioni selvatiche, è caratterizzato da basse concentrazioni, e può inoltre essere degradato e frammentato. Tuttavia anche quantità minime di DNA e frammenti relativamente corti possono venire analizzati tramite la PCR (*"Polymerase Chain Reaction"*), una tecnica che permette l'amplificazione di una sequenza di DNA *target* che si vuole analizzare, a partire da quantità minime di DNA di partenza. La PCR ha fortemente accelerato i progressi nello studio della struttura genetica di molti organismi rendendo possibile l'amplificazione anche di sequenze complesse in poche ore (Saiki *et al.*, 1988). Sequenze *target* presenti in copia singola nel DNA possono essere amplificate fino a 10 milioni di volte in poche ore, ricostruendo in provetta uno specifico passaggio della riproduzione cellulare, ovvero la replicazione di un segmento di DNA (Randi *et al.*, 2002). La principale condizione perché questo si verifichi è quella di conoscere la sequenza delle due regioni fiancheggianti i lati del DNA *target*. Il primo passaggio prevede, infatti, l'appaiamento di specifici oligonucleotidi detti *"primer"* sulle regioni a loro complementari nelle sequenze fiancheggianti. I *primer* sono generalmente composti da 20-30 nucleotidi e vengono sintetizzati chimicamente da laboratori specializzati a cui occorre fornire nel dettaglio la sequenza. L'estensione procede

attraverso la regione *target*, compresa fra i due *primer*, i quali amplificano in direzioni opposte l'uno rispetto all'altro (Saiki *et al.*, 1988).

La sintesi in natura, così come in provetta, avviene grazie all'azione di una DNA polimerasi, un enzima che sintetizza nuovi filamenti a partire da un segmento di DNA *target* denaturato. Perché ciò avvenga è necessaria la presenza di almeno una coppia di *primer* e di una certa quantità di nucleotidi liberi, che saranno incorporati nel corso della sintesi. Inoltre devono verificarsi condizioni ottimali di pH e di concentrazione di ioni Mg^{++} , valori che in vitro sono mantenuti da una soluzione tampone.

Ogni PCR consiste in un ciclo ripetuto da 20 a 40 volte all'interno di un termocicizzatore che esegue con precisione e rapidità i passaggi tra diverse temperature specifiche per ognuna delle fasi principali della reazione rappresentate in figura 3.7, ovvero:

1. *Denaturazione*. Per far sì che i *primer* si appaiano e che la reazione abbia inizio, è necessario separare i filamenti di DNA. Per questo motivo il DNA con la miscela di reagenti viene portato per alcuni secondi ad una temperatura di 94°C.
2. *Annealing*. Quando il DNA è denaturato ognuno dei *primer* si aggancia alla sequenza complementare che fiancheggia il DNA *target*. La temperatura di *annealing* viene mantenuta per pochi secondi ed influenza la specificità dei *primer*. La scelta della temperatura corretta dipende dalle caratteristiche dei *primer* e solitamente varia dai 40°C ai 55°C. La temperatura di *annealing* dipende dalla lunghezza dei *primer* e dalla loro concentrazione in GC, poiché guanina e citosina sono unite da tre legami idrogeno mentre Timina e Adenina da due, una maggiore concentrazione di GC implica temperature di appaiamento più alte.
3. *Estensione*. Quando l'*annealing* è completato inizia la duplicazione del DNA *target* a partire dai siti di appaiamento dei *primer*. L'enzima utilizzato in questa fase è la "*Taq polymerase*", una DNA polimerasi con altissima tolleranza al calore e quindi resistente alla denaturazione dei filamenti che viene ripetuta ad ogni nuovo ciclo di PCR (Saiki *et al.*, 1988). La *Taq* polimerasi utilizza i nucleotidi liberi presenti in soluzione per produrre nuovi filamenti complementari a quelli della sequenza *target*. L'estensione avviene solitamente attorno ai 72°C.

Ad ogni ripetizione del ciclo termico la quantità di DNA sintetizzato risulterà raddoppiata realizzando quindi una replicazione esponenziale del DNA *target*. Occorre però considerare i molteplici fattori che possono influenzare l'efficienza della reazione e la sua capacità di amplificare fedelmente ciò che a noi interessa. La notevole sensibilità della PCR la rende anche suscettibile a contaminazioni con DNA estraneo alla nostra sequenza. La contaminazione può avvenire direttamente durante la raccolta, o in laboratorio durante le operazioni di estrazione e amplificazione del DNA. Per evitare questo tipo di problemi è bene seguire protocolli che prevedono utilizzo di locali separati per le fasi di pre e post amplificazione, l'uso di cappe sterilizzate ai raggi UV, ed il controllo delle eventuali contaminazioni attraverso l'uso di saggi positivi e negativi che consentono una verifica della correttezza dei risultati. E' importante inoltre utilizzare *Taq* polimerasi di ottima qualità e *primer* altamente specifici. Quest'ultimi, in particolare, potrebbero dare luogo ad amplificazioni "aspecifiche", appaiandosi ad altre sequenze, oltre a quella *target*, rendendo così difficile o impossibile l'interpretazione dei risultati.

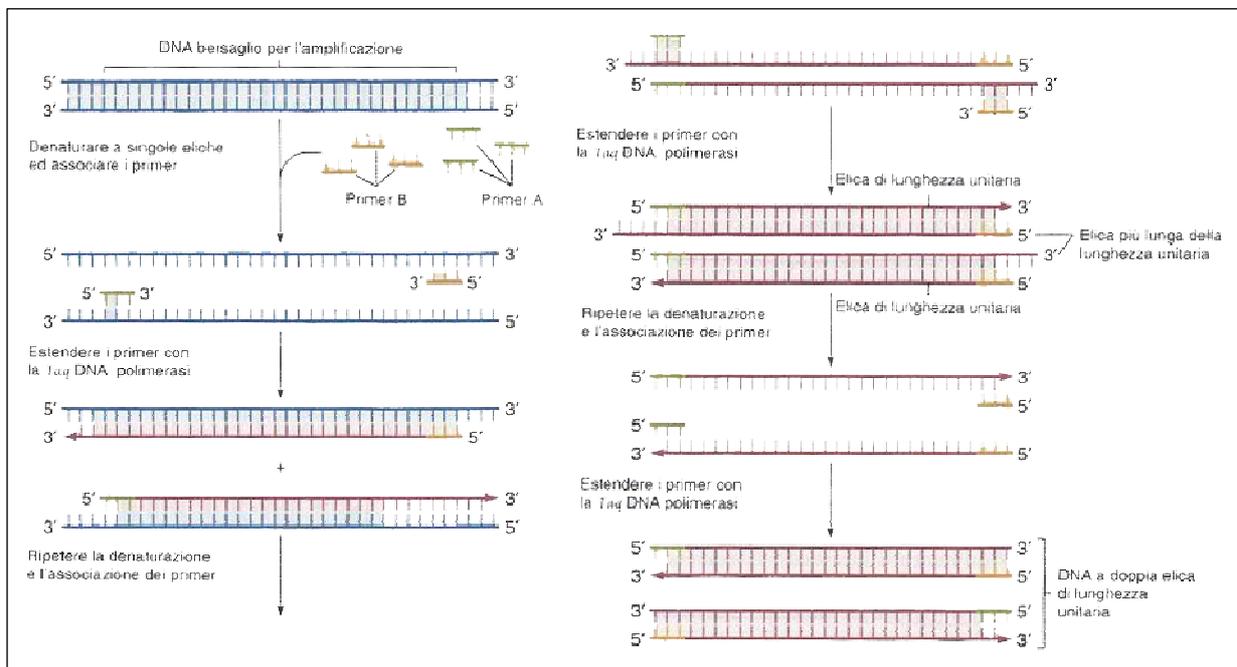


Figura 3.7 - Fasi di una PCR, la reazione a catena della DNA polimerasi (da Russell, 2004).

Inizialmente, nelle analisi delle sequenze di *D. martius* ho scelto di procedere con l'amplificazione e l'analisi di campioni freschi di tessuto e del materiale museale più recente e meglio conservato che dessero maggiori garanzie circa la buona

qualità del DNA in essi contenuto. Si è escluso l'utilizzo dei campioni di tipo non invasivo che non davano certezze sul fatto che potessero essere amplificati con successo. Si è quindi proceduto con una prima amplificazione del *citocromo b* e del *β-fibrinogeno introne 7*.

Numerosi autori hanno utilizzato il citocromo *b* come marcatore mitocondriale in studi di filogenesi sui *Piciformes*, testando con successo l'utilizzo di diverse coppie di *primer* su diversi generi, tra cui anche *Dryocopus* (Weibel e Moore, 2002; Webb e Moore, 2005; Benz *et al.*, 2006; Fuch *et al.*, 2008). Per *D. martius* si è deciso di utilizzare una coppia di *primer* universali già disponibile in laboratorio disegnata sul citocromo *b* di *Gallus gallus*, ovvero L-14993 e H-16065 (Desjardins e Morais, 1990).

Per quanto riguarda invece il *β-fibrinogeno*, si è provato ad utilizzare una coppia di *primer* già testati sui *Picidae* da diversi autori, ovvero Fib-BI7U e Fib-BI7L (Prychitko e Moore, 1997; Weibel e Moore, 2002; Fuch *et al.*, 2006; Fuch *et al.*, 2008).

I nomi dei *primer* e le relative sequenze sono riportati nella tabella 3.3. Nella nomenclatura generalmente i numeri si riferiscono alla posizione del nucleotide 3' terminale del *primer* sul genoma mitocondriale di *Gallus gallus*. Le lettere L e H stanno per *Light* e *Heavy strand* in riferimento alla diversa densità, e quindi peso, dei due filamenti nel mtDNA (Desjardins e Morais, 1990). Nel DNA nucleare, i *primer* per i due filamenti vengono indicati dalle lettere U ed L ovvero *Upper* e *Lower strands*, o più genericamente F ed R per *Forward* e *Reverse*.

<i>Primer</i>	<i>Primer sequence</i>	<i>PCR product (pair bases)</i>
<i>FIB-BI7U</i>	5' - GGAGAAAACAGGACAATGACAATTCAC - 3'	~ 1000 bp
<i>FIB-BI7L</i>	5' - TCCCCAGTAGTATCTGCCATTAGGGTT - 3'	
<i>L-14993</i>	5' - CCATCCAACATCTCAGCYTGATGAAAYTT - 3'	~ 1000 bp
<i>H-16065</i>	5' - GGAGTCTTCAGTTTTTGGTTTACAAGAC - 3'	

Tabella 3.3 - Coppie di *primer* e relative sequenze utilizzate nell'amplificazione del citocromo *b* (Desjardins e Morais, 1990) e del *β-fibrinogeno* (Prychitko e Moore, 1997) in *D. martius*.

L'utilizzo di questi *primer* sui campioni che dessero maggiori garanzie di successo ha consentito di ottenere la sequenza di 10 diversi individui di *D. martius*, un

numero non del tutto rappresentativo dell'intero territorio di campionamento, ma tuttavia sufficiente per valutare l'efficacia del marcatore.

Per l'amplificazione del dominio I della regione di controllo si è fatto uso dei *primer* DenD1F e DenD1R, disegnati da Rutkowski *et al.* (2008) e già testati dagli stessi autori su diverse specie europee di picchi, tra cui il picchio nero.

Si è inoltre scelto di disegnare *primer* specifici per il citocromo *b*, suddividendo così la regione in tre frammenti con ampie zone di sovrapposizione. In questo modo, pur allungando i tempi di analisi in laboratorio, viene facilitata l'analisi del materiale museale in cui il DNA può spesso essere degradato, aumentando di conseguenza la resa. Inoltre una maggiore specificità dei *primer*, disegnati appositamente sulle sequenze ottenute di *D. martius*, diminuisce la possibilità di contaminazioni ed amplificazioni aspecifiche.

<i>Primer</i>	<i>Primer sequence</i>	<i>PCR product (pair bases)</i>
<i>Cytb13816F</i>	5' - CTC-CTC-CTA-GCC-ACC-CAC-TA - 3'	~ 350 bp
<i>Cytb14212R</i>	5' - AGT-GCG-AAG-AAT-CGG-GTG-AG - 3'	
<i>Cytb14052F</i>	5' - CCT-TCG-TCG-GCT-ATG-TCC-T - 3'	~ 350 bp
<i>Cytb14480R</i>	5' - AGG-AAG-TAC-CAC-TCG-GGT-TT - 3'	
<i>Cytb1400F</i>	5' - GCC-CTA-TTC-TCA-CCC-AAC-CT - 3'	~ 300 bp
<i>Cytb14781R</i>	5' - GCT-TGT-TTT-CTA-GGG-TGC-TGA-T - 3'	
<i>DenD1F</i>	5' - AQG-CCA-AAG-ACT-GAA-GAN-ACA-CA - 3'	~ 350 bp
<i>DenD1R</i>	5' - GGC-NGT-TAC-CAT-GGA-GTT-C - 3'	

Tabella 3.4 - *Primer* disegnati sul citocromo *b* di *D. martius* tramite *Primer3* v0.3.0 (Rozen e Skaletsky, 2000) e *primer* utilizzati nell'amplificazione del D-loop (Rutkowski *et al.*, 2008).

Tramite l'utilizzo di un *software* disponibile in rete, *Primer3* v 0.4.0 (Rozen e Skaletsky, 2000), si sono disegnate tre coppie di *primer* (tab. 3.4), in modo da suddividere il citocromo *b* in tre diversi frammenti. Per consentire il corretto appaiamento dei *primer*, i siti polimorfici precedentemente identificati sono stati esclusi dalle loro sequenze. L'intera sequenza del citocromo *b* è stata poi ricostituita a partire dai singoli frammenti in fase di analisi. Successivamente è stato messo a punto un protocollo sperimentale utilizzato per l'amplificazione dei tre marcatori molecolari prescelti. Il mix di reagenti utilizzato è stato il seguente:

PCR <i>Buffer</i> (10X)	1.00 μ l
BSA (0.2%)	2.00 μ l
dNTP <i>mix</i> (1X)	0.40 μ l
<i>Primer</i> L (10 μ M)	0.20 μ l
<i>Primer</i> H (10 μ M)	0.20 μ l
<i>Taq</i> polimerasi (5 U/ μ l)	0.05 μ l
ddH ₂ O	3.15 μ l
	<hr/>
	7.00 μ l
	+
DNA estratto	3.00 μ l
	<hr/>
Volume finale <i>mix</i> PCR	10.0 μ l

Per l'analisi dei campioni di tessuto, ho cercato di tener conto della maggiore qualità e concentrazione del DNA a seguito delle fasi di estrazione. Nel *mix* è stato quindi utilizzato un minor volume di DNA, ovvero 2 μ l, aumentando il volume totale di ddH₂O, per avere comunque un volume finale pari a 10 μ l. Lo stesso *mix* è stato utilizzato per l'amplificazione dei tre diversi marcatori, citocromo *b*, β -fibrinogeno e D-loop.

Per quanto riguarda i reagenti, la ddH₂O è acqua bidistillata e quindi deionizzata e sterile utilizzata per portare il *mix* al volume finale di 10 μ l; il PCR *Buffer* è una soluzione tampone composta da MgCl₂ 15 mM, Tris-HCl 100 mM e KCl 500 mM; la BSA (*Bovine Serum Albumin*) è una proteina che aumenta la resa della PCR stabilizzando la DNA polimerasi e bloccando l'azione di inibitori di varia origine; i dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) sono i deossiribonucleotidi che sono incorporati dalla *Taq* polimerasi durante la sintesi.

Le provette con i *mix* sono quindi inserite nei termociclatori in cui è stato predisposto il seguente ciclo termico, utilizzato nell'analisi del materiale museale o non invasivo, riportato in figura 3.8:

1. *Una prima fase*, in cui la temperatura viene mantenuta costante a 94°C per 2 minuti per realizzare una completa denaturazione del DNA;
2. *Una seconda fase* costituita da 45 cicli di PCR, in cui vengono raggiunte e mantenute tre diverse temperature, ovvero 94°C per 30 secondi (denaturazione), 55°C per 30 secondi (*annealing*) e 72°C per 30 secondi (estensione);

3. Una terza fase, comprendente tre passaggi a temperatura costante, ovvero 72°C per 10 minuti, 4°C per 10 minuti per inattivare la DNA polimerasi e ricostituire le doppie eliche di DNA, ed infine 15°C per un tempo indeterminato.

Lo stesso ciclo è stato utilizzato nell'amplificazione dei tre diversi marcatori. Un diverso protocollo è stato invece utilizzato nell'analisi di campioni freschi di tessuto, per i quali è stato impostato un minor numero di cicli, ovvero 40 cicli, per i motivi riguardanti la migliore qualità e maggior concentrazione del DNA. Oltre al numero di cicli di PCR, altre due variabili fondamentali sono state considerate nella scelta del protocollo: la temperatura di *annealing*, mantenuta costante a 55°C per ogni *primer*, e la concentrazione di ioni Mg^{2+} .

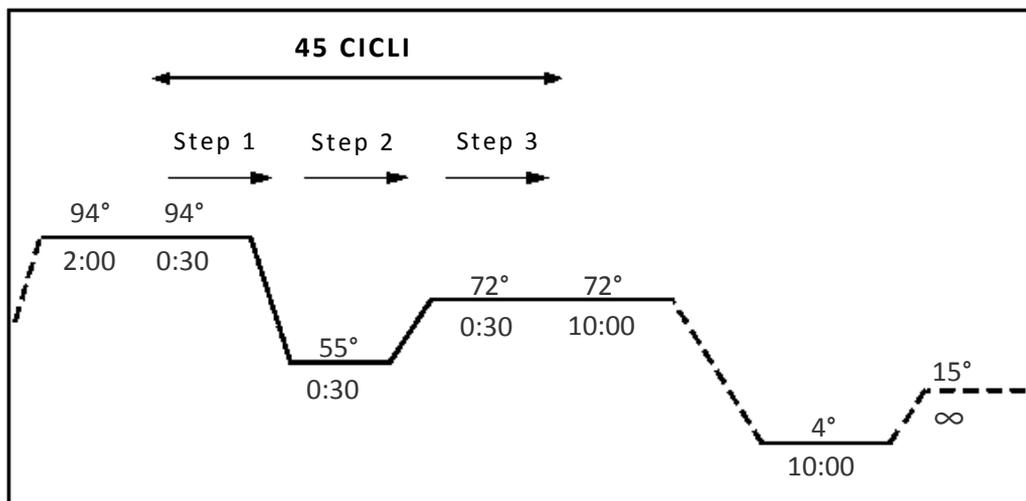


Figura 3.8 - Metodo di PCR utilizzato nell'amplificazione dei tre marcatori in *D. martius*.

La scelta per la temperatura di *annealing* è strettamente collegata alla temperatura di *melting* dei *primer*, ovvero la temperatura alla quale il 50% delle molecole si trova in forma di doppia elica ed il restante 50% a singola elica. Scegliendo una temperatura di *annealing* elevata, avvicinandosi alla temperatura di *melting*, viene aumentata la specificità della reazione favorendo tuttavia allo stesso tempo la separazione dei *primer* dalla sequenza *target*. Se la temperatura di *annealing* sarà invece più bassa, pur allontanandosi dalla temperatura di *melting*, verrà favorita la formazione di aspecifici. Il magnesio può condizionare l'attività della polimerasi e dei *primer* e la specificità dell'*annealing*. La concentrazione degli ioni Mg^{2+} è,

infatti, inversamente proporzionale alla specificità dei *primer*. Di conseguenza un'alta temperatura e una bassa concentrazione di ioni magnesio rende maggiormente specifico l'*annealing* dei *primer*.

3.6 Controllo su gel di agarosio

Prima di procedere con le successive fasi dell'analisi (cioè con il sequenziamento), mi sono assicurato che la PCR fosse avvenuta correttamente. Questo è stato possibile effettuando una corsa elettroforetica condotta su un minigel di agarosio al 1.5% immerso in una soluzione di elettroliti. All'interno di pozzetti sono stati caricati 3 µl di DNA amplificato e 5 µl di "Blu/Gel Red".

Applicando corrente elettrica al sistema si causa la migrazione dei frammenti di DNA che, essendo carichi negativamente, si muovono verso il polo positivo con velocità inversamente proporzionale al peso molecolare dei frammenti. Il "Blu/Gel Red" legandosi al DNA lo rende fluorescente e visibile in presenza di raggi UV. Di conseguenza al termine della corsa, anche dopo pochi minuti, sarà possibile verificare direttamente che siano presenti bande fluorescenti singole e compatte senza amplificati aspecifici visibili come "strisciate" o bande diverse a distanze diverse. Includendo saggi negativi o positivi si può controllare la resa di amplificazione. Infatti, se nessuna banda è presente sui campioni ma lo è sul controllo positivo significa che la PCR ha funzionato, ma dai campioni analizzati non si è ottenuto nessuna amplificazione. Se invece nel controllo negativo è presente una banda significa che è avvenuta una contaminazione e occorrerà ripetere l'amplificazione o l'estrazione del DNA.

Gli amplificati ottenuti tramite l'utilizzo delle coppie di *primer* DenD1F/DenD1R, per la regione di controllo, e Cytb14052F/Cytb14480R, per il frammento centrale del citocromo *b*, hanno dato buoni risultati, evidenziando bande singole alla stessa distanza dai pozzetti senza la presenza di aspecifici. Nel caso invece delle coppie di *primer* Cytb13816F/Cytb14212 e Cyt1400F/Cyt14781R, specifici rispettivamente per il primo ed il terzo frammento del citocromo *b*, le bande fluorescenti risultavano poco visibili o in molti casi non presenti.

Nelle fasi successive di analisi, che hanno portato al sequenziamento dei frammenti, ho appositamente incluso alcuni fra i campioni di DNA che non avevano evidenziato bande chiaramente visibili, per poter avere così una conferma della veridicità delle corse elettroforetiche. Per alcuni prodotti di

amplificazione, probabilmente troppo degradati, è stato impossibile ottenere la sequenza, mentre per quelli ottenuti tramite i *primer* Cytb13816F/Cytb14212 e Cyt1400F/Cyt14781R in molti casi si ha avuto la conferma del loro corretto funzionamento. Anche se al termine della corsa elettroforetica le bande fluorescenti non risultavano chiaramente visibili, è stato comunque possibile ottenere le sequenze procedendo con le fasi successive delle analisi.

3.7 Sequenziamento del DNA

L'amplificato ottenuto dalla prima PCR è principalmente costituito da copie della sequenza *target*. Prima di poter procedere con il sequenziamento dei frammenti è necessario eliminare dal DNA amplificato i *primer* ed i nucleotidi liberi rimasti in soluzione tramite una "purificazione". Questa viene ottenuta usando il *mix* ExoSAP costituito da *Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase*, ovvero due enzimi di restrizione in grado di eliminare esclusivamente dalla soluzione i nucleotidi liberi e gli oligonucleotidi. Il protocollo prevede l'aggiunta di 1 µl di *mix* ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) ad ogni campione di DNA amplificato, da sottoporre poi al seguente ciclo termico:

$37^{\circ}\text{C} \times 30' + 80^{\circ}\text{C} \times 15' + 4^{\circ}\text{C} \times 10' + 15^{\circ}\text{C} \textit{ forever}$

Alla temperatura di 37°C si svolge l'attività digestiva degli enzimi che vengono successivamente disattivati mantenendo la temperatura di 80°C per 15 minuti.

Dopo la purificazione è possibile procedere con il sequenziamento, il quale avviene tramite il "metodo Sanger" (Sanger, 1981), basato sull'interruzione specifica della sintesi enzimatica di una nuova catena di DNA, metodo oggi comunemente utilizzato per il sequenziamento del DNA. Il processo di sequenziamento prevede una seconda PCR, detta "di sequenza", effettuata utilizzando uno solo dei due *primer*, ovvero il *primer* di sequenza. Di conseguenza l'amplificazione della sequenza *target* avverrà in una sola direzione, sarà lineare e non logaritmica, come invece avviene nelle normali reazioni di amplificazione. Sono anche utilizzati, oltre ad i quattro deossinucleotidi (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), una certa aliquota di quattro dideossinucleotidi (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), molecole analoghe ai primi ma mancanti del gruppo ossidrilico in posizione 3'. Nel momento in cui un dideossinucleotide viene

incorporato nel DNA, causa l'interruzione della sintesi. In questa maniera, al termine della PCR di sequenziamento, si ottiene una miscela di frammenti a diversa lunghezza, tutti terminanti con un dideossinucleotide. Il mix utilizzato per la PCR di sequenza è stato il seguente:

<i>BigDye Terminator mix</i>	1.00 µl
<i>Primer</i> (1.0 QM)	2.00 µl
ddH ₂ O	6.00 µl
<hr/>	
	9.00 µl
	+
DNA (amplificato e purificato)	1.00 µl
<hr/>	
Volume finale <i>mix</i> PCR	10.0 µl

Il *BigDye Terminator mix* v1.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) contiene i dNTPs ed i ddNTPs marcati in rapporto 1:100 e la *Taq* polimerasi. Per ottenere le sequenze di D-loop ho amplificato entrambi i filamenti, trattando quindi ogni campione due volte, una volta per ogni *primer* della coppia. Per quanto riguarda invece i frammenti del citocromo *b* è risultata sufficiente l'amplificazione di uno solo dei due filamenti.

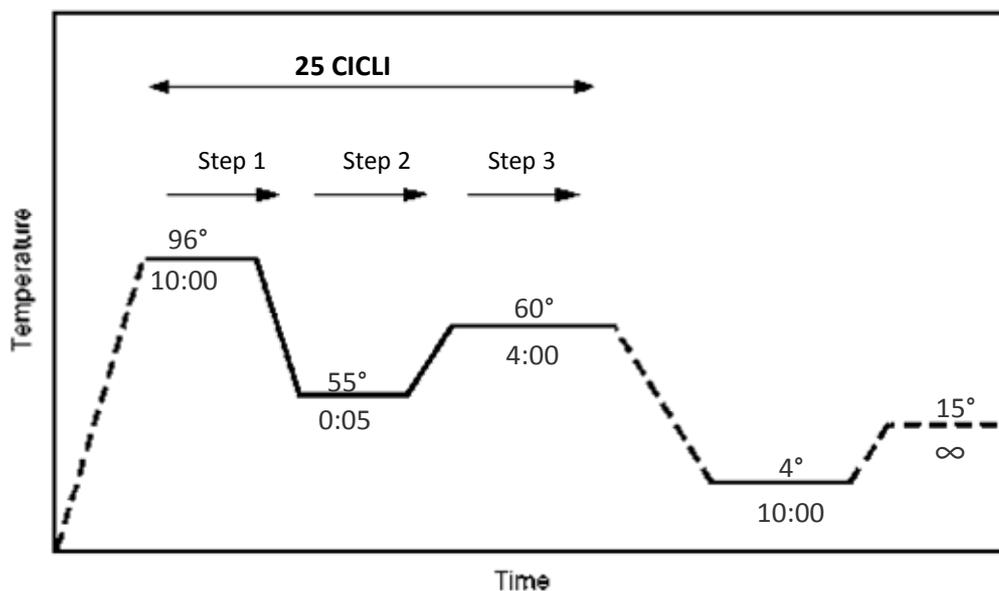


Figura 3.9 - Metodo per le PCR di sequenza utilizzato per i tre marcatori in *D. martius*.

Come mostrato nella figura 3.9, ogni mix viene sottoposto ad un ciclo ripetuto 25 volte, costituito da tre temperature: 96°C per 10 secondi (denaturazione), 55°C per 5 secondi (*annealing*) e 60°C per 4 minuti (estensione). A questi segue la fase di inattivazione della *Taq* polimerasi costituita da un *hold* a 4°C per 10 minuti ed infine la temperatura viene portata e mantenuta a 15°C.

Il prodotto della PCR così ottenuto, costituito da frammenti di diversa lunghezza della sequenza *target*, prima di poter essere inserito all'interno del sequenziatore, deve essere nuovamente purificato per rimuovere i *primer* o i ddNTPs non utilizzati. Generalmente viene usata una precipitazione del DNA tramite Etanolo e Sodio Acetato, sufficiente per ottenere una buona purificazione. Il protocollo prevede l'aggiunta, ai campioni di DNA amplificati, di una soluzione contenente 2 µl di NaAc 3.0 M a pH 5.2, 10.0 µl di ddH₂O e 50 µl di EtOH 100%. A questo segue una centrifugazione a 17.000 rpm a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo aver asportato il surnatante tramite pipette *transfer*, viene fatto un secondo lavaggio del DNA che è precipitato sul fondo della provetta, per eliminare i residui di Sodio Acetato, aggiungendo 70 µl di EtOH al 70% e nuovamente centrifugato a 17.000 rpm a temperatura ambiente per 5 minuti. Si asporta quindi nuovamente il surnatante e si lascia asciugare il *pellet*, contenente il DNA, per far sì che l'etanolo evapori completamente. Il DNA è quindi risospeso in 10 µl di formammide, una sostanza denaturante, e trasferito in un'apposita piastra. Dopo aver subito un'ulteriore denaturazione all'interno di un termociclatore (95°C x 3' + 4°C x 3') la soluzione viene immediatamente caricata nel sequenziatore.

Per analizzare le sequenze è stato utilizzato il sequenziatore automatico ABI PRISM 3130xl *Genetic Analyser (Applied Biosystems)* dotato di 16 capillari di vetro da 36 cm, all'interno dei quali viene fatto correre il DNA. Nei capillari viene introdotto inizialmente un polimero artificiale (POP-4, *Performance Optimized Polymer*) in grado di separare tramite elettroforesi anche frammenti che differiscano per un solo nucleotide in lunghezza. La lettura delle basi avviene grazie alla presenza dei quattro ddNTPs, i quali sono marcati in modo univoco tramite molecole chiamate fluorofori, che possono essere lette dal sequenziatore. I dideossinucleotidi, nel momento in cui vengono incorporati dalla *Taq* polimerasi causano l'arresto della sintesi dei filamenti, consentendo quindi la lettura dell'ultima base azotata di ogni singolo frammento. All'interno dei capillari ogni

frammento viene separato tramite una corsa elettroforetica. In questo modo la successione dei frammenti, o meglio la successione dei ddNTPs terminali di ogni frammento, viene letta tramite una finestra di lettura. Eccitando il fluoroforo tramite un laser, viene provocata un'emissione con lunghezza d'onda caratteristica per ognuna delle quattro basi, che possono così essere riconosciute dal software di analisi (*Sequencing Analysis Applied Biosystems*). I risultati della corsa elettroforetica sono salvati in forma di "elettroferogrammi", in cui ogni picco rappresenta l'emissione luminosa prodotta dal fluoroforo eccitato dal laser, letta dal sequenziatore come un colore. La sequenza dei picchi colorati corrisponderà esattamente alla sequenza del DNA.

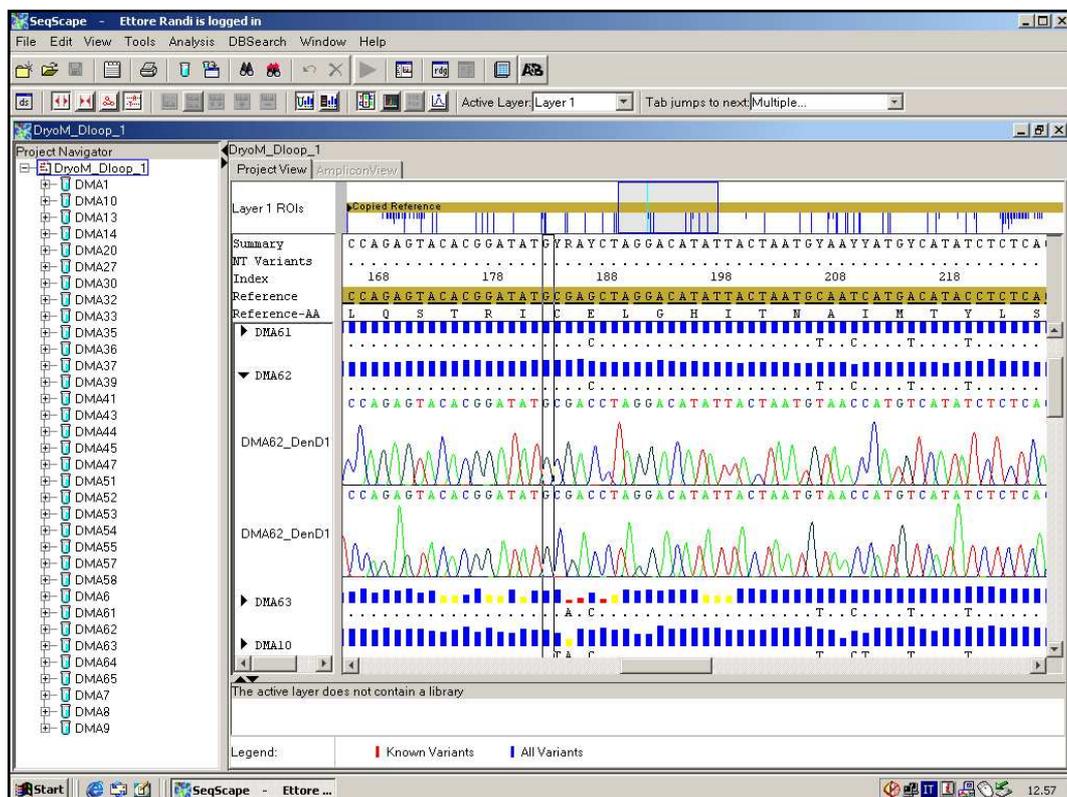


Figura 3.10 - SeqScape v2.5 (Applied Biosystems), software utilizzato nell'elaborazione dei dati elettroforetici: ogni picco rappresenta un nucleotide ed ogni colore è associato univocamente ad ognuna delle quattro basi azotate.

L'elaborazione dei dati elettroforetici è avvenuta tramite il software *SeqScape v2.5 (Applied Biosystems)*, il quale consente l'allineamento delle sequenze ottenute rispetto ad una di riferimento, ed assegna ad ogni picco le relative basi azotate. Assegna inoltre un valore di qualità al segnale ottenuto permettendo la correzione manuale da parte dell'operatore nei casi in cui la sequenza sia di

difficile lettura. In particolare per quanto riguarda l'allineamento di citocromo *b* e D-loop, non essendo disponibili sequenze complete di *D. martius*, ho utilizzato, come sequenze di riferimento, i relativi frammenti del genoma mitocondriale completo di *D. pileatus* ottenuto da *GenBank* (*GenBank Accession no.* NC_008546.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Per quanto riguarda invece l'allineamento del β -fibrinogeno ho usato come riferimento la sequenza del gene di *D. martius* disponibile su *GenBank* (*GenBank Accession no.* DQ479208, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.8 Analisi filogenetica

I dati così ottenuti sono stati importati nel software *MEGA* 3.1 (Tamura *et al.*, 2007). Con *MEGA* 3.1 è stato possibile ricostruire l'intera sequenza del citocromo *b* a partire dai tre frammenti ottenuti, verificando che le due zone di sovrapposizione fossero state amplificate in modo identico dalle tre diverse coppie di *primer*.

Ho ottenuto gli aplotipi per entrambi i marcatori mitocondriali tramite il *software DnaSP* v5 (Librado e Rozas, 2009). Quelli ottenuti per la regione di controllo del mtDNA sono stati inoltre allineati con altri sei diversi aplotipi ottenuti da Rutkowski *et al.* (2008), disponibili su *Genbank* (*Accession no.* EF015534, EF015536, EF015537, EF015535, EF015533, EF055577; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e che corrispondono a sei campioni provenienti da Polonia ed Olanda.

Inizialmente ho verificato che non fossero presenti “copie nucleari”, ossia sequenze omologhe presenti nel genoma nucleare (pseudogeni nucleari o *numts*), il cui sequenziamento può avvenire nel caso si utilizzino *primer* conservativi, disegnati su altri organismi ed a diversi livelli tassonomici. Anche se il fenomeno è ancora scarsamente conosciuto nel genoma degli uccelli, i geni mitocondriali sembrano evolvere fino a 10 volte più velocemente dei corrispettivi nucleari e le differenze varierebbero tra il 2 ed il 31%. Di conseguenza, l'analisi delle sequenze amplificate, qualora queste includessero pseudogeni nucleari, potrebbe indurre a conclusioni erronee e fuorvianti (Arctander, 1995; Sorenson e Fleischer, 1996; Pereira e Baker, 2004).

Per escludere eventuali problemi di questo tipo, ho tradotto le sequenze di citocromo *b* ottenute in sequenze amminoacidiche tramite *MEGA* 3.1, per

escludere l'eventuale presenza di mutazioni *frame-shift* e di codoni di stop all'interno delle sequenze stesse. Per quanto riguarda il D-loop, in quanto codificante, non è stato possibile valutare la presenza di anomalie nella sequenza amminoacidica. Tuttavia, alcune indicazioni, tra cui l'assenza di bande anomale durante le corse elettroforetiche, l'utilizzo di *primer* specifici per la famiglia, l'assenza di sequenze ambigue e l'utilizzo di materiale biologico ricco di DNA mitocondriale, hanno permesso di escludere con buona probabilità l'amplificazione accidentale di pseudogeni nucleari.

Ho quindi identificato, tramite *MEGA* 3.1, i siti nucleotidici polimorfici, distinguendo tra siti *parsimonia-informativi* e *non-informativi*. Le sostituzioni sono state classificate come *transizioni* ($A \leftrightarrow G$ o $C \leftrightarrow T$) e *transversioni* ($C/T \leftrightarrow A/G$), verificando se determinassero codoni codificanti per lo stesso amminoacido (*mutazioni sinonime*), o per un diverso amminoacido (*mutazioni non-sinonime*). Tramite *DnaSP* v5 ho analizzato la composizione in basi dei marcatori analizzati, e calcolato l'indice di diversità aplo-tipica (Hd), l'indice di diversità nucleotidica (π) ed il numero medio di differenze nucleotidiche per sito tra coppie di sequenze (k).

Successivamente, mi sono concentrato sulla costruzione di alberi filogenetici. Un albero filogenetico è una rappresentazione bidimensionale delle relazioni evolutive esistenti fra entità biologiche, che condividano un comune antenato (Gregory, 2008). Tramite la costruzione di alberi filogenetici è quindi possibile confrontare le sequenze di DNA ottenute e descrivere le relazioni evolutive esistenti fra diversi gruppi tassonomici (Avise, 1994). All'interno di un albero, ogni specie (nel nostro caso ogni aplotipo) è rappresentata agli apici dei rami, ed è connessa alle altre tramite nodi interni, ovvero i punti di divergenza dagli ipotetici predecessori. Il nodo iniziale rappresenta la radice stessa dell'albero e quindi l'antenato comune. Nelle ricostruzioni filogenetiche è anche necessario attribuire un punto di origine, ovvero un gruppo esterno, detto *outgroup*. Esso deve fungere da radice dell'albero, in base al quale viene valutata la direzione evolutiva dei vari caratteri. La scelta dell'*outgroup* presuppone inoltre una conoscenza preliminare delle relazioni tra i vari gruppi (Avise, 1994; Gregory, 2008).

Per quanto riguarda l'analisi delle sequenze di citocromo *b* di *D. martius*, ho scelto come *outgroup* il picchio pileato, *D. pileatus* (*GenBank Accession no.* DQ780879, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ed il picchio lineato, *D. lineatus*

(*GenBank Accession no.* DQ479270, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Per quanto riguarda invece il dominio I della regione di controllo del mtDNA, ho invece utilizzato come *outgroup* le sequenze di picchio pileato, *D. pileatus* (*GenBank Accession no.* DQ780879, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e di picchio dorato, *Colaptes auratus* (*GenBank Accession no.* AF082044, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). In entrambi i casi sono state scelte le due specie tassonomicamente più vicine al picchio nero, di cui fossero disponibili *online* le sequenze di citocromo *b* e D-loop.

Per la costruzione di un albero è indispensabile procedere al calcolo di una matrice di distanze genetiche, sulla base della quale verranno determinate le connessioni fra i diversi gruppi e le lunghezze dei rami. All'interno della matrice, gli individui sono confrontati a coppie per valutare il numero di differenze nucleotidiche, da cui viene poi calcolata una stima di distanza evolutiva. Nello studio di *D. martius* ho utilizzato il modello di *Tamura-Nei* (Tamura e Nei, 1993; Nei e Kumar, 2000), il quale prende in considerazione le caratteristiche dell'evoluzione molecolare del mtDNA. In particolare il modello tiene conto della diversa frequenza dei nucleotidi all'interno dei filamenti, del più alto numero di transizioni rispetto a quello di transversioni nucleotidiche e della minor frequenza di sostituzioni non-sinonime rispetto a quelle sinonime. Quest'ultime in particolare, si verificano all'interno dei codoni soprattutto in terza posizione, in cui è quindi presente un più alto grado di variabilità. Inoltre, il modello include una correzione per evitare una sottostima della distanza genetica dovuta a *multiple hits*, ovvero eventi mutazionali ripetuti sullo stesso nucleotide (Brown *et al.*, 1982; Aquadro e Greenberg, 1983; Hasegawa *et al.*, 1985; Tamura e Nei, 1993).

Procedendo con le analisi è stato inoltre necessario effettuare una scelta fra le diverse tipologie di alberi filogenetici che possono essere realizzati. Ognuno di questi si contraddistingue dagli altri per le operazioni di calcolo ed elaborazione delle distanze genetiche tra taxa. Nell'analisi delle sequenze di *D. martius* ottenute nel presente studio ho scelto di utilizzare due diversi metodi: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) (Sneath e Sokal, 1973) e *Neighbour-Joining* (NJ) (Saitou e Nei, 1987).

L'UPGMA è sicuramente il modello più semplice. Esso identifica e connette, ad ogni passaggio, i due elementi separati dalla minima distanza media, calcolata dando un peso uguale ad ogni unità sistematica (da cui il termine *unweighted*).

Quindi, partendo dalle due sequenze più simili fra loro, il sistema aggiunge ad ogni passaggio un nodo all'albero, scartando dalla matrice gli elementi già utilizzati. Il principale presupposto del metodo è che le sequenze evolvano alla stessa velocità lungo tutti i rami dell'albero, cosa che non sempre corrisponde alla realtà (Sneath e Sokal, 1973; Avise, 1994).

Il NJ, a differenza del'UPGMA, costruisce una matrice modificata, in cui al valore di distanza tra ogni coppia di taxa vengono sottratti i valori di distanza rispetto agli altri elementi presenti nel sistema. In questo modo, di volta in volta, vengono identificate ed unite le coppie con i valori più bassi. Inoltre, nella costruzione dell'albero viene osservato il principio di minima evoluzione o massima parsimonia, il quale prevede la scelta dell'albero più semplice e con il minor numero di cambiamenti evolutivi possibili (Saitou e Nei, 1987; Avise, 1994).

Per determinare il grado di affidabilità ed ottenere dei valori di confidenza nella costruzione degli alberi ho utilizzato il metodo statistico del *bootstrap* (Efron, 1979; Efron e Gong, 1983; Felsenstein, 1985). Esso prevede che i dati delle sequenze vengano rielaborati ricampionando casualmente le colonne verticali, fino a formare almeno 1000 nuovi allineamenti. Sull'albero vengono quindi inseriti i valori di *bootstrap*, ovvero la percentuale con cui ogni ramificazione trova riscontro sul totale delle repliche (Soltis e Soltis, 2003). Per quanto riguarda l'interpretazione dei valori di *bootstrap*, Felsenstein (1985) propose come significativi solamente i nodi con valori uguali o maggiori di 95%. Tuttavia, numerosi autori spostano il valore di confidenza al 70%, valore che in certe condizioni può corrispondere ad un reale clade (Hillis e Bull, 1993; Soltis e Soltis, 2003).

Le stesse metodologie di analisi sono state utilizzate per i due principali marcatori considerati. Ho infine elaborato gli aplotipi considerando le sequenze sia di citocromo b che di D-loop ed in seguito è stato elaborato un *network* filogenetico utilizzando il software TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Il *software* effettua le connessioni tra gli aplotipi più vicini secondo il principio di parsimonia, considerando un livello di confidenza del 95%. Identifica, inoltre, l'aplotipo ancestrale da cui sarebbero derivati gli altri elementi considerati, collocandolo in posizione centrale. Eventuali aplotipi mancanti vengono indicati nella visualizzazione finale come nodi. L'utilizzo di *network* si adatta meglio ai bassi livelli di divergenza che spesso caratterizzano studi intraspecifici. I metodi

tradizionali di filogenesi, infatti, hanno spesso difficoltà nel ricostruire con fedeltà le parentele tra individui strettamente correlati tra loro e caratterizzati da bassa diversità (Clement *et al.*, 2000).

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1 Resa dei campioni

Le operazioni di estrazione, amplificazione e sequenziamento hanno avuto esito differente a seconda della tipologia dei campioni utilizzati, a seconda della qualità del DNA in esso contenuto. Utilizzando materiale da museo è inevitabile che parte di essi non vengano amplificati con successo, a causa dell'eccessivo degrado del DNA. I filamenti di DNA possono subire una frammentazione in poche decine o centinaia di nucleotidi, a causa dell'azione digestiva delle endonucleasi o per l'azione di agenti esterni. Questo rende le analisi più difficoltose e maggiormente esposte a contaminazioni, pur non invalidandone i risultati (Randi *et al.*, 2002).

4.1.1 Resa del citocromo b. Nel tentativo di aumentare la resa, si sono utilizzate tre diverse coppie di *primer*, che amplificassero frammenti di lunghezza ridotta e presentassero zone di sovrapposizione. Si è verificato, in alcuni casi, che un campione fosse amplificato con successo da una coppia di *primer* ma non dalle restanti due, o viceversa. In fase di allineamento ed analisi delle sequenze ho utilizzato solo quei campioni per cui era stato possibile ottenere l'intera sequenza del citocromo, escludendo quindi amplificazioni parziali. Ho quindi ottenuto complessivamente 53 sequenze, ognuna corrispondente ad un distinto individuo. Le sequenze ottenute da due campioni di dubbia provenienza sono state escluse dalle analisi.

Per quanto riguarda la parte non invasiva, uno solo tra i 29 campioni non è risultato amplificato interamente con successo. La resa è stata quindi prossima al 100%, probabilmente grazie alla maggiore qualità del DNA contenuto in essi.

L'amplificazione dei 6 campioni di tessuto è fallita in un solo caso, in cui ho riscontrato un problema di conservazione: l'etanolo era fuoriuscito a causa di una chiusura non corretta del tappo della provetta. Tuttavia il fatto che la regione di controllo del mtDNA dello stesso campione sia stata amplificata con successo induce a considerare che possa essersi verificato un errore in una delle fasi di analisi in laboratorio.

Il risultato è stato ben diverso per quanto riguarda la parte museale: su 60 campioni, 20 sono stati amplificati con successo, con una resa pari al 30%. In particolare, nel caso di frammenti di polpastrello sono stati amplificati con successo 13 campioni su 44, con una resa quindi inferiore al 30%, mentre per le penne museali la resa è stata di poco superiore al 43%, con 7 campioni su 16 totali (tab. 4.1).

4.1.2 Resa del D-loop. Per quanto riguarda il dominio I della regione di controllo del mtDNA ho complessivamente ottenuto 55 sequenze, ognuna corrispondente ad un distinto individuo. La sequenza ottenuta da un campione di dubbia provenienza è stata esclusa dalle successive analisi.

Per quanto riguarda la parte dei campioni non invasivi, ho amplificato con successo 27 campioni su 29 e solo in 3 casi ci sono stati esiti negativi. In questo caso tutti i 6 campioni freschi di tessuto hanno dato buoni risultati. Mentre per quanto riguarda la parte museale, 23 campioni su 60 sono stati amplificati con successo, con una resa circa pari al 38%. Tra di essi, i polpastrelli presentano nuovamente una resa inferiore rispetto alle penne da museo.

Riporto nelle tabelle 4.1 e 4.2 il numero campioni amplificati con successo rispetto al tipo di campione, per ogni regione inclusa nel campionamento.

<i>Marcatore</i>	<i>Non invasivo (n)</i>	<i>Fresco (n)</i>	<i>Polpastrello museale (n)</i>	<i>Penne museali (n)</i>	<i>Totale</i>
<i>Citocromo</i>	28 (29)	5 (6)	13 (44)	7 (16)	53
<i>D-loop</i>	27 (29)	6 (6)	13 (44)	9 (16)	55

Tabella 4.1 - Numero di campioni analizzati con successo rispetto al tipo ed al marcatore utilizzato; tra parentesi il numero totale dei campioni analizzati.

<i>Marcatore (n)</i>	<i>Alpi occidentali (36)</i>	<i>Alpi orientali (45)</i>	<i>Appennino Settentrionale (2)</i>	<i>Appennino Meridionale (3)</i>	<i>Ignota (8)</i>
<i>Resa Cyt b (53)</i>	26	23	2	3	2
<i>Resa D-loop (55)</i>	26	25	2	2	2

Tabella 4.2 - Numero di campioni analizzati con successo per regione geografica; tra parentesi il numero totale dei campioni analizzati.

4.2 Analisi del il β -fibrinogeno introne 7

L'analisi del β -fibrinogeno introne 7 ha consentito di ricavare 8 sequenze rappresentative di 8 individui provenienti da diverse zone dell'arco alpino. Sono state escluse le porzioni iniziali e terminali degli amplificati così ottenute, in quanto spesso queste regioni non vengono determinate in modo del tutto accurato durante il sequenziamento. Sono state quindi analizzate sequenze di lunghezza pari a 859 bp, le quali complessivamente non hanno mostrato siti polimorfici. Si è quindi scelto di non proseguire con l'utilizzo di questo marcatore nucleare e di non amplificarlo nei restanti campioni.

4.3 Analisi del citocromo b

L'intera sequenza del citocromo b è stata ricostruita tramite il *software* MEGA 3.1 a partire dai frammenti ottenuti utilizzando le tre coppie di *primer*, appositamente disegnate su *D. martius*. In questo modo ho ottenute 53 sequenze di lunghezza pari a 872 bp, rappresentative di 53 diversi individui campionati. Anche in questo caso ho evitato di includere le porzioni iniziali e terminali del gene, che spesso non vengono determinate in modo del tutto accurato durante il sequenziamento.

Utilizzando il *software* MEGA 3.1 ho individuato 13 siti polimorfici. Tra questi, 8 sono risultati parsimonia-informativi (*parsim-informative site*), in quanto mostravano almeno due diversi nucleotidi, ognuno dei quali presente come minimo in due campioni. I restanti 5 siti polimorfici sono risultati non-informativi (*singleton site*), in quanto contenenti varianti nucleotidiche presenti in singoli filamenti. Ho individuato 12 transizioni ed una sola transversione tra le diverse sostituzioni nucleotidiche. Queste sono risultate non-sinonime in 4 casi (nelle posizioni nucleotidiche 389, 471, 756 e 809), due in prima e due in seconda posizione del codone. Le restanti 9 sostituzioni sono risultate sinonime e collocate tutte in terza posizione nel codone.

Utilizzando il *software* DnaSP v5 ho potuto raggruppare le sequenze ottenute in 12 diversi aplotipi, che sono stati poi oggetto delle successive analisi (fig. 4.6). Tramite il *software* MEGA 3.1 ho quindi costruito le matrici di distanza genetica tra i diversi aplotipi secondo il modello *Tamura-Nei* (tab. 4.3) e gli alberi filogenetici secondo i metodi NJ (fig. 4.1) e UPGMA (fig 4.2), utilizzando come test statistico un *bootstrap* di 1000 repliche. All'interno del NJ l'aplotipo H01 è

separato con valore di *bootstrap* del 100% del restante gruppo. Nell'UPGMA è invece l'aplotipo H08 ad essere diviso con valore di *bootstrap* pari a 100%.

Sono stati quindi calcolati gli indici di diversità molecolare, ovvero l'indice di diversità aplotipica (H_d), l'indice di diversità nucleotidica (π) ed il numero medio di differenze nucleotidiche per sito tra coppie di sequenze (k). La composizione in basi delle sequenze ed ogni altro dettaglio sono riportati nelle tabelle 4.4 e 4.5.

		DISTANZA MEDIA TRA APLOTIPI											
APLOTIPI		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	H01		0.002	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
2	H02	0.002		0.002	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
3	H03	0.003	0.003		0.002	0.001	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002
4	H04	0.001	0.001	0.002		0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
5	H05	0.002	0.002	0.001	0.001		0.001	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002
6	H06	0.003	0.003	0.002	0.002	0.001		0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002
7	H07	0.003	0.003	0.002	0.002	0.001	0.002		0.003	0.002	0.002	0.002	0.002
8	H08	0.005	0.005	0.006	0.003	0.005	0.006	0.006		0.003	0.003	0.003	0.003
9	H09	0.002	0.005	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.007		0.002	0.002	0.002
10	H10	0.003	0.003	0.002	0.002	0.001	0.002	0.002	0.006	0.003		0.002	0.001
11	H11	0.003	0.003	0.002	0.002	0.001	0.002	0.002	0.006	0.003	0.002		0.002
12	H12	0.005	0.005	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.007	0.005	0.001	0.003	

Tabella 4.3 - Distanze genetiche medie tra aplotipi per il citocromo *b* di *D. martius* (valori ottenuti con *DnaSP v5*); i valori posti sopra la diagonale si riferiscono agli errori standard.

<i>N.</i>	<i>bp</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>H_d</i> (<i>s</i>)	π	<i>K</i>	<i>T_s</i> (<i>T_s/site</i>)	<i>T_v</i> (<i>T_v/site</i>)
53	872	13 (1.5%)	12	0.723 (0.061)	0.0015	1.306	12 (0.014)	1 (0.001)

Tabella 4.4 - Indici di diversità molecolare delle sequenze di citocromo *b* di *D. martius* (valori ottenuti con *DnaSP v5*). *N*: dimensioni del campionamento; *bp*: numero di coppie di basi amplificate; *S*: numero dei siti polimorfici segreganti; *H*: numero di aplotipi; *H_d*: diversità aplotipica, tra parentesi la deviazione standard; π : diversità nucleotidica; *K*: numero medio di differenze nucleotidiche; *T_s*: numero di transizioni, tra parentesi rapporto tra *T_s* ed il numero di siti analizzati; *T_v*: numero di transversioni, tra parentesi rapporto tra *T_v* ed il numero di siti analizzati.

N.	bp	S	P.I.S.	Non Syn.	Syn.	Siti variabili per codone			Frequenze nucleotidiche			
						1st	2nd	3rd	% T	% C	% A	% G
53	872	13 (1.5%)	8 (0.9%)	4	9	2 (15.4%)	2 (15.4%)	9 (69,2%)	25.1	37.7	23.3	13.9

Tabella 4.5 - Caratteristiche e variabilità delle sequenze di citocromo *b* di *D. martius* (valori ottenuti con *DnaSP* v5 e *MEGA* 3.1). N: dimensioni del campionamento; bp: numero di coppie di basi amplificate; S: numero dei siti polimorfici segreganti; P.S.I.: siti parsimonia-informativi; Syn: mutazioni sinonime; Non-Syn: mutazioni non sinonime.

Aplotipo	N	Località di campionamento (numero di individui)
Hap 01	1	Basilicata - Fardella (1)
Hap 02	6	Trentino - Lavs (1), Veneto - Belluno (1), Trentino - Rovereto (1), Lombardia - Sondrio (2), Trentino - Cadino (1)
Hap 03	2	Trentino - Molina di Ledro (1), Trentino - Dro (1)
Hap 04	4	Campania - Piaggine (1), Calabria - Cosenza (1), Valle d'Aosta - Champdepraz (2)
Hap 05	27	Lombardia - Bergamo (1), Veneto - Ospitale di Cadore (1), Veneto - San Pietro di Cadore (1), Svizzera - Lugano (1), Emilia Romagna - Campigna (2), Valle d'Aosta - Morgex (1), Piemonte - Salbertrand (3), Valle d'Aosta - Mont Avic (9), Lombardia - Breno (1), Trentino - Trento (1), Veneto - Cesiomaggiore (1), Lombardia - Sondrio (2), Piemonte - Vercelli (1), Trentino - Rumo (1), Trentino - Cles (1)
Hap 06	2	Friuli Venezia Giulia - Moggio Udinese (1), Trentino - Tovel (1)
Hap 07	1	Svizzera - Lugano (1)
Hap 08	1	Slovenia - Aidussina (1)
Hap 09	1	Trentino - Predazzo (1)
Hap 10	3	Valle d'Aosta - Saint Vincent (1), Valle d'Aosta - Gignod (1), Piemonte - Soprana (1)
Hap 11	3	Valle d'Aosta - Mont Avic (3)
Hap 12	2	Valle d'Aosta - Mont Avic (2)

Tabella 4.6 - Elenco dei 12 aplotipi identificati utilizzando *DnaSP* v5 (Librando e Rozas, 2009) sulle 53 sequenze di lunghezza pari a 872 bp di citocromo *b* di *D. martius*.

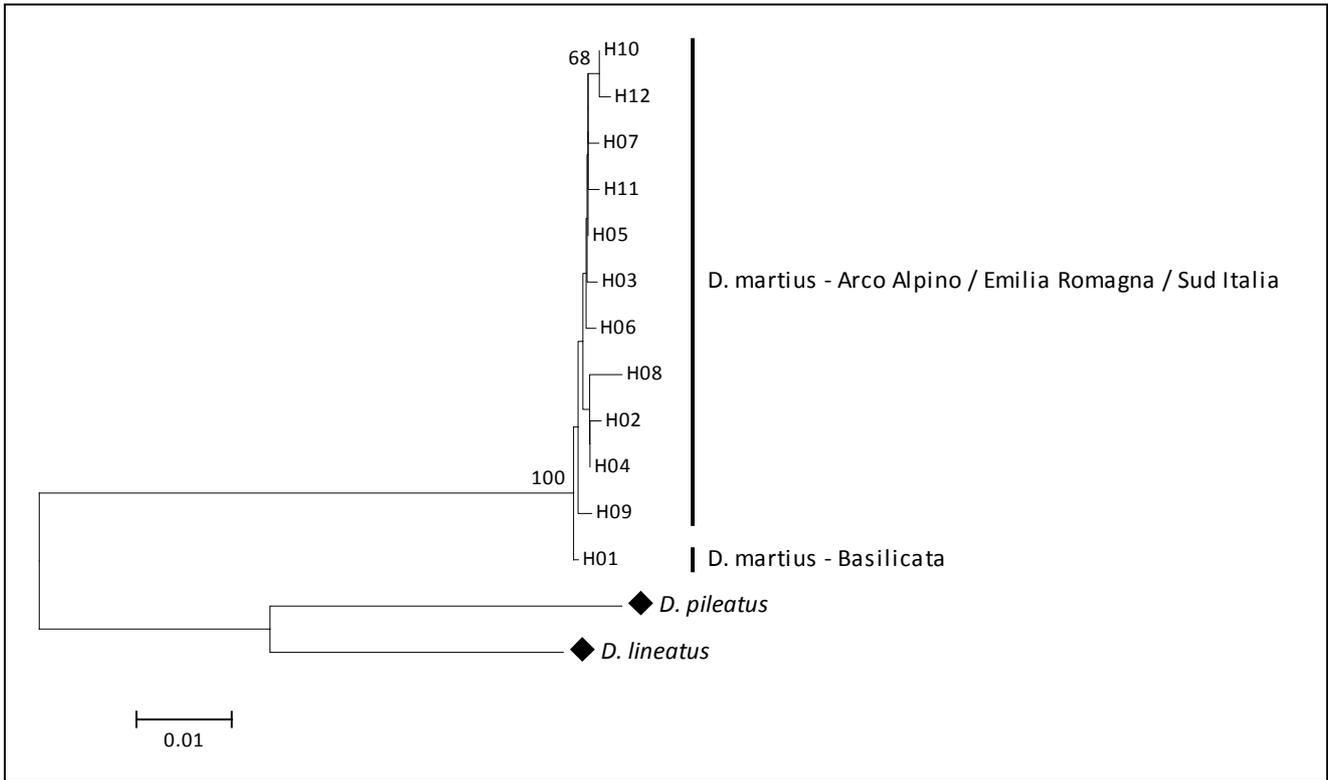


Figura 4.1 - *Neighbour-Joining Tree* (Saitou e Nei, 1987) costruito sulle sequenze di citocromo *b* di *D. martius*. Sono mostrati solo i valori di *bootstrap* con consenso maggiore del 50%.

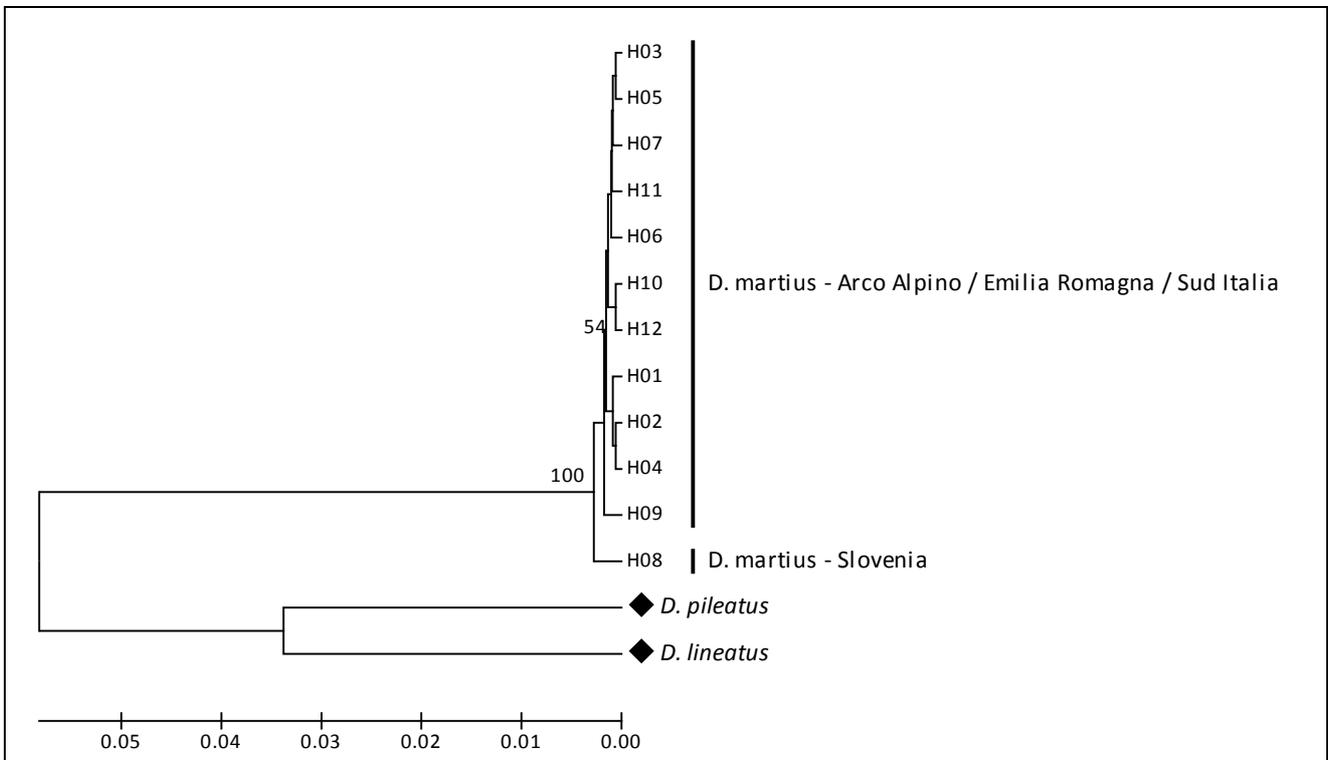


Figura 4.2 Albero UPGMA (Sneath e Sokal, 1973) ottenuto dagli aplotipi del citocromo *b* di *D. martius*. Sono mostrati solo i valori di *bootstrap* con consenso maggiore del 50%.

4.4 Analisi del dominio ipervariabile I della regione di controllo del mtDNA

L'analisi ed il sequenziamento del D-loop ha consentito di ottenere 55 sequenze rappresentative di 55 diversi individui. Anche in questo caso le porzioni iniziali e terminali del gene, sono state escluse dalle analisi. Per le successive analisi ho utilizzato sequenze di 279 bp. Utilizzando il software *MEGA* 3.1 ho individuato 24 siti polimorfici, dei quali 16 sono risultati parsimonia-informativi (*parsim-informative site*), ed i restanti 8 non-informativi (*singleton site*). Erano presenti complessivamente, tra le diverse sostituzioni nucleotidiche, 21 transizioni e 3 transversioni (tab. 4.9). Utilizzando del software *DnaSP* v5 ho raggruppato le sequenze ottenute nei 19 diversi aplotipi riportati in tabella 4.9, a cui ne ho aggiunti 6 ottenuti da Rutkowski *et al.* (2008) rappresentativi di individui provenienti da Polonia e Olanda e disponibili su *Genbank*. I 25 aplotipi così ottenuti ed allineati sono stati quindi oggetto delle successive analisi. Utilizzando il software *MEGA* 3.1 ho costruito le matrici di distanza genetica tra i diversi aplotipi secondo il modello *Tamura-Nei* (tab. 4.8), e gli alberi filogenetici secondo i metodi NJ (fig. 4.3) e UPGMA (fig. 4.4), utilizzando come test statistico un bootstrap di 1000 repliche. All'interno del NJ i diversi gruppi sono separati da valori di bootstrap molto bassi. Questi tendono ad aumentare nell'UPGMA che divide gli aplotipi di Polonia ed Olanda (99%) e gli aplotipo del sud Italia (53%) da quelli di arco alpino ed Appennino settentrionale. Ho infine calcolato gli indici di diversità molecolare ed ottenuto i valori di diversità aplotipica (H_d), diversità nucleotidica (π) ed il numero medio di differenze nucleotidiche per sito tra coppie di sequenze (k) (tab. 4.7).

Regione di campionamento	N	bp	S	H	H _d (s)	π	K	P.I.S.	T _s (T _s /site)	T _v (T _v /site)	Frequenze nucleotidiche			
											% T	% G	% C	% A
Totale	61	279	24 (8.6%)	24	0,857 (0,038)	0,0084	2,352	16	21 (0.075)	3 (0.011)	28.8	13.0	29.3	29.0
Polonia	6	279	6 (2.2%)	6	1,000 (0,096)	0,0081	2,267	1	6 (0.021)	0 (0.00)	28.6	13.1	29.1	29.2
Italia	55	279	20 (7,9%)	18	0,824 (0,045)	0,0063	1,762	11	20 (0.072)	0 (0.00)	28.9	12.9	29.2	29.0

Tabella 4.7 - Indici di diversità molecolare e variabilità delle sequenze di D-loop in *D. martius*. N: dimensioni del campionamento; bp: numero di coppie di basi amplificate; S: numero dei siti polimorfici segreganti; H: numero di aplotipi; H_d: diversità aplotipica, tra parentesi la deviazione standard; π : diversità nucleotidica; K: numero medio di differenze nucleotidiche; P.S.I.: siti parsimonia-informativi; T_s: numero di transizioni, tra parentesi rapporto tra T_s ed il numero di siti analizzati; T_v: numero di transversioni, tra parentesi rapporto tra T_v ed il numero di siti analizzati.

APLOTIPI		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	H01		0.005	0.006	0.006	0.006	0.007	0.007	0.006	0.005	0.006	0.006	0.007	0.007	0.006	0.008	0.007	0.007	0.006	0.008	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009
2	H02	0.007		0.008	0.008	0.008	0.007	0.009	0.008	0.007	0.008	0.008	0.007	0.009	0.008	0.010	0.009	0.009	0.008	0.010	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010
3	H03	0.011	0.018		0.005	0.005	0.006	0.006	0.005	0.004	0.005	0.005	0.006	0.004	0.005	0.005	0.006	0.006	0.005	0.007	0.006	0.009	0.009	0.009	0.008
4	H04	0.011	0.018	0.007		0.005	0.006	0.004	0.005	0.004	0.005	0.005	0.006	0.006	0.005	0.007	0.006	0.004	0.005	0.007	0.008	0.009	0.007	0.007	0.006
5	H05	0.011	0.018	0.007	0.007		0.006	0.006	0.005	0.004	0.005	0.005	0.006	0.006	0.005	0.007	0.006	0.006	0.005	0.007	0.008	0.009	0.007	0.009	0.008
6	H06	0.015	0.015	0.011	0.011	0.011		0.007	0.006	0.005	0.006	0.006	0.007	0.007	0.006	0.008	0.007	0.007	0.006	0.008	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009
7	H07	0.015	0.022	0.011	0.004	0.011	0.015		0.006	0.005	0.006	0.006	0.007	0.007	0.006	0.008	0.007	0.005	0.006	0.008	0.009	0.010	0.008	0.006	0.007
8	H08	0.011	0.018	0.007	0.007	0.007	0.011	0.011		0.004	0.005	0.005	0.006	0.006	0.005	0.007	0.006	0.006	0.005	0.007	0.008	0.009	0.009	0.009	0.008
9	H09	0.007	0.015	0.004	0.004	0.004	0.007	0.007	0.004		0.004	0.004	0.005	0.005	0.004	0.006	0.005	0.005	0.004	0.006	0.007	0.008	0.008	0.008	0.007
10	H10	0.011	0.018	0.007	0.007	0.007	0.011	0.011	0.007	0.004		0.005	0.006	0.006	0.005	0.007	0.006	0.006	0.005	0.007	0.008	0.009	0.009	0.009	0.008
11	H11	0.011	0.018	0.007	0.007	0.007	0.011	0.011	0.007	0.004	0.007		0.006	0.004	0.005	0.007	0.006	0.006	0.005	0.007	0.008	0.009	0.009	0.009	0.008
12	H12	0.015	0.015	0.011	0.011	0.011	0.015	0.015	0.011	0.007	0.011	0.011		0.007	0.006	0.008	0.007	0.007	0.006	0.008	0.009	0.010	0.010	0.010	0.009
13	H13	0.015	0.022	0.004	0.011	0.011	0.015	0.015	0.011	0.007	0.011	0.004	0.015		0.006	0.006	0.007	0.007	0.006	0.008	0.007	0.010	0.010	0.010	0.009
14	H14	0.011	0.018	0.007	0.007	0.007	0.011	0.011	0.007	0.004	0.007	0.007	0.011	0.011		0.007	0.006	0.006	0.005	0.007	0.008	0.009	0.009	0.009	0.008
15	H15	0.018	0.026	0.007	0.015	0.015	0.018	0.018	0.015	0.011	0.015	0.015	0.018	0.011	0.015		0.008	0.008	0.007	0.009	0.008	0.011	0.010	0.010	0.010
16	H16	0.015	0.022	0.011	0.011	0.011	0.015	0.015	0.011	0.007	0.011	0.011	0.015	0.015	0.011	0.018		0.007	0.006	0.008	0.009	0.008	0.010	0.010	0.009
17	H17	0.015	0.022	0.011	0.004	0.011	0.015	0.007	0.011	0.007	0.011	0.011	0.015	0.015	0.011	0.018	0.015		0.006	0.008	0.009	0.010	0.008	0.008	0.007
18	H18	0.011	0.018	0.007	0.007	0.007	0.011	0.011	0.007	0.004	0.007	0.007	0.011	0.011	0.007	0.015	0.011	0.011		0.007	0.008	0.009	0.009	0.009	0.008
19	Dmar 1	0.018	0.026	0.014	0.015	0.014	0.018	0.018	0.014	0.011	0.015	0.014	0.018	0.018	0.014	0.022	0.018	0.018	0.014		0.004	0.005	0.005	0.005	0.004
20	Dmar 2	0.022	0.030	0.011	0.018	0.018	0.022	0.022	0.018	0.014	0.018	0.018	0.022	0.014	0.018	0.018	0.022	0.022	0.018	0.004		0.006	0.006	0.006	0.005
21	Dmar 3	0.026	0.033	0.022	0.022	0.022	0.026	0.026	0.022	0.018	0.022	0.022	0.026	0.026	0.022	0.030	0.018	0.026	0.022	0.007	0.011		0.007	0.007	0.006
22	Dmar 4	0.026	0.033	0.022	0.014	0.015	0.026	0.018	0.022	0.018	0.022	0.022	0.026	0.026	0.022	0.029	0.026	0.018	0.022	0.007	0.011	0.015		0.005	0.004
23	Dmar 5	0.026	0.033	0.022	0.014	0.022	0.026	0.011	0.022	0.018	0.022	0.022	0.026	0.026	0.022	0.029	0.026	0.018	0.022	0.007	0.011	0.015	0.007		0.004
24	Dmar 6	0.022	0.029	0.018	0.011	0.018	0.022	0.014	0.018	0.015	0.018	0.018	0.022	0.022	0.018	0.026	0.022	0.014	0.018	0.004	0.007	0.011	0.004	0.004	

Tabella 4.8 - Distanze genetiche medie tra aplotipi per il D-loop di *D. martius* (valori ottenuti con *DnaSP* v5); i valori posti sopra la diagonale indicano i rispettivi errori standard.

Aplotipo	N	Località di campionamento (numero di individui)
Hap 01	1	Basilicata - Fardella (1)
Hap 02	1	Campania - Piaggine (1)
Hap 03	5	Lombardia - Bergamo (1), Valle d'Aosta - Mont Avic (3), Lombardia - Sondrio (1)
Hap 04	6	Valle d'Aosta - Saint Vincent (1), Valle d'Aosta - Gignod (1), Piemonte - Soprana (1), Valle d'Aosta - Mont Avic (2), Veneto - Ospitale di Cadore (1)
Hap 05	1	Valle d'Aosta - Saint Vincent (1)
Hap 06	1	Veneto - San Pietro di Cadore (1)
Hap 07	1	Svizzera - Lugano (1)
Hap 08	2	Slovenia - Aidussina (1), Trentino - Trento (1),
Hap 09	21	Slovenia - Aidussina (1), Trentino - Predazzo (1), Trentino - Rumo (1), Trentino - Cadino (1), Trentino - Lavis (1), Piemonte - Salbertrand (2), Valle d'Aosta - Mont Avic (6), Lombardia - Sondrio (2), Lombardia - Bratto Dorga (1), Veneto - Belluno (1), Veneto - Cesiomaggiore (1), Friuli Venezia Giulia - Chiusaforte (1), Emilia Romagna - Campigna (2)
Hap 10	1	Trentino - Predazzo (1)
Hap 11	1	Lombardia - Breno (1)
Hap 12	5	Valle d'Aosta - Mont Avic (4), Trentino - Tovel (1)
Hap 13	3	Trentino - Molina di Ledro (1), Trentino - Dro (1), Trentino - Cles (1)
Hap 14	1	Trentino - Rovereto (1)
Hap 15	1	Svizzera - Lugano (1)
Hap 16	2	Valle d'Aosta - Mont Avic (2)
Hap 17	1	Piemonte - Novara (1)
Hap 18	1	Veneto - Belluno (1)
Dmar1	1	<i>Genbank Accession no.</i> EF015534
Dmar2	1	<i>Genbank Accession no.</i> EF015536
Dmar3	1	<i>Genbank Accession no.</i> EF015537
Dmar4	1	<i>Genbank Accession no.</i> EF015535
Dmar5	1	<i>Genbank Accession no.</i> EF015533
Dmar6	1	<i>Genbank Accession no.</i> EF055577

Tabella 4.9 - Elenco dei 18 aplotipi identificati utilizzando *DnaSP v5* (Librando e Rozas, 2009) su 55 sequenze di lunghezza pari a 280 bp del dominio I della regione di controllo del mtDNA *b* di *D. martius*; all'elenco sono stati aggiunti gli aplotipi ottenuti da Rutkowski *et al.* (2008) per Polonia e Olanda.

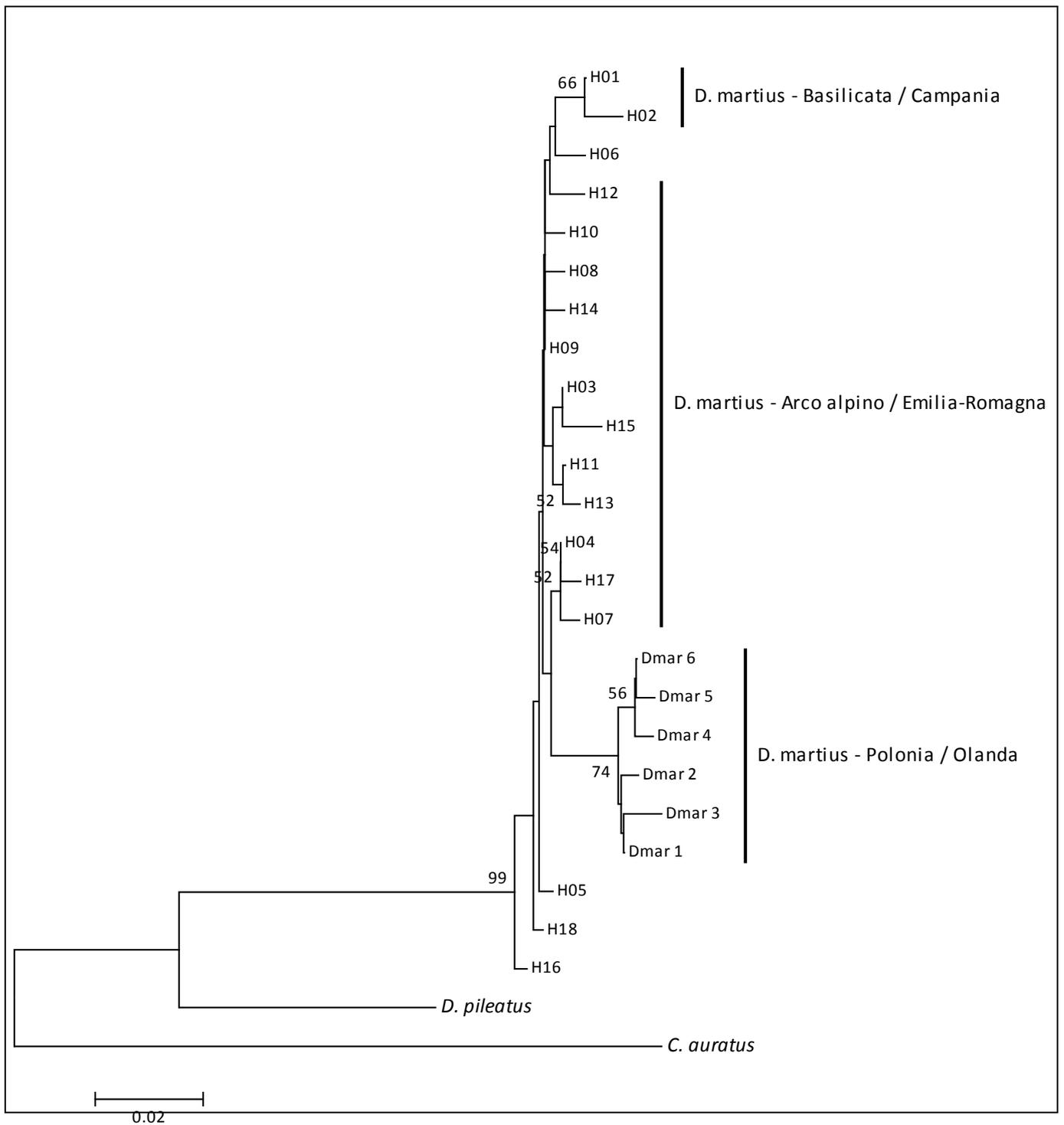


Figura 4.3 - Neighbour-Joining Tree (Saitou e Nei, 1987) costruito sulle sequenze del dominio I della regione di controllo del mtDNA di *D. martius*. Sono mostrati solo i valori di *bootstrap* con consenso maggiore del 50%.

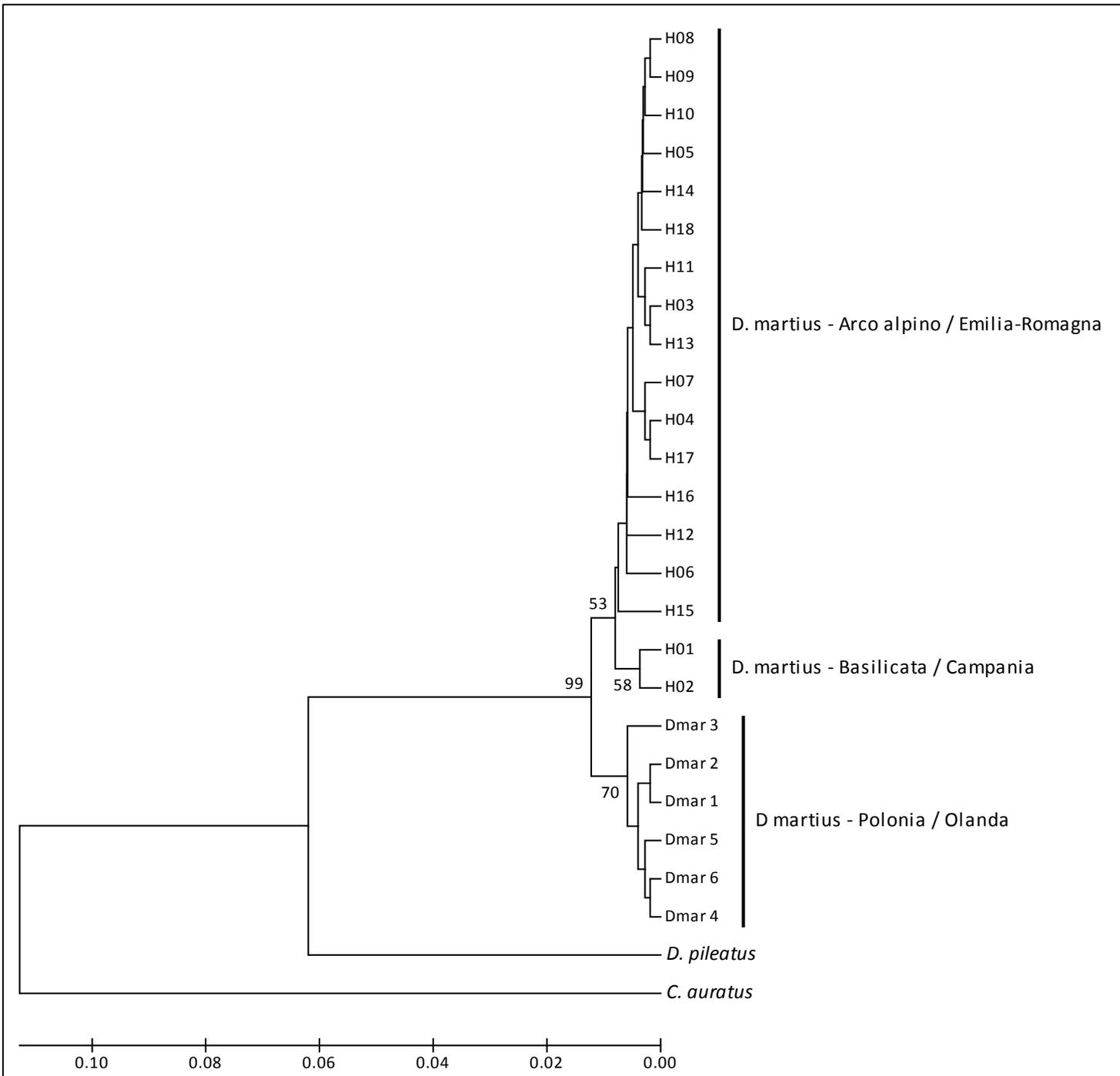


Figura 4.4 - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean Tree (Sneath e Sokal, 1973) costruito sulle sequenze del dominio I della regione di controllo del mtDNA di *D. martius*. Sono mostrati solo i valori di *bootstrap* con consenso maggiore del 50%.

4.5 Analisi complessiva dei due marcatori utilizzati

In ultima analisi ho utilizzato contemporaneamente entrambi i marcatori mitocondriali. Ciò ha permesso di ottenere 49 sequenze rappresentative di 49 diversi individui per cui era stato possibile amplificare sia il citocromo b che il D-loop.

Utilizzando il software *MEGA* 3.1 ho individuato 29 siti polimorfici in sequenze pari a 1151 bp. Di questi, 12 sono risultati parsimonia-informativi (*parsiminformative site*) ed i restanti 17 sono risultati non-informativi (*singleton site*). Tra le diverse sostituzioni nucleotidiche ho individuato nel complesso 21 transizioni e 3 transversioni (tab. 4.10).

Tramite l'utilizzo del software *DnaSP* v5 ho potuto raggruppare le sequenze ottenute nei 22 diversi aplotipi riportati in tabella 4.11. Sugli aplotipi così ottenuti, utilizzando il software *TCS* 1.21 ho elaborato un *network* filogenetico (fig. 4.5). Il *network* individua come aplotipo ancestrale H13 e posiziona alle maggiori distanze gli aplotipi H01 e H05 rappresentativi del sud Italia, H11 della Slovenia e H10 della Svizzera.

Ho infine calcolato gli indici di diversità molecolare, ovvero i valori di diversità aplotipica (H_d), diversità nucleotidica (π) ed il numero medio di differenze nucleotidiche per sito tra coppie di sequenze (k) (tab. 4.10).

<i>N</i>	<i>bp</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>H_d</i> (<i>s</i>)	π	<i>K</i>	<i>P.I.S.</i>	<i>T_s</i> (<i>T_s/site</i>)	<i>T_v</i> (<i>T_v/site</i>)	<i>Frequenze nucleotidiche</i>			
										% <i>T</i>	% <i>G</i>	% <i>C</i>	% <i>A</i>
49	1151	29 (2,5%)	22	0,932 (0,020)	0,0027	3,124	12	28 (0,024)	1 (0,000)	26.0	35.7	24.6	13.7

Tabella 4.10 - Indici di diversità molecolare e variabilità delle sequenze di D-loop e citocromo b in *D. martius* (valori ottenuti con *DnaSP* v5 e *MEGA* 3.1). *N*: dimensioni del campionamento; *bp*: numero di coppie di basi amplificate; *S*: numero dei siti polimorfici segreganti; *H*: numero di aplotipi; *H_d*: diversità aplotipica, tra parentesi la deviazione standard; π : diversità nucleotidica; *K*: numero medio di differenze nucleotidiche; *P.S.I.*: siti parsimonia-informativi; *T_s*: numero di transizioni, tra parentesi rapporto tra *T_s* ed il numero di siti analizzati; *T_v*: numero di transversioni, tra parentesi rapporto tra *T_v* ed il numero di siti analizzati.

Aplotipo	N	Località di campionamento (numero di individui)
Hap 01	1	Basilicata - Fardella (1)
Hap 02	5	Trentino - Lavis (1), Trentino - Cadino (1), Veneto - Belluno (1), Lombardia - Sondrio (1), Lombardia - Bratto Dorga (1)
Hap 03	2	Trentino - Molina di Ledro (1), Trentino - Dro (1)
Hap 04	1	Trentino - Rovereto (1)
Hap 05	1	Campania - Piaggine (1)
Hap 06	5	Lombardia - Bergamo (1), Lombardia - Sondrio(1), Valle d'Aosta - Mont Avic (3)
Hap 07	1	Veneto - Ospitale di Cadore (1)
Hap 08	1	Veneto - San Pietro di Cadore (1)
Hap 09	1	Svizzera - Lugano (1)
Hap 10	1	Svizzera - Lugano (1)
Hap 11	1	Slovenia - Aidussina (1)
Hap 12	1	Trentino - Predazzo (1)
Hap 13	9	Emilia Romagna - Campigna (2), Piemonte - Salbertrand (2), Veneto - Cesiomaggiore (1), Lombardia - Sondrio (1), Valle d'Aosta - Mont Avic (2), Trentino - Rumo (1)
Hap 14	1	Lombardia - Breno (1)
Hap 15	1	Trentino - Trento (1)
Hap 16	3	Valle d'Aosta - Saint Vincent (1), Valle d'Aosta - Gignod (1), Piemonte - Soprana (1)
Hap 17	4	Valle d'Aosta - Mont Avic (4)
Hap 18	3	Valle d'Aosta - Mont Avic (3)
Hap 19	2	Valle d'Aosta - Mont Avic (2)
Hap 20	2	Valle d'Aosta - Mont Avic (2)
Hap 21	1	Trentino - Cles (1)
Hap 22	1	Trentino - Tovel (1)

Tabella 4.11 - Elenco dei 22 aplotipi identificati utilizzando *DnaSP* v5 (Librando e Rozas, 2009) su 49 sequenze di lunghezza pari a 1151 bp comprendenti il citocromo *b* ed il dominio I della regione di controllo del mtDNA *b* di *D. martius*.

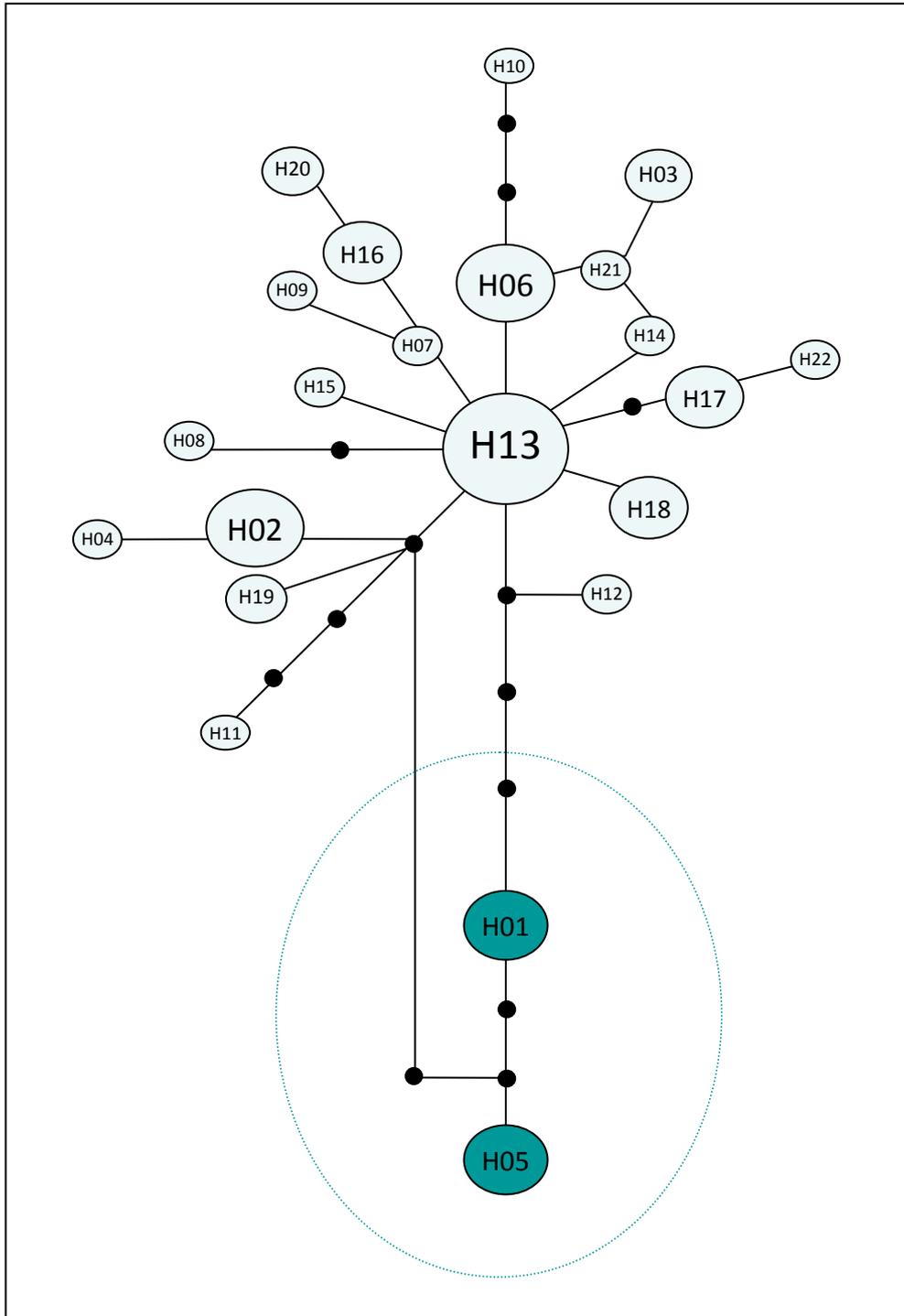


Figura 4.5 - Network elaborato tramite TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) costruito sulle sequenze di citocromo *b* e del dominio I della regione di controllo del mtDNA di *D. martius*, con valore di confidenza del 95%.

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

Il presente lavoro, finalizzato ad effettuare una prima caratterizzazione delle popolazioni italiane di Picchio nero, *Dryocopus martius* (Linnaeus, 1758), ha consentito di ottenere un quadro generale ed introduttivo nello studio della specie. L'areale italiano del picchio nero include le regioni dell'arco alpino ed in modo frammentato alcune stazioni dell'Appennino centrale e meridionale. La mancanza di dati di tipo genetico ha spinto ad approfondire la questione riguardante una presunta divergenza fra i diversi settori dell'areale. Si è cercato inoltre di stabilire la provenienza degli individui che hanno colonizzato recentemente alcune zone dell'Appennino romagnolo. L'analisi di un marcatore nucleare, il β -fibrinogeno introne 7, e di due regioni del mtDNA, il citocromo *b* ed il dominio I della regione di controllo, pur senza giungere a conclusioni certe, ha fornito certamente indicazioni per un successivo lavoro più ampio e di approfondimento. La difficoltà nel reperire campioni biologici della specie, a causa della sua elusività e dell'habitat in cui essa si inserisce, ha spinto a fare ricorso a diverse strategie di campionamento. Si è quindi scelto di ricorrere anche all'utilizzo di materiale museale e di tipo non invasivo, con lo scopo di ottenere un numero di campioni che, se pur minimo, consentisse di coprire e rappresentare i diversi settori dell'areale italiano della specie. In questo modo, inoltre, si è potuto verificare l'efficacia delle operazioni di estrazione, amplificazione e sequenziamento su DNA di diversa qualità. In particolar modo è stata confermata l'importanza in campo genetico dell'utilizzo di campioni non invasivi, come le penne di muta (Segelbacher, 2002; Bush *et al.*, 2005). Queste possono rappresentare una notevole risorsa nello studio di specie di uccelli difficilmente catturabili, nonostante il basso contenuto in DNA ed il minore successo in termini di resa rispetto a penne prelevate direttamente dagli individui. Nel nostro sono state utilizzate penne di muta raccolte sul campo anche dopo diverso tempo e ciò nonostante è stata evidenziata una resa complessiva molto vicina al 100%. Per poter ampliare il numero di campioni utilizzati è stato incluso nel campionamento anche materiale museale. L'importanza di poter ottenere campioni di DNA da individui tassidermizzati si trova però spesso in conflitto con le esigenze di

conservazione del materiale. Le operazioni di prelievo da individui tassidermizzati sono infatti interventi “*distruttivi*”, che i curatori museali preferiscono evitare. Di conseguenza è risultato spesso difficile ottenere il consenso al prelievo, ed in alcuni casi questo è stato negato. In molti casi, tuttavia, non è possibile reperire campioni in altro modo, ed è quindi necessario raggiungere un compromesso, che consenta il successo delle analisi genetiche ed al tempo stesso non risulti eccessivamente dannoso per lo stato di conservazione degli individui tassidermizzati (Graves e Braun, 1992; Payne e Sorenson, 2003). Generalmente viene quindi preferito al prelievo di tessuto dal polpastrello, un’operazione che abbia minor impatto, come avviene nel caso dell’utilizzo di penne. In questo modo sarà possibile effettuare più di un prelievo per individuo ed al tempo stesso ridurre l’impatto visivo sugli individui tassidermizzati, prelevando le penne da parti dell’animale non direttamente visibili. Horvath *et al.* (2005) hanno inoltre evidenziato risultati simili, sia in termini di resa che di qualità e quantità di DNA estratto ed amplificato, per entrambe le tipologie di campioni museali. Tenuto conto della data di preparazione degli individui museali su cui è stato effettuato il prelievo, ho riscontrato nella presente ricerca una resa maggiore per le penne. Tuttavia potevo disporre di un numero minore di penne museali rispetto ai campioni di polpastrello (rispettivamente 16 e 44). Inoltre, il successo delle analisi non sempre è risultato correlato con l’età del materiale analizzato. Ad esempio l’amplificazione del campione Dma30, ottenuto a partire da un individuo datato 1901, ha avuto successo per entrambi i marcatori mitocondriali. D’altro canto i campioni Dma11 e Dma12, datati 1971, in nessuno caso hanno dato risultati. Questo sottolinea l’importanza dei metodi di conservazione, nel determinare il buon esito delle operazioni di estrazione ed amplificazione.

Passando ai risultati delle analisi genetiche, inserisco una breve considerazione riguardante la composizione in basi delle sequenze ottenute per entrambi i marcatori. Le frequenze nucleotidiche evidenziano uno sbilanciamento a favore di citosina (37.7% nel citocromo b; 29.3% nel D-loop) a scapito della guanina (13.9% nel citocromo b; 13.0% nel D-loop). Questi dati sono in linea con quelli riscontrati da altri autori (Baker e Marshall, 1997; Webb e Moore, 2005; Benz *et al.*, 2006) e testimoniano l’asimmetria nella composizione tra i due filamenti. Infatti, come è tipico nel mtDNA dei vertebrati, il filamento L (*light*) è più leggero del filamento H (*Heavy*), in quanto meno ricco in G e più ricco in C, ovvero le basi azotate con peso molecolare rispettivamente maggiore e minore.

Detto questo, l'analisi delle sequenze di β -fibrinogeno introne 7 non ha evidenziato la presenza di siti polimorfici. Non mostrando siti variabili il marcatore nucleare non sembrava poter fornire informazioni utili per gli scopi della ricerca ed ho quindi scelto di non amplificarlo nei restanti campioni. L'analisi delle sequenze di citocromo *b* consente invece di effettuare alcune riflessioni circa l'utilità del marcatore a questo livello di indagine. Esso è stato più volte applicato in campo tassonomico all'interno dell'ordine dei *Piciformes*, e sempre per specie o sottospecie distinte. Nel presente studio ho testato la sua efficacia applicandolo allo studio di diverse popolazioni di una singola specie, *D. martius*. Dai risultati ottenuti si può concludere che il tasso evolutivo ed il numero di mutazioni presenti nella regione siano complessivamente inadatte ad una sua applicazione in studi di genetica a questo livello (intraspecifico), anche se utilizzato per popolazioni geograficamente distinte ed isolate.

Il numero di aplotipi (H) ed il numero di siti segreganti (S) possono fornire una misura intuitiva del grado di polimorfismo, in rapporto al numero di individui campionati ed al numero complessivo di siti analizzati. In *D. martius*, a partire da amplificati di lunghezza pari a 872 bp, ho individuato complessivamente 12 aplotipi e 13 siti segreganti. Di questi, 9 si trovano in terza posizione all'interno dei codoni, dove avvengono più frequentemente sostituzioni sinonime (tab. 4.5). Stiamo quindi parlando di un numero ridotto di mutazioni, tenendo anche conto della lunghezza dei frammenti di DNA amplificati.

Dall'analisi dei 12 aplotipi ottenuti (tab. 4.6) non sembra emergere una chiara struttura all'interno dell'arco alpino. Infatti, pur notando aplotipi esclusivi di alcune zone (H10, H11, H12 in Piemonte e Valle d'Aosta; H03, H09 in Trentino), l'aplotipo più comune risulta presente in tutte le regioni del nord Italia senza alcuna distinzione, nonché in Svizzera ed Emilia-Romagna. Oltre a questo, i due principali distretti presenti all'interno dell'areale italiano, ovvero le popolazioni presenti in Sud Italia e quelle distribuite lungo l'arco alpino e l'Appennino settentrionale, non vengono separati chiaramente. Nel momento in cui le sequenze sono collasate in aplotipi, uno solo fra i tre campioni meridionali si dispone in un aplotipo distinto, ovvero H01, mentre gli altri due vengono ricompresi all'interno dell'aplotipo H04, assieme a due individui provenienti dalla Valle d'Aosta. Risulta quindi chiaro che, a questo livello di indagine non è possibile fare alcuna distinzione tra le due zone dell'areale, che evidentemente non presentano livelli di

divergenza tali da poter essere percepiti con l'analisi dei polimorfismi riscontrati all'interno del citocromo *b*.

Infine, i campioni provenienti dal Parco delle Foreste Casentinesi mostrano l'aplotipo più frequente (H05), che comprende, infatti, campioni provenienti da tutto l'arco alpino. Questo, assieme alla mancata discriminazione fra arco alpino e sud Italia, non consente di avanzare precise ipotesi riguardanti la provenienza geografica del nucleo riproduttivo dell'Appennino tosco-romagnolo. Gli alberi filogenetici non aggiungono molto alle considerazioni fatte fino ad'ora. Il *Neighbour-Joining* (Fig. 4.1) separa l'aplotipo lucano (H01) dal restante gruppo, in cui tuttavia troviamo anche l'aplotipo H04, contenente i due campioni meridionali di Basilicata e Calabria. A differenza del NJ, l'UPGMA (Fig. 4.2) separa l'aplotipo sloveno (H08), il quale mostra anche i valori di distanze genetiche medie maggiori (tab. 4.3). In ogni caso, l'analisi degli alberi filogenetici e degli aplotipi, nonché i valori minimi di distanza genetica, portano a concludere che, a livello del citocromo *b*, la specie non mostra struttura genetica né distinte linee evolutive all'interno dell'areale italiano. La variabilità complessivamente mostrata dal marcatore utilizzato non è tale da permettere una discriminazione tra popolazioni alpine, ma neppure tra queste e le altre stazioni del sud Italia isolate geograficamente e geneticamente.

Dai dati ottenuti trami l'analisi ed il sequenziamento del dominio I della regione di controllo del mtDNA, è possibile trarre maggiori indicazioni grazie al più alto grado di variabilità del marcatore. Nella tabella 4.7 sono riportati i valori di diversità molecolare ottenuti. Per quanto riguarda le 55 sequenze ottenute in questo studio, ho potuto identificare 18 aplotipi rappresentativi dell'areale italiano di *D. martius*. Su frammenti di lunghezza pari a 280 bp, sono presenti complessivamente 20 siti segreganti (S), dei quali 11 sono risultati parsimonia-informativi. Rispetto ai risultati ottenuti per il citocromo *b*, il D-loop ha mostrato un più alto grado di variabilità, nonostante la lunghezza del frammento amplificato fosse molto minore (280 bp rispetto a 872 bp).

Gli indici di diversità molecolare calcolati sono stati la diversità nucleotidica π , ovvero il numero medio di differenze nucleotidiche per sito, l'indice k , il quale indica il numero medio di differenze nucleotidiche tra coppie di sequenze, e la diversità aplotipica (H_d), utilizzata per valutare il grado di variabilità fra sequenze. Quest'ultima in particolare indica la probabilità che, scegliendo casualmente due sequenze, queste risultino diverse. I valori di tutti gli indici

ottenuti per il citocromo *b* di *D. martius*, sono complessivamente inferiori a quelli ottenuti per il D-loop. Questo vale anche per le distanze medie tra aplotipi ricavate con il modello *Tamura-Nei*, nel confronto fra i due marcatori (tab. 4.8). Nel D-loop notiamo valori più alti in particolar modo per gli aplotipi H01 e H02 (Basilicata e Campania), e per gli aplotipi di Polonia e Olanda che sembrano mediamente essere più distanti dei restanti gruppi.

L'analisi della tabella degli aplotipi (tab. 4.9) mostra in questo caso una più chiara distinzione fra le diverse zone dell'areale della specie. I due campioni analizzati provenienti dal Sud Italia vengono distinti in due aplotipi (H01 e H02), distinti dai restanti. Per quanto riguarda i diversi settori dell'arco alpino, troviamo ancora aplotipi esclusivi di certe zone (H05, H16, H17 in Piemonte e Valle d'Aosta; H10, H13, H14 in Trentino), ma l'aplotipo più comune (H09) comprende 21 campioni provenienti da un estremo all'altro della catena ed include anche Slovenia ed Emilia-Romagna. Anche in questo caso i campioni provenienti dall'Appennino tosco-romagnolo hanno mostrato sequenze nucleotidiche identiche a quelle di individui provenienti dall'arco alpino, che viene quindi indicato come zona di provenienza degli individui delle Foreste Casentinesi.

Nella costruzione degli alberi filogenetici sono stati inclusi 6 aplotipi ottenuti da Rutkowski *et al.* (2008) rappresentativi di 4 campioni provenienti da diverse popolazioni in Polonia e 2 campioni provenienti da una singola località in Olanda. Questi rimangono distinti dai restanti aplotipi, ottenuti tramite l'utilizzo del software *DnaSP* v5 sulle sequenze del D-loop.

Dal'analisi del NJ (*Neighbour-Joining*) in figura 4.3 emerge una situazione non del tutto chiara circa la disposizione evolutiva dei diversi aplotipi. L'albero tende a dividere il gruppo di Polonia e Olanda dagli aplotipi italiani, anche se con valori di *bootstrap* bassi. Inoltre i due aplotipi corrispondenti a Basilicata e Campania vengono inclusi all'interno del gruppo alpino/nord-appenninico, senza quindi evidenziare una chiara divergenza evolutiva fra le due aree. Alcuni aplotipi (H05, H18 e H16) sono inoltre posizionati esternamente a questo gruppo, ma ancora una volta con valori bassi di *bootstrap*. La struttura dell'UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) è invece più netta (fig. 4.4). L'albero è più chiaramente strutturato e tende a dividere le tre zone geografiche. Gli aplotipi ottenuti da Rutkowski *et al.* (2008) vengono collocati in un gruppo distinto con valore di *bootstrap* elevato. Lo stesso avviene anche per i due aplotipi sud-

appenninici, i quali sono separati dal gruppo alpino con valore di *bootstrap* pari al 53%.

L'utilizzo di entrambi i marcatori allo stesso tempo ha permesso infine di ottenere un numero più elevato di aplotipi ed una più chiara distinzione fra le diverse regioni. Troviamo, infatti, un maggior numero di aplotipi esclusivi per ogni regione, ed un minor numero di individui inclusi all'interno dell'aplotipo più frequente e più ampiamente distribuito, H13. Questo aplotipo viene identificato come aplotipo ancestrale nella costruzione del *network* tramite TCS 1.21. Attorno ad esso si dispongono gli aplotipi discendenti di provenienza alpina a distribuzione più localizzata. Più distanziati troviamo H01 ed H05 (Basilicata e Campania), che sembrano distinguersi dagli altri aplotipi.

Concludendo, sia il NJ che l'UPGMA collocano gli individui delle Foreste Casentinesi all'interno del gruppo alpino. All'interno di quest'ultimo non viene evidenziata una chiara struttura genetica ed i diversi aplotipi, separati da valori di *bootstrap* minimi, si collocano molto vicini gli uni rispetto agli altri. Nel NJ anche i due aplotipi sud-appenninici vengono inclusi in questo gruppo, mentre gli stessi, nell'UPGMA, metodo più debole dal punto di vista statistico, sono invece collocati esternamente al gruppo e separati da valori di *bootstrap* pari al 53%. Gli stessi aplotipi, all'interno del *network* costruito su entrambi i marcatori, sembrano posizionarsi ad una certa distanza dal gruppo alpino. La situazione che si presenta, valutando i dati fin qui ottenuti, mostra la mancanza di distinte linee evolutive tra le diverse popolazioni della catena alpina. Sono stati tuttavia riscontrati aplotipi caratteristici ed esclusivi per le popolazioni del Trentino e della Valle d'Aosta e Piemonte, che sono d'altro canto le regioni che ospitano le popolazioni più consistenti e meglio campionate. Questo suggerisce che, pur in assenza di divergenza evolutiva, il marcatore utilizzato possa consentire una caratterizzazione ed una distinzione fra diverse popolazioni di una stessa specie, come già suggerito da altri autori. Rutkowski *et al.* (2008) ad esempio, utilizzando lo stesso marcatore su nove diverse specie di picidi in Europa, avevano ottenuto un numero di aplotipi almeno pari al numero di distinte popolazioni campionate.

La continuità genetica riscontrata tra i diversi settori riguarda anche Svizzera e Slovenia, così come il nucleo riproduttivo dell'Emilia-Romagna. In questo contesto è stato possibile confermare la certa provenienza alpina degli individui instauratisi nelle Foreste Casentinesi. Le sequenze dei due campioni provenienti dalla zona si sono collocate all'interno di un aplotipo comprendente individui

provenienti da tutte le regioni della catena. Non è stato quindi possibile individuare una precisa origine del nucleo riproduttivo, né confermare la possibilità di un transito attraverso l'Appennino ligure, ipotesi che sembra emergere dalle segnalazioni disponibili per la specie.

Per quanto riguarda le popolazioni del sud Italia, i dati sembrano indicare una loro diversità rispetto al gruppo comprendente arco alpino ed Appennino settentrionale. Questo dato viene confermato sia dalla presenza di aplotipi esclusivi che dalla struttura del *network* filogenetico, in cui essi si collocano ad una certa distanza dal gruppo alpino. Inoltre, almeno secondo le indicazioni dell'UPGMA, emerge una distinta linea evolutiva. Tuttavia, quest'ultimo punto, considerando i valori relativamente bassi di *bootstrap*, la minore validità dell'UPGMA rispetto al NJ ed il ridotto numero di campioni considerati, rimane per il momento soltanto un'indicazione ed un'ipotesi per cui sarà necessaria una verifica. Interessante sarebbe anche poter valutare la collocazione dei piccoli nuclei riproduttivi dell'Appennino centrale di Abruzzo e Molise, per capire se essi presentino, com'è verosimile data la maggiore vicinanza, affinità con le popolazioni di Campania, Basilicata e Calabria, e non con quelle dell'Appennino settentrionale.

Infine, il confronto effettuato con gli aplotipi di Polonia ed Olanda è stato utile nel fornire spunti per un successivo lavoro di approfondimento. Infatti, questi vengono sempre separati all'interno degli alberi elaborati, suggerendo la presenza di distinte linee evolutive tra le popolazioni europee. L'utilizzo di un campione così ridotto non certamente rappresentativo dell'intero territorio europeo non consente tuttavia alcuna ulteriore considerazione. Questo dato suggerisce in ogni caso di approfondire la filogeografia della specie, tramite un campionamento che includa una più ampia porzione del suo areale europeo.

In un successivo lavoro di approfondimento sarà sicuramente necessario anche aumentare gli sforzi nello studio delle popolazioni relitte del sud Italia. Un maggiore e migliore campionamento renderebbe possibile ottenere risultati più certi a riguardo. E' però necessario che aumenti l'interesse nei confronti della specie nelle zone dove essa sia presente. Questo consentirebbe di ottenere conoscenze pregresse riguardanti la localizzazione dei nidi ed i territori occupati dalle coppie che, come abbiamo visto, facilitano notevolmente il reperimento di campioni. Infine, l'impiego di marcatori ipervariabili potrebbe fornire un importante apporto nello studio delle popolazioni di picchio nero, *Dryocopus*

martius e di altre specie già citate presenti in Appennino centro-meridionale, ovvero il picchio rosso mezzano, *Dendrocopos medius* ed il picchio dalmatino, *Dendrocopos leucotos lilfordi*. Come già sottolineato, lo scarso numero di marcatori polimorfici presenti in letteratura rappresenta un limite per studi genetici sui picidi (Rutkowski *et al.*, 2006). Questa mancanza è stata affrontata da alcuni autori che, spinti dalla necessità di trovare marcatori molecolari più adatti a studi di genetica di popolazione, si sono concentrati sull'utilizzo di microsatelliti. I microsatelliti sono tratti di DNA nucleare presenti nel genoma di tutti gli organismi fino ad ora analizzati. La loro sequenza è formata da un motivo di alcune basi ripetuto in *tandem* un numero variabile di volte. Essi sono ereditati in modo bi-parentale e, oltre ad essere fenotipicamente neutrali, presentano alti tassi di mutazioni, soprattutto delezioni e inserzioni che ne variano la lunghezza. Sono inoltre posizionati all'interno di regioni di DNA altamente conservate, entro le quali è quindi possibile disegnare *primer*, utilizzabili in diverse specie tramite amplificazioni “*cross-species*” (Randi *et al.*, 2002).

Ellegren *et al.* (1999), quando ancora nessun microsatellite era disponibile per i picchi, propose l'utilizzo di sei diversi loci microsatelliti nello studio di *Dendrocopos leucotos*, specie in rarefazione per la frammentazione degli habitat forestali, con lo scopo di valutare la struttura genetica e la variabilità di una sub-popolazione svedese con evidenti tassi ridotti di sopravvivenza e diversi casi di inbreeding. Gli stessi microsatelliti sviluppati da Ellegren sono stati usati per amplificazioni *cross-species* su altre specie europee di picchi. I risultati sono stati incoraggianti per alcune di queste, meno per il Picchio nero, *Dryocopus martius*, per il quale un solo locus su sei ha presentato polimorfismo (Rutkowski *et al.*, 2006). Vilà *et al.* (2008) hanno sviluppato un set di 12 microsatelliti polimorfici sul Picchio mezzano *Dendrocopos medius*, testati anche su *Picoidea arcticus*. Altri 17 loci polimorfici sono stati disegnati su *Picoidea tridactylus* (Valimaki *et al.*, 2008), specie legata alle foreste di conifere e sensibile ad alcune pratiche forestali. Fike *et al.* (2009), infine, hanno proposto l'uso di 25 microsatelliti per *Picoidea borealis*, specie nord-americana in pericolo per frammentazione ed impatto antropico su habitat forestali. Questi dati riassumono la situazione attuale delle conoscenze per quanto riguarda i microsatelliti, su cui, nell'ambito della famiglia dei *Picidae*, i dati disponibili sono ancora scarsi. Poter approfondire questo aspetto consentirebbe di aumentare la potenzialità per i successivi studi di approfondimento.

CONCLUSIONI

Le analisi condotte hanno permesso di valutare l'efficacia a livello intraspecifico dei tre diversi marcatori utilizzati nello studio delle popolazioni italiane di Picchio nero *Dryocopus martius*. Il citocromo *b* ha evidenziato un numero complessivo di polimorfismi insufficiente a caratterizzare le diverse popolazioni della specie, anche se isolate geneticamente. Lo stesso discorso può valere per il β -fibrinogeno introne 7, il quale, dall'analisi di un numero ridotto di campioni di partenza, non ha presentato nessun polimorfismo. Il dominio I della regione di controllo del mtDNA ha invece mostrato un grado di variabilità tale da consentire la distinzione di diverse popolazioni all'interno dell'areale italiano della specie. L'utilizzo di entrambi i marcatori mitocondriali ha permesso infine di ottenere un maggior dettaglio della situazione.

I risultati dello studio confermano quindi la diversità fra le popolazioni di picchio nero presenti in sud Italia e nell'arco alpino, indicando una possibile divergenza evolutiva fra due gruppi. E' stata inoltre accertata la provenienza alpina degli individui del nucleo riproduttivo delle Foreste Casentinesi, confermando una colonizzazione dell'area a partire da nord. Il confronto fra aplotipi alpini ed aplotipi caratteristici di Polonia ed Olanda ha evidenziato infine la presenza di distinte linee evolutive all'interno dell'areale europeo della specie.

La situazione necessita comunque della conferma di un successivo lavoro che preveda un campionamento più ampio a livello europeo ed una maggiore attenzione nei confronti delle popolazioni del sud Italia e dei nuclei riproduttivi dell'Appennino centrale. Inoltre, l'utilizzo di microsatelliti consentirebbe di ottenere un maggior numero di dettagli e di delineare con più affidabilità il livello di divergenza fra le diverse popolazioni.

BIBLIOGRAFIA

- Alessandria G., Boano G., Della Toffola M., Fasano S., Pulcher C., Toffoli R.** Eds., 2002. *Resoconto ornitologico per la regione Piemonte - Valle d'Aosta. Anno 1999*. Riv. Piem. St. Nat. 23: 297-338
- Angelstam, P., Mikusinski G.**, 1994. *Woodpecker assemblages in natural and managed boreal and hemiboreal forest: a review*. Annales Zoologici Fennici 31:157-172.
- Aquadro C.F., Greenberg B.D.**, 1983. *Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals*. Genetics 103: 287–312.
- Arctander P.**, 1995. *Comparison of a mitochondrial gene and a corresponding nuclear pseudo gene*. Proc. R. Soc. London B Biol. Sci. 262: 13-19.
- Arrigoni degli Oddi E.**, 1929. *Ornitologia Italiana*. Hoepli, Milano.
- Avise J.C.**, 1994. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Baker A.J., Marshall H.D.**, 1997. *Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution*. In: Mindell, D.P. Ed., *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego, pp. 51–82.
- Balen J. H. Van, Booy J. H., Franeker J. A. Van, Osieck E. R.**, 1982. *Studies on hole-nesting birds in natural nestsites. 1. Availability and occupation of natural sites*. Ardea 70: 1-24.
- Benoit L.**, 1840. *Ornitologia siciliana*. Stamperia G. Fiumara, Messina.
- Benz B. W., Robbins M. B., Peterson A. T.**, 2006. *Evolutionary history of woodpeckers and allies (Aves: Picidae): Placing key taxa on the phylogenetic tree*. Mol. Phylogenet. and Evol. 40: 389-399.
- Bernoni M.**, 1992. *Dati sulla presenza di Piciformi nelle faggete del Parco Nazionale d'Abruzzo*. Aluda I: 48-51.

- Bevacqua D.**, 1984. *Indagine preliminare sulla distribuzione del Picchio nero Dryocopus martius nella Sila Piccola, provincial di Catanzaro*. *Picus* 10:73-76.
- BirdLife International**, 2004. *Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status*. Cambridge, UK: BirdLife International. (BirdLife Conservation Series No.12).
- Boano G., Brichetti P., Cambi D., Meschini E., Mingozi T., Pazzuoni A.**, 1985. *Contributo alla conoscenza dell'avifauna della Basilicata*. *Ric. Biol. Selvaggina* 75: 1-39.
- Bocca M., Carisio L., Rolando A.**, 2007. *Habitat use, home ranges and census techniques in the Black Woodpecker Dryocopus martius in the Alps*. *Ardea* 95: 17-29.
- Bocca M., De Franceschi P.**, 1983. *Picchio nero Dryocopus martius*. In Brichetti P., Ed., *Atlante degli uccelli nidificanti sulle Alpi italiane, II*. *Riv. ital. Orn.* 53: 113-115.
- Bocca M., Falcone U.G.**, 1999. *Caratteristiche dei siti riproduttivi del Picchio nero Dryocopus martius in una valle delle Alpi Graie (Parco Naturale del Mont Avic, Valle d'Aosta)*. *Avocetta* 23: 112.
- Bon M., Sighele M. & Verza E.**, Eds., 2006. *Rapporto ornitologico per la Regione Veneto. Anno 2005*. *Boll. Mus. Civ. St. Nat. Venezia* 57: 199-220.
- Brichetti P.**, 1987. *Atlante degli uccelli delle Alpi italiane*. Editoriale Ramperto, Brescia: 212 pp.
- Brichetti P., Fracasso G.**, 2007. *Ornitologia Italiana. Vol.4 - Apodidae-Prunellidae*. Oasi Alberto Perdisa Editore, Bologna.
- Burton, P. J. K.**, 1985. *Anatomy and evolution of the feeding apparatus in the avian orders Coraciiformes and Piciformes*. *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool. Ser.* 47: 331-443.
- Bush K. L., Vinsky M. D., Aldridge C. L., Paszkowski C. A.**, 1982. *A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of greater Sage-Grouse (Centrocercus urophasianus)*. *Conservation Genetics* 6: 867-870.

- Bush K. L., Vinsky M. D., Aldridge C. L., Paszkowski C. A., 2005.** *A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of greater Sage-Grouse (Centrocercus urophasianus).* Conservation Genetics 6: 867-870.
- Caro T. M., O'Doherty G., 1999.** *On the Use of Surrogate Species in Conservation Biology.* Conservation Biology 13: 805-814.
- Castiglia G., Di Carlo E.A., Tabarrini G., 1976.** *Il Picchio nero (Dryocopus martius) e il Picchio di Lilford (Dendrocopus leucotos lilfordi) nell'Appennino centrale.* Riv. ital. Orn. 46: 169.
- Ceccarelli P.P., Agostini N. & Milandri M., 2003.** *Osservazioni di Picchio nero, Dryocopus martius, nelle Foreste Casentinesi.* Riv. Ital. Orn. 73: 81-82.
- Ceccarelli P.P., Agostini N., Milandri M., Bonora M., 2008.** *Il Picchio nero Dryocopus martius (Linnaeus, 1758) nel Parco Nazionale delle Foreste Casentinesi (Aves Piciformes Picidae).* Quad. Studi Nat. Romagna, 27: 143-154.
- Colpi C., Varaschin M., Zenatello M., Luise R., 1991.** *Selvicoltura ed avifauna sensibile. Il caso del Picchio Nero (Dryocopus martius) nel Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi.* Atti del Terzo Congresso Nazionale di Selvicoltura. Taormina.
- Cracraft J., Barker F. K., Braun M., Harshman J., Dyke G. J., Feinstein J., Stanley S., Cibois A., Schikler P., Beresford P., Garcia-Moreno J., Sorenson M. D., Yuri T., Mindell D. P., 2004.** *Phylogenetic relationships among modern birds (Neornithes).* In, Cracraft J., Donoghue M. J., Eds., *Assembling the tree of life.* Oxford Univ. Press, New York, pp. 468-489.
- Cramp S., 1985.** *Handbook of the Birds of Europe the Middle East and North Africa. The Birds of the Western Palearctic. Vol.IV.* Oxford University Press.
- D'Acunto G., 1979.** *Altre notizie sul Picchio nero Dryocopus martius (L.) in Campania.* Riv. ital. Orn. 49: 111-113.
- De Leone N., 1908.** *Materiali per una avifauna d'Abruzzo.* Ristampa A. Forni, L'Aquila.

- Desjardins P., Morais R.**, 1990. *Sequence and gene organisation of the chicken mitochondrial genome: A novel gene order in higher vertebrates*. J. Mol. Biol. 212: 599-634.
- Di Carlo E.A.**, 1965. *Notizie ornitologiche varie*. Riv. ital. Orn. 35: 121-125.
- Di Carlo E.A.**, 1972. *Gli Uccelli del Parco Nazionale d'Abruzzo*. Riv. ital. Orn. 42: 1-160.
- Di Carlo E.A.**, 1976. *Notizie ornitologiche dall'Italia centro-meridionale*. Uccelli d'Italia 1: 135-137
- Drever M. C., Aitken K. E. H., Norris A. R., Martin K.** 2008. *Woodpeckers as reliable indicators of bird richness, forest health and harvest*. Biol. Conserv. 141: 624-634.
- Edington J. M., Edington M. A.**, 1972. *Spatial patterns and habitat partition in the breeding birds of an upland wood*. J. Anim. Ecol. 41: 331-357.
- Efron B.**, 1979. *Bootstrap methods: another look at the jackknife*. Annals Stat. 7: 1-26.
- Efron B., Gong G.**, 1983. *A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation*. Am. Statistician 37: 36-48.
- Ellegren H., Carlson A., Stenberg I.**, 1999. *Genetic structure and variability of white-backed woodpecker *Dendrocopos leucotos* populations in northern Europe*. Hereditas, 130: 291-299.
- Ericson P. G. P., Anderson C. L., Britton T., Elzanowski A., Johansson U. S., Kallersjo M., Ohlson J. I., Parsons T. J., Zuccon D., Mayr G.** 2006. *Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils*. Biol. Lett. 2: 543-547.
- Esposti D.M., De Vries S., Crimi M., Ghelli A., Patarnello T., Meyer A.**, 1993. *Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein*. Biochim. Biophys. Acta 1143: 243-271.
- Felcher L., Zorzeron T.**, 1999. *Picchio nero *Dryocopus martius**. In: Parodi R., Ed. *Gli uccelli della provincia di Gorizia*. Pubblicazione Museo Friulano di Storia Naturale. Udine. N. 42: 180-181.

- Felsenstein J.**, 1985. *Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap*. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fernández C., Azkona P.**, 1996. *Influence of forest structure on the density and distribution of the White-backed Woodpecker *Dendrocopos leucotos* and Black Woodpecker *Dryocopus martius* in Quinto Real (Spanish western Pyrenees)*. *Bird Study* 43: 305-313.
- Ferretti S., Rizzolli F., Pedrini P., Spina F.**, 2008. *Progetto Alpi - La migrazione postriproduttiva attraverso le Alpi italiane. Resoconto sull'attività di campo - 2007*. Museo Tridentino di Scienze Naturali.
- Fike J. A., Athrey G., Bowman R., Leberg P. L., Rhodes Jr. O. E.**, 2009. *Development of twenty-five polymorphic microsatellite markers for the endangered red-cockaded woodpecker (*Picoides borealis*)*. *Cons. Genet.* 10: 1021-1023.
- Fleishman E., Murphy D. D., Brussard P. F.**, 2000. *A new methods for selection of umbrella species for conservation planning*. *Ecol. Appl.* 10: 569-579.
- Fraissinet M., Kalby M.**, Eds., 1989. *Atlante degli uccelli nidificanti in Campania (1983-1987)*. Monografia n. 1. ASOIM, Napoli: 240 pp.
- Fuchs J., Ohlson J. I., Ericson P. G. P., Pasquet E.**, 2006. *Molecular phylogeny and biogeographic history of the piculets (Piciformes: Picumninae)*. *J. Avian Biol.* 37: 487-496.
- Giglioli Hillyer E.**, 1907. *Secondo resoconto dei risultati dell'inchiesta ornitologica in Italia. Avifauna italiana. Nuovo elenco sistematico delle specie di uccelli stazionarie, di passaggio o di accidentale comparsa in Italia*. Firenze.
- Ginanni F.**, 1774. *Istoria civile e naturale delle Pinete ravennati*. Salomoni, Roma.
- Graves G. R., Braun M. J.**, 1992. *Museums: Storehouses of DNA?*. *Science* 255: 1335-1336.
- Gregory T. R.**, 2008. *Understanding Evolutionary Trees*. *Evo Edu Outreach* 1: 121-137.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T.**, 1985. *Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA*. *J. Mol. Evol.* (1985) 22:160-174.

- Hillis D.M., Bull J.J.**, 1993. *An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis*. Syst. Biol. 42: 182-192.
- Horvath M. B., Martinez-Cruz B., Negro J. J., Kalmar L., Godoy J. A.**, 2005. *An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds*. J. Avian Biol. 36: 84-88.
- Imparati E.**, 1934 - *Avifauna ravennate*. Arnaldo Forni Editore, Bologna.
- Johansson U. S., Ericson, P. G. P.**, 2003. *Molecular support for a sister group relationship between Pici and Galbulae (Piciformes sensu Wetmore 1960)*. J. Avian Biol. 34: 185-197.
- Johansson U. S., Parsons T. J., Irestedt M., Ericson P. G. P.**, 2001. *Clades within the 'higher land birds', evaluated by nuclear DNA sequences*. J. Zool. Syst. Evol. Res. 39: 37-51.
- Johns G.C., Avise J.**, 1998. *A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene*. Mol. Biol. Evol. 15(11):1481-1490.
- Johnsson K., Nilsson S.G., Tjernberg M.**, 1993. *Characteristics and utilization of old black woodpecker *Dryocopus martius* holes by hole-nesting species*. Ibis 135: 410-416.
- Kalby M., de Filippo G.**, 1985. *Biometria di Picchio nero *Dryocopus martius* (L., 1758) in Italia*. Atti III Convegno Italiano di Ornitologia. Salice Terme: 274-275.
- Kalby M., de Filippo G., Fraissinet M.**, 1985. *Further observations on the population analysis of Black Woodpecker inhabiting an Appenninic region of South Italy*. Abstracts XVIII Congressus Internationalis Ornithologicus 2: 1117-1118
- Kalby M.L.**, 1976. *Il Picchio nero in provincia di Salerno*. Riv. ital. Orn. 46: 166-167.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Paabo S.F., Villablanca F.X., Wilson A.C.**, 1989. *Dynamics of mtDNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 6196-6200.

- Landres P. B., Verner J., Thomas J. W.**, 1988. *Ecological uses of vertebrate indicator species: a critique*. Cons. Biol. 2: 316-328.
- Lanion S. M., Zink R. M.**, 1987. *Genetic variation in piciform birds: monophyly and generic and familial relationships*. Auk 104: 724-732.
- Librando P., Rozas J.** 2009. *A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. Bioinformatics 25: 1451-1452.
- Longo L., Martignoni C., Bertoli R.** 2002. *Svernamento di Picchio nero, Dryocopus martius, nella Riserva Naturale di Bosco della Fontana (Mantova)*. Riv. ital. Orn. 72: 81-82.
- Luise R.**, 1990. *Bio-ecologia del Picchio nero (Dryocopus martius (L.)) nella Foresta del Consiglio (Prealpi Venete)*. Tesi di Laurea - Università degli Studi di Padova - Anno accademico 1989-90.
- Marchesi L., Zanin M., Zorer P.**, 2008. *Lunga vita ai tronchi col buco! I picchi e la biodiversità forestale: i primi 580 alberi tutelati in Trentino*. Natura Alpina 1: 15-26.
- Martignago G., Lombardo S., Mezzavilla F.**, 1992. *Considerazioni circa la diffusione e l'abbassamento altitudinale riscontrato nel Picchio nero (Dryocopus martius)*. Boll. Cen. Orn. Veneto Or. 3: 23.
- Martignago G., Silveri G., Mezzavilla F.** 2001. *Diffusione ed abbassamento altitudinale del Picchio nero Dryocopus martius in provincia di Treviso (Colli Asolani)*. Avocetta 25: 59.
- Martin K., Aitken K.E.H., Wiebe K.L.**, 2004. *Nest sites and nest webs for cavity-nesting communities in interior British Columbia, Canada: nest characteristics and niche partitioning*. Condor 106: 5-19.
- Martin K., Eadie J. M.**, 1999. *Nest webs: A community-wide approach to the management and conservation of cavity-nesting forest birds*. For. Ecol. Manage. 115: 243-257.
- Martorelli G.**, 1906. *Gli Uccelli d'Italia*. Casa Ed. L.F. Cogliati, Milano.
- Massa B.** Ed., 1985. *Atlante degli uccelli nidificanti in Sicilia (1979-1983)*. Atlas Faunae Siciliae "Aves". Naturalista siciliano, vol. IX (Numero speciale): 276 pp.

- Massa R., Massa B.**, 1978. *Nuove notizie sul Picchio nero Dryocopus martius (L.) in Campania*. Riv. ital. Orn. 48: 339-340.
- Mayr G.**, 2007. *Avian higher-level phylogeny: well-supported clades and what we can learn from a phylogenetic analysis of 2954 morphological characters*. J. Zool. Syst. Evol. Res. 46: 63-72.
- Mayr G., Manegold A., Johansson U.**, 2003. *Monophyletic groups within "higher land birds"-comparison of morphological and molecular data*. J. Zool. Syst. Evol. Res. 41: 233-248.
- Mezzavilla F., Stival E., Nardo A., Roccaforte P.**, 1999. *Rapporto Ornitologico Veneto Orientale, Anni 1991-1998*. Cen. Orn. Veneto Or. Montebelluna. Pp 60.
- Mikusinski G.**, 1997. *Woodpeckers in time and space: the role of natural and anthropogenic factors*. Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Mikusinski G., Angelstam P.**, 1997. *European woodpeckers and anthropogenic habitat change: a review*. Die Vogelwelt 118: 277-283.
- Mikusinski G., Angelstam P.**, 1998. *Economic geography, forest distribution and woodpecker diversity in central Europe*. Cons. Biol. 12: 200-208.
- Mikusinski G., Gromadziki M., Chylarecki P.**, 2001. *Woodpeckers as indicators of forest bird diversity*. Cons. Biol. 15: 208-217.
- Mills L. S. M., Soul M. E., Doak D. R.**, 1993. *The keystone-species concept in ecology and conservation*. BioScience 43:219-224.
- Mindell D.P., Sorenson M.D., Dimcheff D.E.**, 1998. *Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 10693-10697.
- Mingozi T.**, 1994. *L'Avifauna della Riserva Naturale Orientata "Valle del fiume Argentino" (Orsomarso, CS): Analisi faunistico-ecologica ed indicazioni conservazionistico-gestionali*. Collana Verde. Ministero Risorse Agricole, Alimentari e Forestali. Roma. N. 96: 1-94.
- Moltoni E.**, 1964. *L'ornitofauna della Sila (Calabria)*. Riv. ital. Orn. 34: 1-183.

- Moore W.S., DeFilippis V.R.**, 1997. *The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome b*. In: Mindell D.P., Ed., Avian molecular evolution and systematics. Academic Press, New York, pp. 83–120.
- Moritz C., Dowling T. E., Brown W. M.**, 1987. *Evolution of animal mitochondrial Dna: relevance for population biology and systematics*. Ann. Rev. Ecol. Syst.18: 269-92.
- Nei, M., Kumar, S.** 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Noss R. F.**, 1990. *Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach*. Cons. Biol. 4: 355-363.
- Olson S. L.**, 1983. *Evidence for a polyphyletic origin of the Piciformes*. Auk 100: 126-133.
- Orlando C.**, 1956. *I Picini (sottofamiglia Picinae) in Sicilia*. Riv. ital. Orn. 26: 78-81.
- Paine R. T.**, 1969. *The Pisaster-Tegula interaction: Prey patches, predator food preference, and intertidal community structure*. Ecology 50: 950-61
- Pandolfi M., Giacchini P.**, 1995. *L'Avifauna della Provincia di Pesaro e Urbino*. Amministrazione Provinciale di Pesaro e Urbino.
- Parodi R.**, 2004. *Avifauna in provincia di Pordenone*. Provincia di Pordenone
- Pasinelli G.**, 2006. *Population biology of European woodpecker species: a review*. Ann. Zool. Fennici 43: 96-111.
- Passerin d'Entrèves P., Rolando A.**, 1990. *Osservazione di Picchio nero, Dryocopus martius, in Pianura Padana durante il periodo riproduttivo*. Riv. ital. Orn. 60: 212-213.
- Payne R. B., Sorenson M. D.**, 2002. *Museum collections as sources of genetic DNA*. Bonn. Zool. Beitr. 51: 97-104.
- Pearson D.**, 1995. *Selecting indicator taxa for the quantitative assessment of biodiversity*. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B 345: 75-79.

- Pedrini P., Caldonazzi M., Zanghellini S.,** Eds., 2005. *Atlante degli Uccelli nidificanti e svernanti in provincia di Trento*. Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol. 80, suppl. 2.
- Pellegrini M., De Marco P.,** 1995. *Presenza del Picchio nero (Dryocopus martius) in un'area dell'Appennino centrale (Abruzzo e Molise)*. Suppl. Ric. Biol. Selvaggina 22: 687-690.
- Perco F.,** 1978. *Studio preliminare per la reintroduzione del Picchio nero nel Parco Nazionale d'Abruzzo*. Studi Conservazione Natura LIPU. N. 1: 1-27.
- Pereira S. L., Baker A. J.,** 2004. *Low number of mitochondrial pseudogenes in the chicken (Gallus gallus) nuclear genome: implications for molecular inference of population history and phylogenetics*. BMC Evol. Biol. 4:17
- Pinchera F., Pellegrini M.,** 1999. *Spaziatura e densità dei siti di riproduzione di Picinae in due aree dell'Appennino centrale*. Riv. ital. Orn. 69: 105-113.
- Pirovano A., Rogantini F., Guidali F., Schröder W.** 2003. *Selezione dell'habitat del Picchio nero Dryocopus martius nel Parco Regionale delle Orobie Valtellinesi*. Avocetta Num. Spec. 27: 91.
- Pirovano A., Zecca G., Guidali F., Schröder W.** 2003. *Il Picchio nero Dryocopus martius quale indicatore di biodiversità forestale nel Parco Regionale delle Orobie Valtellinesi*. Avocetta Num. Spec. 27: 115.
- Prychitko T. M., Moore W. S.,** 1997. *The utility of DNA sequences of an intron from the b-fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae)*. Mol. Phylogenet. Evol. 8: 193-204.
- Prychitko T. M., Moore W. S.,** 2000. *Comparative evolution of the mitochondrial cytochrome b gene and nuclear beta-fibrinogen intron 7 in woodpeckers*. Mol. Biol. Evol. 17: 1101-1111.
- Quinn T.W.,** 1997. *Molecular evolution of the mitochondrial genome*. In, Mindell D. P., Ed., Avian molecular systematics and evolution. Academic Press, New York, pp 3-28
- Randi E., Tabarroni C., Rimondi S.,** Eds., 2002. *Forensis genetics and the Washington Convention - CITES*. Quad. Cons. Natura 12. Min. Ambiente - Ist. Naz. Fauna Selvatica.

- Rolstad J., Rolstad E.**, 1995. *Seasonal patterns in home range and habitat use of the grey-headed woodpecker (Picus canus) as influenced by the availability of food*. *Ornis Fennica* 72:1–13.
- Rozen S., Skaletsky H. J.**, 2000. *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. *Methods Mol. Biol.* 12: 2201-2214
- Ruokonen M., Kvist L.**, 2002. *Structure and evolution of the avian mitochondrial control region*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23: 422-432.
- Rutkowski R., Jagolkowska P., Mazgajski T. D., Lukasz R.**, 2006. A mitochondrial DNA control region phylogeny of the European woodpeckers Picidae. *Genus Supplement* 14: 173-176.
- Rutkowski R., Jagolkowska P., Mazgajski T. D., Lukasz R.**, 2008. *Mitochondrial marker for studying european Picidae at various taxonomic levels*. *Annales Zoologici*, 58: 907-913.
- Rutkowski R., Mazgajski D. T., Rejt L.**, 2006. *Cross-species amplification of microsatellite markers in European woodpeckers Picidae*. *Annales Zoologici*, 56: 819-826.
- Russell P. J.**, 2004. *Genetica Fondamenti*. EdiSES, Napoli.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A.**, 1988. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase*. *Science* 239: 487-491.
- Saitou N., Nei M.**, 1987. *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- Salvadori T.**, 1872. *Fauna d'Italia*. Uccelli. Forni Editore, Bologna.
- Sanger F.**, 1981. *Determination of nucleotide sequences in DNA*. *Biosci. Rep.* 1: 3-18.
- Scebba S.**, 1993. *Gli uccelli della Campania*. Edizioni Esselibri ed., Napoli.
- Segelbacher G.**, 2002. *Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples*. *Mol. Ecol. Notes* 2: 367-369.
- Sibley C. G., Ahlquist J. E.**, 1990. *Phylogeny and Classification of Birds*. Yale Univ. Press, New Haven, CT.

- Simpson S. F., Cracraft J.**, 1981. *The phylogenetic relationships of the piciformes (class aves)*. *The Auk* 98: 481-494.
- Sneath P. H. A., Sokal R. R.**, 1973. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: W. H. Freeman.
- Soltis P.S., Soltis D.E.**, 2003. *Applying the Bootstrap in Phylogeny Reconstruction*. *Stat. Sci.* 18: 256-267.
- Sorenson M. D., Ast J. C., Dimcheff D. E., Yuri T., Mindell D.P.**, 1999. *Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12: 105-114,
- Sorenson M. D., Fleischer R. C.**, 1996. *Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93: 15239-15243.
- Spanò S., Truffi G.**, 1987. *Gli uccelli della Liguria occidentale*. Regione Liguria, Genova.
- Spanò S., Truffi G.**, 1989. *Atlante degli uccelli nidificanti in Liguria 1981-1986*. Cataloghi dei beni naturali, n.1. Regione Liguria, Genova: 210 pp.
- Spanò S., Truffi G., Burlando G.**, Eds., 1998. *Atlante degli uccelli svernanti in Liguria*. Regione Liguria.
- Stresemann E.**, 1957. *Ein ornithologischer Streifzug durch Calabrien*. *J. Orn.* 98: 372-388.
- Svensson L., Grant P.J., Mullarney K., Zetterström D.**, 2000. *Collins Bird Guide*. Harper Collins Publishers, London.
- Swierczewski V., Raikow R. J.**, 1981. *Hind limb morphology, phylogeny, and classification of the Piciformes*. *Auk* 98: 466-480.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.**, 2007. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tamura K., Nei M.**, 1993. *Estimation of number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.

- Tjernberg M., Johnsson K., Nilsson S. G.** 1993: *Density variation and breeding success of the black woodpecker *Dryocopus martius* in relation to forest fragmentation*. *Ornis Fennica* 70: 155-162
- Tralongo S.**, 1978. *Note ornitologiche sulla Calabria*. *Uccelli d'Italia* 3: 208-215.
- Tramontani L.**, 1801. *Istoria Naturale del Casentino con la vera Teoria della Terra*. Vol.1 Biblioteca cristiano-filosofica anno III vol.XIV – Stamperia della Carità, Firenze.
- Utmar P.**, 2003. *Svernamento di Picchio nero *Dryocopus martius* in un'area golenale di pianura in provincia di Gorizia*. *Avocetta Num. Spec.* 27: 53.
- Utmar P., Padovan P.**, 2005. *Il Picchio nero, *Dryocopus martius*, nidificante in pianura nel Friuli Venezia Giulia*. *Riv. Ital. Orn.* 75: 62-64.
- Välimäki K., Jaari S., Piha M., Pakkala T., Merilä J.**, 2008. *Isolation and characterization of 17 polymorphic microsatellite loci for the three-toed woodpecker (*Picoides tridactylus*)*. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 1152-1154
- Vaurie C.**, 1959. *Systematic Notes on Palearctic Birds. No. 34 Picidae: The Genera *Picus* and *Dryocopus**. *Amer. Mus. Novitates* No. 1945. 21 p.
- Vila M., Robles H., Ciudad C., Olea P. P., Baglione V.**, 2008. *Isolation and characterization of 12 microsatellite markers in the middle-spotted woodpecker (*Dendrocopos medius*)*. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 415-417.
- Virkkala R.**, 2006. *Why study woodpeckers? The significance of woodpeckers in forest ecosystems*. *Annales Zoologici Fennici* 43, 82–85.
- Von Hartmaan L.**, 1956. *Adaptations in hole-nesting birds*. *Evolution* 11: 339-347.
- Webb D.M., Moore W.S.**, 2005. *A phylogenetic analysis of woodpeckers and their allies using 12S, Cyt b, and COI nucleotide sequences*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36: 233-248.
- Weibel A.C., Moore W.S.**, 2002. *A test of a mitochondrial gene-based phylogeny of woodpeckers (genus *Picoides*) using an independent nuclear gene, β -Wbrinogen intron 7*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22: 247-257.

- Weibel A.C., Moore W.S.**, 2002. *Molecular phylogeny of a cosmopolitan group of woodpeckers (genus Picoides) based on COI and cyt b mitochondrial gene sequences*. Mol. Phylogenet. Evol. 22: 65-75.
- Wetmore A.** 1960. *A classification for the birds of the world*. Smithsonian Misc. Coll. 139: 1-37.
- Wübbenhorst J., Südbeck P.**, 2003. *Woodpeckers as indicators for sustainable forestry? First results of a study from Lower Saxony*. Nationalpark Berchtesgaden Forschungsbericht 48: 179-192.
- Zangheri P.**, 1938. *Primo censimento completo della Avifauna Romagnola*. In Forlì presso l'Autore.
- Zenatello M.**, 2003. *Picchio nero Dryocopus martius*. In Spagnesi M., L. Serra, Eds., Uccelli d'Italia. Quad. Cons. Natura, 16, Min. Ambiente - Ist. Naz. Fauna Selvatica.