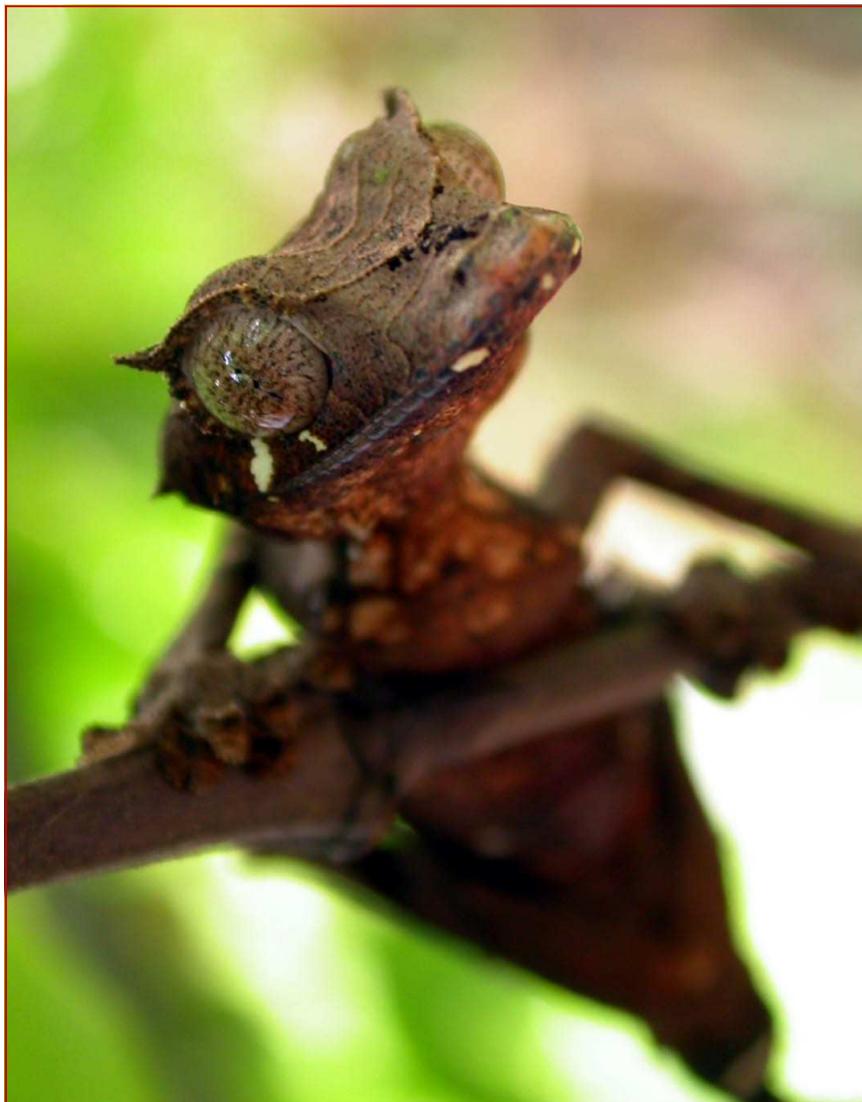


**UNIVERSITÁ DEGLI STUDI FEDERICO II**  
**FACOLTÁ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI**

**Dottorato di ricerca in Biologia Avanzata**  
**indirizzo in Biologia Evoluzionistica**  
**(ciclo XVIII)**

**Radiazione evolutiva dei Geconidi africani:**  
**un approccio cromosomico e molecolare**



**Tutore:**

***Ch.mo Prof. GAETANO ODIERNA***

**Coordinatore:**

***Ch.ma Prof.ssa SILVANA FILOSA***

**Candidato:**

***Dott. GENNARO APREA***



# Indice

<b>1. Introduzione</b>	<b>5</b>
1,1 Evoluzione e filogenesi dei Gekkota	5
1,2 I cromosomi e il loro ruolo nei processi di speciazione	8
1,2a L'evoluzione cromosomica nei Gekkota	11
1,3 I marcatori molecolari	12
1,3a Il DNA mitocondriale	12
1,3b Il DNA nucleare	13
1,3b1 Il DNA ribosomiale	14
1,3b2 Il DNA a sequenza unica	16
1,3b3 Il DNA satellite	17
<b>2. Scopo</b>	<b>21</b>
<b>3. Materiali e Metodi</b>	<b>28</b>
3,1 Specie utilizzate e loro provenienza	28
3,2 Analisi citologiche: Metodiche impiegate	35
3,3 Analisi molecolari: Metodiche impiegate	36
3.3a DNA altamente ripetuto	40
<b>4. Risultati</b>	<b>47</b>
4,1 Phelsuma	47
4,1a Morfologia e NOR	47
4,1b Distribuzione e composizione della eterocromatina	47
4,2 Uroplatus	47
4,2a Morfologia e NOR	47
4,2b Distribuzione e composizione della eterocromatina	48
4,3 Paroedura	48
4,3a Morfologia e NOR	48
4,3b Distribuzione e composizione della eterocromatina	67
4,4 Microscalabotes e Lygodactylus	67
4,4a Morfologia e NOR	67
4,4b Distribuzione e composizione della eterocromatina	68
4,5 Ebenavia-Matoatoa-Blaesiodactylus-Geckolepis	68
4,5a Morfologia e NOR	68
4,5b Distribuzione e composizione della eterocromatina	68
4,6 Tarentola	68
4,6a Morfologia e NOR	68
4,6b Distribuzione e composizione della eterocromatina	77

4,7 Tropicolotes-Stenodactylus-Ptyodactylus	77
4,1a Morfologia e NOR	77
4,1b Distribuzione e composizione della eterocromatina	77
5. Discussione	80
6. Conclusioni	88
7. Bibliografia	97

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 EVOLUZIONE E FILOGENESI DEI GEKKOTA

I gechi e i pigopodidi vengono raggruppati all'interno dell'infraordine dei Gekkota, uno dei tre principali raggruppamenti tra i sauri viventi ed il solo a comprendere linee evolutive primariamente notturne. A parte la loro atipica conduzione di vita notturna, i gechi sono conosciuti principalmente per vari caratteri apomorfici, che includono la presenza di un sistema di lamelle adesive sotto le dita altamente complesso, la mancanza di palpebre, la riduzione delle arcate temporali, ciò nonostante nessuna di queste caratteristiche caratterizza tutti i membri del gruppo (Kluge, 1987; Estes et al., 1988). Attualmente si stima che il taxon Gekkota comprende circa 1110 specie incluse in 116 generi (Kluge, 2001; Bauer, 2002) e molti taxon nuovi vengono descritti ogni anno. In base a numerosi caratteri morfologici si è ipotizzato che i Gekkota viventi siano monofiletici (Moffat, 1973; Hecht, 1976; Kluge, 1987; Estes et al., 1988) e quest'ipotesi è stata ulteriormente avvalorata da differenti studi molecolari (Saint et al., 1998; Harris et al., 1999, 2001). A parte l'occasionale inclusione degli Xantusiidae nel gruppo (vedi McDowell & Bogert, 1954; Macey et al., 1997) una visione generalmente non supportata (Moffat, 1973; Estes et al., 1988; Harris et al., 1999, 2001; Vicario et al., 2003) la sua composizione è rimasta relativamente invariata per tutto l'ultimo mezzo secolo. Underwood (1954), nel primo studio di tipo "moderno" sulle relazioni tra i geconidi, riconobbe tre famiglie: gli Eublepharidae, i Gekkonidae (con le sottofamiglie Gekkoninae e Diplodactylinae), e gli Sphaerodactylidae. Con piccole modifiche a questo schema (vedi in Russell & Bauer, 2002), una simile classificazione fu ripresa da Kluge (1967b), che considerò ogni linea evolutiva proposta da Underwood come una sottofamiglia e propose un pattern di relazioni rappresentabile come: (Eublepharinae (Diplodactylinae (Gekkoninae + Sphaerodactylinae))).

Sebbene i pigopodidi (lucertole con una riduzione degli arti) furono tra i primi ad essere individuati come quelli più affini ai geconidi (McDowell & Bogert, 1954; Underwood 1957), essi non furono inclusi nell'analisi di Kluge all'interno dei suoi raggruppamenti, ma furono considerati un sister-group. Kluge (1987) attraverso una rianalisi cladistica dei gruppi, fornì una revisione dei rapporti filogenetici includendo i pigopodidi e proponendo di innalzare a rango tassonomico più elevato alcuni raggruppamenti linneani. In base a questa sua interpretazione gli Eublepharidae divennero un sister-group dei Gekkonidae (che includeva i Gekkoninae e la nuova appena elevata sottofamiglia Teratoscincinae con il solo genere *Teratoscincus*) più i Pygopodidae (che includeva i Diplodactylinae e i Pygopodinae); gli Sphaerodactylinae furono considerati rendere i Gekkoninae parafiletici e quindi furono ridotti a un rango di tribù (gli Sphaerodactylini). Questo schema di relazioni fu largamente accettato da altri autori (Russel & Bauer,

2002), sebbene l'ordine dei rapporti ai livelli più alti della filogenesi e la nomenclatura proposta da Kluge per i Pygopodidae è rimasta sempre oggetto di dibattito (Moffat, 1973; King, 1987b; Donnellan et al., 1999; Bauer, 2002).

Nel corso degli ultimi decenni vari tentativi sono stati fatti per tentare di chiarire le relazioni tra le principali linee evolutive dei Gekkota, infatti alcune delle relazioni dentro le più piccole radiazioni, come gli Eublepharidae, sono stati risolti fin a livello specifico (Grismer, 1988; Ota et al., 1999). Kluge (1974, 1976) fornì una filogenesi a livello generico per i pigopodidi che in seguito fu modificata (Jennings et al., 2003). Ancora, Kluge (1965, 1967) identificò due principali linee filetiche dentro i diplodactilini, e tali ipotesi fu accettata da altri autori (vedi Bauer, 1990a), sebbene la monofilia di questi due gruppi, i Diplodactylini e i Carphodactylini, fu in seguito cambiata sulla base sia dei dati cromosomici (King, 1987b; King & Megden, 1990; vedi King, 1994 e Kluge, 1994 per maggiori informazioni sulla controversia) che dei dati molecolari (Donnellan et al., 1999).

Se riteniamo questa classificazione quella più parsimoniosa risulta che gli Eublepharinae sono i geconidi viventi più primitivi, ipotesi maturata anche in base alla discontinuità della distribuzione geografica delle specie, tutte allopatriche, appartenenti a questo taxon. All'interno di questa sottofamiglia *Aeluroscalabotes* viene considerato il genere più primitivo per la presenza sia dell'osso splenico che dell'osso angolare della mandibola, dello squamoso e del sopratemporale; per il numero degli elementi sclerali in media 20; per la compattezza delle ossa interclavicolarie e delle clavicole (di solito non perforate); inoltre per l'abitudine di camminare sugli alberi (è una specie di foresta tropicale) con le dita diritte e per l'assenza di organi adesivi. Molto probabilmente il luogo di origine e di radiazione evolutiva della famiglia fu l'Asia sud-orientale a causa della distribuzione nel Sud-Est asiatico delle specie del genere *Eublepharis* strettamente affine ad *Aeluroscalabotes*; inoltre la distribuzione australiana dei Diplodactylinae correlati agli Eublepharinae può ritenersi un'altra prova a favore del centro di radiazione evolutivo asiatico. La migrazione verso est probabilmente si è avuta attraverso la via India-Arcipelago australiano a causa della prossimità geografica di *Aeluroscalabotes* a quella regione. Gli Eublepharinae potrebbero essere migrati verso la Nuova Guinea e l'Australia dove molto probabilmente sono stati successivamente sostituiti dalla imponente radiazione dei Diplodactylinae. Il genere *Eublepharis*, si è verosimilmente evoluto da un gruppo simile ad *Aeluroscalabotes* nell'Asia sud-orientale forse nel tardo Mesozoico, infatti la primitiva dispersione terziaria di una forma simile a *Coleonyx* verso il Nuovo Mondo, si spiega con l'ipotesi di un'origine preterziaria del genere *Eublepharis*, che molto probabilmente aveva in passato un areale di distribuzione più ampio dell'attuale. Da questo esteso gruppo ancestrale verosimilmente trassero origine almeno due rami: uno nel Nuovo Mondo, oggi rappresentato da *Coleonyx* ed uno in Africa con i generi *Holodactylus* ed *Hemitheconix*. L'attuale assenza degli Eublepharini dalle parti aride dell'Africa meridionale, si può spiegare con la loro sostituzione da parte della radiazione dei Geconini che si concentrò in questa regione. Un'ipotesi alternativa potrebbe essere che i due generi eublepharini si siano evoluti negli ambienti xerici nelle basse latitudini dell'emisfero settentrionale che iniziò a formarsi nel Terziario e che successivamente siano stati incapaci di attraversare

gli umidi ambienti tropicali equatoriali. Dall'altra parte invece i Diplodattilini probabilmente si evolvettero dal primitivo gruppo geconideo nelle regioni tropicali dell'Asia sud-orientale durante il tardo Mesozoico. La distribuzione attuale dei Diplodattilini in Australia, Nuova Caledonia, isole della Lealtà e Nuova Zelanda potrebbe risentire di un'antica radiazione da parte di un gruppo ancestrale discendente dagli Eublefarini attraverso la regione dell'arcipelago indoaustraliano. Infine in concomitanza con l'origine dei Diplodactylinae da un antenato eublefarinico dell'Asia sud-orientale e quasi in concomitanza con il movimento di questi verso l'arcipelago indo-australiano, i Gekkonidae probabilmente si dispersero attraverso l'Asia verso l'Africa. Oggi vi è un numero abbastanza grande di Gekkoninae in Africa, Madagascar ed Asia sud-occidentale che possiedono molte somiglianze morfologiche quali le ossa nasali fuse e le ossa frontali appaiate, che sembrano essere strettamente correlate. *Teratoscincus* (+ *Stenodactylus*?) molto probabilmente rappresentano i discendenti delle più primitive radiazioni dei Gekkoninae a causa di un alto numero di elementi sclerali e per la presenza dell'osso angolare nella mascella inferiore. Invece le regioni orientale oceanica e australiana, conservano solo i gruppi moderni dominanti a forte espansione come *Gehyra*, "*Cyrtodactylus*", *Lepidodactylus* e *Gekko*, mentre le forme più primitive non sembrano essersi evolute nelle aree paleotropicali orientali. Sulla base delle loro estreme differenze morfologiche, i generi endemici del Nuovo Mondo non sembrano formare un gruppo naturale, infatti, con poche eccezioni, ogni genere del Nuovo Mondo sembra correlato con uno del Vecchio Mondo anche se i primi in molti casi si sono originati indipendentemente dai secondi.

Anche se un occasionale attraversamento dei gechi dell'Atlantico non sembra improbabile viste le correnti favorevoli ed i venti che probabilmente avrebbero potuto trasportare zattere o altro (Brown & Alcalá, 1957; King, 1962). L'attuale distribuzione di *Tarentola* (genere presente con 19 specie dell'Europa meridionale, Africa settentrionale, Isole Canarie e Isole Capoverde ed 1 specie diffusa nelle Indie occidentali) è, infatti, quasi certamente il risultato di attraversamenti dell'Atlantico mediante zattere. I reperti fossili ascrivibili alla specie *Tarentola americana* nelle Indie occidentali del tardo Pleistocene insieme alla differenziazione morfologica, provano la sua presenza nel Nuovo Mondo prima dell'arrivo degli europei. Inoltre dati molecolari (Carranza et al., 2002) indicano che la separazione di questa specie dalle altre del genere è avvenuta 10,6-17 My (milioni di anni) fa. Questa stima ulteriormente rafforza l'idea di una naturale colonizzazione transmarina ed esclude che tale separazione sia avvenuta con l'allontanamento del Sud America dall'Africa occorso circa 100 My fa (Smith & Briden, 1977)

Gli Sferodattilini, invece, sono oggi rappresentati da vari generi con un pattern morfologico e comportamentale ben delineato e sono ristretti prevalentemente nella regione neotropica. Molto probabilmente gli Sphaerodactylinae sono derivati da qualche genere di Gekkonidae affine a *Lygodactylus*. Questa correlazione è basata principalmente dalla comune perdita delle ossa e sacchi cloacali. Questo gruppo ancestrale probabilmente arrivò nei tropici del Nuovo Mondo nel primo Terziario, attraversando l'Atlantico con le zattere dato che le forti affinità con i gruppi africani non sostengono il concetto di una migrazione nel Nuovo Mondo attraverso quel ponte costituito dalla terra di Bering. Inoltre la massiccia

radiazione evolutiva degli Sferodattilini nel Nuovo Mondo è probabilmente correlabile alla assenza di una parallela radiazione evolutiva dei Gekkoninae.

## 1.2 I CROMOSOMI E IL LORO RUOLO NEI PROCESSI DI SPECIAZIONE

Gli studi citogenetici possono contribuire a fornire ulteriori informazioni, indipendenti da quelle morfologiche, biochimiche e molecolari, da poter utilizzate in analisi filogenetiche. Al pari delle indagini biochimiche e molecolari le informazioni derivanti dallo studio dei cromosomi possono rilevare delle differenze o somiglianze che spesso a livello morfologico non sono così ovvie. Il poter indagare diversi livelli di organizzazione biologica, da quella morfologica a quella molecolare in funzione delle tecniche applicate rende la citogenetica di grande attrattiva. I cromosomi possono essere studiati come una manifestazione morfologica del genoma in termini della loro forma, dimensione, numero e del loro comportamento durante la meiosi e la mitosi. L'analisi a livello della ploidia o meiosi possono dare informazioni nei cambiamenti negli incroci sui modelli di ereditarietà (apomissia o traslocazioni eterozigotiche). A livello più fine, gli studi di bandeggio e il chromosome painting ci rivelano aspetti della organizzazione strutturale della cromatina lungo i singoli cromosomi. Ulteriori informazioni le possiamo ottenere quando i cromosomi vengono studiati attraverso ibridazione in situ di sequenze note di DNA o RNA per rilevare i dettagli più fini dell'anatomia cromosomica in termini di microriarrangiamenti o di presenza/assenza di particolari tipi di sequenze. Oggi è inoltre possibile andare ancora oltre e microdissezionare direttamente interi o regioni di cromosomi per analizzare le sequenze geniche e/o preparare sonde specifiche attraverso le quali studiare l'omologia cromosomica tra le specie. Questa tecnica, ovviamente, è più semplice in cariotipi con dimensione e forme dei cromosomi variabili, ma risulta estremamente difficile, se non impossibile in un cariotipo con cromosomi di forma e dimensione simili. Nella maggior parte degli studi di citotassonomia sono stati utilizzati il numero e la morfologia dei cromosomi, e più raramente, vari tipi di bandeggio cromosomico (Olmo 1986; Session & Kezer, 1987; Macgregor et al, 1990; King, 1990; Green & Session, 1991). Le variazioni principali cromosomiche riscontrate nelle analisi filogenetiche nel numero e nella morfologia dei cromosomi sono imputabili a traslocazioni Robertsoniane (fusioni e fissioni di cromosomi a livello centromerico) e a due tipi differenti di inversioni: le inversioni pericentriche che coinvolgono il centromero e le inversioni paracentromeriche che avvengono al di fuori della regione centromerica. Le inversioni pericentromeriche possono essere spesso rivelate dalla sola morfologia cromosomica (vi è uno spostamento della posizione del centromero), mentre la conferma di una traslocazione robertsoniana o di una inversione paracentromerica spesso necessita di alcuni marcatori cromosomici come bande, NORs o ibridazione di sonde. Inversioni e traslocazioni possono anche essere individuate nei cromosomi lampbrush e in altre preparazioni meiotiche (complessi sinaptonemali). È interessante notare che differenze nella struttura dei cromosomi sono spesso correlate con una differenziazione tassonomica, anche se il ruolo dei riarrangiamenti cromosomici nei processi di speciazione

è alquanto controverso (Patton & Sherwood, 1983; Sites & Moritz, 1987; King, 1993). La fissazione dei riarrangiamenti strutturali nei cromosomi può essere il più importante e facilmente comprensibile evento citogenetico correlato alla speciazione. Alcuni organismi, come differenti gruppi di anfibi urodela, mostrano nella struttura cromosomica dei cambiamenti piccoli o di nessun entità a livello intra- o interspecifico contro una notevole variabilità nella morfologia dell'animale, a livello gene-enzima e nella struttura delle sequenze di DNA. Questo ci suggerisce che la morfologia cromosomica è stata fortemente conservata (Session & Kezer, 1987) a dispetto degli altri parametri che normalmente vengono presi in considerazione negli studi tassonomici. In altri casi invece abbiamo che il differenziamento cromosomico precede quello molecolare come nel caso del complesso della *Lacerta kulzeri* (Odierna et al., 1998). Ancora più controversa è la possibile esistenza di un principale trend nell'evoluzione cromosomica. Nelle salamandre, per esempio, è stato ipotizzato che il cariotipo primitivo sia asimmetrico (cioè contenga sia cromosomi acrocentrici che a due braccia) che bimodale (contenente sia macro che microcromosomi), con un alto numero di cromosomi, mentre i cariotipi derivati sono simmetrici (tutti a due braccia) e unimodali (senza microcromosomi), con un più basso numero di cromosomi (Morescalchi, 1973; 1975). Questa ipotesi è basata sulla correlazione dei cariotipi con la morfologia e la biologia della riproduzione degli organismi. Una simile correlazione è stata notata anche per gli anfibi anuri (Morescalchi, 1973) dove nel primo stadio intervengono inversioni pericentromeriche a produrre cromosomi acrocentrici seguito poi da traslocazioni robertsoniane (Morescalchi, 1975; Green, 1983). Il chromosome painting e altre metodiche attualmente in uso potrebbero generare una migliore risoluzione alla definizione dei cromosomi e quindi essere un ottimo strumento per poter seguire il trend evolutivo dei cariotipi all'interno di un contesto filogenetico. L'applicazione più semplice dell'ibridazione in situ riguarda la localizzazione di sequenze mediamente ripetute centinaia di volte nel genoma (Macgregor & Varley, 1983). Conseguentemente la maggior parte degli studi comparativi è stata focalizzata su sequenze ripetute come quelle codificanti gli RNA ribosomiali, tRNA ed istoni, così come sequenze ripetute di DNA satellite. I geni a singola copia, invece, sono stati più facilmente visualizzati nei cromosomi politenici dei ditteri, poiché in tali cromosomi tutte le sequenze geniche non solo sono moltiplicate parecchie centinaia di volte ma anche localizzate e concentrate. Quindi è possibile dedurre delle analisi filogenetiche utilizzando alcuni caratteri, quali la localizzazione di sequenze (varie famiglie ripetute) tra e dentro i cromosomi, la struttura e il numero di copie delle sequenze, la localizzazione di specifiche bande o di altri marcatori, la localizzazione dei NORs. Due differenti ipotesi sono state avanzate riguardo le modalità dei cambiamenti evolutivi nella struttura molecolare dei cromosomi. La prima è quella del repatterning cromosomico (Mancino et al., 1997; Cremisi et al., 1988) e l'altra quella dell'omosequenzialità (Macgregor & Sherwood, 1979). Secondo la prima ipotesi differenze interspecifiche nella localizzazione cromosomica di certe sequenze di DNA ripetute (geni ribosomiali per esempio) riflettono la ridistribuzione degli elementi cromosomici dentro il cariotipo. Una predizione basata su questa modalità è che i cambi evolutivi nella localizzazione delle sequenze dovrebbero essere relativamente conservative (lente, uniche e irreversibili). L'ipotesi dell'omosequenzialità invece postula che le differenze nell'apparente localizzazione

di varie sequenze riflettono amplificazioni o diminuzioni di una o più sequenze con una piuttosto stabile localizzazione cromosomica. Quindi secondo questa ipotesi i cambiamenti nella localizzazione cromosomica di certi tipi di sequenze avvengono in maniera relativamente rapida e reversibile. Un chiaro meccanismo citogenetico per questi cambiamenti rapidi è un ineguale crossing over durante la meiosi o un ineguale sister chromain exchange durante la mitosi o meiosi all'interno delle sequenze ripetitive. Un modello di cambiamenti evolutivi nella dimensione dei cromosomi e nella struttura molecolare che coinvolge i principali gruppi di sequenze ripetitive fu presentata da Macgregor e Session (1986). Secondo questo modello vengono tollerate sequenze di DNA altamente ripetitive che si originano e si sviluppano in particolari regioni cromosomiche, come i centromeri. La ricombinazione di tratti non omologhi in alcuni siti potrebbe dare origine ad una rapida diffusione di nuove sequenze all'interno del cariotipo e susseguente evoluzione concertata tra i cromosomi non omologhi. Susseguenti piccoli riarrangiamenti potrebbero essere conseguenza di una graduale rottura stocastica, dispersione, e degradazione di queste sequenze mentre vengono allontanate dalla regione centromerica lungo i bracci cromosomici. Su questo modello si basa l'ipotesi che le sequenze evolute recentemente potrebbero essere omogeneizzate nella struttura, localizzate in larghi cluster (specialmente nei pressi dei centromeri o telomeri), funzionalmente inerti e tassonomicamente non significative. Le sequenze più antiche dall'altra parte, potrebbero mostrare una maggiore complessità di sequenza, essere trovate in piccoli cluster in posizione intercalare lungo i bracci cromosomici, essere trascritte ed avere chiaramente un valore tassonomico. Alcuni casi tipici possono essere quelli delle salamandre (Macgregor and Session, 1986; Cremisi et al., 1988) e delle piante (Flavell, 1986). Modelli generali sull'evoluzione cromosomica sono complessi da definire poiché vi sono grosse differenze nell'organizzazione molecolare dei genomi appartenenti ai differenti gruppi di organismi eucariotici (Bernardi et al., 1985; O'Brien et al., 1985; Li and Graur, 1991). Molti dei DNA ripetitivi nei genomi possono essere originati da geni funzionali (tRNA per esempio) attraverso un meccanismo di retroposizione (Deininger and Daniels, 1986). Questi meccanismi comportano una retrotrascrizione di molecole di RNA a DNA con susseguente integrazione ed amplificazione di queste copie a nuovi siti genomici. Il meccanismo di retroposizione potrebbe essere la risorsa dominante delle principali famiglie dei DNA ripetuti. Il quadro che si ha dalla comparazione dei risultati ottenuti da questi studi nei diversi organismi è che i genomi sono incredibilmente dinamici in termini di posizione e/o struttura delle sequenze identificate e soprattutto in termini del numero, del tipo e localizzazione delle varie sequenze ripetitive. I meccanismi cromosomici quali il crossing over ineguale, inversioni, traslocazioni possono chiaramente giocare un ruolo dominante così come il ruolo degli elementi trasponibili, retrotrasponibili e il fenomeno della conversione genica nell'evoluzione cromosomica (Baker and Wichman, 1990; Hillis et al., 1991c)

Uno dei principali limiti della citogenetica molecolare è la reale identificazione dei cromosomi. Dal punto di vista teorico l'identificazione potrebbe essere fatta sul pattern delle bande o su qualche altro specifico marcatore cromosomico, indipendentemente dalla localizzazione di particolari sequenze. In realtà i cromosomi dei mammiferi e qualche altro organismo si possono riconoscere con il bandeggio G che mostra

un pattern complesso e cromosoma specifico. Il problema sorge negli altri organismi, quali anfibi e squamati, dove il bandeggio è estremamente complesso e, soprattutto negli squamati, dove i cromosomi sono anche piccoli. In questi casi solo l'ibridazione di sonde cromosoma specifiche potrebbe essere utile ma nella maggior parte di questi organismi ottenere un numero di piastre cromosomiche congruo è spesso molto arduo.

## 1.2a L'EVOLUZIONE CROMOSOMICA NEI GEKKOTA

Rispetto al cospicuo numero di specie appartenenti ai Gekkonidae esistono solo pochi studi cromosomici, infatti meno del 5% delle forme esistenti sono state a tutt'oggi esaminate. Inoltre mentre alcune aree geografiche, soprattutto l'Australia, sono state ben studiate, prevalentemente negli anni '80, vi sono dati estremamente scarsi per le specie provenienti dagli altri continenti. Il numero cromosomico all'interno della famiglia varia da  $2n=24$  a  $2n=46$ , con la maggior parte delle specie possedenti un corredo diploide da 38 a 42 cromosomi. La formula cromosomica generalmente trovata nei vari taxa è abbastanza differente da quella degli altri sauri, essendo un cariotipo unimodale e prevalentemente formato da cromosomi acrocentrici i quali diminuiscono gradualmente di grandezza. Nonostante una omogeneità interspecifica nell'organizzazione cromosomica, vari casi di variabilità intraspecifica nel numero e nella morfologia cromosomica sono stati trovati. Infatti sono stati descritti varie razze cromosomiche e polimorfismi nei Diplodactylinae, *Diplodactylus tessellatus* (King, 1973, 1981) e *D. vittatus* (King, 1977) e nei Gekkoninae, *Phyllodactylus marmoratus* (King & Rofe, 1976; King & King, 1977), *Hemidactylus frenatus* (King, 1978, 1983, 1984; Moritz, 1984b) così come in alcune specie del genere *Gehyra* (King, 1979, 1982, 1983, 1984; Moritz, 1984b). Nella maggior parte dei casi le varie razze cromosomiche differiscono nel numero diploide e nel numero degli elementi a due braccia. Queste differenziazioni sono dovute principalmente a fusioni centriche (King, 1979, 1981). In alcuni casi, come in *Gehyra* e *Phyllodactylus*, le variazioni intraspecifiche sembrano essere conseguenza di speciazione allopatrica (King & Rofe, 1976; King, 1979, 1981, 1984). In altri casi, come in *Diplodactylus vittatus*, sembra essere in relazione a un processo di speciazione stasipatrica (King, 1977a, 1981). I cromosomi sessuali sono stati identificati in 6 specie: 5 di loro *Gehyra australis*, *G. purpurascens*, *Heteronotia binomi*, *Phyllodactylus marmoratus* e *P. lanei* mostrano un'eterogametia femminile di tipo ZW (King & Rofe, 1976; King, 1977b, 1981; Moritz, 1984b) mentre in *Gekko gecko* fu descritto un eteromorfismo maschile di tipo XY (Solleder & Schmid, 1984). Il fatto di ritrovare generalmente una formula unimodale, con tutti i cromosomi acrocentrici gradualmente decrescenti in grandezza, suggeriscono che il cariotipo ancestrale di questa famiglia, o addirittura dell'intero infraordine ha una simile morfologia e un alto numero di cromosomi, presumibilmente 38 (King & Rofe, 1976; King, 1981), come quello dei primitivi Diplodactylinae (King & Rofe, 1976). Infatti quando è stato possibile seguire il trend evolutivo delle varie specie lungo una linea evolutiva o delle varie razze in una specie, come nel caso di *Gehyra* (King, 1979, 1983, 1984) e di *Phyllodactylus* (King & Rofe, 1976; King &

King, 1977) le forme morfologicamente più primitive mostrano un cariotipo con un alto numero cromosomico e con pochi, se non nessuno, elementi biarmed, mentre le forme derivate hanno un numero cromosomico ridotto e vari elementi metacentrici. Il trend principale nell'evoluzione cromosomica dentro i geconidi e quindi la progressiva riduzione del numero cromosomico dovuta a fusioni centriche. Solo in *Gehyra purpurescens* Moritz (1984b) descrisse un caso di fusione tandem telomero-telomero, caso piuttosto raro nei vertebrati. Comunque le fusioni centriche hanno un'origine indipendente nelle varie linee evolutive. Questo è in accordo con l'ipotesi che l'evoluzione di questa famiglia e in particolare dei Gekkoninae è stata caratterizzata da varie radiazioni indipendenti (Underwood, 1954; Kluge, 1967; Russel, 1976)

### 1.3 I MARCATORI MOLECOLARI

Negli ultimi anni grazie all'avvento della Polymerase Chain Reaction (PCR), che ha rappresentato l'inizio di una rivoluzione nella biologia molecolare portando in un numero di differenti campi della biologia, incluso la sistematica, genetica di popolazione, filogenesi, ecologia e molti altri, i ricercatori hanno potuto utilizzare le informazioni contenute nelle sequenze di DNA. Questo, soprattutto, grazie dall'uso di primers più o meno "universali" che si legano, riconoscendo regioni conservate del DNA, e permettono all'enzima Taq polymerase di amplificare la regione del DNA compresa tra i due primers utilizzati.

#### 1.3a IL DNA MITOCONDRIALE

Uno dei vantaggi delle tecniche del DNA e delle nuove acquisizioni di genetica molecolare è che esse permettono di studiare direttamente il genoma e di poter effettuare studi di carattere filogenetico, che ricostruiscono il cammino evolutivo dei diversi taxa, analizzando direttamente le loro distanze genetiche. Uno dei metodi più utilizzato per gli studi di filogenesi è basato sull'analisi del DNA mitocondriale. L'attività mitocondriale è alla base del processo per la produzione di energia a livello cellulare. I mitocondri producono gli enzimi necessari alla respirazione cellulare e contengono anch'essi una piccola quantità di DNA. L'mtDNA ha parecchi vantaggi rispetto al genoma nucleare: è una molecola circolare del mtDNA (eccetto nelle piante) è relativamente piccola, infatti le sue dimensioni variano tra 15700 a 15900 coppie di basi, ovvero circa 2500 volte più piccola delle dimensioni dei più piccoli DNA genomici negli animali. Esso contiene due geni per rRNAs (12 e 16S), 22 geni per tRNAs mitocondriale, 13 geni per subunità proteiche di enzimi di trasporto di elettroni e ATP sintetasi e una parte regolatore contenente i siti di partenza della replicazione e trascrizione del DNA. E poiché è presente in grossa quantità, è facilmente estraibile, è aploide (quindi nessun polimorfismo è in principio aspettato) e il suo modello di ereditarietà è esclusivamente lungo la linea materna la portano ad essere considerata un eccellente marcatore per studi filogenetici. Quindi, tale DNA, a differenza di quanto avviene per quello genomico, è trasmesso esclusivamente, o quasi, attraverso la

linea cellulare germinale femminile ed ha la caratteristica di mutare rapidamente nel tempo. Il genoma mitocondriale, ereditato solo, o quasi solamente, per via materna in forma aploide, ha inoltre la caratteristica di non andare incontro a fenomeni di ricombinazione. Proprio per queste caratteristiche è considerato da molti ricercatori un migliore "contatore del tempo" rispetto al DNA genomico nucleare, anche se purtroppo le mutazioni avvengono con intervalli di tempo incostanti. Nel DNA mitocondriale sono quindi reperibili delle "tracce del passato" complementari e in alcuni casi, più informative rispetto a quelle reperibili con il DNA genomico nucleare. Le variazioni della sequenza combinate alla assenza di ricombinazione costituiscono uno strumento altamente informativo per tutti gli studi relativi ad un determinato taxon. È stato, inoltre, stimato che le sostituzioni nucleotidiche a livello del DNA mitocondriale sono 5-10 volte maggiori rispetto al DNA nucleare e che attraverso lo studio del DNA genomico e mitocondriale è possibile ricostruire le tappe della storia evolutiva degli organismi che popolano la Terra.

### 1.3b IL DNA NUCLEARE

Data la disponibilità di una molteplice varietà di geni che possono essere utilizzati in sistematica molecolare, due problemi riguardano le sequenze che sono più informative (dato qualitativo) per la ricostruzione filogenetica e la quantità di sequenze necessarie (dato quantitativo) per risolvere le relazioni in particolari gruppi. Numerosi lavori in letteratura hanno tentato di rispondere a questo quesito specialmente nell'ambito di comparare i meriti tra geni mitocondriali e geni nucleari (Baker and DeSalle, 1997; Prychitko and Moore, 2000; Springer et al., 2001). In generale è difficile da predire a priori se un determinato gene potrà essere informativo per un particolare gruppo finché l'analisi filogenetica non è condotta (Graybeal, 1994; Mitchell et al., 2000). Nondimeno le caratteristiche che distinguono i geni mitocondriali da quelli nucleari sono ben conosciute e possono guidarci nella scelta dei differenti marker per la nostra ricostruzione filogenetica. La popolarità del DNA mitocondriale (mtDNA) argina in parte il quesito, grazie alle caratteristiche che lo rendono utile per le interrelazioni fra taxa molto vicini, includendo un elevato tasso di sostituzioni rispetto ai geni nucleari a singola copia (Brown et al., 1979). Tuttavia ciò è solo in parte vero poiché i geni mitocondriali vengono tutti ereditati come un singolo gruppo e inoltre rappresentano solo una parte delle molte migliaia di geni che formano le specie (Hey, 2000). Le sequenze geniche nucleari sono andate nel tempo ad essere utilizzate spesso in sinergia con quelle mitocondriali negli studi sistematici (Slade et al., 1994; DeBry and Seshadri, 2001). Sequenze esoniche sono state utilizzate in alcuni casi (Serizawa et al., 2000), tuttavia le sequenze introniche sono favorite a causa della loro presunta mancanza di vincoli funzionali, principalmente per l'alto tasso di sostituzioni e per un grande numero di siti liberi di variare rispetto agli esoni. La maggior parte degli studi che utilizzano geni nucleari sono spesso ristretti a un piccolo numero di singoli loci, ma studi teoretici e simulazioni suggeriscono che sequenze provenienti da multipli loci nucleari potrebbero essere estremamente utili per risolvere alcuni problemi filogenetici per alcune ragioni. In primo luogo basandosi sulla differenza dei tempi di coalescenza tra loci mitocondriali e

nucleari, Moore (1995) mostra che più geni nucleari sono necessari per ottenere lo stesso potere di risoluzione di un singolo gene mitocondriale, particolarmente tra taxa molto vicini tra loro. Secondo, i pattern e i processi di sostituzione variano da locus a locus e forse anche regionalmente dentro il genoma (Matassi et al., 1999). Sequenze provenienti da un singolo gene possono portare ad errore causato da un "location-dependent processes" (Cummings et al., 1995). Lo studio di brevi segmenti di loci multipli da differenti regioni del genoma possono mitigare alcuni errori (Cummings et al., 1995). Terzo, è probabile che gli alberi filogenetici sono la rappresentazione articolata di alberi genici di varia topologia (Maddison, 1996, 1997). Quindi noi dobbiamo considerare che ogni gene può avere una differente dinamica evolutiva generalmente correlata ai suoi constraints funzionali. L'evoluzione di un organismo a livello molecolare può essere un "insieme" di vari processi ed ogni processo può mantenere un proprio orologio molecolare che dipende dalla propria dinamica e/o da forze esterne. Ovvero differenti geni possono possedere segnali filogenetici differenti all'interno dei differenti gruppi a causa della variazione nei pattern di sostituzione così come avviene per la natura stocastica della separazione filetica. Questo implica che non tutti i set di sequenze omologhe sono utili per descrivere la storia evolutiva delle varie specie e anche che le stesse non possono essere indiscriminatamente utilizzate per indagini tassonomiche o per datare eventi biologici (Saccone et al., 1993). Sequenze provenienti da numerose regioni del genoma sono quindi richieste per conoscere come il segnale filogenetico (modalità e variazione della distribuzione; Maddison, 1996) è distribuito lungo una filogenesi.

### 1.3b1 Il DNA RIBOSOMIALE

Studi su geni dell'RNA ribosomiale hanno portato notevole interesse in un cospicuo numero di animali e piante, specialmente in relazione alla caratterizzazione di specie o popolazioni e alle relazioni evolutive. Negli alti eucarioti questi geni sono organizzati a tandem in due distinte famiglie multigeniche composte da centinaia a migliaia di copie (Hadjiolov, 1985). La principale classe degli rDNA comprende i geni che codificano per il 18S, 5,8S e per il 28S rRNAs che sono correlati agli organizzatori della regione nucleolare (NORs) (Long and David, 1980). Invece la seconda famiglia ribosomiale è formata dall'rDNA che codifica per il 5S rRNA. La sequenza nucleotidica e la posizione di queste due famiglie multigeniche hanno contribuito alla conoscenza della struttura, organizzazione ed evoluzione del genoma.

#### 5S rDNA:

Il 5S rDNA consiste di copie multiple di un altamente conservata sequenza di 120 coppie di basi separata da una regione variabile NTS che è uno spaziatore non trascritto (Long & David, 1980). Diversi lavori hanno considerato l'utilizzo della sequenza del 5S rDNA come marcatore filogenetico o di popolazione (Sajdak et al., 1998; Martins & Galletti, 2001). Tuttavia, in alcuni eucarioti di diversi gruppi tassonomici filogeneticamente non correlati, i geni del 5S rDNA possono essere trovati interspersi con altri elementi

quali geni istonici, 45S rDNA etcc.(Andrews et al., 1987; Drouin, 1999; Drouin & Moniz de Sa, 1995; Martins et al., 2002). Notevoli informazioni sull'organizzazione funzionale e strutturale dei geni del 5S rRNA derivano dalle piante (Adacchi et al., 1997; Amarasinghe & Carlson, 1998; e molti altri), dai pesci (Rocco et al., 1999; Martins et al., 2002; e da altri), da alcune specie di anfibi (Korn, 1982; Vitelli et al., 1982; del Pino et al., 1992) dai mammiferi (Leah et al., 1990; Suzuki et al., 1994; e altri). Nella maggior parte degli eucarioti, i geni del 5S rRNA sono generalmente localizzati in distinte aree del genoma, organizzati come una o più unità ripetute associate a clusters, e il numero di questi geni varia da 100 a 300000 copie. Inoltre mentre in drosofila per sempio vi è solo un clusters di circa 160 copie in *Xenopus laevis* questi geni sono localizzati a clusters nella regione telomerica della maggior parte, quasi tutti, i cromosomi (Pardue et al., 1973) e nel teleosteo *Oreochromis niloticus* invece sono state rinvenute l'esistenza di due differenti classi di 5S rDNA (condizione non nuova per i pesci) localizzati su tre coppie di cromosomi (Martins et al., 2002). In molti vertebrati i geni del 5S sono localizzati su un singolo paio di cromosomi, mentre i NORs alcune volte sono presenti su cromosomi multipli (Suzuki et al., 1996; Makinem et al., 1997), negli anfibi (Schmid et al., 1987; Lucchini et al., 1993) e nei pesci (Martins & Galletti, 2001; Martins et al., 2002) i geni del 5S rRNA possono essere localizzati su vari cromosomi; tuttavia i loci NOR e 5S rDNA possono assumere un'organizzazione sintenica sullo stesso cromosoma (Pendàs et al., 1994; Mòran et al., 1996) o possono essere rinvenuti su differenti paia di cromosomi (Martinez et al., 1996; Sajdak et al., 1998; Martins & Galletti, 1999; Wasko et al., 2001).

### ITS-1 e ITS-2

Le regioni trascritte interne (ITS-1 e ITS-2) che separano i geni ribosomiali del 18S dal 28S sono considerati degli ottimi candidati per valutare le distanze filogenetiche all'interno dei generi o tra gruppi di specie affini. Infatti mentre le regioni del 18S e del 28S sono molto conservate lungo le varie linee filetiche, gli spaziatori interni (ITS-1 e ITS-2) e lo spaziatore intergenico (IGS) variano per differenti gradi tra le specie e l'allineamento delle loro sequenze viene normalmente utilizzato per indagini filogenetiche (vedi Baldwin et al., 1995 per una review). Le regioni ITS, quindi, sono più variabili di quelle dei geni funzionali del 18S, 5,8S e 28S ma sono più conservate di quelle dell' IGS. Poiché la variabilità tra i geni è ridotta (omogeneizzata) da un processo come il crossing-over ineguale o dalla conversione genica, che vengono collettivamente conosciuti come deriva molecolare (Dover, 1982), questo processo potrebbe operare simultaneamente sulle regioni ITS. Ciò nonostante mentre in alcuni organismi (prevalentemente parassiti di piante) sono conosciute solo piccole variazioni nelle sequenze degli ITS (Fenton et al., 1997) in altri organismi al contrario vi è un'elevata variabilità di sequenza (Wesson et al., 1992; Wesson et al., 1993; McLain et al., 1995).

### 1.3b2 IL DNA A SEQUENZA UNICA

Durante gli ultimi due decenni, le sequenze di DNA sono divenute lo strumento dominante nell'individuare le relazioni filogenetiche tra vasta varietà di organismi. La schiacciante maggioranza degli studi molecolari sulla sistematica degli animali ha visto l'utilizzo di geni mitocondriali per i quali sono conosciuti primer universali (Kocher et al., 1989; Sorenson et al., 1999). Ciò nonostante, i geni mitocondriali rappresentano solo una piccolissima parte delle decine di migliaia di loci che compongono il genoma degli animali. Nonostante il recente completamento di vari progetti genomici (*Homo*, *Mus* ad esempio) il genoma nucleare della quasi totalità delle specie rimane inesplorato, eppure esso rimane un notevole pozzo da cui poter attingere informazioni sulla filogenesi.

#### STSs

Una delle modalità attraverso la quale il genoma nucleare degli organismi è in parte conosciuto è un approccio di ricerca attraverso la comparazione di genomi. Questo approccio usa informazioni di sequenze omologhe da un organismo per assegnare un ipotetica funzione a un non conosciuto gene e/o serve come guida per mappare la posizione dei geni in altri organismi (Brown, 1999). Negli anni recenti gli sforzi di costruire una mappa genomica comparativa nei mammiferi ha condotto allo sviluppo di migliaia di marker che definiscono specifici punti di riferimento nel genoma nucleare di specie modello (topo e uomo), che sono conosciuti col nome sequenze-tagged sites (STSs). Le STSs sono brevi regioni del DNA di circa 200-1000 coppie di basi e sono facilmente evidenziabili dalla PCR partendo dal DNA totale (Olson et al., 1989); in altre parole i primers che amplificano una sequenza unica e mappano a una singola posizione nel genoma definiscono una STS. Tre classi di loci STS sono riconosciuti: tipo I, II e III (O'Brien et al., 1999): I loci tipo I sono geni codificanti regioni a singola copia (esoni e introni) ed aiutano a definire omologhi tratti che sono conservati lungo un vasto range di taxa. I loci tipo II sono marker di DNA ripetitivo, come i microsatelliti, e sono altamente polimorfici, e vengono normalmente utilizzati analisi di popolazione. I loci tipo III sono polimorfismi a singolo nucleotide dentro regioni sia codificanti che non e sono utilizzati per studi di popolazione e di discendenza, sebbene sono meno polimorfici dei loci tipo II. Di queste tre classi di loci STS, i marker tipo I sono quelli che vengono più utilizzati in studi di sistematica molecolare per diverse ragioni, tra queste 1) i primer derivati da un genoma ben mappato possono essere utilizzati per amplificare loci omologhi in specie poco studiate. Ciò è possibile poiché i primer sono localizzati in regioni (normalmente esoni) che sono altamente conservate anche tra taxa distanti. 2) ci si aspetta che i primer amplifichino una singola sequenza, riducendo la possibilità di amplificare sequenze paraloghe, le quali sono un potenziale rischio poiché molti geni nucleari appartengono a famiglie geniche. 3) i loci tipo I sono abbondanti, infatti nei mammiferi ne sono già stati caratterizzati centinaia (Venta et al., 1996; Lyons et al., 1997; Jiang et al., 1998; Koepfli and Wayne, 2003). Infine i loci tipo I generalmente comprendono sequenze

intrinche che sono chiaramente informative sia per caratterizzare divergenze evolutive profonde sia poco profonde.

## C-MOS

Il c-mos è un proto-oncogeno che codifica una serina/treonina chinasi espresso ad alto livello nelle cellule germinali. La proteina è un regolatore della maturazione meiotica ed è coinvolto nell'arresto della maturazione ovocitaria a livello della metafase II (Yew et al., 1993). Il gene del c-mos è a singola copia, senza introni, ed è appena più grande di 1000 coppie di basi. Esso è stato trovato nel genoma degli anfibi, rettili, uccelli e mammiferi. Non vi è nessun elemento ripetitivo nella sequenza e solo poche inserzioni o delezioni che possono complicare l'allineamento delle sequenze tra i vertebrati. Queste caratteristiche lo rendono ideale per l'amplificazione con PCR dal DNA genomico totale e per il diretto sequenziamento del prodotto di PCR. Graybeal (1994) suggerisce che il c-mos può portare informazioni filogenetiche tra i taxa caratterizzati da un tempo di divergenza di 400 milioni di anni. Analisi con Southern suggeriscono che il c-mos è presente a singola copia anche nel genoma degli squamati (Saint et al., 1998).

### 1.3b3 IL DNA SATELLITE

Inizialmente la definizione di eterocromatina aveva un significato esclusivamente morfologico, infatti venivano identificate le regioni dei cromosomi mitotici eteropicnotiche. Con l'introduzione della tecnica del C-banding (Arrighi & Hsu, 1971) si riuscì citologicamente a distinguere due tipi di eterocromatina, una costitutiva che resisteva all'idrolisi alcalina a caldo ed una facoltativa. Le successive analisi molecolari hanno messo in evidenza che l'eterocromatina costitutiva contiene prevalentemente sequenze altamente ripetute di DNA, ovvero brevi sequenze, uguali tra loro, ripetute da alcune centinaia di migliaia a diversi milioni di volte. Tale DNA altamente ripetuto è noto anche come "DNA satellite" poiché dopo centrifugazione su gradiente di cloruro di cesio spesso si isola dalla frazione principale andando a costituire una banda "satellite". Questo DNA di solito non è trascritto, e anche nei casi in cui ciò avviene, il trascritto non è mai tradotto.

Il suo ruolo è estremamente controverso:

**Inerte** secondo i sostenitori dell'ipotesi del "junk DNA" e del "selfish DNA" (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980). Nel primo caso si ritiene che l'eterocromatina sia costituita da sequenze neutre di DNA, ottenute come sottoprodotto del metabolismo nucleare e quindi viene considerata come un inutile avanzo (junk). Nel secondo caso è ipotizzato che l'eterocromatina sia costituita prevalentemente da sequenze di origine virale, le quali una volta invaso il genoma, si autoamplificano e si lasciano trasportare

come elementi passivi. Questi due modelli che sono stati molto in voga fino agli anni novanta ora sono stati abbandonati dalla maggior parte dei ricercatori.

**Nei processi di speciazione** secondo Fry & Salser (1977) in quanto l'eterocromatina è ritenuta fondamentale per l'appaiamento degli omologhi in meiosi. La differente distribuzione e composizione di tale materiale genomico, che in genere si osserva tra le diverse specie, creerebbe tra queste una barriera riproduttiva a causa delle anomalie meiotiche che si andrebbero a determinare nell'eventuale ibrido. Altri autori (John & Miklos, 1979; Miklos et al., 1981) in base ad osservazioni sull'appaiamento dei cromosomi omologhi in pachitene asseriscono che il suo ruolo nei processi di speciazione sia neutro. Per Cavalier-Smith (1991), Morescalchi (1991), e King (1993) le variazioni di eterocromatina pur non creando barriere riproduttive conferirebbero alle specie vantaggi adattativi.

**Funzionale** infatti è implicata nel riconoscimento ed appaiamento dei cromosomi omologhi; nella corretta segregazione dei cromosomi in mitosi ed in meiosi; nella regolazione dei geni in essa contenuti; nell'inibizione del crossing-over (John, 1988; McKee et al., 2000). Crescenti evidenze suggeriscono il coinvolgimento dell'eterocromatina nei processi che regolano l'organizzazione tridimensionale del nucleo (Boulikas, 1992). Inoltre si stanno identificando all'interno di questo DNA specifiche proteine che, sono evolutivamente conservate, quali la HP-1 che si lega alle famiglie di DNA altamente ripetuto in *Drosophila* e in *Homo* (Saunders et al., 1993); RAP-1 che lega le sequenze telomeriche dei cromosomi dei vertebrati (Marcand et al., 1997); CENP-B che lega specifici motivi di sequenze, conservati in differenti famiglie di DNA satellite di vertebrati e importanti per la funzionalità centromerica (Willard, 1990). Secondo Grewal & Moazed (2003) l'impacchettamento del DNA nell'eterocromatina esercita un controllo epigenetico su importanti processi biologici.

**In Filogenesi e Sistematica** di particolare interesse si è rivelato l'uso di famiglie di DNA altamente ripetuto come sonde per l'analisi delle distanze filetiche fra le specie (Miklos & Gill., 1981; Singer, 1982; Miklos, 1985). Secondo questi autori le sequenze del DNA satellite, originatesi in base a processi di duplicazione, mostrano un grado di variabilità direttamente proporzionale alla divergenza tra specie affini. Inoltre confronti a livello intraspecifico ottenuti mediante la comparazione di sequenze nucleotipiche di cloni appartenenti ad una stessa famiglia di DNA ripetitivo ma proveniente da differenti popolazioni di una stessa specie hanno consentito di poter comprendere meglio il ruolo di questi DNA satelliti. Feliciello e coautori (2005) dopo esaustivi studi sui DNA satelliti nelle rane brune ipotizzano che l'evoluzione di questi DNA avvenga secondo un modello saltatorio, infatti le mutazioni delle proteine che sono legate ai satelliti potrebbero essere rapidamente eliminate dalle specie poiché queste potrebbero essere la causa di una riduzione della fitness. Tuttavia secondo gli stessi autori sotto condizioni particolari, quali stress ambientali, le stesse mutazioni potrebbero portare dei vantaggi ed essere fissati. In questo modo queste mutazioni favorirebbero l'isolamento riproduttivo ed accelererebbero la formazione di nuove specie. Essi, inoltre, dimostrano che la deriva molecolare che è alla base dell'evoluzione concertata dei DNA satelliti potrebbe

essere principalmente determinata da processi direzionali basati sul rolling circle replication piuttosto che attraverso la conversione genica e/o crossing-over ineguale.



## 2. SCOPO

Come si evince dall'introduzione l'Africa rappresenta uno dei principali centri di radiazione evolutiva dei geconidi, con 27 generi (90 totali) e oltre 160 specie delle circa 800 totali (Loveridge 1947, Welch 1982, Joger 1983, 1984) e mentre le relazioni nei Gekkonidae a livello di sottofamiglie sono ben chiare (King 1988) e tutti i geconidi africani, ad eccezione dei generi *Hemitheconyx* e *Holodactylus* appartenenti alla sottofamiglia Eublepharinae, sono attualmente classificati come membri della sottofamiglia Gekkoninae (Underwood 1954; Kluge 1967, 1987) rimangono, invece, oscure le relazioni intergeneriche dei Gekkoninae:

Haacke (1976) distinse un *Pachydactylus* group basandosi sull'iperfalangia del primo dito dell'arto anteriore e posteriore. Questo comprendeva i generi sud africani *Pachydactylus*, *Rhoptropus*, *Chondrodactylus*, *Colopus*, *Kaokogecko* e *Palmatogecko* e quelli nord africani *Geckonia* e *Tarantola*.

Russell (1972) li suddivise in gruppi morfologici basandosi sull'anatomia delle dita dell'arto posteriore e oltre al *Pachydactylus* group individuò anche un *Phelsuma* group con i generi *Phelsuma*, *Ligodactylus* e *Ailuronyx*; un *Homopholis* group composto da *Homopholis*, *Geckolepis* e *Paragehyra* con delle similarità anatomiche con il genere sud americano *Thecadactylus*; un *Phyllodactylus* group che include *Phyllodactylus*, *Uroplatus* e *Ptyodactylus*; un *Afroedura* group con *Afroedura* e il genere indiano *Calodactylodes*; uno *Stenodactylus* group con una ridotta falangia e la mancanza dei cuscinetti adesivi e con certe similarità con il genere *Teratoscincus*, asiatico; un *Hemidactylus* group che lo stesso autore nel 1976 considera un'unità evolutivamente separata derivata dal "genere" *Cyrtodactylus* con il quale è legato da un

a d d i z i o n a l e  
assemblaggio. Russel  
ipotizzò comunque che  
alcuni di questi gruppi  
potevano essere  
p r o b a b i l m e n t e  
polifiletici (Fig.1).

Genus	Digital structure (Russell, 1972)	Hyoid structure (Kluge, 1983)
<i>Afroedura</i>	<i>Afroedura</i> group	'Ptyodactylini'
<i>Afrogecko</i>	<i>Phyllodactylus</i> group	'Ptyodactylini'
<i>Bunopus</i>	Naked-Toed II	Gekkonini
<i>Calodactylodes</i>	<i>Afroedura</i> group	Gekkonini
<i>Christinus</i>	<i>Phyllodactylus</i> group	'Ptyodactylini'
<i>Cnemaspis</i>	Naked-Toed II	Gekkonini
<i>Cyrtopodion</i>	Naked-Toed I	Gekkonini
<i>Gehyra</i>	<i>Gekko</i> group	Gekkonini
<i>Gekko</i>	<i>Gekko</i> group	Gekkonini
<i>Goggia</i>	<i>Phyllodactylus</i> group	'Ptyodactylini'
<i>Hemidactylus</i>	<i>Hemidactylus</i> group	Gekkonini
<i>Hemiphyllodactylus</i>	<i>Gekko</i> group	Gekkonini
<i>Lepidodactylus</i>	<i>Gekko</i> group	Gekkonini
<i>Lygodactylus</i>	<i>Phelsuma</i> group	Gekkonini
<i>Nactus</i>	Naked-Toed I	'Ptyodactylini'
<i>Narudasia</i>	Naked-Toed II	'Ptyodactylini'
<i>Pachydactylus</i>	<i>Pachydactylus</i> group	'Ptyodactylini'
<i>Phelsuma</i>	<i>Phelsuma</i> group	'Ptyodactylini'
<i>Phyllodactylus</i>	<i>Phyllodactylus</i> group	'Ptyodactylini'
<i>Ptenopus</i>	Naked-Toed II	'Ptyodactylini'
<i>Rhoptropus</i>	<i>Pachydactylus</i> group	'Ptyodactylini'
<i>Stenodactylus</i>	<i>Stenodactylus</i> group	Gekkonini
<i>Tarentola</i>	<i>Pachydactylus</i> group	'Ptyodactylini'
<i>Teratoscincus</i>	<i>Stenodactylus</i> group	'Ptyodactylini'

Fig. 1 da Han et al. (2004)

Kluge (1983)  
approcciò alla  
sistemica della  
famiglia dei

Gekkonidae in modo completamente differente suddividendola in due tribù, Gekkonini e Ptyodactylini. I Gekkonini furono considerati monofiletici sulla base di una singola sinapomorfia, la perdita del secondo arco ceratobranchiale (Fig.1).

Joger (1985) ritenendo che l'approccio morfologico era estremamente debole poiché soggetto ad evoluzione parallela, condusse uno studio su base sierologica per estrapolare delle distanze molecolari tra le specie e i generi usando le albumine. Quest'indagine lo portò a concludere che i Gekkoninae africani rappresentano un gruppo monofiletico, con la sola eccezione del genere *Hemidactylus* che fa parte di un'altra radiazione evolutiva, e ad indicare come sister group il *Gecko* group (asiatico). Inoltre suddivise i Gekkoninae africani in due cladi: una radiazione nordafricana e una sudafricana. La prima, composta da generi con diversi tipi di adattamento, poteva essere suddivisa a sua volta in un sottogruppo occidentale composto dal genere *Tarentola* e *Geckonia* e un sottogruppo orientale, derivante dall'Arabia, con dei generi altamente specializzati *Stenodactylus* e *Ptyodactylus*. La

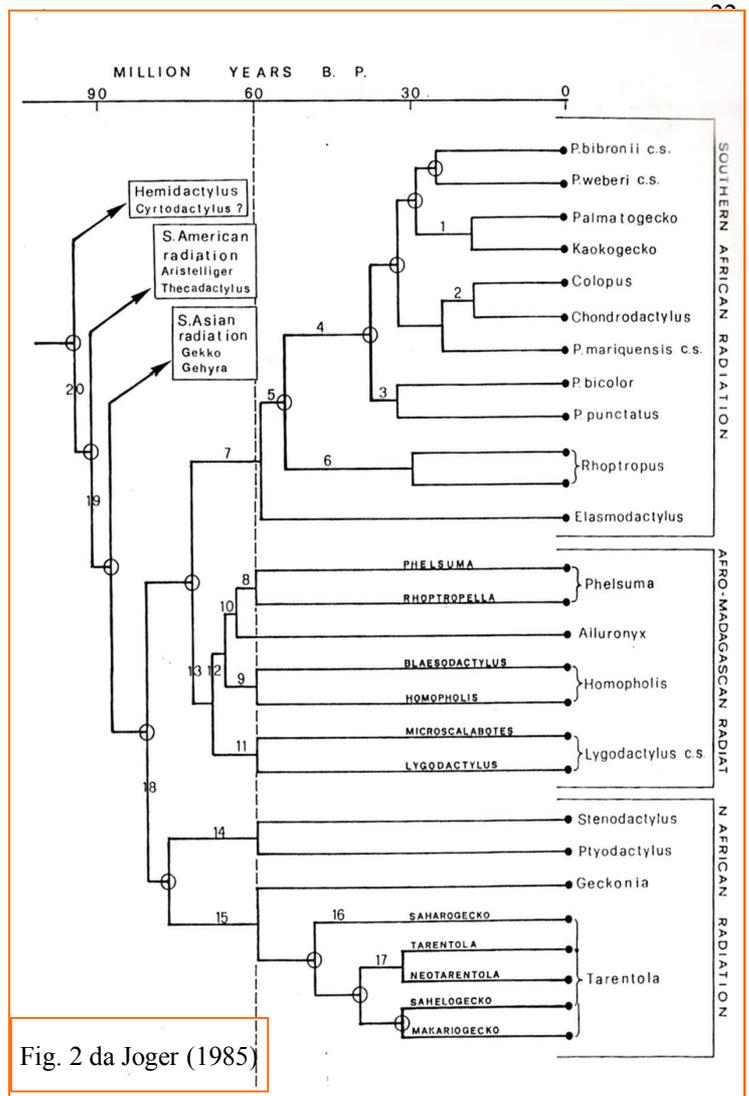


Fig. 2 da Joger (1985)

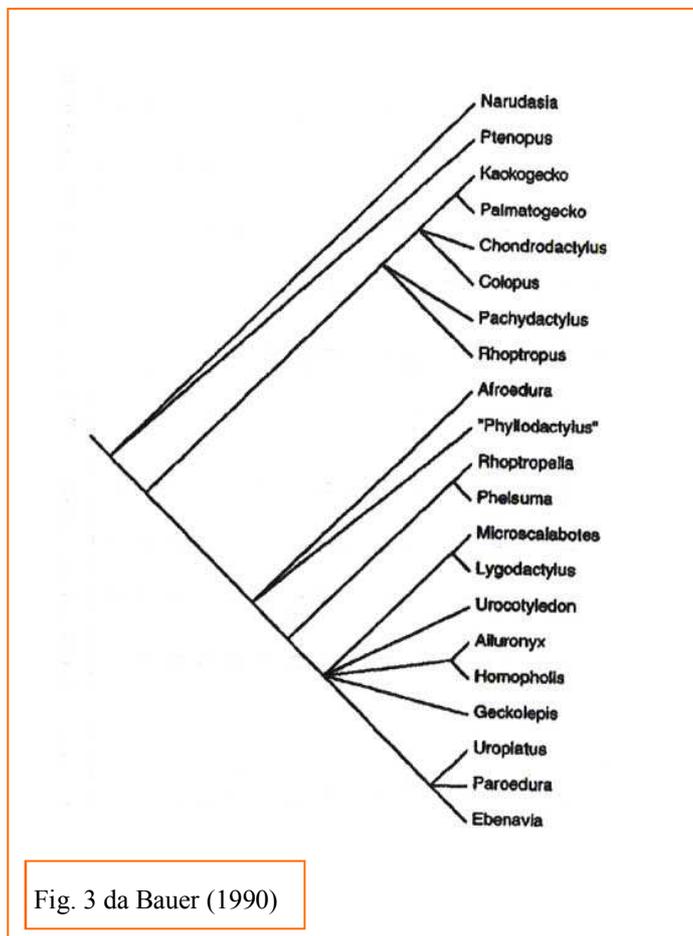


Fig. 3 da Bauer (1990)

radiazione sudafricana, invece, aveva successivamente dato origine, da una parte alla recente radiazione dei gekkonidi del Madagascar, nella parte terminale del Cretacico, prima della separazione dell'isola continente dal continente africano, portando ai generi *Ligodactylus*, *Homopholis* e *Phelsuma* (più *Ailuronyx*) e dall'altra al *Pachydactylus* group in Sud Africa. Qui il monotipico genere *Elasmodactylus*, precedentemente classificato come *Pachydactylus tuberculatus*, è stato considerato come un relitto, del Paleogene, dell' antenore del *Pachydactylus* group prima della divergenza da *Rhoptropus*. I moderni *Pachydactylus* vengono, infine, suddivisi in parecchie linee alcune delle quali, ipotizza l'autore, hanno dato origine ai generi monotipici *Colopus*, *Chondrodactylus*, *Kaokogecko* e

*Palmatogecko*. Comunque lo stesso Joger afferma che le relazioni tra parecchi rappresentanti africani della famiglia Gekkonidae rimangono non risolte, non avendo esaminato molti generi sia del Madagascar come: 1) *Paroedura* (molto probabilmente vicino a *Phyllodactylus*), 2) *Uroplatus* che Russel (1972) considera affine a *Ptyodactylus*, 3) *Microscalabotes* e *Millotisaurus* affini al genere *Lygodactylus*, 4) *Parageyra*, *Geckolepis*, *Blasiodactylus* (prima *Homopholis*), *Ebenavia* e *Matuatoa*; sia del Sud Africa come: a) *Afroedura*, probabile relitto del Gondwana se filogeneticamente vicino al genere indiano *Calodactylodes* (Russel 1972), b) i generi *Cnemaspis*, *Narudasia* e *Ptenopus*; sia del Nord Africa come *Tropicolotes*, *Saurodactylus*, *Quedenfeldtia* e *Pisturus* (area mediorientale) (Fig. 2).

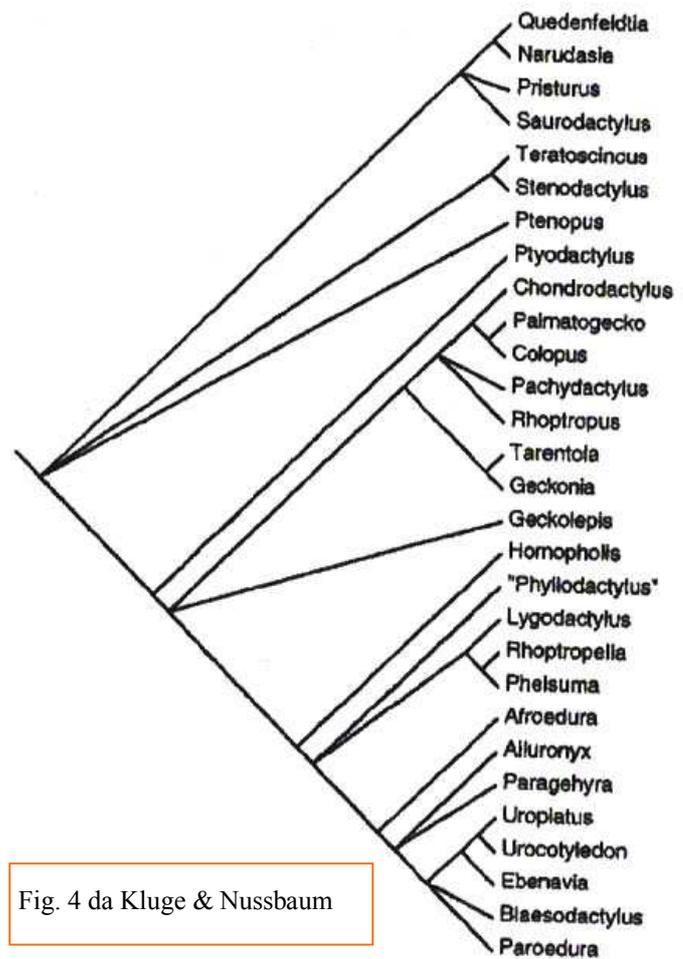


Fig. 4 da Kluge & Nussbaum

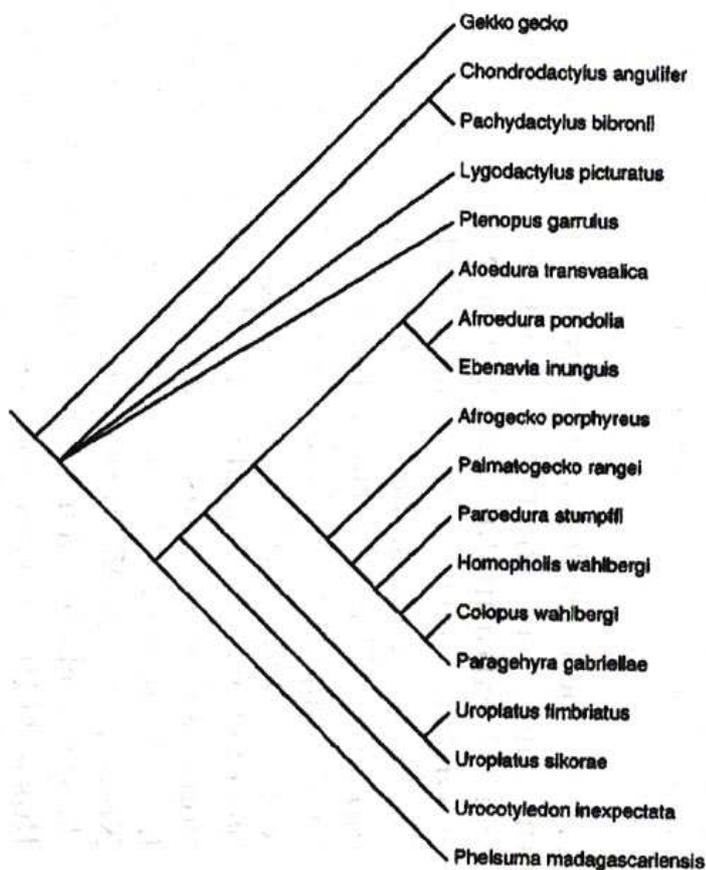


Fig. 5 da Russell et al.

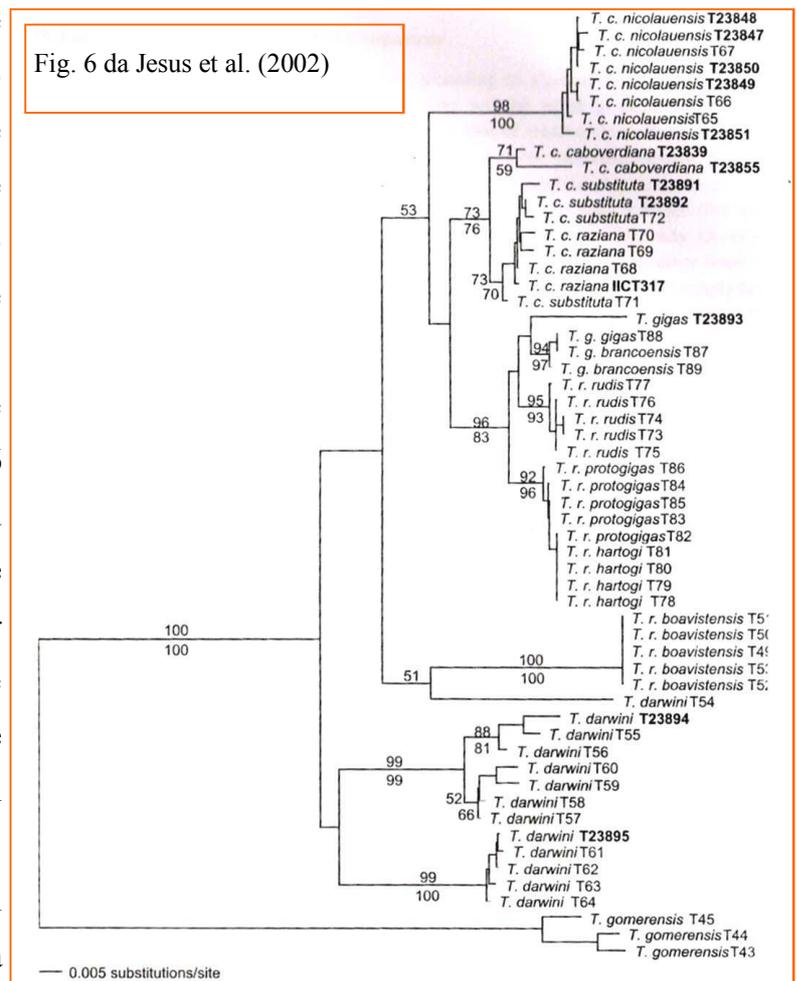
Bauer (1990) in un lavoro, definito dallo stesso autore preliminare, analizza un set di caratteri morfologici sviluppando un'analisi cladistica sui geconidi sudafricani e delle isole dell'Oceano Indiano evidenziando che esiste un raggruppamento monofiletico afro-malagascio. L'autore ipotizza che il *Pachydactylus* group sia un unità monofiletica, *Phelsuma* e *Rhotropella* si raggruppano insieme, *Lygodactylus* con *Microscalabotes* e *Millotisaurus* e insieme con *Ailuronyx* e *Homopholis* e con *Geckolepis* e infine ritrova un'affinità tra *Paroedura*, *Ebenavia* e *Uroplatus* (Fig. 3).

Kluge & Nussbaum (1995) in un analisi comparativa tra i caratteri utilizzati da Joger

(1985) e Bauer (1990) includendo anche altri taxa suggeriscono che *Tarentola* e *Geckonia* sono filogeneticamente affini a *Pachydactylus* e insieme formano un sister group di *Geckolepis*. Inoltre separano le specie del genere *Homopholis* del Madagascar da quelle africane e istituiscono il genere *Blaesodactylus*, pongono nello stesso raggruppamento i generi *Phelsuma* e *Lygodactylus* da una parte e dall'altra *Uroplatus*, *Ebenavia*, *Blaesodactylus* e *Paroedura* (Fig.4).

Infine Russell e coautori (2000) in uno studio comparato delle variazioni strutturali della morfologia della laringe e tracheali su 17 specie appartenenti alla regione geografica Afro-Madagascar e utilizzando come out-group *Gekko gecko* suggeriscono che in base ai caratteri da loro studiati le relazioni sono molto complesse. Infatti secondo la loro ipotesi il *Pachidactylus*-group è polifiletico e che non vi è nessun clade evidente tra i generi del Madagascar (Fig. 5).

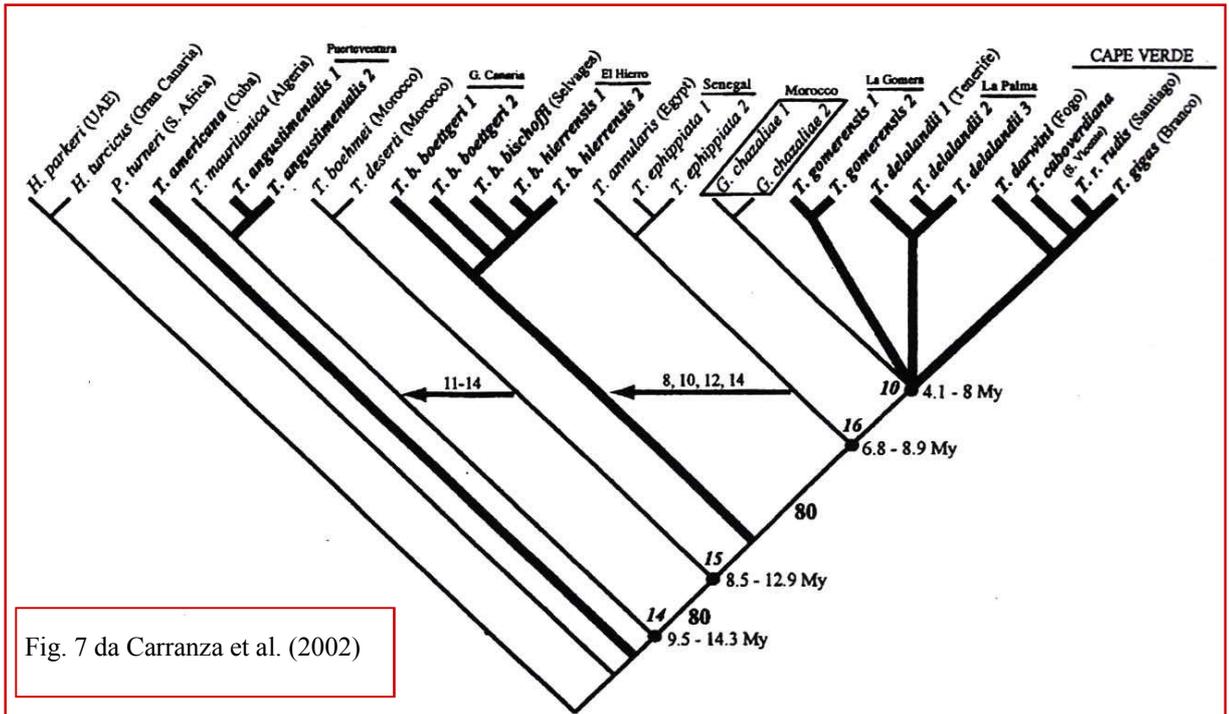
Negli ultimi anni i geconidi africani sono stati oggetto di molti studi che hanno riguardato principalmente la descrizione di nuove specie o di revisioni di generi. Queste indagini sono prevalentemente basati o sullo studio di alcune frazioni del DNA mitocondriale (Lamb e Bauer, 2001 sul genere sudafricano *Rhoptropus*; Jesus et al, 2002 (Fig. 6) sulle specie di *Tarentola* delle Isole Capoverde; Carranza et al, 2002 sul genere *Tarentola* e *Geckonia*) o sui cromosomi ( Aprea et 1996 sul genere *Phelsuma*; Odierna et al, 1994 su *Tarentola mauritanica*). E' estremamente interessante notare che il lavoro di Joger (1985) basato sullo studio delle albumine suggerisce che *Tarentola* è strettamente correlata con gli altri generi nordafricani quali *Geckonia*, *Stenodactylus* e *Ptyodactylus*. Carranza et al. (2002) da un analisi di due geni mitocondriali (citocromo b e 12S rRNA) e da uno nucleare (c-mos) ipotizzano che il genere



*Tarentola* abbia colonizzato le isole atlantiche in cinque invasioni distinte, una delle Indie Occidentali, tre delle isole Canarie una delle quali a portato a invadere l'arcipelago di Capo Verde e che *Geckonia* può essere inclusa nel genere *Tarentola* (Fig. 7). Nello stesso lavoro gli autori riportano che Austin et al. (dati non pubblicati) ritrovano con gli stessi marcatori che i generi *Stenodactylus* e *Ptyodactylus* non appartengono alla stessa radiazione evolutiva di *Tarentola* in disaccordo completo con Joger (1985). Odierna et al. (1994) ancora studiando tre sottospecie di *Tarentola mauritanica* ritrovano che la sottospecie

*T.mauritanica fascicularis* (Egitto) differisce notevolmente per la diversa localizzazione dei cistroni ribosomiali dalla sottospecie nominale (popolazioni italiane e marocchine) e da *T.mauritanica juliae* (Marocco). Tali differenze suggeriscono agli autori di proporre di elevare questo taxon a rango specifico.

Quindi  
allo scopo di  
tentare di  
chiarire i  
rapporti che  
intercorrono  
tra i diversi  
taxa che  
compongono  
la fauna  
geconidea  
dell'Africa  
mi sono  
proposto in



questo progetto di ricerca di eseguire uno studio comparato tra fondamentalmente due approcci: quello citotassonomico e quello molecolare in modo da poter avere una visione abbastanza ampia su questo interessante gruppo di squamati.



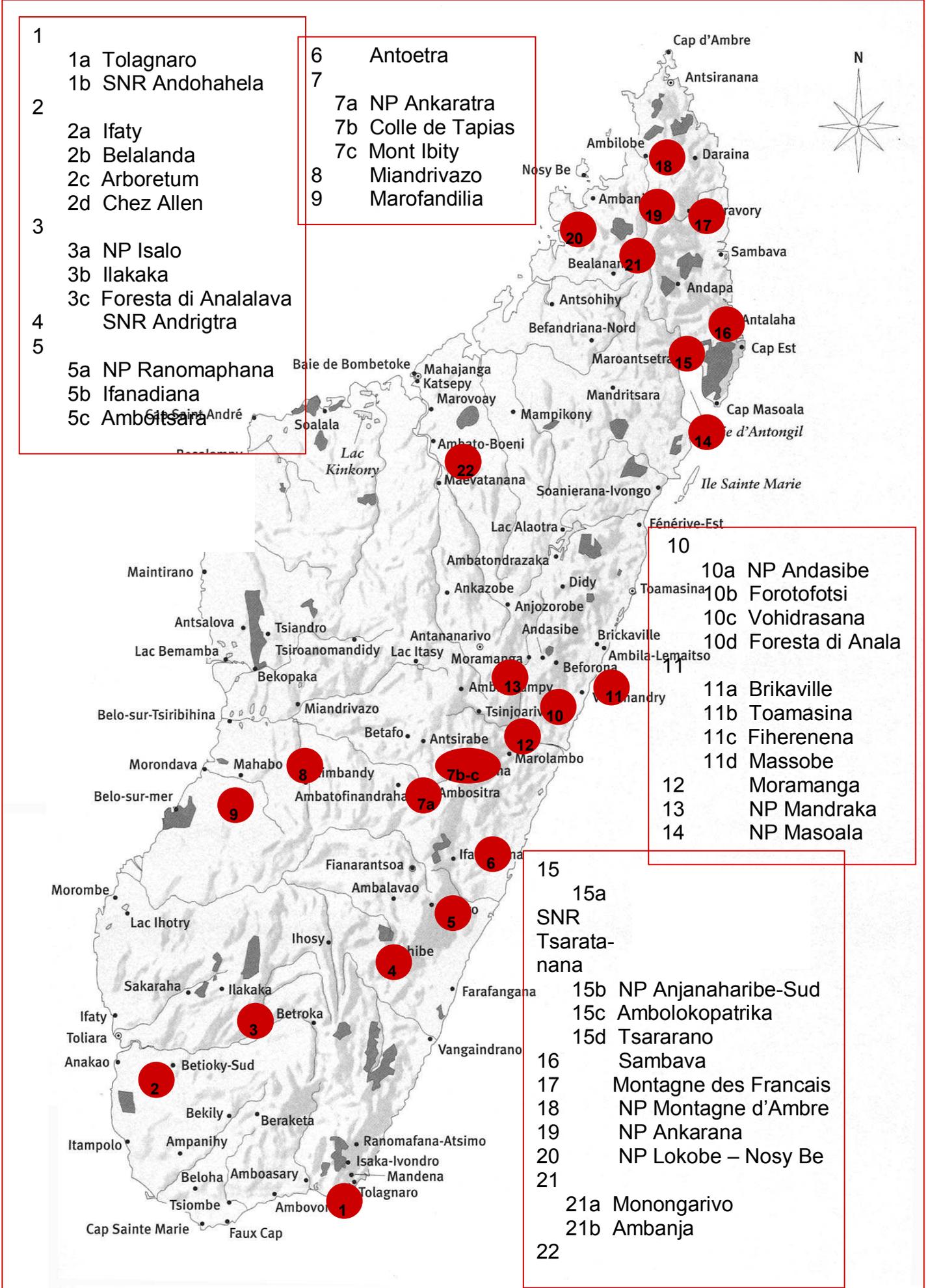


Fig. 8. Cartina del Madagascar con legenda delle località oggetto di studio.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 SPECIE UTILIZZATE E LORO PROVENIENZA

Nel corso dei tre anni del Dottorato sono state compiute tre spedizioni zoologiche in Madagascar, rispettivamente nel 2003 (Gennaio-Marzo) in collaborazione col dott. Franco Andreone (Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino), prof. Miguel Vences (Museo Zoologico di Amsterdam-Olanda) e dott. Frank Glaw (Museo Zoologico di Monaco-Germania); nel 2004 (Gennaio- Febbraio) col dott. Franco Andreone e nel 2005 (Gennaio- Febbraio) ed una spedizione in Marocco, West Sahara nel 2004 (Ottobre) in collaborazione col prof. Mohammed Fadli (Università di Kenitra-Marocco). Durante queste spedizioni sono stati visitati numerosi siti (Fig. 8, 9, 10 e 11). Gli animali raccolti durante queste spedizioni furono direttamente sacrificati in campo e da questi furono prelevati i tessuti per i cromosomi e il DNA. Questo materiale fu successivamente processato in laboratorio a Napoli. Una parte del materiale di studio era stata raccolta precedentemente all'inizio di questo progetto di ricerca in Marocco nell'Ottobre 2001 in collaborazione con la dott. Paola Magni (Università di Torino). Alcuni esemplari furono gentilmente donati



- |   |   |
|---|---|
| 1 | 50 Km sud Laayoune                                |
| 2 | Tarfaya   |
| 3 | Sud di Zagora a 3 Km dal confine Algeria Camp 1-3 |
| 4 | Costa Sud Agadir                                  |
| 5 | Strada Essauira-Marrakech                         |

Fig. 9. Cartina del Nord Africa con legenda delle località oggetto di studio.

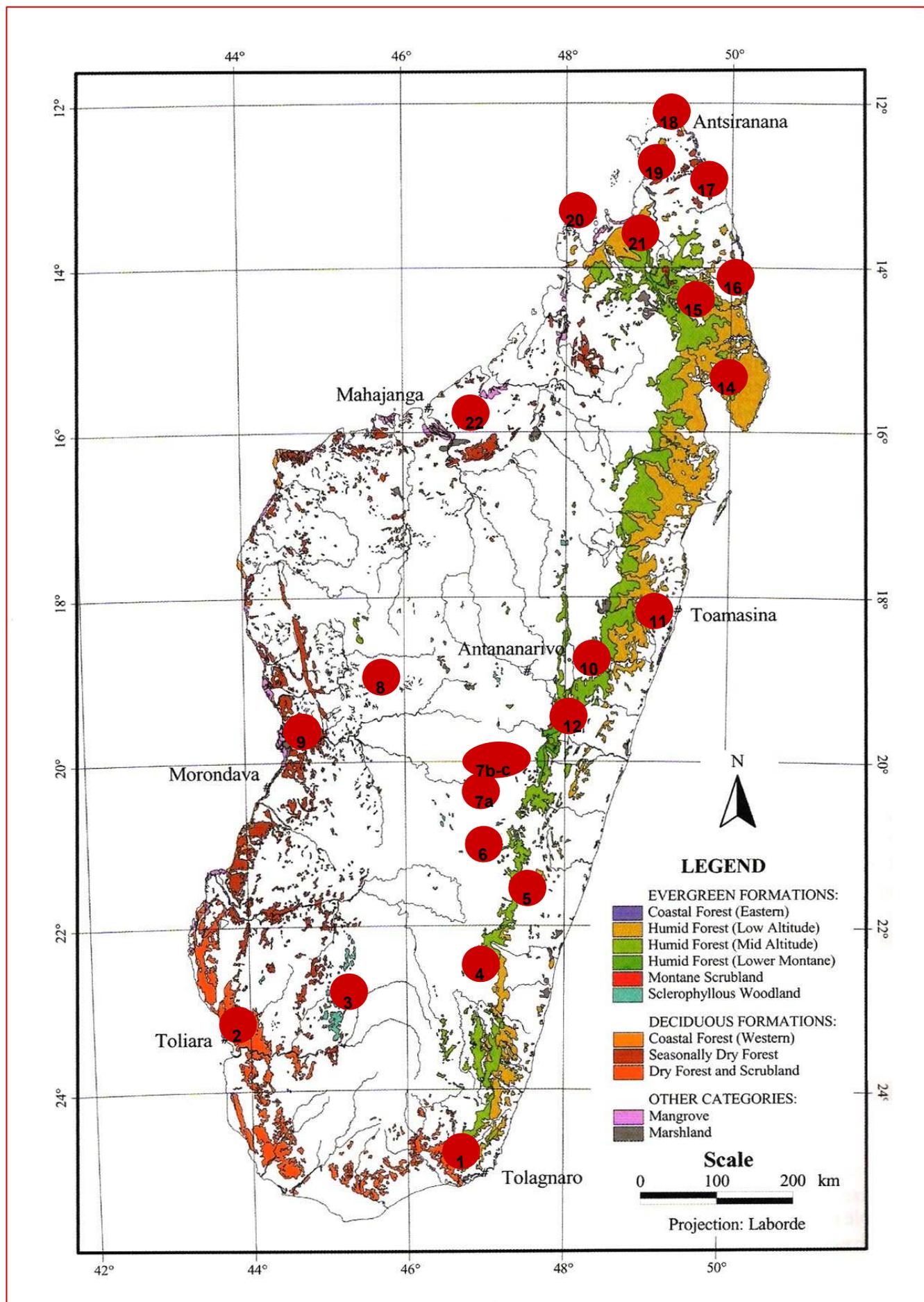


Fig. 10. Carta della distribuzione della vegetazione del Madagascar. I numeri nei cerchi rossi indicano le località oggetto di studio.

dal dott. Marco Zuffi (Museo Scienze naturali di Pisa) e dal dott. Amor Nabil (Università di Monastir-Tunisia) mentre altri furono, invece, acquistati presso rivenditori specializzati

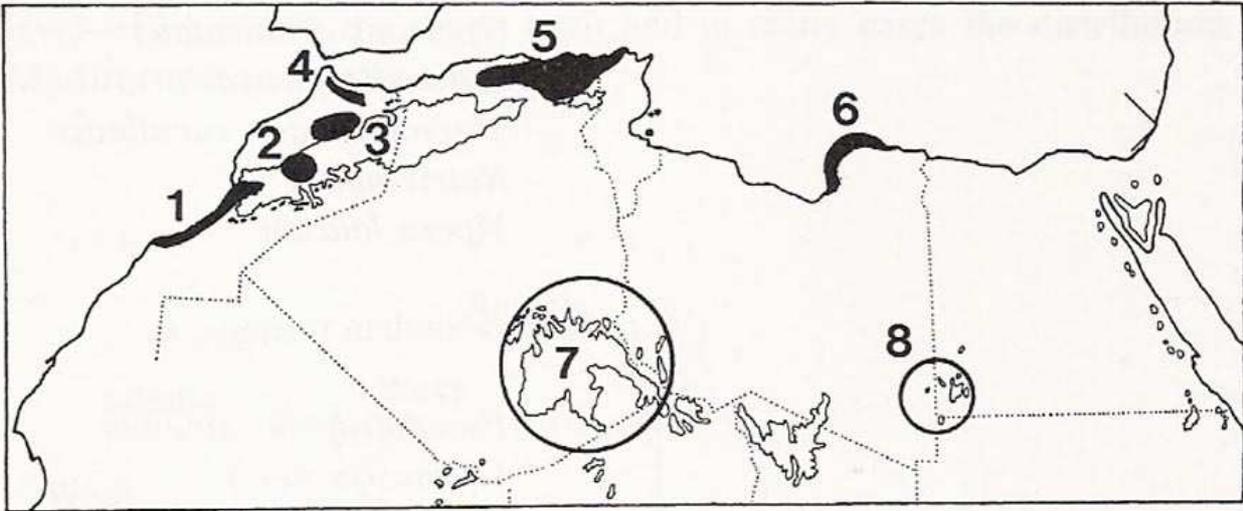


Fig. 3. Survey of the most important relatively moist refugial regions in NAF:

1. Sous Valley and adjacent Atlantic coast
2. Haut Atlas
3. Moyen Atlas
4. Rif
5. Tell and Aurès Mts.
6. Cyrenaica
7. Hoggar and Tassili Mts, Ghat region
8. Dj. Aueinat and Kufra oases.

Fig. 11. Cartina del Nord Africa dove vengono indicate le aree di maggiore biodiversità.

### Elenco degli esemplari studiati

#### **genus *Blaesodactylus*:**

- *Blaesodactylus antongilensis*
- *Blaesodactylus boivini*
- *Blaesodactylus sakalava* ♀

#### **genus *Ebenavia*:**

- *Ebenavia inunguis*

**genus *Geckolepis*:**

- *Geckolepis petiti*
- *Geckolepis polylepis*
- *Geckolepis typica*

**genus *Lygodactylus*:**

- *Lygodactylus blanci*
- *Lygodactylus decaryi*
- *Lygodactylus expectatus*
- *Lygodactylus guibei*
- *Lygodactylus heterurus*
- *Lygodactylus inexpectatus*
- *Lygodactylus intermedius*
- *Lygodactylus madagascariensis*
- *Lygodactylus miops*
- *Lygodactylus mirabilis*
- *Lygodactylus montanus*
- *Lygodactylus ornatus*
- *Lygodactylus pauliani*
- *Lygodactylus picturatus*
- *Lygodactylus pictus*
- *Lygodactylus rarus*
- *Lygodactylus tolampyae*
- *Lygodactylus tuberosus*
- *Lygodactylus verticillatus*

**genus *Matoatoa*:**

- *Matoatoa brevipes*

**genus *Microscalabotes*:**

- *Microscalabotes bivittis*

**genus *Pachydactylus*:**

- *Pachydactylus bibronii*
- *Pachydactylus punctatus*
- *Pachydactylus tuberculosus*

**genus *Paragehyra*:**

- *Paragehyra gabriellae*
- *Paragehyra petiti*

**genus *Paroedura*:**

- *Paroedura androyensis*
- *Paroedura bastardi*
- *Paroedura gracilis*
- *Paroedura karstophila*
- *Paroedura lohatsara*
- *Paroedura masobe*
- *Paroedura oviceps*
- *Paroedura picta*
- *Paroedura stumpffi*
- *Paroedura vazimba*

**genus *Phelsuma***

- *Phelsuma abbotti*
- *Phelsuma barbouri*
- *Phelsuma breviceps*
- *Phelsuma dubia*
- *Phelsuma flavigularis*

- *Phelsuma guttata*
- *Phelsuma laticauda*
- *Phelsuma lineata*
- *Phelsuma lineata lineata*
- *Phelsuma lineata bifasciata*
- *Phelsuma lineata bombetokensis*
- *Phelsuma lineata dorsivittata*
- *Phelsuma madagascariensis*
- *Phelsuma madagascariensis madagascariensis*
- *Phelsuma madagascariensis grandis*
- *Phelsuma madagascariensis kochi*
- *Phelsuma madagascariensis boehmei*
- *Phelsuma malamakibo*
- *Phelsuma modesta*
- *Phelsuma modesta modesta*
- *Phelsuma modesta leiogaster*
- *Phelsuma modesta isakae*
- *Phelsuma mutabilis*
- *Phelsuma pronki*
- *Phelsuma pusilla*
- *Phelsuma quadriocellata*
- *Phelsuma quadriocellata quadriocellata*
- *Phelsuma quadriocellata bimaculata*
- *Phelsuma quadriocellata lepida*
- *Phelsuma quadriocellata parva*
- *Phelsuma serraticauda*
- *Phelsuma standingi*

**genus *Ptyodactylus*:**

- *Ptyodactylus guttatus*
- *Ptyodactylus hasselquistii*

**genus *Saurodactylus*:**

- *Saurodactylus fasciatus*

**genus *Stenodactylus*:**

- *Stenodactylus petrii*
- *Stenodactylus sthenodactylus*

**genus *Tarentola*:**

- *Tarentola annularis*
- *Tarentola boehmei*
- *Tarentola caboverdianus*
- *Tarentola chazaliae*
- *Tarentola deserti*
- *Tarentola gigas*
- *Tarentola mauritanica*
- *Tarentola mauritanica mauritanica*
- *Tarentola mauritanica fascicularis*
- *Tarentola mauritanica juliae*

**genus *Tropicolotes*:**

- *Tropicolotes steudneri*
- *Tropicolotes tripolitanus*

**genus *Uroplatus*:**

- *Uroplatus alluaudi*
- *Uroplatus ebenau*
- *Uroplatus fimbriatus*

- *Uroplatus guentheri*
- *Uroplatus henkeli*
- *Uroplatus lineatus*
- *Uroplatus phantasticus*
- *Uroplatus sikorae*
- *Uroplatus picthicmanni*

### 3.2 ANALISI CITOLOGICHE: METODICHE IMPIEGATE

A tutti gli animali fu iniettato intraperitonealmente all'incirca una dose (0,1 ml/10 gr peso corporeo) di colchicina a 0,5 mg/ml. Dopo due ore gli animali furono anestetizzati attraverso un'iniezione di MS 222 e sacrificati. Da ogni esemplare fu prelevato il fegato, l'intestino, la milza, le gonadi e dove possibile (in funzione della taglia) il midollo osseo. I tessuti ad eccezione del fegato furono incubati per 30 minuti in una soluzione ipotonica composta da sodio citrato allo 0,5% e KCl 75 mM in parti uguali. Trascorsi i 30 minuti furono conservati in fissativo Carnoy (alcool metilico e acido acetico 3:1). I fegati invece furono conservati in alcool a 95%. In laboratorio a Napoli i cromosomi furono ottenuti mediante il metodo dello scraping+air drying su tutti i tessuti fissati in Carnoy mentre dai fegati fu estratto il DNA attraverso un' iniziale lavaggio in PBS e TE per rimuovere tutto l'alcool, omogeneizzazione del tessuto e successiva digestione con proteinase K a 55°C per circa 3-5 ore. Due estrazioni in fenolo seguite da due in fenolo-cloroformio-alcool isoamilico 25:24:1 e da una in cloroformio-alcool isoamilico 24:1 furono necessarie per ottenere dei DNA puliti.

Lo studio cromosomico fu condotto mediante colorazioni sia convenzionali, utilizzando soluzioni di Giemsa al 5% a pH 7, che di bandeggio:

**Ag-NOR banding** secondo il metodo di Howell e Black (1980);

**Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA)/Verde Metile** seguendo le indicazioni di Sahar e Latt (1980), ma riducendo il tempo di esposizione al colorante non fluorescente, il verde di metile, a pochi secondi;

**Bandeggio C** seguendo il metodo di Summer (1972), ma incubando i vetrini in idrossido di bario per 5 min a 45°C; inoltre i cromosomi furono colorati sequenzialmente con CMA<sub>3</sub> e DAPI e dopo osservazione al microscopio a fluorescenza con Giemsa al 5% a pH 7

**Digestioni in situ con l'endonucleasi Alu I**, condotte come da Mezzanotte et al. (1983), incubando i vetrini con 20 U di endonuclease; inoltre i cromosomi furono colorati sequenzialmente con CMA<sub>3</sub> e DAPI e

dopo osservazione al microscopio a fluorescenza con Giemsa al 5% a pH 7

### 3.3 ANALISI MOLECOLARI: METODICHE IMPIEGATE

#### 3.3a DNA mitocondriale e nucleare (ribosomiale e a singola copia)

Per tutti gli amplificati fu preparata una mix di PCR secondo il seguente protocollo:

5	µl di Buffer (10x)
1,5	µl di MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,5	µl di dNTP (mix 10 mM)
0,5	µl di Primers (mix For + Rev 50 µM)
0,3	µl di Taq Polymerase Invitrogen (5U/µl)
1	µl di DNA (100ng/µl)
41,3	µl di mQH <sub>2</sub> O

I Primers utilizzati furono i seguenti:

Amplificazione attraverso PCR di geni mitocondriali (12S + 16S, ND1, ND2, COI )

La regione dal 12S al 16S fu amplificata tramite PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') 12Sa AAAGTGGGATTAGATACCCCACTAT e 16s Rev TTTCATGTTTCCTTGCGGTAC; la regione del ND1 utilizzando la coppia di primers (5' a 3') 16Sa Rev ATGTTTTTGGTAAACAGGCG e H4641m GCTTGTGTTAGGAAATA(C+T)TT; la regione ND2 utilizzando la coppia di primers (5' a 3') L4160m CGATTCCGATATGACCA(G+A)CT e il H5937m GTGCCAATATCTTT(G+A)TG; la regione del COI utilizzando la coppia di primers (5' a 3') L5347m CTAATAAGCCTATACTT(C+T)TA e H7613m ATAGGTGATGTAGCGTC(C+T)T G. Per tutte queste regioni fu seguito il seguente programma:

1 ciclo a 92°C x 5 min

35 cicli a 92°C x 1 min, 50°C x 1 min, 72°C x 2 min

1 ciclo a 72°C x 7 min

### Amplificazione attraverso PCR delle regioni ribosomiali (ITS1 e ITS2, 5s)

La regione dello spaziatore interno trascritto (ITS 1) fu amplificata tramite PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') 18S 8F GTACACACCGCCCGT e 5,8S Rev GTTCTTCATCGACCCA (C+T)GAG seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 4 min

35 cicli a 94°C x 30 s, 50°C x 30 s, 72°C x 45s

1 ciclo a 72°C x 5 min

La regione dello spaziatore interno trascritto (ITS 2) fu amplificata tramite PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') 5,8S FOR CTC(A+G)TGGGTCGATGAAGA(A+C)C e 28S D11 TGAAATACCACTACTCTTATCGTT seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 4 min

35 cicli a 94°C x 30 s, 48°C x 30 s, 72°C x 45s

1 ciclo a 72°C x 5 min

Il 5S fu amplificata tramite PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') 5Sa TACGCCCCGATCTCGTCCGATC e 5Sb CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 4 min

35 cicli a 94°C x 1 min, 52°C x 45 s, 72°C x 1 min

1 ciclo a 72°C x 7 min

Amplificazione attraverso PCR di geni nucleari a singola copia (  $\alpha$ -enolase,  $\beta$ -cristallina, *c-mos*, rodopsina introne 3, apolipoprotein B esone 29, creatine kinase (CK) introne 6, fattore di allungamento 1 $\alpha$  introne 1,  $\beta$ -tubulina introne 1-3, fattore di istocompatibilità maggiore classe II introne 2, *c-myc* esone 2 e 3 e introne B,  $\beta$ -fibrinogeno introne 7)

Per l'introne del gene dell'  $\alpha$ -enolase fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3')  $\alpha$ -eno F TTCAAATCCCCCGATGATCC e  $\alpha$ -eno R CAGTCTACCTGGTCAAAGG seguendo

il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 4 min

35 cicli a 94°C x 30 s, 48°C x 30 s, 72°C x 30s

1 ciclo a 72°C x 5 min

Per la  $\beta$ -cristallina fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3')  $\beta$ -crist F CTGATCCGCAGACCTTTCTT e  $\beta$ -crist R TAGCCAACCTGGGCATCCGC seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 4 min

35 cicli a 94°C x 30 s, 50°C x 30 s, 72°C x 40s

1 ciclo a 72°C x 5 min

Per la regione rettile specifica del c-mos fu utilizzata una reazione di PCR (Saint et al., 1998) utilizzando la coppia di primers (5' a 3') G73 GCGGTAAAGCAGGTGAAGAAA e G74 TGAGCATCCAAAGTCTC CAAT seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 3 min, 52°C x 45 s, 72°C x 1min

34 cicli a 94°C x 45 s, 52°C x 45 s, 72°C x 1min

1 ciclo a 72°C x 6 min

Per l'introne 3 del gene della rodopsina fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') RHO1 F TACATGTTCGTGGTCCACTT e RHO1 R TGGTGGGTGAAGATGT AGAA seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 4 min

35 cicli a 94°C x 30 s, 52°C x 30 s, 72°C x 30s

1 ciclo a 72°C x 5 min

Per la porzione dell'esone 29 dell'apolipoprotein B fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') APObF GGCTGGACAGTGAAATATTATGAAC e APObR

AATCAGAGAGTTGGTCTGAAAAAT seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 4 min

35 cicli a 94°C x 30 s, 50°C x 45 s, 72°C x 1 min

1 ciclo a 72°C x 7 min

Per l'introne 6 della creatine kinase (CK) fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') CK6 GACCACCTCCGAGTCATCTC(G+C+T)ATG e CK7 CAGGTGCTCGTTCCAC ATGAA seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 4 min

35 cicli a 94°C x 45 s, 50°C x 45 s, 72°C x 1 min

1 ciclo a 72°C x 10 min

Per gli introni del fattore di allungamento 1 $\alpha$  fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') EF0 TCCGGATGGCA(C+T)GGCGAGAA(C+T)ATG E EF2 ATGTGAGCAGTGTGGC AATCCAA seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 5min

35 cicli a 94°C x 1min, 50°C x 45 s, 72°C x 1 min

1 ciclo a 72°C x 10 min

Per gli introni 1-3 della  $\beta$ -tubulina fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3' Tub1 CAGGCTGGTCAATGTGG(C+T)AA(C+T)CA eTub 4 ATACGGTC(A+G+C+T)GGGTACTC (C+T)TC(A+G+C+T) seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 5min

35 cicli a 94°C x 1min, 48°C x 1 min, 72°C x 1 min

1 ciclo a 72°C x 10 min

Per l'introne 2 del fattore di istocompatibilità maggiore classe II fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') GD222 CCGGCAGCAGTACGTGCACTTCGACA GCGA E GD719 GATGGGCTGCTGCAGGCTGGTGTGCT seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 5min

35 cicli a 94°C x 40 s, 50°C x 30 s, 72°C x 1 min

1 ciclo a 72°C x 5 min

Per la regione del gene c-myc corrispondente all'esone 2 e 3 e all'introne B fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando due coppie di primers (5' a 3') C-MYC F26 GACGACTCCACCCCATGCAGGAGC e C-MYC R20 GGGGACTTGAGCACTTTCTG; C-MYC F03 AGAAGAAGAACAAGAGGAAG e C-MYC R01 CCAAAGTATCAATTATGAGGC A seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 95°C x 3min

35 cicli a 95°C x 45 s, 48° o 50°C x 45 s, 72°C x 1 min

1 ciclo a 72°C x 7 min

Per l'introne 7 del  $\beta$ -fibrinogeno fu utilizzata una reazione di PCR utilizzando la coppia di primers (5' a 3') B17U GGAGAAAACAGGACAATGACAATTCAC e B17L TCCCCAGTAGTATCTGCCATTAGGG TT seguendo il seguente programma:

1 ciclo a 94°C x 5min

35 cicli a 94°C x 40 s, 48°C x 30 s, 72°C x 1 min

1 ciclo a 72°C x 7 min

I campioni dopo la PCR, per verificare l'amplificazione specifica, furono colorati con blu di bromofenolo e corsi su un gel di agarosio all'1% applicando un potenziale di 80 Volt. L'aggiunta di Bromuro di Etidio durante la preparazione del gel di agarosio ha consentito la visualizzazione delle bande mediante transilluminatore UV. Nei casi che i prodotti di PCR diedero bande multiple queste furono isolate e purificate (utilizzando le colonnine NucleoSpin Extract della Macherey-Nagel) e successivamente riamplicate separatamente.

### 3.3a DNA altamente ripetuto

## Analisi del DNA con enzimi di restrizione

Il DNA gnomico totale di *Tarentola mauritanica fascicularis* è stato sottoposto a digestione con una serie di enzimi di restrizione (vedi tabella) che tagliano la doppia elica di DNA in sequenze specifiche di 4 o 6 coppie di basi diverse per ciascun enzima, permettendo così di frammentare il genoma. Quindi 5 µg di DNA gnomico ad alto peso molecolare furono digeriti con 2U/µg dei vari enzimi nel loro tampone specifico a 37° C overnight. Per l'enzima Taq I la digestione fu condotta a 60°C. I risultati della digestione furono corsi su un gel di agarosio all' 1,8% in TAE 1x a voltaggio costante di 45V. Infine il gel fu osservato e fotografato su transilluminatore a U.V.

Acc I	Alu I	Apa I	Asp 718	Ava I
BamH I	Bgl II	Cfo I	Cla I	Dde I
Dra I	EcoR I	EcoR V	Fok I	Hae III
Hind III	Hinf I	Hpa I	Hpa II	Kpn I
Msp I	Nae I	Nde I	Not I	Pst I
Pvu I	Rsa I	Sac I	Sau3A I	Sca I
Sma I	Stu I	Taq I	Tru9 I	Xba I
Xho I				

Tab. 1 elenco delle endonucleasi di restrizione saggate sul DNA di *T.mauritanica fascicularis*

### Autoamplificazione del DNA satellite mediante PCR (GSP-PCR)

Buntjer e Lenstra (1998) hanno pubblicato un protocollo che permette l'amplificazione di famiglie di DNA satellite a partire da piccolissime quantità di DNA gnomico mediante PCR. Questa tecnica che permette di amplificare mediante PCR non necessita di primers come avviene normalmente, ma utilizza lo stesso DNA genomico come template mentre come primers viene utilizzato lo stesso DNA genomico precedentemente denaturato. Infatti Stemmer (1994) ha dimostrato che una PCR in assenza di oligonucleotidi che agiscono come primers può essere guidata da larghi frammenti di DNA genomico. Infatti 1) per il tempo di annealing applicato, le sequenze a singola copia non si appaiono e quindi non si amplificano; 2) l'annealing preferenziale avviene tra sequenze ripetute sia in tandem che intersperse; 3) la sintesi del DNA da parte della Taq polymerase dopo annealing procede dall'estremità 3' libera; 4) l'estensione dell'estremità 3' appaiate con le unità ripetute intersperse crea nuove estremità 3' a valle delle unità ripetute. Il prodotto del primo ciclo di amplificazione è sicuramente un DNA a sequenza unica che, nel successivo ciclo di amplificazione, non appaierà e quindi non potrà funzionare da primer. In definitiva le sequenze ripetute intersperse non vengono amplificate; 5) L'estensione dell'estremità 3' delle unità ripetute in tandem porta alla sintesi di una nuova unità che, molto probabilmente, sarà copia di una delle successive

unità ripetute. (Fig. 12)

5  $\mu$ l di DNA genomico (100ng/ $\mu$ l) furono denaturati a 100° per 15 minuti e mescolati con un equivalente volume di DNA non denaturato. 2 $\mu$ l di questa mix furono poi utilizzati per una reazione di PCR di 30 cicli di 1 min a 92°C, 2 min a 50° C e 2 min a 72° C. Il prodotto fu ulteriormente amplificato 2 volte usando 5 $\mu$ l come template in una nuova reazione. Il prodotto finale fu poi digerito con ... a 37° C overnight e corso su gel di agarosio al 2%.

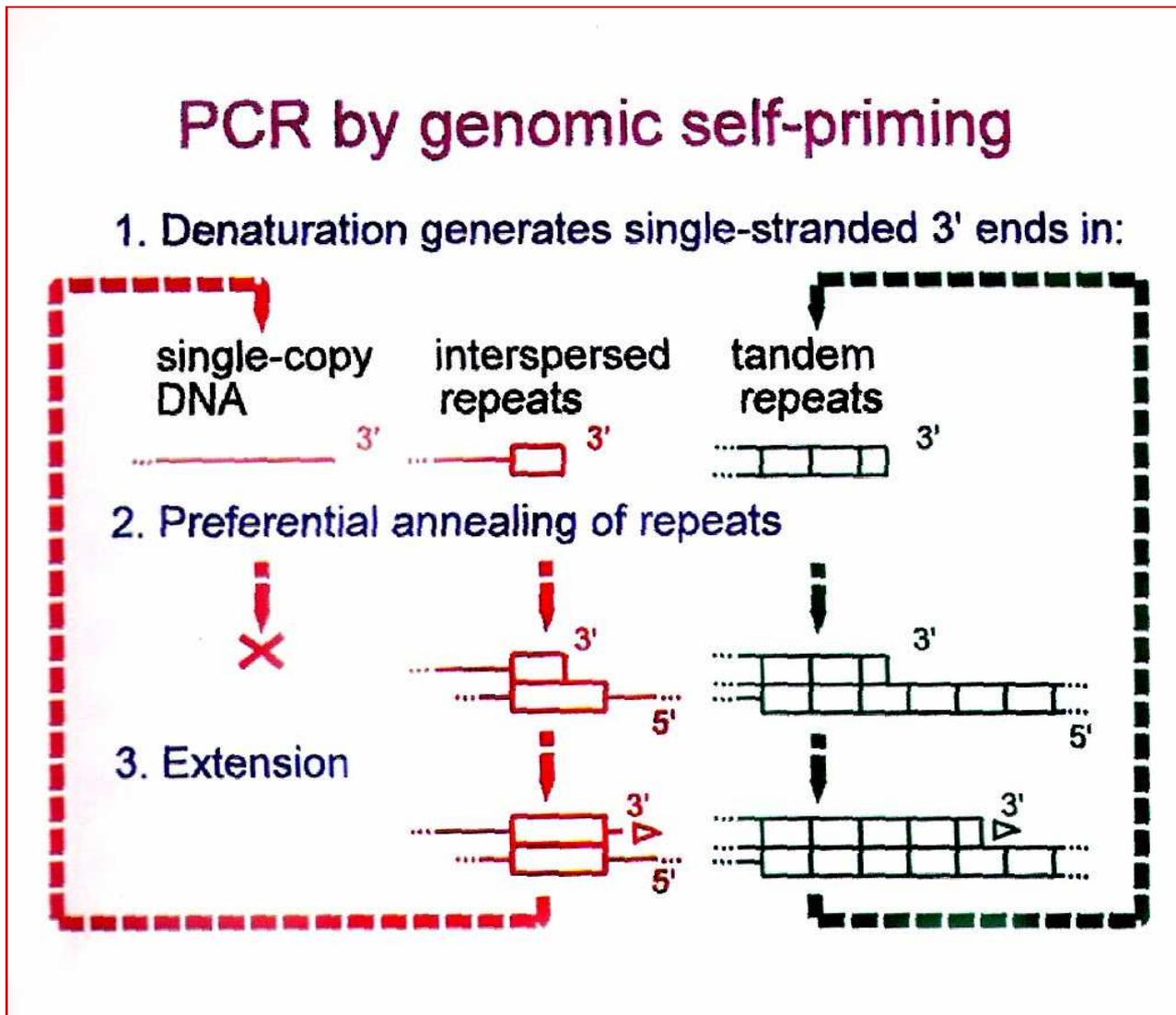


Fig. 12 schema dell'autoamplificazione del DNA satellite secondo Buntjer & Lenstra (1998)

Amplificazione del DNA genomico intero attraverso linker-adapter

E' di grande interesse una strategia per amplificare molecole di DNA la cui sequenza è sconosciuta e a cui non possono essere i protocolli standard di PCR. Il metodo generalmente utile per produrre frammenti di DNA amplificabili da DNA che può essere o frammenti di cromosomi o l'intero genoma di un organismo, dove i principali step delle procedure sono indicati in Fig. .... La strategia generale è di estrarre il DNA e di

digerirlo con uno o più enzimi di restrizione successivamente di ligarlo con gli appropriati clinker-adapter a entrambe le estremità. I linker forniscono il sito di aggancio per i primers (i clinker stessi) su ogni elica del DNA permettendo la susseguente amplificazione usando la PCR dei frammenti di restrizione modificati dai clinker. (Mendelman et al., 1989). La scelta degli enzimi di restrizione usati in questo metodo è dettata principalmente dalla lunghezza delle sequenze che desideriamo amplificare, in pratica è possibile amplificare tratti di sequenze lunghi anche parecchi kilobasi tuttavia i frammenti lunghi sono notevolmente impediti quando tra i frammenti ottenuti dal taglio delle endonucleasi sono presenti templati più brevi. E' meglio restringere l'indagine a una o più endonucleasi che producono frammenti di circa 500 coppie di basi. Quindi è preferibile scegliere enzimi di restrizione con 4 basi e che lasciano terminazioni sticky per una migliore legazione dei clinker-adapter (Tab. 2) I clinker-adapter sono stati specificatamente disegnati per ottenere

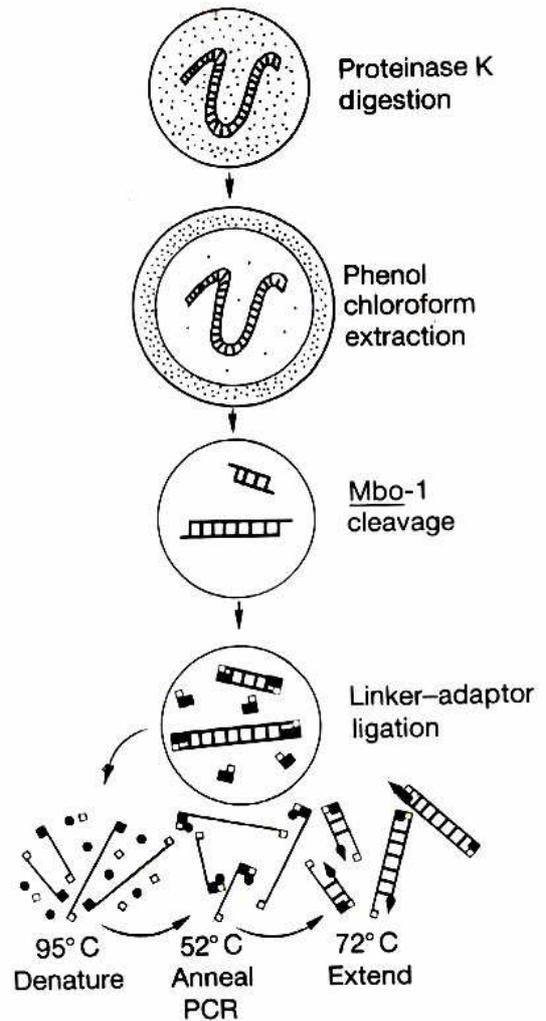


Fig. 13 schema del metodo di amplificazione del DNA da cromosomi dissezionati da Johnson (1991)

Restriction enzyme	Cleavage consensus	Linker-adapter	
<i>Mbol</i> <sup>a</sup>	5' - ↓ GATC - 3'	5' GATCTGTA CTGCACCAGCAAATCC3'	
<i>Sau3A</i> <sup>b</sup>	3' - CTAG ↑ - 5'	3' ACATGACGTGGTCGTTTAGG5'	
<i>HpaII</i> <sup>c</sup>	5' - C ↓ CG G - 3'	5' CGGTGTA CTGCACCAGCAAATCC3'	
<i>MspI</i> <sup>d</sup>	3' - G GC ↑ C - 5'		3' CACATGACGTGGTCGTTTAGG5'
<i>TaqI</i> <sup>e</sup>	5' - T ↓ CG A - 3'		
	3' - A GC ↑ T - 5'		

<sup>a</sup> No cleavage with N<sup>6</sup>-methyladenine but cleaves with 5-methylcytosine.

<sup>b</sup> No cleavage with 5-methylcytosine but cleaves with N<sup>6</sup>-methyladenine.

<sup>c</sup> No cleavage with 4-methylcytosine or with 3'C of 5-methylcytosine.

<sup>d</sup> Cleavage with 3'C but not with 5'C of 5-methylcytosine.

<sup>e</sup> Active at 65°C.

Tab. 2 elenco degli enzimi e relativi clinker-adapter da Johnson (1991)

un'amplificazione di sequenze di DNA alle quali sono legati senza che essi stessi possano diventare un substrato per l'amplificazione attraverso la PCR (Fig. 13 e 14).

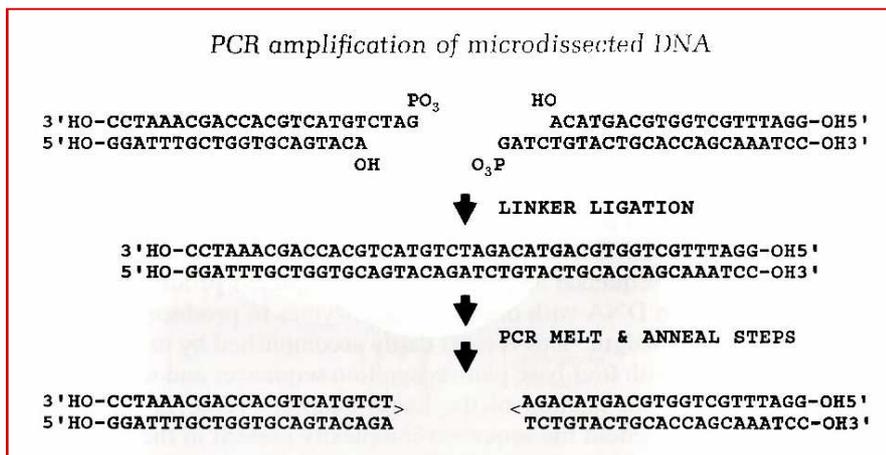


Fig. 14 schema dei principali prodotti di legame che avvengono durante il processo illustrato nella Fig. 13

200pg di DNA furono digeriti con 0,1 U dei vari enzimi mostrati nella tabella in 10 µl di reazione totale per un'ora.

Le digestioni furono poste su ghiaccio e a queste furono aggiunti 4 µl di T4 ligase mix, 50 ng dell'appropriato clinker-adapter, 5 U T4 DNA ligase e il tutto fu portato a 20 µl con aggiunta di H<sub>2</sub>O. Le reazioni furono incubate a 4° per due giorni.

Le legazioni furono raffreddate ponendole a -20°C e 1 µl di ogni legazione fu aggiunta a 99 µl di una mix di PCR :

- 10 µl tampone di PCR
- 2 µl dNTP (mix di tutti e quattro) 10mM
- 1 µl dei clinker-adapter (0,2 µg/ µl)
- 1 µl di Taq DNA polimerase (5 U)
- 86 µl di acqua distillata

La mix fu poi amplificata in 25 cicli di PCR con una denaturazione di 1 min a 94°C , annealing di 2 min a 52°C e un estensione per ciclo di 3 min a 72°C e infine un estensione finale a 72°C per 10 minuti.

10 µl dell'amplificato furono corsi su gel di agarosio all'1,2% e osservato al transilluminatore.

#### Clonaggio e trasformazione

I prodotti di PCR furono corsi su gel di agarosio all'1% per verificare la qualità degli amplificati e successivamente purificati su colonnina NucleoSpin Extract della Macherey-Nagel seguendo il protocollo

fornito dal produttore. Dopo la purificazione furono corsi su gel al 2% in modo da poterli quantizzare e furono clonati tramite kit (Quiagen PCR Clonino Kit) secondo le specifiche della casa.

Per la trasformazione sono stati utilizzati ceppi batterici DH 5 $\alpha$  dopo averle permeabilizzate con CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. A questo punto fu inoculato il plasmide e le cellule pilastrate su un terreno contenente Ampicillina, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-d-galattopiranoside) e IPTG (isopropil-tio-galattoside). Su questo terreno i batteri dovrebbero crescere formando colonie bianche

#### Purificazione e Sequenziamento degli amplificati

Tutti gli amplificati furono purificati su colonnina NucleoSpin Extract della Macherey-Nagel seguendo il protocollo fornito dal produttore. Dopo la purificazione gli amplificati furono fatti correre su gel di agarosio al 2% per verificare la qualità e la quantità del DNA amplificato. Successivamente questi 100 ng di ognuno di questi DNA furono sottoposti a reazione di sequenza. Quindi 1  $\mu$ l di DNA template (100ng/  $\mu$ l) furono aggiunti ad una miscela di reazione contenente 1  $\mu$ l di Buffer 5x, 1  $\mu$ l di Big Dye (Applied Biosystem), 0,5  $\mu$ l di primer (1,6  $\mu$ M) forward o revers e 2,5  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O per un volume totale di 5  $\mu$ l. Questi campioni furono poi sottoposti al seguente programma di amplificazione:

25 cicli a 96°C x 10 s, 50°C x 5 s, 60°C x 4 min

Al termine dell'amplificazione il DNA marcato fu fatto precipitare aggiungendo alla miscela di reazione 20  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O, 50  $\mu$ l di etanolo 100% a -20°C, 2,5  $\mu$ l di Sodio Acetato 7,5M a pH 5,2 e riponendo il tutto a -80°C per 30 minuti. Successivamente i campioni furono centrifugati a 13,000 rpm per 30 minuti, il surnatante eliminato tramite aspirazione e lavati per due volte con etanolo a 70% in modo da purificare ulteriormente da residui di Big Dye non legati al DNA. Quindi per eliminare ogni traccia di etanolo i campioni furono essiccati in centrifuga e quindi, infine, dopo che furono risospesi in formammide demonizzata sottoposti a sequenziamento tramite l'ABI 310 dell'Applied Biosystem.

Preparazione di sonde marcate con fluorescenza e Ibridazione in situ su cromosomi.

I vetrini sui quali successivamente fu condotta l'Ibridazione in situ furono fatti invecchiare per una settimana a temperatura ambiente. Al termine di questo periodo fu seguito il seguente protocollo:

Trattamento con RNAsi (100  $\mu$ g/ml) in 2x SSCa pH 7 per 1 ora a 37°C

Lavare per 3 volte in 2x SSCa pH 7 per 10 minuti

Disidratare i vetrini in etanolo (50%, 75%, 90%, 100%)

Incubare i vetrini per 3 minuti ad 80°C con 200  $\mu$ l di formammide 70% in 2x SSC a pH 7

Lavare i vetrini rapidamente in 2x SSC a pH 7 in ghiaccio

Disidratare i vetrini in etanolo (50%, 75%, 90%, 100%)

Lasciarli in etanolo 100%

Aggiungere ad 1  $\mu$ l di sonda biotinilata (biotina 16 dUTP), 2  $\mu$ l di Salmon sperm 1mg/ml "shared" e 2  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O, Na acetato 3M 0,5  $\mu$ l e tre volumi di etanolo assoluto tenuto a -20°C.

Miscelare il tutto su vortex e mettere per 15 minuti a -20°C

Centrifugare per 5 minuti a 12,000 rpm ed eliminare il sopranatante

Centrifugare per 1 minuto a 12,000 rpm ed eliminare il sopranatante

Centrifugare per 3 minuti a 4000 rpm a tubi aperti

Sciogliere il precipitato nella Mix di ibridazione (per 10 ml: 1ml 20x SSC pH 7; 0,4ml Tampone fosfato 1M pH 6,8; 0,1ml SDS 10%; 0,1ml Denhardt; 5ml formamide demonizzata; 1,4ml H<sub>2</sub>O; 2ml destransolfato 50%)

Denaturare la sonda a 80°C per 5 minuti, poi raffreddare a 0°C su ghiaccio, centrifugare brevemente e pipettare sul vetrino precedentemente asciugato per evaporazione dall'alcool

Mettere ad ibridare per 20 ore a 42°C in atmosfera satura di formamide 50% in 2x SSC pH 7

Lavare i vetrini due volte in formamide 50% in 2x SSC pH / per 10 minuti a 42°C per eliminare la sonda non legata

Lavare i vetrini tre volte in 2x SSC pH 7 per 10 minuti a 42°C per eliminare la formamide

Incubare i vetrini per 30 minuti a 37°C in camera umida con 200  $\mu$ l di soluzione di bloccaggio (BSA 1% + 4% SSC in 0,1% Tween 20)

Diluire l'Extravidina FITC coniugata alla concentrazione finale di 5  $\mu$ g/ml in soluzione di bloccaggio

Incubare i vetrini per 30 minuti con 200  $\mu$ l di Extravidina FITC a 37°C a buio

Lavare per 10 minuti i vetrini in 4x SSC in 0,1% Tween 20 per tre volte a 42°C a buio

Colorare i vetrini con 200  $\mu$ l di Ioduro di propidio (200ng/ml) in 2x SSC pH 7 per 2 minuti al buio

Lavare brevemente i vetrini in PBS

Montare in Antifade (per 10ml: Ioduro di propidio 200ng/ml, 0,233g DABCO, 200  $\mu$ l TRIS-HCl 1M a pH 8, 800  $\mu$ l H<sub>2</sub>O e 9 ml di glicerolo)

I vetrini furono osservati e fotografati a microscopio a fluorescenza axioscope della Zeiss.

## 4. RISULTATI

Nel seguente capitolo vengono esposti i risultati ottenuti nel corso della ricerca. La loro presentazione è articolata in funzione dello scopo ovvero saranno analizzati i principali gruppi di geconidi investigati.

### 4.1 *Phelsuma*

#### 4.1a Morfologia e NOR

Tutti gli esemplari esaminati, ad eccezione di *P.standigi*, *P.mutabilis* e *P.dubia*, mostrano un numero diploide di 36 cromosomi acrocentrici. *P.standigi* possiede un corredo cromosomico formato da 34 elementi di cui le prime due coppie metacentriche e le restanti acrocentriche, *P.mutabilis* con 36 cromosomi ma con la prima, seconda e quarta coppia submetentriche e infine *P.dubia* possiede una tra le coppie più piccole di cromosomi submetentrici ipoteticamente la sedicesima. In tutte le specie tranne *P.standigi*, dove sono metacentriche, la prima e la seconda coppia sono più lunghe delle restanti. Mentre la morfologia cromosomica sembra rimanere invariata in quasi tutte le specie, il numero e la localizzazione dei NORs ha una variabilità interspecifica (Aprea et al., 1996). Infatti in *P.pusilla* sono ben nove le coppie che possiedono cistroni ribosomiali mentre le altre specie ne possiedono una coppia: in *P.dubia* ai telomeri della terza coppia, in *P.madagascariensis* (sia nella sottospecie nominale che nelle altre tre), in *P.standigi* e in *P.seippi* ai telomeri della prima coppia (in *P.standigi* la prima coppia corrisponde alla terza poiché la prima e la seconda sono dovute alla fusione centrica delle coppie 5-8); nelle altre specie i NORs sono localizzati in posizione centromerica nella terza coppia in *P.abotti*, *P.lineata* e *P.guttata*, sulla prima in *P.barbouri* e sulla dodicesima in *P.quadriocellata* e *P.mutabilis* (Fig. 15 e 16).

#### 4.1b Distribuzione e composizione dell'eterocromatina

Tutte le specie dopo il C-banding mostrano bande eterocromatiche ai centromeri e ai telomeri della maggior parte dei cromosomi, mentre furono osservate bande eterocromatiche in posizione pericentromerica nelle prime tre coppie di *P.abotti*, prime nove coppie di *P.madagascariensis* la stessa banda invece presente in posizione interstiziale nelle prime dodici coppie di *P.dubia*, *P.lineata* e *P.quadriocellata*. Dopo colorazione con i fluorocromi Cromomicina A<sub>3</sub> e DAPI le bande centromeriche appaiono brillanti con il DAPI mentre in *P.mutabilis* solo una esile banda interstiziale. Solo le regioni telomeriche e nucleolo associate brillano dopo la colorazione della Cromomicina (Fig. 27)

### 4.2 *Uroplatus*

#### 4.2a Morfologia e NOR

Tutte le specie esaminate possiedono un corredo cromosomico diploide uguale a 36 (Fig 17). Tutti i cromosomi sono acrocentrici e gradualmente decrescenti di grandezza. Solo gli esemplari femmina di *U.alluaudi* e di *U.phantasticus* possiedono un eteromorfismo a carico della prima coppia di cromosomi

subtelocentrico piuttosto che acrocentrico. A differenza dell'omogeneità morfologica i NORs sono variabili infatti in *U.fimbriatus* and *U.henkeli* sono presenti ai telomeri della sesta coppia, in *U.alluaudi*, *U.guentheri* e *U.pietschmanni* sono ai telomeri della seconda coppia, in *U.sikorae* in posizione centromerica su una delle coppie più piccole verosimilmente la sedicesima, in *U.ebenau* ai telomeri della prima coppia e *U.phantasticus* al centromero della terza coppia. Mentre tutte le popolazioni di *U.sikorae* (Fig. 18) mostravano la stessa localizzazione dei NORs le popolazioni di *U.cf. ebenau* invece risultavano differenti infatti *U.cf. ebenau* proveniente da Montagne d'Ambre possiede i NORs al centromero degli elementi acrocentrici della nona coppia, gli esemplari provenienti da Ambolokopatrika (corridoio tra i parchi nazionali del Marozezi e di Anjanaribe-Sud) in posizione centromerica della terza coppia mentre gli esemplari provenienti da Fiherenena sono ben due coppie che portano i cistroni ribosomiali, la terza e la sedicesima sempre in posizione centromerica (Fig. 19).

#### 4.2b Distribuzione e composizione dell'eterocromatina

Anche la composizione dell'eterocromatina è variabile tra le specie infatti mentre dopo C-banding appaiono evidenti bande centromeriche e telomeriche, quando queste colorazioni sono seguite dai fluorocromi DAPI e CMA si evidenziano notevoli differenze infatti in *U.sikorae* le regioni centromeriche risultano positive ad entrambi i fluorocromi. Nell'*U.cf. ebenau* proveniente da Fiherenena le regioni centromeriche sono positive alla Cromomicina A<sub>3</sub> mentre le stesse regioni sono negative al DAPI; in *U.ebenau* risultano positive alla CMA sia le regioni centromeriche che quelle telomeriche mentre un elemento della (ipoteticamente) quindicesima coppia risulta quasi del tutto positivo al DAPI, solo la regione centromerica risulta negativa (Fig. 20).

### 4,3 *Paroedura*

#### 4,3a Morfologia e NOR

*P.stumffi*, *P.karstophila*, *P.loatsara*, *P.vazimba* e *P.masobe* possiedono un cariotipo formato da 36 elementi con le prime tre coppie nettamente più grandi delle restanti di cui la terza è formata da elementi metacentrici. Le restanti coppie sono tutte acrocentriche tranne l'ultima e la terzultima e decrescono in modo graduale di grandezza. All'interno di questo gruppo differisce *P.masobe* per possedere la prima coppia subtelocentrica. *P.bastardi* invece possiede un numero diploide di 34 elementi con la prima e la quarta coppia metacentrica. Di queste la prima coppia è dovuta a un riarrangiamento robertsoniano, ovvero alla fusione di due coppie di elementi acrocentrici di media dimensione mentre la quarta coppia corrisponde alla terza degli altri cariotipi. La femmina di *P.gracilis* differisce ulteriormente per possedere un cariotipo formato da 29 cromosomi con ben nove elementi metacentrici di cui otto vanno a formare le prime quattro coppie mentre il nono elemento si appaia con un elemento acrocentrico di dimensione ridotta, circa la metà. La prima coppia risulta di dimensioni notevolmente superiore alla seconda, circa il doppio (Fig. 21). La localizzazione dei NORs invece è fortemente conservata infatti in tutte le specie studiate i cistroni

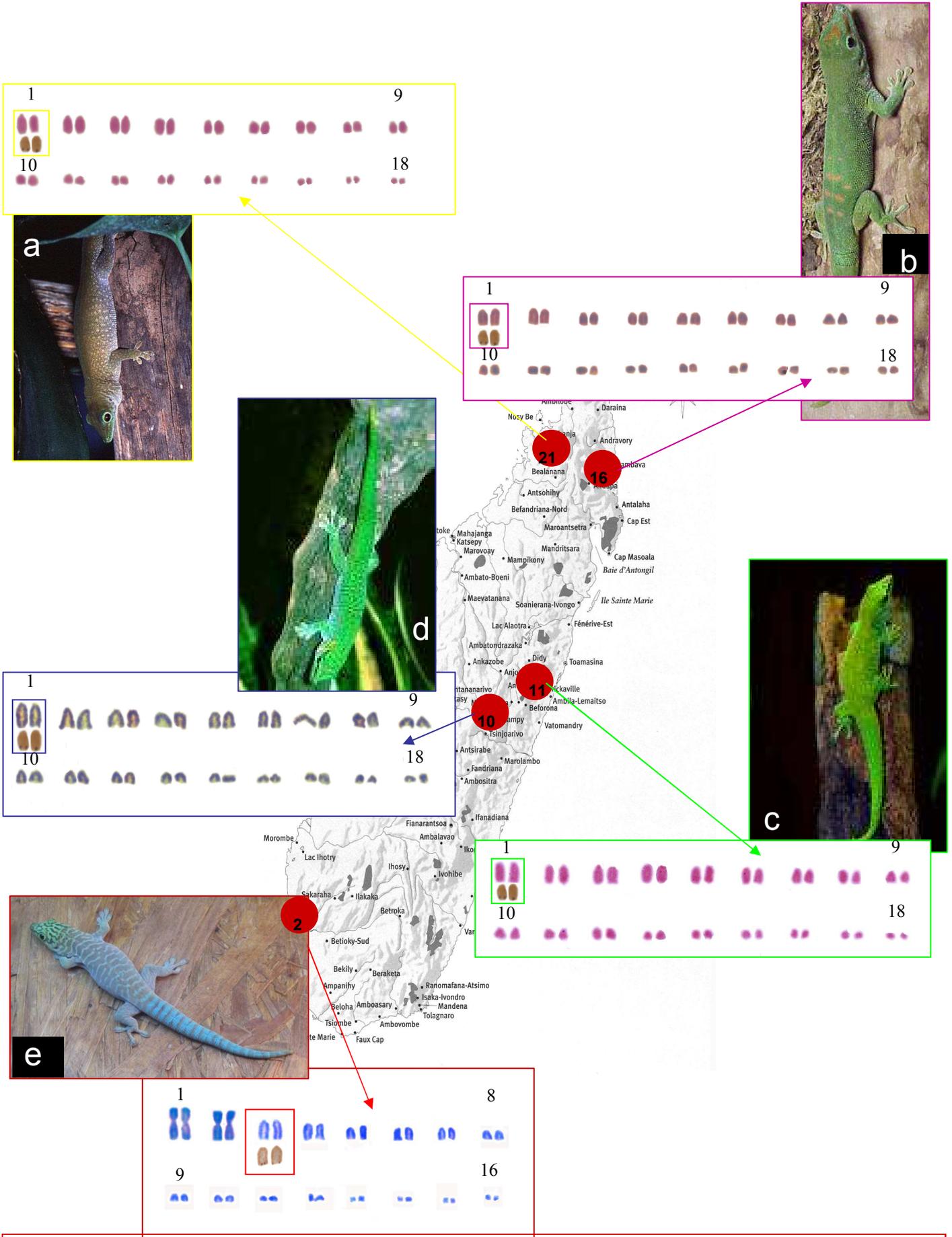


Fig. 15. Cariotipo di e) *Phelsuma standigi* e delle 4 sottospecie di *Phelsuma madagascariensis*: a) *P. madagascariensis grandis*; b) *P. madagascariensis madagascariensis*; c) *P. madagascariensis boehmei*; d) *P. madagascariensis kochi*. I riquadri indicano le coppie che portano i cistroni ribosomiali.



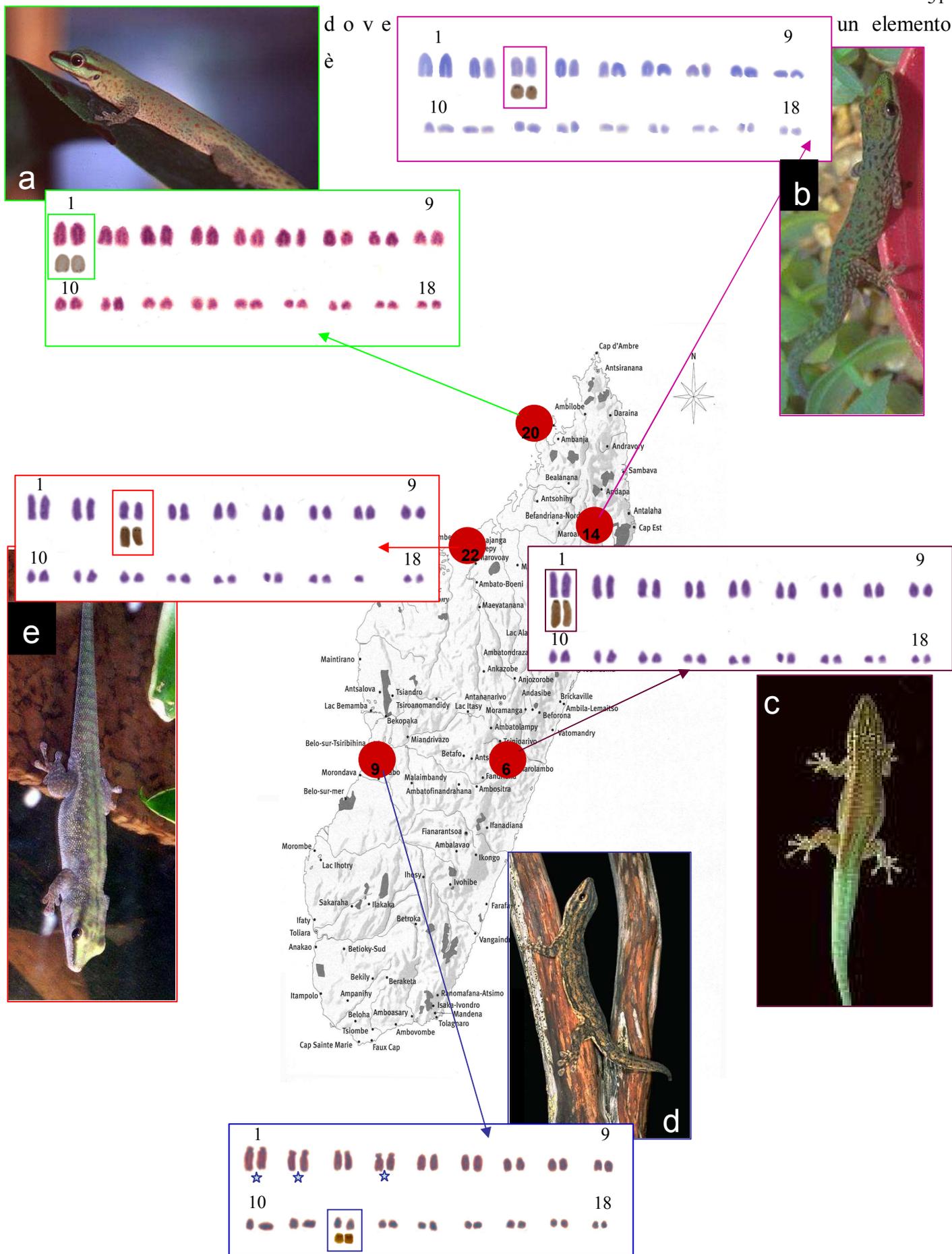


Fig. 16. Cariotipo di 5 specie di *Phelsuma*: a) *P. seippi*; b) *P. guttata*; c) *P. barbouri*; d) *P. mutabilis*; e) *P. abotti*. I riquadri indicano le coppie che portano i cistroni ribosomiali. Gli asterischi in *P. mutabilis* indicano i cromosomi biarmed



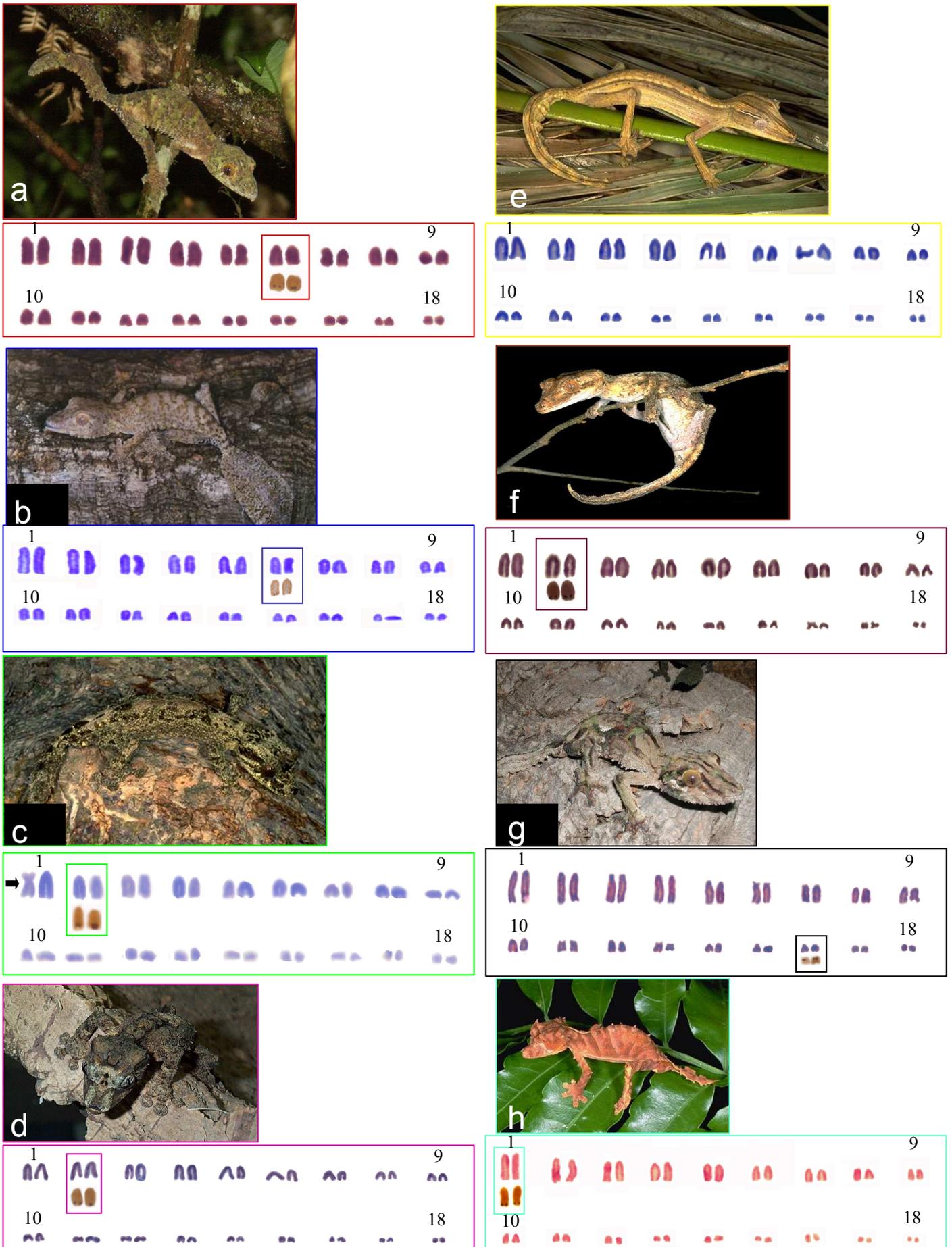


Fig. 17 Cariotipi di otto specie di *Uroplatus*: a) *U. fimbriatus*; b) *U. henckeli*; c) *U. alluaudi*; d) *U. pietschmanni*; e) *U. lineatus*; f) *U. guentheri*; g) *U. sikorae*; h) *U. ebenau*. Il riquadro indica la localizzazione dei NORs. La freccia invece indica la coppia cromosomica eteromorfa nella femmina di *U. alluaudi* ascrivibile ad un sistema di cromosomi sessuali di tipo ZW.



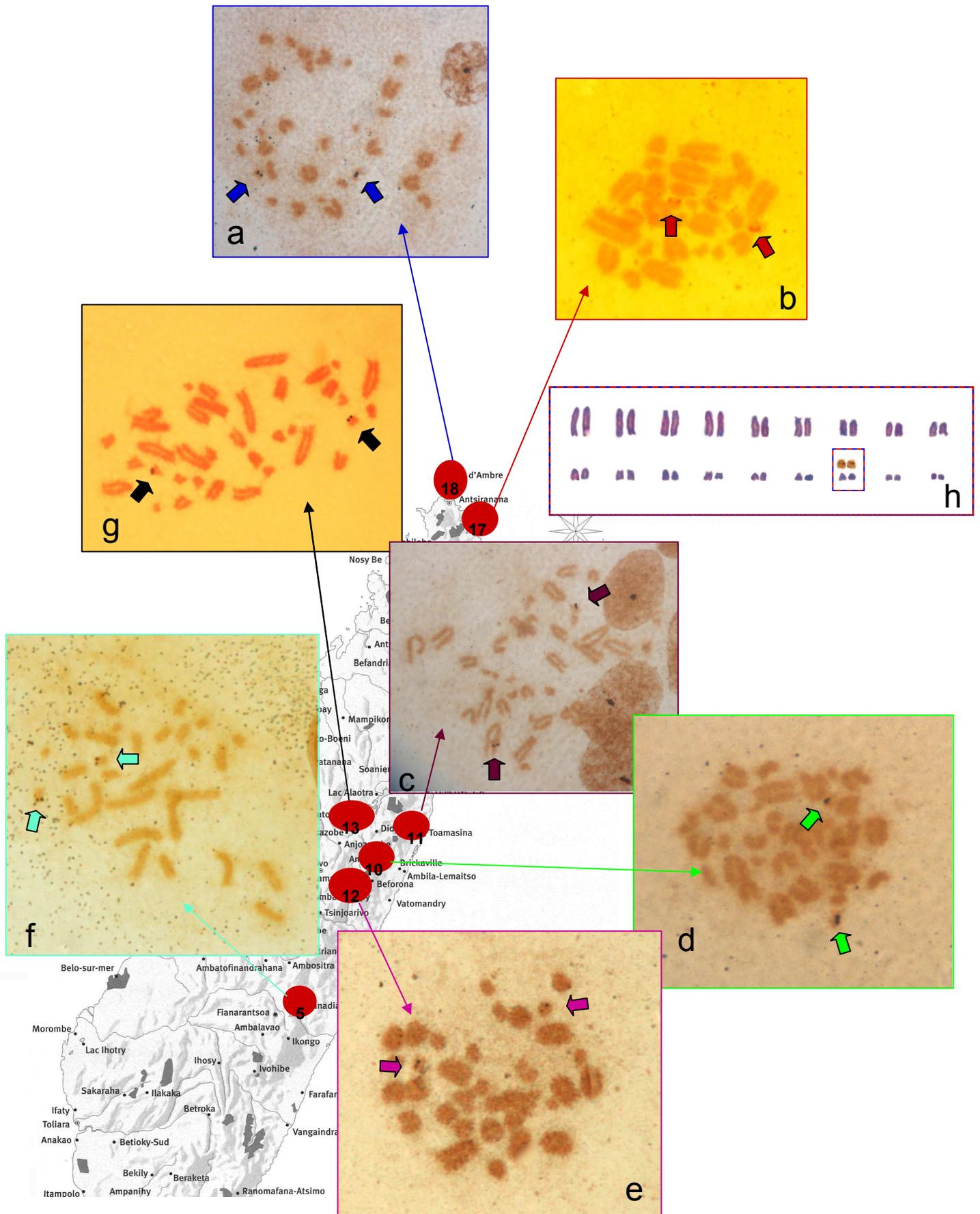
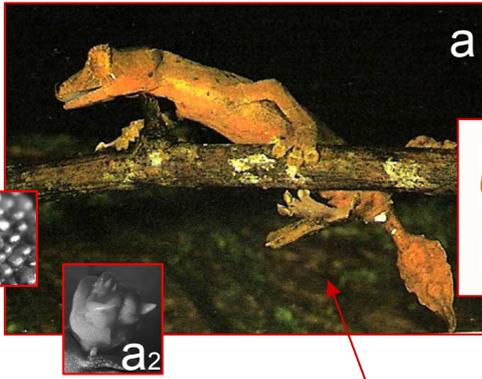


Fig. 18 Piastre cromosomiche colorate con il nitrato d'argento in diverse popolazioni di *Uroplatus sikorae*: a) Mountagne d'Ambre; b) Mountagne des Francais; c) Brikaville; d) Andasibè; e) Moramanga; f) Ifanadiana; g) Mandraka. Le frecce indicano la localizzazione dei NORs. h) cariotipo standard di *U. sikorae*. Il riquadro indica la coppia che porta i cistroni ribosomiali

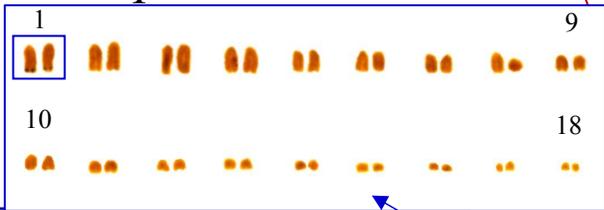




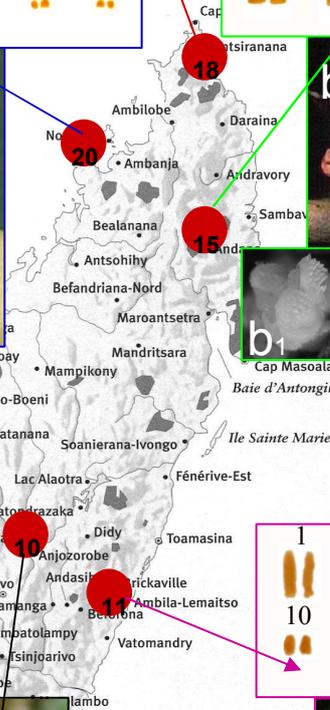
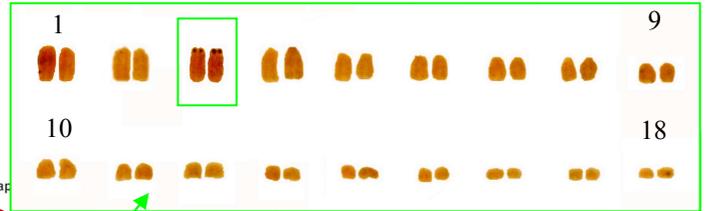
*Uroplatus specie nova 1*



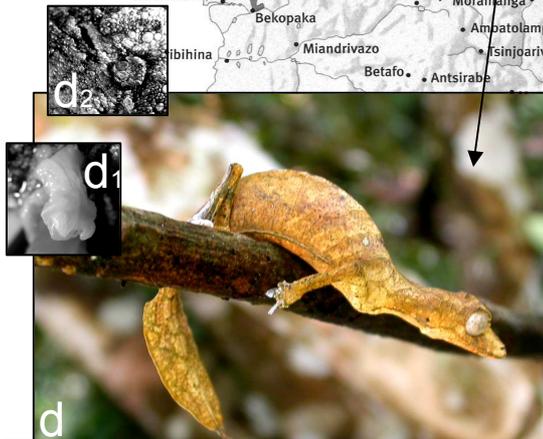
*Uroplatus ebenaui*



*Uroplatus specie nova 2*



*Uroplatus specie nova 3*



*Uroplatus phantasticus*

Fig. 19. Cariotipi ricostruiti da piastre colorate con la tecnica dell'AgNOR comparati(a,b,c,d,e) con l'analisi degli emipeni (a<sub>1</sub>,b<sub>1</sub>,c<sub>1</sub>,d<sub>1</sub>,e<sub>1</sub>) e delle squame della pelle (a<sub>2</sub>,b<sub>2</sub>,c<sub>2</sub>,d<sub>2</sub>,e<sub>2</sub>) nell'*ebenaui*-Group: a) *U. cf ebenaui* di Mountagne d'Ambre (spece nova I); b) *U. cf. ebenaui* di Ambalokopatrika (spece nova II); c) *U. cf. ebenaui* di Fiherenena (spece nova III); d) *U. phantasticus*; e) *U. ebenaui* di Monongarivo. b<sub>3</sub>) dettaglio della coda. Il riquadro indica la coppia che porta i cistroni ribosomiali

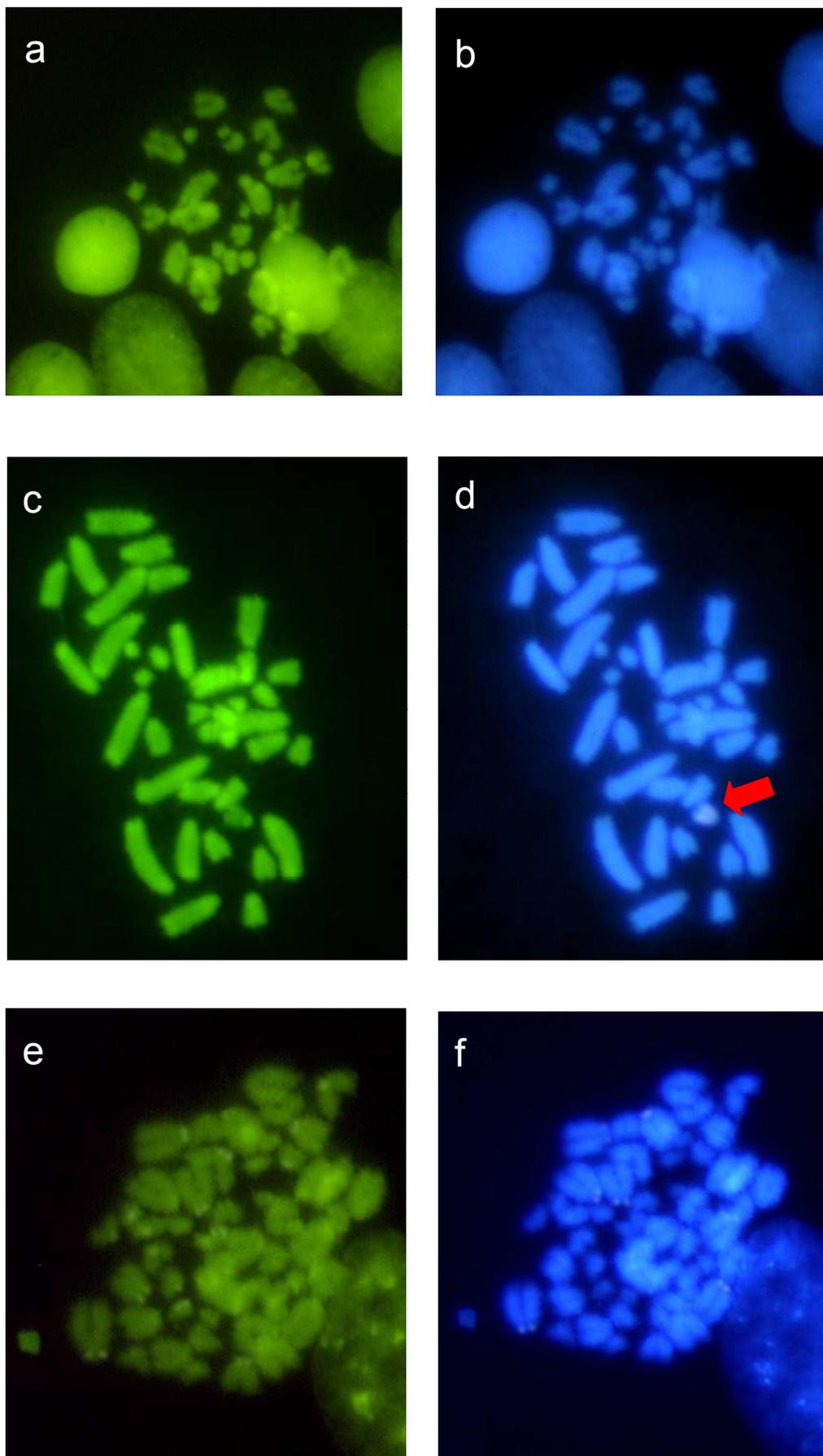


Fig. 20 Piastre metafasiche dopo bandeggio C seguito da colorazione sequenziale con DAPI (b,d,f) e CMA 3 (a,c,e) in *Uroplatus cf. ebenau*i spece nova III (a,b); *Uroplatus ebenau*i (c,d); *Uroplatus sikorae* (e,f). La feccia incica il cromosoma W.



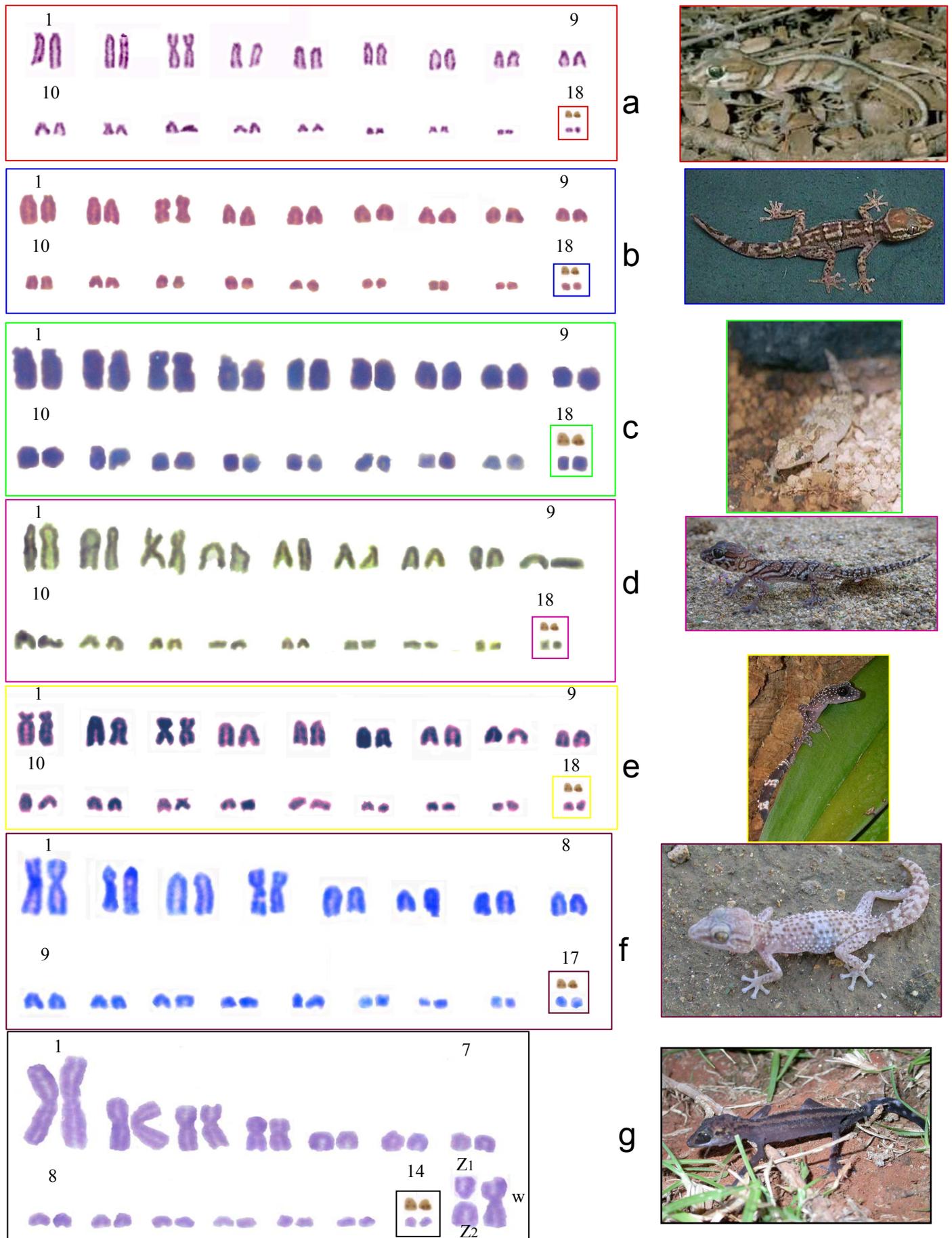


Fig. 21. Cariotipi di femmine di sette specie di *Paroedura*: a) *P. loatsara*; b) *P. stumpffi* (Majanka); c) .; d) *P. picta*; e) *P. masobe*; f) *P. bastardi*; g) *P. gracilis*. Il riquadro indica la coppia che porta i cistroni ribosomiali. Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub> e W indicano il sistema di cromosomi sessuali in *P. gracilis*.



# *Paroedura bastardi*

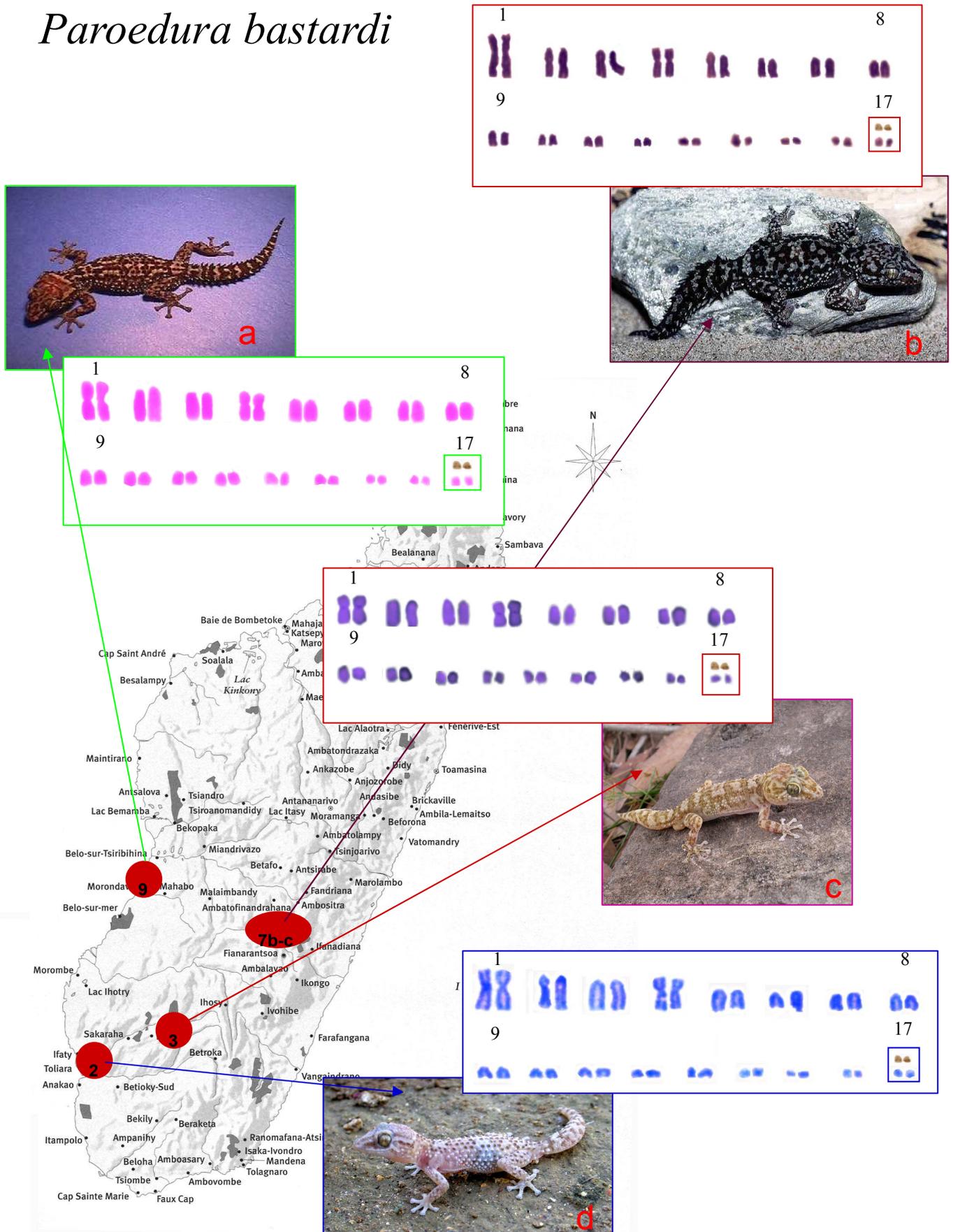


Fig. 22. Cariotipi di *Paroedura bastardi* provenienti da diverse località: a) Miandrivazo; b) Mount Ibity; c) Ilakaka-Isalo; d) Tulear. Il riquadro indica la coppia che porta i cistroni ribosomiali



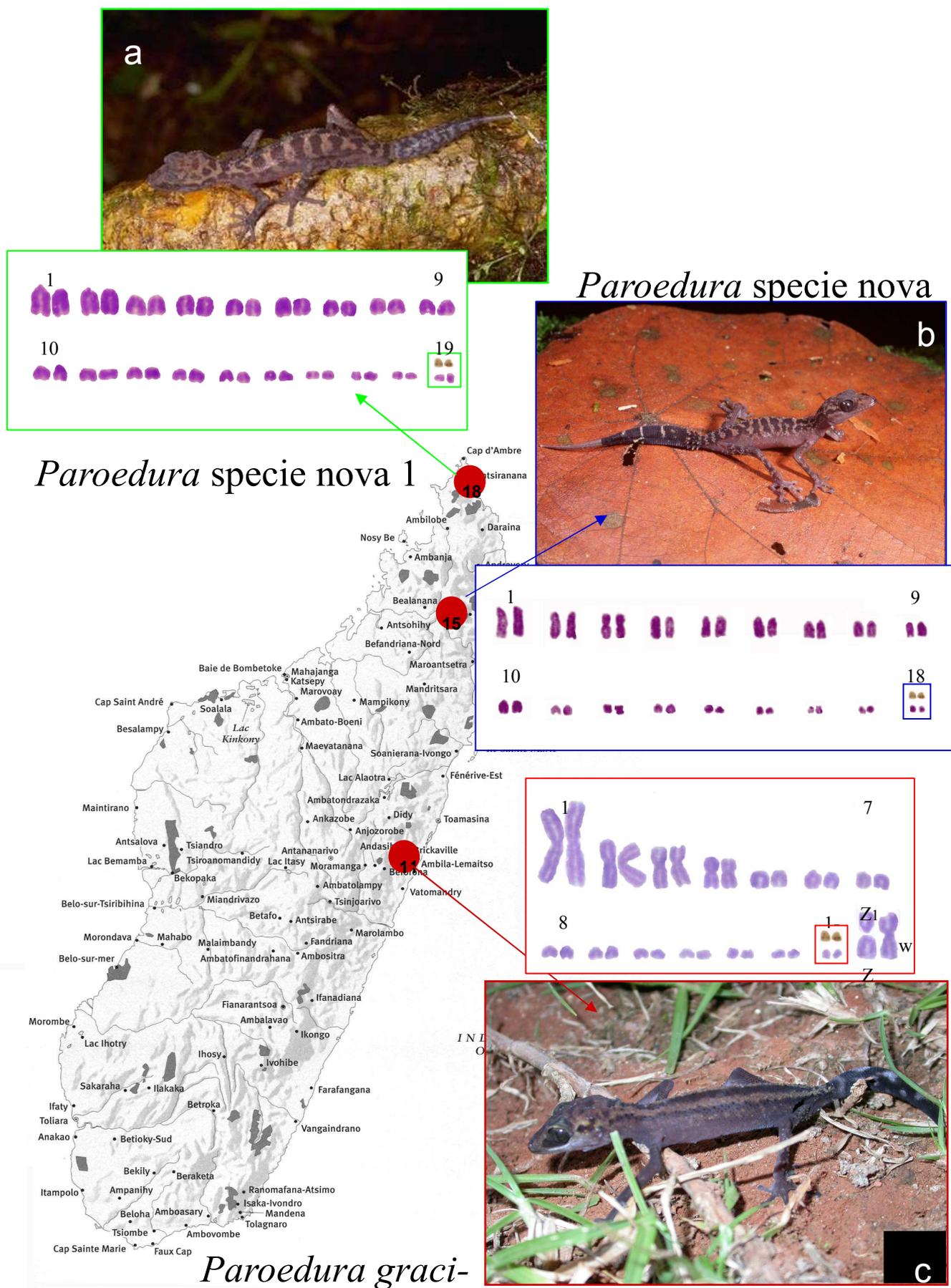


Fig. 23. Cariotipi di femmine di *Paroedura* cf. *gracilis* provenienti da diverse località: a) Montagne d'Ambre; b) Ambolokopatrika; c) Fiherenena. Il riquadro indica la coppia che porta i cistroni ribosomiali. Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub> e W indicano il sistema di cromosomi sessuali in *P. gracilis*.



ribosomiali si vanno a localizzare sulla coppia più piccola in posizione telomerica. Tutte le popolazioni di *P.bastardi* (Mount Ibity, Isalo N.P., Tulear, Miandrivazo) (Fig. 22) e di *P.stumpffi* (Ankarana, Montagne des Francais, Monongarivo, Mahajanga) sono cromosomicamente, sia per la morfologia che per la localizzazione dei NORs, uniformi. Al contrario le popolazioni di *P.cf. gracilis* (Ambolokopatrika e Montagne d'Ambre) differivano dalla popolazione di *P.gracilis* (Fiherenena, località prossima alla località tipica, Andasibè) per possedere la *P.cf. gracilis* di Ambolokopatrika un cariotipo formato da 36 elementi con le prime tre coppie nettamente più grandi delle restanti di cui la terza è formata da elementi metacentrici mentre *P.cf. gracilis* di Montagne d'Ambre possiede un cariotipo con 38 elementi tutti acrocentrici con le prime due coppie nettamente più grandi delle restanti (Fig. 23).

#### 4,3b Distribuzione e composizione dell'eterocromatina

L'eterocromatina è distribuita prevalentemente nella regione centromerica e telomerica e dopo le colorazioni con i fluorocromi le regioni centromeriche degli elementi metacentrici e di tutte le coppie medio-grandi sono DAPI positive mentre le regioni telomeriche, gli elementi più piccoli, le regioni NORs associate ed alcuni centromeri sono CMA positivi (Fig. 27).

#### 4.4 *Microscalabotes* e *Lygodactylus*

##### 4,4a Morfologia e NOR

Gli esemplari appartenenti al genere monospecifico *Microscalabotes* possiedono un cariotipo formato da 40 elementi tutti telocentrici e decrescenti di grandezza (Fig. 24). Tuttavia braccini molto corti sono evidenti su tutti i cromosomi. I cistroni ribosomiali sono localizzati sulla coppia più piccola. All'interno del genere *Lygodactylus* invece *Lygodactylus sp* provenienti dalla regione di Morondava possedevano anch'essi un cariotipo come *Misroscalabotes*. *L. cf. tuberosus* delle regione di Tulear e *L. cf. miops* provenienti da Ranomaphana possiedono un cariotipo formato da 38 elementi con la prima coppia metacentrica. I NORs sono localizzati nella prima specie sui braccini corti della seconda coppia mentre in *L. cf. miops* sulla coppia più piccola. Nelle femmine *L. cf. tuberosus* fu trovato che la prima coppia risultava eteromorfa con un elemento metacentrico ed uno acrocentrico di uguale dimensione. Nelle due popolazioni di *L. cf. guibei* provenienti da Andasibe e Forotofutzi fu ritrovato un cariotipo con 36 elementi con la prima coppia metacentrica e la seconda submetacentrica. I NORs sono localizzati sui braccini corti della terza coppia. Le femmine della popolazione di Forotofutzi possedevano una coppia eteromorfa di cui un elemento subtelocentrico di dimensioni medio-grande e l'altro elemento risultava il più piccolo del corredo diploide. *L.mirabilis* invece possiede un complemento diploide  $2n=38$  con la prima coppia metacentrica e con le prime due coppie nettamente più grandi delle restanti. I NORs erano localizzati su due coppie e precisamente la seconda sui braccini corti e la quattordicesima in posizione paracentromerica (Fig. 24).

#### 4,4b Distribuzione e composizione dell'eterocromatina

Nelle specie esaminate l'eterocromatina costitutiva risulta prevalentemente localizzata al centromero con cospicui blocchi mentre nelle regioni telomeriche si evidenziano esili bande. Dopo colorazione consequenziali con DAPI e CMA<sub>3</sub> le regioni centromeriche risultavano fortemente colorate con il DAPI. Tutte le metafasi osservate erano invece negative alla cromomicina (Fig.27).

#### 4.5 *Ebenavia* – *Matoatoa* – *Blasiodactylus* – *Geckolepis*

##### 4,5a Morfologia e NOR

Gli esemplari di *Ebenavia inunguis* possiedono un cariotipo formato da 36 elementi tutti acrocentrici e decrescenti di grandezza con le prime due coppie più grandi delle restanti. Gli organizzatori nucleolari sono presenti ai telomeri della prima coppia (Fig. 25). *Matoatoa breviceps* invece possiede un cariotipo con un numero diploide  $2n=34$  formato dalla prima coppia submetacentrica, dalla sedicesima metacentrica e dalle restanti 15 coppie acrocentriche con dei braccini molto corti su tutti i cromosomi e con le prime due coppie nettamente più grandi delle altre (Fig. 25). Il cariotipo di *Geckolepis typica* è formato da 38 elementi con la prima coppia subtelocentrica e le restanti 18 coppie acrocentriche con alcune coppie che presentavano anche dei braccini corti o molto corti. Tutte le coppie sono decrescenti di grandezza. I NORs sono localizzati su una coppia medio-piccola che ipoteticamente possiamo indicare con la decima (Fig.25). *Blasiodactylus sakalava* invece possiede un assetto cromosomico formato da 42 elementi tutti acrocentrici e decrescenti di grandezza con i cistroni ribosomiali localizzati in posizione paracentromerica della prima coppia (Fig. 25). In questa specie l'eterocromatina è prevalentemente centromerica e telomerica, ma dopo digestione con l'endonuclease Alu I si evidenziano delle bande centromeriche resistenti a tale enzima che risultano anche essere ricche di A+T risultando fortemente colorate con il DAPI (Fig. 27).

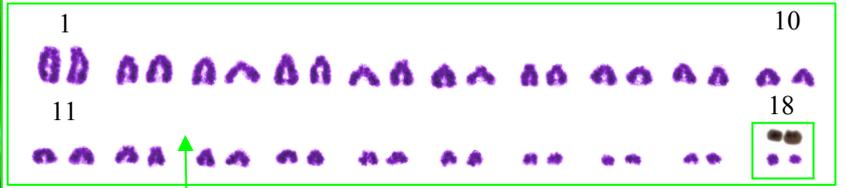
#### 4.6 *Tarentola*

##### 4,6a Morfologia e NOR

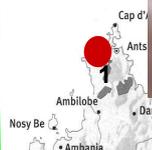
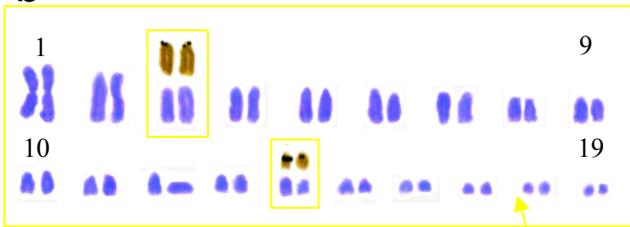
Tutte le specie studiate possedevano un cariotipo con 42 cromosomi tutti gradualmente decrescenti di lunghezza con maggior parte dei cromosomi acrocentrici (Matthey, 1931; Odierna et al., 1994). Tra gli elementi più piccoli le ultime coppie apparivano biarmed (il numero e la morfologia varia tra le popolazioni e tra le specie). I NORs invece differivano tra le varie specie: in *T.mauritanica mauritanica* (Italia e Marocco), *T.mauritanica juliae* (Marocco) furono localizzati vicino al centromero in un paio di cromosomi medio-piccoli (ipoteticamente la quindicesima coppia); in *T.mauritanica fascicularis* (Marocco e Tunisia) questi si localizzavano sul braccio corto del secondo paio; in *T.annularis* (Egitto) invece la coppia che porta gli organizzatori nucleolari è eteromorfa con un cromosoma di dimensioni medio-grandi (ipoteticamente un elemento della quattordicesima coppia) ed uno di dimensioni medio-piccole (ipoteticamente appartenente alla diciottesima coppia); *T.chazaliae* e *T.capoverdiana substituta* sulla prima coppia ma mentre nella prima specie sono localizzati sui braccini corti nella seconda si ritrovano in



a



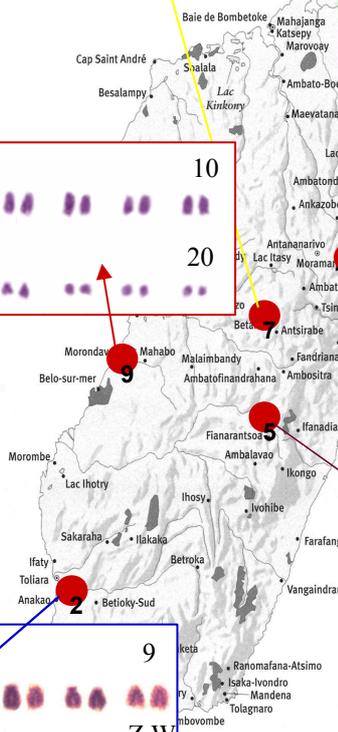
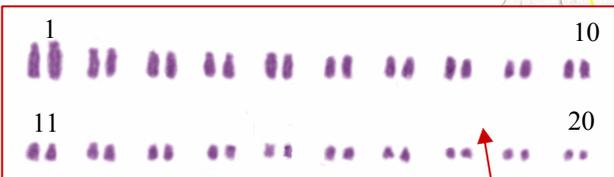
b



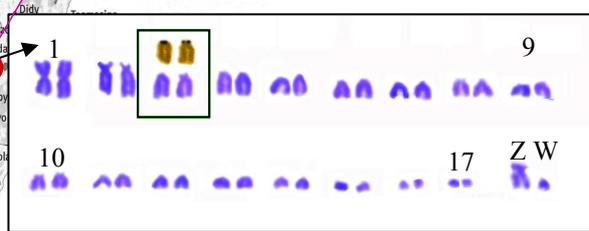
g



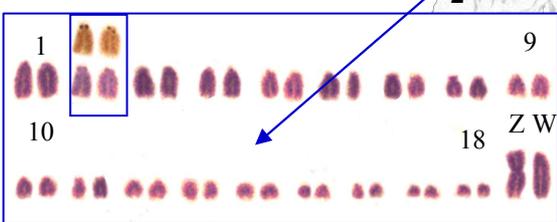
c



f



d



e



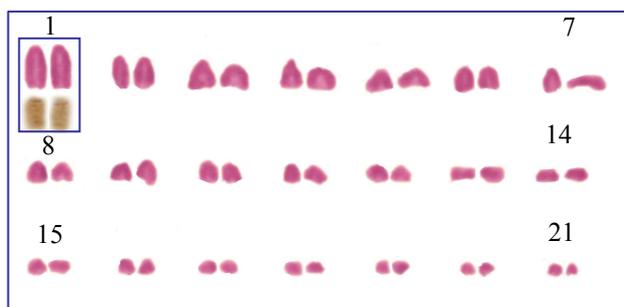
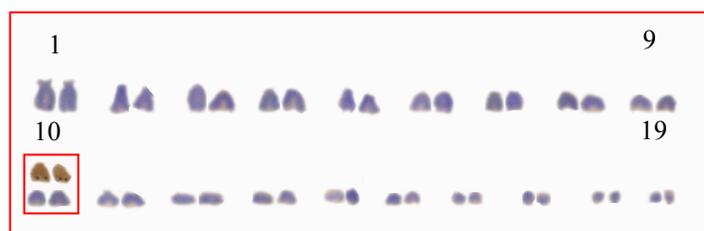
Fig. 24. Cariotipo di *Microscalabotes bivittis* ♀ (a); Cariotipi di 6 specie del genere *Lygodactylus*: b) *L. mirabilis* ♂; c) *L.sp* di Marofandilia ♂; d) *L. cf. tuberosus* di Tulear ♀; e) *L. cf. miops* di Ranomaphana ♂; f e g) due popolazioni di *L. cf. guibei* di Andasibè ♀ (f) e di Forotofuzi ♀ (g). I riquadri indicano le coppie che portano i cistroni ribosomiali . Z e W indicano il sistema di cromosomi sessuali in *L. cf. tuberosus* di Tulear e di *L. cf. guibei* di Andasibè.



b



c



d



e



Fig. 25. Cariotipo di a) *Ebenavia inunguis*; b) *Matoatoa breviceps*; c) *Geckolepis typica*; d) *Blaesiodactylus sakalava*; e) *Hemidactylus cf. marcatorius*. I riquadri indicano le coppie che portano i cistroni ribosomiali.



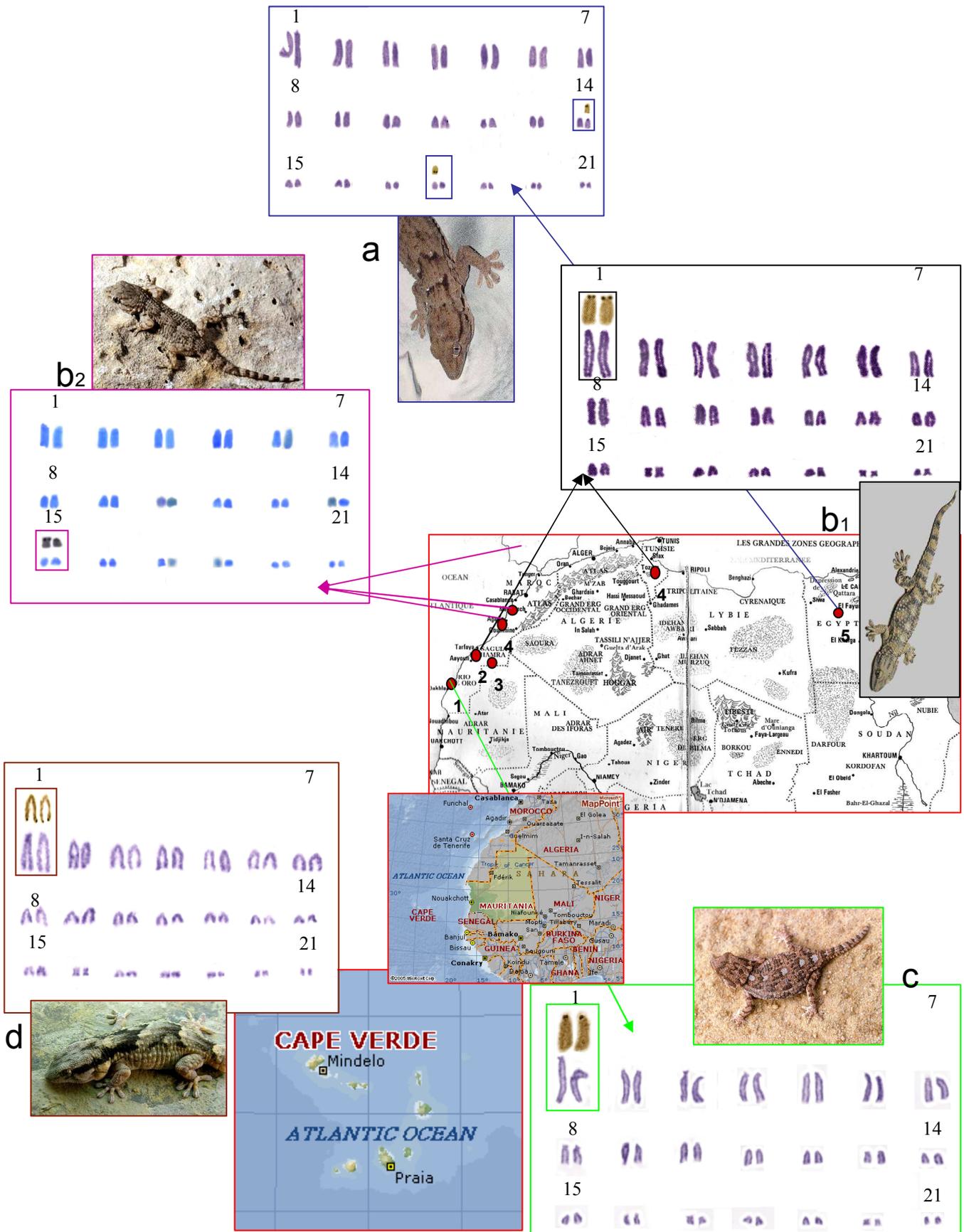


Fig. 26. Cariotipo di 4 specie di *Tarentola*: a) *T. annularis*; b) *T. mauritanica* (b<sub>1</sub> *T. mauritanica fascicularis* e b<sub>2</sub> *T. mauritanica mauritanica*); c) *T. (Geckonia) chazaliae*; d) *T. capoverdiana substituta*. I riquadri indicano le coppie che portano i cistroni ribosomiali.



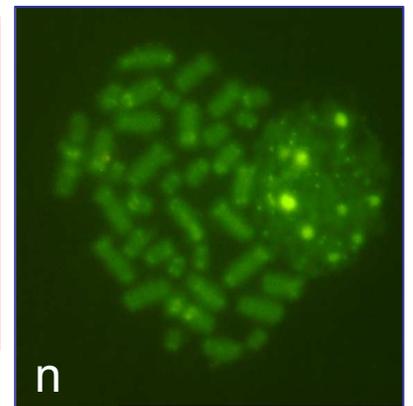
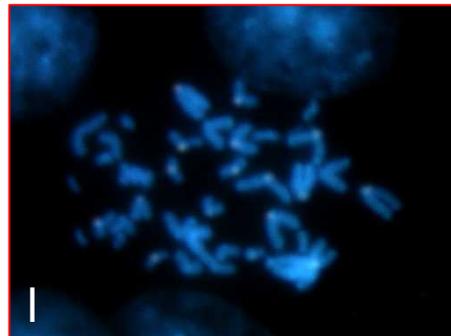
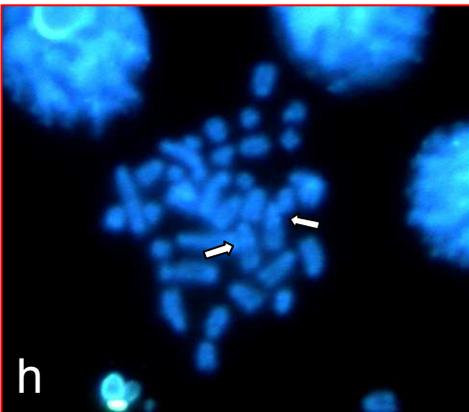
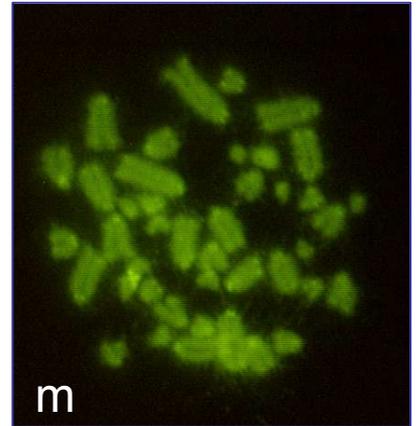
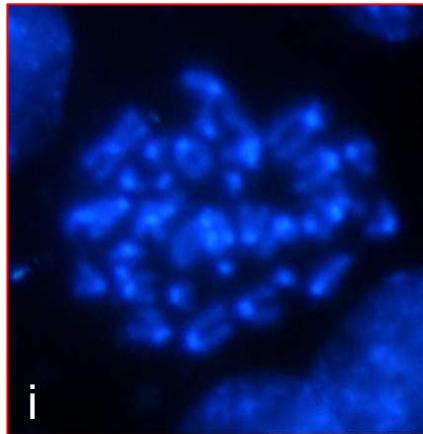
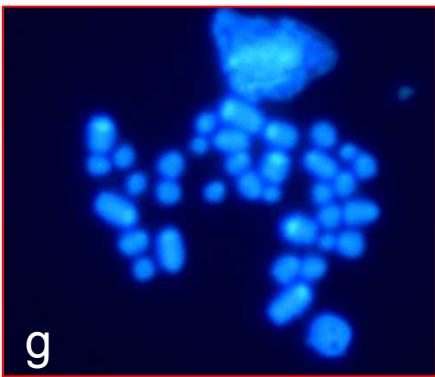
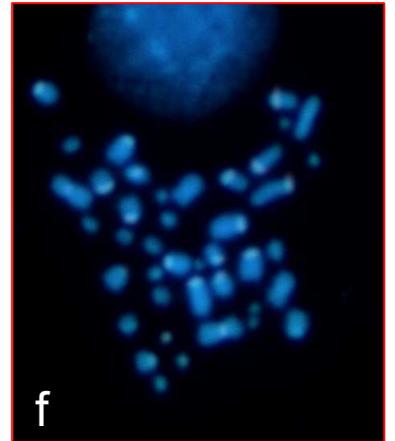
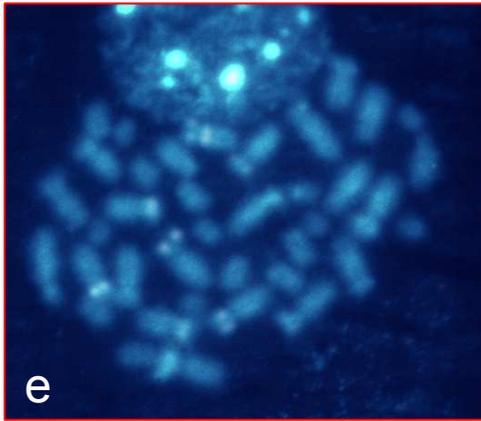
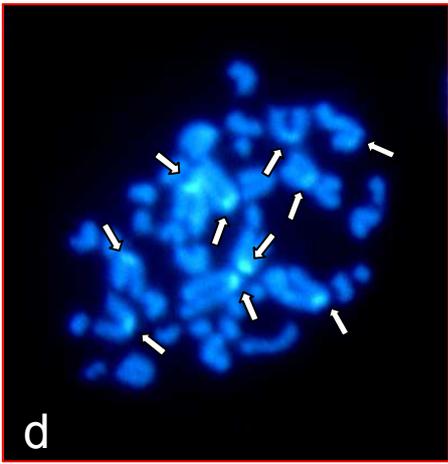
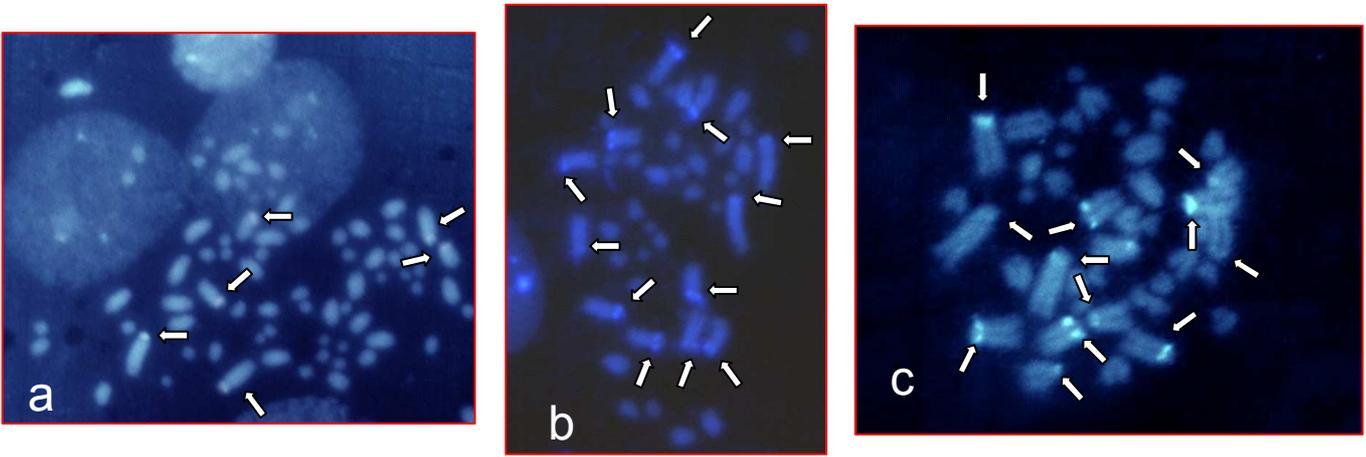


Fig. 27. Piastre metafasiche dopo bandeggio C seguito da colorazione sequenziale con DAPI (a,b,c,d,e,f,g,h,i,l) e CMA 3 (m,n). a-m) *Tarentola (Geckonia) chazaliae*; b) *Ptyodactylus guttatus*; c) *Tarentola mauritanica*; d) *Blaesiodactylus sakalava*; e-n) *Stenodactylus stenodactylus*; f) *Paroedura stumpffi*; g) *Phelsuma barbouri*; h) *Phelsuma mutabilis*; i) *Lygodactylus cf. guibei*; l) *Lygodactylus cf. miops*. Le frecce indicano le regioni pericentromeriche DAPI+.

posizione telomerica (Fig. 26).

#### 4,6b Distribuzione e composizione dell'eterocromatina

Dopo bandeggio c evidenti blocchi eterocromatici furono osservati nelle regioni centromeriche e telomeriche mentre dopo digestione con l'endonuclease Alu I si osservava un peculiare pattern infatti solo le regioni pericentromeriche delle prime sei coppie furono resistenti alla digestione. Quando dopo questi bandeggi i vetrini furono colorati con i fluorocromi CMA<sub>3</sub> e DAPI l'eterocromatina resistente al bandeggio c si colorò intensamente con la cromomicina A<sub>3</sub> mentre le bande pericentromeriche resistenti all'Alu I si colorarono con il DAPI (Fig. 27).

### 4.7 *Tropiocolotes* – *Stenodactylus* - *Ptyodactylus*

#### 4,7a Morfologia e NOR

*Tropiocolotes* e *Stenodactylus* posseggono entrambi un cariotipo formato da 38 elementi ma, mentre in *Tropiocolotes* sono tutti acrocentrici (Fig. 28) nel genere *Stenodactylus* invece sono biarmed infatti tutti gli elementi posseggono dei braccini medio-corti o molto corti. In entrambi i generi i cromosomi decrescono gradualmente in lunghezza (Fig. 28). *Ptyodactylus* invece possiede una formula cromosomica con 2n=40 con tutti gli elementi acrocentrici e decrescenti di grandezza (Fig. 28). Gli organizzatori nucleolari sono localizzati in posizione pericentromerica della prima coppia in *Tropiocolotes tripolitanus*, ai telomeri di una delle coppie delle più piccole (verosimilmente la quindicesima) in *Stenodactylus stenodactylus* mentre in *Ptyodactylus guttatus* venivano marcate dai sali d'argento ben due coppie, la prima e la seconda, sui braccini corti (Fig. 28).

#### 4,7b Distribuzione e composizione dell'eterocromatina

In *Ptyodactylus guttatus* dopo bandeggio c evidenti blocchi eterocromatici furono osservati nelle regioni centromeriche e telomeriche Dopo digestione con l'endonuclease Alu I, invece, si osservava un peculiare pattern infatti solo le regioni pericentromeriche delle prime sei coppie furono resistenti alla digestione enzimatica. Quando dopo questi bandeggi i vetrini furono colorati con i fluorocromi CMA<sub>3</sub> e DAPI l'eterocromatina resistente al bandeggio c si colorò intensamente con la cromomicina A<sub>3</sub> mentre le bande pericentromeriche resistenti all'Alu I si colorarono con il DAPI. Al contrario *Stenodactylus stenodactylus* dopo digestione con l'endonuclease Alu I e susseguente colorazione con i fluorocromi CMA<sub>3</sub> e DAPI le regioni pericentromeriche di quasi tutti i cromosomi apparivano fortemente colorate con la CMA<sub>3</sub> mentre con il DAPI brillavano solo alcune bande sempre in posizione pericentromerica nelle coppie di cromosomi più grandi (Fig. 27)



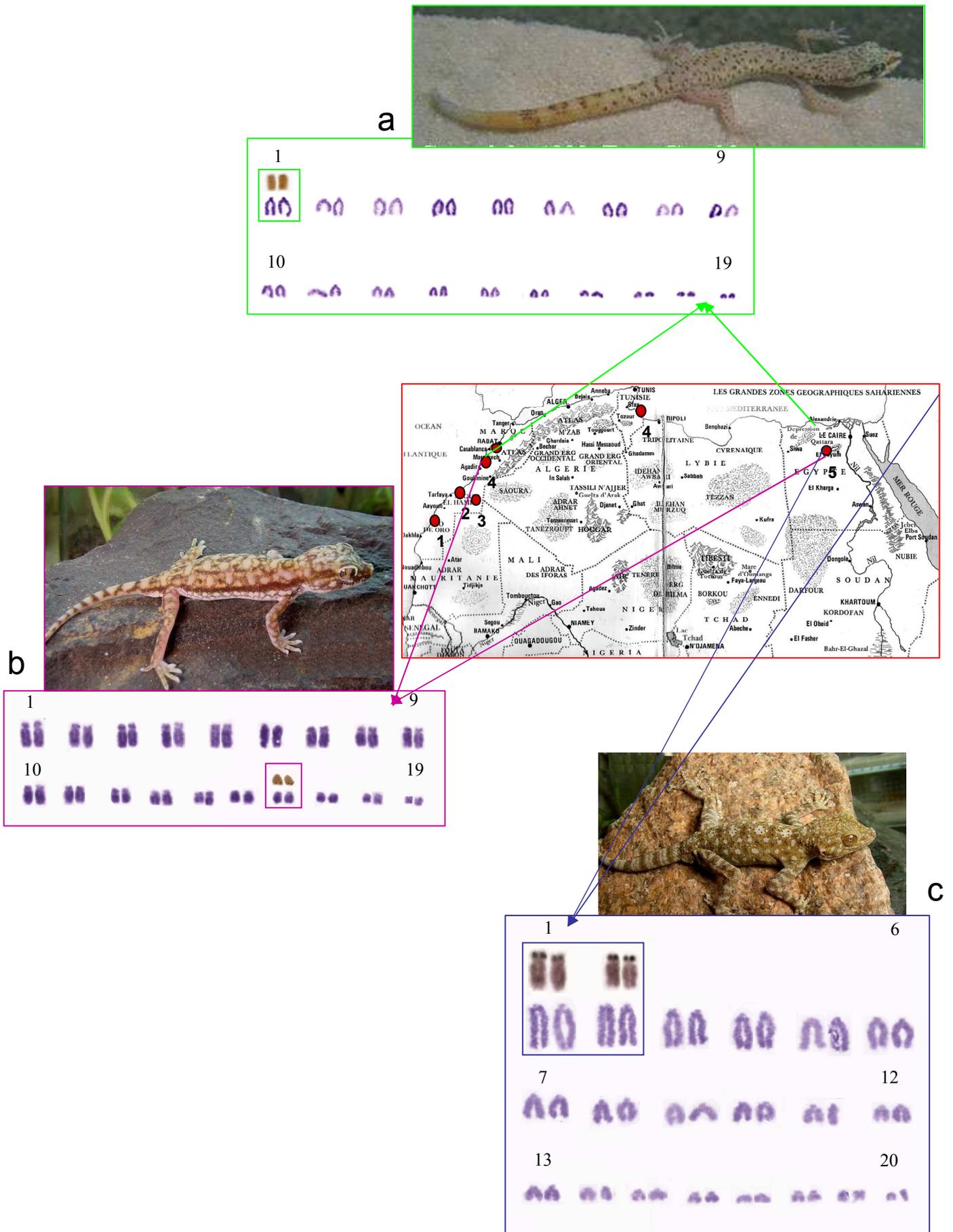


Fig. 28. Cariotipo di a) *Tropiocolotes tripolitanus*; b) *Stenodactylus stenodactylus*; c) *Ptyodactylus guttatus*. I riquadri indicano le coppie che portano i cistroni ribosomiali.

## 5. DISCUSSIONE

### *Phelsuma*

*Phelsuma* è un ipotetico clade a cui sono ascritte circa 40 specie, 23 delle quali si ritrovano in Madagascar e nelle isole limitrofe, 4 nelle Comore, 2 nelle Seychelles, 1 sull'isola di Pemba sulla costa della Tanzania, un'altra nelle isole Nicobar e Andaman a ovest di Myanmar e sette nelle isole Mascarene. Un'altra specie diffusa sulle coste del Sudovest dell'Africa e Namibia fu inclusa nel genere *Phelsuma* come *Phelsuma ocellata* da Russell (1977) ma recentemente alcuni autori Bauer, 1990; Kluge e Nussbaum, 1995; Röhl, 1999) l' hanno rinserito nel suo genere originario *Rhoptropella* Hewitt, 1937. Sempre Russell (1977) raggruppò le specie malgascie del genere *Phelsuma* in due gruppi, uno dal corpo grosso adattato agli ambienti umidi dell'est e uno con forme più piccole associate ad ambienti xerici nel sudovest. Questi gruppi tuttavia non sembrano essere monofiletici (Nussbaum and Raxworthy, 1998a). Invece sembra probabile che la radiazione malgascia delle *Phelsuma* possa essere polifiletica con alcune forme maggiormente vicine ai membri del gruppo delle isole Mascarene (Börner, 1972, 1984; Raxworthy and Nussbaum, 1994c). Austin et al., 2004 su base molecolare (mtDNA+ c-mos, 1460 bc in totale) supportano l'ipotesi che *Phelsuma* è genere è monofiletico se dal clade si esclude *Rhoptropella*. Virtualmente tutte le specie appartenenti a questo genere sono arboricole, ma *P.barbouri*, una specie di alta quota, è rupicola (Glaw e Vences, 1994) e alcune specie come *P.lineata* si rinvencono spesso nelle case e sono tolleranti degli habitat disturbati (Andreone 1991a, 1991b). La maggior parte delle specie vivono nelle piovose foreste del nord ed dell'est del Madagascar, ma alcune come le specie del *P.mutabilis*-group vivono nelle foreste secche del sudovest dove tra i rami spinosi delle *Euphorbia* trovano rifugio e siti per l'ovodeposizione (Meier, 1993). Glaw e Vences (1994) riconoscono all'interno delle specie del Madagascar 6 gruppi: *guttata*-Group (*P.guttata*, *P.seippi*, *P.abotti*); *madagascariensis*-Group (*P.madagascariensis madagascariensis*, *P.madagascariensis grandis*, *P.madagascariensis kochi*, *P.madagascariensis boehmei*, *P.standingi*); *mutabilis*-Group (*P.mutabilis*, *P.breviceps*); *laticauda*-Group (*P.laticauda laticauda*, *P.laticauda angularis*, *P.serraticauda*, *P.flavigularis*, *P.antanosy*); *lineata*-Group (*P.lineata lineata*, *P.lineata bifasciata*, *P.lineata dorsovittata*, *P.lineata punctulata*, *P.lineata bombetokensis*, *P.pusilla pupilla*, *P.pusilla hallmanni*, *P.quadriocellata quadriocellata*, *P.quadriocellata leiura*, *P.quadriocellata parva*, *P.quadriocellata bimaculata*, *P.quadriocellata lepida*); *modesta*-Group (*cepediana*-Group ?) (*P.leiogaster leiogaster*, *P.leiogaster trautmanni*, *P.leiogaster isakae*, *P.modesta*, *P.cepediana*). *P.dubia*, *P.barbouri* e *P.klemmeri* non vengono inserite in nessun gruppo. Negli ultimi anni sono ulteriormente descritte *P.berghofi*, *P.hielscheri*, *P.malamakibo*, *P.masohoala*, *P.pronki* portando il numero totale di specie a 25.

Le 25 specie di *Phelsuma* endemiche del Madagascar hanno subito una notevole radiazione evolutiva con molte specie specializzatesi in vari habitat (Raxworthy & Nussbaum, 1993; Andreone, 1991). Questa

impressionante radiazione molto probabilmente è stata accompagnata da cambi cromosomici dove mentre la morfologia è rimasta quasi del tutto invariata vi è stato un notevole repatterning dei NORs e dell'eterocromatina. Riguardo alla morfologia fusioni centriche ed inversioni sono i principali riarrangiamenti cromosomici (King, 1987; Ota, 1989; Odierna et al., 1994) infatti due fusioni centriche potrebbero aver originato le prime due coppie di *P.standigi*, mentre inversioni pericentriche potrebbero aver originato sia il sedicesimo paio di cromosomi in *P.dubia* (submetacentrico), il primo paio in *P.cepediana* (De Smet, 1981) sia il primo, secondo e quarto paio in *P.mutabilis* (subtelocentrici). I blocchi di eterocromatina interstiziali lungo molte coppie di cromosomi in *P.dubia*, *P.pusilla*, *P.lineata* e *P.mutabilis* e *P.quadriocellata* possono essere dovute ad inversioni paracentriche (Fig. ...). Molto più complesso è formulare una singola ipotesi per spiegare le differenze nella localizzazione dei NORs osservate nelle varie specie di *Phelsuma*. I singoli NORs trovati in tutte le specie studiate ad eccezione di *P.pusilla* possono essere il risultato di una dominanza nell'espressione di un singolo sito preferenziale mentre i multipli siti NOR trovati in *P.pusilla* potrebbero riflettere una coodominanza (Schubert & Künzel, 1990). In alternativa nelle specie di *Phelsuma* la localizzazione dei NORs in posizione telomerica e/o centromerica, i.e. nelle regioni eterocromatiche dei cromosomi suggeriscono che differenti localizzazioni possono essere il risultato di appaiamento e scambio tra sequenze simili di DNA satellite distribuite nell'eterocromatina di cromosomi non omologhi come suggerito da Gadi & Ryder (1983) per gli Equide.

### *Uroplatus*

Il genere dei geconidi *Uroplatus* Duméril, endemico del Madagascar nel 1989 fu riesaminato da Bauer e Russell che riconobbero sei specie: *alluaudi*, *ebenaii*, *fimbriatus*, *guentheri*, *lineatus* e *sikorae*. Böhme e Ibsch (1990) descrissero una settima specie, che chiamarono *Uroplatus henkeli*. Queste specie di *Uroplatus* furono tentativamente assegnate a tre gruppi di specie: *fimbriatus*-Group che includeva *fimbriatus*, *lineatus*, *sikorae* ed *henkeli*; l'*ebenaii*-Group, che include solo *ebenaii*; e l'*alluaudi*-Group che include *alluaudi* e *guentheri*. Bauer e Russell (1989) posero *U.phantasticus* in sinonimia con *U.ebenaii*. Nussbaum e Raxworthy (1994) descrissero un'altra nuova specie di *Uroplatus*: *U.malahelo* che inclusero nell'*alluaudi*-Group. Le specie del *fimbriatus*-Group sono forme relativamente grosse, con una lunga coda, una grossa testa e muso lungo con la testa depressa e membrana laterale lungo la testa, il collo, il corpo, e gli arti. L'*ebenaii* e l'*alluaudi*-Group consistono di forme piccole, con una coda corta, testa corta e muso corto con la testa non depressa e membrana solo sulla coda. L'*ebenaii*-Group è ulteriormente caratterizzato dall'aver un corpo depresso lateralmente: con spine sparpagliate, dirette posteriormente, sulla superficie dorsolaterale della testa, del collo, del corpo, degli arti e alla base della coda. Le specie dell'*alluaudi*-Group sono invece caratterizzate da una plica dorsoventrale lungo il corpo, senza spine e piccoli tubercoli di scaglie differenziate. Sempre Nussbaum e Raxworthy (1995) descrissero un'altra specie ascrivibile all'*ebenaii*-Group: *U.malama*. Böhle, A. & Schönecker, P (2004) descrissero un'altra specie *U. pietschmanni* ascrivibile

all'*alluaudi*-Group.

A. *fimbriatus*-Group

1. *Uroplatus fimbriatus* (Schneider) 1797
2. *Uroplatus sikorae* (Boettger)
3. *Uroplatus henkeli* (Böhme & Ibisich) 1990

B. *lineatus*-Group

4. *Uroplatus lineatus* (Duméril & Bibron) 1797

C. *alluaudi*-Group

5. *Uroplatus alluaudi* (Mocquard) 1894
6. *Uroplatus guentheri* (Mocquard) 1908
7. *Uroplatus malahelo* (Nussbaum & Raxworthy) 1994
8. *Uroplatus pietschmanni* (Böhle & Schönecker) 2004

D. *ebenaui* –Group

9. *Uroplatus ebenaui* (Boettger) 1879
10. *Uroplatus phantasticus* (Boulenger) 1888
11. *Uroplatus malama* (Nussbaum & Raxworthy) 1995

In tutte le specie di *Uroplatus* studiate (9 delle 11) si osserva una rimarchevole stabilità nel numero e nella morfologia dei cromosomi. Questa uniformità non si può invece estendere alla localizzazione dei cistroni ribosomiali poiché i NORs sono specie specifici e vanno a definire dei gruppi che sono in congruenza con i dati morfologici, gli stessi NORs non sembrano variare all'interno delle specie come si può osservare in *U.sikorae* dove nelle otto popolazioni studiate (Mountagne d'Ambre, Mountagne des Francais, Ifanadiana, Andasibè, Fiherenena, Brikaville, Moramanga e Mandraka) la localizzazione dei NORs rimane invariata. Il gruppo *U. ebenaui* è alquanto controverso infatti molto probabilmente rappresenta un complesso di specie. *U.phantasticus* che Bauer e Russel (1989) posero in sinonimia con *U.ebenaui* dal punto di vista cromosomico si differenzia per avere i NORs ai centromeri della terza coppia piuttosto che ai telomeri della prima coppia, lo stesso avviene per la popolazione di *U.cf. ebenaui* di Montagne d'Ambre dove i NORs sono al centromero degli elementi della nona coppia, per la popolazione di *U.cf. ebenaui* di Ambolokopatrika ai centromeri della terza coppia mentre la popolazione di *U.cf. ebenaui* di Fiherenena sono due coppie, la terza e la sedicesima sempre in posizione centromerica. Come è stato dimostrato in vari pesci

teleostei, e.g. Cyprinidae (Amemeyia & Gold, 1988), Sternopygidae (Foresti de Almeida-Toledo et al., 1993), Salmonidae (Phillips et al., 1988; Lozano et al., 1992) che cambi nella comune localizzazione dei NOR potrebbe avere una particolare rilevanza negli studi filogenetici. Inoltre queste popolazioni differiscono anche morfologicamente sia per la taglia che per le spicole che caratterizzano l'epidermide e per la morfologia degli emipeni (Fig. 19). Per questi motivi queste popolazioni vengono elevate a rango specifico e in questo lavoro vengono indicate come *Uroplatus* specie nova I (popolazione di Mountagne d'Ambre), *Uroplatus* specie nova II (popolazione di Ambolokopatrika) e *Uroplatus* specie nova III (popolazione di Fiherenena).

Come si può osservare dalla figura 20 le regioni centromeriche di *U. sikorae* appaiono positive dopo bandeggio-C ad entrambi i fluorocromi basi specifici. Per spiegare questo fenomeno si possono avanzare due ipotesi: una prima ipotesi prevede che nella regione considerata sia presente una sola classe di DNA altamente ripetuto la cui sequenza monometrica è caratterizzata da alcuni tratti di sequenza ricche in A+T (DAPI positive) ed altri ricchi in G+C (CMA positive). La seconda ipotesi prevede invece l'esistenza di due famiglie di DNA ripetute, una ricca in A+T e l'altra in G+C, ciascuna contenuta in singole unità cromomeriche più o meno alternate nella banda eterocromatica.

Un'ulteriore considerazione va fatta per l'eteromorfismo rinvenuto a carico delle femmine di *U. alluaudi* e *U. phantasticus* dove la prima coppia è eteromorfa a causa di un'inversione pericentrica che ha reso uno dei due elementi acrocentrici subtelocentrico e nella femmina di *U. ebenau* dove invece un elemento probabilmente appartenente alla quindicesima coppia differisce per il contenuto di eterocromatina. Questi eteromorfismi vanno ascritti molto probabilmente a sistemi di cromosomi sessuali di tipo ZW. Il rinvenimento della presenza di cromosomi sessuali in tre specie appartenenti a gruppi differenti testimonia che l'insorgenza di tali eteromorfismi è avvenuta separatamente.

### *Paroedura*

Dixon e Kroll (1974) riesumarono *Paroedura* Günther, 1879, come un genere di gechi del Madagascar-Comore dall'eterogeneo e ampiamente distribuito *Phyllodactylus*, descrivendo una nuova specie e apportando una più recente revisione del gruppo. Essi riconobbero nove specie: *P. androyensis* (Grandidier), *P. bastardi* (Mocquard), *P. gracilis* (Boulanger), *P. guibeae* Dixon and Kroll, *P. homalorhina* (Angel), *P. oviceps* (Boettger), *P. picta* (Peters), *P. sanctijohannis* Günther (l'unica specie endemica delle Comore), e *P. stumpffi* (Boettger). Nussbaum e Raxworthy (1994) descrissero una decima specie, *P. masobe*, dalla Riserva di Zahamena, Madagascar e inserirono anche i dati sull'ecologia delle specie del Madagascar. Nussbaum e Raxworthy (2000) in un lavoro sulla revisione sistematica del genere descrissero ulteriori 5 nuove specie *P. maingoka*, *P. karstophila*, *P. tanjaka*, *P. vahiny* e *P. vazimba* e misero in sinonimia *P. guibeae* con *P. bastardi*. Mocquard (1909) e susseguenti autori (Angel, 1942; Guibé, 1956) avanzarono l'ipotesi di

suddividere il genere *Paroedura* in due gruppi in base alla posizione delle narici in relazione alle squame circostanti. In un gruppo che Nussbaum e Raxworthy (2000) definirono come *picta*-Group, le narici sono escluse dal contatto con la squama rostrale dalla posizione della prenatale (=sopranasale). Nel secondo gruppo sempre definito da Nussbaum e Raxworthy (2000) come *santijohannis*-Group le narici vengono in contatto con l'angolo dorsolaterale della rostrale. Più in generale *picta*-Group è ristretto alla regione sud-sudovest del Madagascar in habitat secchi, mentre il *santijohannis*-Group è distribuito nelle regioni centrooccidentali e nel nord del Madagascar e generalmente si rinvengono in habitat piovosi, spesso foreste pluviali. È comunque da evidenziare che al di fuori della posizione delle narici non vi è nessuna evidenza che i due gruppi siano monofiletici.

#### A. *picta*-Group

1. *Paroedura androyensis* (Grandidier), 1867
2. *Paroedura bastardi* (Mocquardd), 1900
3. *Paroedura maingoka* (Nussbaum e Raxworthy), 2000
4. *Paroedura picta* (Peters), 1854
5. *Paroedura vahiny* (Nussbaum e Raxworthy), 2000

#### A. *santijohannis* -Group

6. *Paroedura gracilis* (Boulanger), 1896
7. *Paroedura homalorhina* (Angel), 1936
8. *Paroedura loatsara* (Glaw e Vences) 1998
9. *Paroedura masobe* (Nussbaum e Raxworthy), 1994
10. *Paroedura oviceps* (Boettger), 1881
11. *Paroedura karstophila* (Nussbaum e Raxworthy), 2000
12. *Paroedura sanctijohannis* (Günther), 1879
13. *Paroedura stumpffi* (Boettger), 1879
14. *Paroedura tanjaka* (Nussbaum e Raxworthy), 2000
15. *Paroedura vazimba* (Nussbaum e Raxworthy), 2000

L'ipotesi di suddividere il genere *Paroedura* in due gruppi in base alla posizione delle narici, in relazione alle squame circostanti, non viene avvalorata su base cromosomica infatti nel *picta*-Group *P. picta* possiede

lo stesso pattern cromosomico delle specie *P. loatsara*, *P. oviceps* (dato non mostrato), *P. karstophila*, *P. stumpffi* e *P. vazimba* dello *santijohannis* –Group. Tale cariotipo può essere considerato quello ancestrale (successivamente sarà definito cariotipo standard) mentre *P. androyensis* (dato non mostrato) e *P. bastardi* del *picta*-Group, *P. gracilis* e *P. masobe* dello *santijohannis* –Group mostrano dei cariotipi derivati. Il cariotipo della *P. masobe* può essere derivato dal cariotipo standard attraverso una semplice inversione pericentromerica della prima coppia. In quello di *P. bastardi* invece una fusione centrica tra due coppie (ipoteticamente la quarta e la settima) ha formato la prima coppia mentre in *P. gracilis* di Fiherenena sono intervenuti ulteriori eventi di fusioni centriche, tra la prima e seconda coppia del cariotipo standard che ha formato la prima coppia e tra la quinta e la sesta sempre del cariotipo standard che ha dato luogo alla quarta coppia. I tre elementi che non si appaiono sono molto probabilmente un sistema di cromosomi sessuali di tipo  $Z_1Z_2W$  nel quale l'elemento W deriva da due elementi acrocentrici che subiscono una fusione centromerica. Riguardo alle popolazioni di *P. cf. gracilis* provenienti da Ambolokopatrika e Mountagne d'Ambre queste risultano cromosomicamente differenziate e gli esemplari di queste popolazioni risultano anche differenziate morfologicamente nel pattern di colorazione. Infatti mentre gli esemplari della popolazione di Fiherenena presentano le tipiche bande nere longitudinali sul dorso, gli esemplari delle due popolazioni di *P. cf. gracilis* posseggono bande trasversali. A causa di queste differenze e considerando che in tutte le popolazioni studiate di *P. bastardi* e *P. stumpffi* non sono state riscontrate differenze a carico dei cromosomi è verosimile ipotizzare che queste due popolazioni siano due specie diverse ed in questo contesto verranno nominate come *Paroedura* specie nova I, la popolazione di Mountagne d'Ambre, e *Paroedura* specie nova II gli esemplari di Ambolokopatrika. La *Paroedura* specie nova II possedendo il cariotipo standard all'interno del *gracilis*-Group si va a posizionare alla base, infatti *Paroedura* specie nova I possiede un cariotipo derivato attraverso un evento di fissione a carico della coppia metacentrica. Tali eventi molto probabilmente sono quelli che facilitano successivamente ulteriori riarrangiamenti come quelli di fusioni centriche creando delle regioni istabili.

### *Lygodactylus e Microscalabotes*

Paster (1965) ipotizzò che il monotipico genere *Microscalabotes* sia stato il solo sopravvissuto di un'antica invasione del genere *Lygodactylus* dall'Africa al Madagascar. Inoltre è stato proposto che un antenato *L. capensis*-like africano sia stato l'antenato delle quattro radiazioni nel Madagascar: un gruppo occidentale ed uno meridionale (entrambi inclusi nel sottogenere *Lygodactylus*), un gruppo orientale (sottogenere *Domerguella*) ed uno dall'areale geografico ristretto, di altitudine elevate (sottogenere *Millotisaurus*) (Paster, 1965, 1977a, 1995; Paster & Blanc 1967, 1973). I dati cromosomici confermano che molto probabilmente il genere *Microscalabotes* si pone alla base della radiazione evolutiva del gruppo. Al contrario, escludendo *Lygodactylus (Millotisaurus) mirabilis*, indicano che questo genere è monofiletico a differenza di quanto ipotizzato da Kluge & Nussbaum (1995) che ritennero il gruppo parafiletico. Infatti *L. sp* provenienti dalla costa occidentale presenta un cariotipo simile a quello di *Microscalabotes* mentre la popolazione di *L. cf. miops* proveniente da Ranomaphana presenta un cariotipo a 38 cromosomi con una

fusione centrica ipoteticamente tra la sesta e settima coppia e con i NORs localizzati nella stessa posizione di *Microscalabotes*. *L. cf. tuberosus* di Tulear invece pur presentando lo stessa formula cromosomica *L. cf. miops* si differenzia per la presenza dei NORs sui braccini corti della seconda coppia e nelle femmine per possedere la prima coppia eteromorfica con uno dei due elementi metacentrici che ha subito un'ulteriore inversione pericentrica divenendo un elemento acrocentrico delle stesse dimensioni dell'elemento biarmed. Tale eteromorfismo può essere ascritto ad un sistema di cromosomi sessuali di tipo ZW. Le popolazioni sono ulteriormente derivate, infatti in entrambe il numero cromosomico è ridotto a 36 elementi. Un ulteriore evento di fusione centrica deve essere intervenuto a carico della prima coppia e di una tra le più piccole formando in questo modo la seconda coppia subtelocentrica. Anche in queste popolazioni i cistroni ribosomiali sono localizzati sui braccini corti della terza coppia (seconda se comparata a *L. cf. miops*). Le due popolazioni si differenziano ulteriormente poiché le femmine della popolazione di Forotofuzi sono risultate eteromorfiche per una coppia di cromosomi. Tale sistema di cromosomi sessuali di tipo ZW è estremamente peculiare infatti bisogna ipotizzare che nelle femmine sia intervenuto in primo luogo un evento di fusione tra due autosomi formando un sistema di tipo AA nel maschio e W0 nella femmina. Il neoformato cromosoma W estremamente instabile ha subito in seguito una rottura nella regione interstiziale di un braccio dando vita a due cromosomi: uno subtelocentrico ed un microcromosoma. *L. mirabilis* invece possiede un cariotipo formato da 38 elementi di cui le prime due coppie sono notevolmente più grandi delle restanti e addizionalmente differisce dalle altre specie del gruppo per possedere due coppie che portano i NORs. In conclusione possiamo ipotizzare che le varie specie del genere *Lygodactylus* derivino da un cariotipo *Microscalabotes*-like, anzi molto probabilmente il genere *Microscalabotes* potrebbe essere messo in sinonimia con *Lygodactylus*. *L. mirabilis* appartiene molto probabilmente ad una differente radiazione proveniente dall'Africa e molto probabilmente anche successiva. Qui si propone di rivalutare il genere *Millotisaurus*. Infine all'interno di questo gruppo i cromosomi sessuali sono comparsi indipendentemente nelle varie specie.

#### *Ebenavia – Matoatoa – Blasiodactylus – Geckolepis*

Il genere *Ebenavia* possiede un cariotipo molto simile se non uguale alle specie appartenenti al genere *Phelsuma* e quindi sembra essere correlato filogeneticamente con questo formando un raggruppamento naturale. *Geckolepis* invece possiede un cariotipo che può essere facilmente derivato da uno *Microscalabotes*-like dove una fusione tra la prima coppia e una tra le più piccole potrebbe essere la causa della riduzione del numero diploide a 38 e della formazione della prima coppia subtelocentrica. Anche *Matoatoa* possiede un cariotipo simile al gruppo *Lygodactylus* anche se per avvalorare quest'ipotesi si devono supporre riarrangiamenti molto complessi. Infatti *Matoatoa* possedendo un cariotipo a 34 elementi con la prima coppia submetacentrica, la seconda coppia, la prima acrocentrica, più grande delle altre, la sedicesima metacentrica e possedendo inoltre dei braccini molto corti su tutti i cromosomi acrocentrici molto probabilmente è derivato da un cariotipo *Microscalabotes*-like. In questo caso sarebbero intervenuti due eventi di fusione centrica, uno a carico delle coppie 5-12 per formare la prima coppia e uno a carico

delle due coppie più piccole a formare la sedicesima coppia. La seconda coppia potrebbe essere derivata o da un'iniziale fusione centrica tra due coppie di media grandezza a formare un elemento metacentrico e, successivamente, un'inversione pericentromerica ha dato origine all'elemento acrocentrico. Un'ulteriore spiegazione, più parsimoniosa, potrebbe essere una fusione telomero-centromero. Il genere *Blasiodactylus* possiede un cariotipo non derivabile dagli altri generi endemici del Madagascar sia per il numero e la morfologia che per la peculiare composizione dell'eterocromatina. Tale peculiarità è riscontrabile solo in alcuni generi di geconidi del Nord Africa (*Tarentola* e *Ptyodactylus*). Il genere *Blaesodactylus* era considerato un sottogenere del genere africano *Homopholis* (Glaw & Vences, 1994); Kluge & Nussbaum (1995) l'avevano elevato a rango generico e considerandolo un sister taxon di *Homopholis*. I dati cromosomici su *Blaesodactylus sakalava* comparati con quelli in letteratura (De Smet, 1981) su *Homopholis wahlbergii* ( $2n=36$  con 4 coppie biarmed) indicano che molto probabilmente i due taxa non derivano da un antenato comune.

### *Tarentola*

Carranza et al. (2002) in base a uno studio basato su sequenze mitocondriali (cit b e 12S) e nucleari (c-mos) considerarono *Geckonia chazaliae* una specie del genere *Tarentola* appartenente al clado delle specie delle isole occidentali delle Canarie e delle Isole di Capoverde. Dal punto di vista cromosomico si conferma questa evidenza infatti *T.(Geckonia) chazaliae* possiede un cariotipo simile a quello delle altre specie di *Tarentola*. Le variazioni nella morfologia dei cromosomi tra le varie specie del genere e tra le varie popolazioni di *T.mauritanica* riguardano prevalentemente il numero di elementi biarmed delle ultime cinque coppie e la dimensione dei braccini corti delle prime 16 coppie acrocentriche. La differenza nella lunghezza di questi braccini potrebbe essere dovuta a differenti livelli di amplificazione di sequenze di DNA satellite contenute nell'eterocromatina come suggerito per varie specie come insetti *Caledia captiva* (Shaw et al., 1976), l'iguanide *Tropidurus torquatus* (Kasahara et al., 1983) e in varie specie di *Thomomys* (Patton & Sherwood, 1982). Tuttavia l'eterocromatina potrebbe non essere sempre la diretta responsabile per la variazione del numero degli elementi biarmed negli ultimi cinque paia di cromosomi omologhi. Infatti solo alcuni di questi elementi contengono eterocromatina e solo in piccola quantità. Quindi queste differenze osservate potrebbero essere dovute allo spostamento del centromero a causa di inversioni pericentriche. La capacità di questi elementi ad essere sottoposti a riarrangiamenti potrebbe dipendere dalla quasi mancanza di eterocromatina associata alla presenza di bande G positive (Odierna et al., 1994). Questa ipotesi è in accordo con Kaback et al.(1992) che gli elementi più piccoli di un corredo cromosomico sono sottoposti ad un maggior numero di ricombinazioni che quelli più grandi e in aggiunta l'eterocromatina impedisce le ricombinazioni meiotiche (John, 1988) mentre gli enzimi competenti a ritrovare e riparare i riarrangiamenti cromosomici sono meno attivi nelle regioni contenenti bande G positive (Boulikas, 1992). Le variazioni tra le popolazioni rinvenute sono fissate e potrebbero essere il sintomo di eventi di speciazione incipiente infatti Harris e coautori (2004) studiando la variazione genetica (12S, 16S e c-mos) in *Tarentola mauritanica* ritrovano che le popolazioni del Nord Marocco sono ben differenziate e lo stesso vale per le popolazioni del

Marocco centrale e meridionale che si separano da quelle europee. *T.mauritanica fascicularis* differisce fondamentalmente per la posizione dei NORs dalle altre popolazioni di *T.mauritanica* dove tale localizzazione non varia. E' stato mostrato in vari pesci teleostei, come i Cyprinidae (Amemiya & Gold, 1988), Sternopygidae (Foresti de Almeida-Toledo et al., 1993), Salmonidae (Phillips et al., 1988; Lozano et al., 1992) che una diversa localizzazione dei NORs potrebbe avere una particolare importanza negli studi filogenetici. Quindi la differente localizzazione dei NORs unita alla differenziazione morfologica e molecolare ci consente di ipotizzare una differenziazione di tipo specifico piuttosto che sottospecifico.

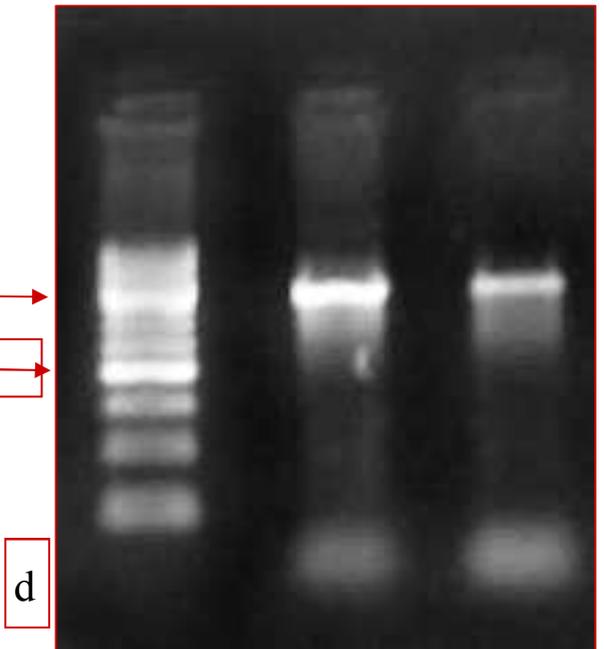
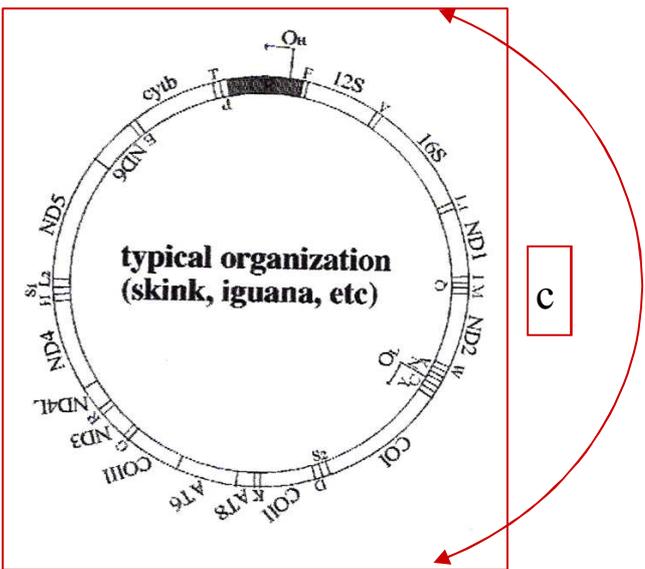
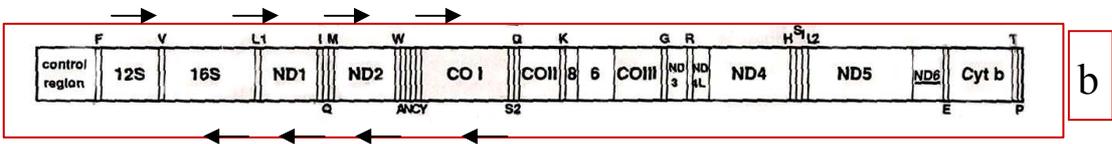
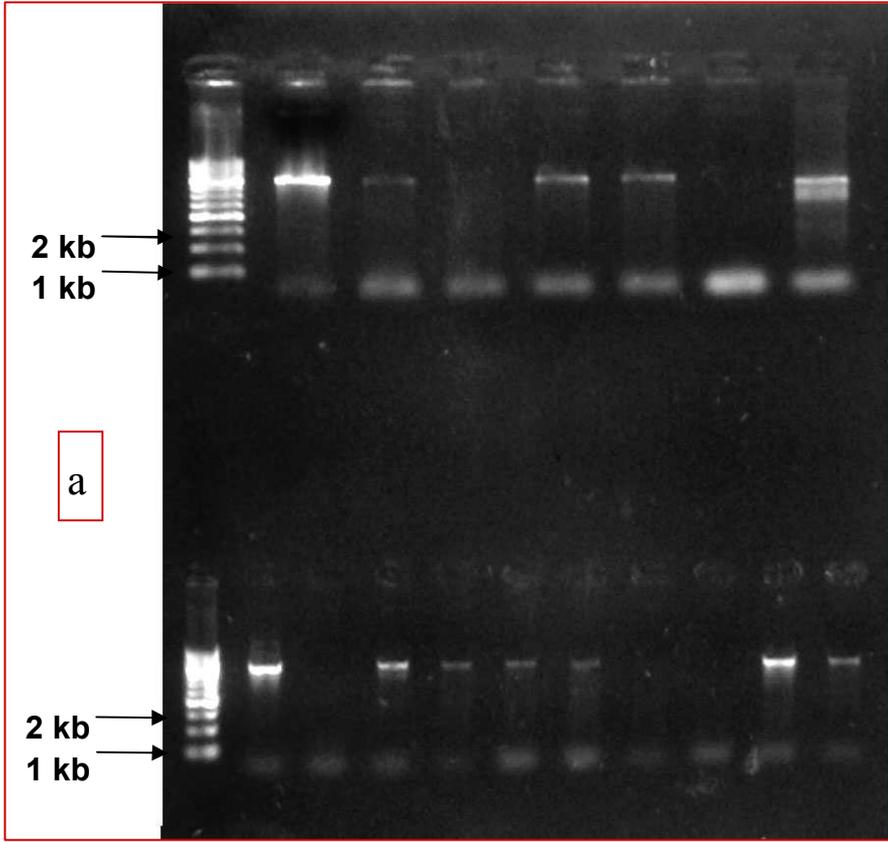
## 6. CONCLUSIONI

Nei tre anni di dottorato sono state compiute tre missioni in Madagascar ed una in Marocco, per un totale di circa cinque mesi, durante le quali sono stati raccolti circa 400 esemplari di geconidi appartenenti ad 80 specie di 16 differenti generi. Tutti gli esemplari sono stati prelevati direttamente sul campo e successivamente sono stati processati in laboratorio a Napoli per ottenere i cromosomi ed il DNA. Inoltre sono stati studiati altri 50 esemplari avuti tramite collaborazioni o comprati presso rivenditori specializzati. Quindi, in totale, sono stati analizzati i cariotipi di circa 450 esemplari appartenenti a 95 specie di ben 23 generi.

Rispetto al cospicuo numero di specie appartenenti ai Gekkonidae, a tutt'oggi meno del 5% delle forme esistenti sono state cariotipate, e solo alcune aree geografiche, Australia, sono state ben studiate. Quindi poiché, in letteratura, esistono solo pochi studi cromosomici su specie provenienti dagli altri continenti, i dati ottenuti sono quasi del tutto originali con ben oltre il 90% delle specie e 9 generi mai investigati e ci aiutano a comprendere meglio l'evoluzione cromosomica all'interno della famiglia dei Gekkonidae.

Nel presente lavoro di dottorato mi sono concentrato prevalentemente sulla radiazione evolutiva dei Gekkonidae del Madagascar e Nord Africa dove ho rinvenuto ben cinque nuove specie di cui tre appartenenti al genere *Uroplatus* e due al genere *Paroedura* (Madagascar) ed elevato a rango tassonomico di specie una sottospecie di *Tarantola mauritanica* del Nord Africa.

Vengono anche descritti vari sistemi di cromosomi sessuali femminili di tipo ZW, questi dati confermano quelli già noti in letteratura per 5 specie australiane: *Gehyra australis*, *G. purpurascens*, *Heteronotia binomi*, *Phyllodactylus marmoratus* e *P. lanei* (King & Rofe, 1976; King, 1977, 1981; Moritz, 1984). Queste maggiori conoscenze sui cromosomi sessuali dei geconidi ci aiutano a mettere in discussione l'evidenza, per altro poco chiara di un eteromorfismo maschile di tipo XY in *Gekko gecko* (Solleder & Schmid, 1984). I dati presentati dimostrano che nei vari generi, *Lygodactylus*, *Paroedura* ed *Uroplatus*, dove sono stati rinvenuti eteromorfismi di tipo sessuale, l'eterogametia è sempre femminile ed avvenuta separatamente nei vari taxa. Le tecniche di bandeggio utilizzate quali quelle dell'AgNOR, del c-banding e dei marcatori



- Fig. 29. a) immagine di corse degli amplificati del 12S + 16S un gel di agarosio al 2%
- b) mappa della regione del DNA mitocondriale. Le frecce indicano le regioni dove sono stati costruiti i primers
- c) schema della tipica organizzazione del DNA mitocondriale nei rettili. La freccia indica la regione amplificata
- d) amplificazione della regione ND-1 e ND-2 su *Tarentola mauritanica*

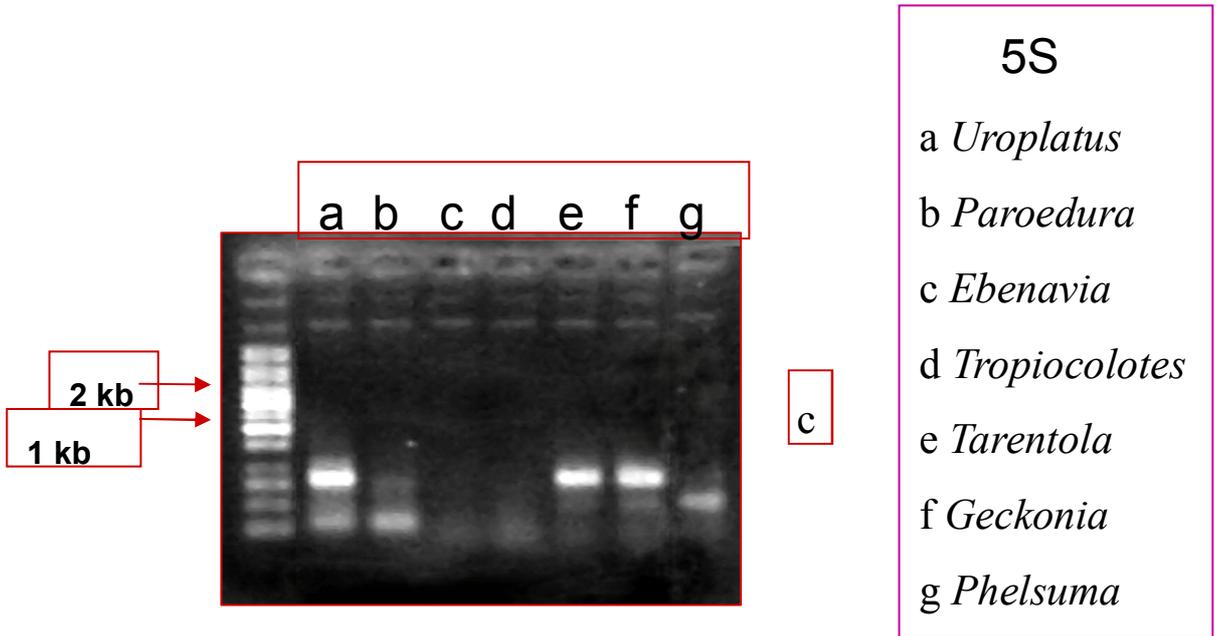
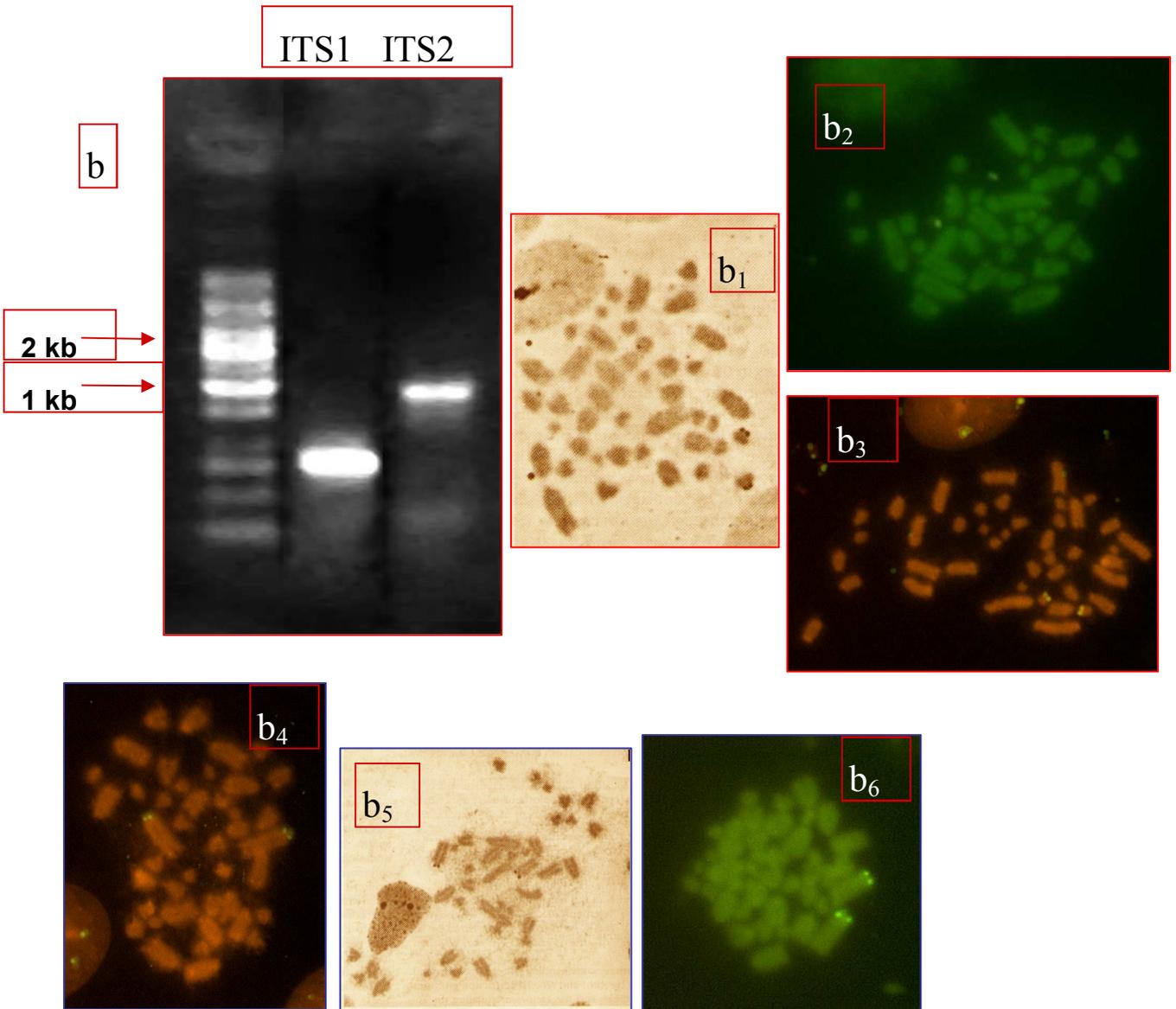
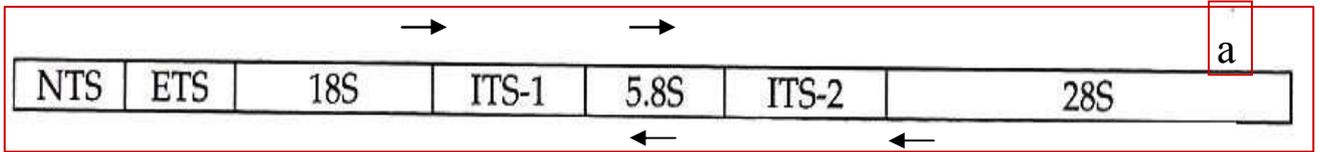


Fig. 30. a) mappa della regione del DNA ribosomiale. Le frecce indicano le regioni dove sono stati costruiti i primers

b, b1, b2 e b3) *Tarentola mauritanica mauritanica*: b) amplificazione dell'ITS-1 e ITS-2; B1) Ag-NOR; b2) CMA3/Mg; b3) ibridazione in situ con sonda ribosomiale. b4, b5 e b6) *Tarentola mauritanica fascicularis*: b5) Ag-NOR; b6) CMA3/Mg; b4) ibridazione in situ con sonda ribosomiale.

c) amplificazione della regione 5S in vari generi di geconidi

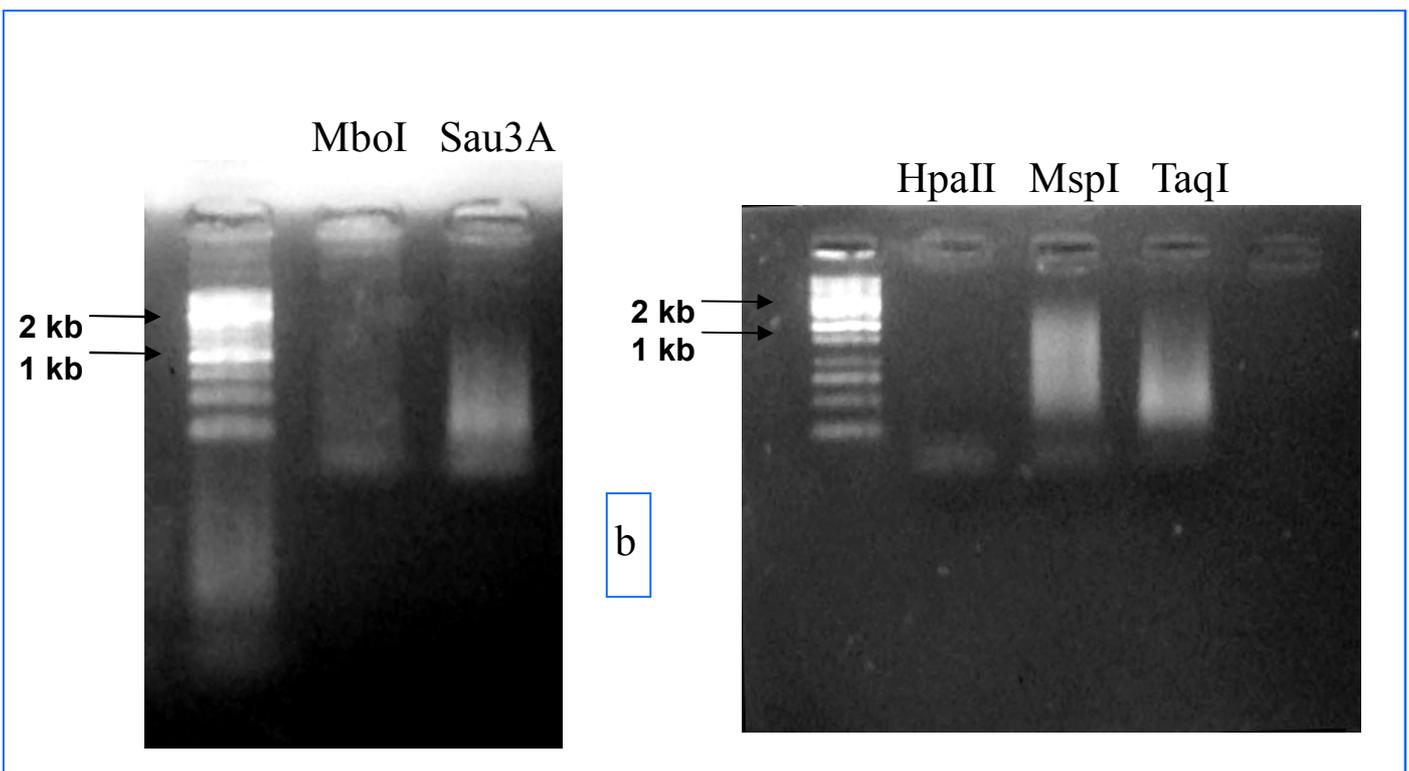
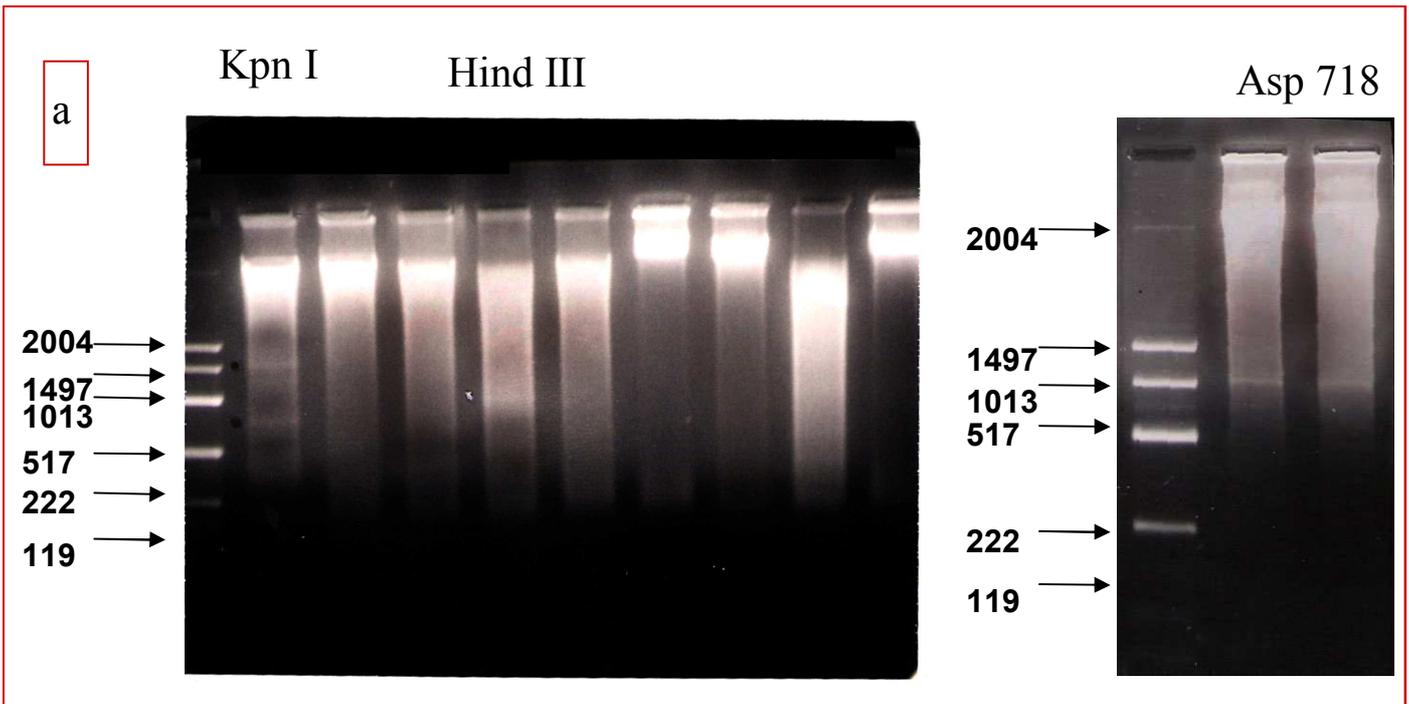


Fig. 31. a) Le immagini mostrano il DNA genomico intero di *Tarentola mauritanica fascicularis* digerito da vari endonucleasi di restrizioni. Nell'immagine si possono delle bande sui DNA lasciate dagli enzimi Kpn I, Hind III e Asp 718

b) Le immagini mostrano il DNA di *Tarentola mauritanica fascicularis* dopo amplificazione con linker-adapter



fluorescenti quali DAPI e Cromomicina A<sub>3</sub> mi hanno permesso di caratterizzare le specie all'interno dei vari taxa e di evidenziare alcune caratteristiche molecolari della cromatina che sono risultate essere anche utili a livello tassonomico e filogenetico.

Poiché durante gli ultimi due decenni, le sequenze di DNA sono divenute lo strumento dominante nell'individuare le relazioni filogenetiche tra la vasta varietà di organismi, in questi tre anni ho anche estratto da tutti gli esemplari i DNA che sono stati utilizzati per amplificare, tramite PCR utilizzando primers universali, la regione del DNA mitocondriale dal 12s al 16s per un totale di circa 1900 coppie di basi. In alcuni esemplari delle varie specie sono state anche amplificate le regioni del ND1, ND2 e COI sempre del mtDNA per un totale di oltre 6000 coppie di basi. Sono state anche amplificate le regioni, correlate agli organizzatori della regione nucleolare (NORs), dei trascritti interni degli rDNA (ITS1 e ITS2) comprese tra le regioni del 18S e 5,8S il primo e tra il 5,8S e il 28S il secondo. La scelta di queste regioni è dovuta al fatto che dai dati in letteratura (prevalentemente su piante, invertebrati e pesci) si è visto che sono degli ottimi marcatori molecolari a livello generico, infatti la loro evoluzione è più rapida delle regioni che li fiancheggiano ma meno di altre regioni come quelle degli NTS. Inoltre è stata anche amplificata la seconda famiglia ribosomiale che codifica per il 5S rRNA. Dal momento che le sequenze nucleotidiche e la posizione di queste due famiglie multigeniche possono contribuire alla conoscenza della struttura, organizzazione ed evoluzione del genoma sono state create delle sonde fluorescenti che successivamente ho ibridato sui cromosomi di *Tarentola mauritanica*.

Inoltre nonostante che la schiacciante maggioranza degli studi molecolari sulla sistematica degli animali ha visto l'utilizzo di geni mitocondriali per i quali sono conosciuti primer universali (Kocher et al., 1989), nonostante che i geni mitocondriali rappresentano solo una piccolissima parte delle decine di migliaia di loci che compongono il genoma degli animali e nonostante il recente completamento di vari progetti genomici, il genoma nucleare della quasi totalità delle specie rimane inesplorato, eppure esso rimane un notevole pozzo da cui poter attingere informazioni sulla filogenesi.

Per questo motivo sono stati anche amplificati sempre tramite PCR i geni nucleari a singola copia (  $\alpha$ -enolase,  $\beta$ -cristallina, *c-mos*, rodopsina introne 3, apolipoprotein B esone 29, creatine kinase (CK) introne 6, fattore di allungamento 1 $\alpha$  introne 1,  $\beta$ -tubulina introne 1-3, fattore di istocompatibilità maggiore classe II introne 2, *c-myc* esone 2 e 3 e introne B,  $\beta$ -fibrinogeno introne 7). I prodotti di PCR relativi al gene del *c-mos* sono stati anche sequenziati. L'analisi delle sequenze purtroppo non ha risolto le divergenze tra i differenti taxa poiché le sequenze erano quasi del tutto uguali presentando troppe poche sostituzioni per risolvere i rapporti filogenetici all'interno della radiazione africana dei geconidi. Infatti mentre Donnellan et al. (1999) utilizzando le sequenze di questo gene insieme con 12S rRNA, per investigare le relazioni esistenti tra i geconidi australiani, dimostrò che i Diplodactylinae erano un gruppo monofiletico e poteva essere considerato una derivazione dei pigopodidi. I suoi risultati confermarono anche che i pigopodidi appartengono ai Gekkota e che pigopodidi più diplodactylini formano un gruppo monofiletico. Tuttavia i

suoi risultati non corroborano la monofilia dei Carphodactylini dentro i Diplodactylinae. Lo stesso autore dimostra l'utilità del c-mos nella ricostruzione della filogenesi dei geconidi dato poi confermato da Harris et al. (2001) su un campione di 13 generi. Per testare le relazioni tra i geconidi Han et al. (2004) analizza sequenze del c-mos rappresentative di 41 generi di gechi e pigopodidi costituenti il 35% del totale e rappresentativi degli Eublepharidae, Pygopodinae, Diplodactylinae, Gekkoninae, Teratoscincinae e Sphaerodactylini sensu Kluge (1987). I loro risultati indicarono che il gene del c-mos porta una buona risoluzione per la maggior parte delle relazioni filogenetiche dentro le linee filetiche della regione est-gondwaniana, e tra i generi negli Eublepharidae. Ma lo stesso gene non si rivelò informativo dentro i Gekkonidae, supportando l'idea che le diverse linee dei geconidi sono sostanzialmente di differente età. Se come ipotizzato dai dati immunologici di King (1987) le divergenze tra i Carphodactylidae e i Diplodactylidae sono in un ordine di circa 66 milioni di anni, questo potrebbe avvallare lo scenario dell'apertura del mare della Tasmania come un evento geologico rilevante alla cladogenesi dentro la radiazione evolutiva est-gondwaniana. Sebbene attraverso il mtDNA si è stabilito che le divergenze intrageneriche nei geconidi (Gekkonidae) nell'ordine di 5-20 o più milioni di anni (Lamb and Bauer, 2000, 2002; Bauer and Lamb, 2002; Carranza et al., 2002; Austin et al., 2004) sono state invece stabilite le distanze intergeneriche. Questo potrebbe significare che i rappresentanti dei Gekkonidae sono stati sottoposti a una radiazione che è stata troppo recente per essere risolta adeguatamente dal c-mos o che questa radiazione sia successa troppo velocemente per avverarsi un pattern di sostituzioni. da riflettere le relazioni filogenetiche. In generale è difficile da predire a priori se un determinato gene potrà essere informativo per un particolare gruppo finché l'analisi filogenetica non è condotta (Graybeal, 1994; Mitchell et al., 2000).

In ultimo è stato trovato un DNA satellite e sequenze intersperse altamente ripetute in *Tarentola mauritanica*. Su quest'ultima specie sono state anche saggiate tecniche molecolari quali ibridazione in situ con una sonda ribosomiale e autoamplificazione del DNA satellite mediante PCR (GSP-PCR) che potrà essere utilizzata nelle specie tropicali dove si possiede troppo poco DNA genomico da poter studiare in modo classico i DNA satelliti ed è stato anche iniziato un lavoro di creazione di una DNA library utile per trovare sequenze SINE, LINE e microsatelliti.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Adacchi J, Watanabe K, Fukui K, Ohmico N, Kosuge K, 1997: Chromosomal localization and reorganization of the 45S and 5S rDNA in the *Brachyscome lineariloba* complex (Asteraceae). *J Plant Res* 110:371-377
- Amarasinghe V, Carlson JE, 1998: Physical mapping and characterization of 5S rRNA genes in douglas-fir. *Am Gen Assoc* 89:495-500
- Amemeiya C, Gold JR, 1988: Chromosomal NOR as taxonomic and systematic characters in North American cyprinidae fishes. *Genetica* 76:81-90
- Andreone F, 1991a: Reptile field records from Malagasy rainforests. *Bollettino del museo Regionale di Scienze Naturali di Torino* 9:437-460
- Andreone F, 1991b: Conservation aspects of the herpetofauna of the Malagasy rain forest. *Zoological Society "La Torbiera"- Scientific Reports* 1:1-45
- Andrews MT, Vaughn JC, Perry BA, Bagshaw JC, 1987: Interspersion of histone and 5S rRNA genes in *Artemia*. *Gene* 51:61-67
- Angel F, 1942: Les lézards de Madagascar. *Mém L'Académie Malgache* 36:193pp, 22pls
- Apra G, Odierna G, Capriglione T, Caputo V, Morescalchi A, Olmo E, 1996: Heterochromatin and NOR distribution in the chromosomes of six gekkonid species of the genus *Phelsuma* (Squamata: Gekkonidae). *J African Zoology* 110 (5): 341-349
- Arrighi FE, Hsu TC, 1971: Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10:81-86
- Austin JJ, Arnold EN, Jones CG, 2004: Reconstructing an island radiation using ancient and recent DNA: the extinct and living day geckos (*Phelsuma*) of the Mascarene islands. *Mol Phyl Evol* 31:109-122
- Baldwin B, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ, 1995: The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann MO Bot Gard* 82:247-277
- Baker RH, DeSalle R, 1997: Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. *Syst Biol* 46:654-673
- Baker R J, Wichman HA, 1990: Retrotransposon *mys* is concentrated on the sex chromosomes: implications for copy number containment. *Evolution* 44:2083-2088
- Bauer AM, 1990a: Phylogenetic systematics and biogeography of the Carphodactylini (Reptilia: Gekkonidae). *Bonner Zoologische Monographien* 30:1-217

- Bauer AM, 1990b: Phylogeny and biogeography of the geckos of southern Africa and the islands of the western Indian Ocean: a preliminary analysis. In: Peters G & Hutterer R (Eds.), *Vertebrates in the Tropics*. Museum Alexander Koenig, Bonn:275-283
- Bauer AM, Lamb T, 2002: Phylogenetic relationships among members of the *Pachydactylus capensis* group of southern African geckos. *African Zoology* 37:209-220
- Bauer AM, Russell AP, 1989: A systematic review of the genus *Uroplatus* (Reptilia: Gekkonidae), with comments on its biology. *J Nat Hist* 23:169-203
- Bernardi G, Olofsson B, Filipski J, Zerial M, Salinas J, Cuny G, Meunier-Rotival M, Rodier F, 1985: The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. *Science* 228:953-958
- Böhle A, Schönecker P, 2004: Eine neue Art der Gattung *Uroplatus* Dumeril, 1805 aus Ost-Madagaskar (Reptilia: Squamata: Gekkonidae). *Salamandra* 2003 (4):129-138
- Böhme W, Ibsch P, 1990: Studien an *Uroplatus*. I. Der *Uroplatus-fimbriatus*-Komplex. *Salamandra* 26:246-259
- Börner AR, 1972: Revision der Geckonidengattung *Phelsuma* Gray 1825. *Saurologica* 1:1-145
- Börner AR, 1984: On the taxonomy of the Indian Ocean lizards of the *Phelsuma madagascariensis* species group (Reptilia: Gekkonidae). *Journal of the Bombay Natural History Society* 81:243-281
- Boulikas T, 1992: Evolutionary consequences of nonrandom damage and repair of chromatin domains. *J mol Evol* 35:156-180
- Brown TA, 1999: *Genomes*. John Wiley and Sons, New York.
- Brown WC, Alcalá AG, 1957: Viability of lizard eggs exposed to sea water. *Copeia* 1:39-41
- Brown WM, George Jr M, Wilson C, 1979: Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1967-1971
- Buntjer JB, Lenstra JA, 1998: Self-amplification of satellite DNA in vitro. *Genome* 41:429-434
- Carranza S, Arnold EN, Mateo JA, Geniez P, 2002: Relationships and evolution of the North African geckos, *Geckonia* and *Tarantola* (Reptilia: Gekkonidae), based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol Phyl Evol* 23:244-256
- Cavalier-Smith T, 1991: Coevolution of vertebrate genome, cell and nuclear size. In Ghiara et al., (eds), *Selected Symposia and Monographs UZI, Mucchi, Modena* 4:51-86
- Cremisi F, Vignali R, Batistoni R, Barsacchi G, 1988: Heterochromatic DNA in *Triturus* (Amphibia, Urodela) II. A centromeric satellite DNA. *Cromosoma* 97:204-211
- Cummings MP, Otto SP, Wakeley J, 1995: Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 12:814-822
- DeBry RW, Seshadri S, 2001: Nuclear intron sequences for phylogenetics of closely related mammals: An example using the phylogeny of *Mus*. *J Mammal* 82:280-288

- Deininger P, Daniels G, 1986: The recent evolution of mammalian repetitive DNA elements. *Trends Genet* 2:76-80
- del Pino EM, Murphy C, Masson PH, Gall JG, 1992: 5S rRNA-encoding genes of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Gene* 111: 235-238
- De Smet WHO, 1981: Description of the orcein stained karyotypes of 27 lizard species (Lacertilia, Reptilia) belonging to the families Iguanidae, Agamidae, Chamaeleonidae and Geckkonidae (Ascalabota). *Acta Zool Pathos Antverpiensia* 76:53-72
- Dixon JR, Kroll JC, 1974: Resurrection of the generic name *Paroedura* for the phyllodactyline geckos of Madagascar, and description of a new species. *Copeia* 1974:24-30
- Doolittle WF, Sapienza C, 1980: Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284:601-603
- Donnellan SC, Hutchinson MN, Saint KM, 1999: Molecular evidence for the phylogeny of Australian gekkonoid lizards. *Biol J Lin Soc* 67:97-118
- Dover G, 1982: Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299:111-117.
- Drouin G, Moniz de Sa M, 1995: The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol* 12:481-493
- Drouin G, 1999: Homogenization of 5S ribosomal genes on the noncoding strand of the rDNA units of two crustacean species. *Genome* 42:150-153
- Estes R, Queiroz K de, Gauthier JA, 1988: Phylogenetic relationships within Squamata. In *Phylogenetic Relationships of the Lizard Families. Essays Commemorating Charles L. Camp*, edited by R. Estes and G. Pregill, pp. 119-281. Stanford: Stanford University Press
- Feliciello I, Picariello O, Chinali G, 2005: The first characterization of the overall variability of repetitive units in a species reveals unexpected features of satellite DNA. *Gene* 349:153-164
- Fenton B, Malloch G, Moxey E, 1997: Analysis of eriophyid mite rDNA internal transcribed spacer sequences reveals variable simple sequence repeats. *Insect Mol Biol* 6:23-32
- Flavell, R.B. 1986. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 312: 227-242
- Foresti de Almeida-Toledo L, Foresti F, Zimbelli Daniel MF, de Almeida Toledo-Filho S, 1993: Nucleolar chromosome variants in *Sternopygus macrurus* (Pisces, Sternopygidae) from three Brazilian river basins. *Carpologia* 46:53-61
- Fry K, Salser W, 1977: Nucleotide sequences of HS-1 satellite DNA from Kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *CELL* 12:1069-1084
- Gadi IK, Ryder OA, 1983: Distribution of silver-stained nucleolus-organizing regions in the chromosomes of the Equidae. *Genetica* 62:109-116

Glaw F, Vences M, 1994: A Fieldguide to the Amphibians and Reptiles of Madagascar (2nd editino). Ed Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Bonn

Graybeal A, 1994: Evaluating the phylogenetic utility of genes: A search for genes informative about deep divergences among vertebrates. *Syst Biol* 43:174-193

Graybeal A, 1994: Evaluating the phylogenetic utilità of genes: A search for genes informative about deep divergence among vertebrates. *Syst Biol* 43:174-193

Green DM, 1983: Evidence for chromosome number reduction and chromosome homosequentiality in the 24 chromosome Korean frog, *Rana dybowskii* and related species. *Cromosoma* 88:222-226

Green DM, Session SK, 1991: Amphibian cytogenetics and evolution. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto

Grewal SIS, Moazed D, 2003: Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301:798-802

Grismer LL, 1988: Phylogeny, Taxonomy, Classification, and Biogeography of Eublepharid Geckos in: Estes, R. & Pregill, G. (eds.) *Phylogenetic Relationships of the Lizard Families* Stanford: Stanford University Press, 369-469

Guibé J, 1956: Revision des espèces Malgaches du genre *Phyllodactylus* Gray. *Mém L'Istitute Scientifique Madagascar Ser A* 10:245-250

Haacke WD, 1976: The burrowing geckos of Southern Africa, 4 (Reptilia, Gekkonidae). *Ann Transvaal Mus* 30:71-89

Hadjiolov AA, 1985: *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis*. (Springer, New York)

Han D, Zhou K, Bauer A, 2004: Phylogenetic relationships among gekkotan lizards inferred from C-mos nuclear DNA sequences and a new classification of the Gekkota. *Biol J Linnean Society* 83:353-368

Han DM, Zhou KY, Wang YQ, 2004: Phylogenetic relationships of the ten gekkonid lizards (Gekkonidae: Lacertilia) from China inferred from DNA sequences of mitochondrial 12S ribosomal RNA gene. *Acta Zoologica Sinica* 47:139-144 (In cinese)

Harris DJ, Marshall JC, Crandall KA, 2001: Squamate relationships based on C-mos nuclear DNA sequences: increased taxon sampling improves bootstrap support. *Amphibia-Reptilia* 22:235-242

Harris DJ, Batista V, Carretero MA, Ferrand N, 2004: Genetic variation in *Tarentola mauritanica* (Reptilia: Gekkonidae) across the Strait of Gibraltar derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences

Hecht MK, 1976: Phylogenetic inference and methodology as applied to the vertebrate record. *Evolutionary Biology* 9:335-363

Hey J, 2000: Human mitochondrial DNA recombination: Can it be true? *Trends Ecol Evol* 15:181-182

Hillis DM, Dixon MT, Ammerman LK, 1991: The relationships of the coelacanth - *Latimeria*

*chalumnae* - evidence from sequences of vertebrate 28S ribosomal-RNA genes. Environ Biol Fish 32(1-4):119-130

Howell WM, Black DA, 1980: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1-step method. Experientia, 36:1014-1015

Jesus J, Brehm A, Harris DJ, 2002: Relationships of *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae) from the Cape Verde Islands estimated from DNA sequence data. Amphibia-Reptilia 23:47-55

Jiang Z, Priat C, Galibert F, 1998: Traced orthologous amplified sequence tags (TOASTs) and mammalian comparative maps. Mammal Genome 9:577-587

Joger U, 1983: Book review of: Welch KRG: Herpetology of Africa. Salamandra 19 (1/2):102-104

Joger U, 1984: Taxonomische revision der gattung *Tarentola*. Bonn zool Beitr 35:129-174

Joger U, 1985: The african gekkonine radiation: Preliminary phylogenetic results, based on quantitative immunological comparisons of serum albumins. Proc Intern Symp African Vertebr Bonn, 1985 pp:479-494

John B, 1988: The biology of heterochromatin. In: Verma RS (ed.), Heterochromatin molecular and structural aspects. Cambridge University Press, Cambridge pp:1-147

John B, Miklos GLG, 1979: Functional aspects of heterochromatin and satellite DNA. Int Rev Cytol 58:1-114

Johnson DH, 1991: PCR amplification of microdissected DNA. In PCR 1 a practical approach. McPherson, Quirke, Taylor (eds.) Oxford University Press

Kasahara S, Ynenaga-Yussada Y, Schincariol RA, L'Abbate M, 1983: Chromosome mechanisms of sex determination, G- and C-band patterns and nucleolus organizer regions in *Tropidurus torquatus* (Sauria, Iguanidae). Genetica 60:151-156

Keback DB, Guachi V, Barber D, Mahn JW, 1992: Chromosome size-dependent control of meiotic recombination. Science 256:228-232

King M, 1977: The evolution the sex chromosomes in lizards. In: Evolution and reproduction, ed. by Calaby J & Tendale H pp. 55-60. Biscol. Austral. Acad. Sci.

King M, 1981: Chromosome change and speciation in lizards. In Evolution and Speciation, ed. by Atchley W.R. & Woodruff D.S. pp. 262-285. Cambridge Univ. Press. Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney

King M, 1987a: Chromosomal evolution in the Diplodactylinae (Gekkonidae: Reptilia). I. Evolutionary relationships and patterns of change. Australian Journal of Zoology 35:507-531

King M, 1987b: Origin of the Gekkonidae: chromosomal and albumin evolution suggests Gondwanaland. *Search* 18:252-254

King M, 1993: *Species evolution: the role of chromosome change*. Cambridge: Cambridge University Press

King M, 1994: Unbuckling the cladistic straight ratchet: An exercise in elementary cytogenetics and a reply to Kluge (1994). *Herpetologica* 50:222-237

King M, Mengden G, 1990: Chromosomal evolution in the Diplodactylinae (Gekkonidae: Reptilia). II. Chromosomal variability between New Caledonian species. *Australian Journal of Zoology* 38:219-226

King M, Rofe R, 1976: Karyotypic variation in the Australian gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Cromosoma* 54:75-87

King M, 1990: *Animal cytogenetics*. 4. Cordata. 4. Amphibia. (eds.) John, Bauer, Kayano, Levan. Gebruder Borntraeger Berlin– Stuttgart

King W, 1962: The occurrence of rafts for dispersal of land animals into the West Indies. *Quart Jour Florida Acad Sci* 25:45-52

Kluge AG, 1965: The Australian gekkonid lizard genus *Diplodactylus* Gray: an evolutionary and zoogeographical study (Gekkonidae). PhD Thesis. Los Angeles: University of Southern California.

Kluge AG, 1967a: "A revision of the South American Gekkonid lizard genus *Homonota* Gray. *Bull Amer Mus Nat Hist* 135:5-59

Kluge AG, 1967b: Systematics, phylogeny, and zoogeography of the lizard genus *Diplodactylus* Gray (Gekkonidae). *Australian Journal of Zoology* 15:1007-1108

Kluge AG: 1974: A taxonomic revision of the lizard family Pygopodidae. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan* 147:1-221

Kluge AG: 1976: Phylogenetic relationships of the lizard family Pygopodidae: an evaluation of the theory, methods and data. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan* 147:1-221

Kluge AG, 1983: Cladistic relationships among gekkonid lizards. *Copeia* 1983 (2):465-475

Kluge AG, 1987: Cladistic relationships in the Gekkonoidea (Squamata, Sauria). *Miscellaneous Publications, Museum of zoology, University of Michigan*

Kluge AG, 1994: Principles of phylogenetic systematics and the informativeness of the karyotype in Gekkotan lizard relationships. *Herpetologica* 50:210-221

Kluge AG, 2001: Gekkotan lizard taxonomy. *Hamadryad* 26:1-209

Kluge AG, Nussbaum RA, 1995: A review of African-Madagascan gekkonid lizard phylogeny and

- Lamb T, Bauer AM, 2002: Phylogenetic relationships of the large-bodied members of the African lizard genus *Pachydactylus* (Reptilia: Gekkonidae). *Copeia* 2002:586-596
- Lamb T, Bauer AM, 2000: Relationships of the *Pachydactylus rugosus* group of geckos (Reptilia; Squamata: Gekkonidae). *African Zoology* 35:55-67
- Lamb T, Bauer AM, 2001: Mitochondrial phylogeny of Namid day geckos (*Rhaptropus*) based on cytochrome *b* and 16S rRNA sequences. *Copeia* 101:775-780
- Leah R, Frederiken S, Engberg J, Sorensen PD, 1990: Nucleotide sequence of a mouse 5S rRNA variant gene. *Nucl Acids Res* 18:7441-7441
- Li WH, Graur D, 1991: Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts
- Long EO, David ID, 1980: Repeated genes in eukariotes. *A Rev Biochem* 49:727-764
- Loveridge A, 1947: Revision of the African lizards of the family Gekkonidae. *Bull Mus comp Zool (Cambridge/Mass)* 98(1):1-469
- Lozano R, Ruiz Rejon C, Ruiz Rejon M, 1992: A comparative analysis of NORs in diploid and triploid salmonids: implications with respect to the diploidization process occurring in this fish group. *Heredity* 69:450-457
- Lucchini S, Nardi I, Barsacchi G, Batistoni R, Andronico F, 1993: Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S+ 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. *Menome* 3-6:762-773
- Lyons LA, Laughlin TF, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, O'Brien SJ, 1997: Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nat Genet* 1-5:47-56
- Macey J R, Larson A, Ananjeva N B, Papenfuss T J, 1997: Replication slippage may cause parallel evolution in the secondary structures of mitochondrial transfer RNAs. *Mol Biol Evol* 14:30-39
- Macgregor HC, Sherwood S, 1979: The nucleolus organizers of *Plethodon* and *Aneides* located by in situ nucleic acid hybridization with *Xenopus* 3H-ribosomal RNA. *Chromosoma* 72:271-280
- Macgregor HC, Sessions SK, 1986: The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the genus *Triturus*: An evolutionary perspective. *Phil Trans Roy Soc London B* 312:243-259
- Macgregor HC, Sessions SK, Arntzen JW, 1990: An integrative analysis of phylogenetic relationships amongst newts of the genus *Triturus* (family Salamandridae) using comparative biochemistry, cytogenetics and reproductive interactions. *J Evol Biol* 3: 329-374.
- Macgregor HC, Varley JM, 1983: Working with Animal Chromosomes. John Wiley and Sons Ltd: Chichester and New York

- Maddison WP, 1996: Molecular approaches and the growth of phylogenetic biology. Pages 47-63 in *Molecular zoology: Advances, strategies, and protocols* (Ferrarsi JD and Palombi SR, eds). Wiley-Liss, New York
- Maddison WP, 1997: Gene trees in species trees. *Syst Biol* 46:523-536
- Makinem A, Zijlstra C, De Haan NA, Mellink CHM, Bosma AA, 1997: Localization of 18S plus 28S and 5S ribosomal RNA genes in the dog by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 78:231-235
- Mancino G, Raggianti M, Bucci-Innocenti S, 1977: Cytotaxonomy and cytogenetics in European newt species. In Taylor & Guttman (eds.), *The reproductive biology of Amphibians*. Plenum, New York pp:411-447
- Marcare S, Gilson E, Shore D, 1997: A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 275:986-990
- Martinez JL, Mòran P, Garcia-Vàsquez E, Pendàs AM, 1996: Chromosomal localization of the major and minor 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Cytogenet Cell Genet* 73:149-152
- Martins C, Galletti PM Jr, 1999: Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus fisch* (Anostomidae, Characiformes). *Chrom Res* 7:363-367
- Martins C, Galletti PM Jr, 2001: Two 5S rDNA arrays in neotropical fish species: Is it a general rule for fishes? *Genetica* 111:439-446
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Parise-Maltempi PP, Wright JM, Foresti F, 2002: Dynamics of 5S rDNA in the tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome: repeat units, inverted sequences, pseudogenes and chromosome loci. *Cytogenet Menome Res* 98:78-85
- Matassi G, Sharp PM, Gautier C, 1999: Chromosomal location effects on gene sequence evolution in mammals. *Curr Biol* 9:786-791
- Matthey R, 1931: Chromosomes de reptiles sauriens, ophidiens, cheloniens. L'évolution de la formule chromosomiale chez le sauriens. *Rev suisse Zool* 38:117-186
- McDowell SB, Bogert CM, 1954: The systematic position of *Lanthanotus* and the affinities of the anguimorph lizard. *Bull Am Mus Nat Hist* 105:1-142
- Miklos GLG, 1985: Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. In Mc Intere (eds.), *Molecular evolutionary genetics*. Plenum Publ Co pp241-321
- Miklos GLG, Gill AC, 1981: The DNA sequences of cloned complex satellite DNAs from Hawaiian *Drosophila* and their bearing on satellite DNA sequence conservation. *Cromosoma* 82:409-427
- Mckee B, Hong CS, Yoo S, 2000: Meiotic pairing sites and genes involved in segregation of the X and Y chromosomes of *Drosophila melanogaster*. In Olmo & Redi (eds.). *Chromosomes Today*, Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin 13:139-152

McLain DK, Wesson DM, Oliver JHJ, Collins FH, 1995: Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among Eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 32:353–360

Meier H, 1993: Neues über einige Taxa der Gattung *Phelsuma* auf Madagaskar, mit Beschreibung zweier neuer Formen. *Salamandra* 29(2):119-132.

Mezzanotte R, Bianchi U, Vanni R, Ferrucci L, 1983: Chromatin organization, restriction nuclease activity on human metaphase chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 36:562-566

Mitchell A, Bitter C, Regier C, 2000: More taxa or more characters revisited: Combinino data from nuclear protein-encoding genes for phylogenetic analyses of Nocuoidea (Insecta: Lepidoptera). *Syst Biol* 49:202-224

Mitchell A, Bitter C, Regier C, 2000: More taxa or more characters revisited: Combinino data from nuclear protein-encoding genes for phylogenetic analyses of Nocuoidea (Insecta: Lepidoptera). *Syst Biol* 49:202-224

Mocquard MF, 1909: Synopsis des familles, genres et especes des reptiles écailleux et des batraciens de Madagascar. *Nouvelles Archives du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris 5th Series I:110pp*

Moffat LA, 1973: The concept of primitiveness and its bearing on the phylogenetic classification of the Gekkota. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 97:275-301

Moore WS, 1995: Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49:718-726

Mòran P, Martinez JL, Garcia-Vasquez E, Pendàs AM, 1996: Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet Cell Genet* 75:145-150

Morescalchi A, 1973: Amphibia. In Chiarelli & Capanna (eds.), *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press, New York pp:233-348

Morescalchi A, 1975: Chromosome evolution in the caudate amphibia. *Evol Biol* 8:339-387

Morescalchi A, 1991: Genome and rise of terrestrial vertebrates. . In Ghiara et al., (eds), *Selected Symposia and Monographs UZI, Mucchi, Modena* 4:31-50

Moritz, 1984: The evolution of a highly variable sex chromosome in *Gehyra purpurascens* (Gekkonidae). *Cromosoma* 90:111-119

Nussbaum RA, Raxworthy CJ, 1994: A new rainforest gecko of the genus *Paroedura* Günther from Madagascar. *Herpetological Natural History* 2(1):43-49

- O'Brien SJ, Nash WG, Wildt DE, Bush ME, Benveniste RE, 1985: A molecular solution to the riddle of the giant panda's phylogeny. *Nature* 317:140-144
- O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Nash WG, Wienberg J, Stanyon R, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, Marshall Graves JA, 1999: The promise of comparative genomics in mammals. *Science* 286:458-481
- Odierna G, Aprea G, Capriglione T, Caputo V, Olmo E, 1994: Chromosomal diversification in the gekkonid *Tarantola mauritanica* (Reptilia: Gekkonidae). *Boll Zool* 61:325-330
- Odierna G, Aprea G, in den Bosch HAJ, Capriglione T, Olmo E, 1998: *Lacerta kulzeri* complex un caso di speciazione cromosomica allopatrica. *Abstr Congr Soc Herpes Ital. Cosenza* pp:61-62
- Olmo E, 1986: Animal cytogenetics. 4. Cordata. 3. Reptilia. (eds.) John, Bauer, Kayano, Levan. Gebruder Borntraeger Berlin– Stuttgart
- Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D, 1989: A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245:1434-1435
- Orgel LE, Crick FHC, 1980: Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604-607
- Ota H, 1989: Karyotypes of five species of Gekko (Gekkonidae: Lacertilia) from East and Southeast Asia. *Herpetologica* 45:438-443
- Pardue ML, Brown DD, Birnstiel M, 1973: Localization of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* 42:191-203
- Paster G, 1965: Recherches sur l'évolution des lygodactyles, lézards actuels. *Travaux de l'Institut Scientifique Chérifien, série zoologique* 29:1-132
- Paster G, 1977: Quelques commentaires à propos de l'espèce chez les lygodactyles. In *Les Problèmes de l'espèce dans le Règne Animal*, eds Bocquet C, Générmont J, Lamette M, pp:335-358. Paris: Société Zoologique de France
- Paster G, 1995: Biodiversité et reptiles: diagnoses de sept nouvelles espèces fossiles et actuelles du genre de lézards *Lygodactylus* (Sauria, Gekkonidae). *Dumerilia* 2:1-21
- Paster G, Blanc CP, 1967: Les lézards du sous-genre malgache de lygodactyles *Domerguella* (Gekkonidés). *Bulletin de la Société Zoologique de France* 92:583-597
- Paster G, Blanc CP, 1967: Nouvelles études sur les lygodactyles (Sauriens Gekkonidés). I. Données récentes sur *Domerguella* et sur ses rapports avec la phytogéographie malgache. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 98:165-174
- Patton JL, Sherwood SW, 1982: Genome evolution in pocket gophers (genus *Thomomys*). I. Heterochromatin variation and speciation potential. *Chromosoma* 85:149-162
- Patton JL, Sherwood SW, 1983: Chromosome evolution and speciation in rodents. *Annual Review of Ecology and Systematics* 14:139-158

- Prychitko TM, Moore WS, 2000: Comparative evolution of the mitochondrial cytochrome b gene and nuclear b-fibrinogen intron 7 in woodpeckers. *Mol Biol Evol* 17:1101-1111
- Raxworthy CJ, Nussbaum RA, 1993: A new Madagascan *Phelsuma*, with a review of *Phelsuma trilineata* and comments on *Phelsuma cepediana* in Madagascar (Squamata:Gekkonidae). *Herpetologica* 49:342-349
- Raxworthy CJ, Nussbaum RA, 1994: A partila systematic revision of the day geckos, *Phelsuma* Gray, of Madagascar (Reptilia: Squamata: Gekkonidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 112:321-335
- Rocco L, Russo C, Stingo V, Aprea G, Odierna G, 1999: Characterization of 5S rDNA in *Gasterosteus aculeatus* (Teleostei, Gasterosteidae). *Ital J Zool* 66:285-289
- Röll B, 1999: Biochemical and morphological aspects of the relationship of the Namaqua day gecko to *Phelsuma* and *Rhoptropus* (Reptilia, Gekkonidae). *Zoology* 102:50-60
- Russell AP, 1972: The foot of gekkonid lizards: A study in comparative and functional anatomy. Thesis, University of London
- Russell AP, 1977. The genera *Rhoptropus* and *Phelsuma* (Reptilia: Gekkonidae) in southern Africa: a case of convergence and a reconsideration of the biogeography of *Phelsuma*. *Zool Afric* 1-2:393-408
- Russell AP, Bauer AM, 1988: Paraphalangeal elements of gekkonid lizards: a comparative survey. *J Morphology* 197:221-240
- Saccone C, La nave G, Pesole G, 1993: Time and Biosequences. *J Mol Evol* 37:154-159
- Sahar E, Latt SA, 1980: Energy Transfer and binding competition between Dyes used to enanche staining differentiation in metaphase chromosomes. *Chromosoma* 79:1-28
- Saint KM, Austin CC, Donnellan SC, Hutchinson MN, 1998: C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Mol Phyl Evol* 10:259-263
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA, 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839):487-491.
- Sajdak SL, Reed KM, Phillips RB, 1998: Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. *J molec Evol* 46:680-688
- Saunders WS, Chue C, Goebel M, Craig C, Clark RF, Powers JA, Eissenberg JC, Elgin SCR, Rothfield NF, Earnshaw WC, 1993: Molecular cloning of a human homologue of *Drosophila* heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromo specificity. [J Cell Sci 10-4:573-582](#)
- Schmid M, Vitelli L, Batistoni R, 1987: Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. *Cromosoma* 95:271-284

- Serizawa K, Suzuki H, Tsuchiya K, 2000: A phylogenetic view on species radiation in *Apodemus* inferred from variation of nuclear and mitochondrial genes. *Biochem Genet* 38:27-40
- Sessions SK, Kezer J, 1987: Cytogenetic evolution in the genus *Aneides*. *Chromosoma* 95:17-30
- Shaw DD, Webb GC, Wilkinson P, 1976: Population cytogenetics of the genus *Caledia* (Orthoptera: Acridinae). II. Variation in the pattern of C-banding. *Cromosoma* 56:169
- Singer MF, 1982: Higly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* 76:63-112
- Sites JW, Moritz C, 1987: Chromosomal evolution and speciation revisited. *Syst. Zool.* 36:153-174
- Slade RW, Moritz C, Heideman A, 1994: Multiple nuclear-gene phylogenies: Aplication to pinnipeds and comparison with a mitochondrial DNA gene phylogeny. *Mol Biol Evol* 11:341-356
- Smith AG, Briden JC, 1977: *Mesozoic and Cenozoic Paleontinental Maps*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Solleder E, Schmid M, 1984: XX/XY-sex chromosomes in *Gekko gekko* (Sauria, Reptilia). *Amphibia-Reptilia* 5:339-345
- Sorenson MD, Ast JC, Dimcheff DE, Yuri T, Mindell DP, 1999: Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12:105-114
- Springer MS, DeBry RW, Douady C, Amrine HM, Madsen O, de Jong WW, Stanhope MJ, 2001: Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. *Mol Biol Evol* 18:132-143
- Stemmer WPC, 1994: DNA scuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747-10751
- Sumner AT, 1972: A simple tecnique for demostratin centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304-306
- Suzuki H, Moriwaki K, Sakurai S, 1994: Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs. *Mol Biol Evol* 11:704-710
- Underwood G, 1954: On the classification and evolution of geckos. *Proceedings of the Zoological Society of London* 124:469-492
- Venta PJ, Brouillette JA, Yuzbasiyan-Gurkan V, Brewer GJ, 1996: Gene-specific universal mammalian sequenze-tagged sites: Application to the canine genome. *Biochem Genet* 34:321-341
- Vicario S, Caccone A, Gauthier J, 2003: Xantusiid "night" lizards: a puzzling phylogenetic problem revisited using likelihood-based Bayesian methods on mtDNA sequences. *Mol Phyl Evol* 26 (2):243-261
- Vitelli L, Batistoni R, Andronico F, Nardi I, Barsacchi-Pilone G, 1982: Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionary divergent anuran amphibians. *Cromosoma* 84:475-491

Wasko AP, Martins C, Wright JM, Galletti Jr PM, 2001: Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Mol Biol Evol* 18:893-902

Welch KRG, 1982: Herpetology of Africa: A checklist and bibliography of the orders Amphisbaenia, Sauria and Serpentes. Malabar, Florida (Krieger)

Wesson DM, McLain DK, Olivier JH, Piesman J, Collins FH, 1993: Investigation of the validity of species status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10221-10225

Wesson DM, Porter CH, Collins FH, 1992: Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol* 1: 253–269

Willard HF, 1990: Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends Genet* 6:410-416

Yew N, Strobel M, Vande Woude GF, 1993: Mos and the cell cycle: the molecular basis of the transformed phenotype. *Curr Opin Genet Devel* 3:19-25









This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.