



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DELL'AQUILA



MESVA
Dipartimento di Medicina Clinica,
Sanità Pubblica, Scienze della Vita
e dell'Ambiente

RELAZIONE FINALE DELLE ATTIVITÀ

Accordo di collaborazione scientifica per la realizzazione del Progetto:

**“Monitorare per conservare la biodiversità di specie e habitat
delle Isole Toscane - ISOLE RARE”**

[N.ID. “NBFC_S8P1_0025” - CUP E43B24000000007]

Responsabile scientifico: Prof. Daniele Salvi

In collaborazione con: Dr. Michele di Musciano

L'Aquila, 09/10/2025


Prof. Daniele Salvi

RELAZIONE FINALE DELLE ATTIVITÀ

Accordo di collaborazione scientifica per la realizzazione del Progetto:

**“Monitorare per conservare la biodiversità di specie e habitat
delle Isole Toscane - ISOLE RARE”**

[N.ID. “NBFC_S8P1_0025” - CUP E43B24000000007]

Responsabile scientifico: Prof. Daniele Salvi

In collaborazione con: Dr. Michele di Musciano

L'Aquila, 09/10/2025



Prof. Daniele Salvi

INDICE

1. INTRODUZIONE E INQUADRAMENTO DEL PROGETTO	1
1.1 CONTESTO E FINALITÀ DEL PROGETTO.....	1
1.2 OBIETTIVI GENERALI E SPECIFICI.....	2
1.3 DURATA E ARTICOLAZIONE TEMPORALE	3
2. MATERIALI E METODI.....	4
2.1 STUDIO DELLA VARIAZIONE DELLA STRUTTURA E DELLA COPERTURA DELLA VEGETAZIONE TERRESTRE	4
2.1.1 <i>Analisi di remote sensing</i>	4
2.1.2 <i>Rilievi fitosociologici in campo</i>	5
2.1.3 <i>Analisi ed elaborazione dati</i>	8
2.2 STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ MARINA MEDIANTE DNA AMBIENTALE (EDNA)	10
2.2.1 <i>Campionamento e raccolta dei dati</i>	10
2.2.2 <i>Conservazione dei campioni e estrazione del DNA</i>	11
2.2.4 <i>Preparazione delle librerie e sequenziamento</i>	12
2.2.5 <i>Analisi bioinformatica e elaborazione dati</i>	12
2.3 STUDIO DI GENETICA DI POPOLAZIONI DI <i>DISCOGLOSSUS SARDUS</i>	14
2.3.1 <i>Campionamento</i>	14
2.3.2 <i>Estrazione e analisi genomica</i>	19
2.3.3 <i>Analisi ed elaborazione dati</i>	19
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	21
3.1 DINAMICHE DELLA VEGETAZIONE NELLE ISOLE MINORI DELL'ARCIPELAGO TOSCANO.....	21
3.1.1 <i>Remote sensing</i>	21
3.1.2 <i>Risultati dei rilievi vegetazionali</i>	22
3.1.3 <i>Stato di conservazione</i>	24
3.2 STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ MARINA (EDNA) DELL'ISOLA DI MONTECRISTO	26
3.3 STUDIO DI GENETICA DI POPOLAZIONI DI <i>DISCOGLOSSUS SARDUS</i>	29
4. CONCLUSIONI E INDICAZIONI GESTIONALI	34
4.1 INDICAZIONI GESTIONALI	36
5. RINGRAZIAMENTI.....	37
BIBLIOGRAFIA	38

1. Introduzione e inquadramento del progetto

Il presente documento costituisce la Relazione finale delle attività svolte nell'ambito del progetto di ricerca **“Monitorare per conservare la biodiversità di specie e habitat delle Isole Toscane – ISOLE RARE”** (N.ID. *NBFC_S8P1_0025* – CUP *E43B24000000007*), realizzato in collaborazione tra il Parco Nazionale dell'Arcipelago Toscano (PNAT) e il Dipartimento di Medicina clinica, sanità pubblica, scienze della vita e dell'ambiente (MESVA), nell'ambito del programma di ricerca del Centro Nazionale per la Biodiversità – National Biodiversity Future Center (NBFC), a valere sulle risorse del Piano Nazionale Ripresa E Resilienza (Pnrr) Missione 4, “Istruzione e Ricerca” - Componente 2, “Dalla Ricerca all'Impresa” - linea di investimento 1.4, “Potenziamento Strutture di Ricerca e Creazione di "Campioni Nazionali di R&S" su alcune key enabling technologies”, finanziato dall'Unione Europea – NEXTGENERATIONEU” Progetto [NBFC].

1.1 Contesto e finalità del progetto

Il progetto si inserisce all'interno delle attività dello *Spoke 1* (“Sensibilità, vulnerabilità e adattamento ai cambiamenti climatici”) e dello *Spoke 3* (“Monitoraggio e valutazione di specie e habitat a rischio di estinzione come conseguenza del cambiamento climatico e degli interventi antropici”) del NBFC, con l'obiettivo di sviluppare conoscenze scientifiche e strumenti operativi per la conservazione e gestione sostenibile della biodiversità insulare dell'Arcipelago Toscano.

In particolare, il progetto ISOLE RARE ha perseguito tre linee di ricerca principali e complementari:

1. **Analisi delle dinamiche della vegetazione terrestre** dell'Isola di Montecristo e degli isolotti minori (Cerboli, Palmaiola, ecc.), con particolare attenzione agli effetti dei cambiamenti climatici e delle pressioni biotiche (pascolamento, aridità);
2. **Monitoraggio della biodiversità marina** mediante approccio di *metabarcoding* del DNA ambientale (eDNA), nelle acque circostanti l'Isola di Montecristo, per la definizione di una *baseline* replicabile nel tempo e utile alla pianificazione gestionale del Parco;
3. **Caratterizzazione genetica delle popolazioni del Discoglossus sardo (*Discoglossus sardus*)** nelle isole di Montecristo e del Giglio, finalizzata alla valutazione della struttura genetica, della diversità e dei trend demografici recenti di una specie di interesse comunitario sensibile ai cambiamenti ambientali.

1.2 Obiettivi generali e specifici

Gli obiettivi generali del progetto sono stati quelli di:

- migliorare la conoscenza scientifica della biodiversità terrestre e marina delle isole minori del PNAT;
- individuare i segnali di vulnerabilità degli ecosistemi agli effetti del cambiamento climatico;
- fornire all'Ente Parco strumenti di supporto per la gestione e conservazione degli habitat e delle specie di interesse comunitario.

A questi obiettivi generali si affiancano obiettivi specifici per ciascuna linea di attività:

a) Vegetazione terrestre:

- ricostruire le variazioni multitemporali della copertura vegetale mediante dati satellitari (serie Landsat);
- verificare in campo i cambiamenti di composizione e struttura delle comunità vegetali;
- individuare le aree di maggiore vulnerabilità ecologica o soggette a degrado.

b) Biodiversità marina (eDNA):

- implementare un protocollo standardizzato per il campionamento, filtrazione e analisi molecolare dell'eDNA marino;
- identificare le specie presenti mediante approcci di *metabarcoding* multi-marker;
- produrre liste tassonomiche validate e database consultabili, utili per la gestione del sito ZSC "Isola di Montecristo".

c) Genetica di popolazioni di *Discoglossus sardus*:

- stimare la diversità genetica intra- e interpopolazione nelle due isole campionate;
- valutare la connettività e i possibili flussi genici tra le popolazioni;
- inferire i trend demografici storici e recenti per definire il grado di isolamento e vulnerabilità della specie.

1.3 Durata e articolazione temporale

Le attività progettuali si sono svolte tra giugno 2024 e ottobre 2025, articolandosi in una prima fase di pianificazione e campionamento, seguita dalle analisi di laboratorio e dall'elaborazione dei dati.

Le tre linee di ricerca sono state sviluppate in parallelo, garantendo una forte integrazione interdisciplinare e ottimizzazione dei rilievi.

Le campagne di campo e le attività analitiche sono state supportate dalla collaborazione del 'Raggruppamento Carabinieri Biodiversità', che ha fornito il supporto logistico per le operazioni a Montecristo e negli isolotti, assicurando l'accesso ai siti e la sicurezza delle operazioni di campionamento.

2. Materiali e Metodi

In questa sezione sono riportati i materiali e i metodi impiegati per ciascuna delle tre linee principali in cui si articolano le attività di ricerca del progetto “ISOLE RARE”.

2.1 Studio della variazione della struttura e della copertura della vegetazione terrestre

2.1.1 *Analisi di remote sensing*

Per la valutazione multitemporale delle dinamiche di copertura vegetale delle isole minori del Parco Nazionale Arcipelago Toscano è stata predisposta ed elaborata l'intera serie storica di immagini satellitari Landsat, comprendente i sensori TM (Thematic Mapper), ETM+ (Enhanced Thematic Mapper Plus) e OLI (Operational Land Imager). L'arco temporale considerato si estende dal 1984 al 2024, offrendo così una copertura di oltre quarant'anni di osservazioni continue e comparabili. Questa ampiezza temporale ha reso possibile analizzare i cambiamenti della vegetazione a scala pluridecennale, includendo sia oscillazioni interannuali legate a condizioni meteorologiche specifiche, sia tendenze di lungo periodo attribuibili a pressioni climatiche e biotiche.

Le immagini Landsat sono state acquisite e processate tramite la piattaforma Google Earth Engine, che consente di operare in modo integrato su grandi dataset satellitari grazie alla disponibilità di strumenti per il pre-processing e per l'analisi temporale e spaziale. Le operazioni preliminari hanno seguito uno schema standardizzato, necessario per garantire la comparabilità tra dati acquisiti da sensori diversi e in anni differenti. In particolare, sono state effettuate:

- Correzioni atmosferiche e radiometriche, per eliminare le distorsioni introdotte da condizioni variabili dell'atmosfera e per riportare i valori di riflettanza a condizioni uniformi. Questa fase è risultata particolarmente importante per la nostra serie storica, data la lunghezza dell'intervallo temporale e l'impiego di più sensori.
- Mascheramento di nubi e ombre, eseguito tramite l'algoritmo Fmask e successivamente validato con controlli visivi, così da garantire l'esclusione di pixel disturbati da copertura nuvolosa o da effetti di ombreggiatura.
- Elaborazione combinata di immagini stagionali, selezionando soltanto i mesi primaverili ed estivi. La scelta è stata motivata dall'esigenza di intercettare il periodo fenologico di massima produttività primaria e di ridurre l'impatto di fenomeni stagionali non legati a variazioni strutturali della vegetazione, come avviene in autunno o inverno.

Una volta completato il pre-processing, le immagini sono state utilizzate per calcolare i principali indici di vegetazione multispettrali e iperspettrali, ciascuno dei quali rappresenta un proxy di parametri funzionali o strutturali delle comunità vegetali (Tucker, 1979; Huete, 1988; Gao, 1996; Rock et al., 1986; Huete et al., 2002; Ceccato et al., 2002). In particolare:

- L'NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), basato sulla riflettanza nel rosso e nel vicino infrarosso, è stato utilizzato come indicatore generale della biomassa fotosinteticamente attiva e della densità della copertura vegetale. È il parametro di riferimento per individuare differenze spaziali e temporali nella produttività primaria.
- L'EVI (Enhanced Vegetation Index) è stato calcolato per migliorare la sensibilità rispetto a variazioni in aree a copertura vegetale molto densa e per correggere gli effetti atmosferici e di saturazione che possono ridurre l'accuratezza dell'NDVI.
- Il SAVI (Soil Adjusted Vegetation Index) è stato impiegato nei contesti insulari dove il suolo nudo o le superfici rocciose hanno un ruolo rilevante, compensando l'influenza del substrato sulla riflettanza complessiva e restituendo un'immagine più precisa delle variazioni vegetazionali reali.
- L'NDWI (Normalized Difference Water Index) ha permesso di monitorare il contenuto idrico della vegetazione, offrendo informazioni cruciali per comprendere la risposta della biomassa agli stress idrici stagionali o interannuali.
- L'NDII (Normalized Difference Infrared Index), basato su bande del medio infrarosso, si è rivelato particolarmente utile per evidenziare condizioni di stress idrico cronico o acuto.
- Il MSI (Moisture Stress Index) ha completato il quadro, quantificando la disponibilità relativa di umidità nella vegetazione e consentendo di identificare episodi di siccità particolarmente severi.

Per valutare le dinamiche temporali, sono state applicate metodologie di Change Detection. L'analisi ha previsto il confronto sistematico dei valori degli indici a intervalli regolari, calcolando la variazione normalizzata rispetto a una baseline individuata nel decennio 1990–2000. In questo contesto, è stata introdotta una soglia operativa pari a $|\Delta\text{NDVI}| \geq 0,1$ mantenuta per almeno tre anni consecutivi, così da discriminare i cambiamenti persistenti dalle fluttuazioni di breve durata.

Parallelamente, sono state condotte analisi di regressione lineare pixel-based sui valori di NDVI ed EVI, con l'obiettivo di identificare tendenze significative di variazione della copertura vegetale lungo l'intera serie temporale. Questa doppia strategia ha consentito di distinguere fenomeni locali di regressione o incremento della vegetazione da oscillazioni stagionali o anomalie puntuali.

2.1.2 Rilievi fitosociologici in campo

La seconda linea di attività del progetto ha riguardato i rilievi vegetazionali in campo, svolti principalmente sull'Isola di Montecristo (Fig 1) e sugli isolotti (Fig 2), dove era disponibile una documentazione storica di rilievi eseguiti in decenni precedenti. L'obiettivo è stato duplice: da un lato ricampionare i plot storici per valutare la dinamica della composizione floristica e della copertura, dall'altro stabilire nuovi plot in corrispondenza delle aree identificate come maggiormente variabili attraverso l'analisi da telerilevamento. Complessivamente, sull'isola sono stati ricampionati circa 40 plot, distribuiti lungo gradienti altitudinali che spaziano dal livello del mare fino alla cima del Monte Fortezza (645 m s.l.m.) e lungo gradienti di esposizione che coprono l'intero ventaglio di condizioni microclimatiche. Questo disegno di campionamento

ha consentito di garantire la rappresentatività delle principali tipologie ambientali presenti, includendo settori umidi e riparati, aree esposte ai venti, crinali e versanti più aridi. La localizzazione dei plot ha rappresentato una sfida metodologica significativa, dovuta soprattutto all'eterogeneità delle informazioni disponibili per i rilievi storici. I dati pregressi, infatti, si possono suddividere in due tipologie: 1) Plot semi-permanenti, per i quali erano disponibili coordinate GPS di prima generazione (con errori di decine di metri) o descrizioni ambientali (quota, esposizione, pendenza), utili ma non sempre esaustive per una ricollocazione univoca; 2) Plot non tracciabili, privi di riferimenti geografici o ambientali sufficienti a consentire un riposizionamento accurato.

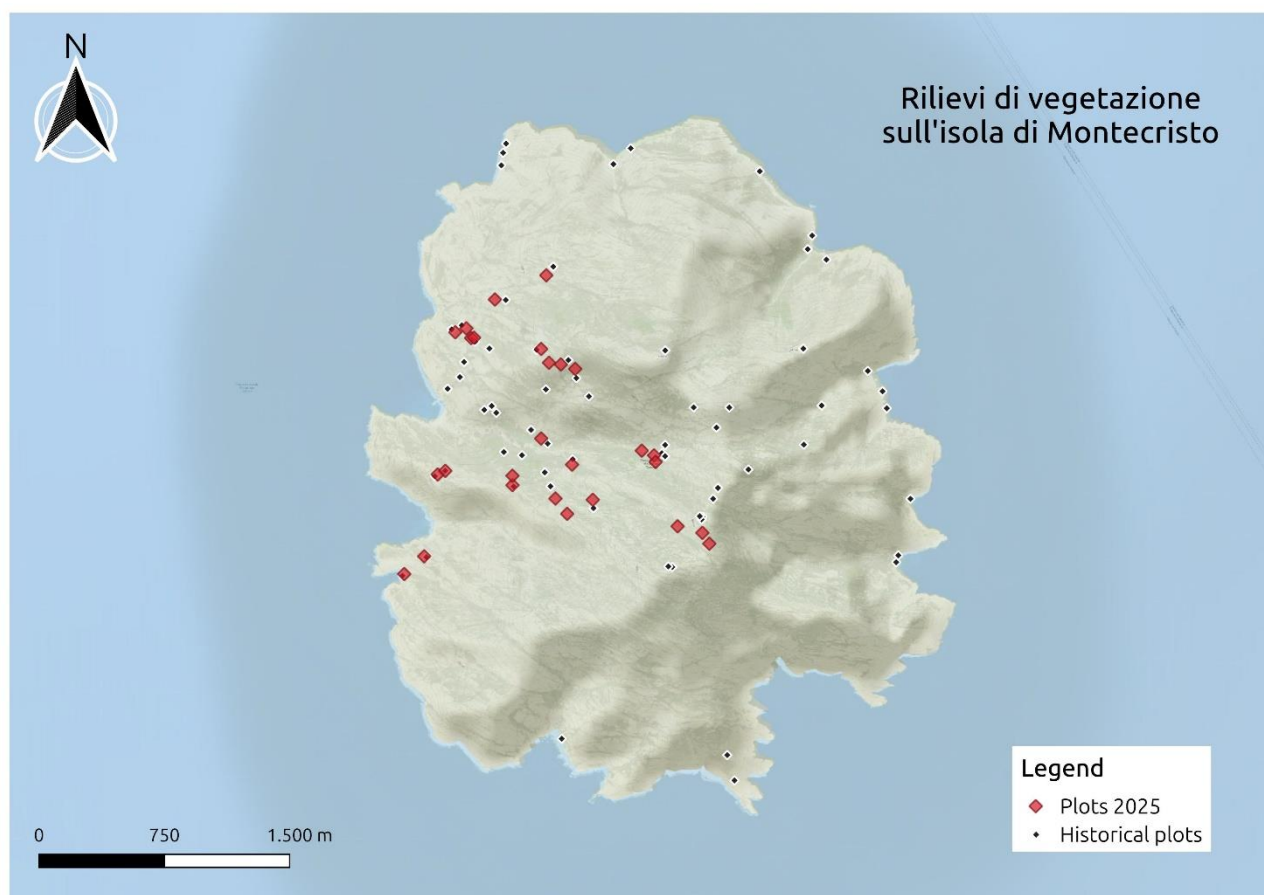


Figura 1. Rilievi di vegetazione sull'isola di Montecristo

Per ridurre l'impatto delle incertezze, soprattutto nei casi di plot semi-permanenti, è stata adottata una procedura specifica: qualora l'incertezza di localizzazione superasse i 50 m, il plot è stato replicato con due punti aggiuntivi, scelti nello stesso tipo di habitat e posizionati a una distanza reciproca di almeno 20 m. Questa strategia ha permesso di aumentare l'affidabilità dei confronti con i dati storici, mitigando l'errore spaziale e mantenendo la confrontabilità con le serie passate.

Una volta localizzati i plot, la loro materializzazione sul terreno è stata effettuata mediante fettucce metriche. Tale procedura ha garantito la comparabilità con i protocolli precedentemente adottati e ha fornito un riferimento spaziale chiaro per le operazioni di rilevamento. Prima dell'avvio della raccolta dati, ciascun plot è stato documentato fotograficamente, includendo panoramiche generali e dettagli delle comunità vegetali, al fine di garantire una documentazione visiva utile per futuri confronti. Per ogni plot sono stati raccolti tre gruppi principali di informazioni:

Metadati ambientali, comprendenti coordinate GPS (sistema EPSG:4326), quota (m s.l.m.), esposizione (°), pendenza (°), copertura litologica (%), presenza di pietre mobili (%), lettiera (%), legno morto (%) e suolo nudo (%). Questi parametri consentono di caratterizzare il contesto ecologico e forniscono variabili fondamentali per interpretare le differenze nella composizione vegetale.

Dati strutturali, relativi alla copertura percentuale distinta per strato: erbaceo ($\leq 1,5$ m), arbustivo (1,5–3 m) e arboreo (> 3 m). Per ogni strato, oltre alla copertura, è stata registrata anche l'altezza media della vegetazione dominante, così da restituire una misura della complessità verticale delle comunità.

Composizione floristica, consistente nell'elenco completo delle specie vascolari presenti all'interno della parcella. Ogni specie è stata identificata a livello specifico seguendo la nomenclatura standardizzata di Bartolucci et al. (2024) per la flora italiana e Galasso et al. (2024) per le specie aliene. A ciascuna specie è stato assegnato un valore di copertura percentuale, distinto per strato. Inoltre, per le specie arboree e arbustive, è stato registrato lo stadio vitale (seedling, sapling, adulto), informazione essenziale per valutare i processi di rinnovazione naturale.

Gran parte della campagna di rilevamento è stata resa possibile grazie al supporto operativo e logistico del Raggruppamento Carabinieri Biodiversità, che ha garantito l'accesso all'isola di Montecristo, ha coordinato le operazioni di trasporto del personale e del materiale e ha assicurato le condizioni di sicurezza necessarie durante le attività sul campo. Questo contributo si è rivelato determinante per il buon esito delle operazioni, permettendo di rispettare la pianificazione prevista e di completare il ricampionamento dei plot nonostante le difficoltà logistiche legate all'isolamento e all'orografia complessa dell'isola.

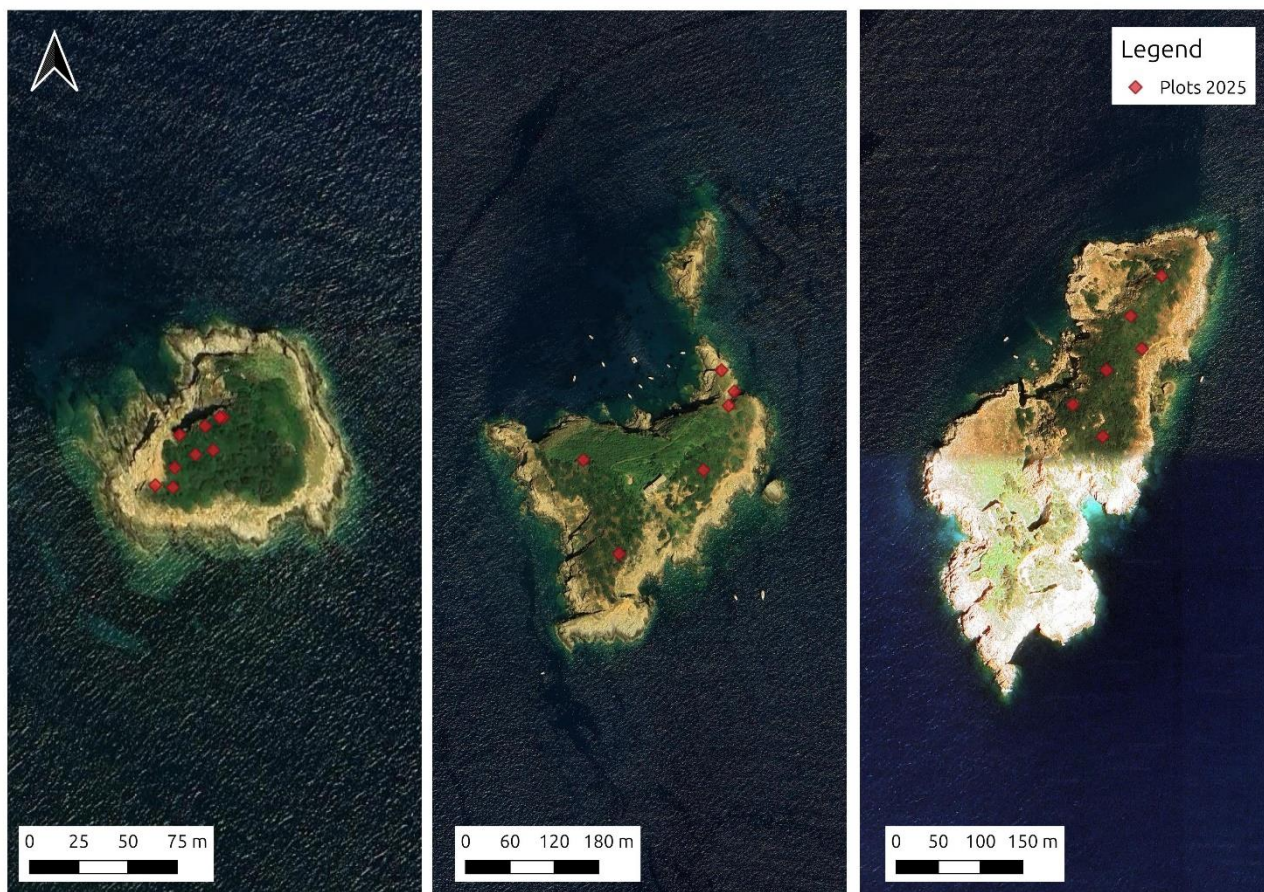


Figura 2. Rilievi di vegetazione nelle varie isole campionate

2.1.3 Analisi ed elaborazione dati

L'elaborazione dei dati satellitari è stata effettuata in Google Earth Engine (Gorelick et al., 2017), che ha permesso di estrarre le serie temporali e calcolare gli indici di vegetazione multispettrali e iperspettrali (NDVI, EVI, SAVI, NDII, MSI). Per ridurre la variabilità interannuale e mettere in evidenza i trend di lungo periodo, gli indici sono stati aggregati e analizzati su base decennale. Le statistiche descrittive (media, deviazione standard, min-max) sono state calcolate in ambiente R 4.3.2 (R Core Team, 2023), utilizzando i pacchetti rgee (Aybar et al., 2020) per l'integrazione con GEE e terra (Hijmans, 2023) per l'analisi raster. Le mappe di variazione spaziale e le regressioni pixel-wise nel tempo sono state elaborate in QGIS 3.34 (QGIS Development Team, 2023). L'analisi di correlazione tra indici (NDVI, EVI, MSI) è stata condotta per identificare i settori più sensibili agli stress idrici, con particolare riferimento alle anomalie registrate in corrispondenza delle annate siccitose. I dati vegetazionali raccolti sul campo sono stati organizzati in R e analizzati mediante approcci multivariati. La composizione floristica dei plot è stata valutata attraverso ordinamenti indiretti, utilizzando la Detrended Correspondence Analysis (DCA) implementata nel pacchetto vegan (Oksanen et al., 2022). Le analisi di clustering sono state condotte con metodi gerarchici (UPGMA e Ward) tramite i pacchetti cluster (Maechler et al., 2022) e stats (R Core Team, 2023). La rappresentazione grafica dei risultati è stata realizzata con ggplot2 (Wickham, 2016). Queste procedure hanno permesso di

evidenziare la coerenza floristica delle comunità campionate, la distinzione tra i diversi assetti vegetazionali e le principali differenze lungo i gradienti ambientali ed edafici, garantendo al tempo stesso riproducibilità e trasparenza metodologica.

2.2 Studio della biodiversità marina mediante DNA ambientale (eDNA)

2.2.1 Campionamento e raccolta dei dati

Per lo studio della biodiversità marina nelle acque circostanti l'Isola di Montecristo è stata selezionata un'area rappresentativa degli ecosistemi costieri insulari, caratterizzata dalla presenza sia di comunità di fondo mobile che di fondo duro, su una batimetria compresa tra 15 e 30 metri. Questo approccio permette di ottenere una rappresentazione esaustiva delle biocenosi bentoniche litorali e della componente pelagica. Tutti i campionamenti sono stati effettuati presso il sito selezionato ($42^{\circ}20'11.59''N$ - $10^{\circ}17'25.59''E$; Fig. 3).

Oltre a Montecristo, ai soli fini comparativi sono stati presi in considerazione anche campioni raccolti in altri siti dell'Arcipelago Toscano (Giannutri, Isola d'Elba, Giglio, Capraia, Pianosa). Questi dati aggiuntivi, sebbene non previsti dal progetto, sono stati utilizzati per favorire l'interpretazione dei risultati e comprendere la rilevanza dell'area di studio nel contesto generale.



Figura3. Sito selezionato per il campionamento del eDNA nell'Isola di Montecristo

Per ciascuna sessione sono state raccolte due repliche, filtrando 4 litri di acqua superficiale (0–0,5 m) tramite pompa a vuoto e filtri autopreservanti Smith-Root, progettati per garantire la stabilità del DNA anche in condizioni operative non ottimali.

2.2.2 Conservazione dei campioni e estrazione del DNA

L'amplificazione del DNA è stata eseguita mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizzando primer specifici opportunamente taggati con barcode molecolari, al fine di consentire l'identificazione univoca dei campioni durante la fase di analisi del sequenziamento.

I marcatori utilizzati sono stati scelti in base alla loro efficacia documentata in letteratura e alla copertura tassonomica. Si sottolinea come, in considerazione del fatto che trattavasi del primo esercizio per l'area di studio e contrariamente a quanto previsto in fase progettuale, il numero di marcatori utilizzati è stato accresciuto a 4, così da offrire un primo quadro quanto più possibile esaustivo della comunità biologica marina e orientare al meglio futuri monitoraggi nell'area. Di seguito si riportano le informazioni relative a ciascun marcatore, con le relative sequenze di primers, lunghezza attesa del frammento amplificato e gruppo di riferimento.

18S rRNA – Euka02

- Primer Forward (F): TTTGTCTGSTTAATTSCG
- Primer Reverse (R): CACAGACCTGTTATTGC
- Target tassonomico: Eucarioti, inclusi protisti e metazoi
- Lunghezza attesa del frammento: ~123 bp

cox1 mtDNA

- Primer Forward (mlCOLintF): GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC
- Primer Reverse (jgHCO2198): TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA
- Target tassonomico: Invertebrati e metazoi
- Lunghezza attesa del frammento: ~313 bp

16S rDNA – Kelly Metazoan 16S

- Primer Forward (Metazoa16S_F): AGTTACYYTAGGGATAACAGCG
- Primer Reverse (Metazoa16S_R): CCGGTCTGAACTCAGATCAYGT
- Target tassonomico: Metazoi
- Lunghezza attesa del frammento: ~160 bp

12S rDNA – Primer Tele02

- Primer Forward (F): AAACCTCGTGCCAGCCACC
- Primer Reverse (R): GGGTATCTAATCCCAGTTTG

- Target tassonomico: Pesci teleostei
- Lunghezza attesa del frammento: ~167 bp

La PCR è stata effettuata con master mix AmpliTaq Gold™ (Thermo Fisher Scientific), seguendo i seguenti cicli termici:

- 18S: 95°C 10'; 35×(95°C 30", 46°C 30", 72°C 1'); 72°C 7'
- cox1: 95°C 10'; 35×(95°C 30", 46°C 30", 72°C 1'); 72°C 7'
- 16S: 95°C 3'; 35×(95°C 30", 53°C 30", 72°C 15"); 72°C 5'
- 12S: 95°C 10'; 40×(95°C 30", 58°C 30", 72°C 1'); 72°C 7'

Le reazioni PCR sono state eseguite in triplicato tecnico per ciascun marcatore, al fine di garantire la robustezza, riproducibilità e affidabilità dei dati molecolari.

2.2.4 Preparazione delle librerie e sequenziamento

I prodotti PCR sono stati quantificati mediante fluorimetria utilizzando Qubit Flex Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) e normalizzati in concentrazione al fine di garantire una rappresentazione equimolare nelle fasi successive. Una volta normalizzati, i campioni sono stati raggruppati in librerie uniche, suddivise per marcatore genetico e replicati tecnici, in modo da ottimizzare la resa del sequenziamento e ridurre i bias quantitativi. Le librerie sono state poi sottoposte ad una fase di purificazione tramite biglie magnetiche AMPure XP (Beckman Coulter) con l'obiettivo di rimuovere primer residui, dNTPs non incorporati, enzimi e altri contaminanti che potrebbero interferire con la fase di sequenziamento. Infine, i pool purificati sono stati inviati a un centro di sequenziamento specializzato per l'analisi su piattaforma DNBSEQ (BGJ Tech), tecnologia di sequenziamento NGS paired-end 150 bp.

2.2.5 Analisi bioinformatica e elaborazione dati

I campioni sono stati analizzati seguendo le pipeline descritte di seguito. Parallelamente, sono stati elaborati, a scopo comparativo, anche dati raccolti in altri siti dell'Arcipelago Toscano (Giannutri, Elba, Giglio, Capraia, Pianosa), così da permettere un confronto diretto delle comunità biologiche tra le diverse isole. Per tutti i dataset generati, le sequenze grezze ottenute dal sequenziamento sono state inizialmente sottoposte a procedure di demultiplexing e controllo qualità. In particolare:

- Demultiplexing e trimming: i file FASTQ paired-end sono stati processati con Cutadapt (Martin, 2011, v5.x) per l'identificazione e la rimozione dei tag/primer presenti all'inizio e alla fine delle sequenze.

Contestualmente sono state eliminate le letture di bassa qualità o non conformi ai parametri di lunghezza stabiliti.

- Controllo qualità: la qualità delle sequenze è stata valutata con FastQC (Andrews, 2010, v0.12.1) e i report aggregati con MultiQC (Ewels et al., 2016, v1.31), al fine di verificare la distribuzione della qualità lungo le letture e identificare eventuali bias di sequenziamento.

- Allineamento delle letture paired-end: quando previsto dal protocollo, le letture forward e reverse sono state assemblate in una singola sequenza mediante PEAR (Zhang et al. 2014, v0.9.11).
- Formattazione dataset: i file FASTQ post-filtraggio sono stati combinati in un unico dataset per le successive fasi di analisi. Le pipeline successive sono state differenziate in funzione dei marcatori molecolari considerati.

L'analisi delle sequenze relative ai marcatori Tele02 (12S), Euka02 (18S) e Metazoa (16S) è stata condotta in QIIME2 (Bolyen et al. 2019, v2024.10.1) utilizzando la pipeline DADA2 (Callahan et al. 2016), che ha permesso di identificare le varianti uniche di sequenza (ASVs), rimuovere varianti spurie, errori (denoising) e chimere.

Le sequenze relative al gene *cox1* sono state elaborate utilizzando una pipeline bioinformatica sviluppata in OBITools (Boyer et al. 2016, v1.2.13). In una prima fase, mediante il comando *obiuniq*, sono state identificate tutte le sequenze identiche presenti nel dataset, raggruppandole in Operational Taxonomic Units (OTUs). Successivamente è stato effettuato un filtraggio preliminare dei dati: con *obistat* sono state prodotte statistiche di abbondanza, mentre *obigrep* ha consentito di eliminare le OTUs con una frequenza inferiore a tre occorrenze sull'intero dataset. L'uso di *obiclean* ha inoltre permesso di rimuovere sequenze spurie e possibili errori di amplificazione. In un'ulteriore fase, i comandi *obiannotate* e *obitab* sono stati impiegati per arricchire le OTUs con metadati relativi ai primers e per estrarre statistiche utili alla loro distribuzione, rendendo possibile la successiva associazione delle OTUs ai diversi siti di campionamento.

L'assegnazione tassonomica delle ASVs e delle OTUs è stata eseguita mediante *blastn* (v2.15.0; modalità *megablast*), applicando i seguenti filtri: E-value $\leq 1e-3$, identità $\geq 90\%$, copertura della query $\geq 90\%$. Le analisi BLAST (Camacho et al. 2009) sono state condotte in parallelo su NCBI e ulteriori databases di riferimento. In particolare, per *cox1* sono stati utilizzati tre databases: COInr (2025-05-23), MIDORI2 (Machida et al. 2017, GB267, 2025-06-19) e *core_nt* (2025-08-25), per Euka02 è stato utilizzato Silva SSU 138.2 (Quast et al., 2013), mentre per tele02 (12S) è stato utilizzato anche il database Mitohelper (2025-03). Le tabelle riassuntive dei diversi marcatori sono state prodotte e formattate in R. Successivamente, i dati sono stati sottoposti a revisione e validazione manuale (un passaggio dispendioso in termini di tempo e spesso evitato, ma ritenuto necessario in questo caso essendo la prima applicazione della metodica nell'area), con particolare attenzione alla coerenza ecologica e biogeografica dei taxa identificati. Le informazioni sulla distribuzione e sulla corretta tassonomia delle specie sono state verificate consultando banche dati specialistiche, tra cui AlgaeBase (Guiry & Guiry), WoRMS (World Register of Marine Species; Horton et al. 2025) e GBIF (Global Biodiversity Information Facility), al fine di garantire un'interpretazione accurata e scientificamente valida dei risultati.

2.3 Studio di genetica di popolazioni di *Discoglossus sardus*

2.3.1 Campionamento

I campionamenti sono stati condotti nelle isole del Giglio e di Montecristo, in un totale di 21 siti (19 al Giglio, 2 a Montecristo; Fig. 4-6).

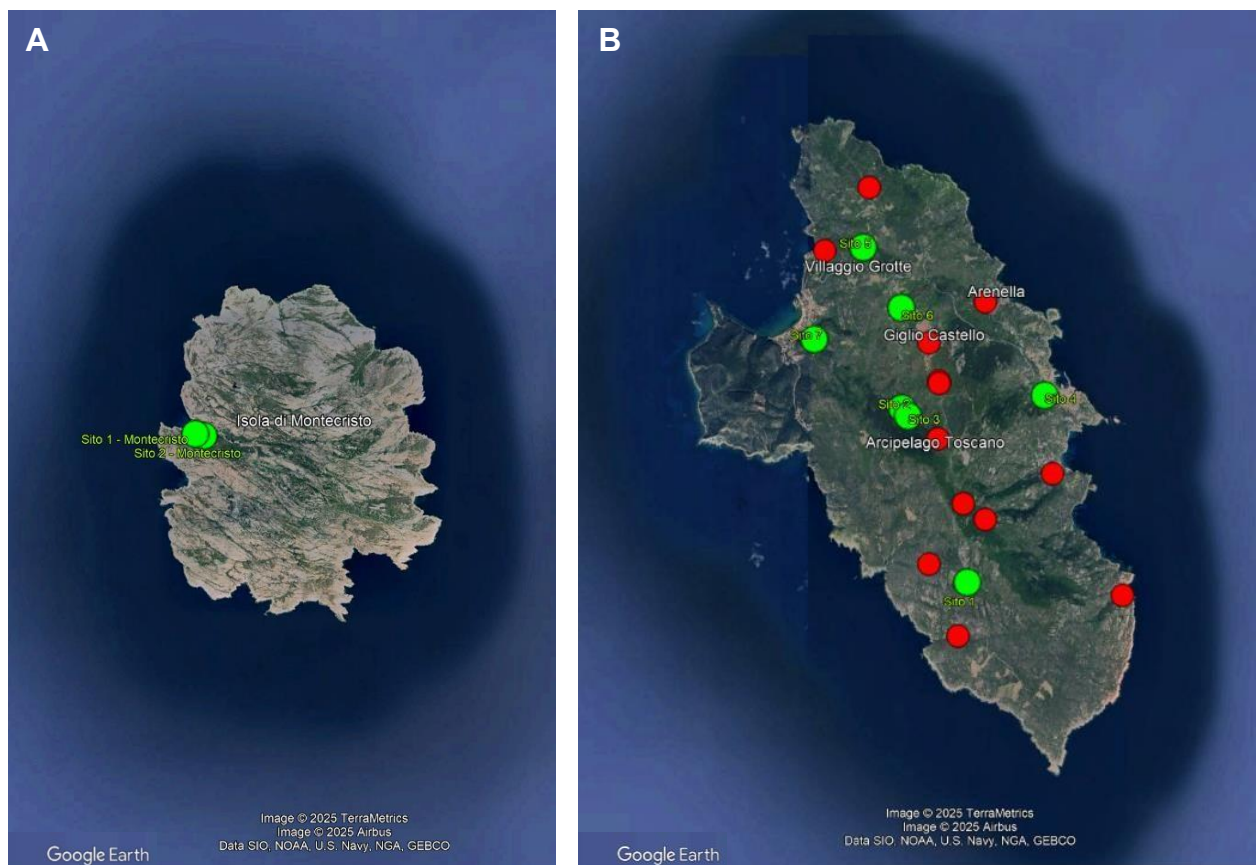


Figura 4. Siti di campionamento nell'Isola di Montecristo (A) e nell'Isola del Giglio (B). In rosso i siti dove la specie non è stata rinvenuta; in verde i siti dove la specie è stata rinvenuta e sono stati raccolti campioni per le analisi genetiche.

In 12 siti non è stata rilevata la presenza della specie, principalmente per assenza di corpi idrici. La specie è stata rinvenuta in 9 siti (7 al Giglio, 2 a Montecristo; Fig. 5-8), da cui sono stati raccolti 79 campioni biologici (Tab. 1). Per ciascun individuo è stata prelevata una piccola porzione di tessuto (biopsia di coda o di membrana interdigitale), conservata in etanolo al 95% fino alle analisi.

Tabella 1. Campioni di Discoglossus sardo raccolti per le isole Giglio e Montecristo con informazioni dei siti di campionamento.

Specie	Località	Site ID	Habitat type	Data	Latitudine	Longitudine	Numero di campioni
<i>Discoglossus sardus</i>	Isola del Giglio	sito 1	Artificial	giugno 2024	42.338123	10.906463	2
<i>Discoglossus sardus</i>	Isola del Giglio	sito 2	Natural	giugno 2024	42.357475	10.896664	10
<i>Discoglossus sardus</i>	Isola del Giglio	sito 3	Natural	giugno 2024	42.356602	10.897559	10
<i>Discoglossus sardus</i>	Isola del Giglio	sito 4	Artificial	giugno 2024	42.35891	10.918075	1
<i>Discoglossus sardus</i>	Isola del Giglio	sito 5	Natural	giugno 2024	42.375343	10.890835	17
<i>Discoglossus sardus</i>	Isola del Giglio	sito 6	Artificial	giugno 2024	42.368626	10.896556	10
<i>Discoglossus sardus</i>	Isola del Giglio	sito 7	Natural	giugno 2024	42.365128	10.883498	9
<i>Discoglossus sardus</i>	Montecristo	sito 1	Natural	giugno 2024	42.333981	10.295471	10
<i>Discoglossus sardus</i>	Montecristo	sito 2	Natural	giugno 2024	42.334119	10.294191	10

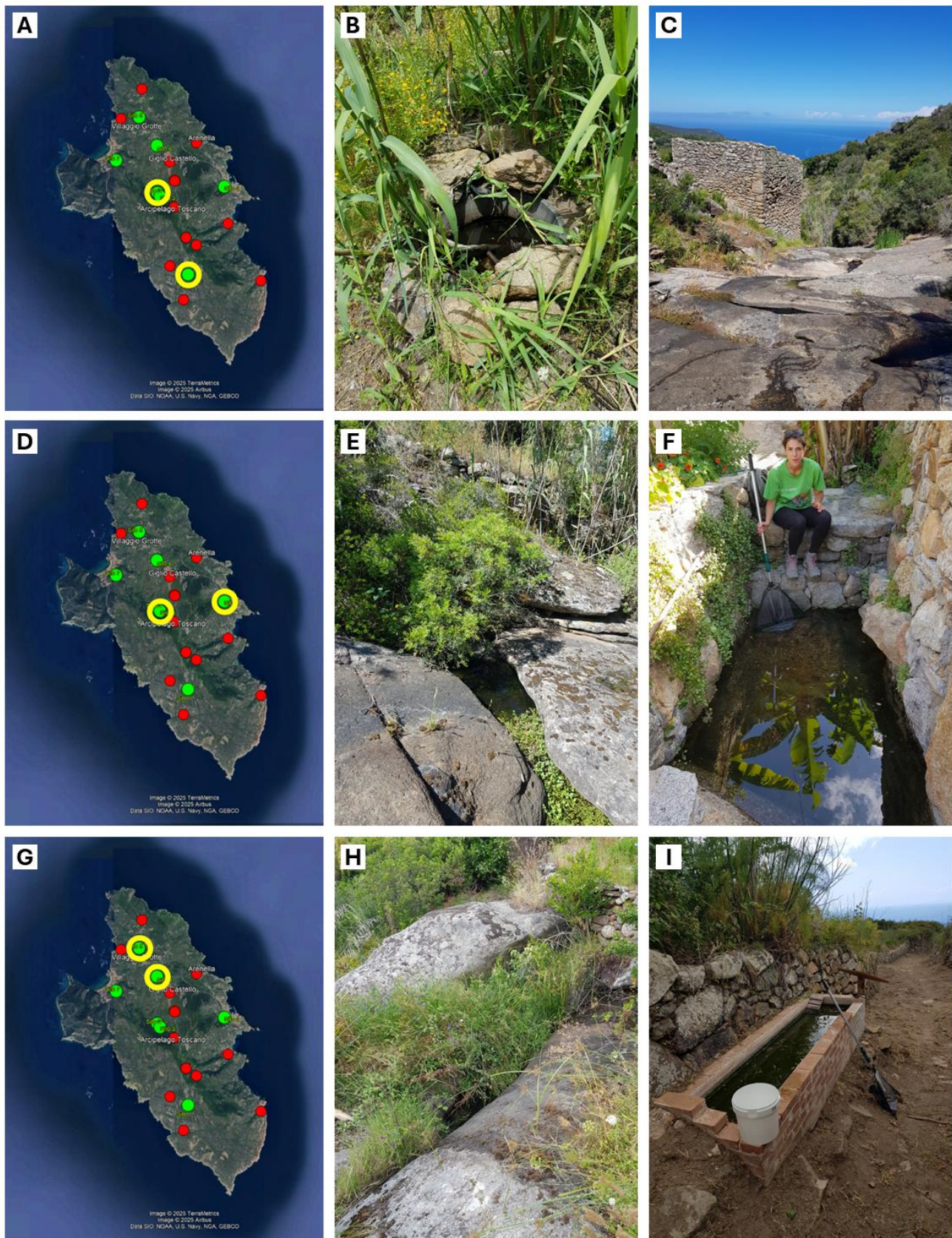


Figura 5. Alcuni siti di campionamento nell'Isola del Giglio (A–I). Nelle mappe a sinistra è indicata la posizione geografica dei siti, rappresentati nelle immagini centrali e a destra durante i rilievi di campo. Il *Discoglossus sardus* è stato osservato sia in ambienti artificiali (B, F, I) sia in ambienti naturali (C, E, H).

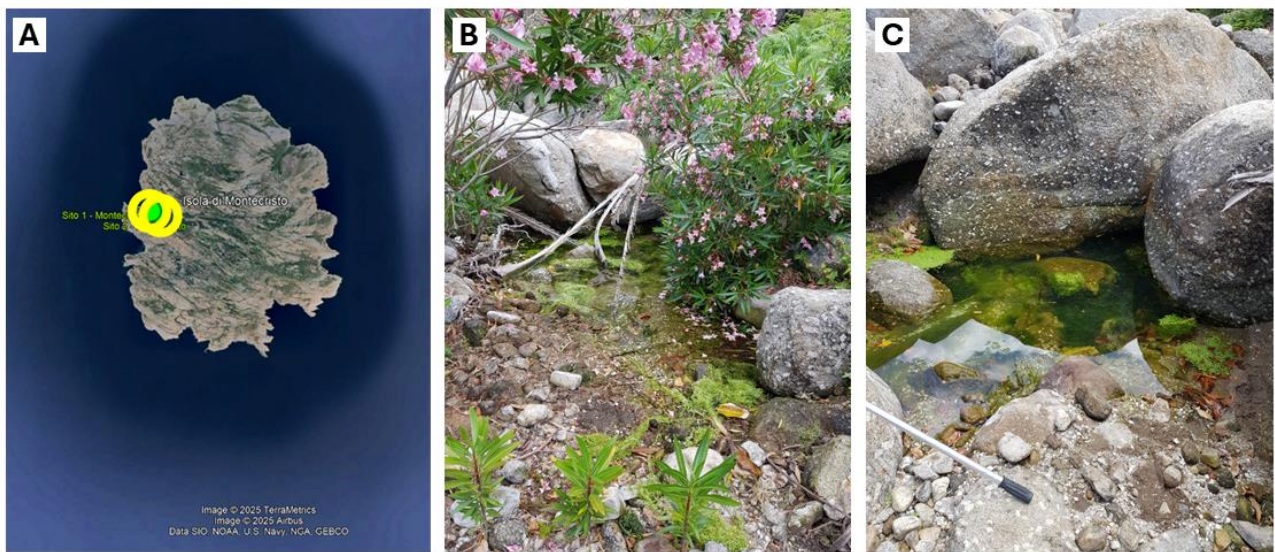


Figura 6. Alcuni siti di campionamento nell'Isola di Montecristo (A–B). Nella mappa a sinistra è indicata la posizione geografica dei siti, rappresentati nelle immagini centrali e a destra durante i rilievi di campo. Il Discoglosso sardo (*Discoglossus sardus*) è stato osservato in piccole pozze di acqua nei pressi dei siti di ruscellamento.

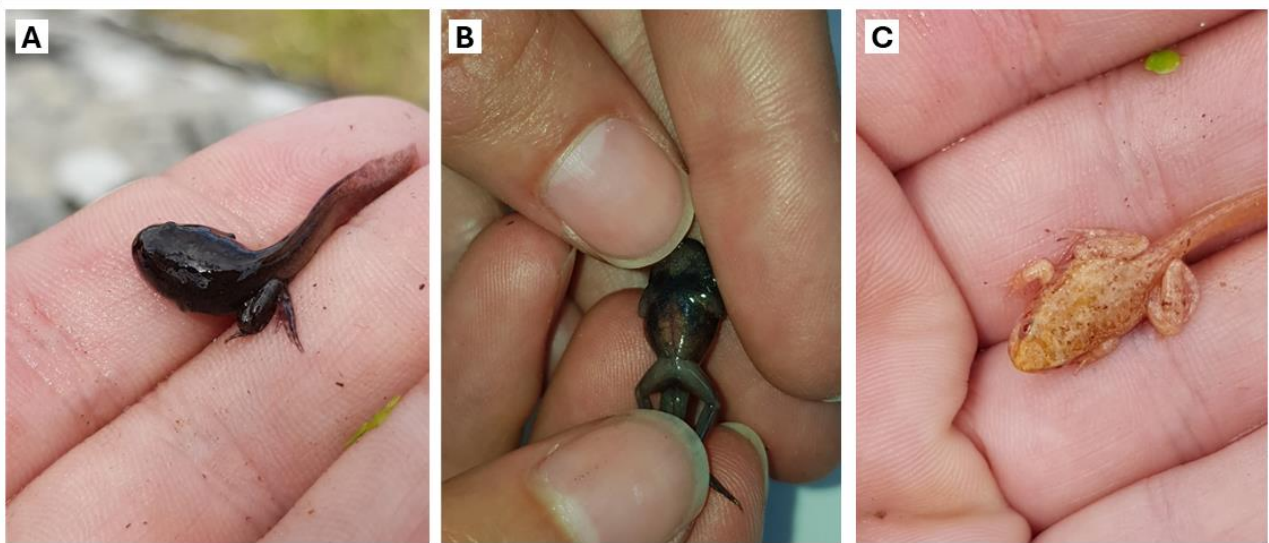


Figura 7. Individui di Discoglossus sardo (*Discoglossus sardus*) osservati nelle ultime fasi della metamorfosi (A–B) e durante l’uscita dall’acqua (C).



Figura 8. Individuo adulto di Discoglossus sardo (*Discoglossus sardus*).

2.3.2 Estrazione e analisi genomica

Il primo step necessario allo studio della variabilità genetica dei campioni raccolti consiste nell'estrazione del DNA genomico. Il DNA è stato estratto da una porzione del campione biologico raccolto per ogni individuo utilizzando il kit Zymo-Research specifico per tessuti animali, il quale consente di ottenere materiale genetico di elevata qualità e purezza, adatto alle analisi di sequenziamento di nuova generazione. Il DNA estratto è stato successivamente quantificato mediante il fluorimetro Qubit, uno strumento che fornisce misure precise della concentrazione di DNA. Questa fase è fondamentale per garantire che ogni campione contribuisca in modo equilibrato alle analisi successive, evitando errori dovuti a differenze di quantità o qualità del materiale di partenza.

Il sequenziamento genetico degli individui è stato effettuato mediante approccio RAD-Seq, una tecnica che permette di analizzare in modo rapido e mirato regioni rappresentative del genoma (decine di migliaia di regioni del genoma), offrendo un quadro dettagliato della variabilità genetica tra individui o popolazioni senza dover sequenziare l'intero DNA. La preparazione delle librerie genomiche è stata condotta seguendo il protocollo quaddRAD. Il DNA è stato frammentato mediante digestione con degli enzimi di restrizione (*PstI* e *MspI*), a cui sono stati poi legati adattatori specifici (top e bottom adapter). Questo passaggio consente di selezionare e amplificare regioni mirate del genoma, rendendo possibile l'analisi di migliaia di marcatori genetici distribuiti in tutto il DNA. Le librerie vengono poi amplificate mediante PCR, e successivamente purificate. Dopo la purificazione, la qualità delle librerie è stata verificata con il sistema Agilent TapeStation, che permette di valutare la distribuzione delle dimensioni dei frammenti. Infine, per assicurare un'elevata omogeneità tra i campioni, è stata effettuata una selezione delle dimensioni dei frammenti con il sistema BluePippin (Agilent). A questo punto le librerie sono andate incontro al sequenziamento. Il sequenziamento è stato realizzato sulla piattaforma Illumina DNBSEQ-G400 (MGI Tech) con tecnologia paired-end (PE150), che consente la lettura di entrambe le estremità dei frammenti di DNA, garantendo maggiore accuratezza e copertura dei dati.

2.3.3 Analisi ed elaborazione dati

Le analisi bioinformatiche sono state impostate in modo da coniugare due approcci complementari per la ricostruzione dei genotipi e la caratterizzazione della variabilità genetica di *Discoglossus sardus*. Da un lato è stato utilizzato un approccio *de novo*, basato sul programma *denovo_map.pl* del pacchetto *Stacks* (Catchen et al., 2013), finalizzato alla ricostruzione dei loci senza riferimento a un genoma di supporto; dall'altro è stato implementato un approccio di allineamento a riferimento (*reference-based*), mediante *ref_map.pl*, sfruttando il genoma di *Discoglossus pictus* (GCA_027410445.1) come riferimento comparativo per l'assemblaggio e la chiamata delle varianti. L'ottimizzazione dei parametri del processo *de novo* è stata condotta esplorando diverse combinazioni dei valori di soglia ($-m$, $-M$, $-n$), con un range testato per $-M$ e $-n$ compreso tra 1 e 4; la configurazione che ha fornito il miglior equilibrio tra qualità e quantità di loci identificati è risultata quella con parametri $-m$ 3, $-M$ 2 e $-n$ 2. Una volta generati i file *VCF* (Danecek et al. 2011) tramite il modulo *populations*,

i dataset sono stati sottoposti a una serie di filtri di qualità utilizzando *vcftools*, volti a rimuovere *indels* e loci non biallelici, ad applicare soglie di profondità di lettura minima (*minDP*) e massima media (*max-meanDP*), limiti sul *minor allele count* (*MAC*) e percentuali massime di dati mancanti per sito. Dopo i controlli di qualità e la filtrazione degli individui con elevati *missing data* (che sono stati quindi rimossi), il dataset finale risulta composto da 42 individui del Giglio e 8 di Montecristo. Tale processo di filtraggio ha consentito di ottenere dataset progressivamente più puliti: nell'approccio *de novo* sono stati mantenuti 6.242 loci su un totale di 30.836 siti potenziali, mentre per analisi più stringenti sull'eterozigosi (*minDP*=20, *max-missing*=0.90) il numero di loci è stato ridotto a 1.028. Nell'approccio *reference-based*, dopo la prima iterazione di filtri sono rimasti 14.011 loci su 47.012, mentre una successiva iterazione, più selettiva, ha prodotto un dataset finale di 3.912 loci (*minDP*=20, *max-missing*=0.90). Considerato il maggior numero di loci ritenuti dall'approccio *reference-based*, abbiamo deciso di utilizzare i *VCF* generati da quest'ultimo per le successive analisi. I dati filtrati sono stati poi utilizzati per la stima delle metriche di diversità individuale e di popolazione; in particolare sono state calcolate le eterozigosi individuali tramite *vcftools --het* e le distanze genetiche *Fst* con il pacchetto R *StAMPP*, dalle quali sono state ricavate le relative matrici di confronto tra popolazioni.

I dati genomici prodotti sono stati infine utilizzati per inferire i cambiamenti storici nelle dimensioni di popolazione e le dinamiche demografiche delle popolazioni di Discoglossus sardo dell'Isola del Giglio e dell'Isola di Montecristo. Le analisi si sono basate sul *Site Frequency Spectrum* (*SFS*), una rappresentazione della distribuzione delle frequenze delle varianti genetiche (alleli) presenti nel genoma degli individui di una popolazione, e che permette di ricostruire la storia demografica ed evolutiva della popolazione considerando la proporzione tra le mutazioni rare, comuni o fissate. Avendo a disposizione il genoma di riferimento di una specie affine alla specie studiata (*Discoglossus pictus*) è stato possibile estrapolare l'*SFS* reale, calcolato mediante la procedura implementata nel software *ANGSD* (Korneliussen et al. 2014), che consente di ottenere stime affidabili anche da dati di sequenziamento a copertura medio-bassa. Per ogni popolazione è stato prodotto un *SFS* unidimensionale (*ID-SFS*), che è stato successivamente utilizzato dal software *Stairway Plot 2* (Liu & Fu 2015) per stimare le variazioni nel tempo delle dimensioni effettive di popolazione (*Ne*) dei Discoglossi dell' Isola del Giglio e dell'Isola di Montecristo.

3. Risultati e Discussione

3.1 Dinamiche della vegetazione nelle isole minori dell'Arcipelago Toscano

3.1.1 *Remote sensing*

L'analisi della serie storica di immagini Landsat (1984–2024) ha consentito di ricostruire con continuità quarantennale l'evoluzione della copertura vegetale delle isole oggetto di studio (Tucker, 1979; Gorelick et al., 2017). L'utilizzo di indici multispettrali e iperspettrali (NDVI, EVI, SAVI, NDII, MSI) ha permesso di quantificare variazioni sia di breve termine, legate alle oscillazioni climatiche interannuali, sia di lungo periodo, legate a processi strutturali e successionalmente rilevanti. Nel complesso, i valori medi di NDVI mostrano un quadro di stabilità generale, con valori prossimi a 0,52 sull'intero arco temporale considerato. Le oscillazioni interannuali si collocano tipicamente entro $\pm 0,1$, riconducibili alle variazioni meteorologiche stagionali (precipitazioni, stress idrici estivi). Il trend di lungo periodo non evidenzia incrementi sistematici della produttività primaria, ma piuttosto una persistenza degli assetti vegetazionali preesistenti. Le analisi spaziali mostrano come le differenze interne all'isola si siano mantenute pressoché costanti nel tempo. I settori esposti, caratterizzati da suoli superficiali e forte insolazione, hanno conservato valori di NDVI più bassi (0,35–0,45), mentre le aree riparate e microclimaticamente favorevoli hanno mantenuto valori più alti (0,55–0,60). Questa eterogeneità, già evidente nei dati degli anni Ottanta, è rimasta stabile anche nei decenni successivi, suggerendo che i principali fattori di controllo delle dinamiche vegetazionali siano di tipo topografico e biotico (in primis il pascolamento).

Le analisi di Change Detection hanno evidenziato che meno del 5% della superficie ha subito variazioni persistenti lungo l'intera serie. Le aree di regressione vegetale si concentrano nelle zone di transizione roccia–prateria, soprattutto nei versanti meridionali e occidentali, dove l'interazione tra erosione, esposizione e disturbo biotico produce condizioni di fragilità strutturale. Al contrario, i segnali di incremento ($\Delta\text{NDVI} > 0,05$) restano circoscritti a microsettori ombreggiati e scarsamente accessibili, interpretabili come nuclei localizzati di ricolonizzazione arbustiva. Un elemento ricorrente riguarda la risposta agli anni siccitosi estremi: i dati mostrano riduzioni consistenti degli indici (ΔNDVI compreso tra $-0,1$ e $-0,15$) nelle annate 2003, 2012, 2017 e 2022. In questi casi, la vegetazione ha evidenziato cali temporanei di produttività, seguiti da recuperi parziali nelle stagioni successive. Questo comportamento suggerisce una resilienza complessiva del sistema, pur in presenza di eventi climatici sempre più frequenti e intensi. In sintesi, il confronto temporale lungo la serie storica evidenzia una vegetazione complessivamente stabile, ma caratterizzata da dinamiche localizzate di regressione nelle aree più vulnerabili e dà segnali molto limitati di recupero arbustivo in settori marginali. Tale quadro conferma che, nonostante l'assenza di variazioni macroscopiche a scala insulare, gli ecosistemi vegetazionali restano in equilibrio precario, fortemente condizionato dagli estremi climatici e dalle pressioni biotiche locali.

3.1.2 Risultati dei rilievi vegetazionali

I rilievi condotti nel 2025 hanno permesso di caratterizzare in maniera dettagliata lo stato attuale della vegetazione delle isole minori del PNAT, restituendo un quadro coerente con quanto osservato nei dati da telerilevamento ma arricchito da elementi strutturali e floristici di maggiore risoluzione (Fig. 9-11). Dal punto di vista della struttura della vegetazione, la copertura complessiva si mantiene elevata, con valori medi attorno al 75–80% e un range che oscilla tra il 50% e oltre il 90% a seconda delle condizioni micro-ambientali. Lo strato arbustivo rappresenta la componente dominante: oltre due terzi dei rilievi presentano una copertura superiore al 40%, e in più del 40% dei casi essa supera il 60%. Questi valori confermano che l'assetto attuale è fortemente sbilanciato verso comunità arbustive compatte, che garantiscono continuità al manto vegetale ma allo stesso tempo bloccano le traiettorie successionali.

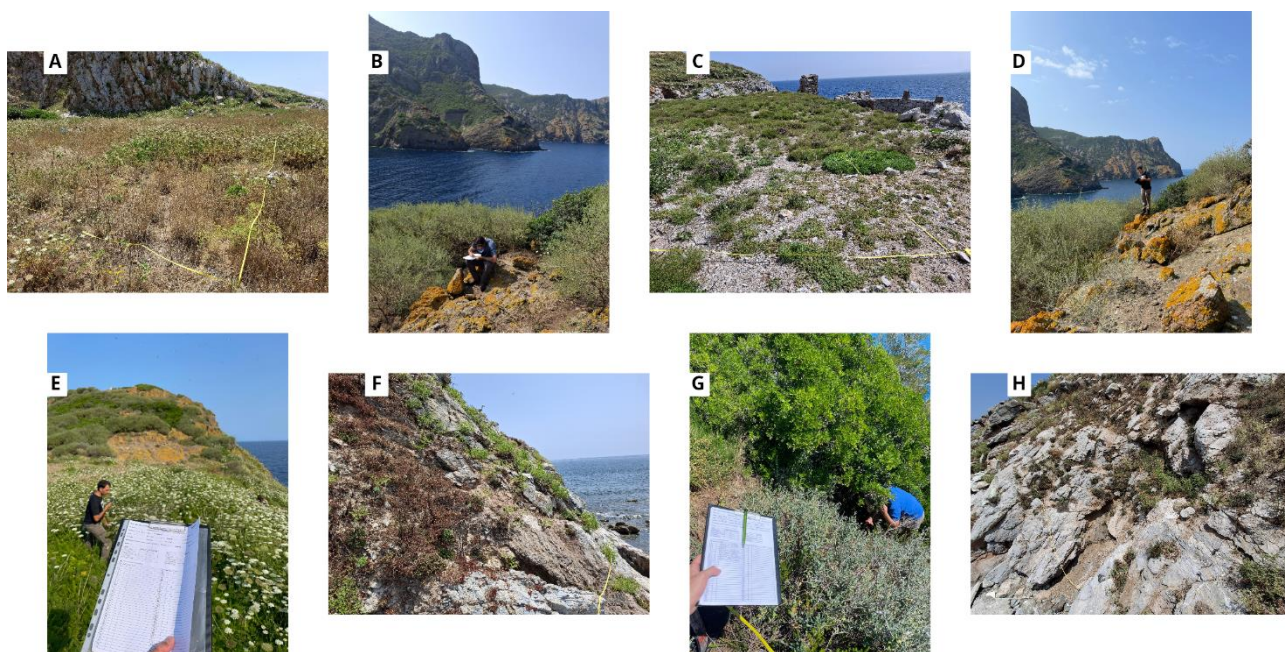


Figura 9. Alcuni siti di campionamento sulle isole di Cerboli, Peraiola e Gemini

Lo strato erbaceo contribuisce in misura minore, con una copertura media intorno al 20% ma caratterizzata da forte variabilità locale (1–70%). Lo strato arboreo, invece, è pressoché assente: solo in rari casi si osservano individui isolati, senza mai costituire una componente strutturale significativa. I parametri edafici confermano condizioni povere ma non estreme: la roccia affiorante rappresenta in media circa il 15% della superficie, la pietrosità l'8%, il suolo nudo meno del 3% e la lettiera tra l'1 e il 2%. Questi valori delineano ambienti tipici delle isole mediterranee, caratterizzati da substrati sottili e discontinui ma comunque in grado di sostenere comunità vegetali compatte e relativamente stabili.

Tabella 2. Copertura percentuale media, mediana e valori estremi per strato della vegetazione (rilievi 2025)

STRATO	MEDIA (%)	MEDIANA (%)	MIN (%)	MAX (%)
COPERTURA TOTALE	75,1	80,0	30,0	95,0
ARBUSTIVO	50,1	60,0	0,0	93,0
ERBACEO	19,7	13,0	1,0	70,0
ARBOREO	1,5	0,0	0,0	40,0

La composizione floristica riflette chiaramente queste condizioni. I rilievi del 2025 documentano la prevalenza di macchie basse e garighe xerofile, dominate da suffrutici mediterranei e terofite annuali adattati a stress idrico e substrati superficiali. Tra le specie più frequenti si segnalano *Cistus monspeliensis*, presente in quasi tutte le unità di campionamento, *Arisarum vulgare* subsp. *vulgare*, costante in oltre tre quarti dei rilievi, *Teucrium marum* e *Salvia rosmarinus*, entrambi diffusi in maniera consistente, e ancora *Senecio lividus*, *Cerastium glomeratum* ed *Erica scoparia* subsp. *scoparia*. La distribuzione di questi taxa conferma l'adattamento delle comunità a condizioni xeriche e l'assenza di segnali di progressione verso assetti forestali. Tuttavia, in microambienti più favorevoli, come impluvi o versanti ombroso-umidi, sono stati registrati valori di ricchezza specifica nettamente superiori, fino a 25–30 specie per plot, a testimonianza di una maggiore eterogeneità ecologica e del ruolo cruciale dei microhabitat nel mantenimento della biodiversità locale. Per quanto riguarda le specie aliene, i rilievi del 2025 non hanno evidenziato una presenza significativa di taxa invasivi litorali.

Tabella 3. Specie rilevate con maggior frequenza nei plot eseguiti.

Specie	N. plot
<i>Cistus monspeliensis</i>	24
<i>Arisarum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	22
<i>Teucrium marum</i>	19
<i>Salvia rosmarinus</i>	19
<i>Senecio lividus</i>	16
<i>Cerastium glomeratum</i>	15
<i>Geranium purpureum</i>	13
<i>Umbilicus rupestris</i>	13
<i>Rumex bucephalophorus</i> subsp. <i>bucephalophorus</i>	12
<i>Lysimachia arvensis</i>	12

L'unica specie aliena documentata è *Ailanthus altissima*, rinvenuta in nuclei isolati e circoscritti. La sua distribuzione appare al momento molto limitata e la sua incidenza sull'intera flora censita è inferiore al 2%, ma la presenza rappresenta un potenziale fattore di rischio gestionale in quanto può ostacolare i processi di rinnovazione delle specie legnose autoctone. In sintesi, i rilievi di campo confermano che le comunità vegetali delle isole minori del PNAT sono strutturalmente dominate dagli arbusti, floristicamente semplificate e successionali bloccate. Pur garantendo una copertura complessiva elevata e continua, la quasi totale assenza dello strato arboreo e la scarsità di semenzali di specie forestali segnalano un equilibrio instabile, reso ancora più fragile dalla comparsa, seppur limitata, di specie aliene invasive.

3.1.3 Stato di conservazione

Il confronto con i dati storici disponibili (Filipello e Sartori 1981; Landi et al. 2007) indica che la vegetazione insulare ha mantenuto, nell'arco di oltre quarant'anni, un quadro di stabilità relativa. La copertura complessiva e la ricchezza floristica si collocano infatti su valori comparabili a quelli rilevati nei decenni precedenti, senza variazioni macroscopiche di superficie o di diversità complessiva. Tuttavia, questa apparente stabilità cela un assetto strutturale congelato su stadi arbustivi, incapaci di evolvere verso forme mature di macchia mediterranea o formazioni forestali. Un caso emblematico è rappresentato dai nuclei relitti di *Quercus ilex*, testimonianza della matrice forestale originaria. Nonostante la presenza di individui vetusti, in parte datati come plurisecolari, non si osservano segnali di rinnovazione. La costante assenza di semenzali e giovani piante di leccio conferma l'esistenza di un collo di bottiglia successionale, attribuibile principalmente alla pressione cronica del pascolamento caprino. Tale fattore biotico, sommato alle limitazioni edafiche tipiche degli ambienti insulari, impedisce l'avvio di processi di avanzamento strutturale e mantiene la vegetazione in uno stato di equilibrio forzato. Dal punto di vista funzionale, le comunità vegetali mostrano una resilienza parziale. La copertura totale si mantiene mediamente elevata e garantisce continuità al manto vegetale, ma la risposta agli eventi climatici estremi rivela una vulnerabilità significativa. I dati satellitari evidenziano cali consistenti di produttività ($\Delta NDVI -0,1/-0,15$) in coincidenza con le annate siccitose del 2003, 2012, 2017. Questo comportamento suggerisce che la vegetazione sia in grado di tamponare gli effetti degli stress idrici, ma senza recuperare pienamente i livelli precedenti, con un rischio di accumulo di deficit funzionali nel lungo periodo. Un ulteriore elemento critico è rappresentato dalla presenza di specie aliene, seppur attualmente molto contenuta. L'individuazione di nuclei isolati di *Ailanthus altissima* segnala una minaccia latente, che potrebbe compromettere ulteriormente la rinnovazione delle specie autoctone in caso di espansione. Pur costituendo meno del 2% dei taxa censiti, la loro comparsa va interpretata come un segnale di allerta gestionale. In sintesi, lo stato di conservazione della vegetazione insulare può essere definito come stabile ma fragile: stabile perché i valori di copertura e ricchezza risultano costanti nel tempo, fragile perché l'assenza di dinamiche successionali, la vulnerabilità agli stress idrici e la comparsa di aliene segnalano una condizione di equilibrio precario. Per queste ragioni, si ritiene fondamentale mantenere attivo un monitoraggio continuativo, integrando rilievi di campo e dati satellitari, e

pianificare interventi mirati di gestione della fauna e controllo delle specie invasive, al fine di evitare processi di semplificazione irreversibile della biodiversità insulare.

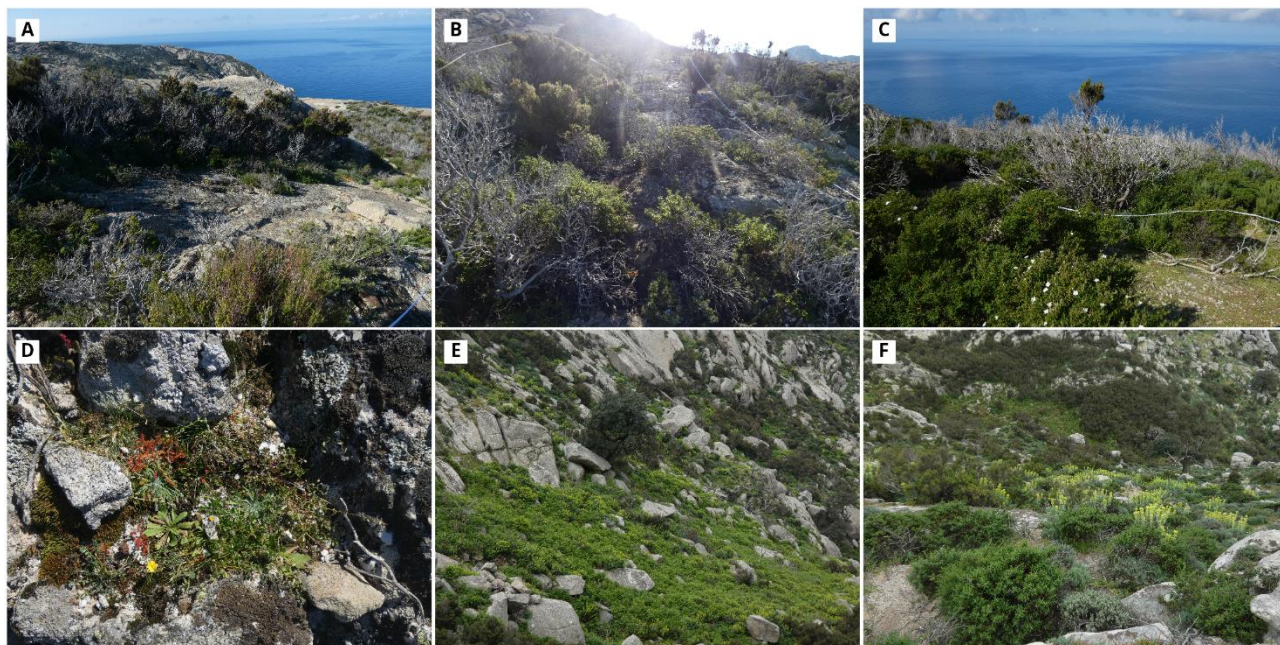


Figura 10. Alcuni siti di campionamento nell'Isola di Montecristo

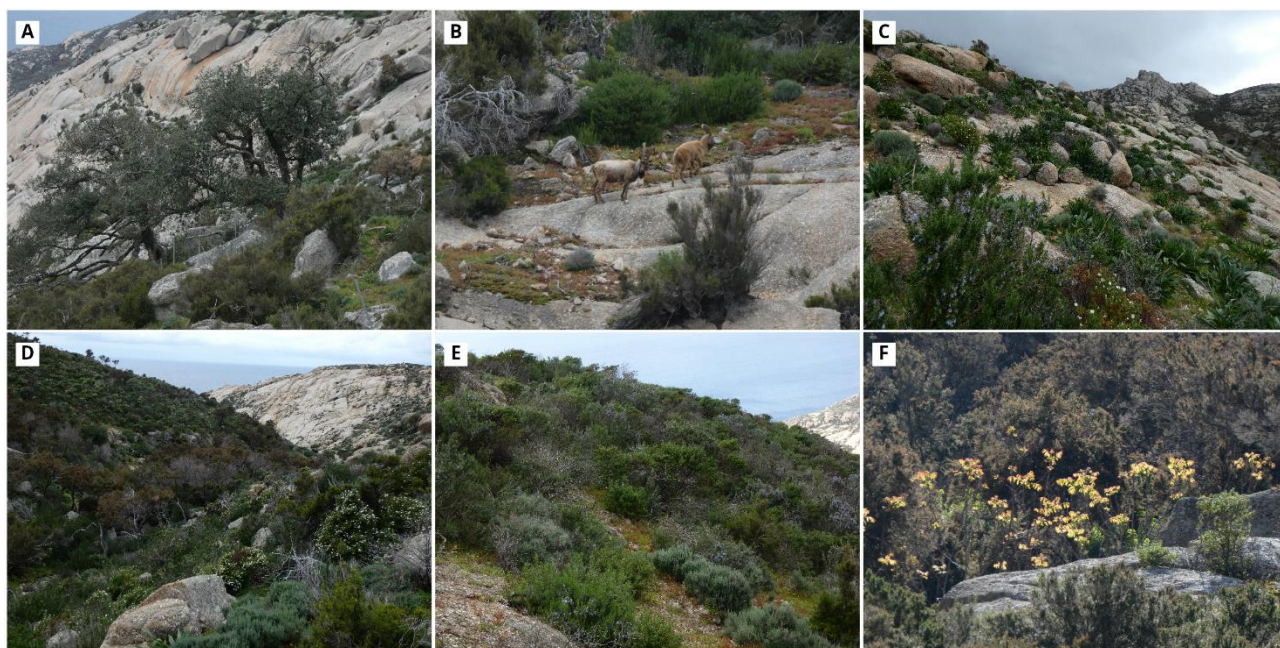


Figura 11. Alcuni siti di campionamento nell'Isola di Montecristo con la presenza di specie aliene

3.2 Studio della biodiversità marina (eDNA) dell'Isola di Montecristo

Dai dati ottenuti per l'Isola di Montecristo emerge un quadro di notevole complessità biologica, con la presenza di specie appartenenti a diversi e numerosi gruppi tassonomici. Nello specifico, a livello di regno (Fig. 12), la maggior parte delle specie identificate appartiene ad Animalia, che rappresenta il regno più abbondante con oltre 200 taxa individuati. Seguono i Chromista, con circa 139 specie, mentre Plantae e Protozoa risultano meno rappresentati (rispettivamente 29 e 7 specie). Le specie appartenenti al regno dei Funghi sono state rilevate marginalmente, solo una specie identificata.

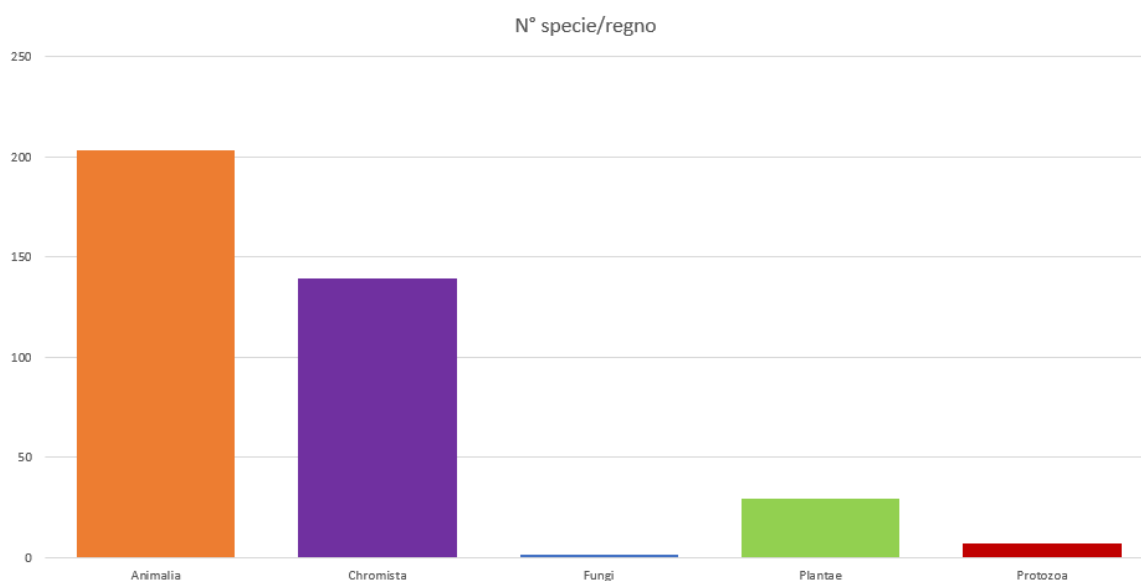


Figura 12. Numero di specie identificate presso l'Isola di Montecristo suddivise per regno.

Nel regno Animalia prevalgono le specie del phylum Chordata, con 61 taxa identificati, seguite da Arthropoda (34 specie), Annelida (28 specie) e Bryozoa (28 specie) (Fig. 13). Nel regno Chromista risultano particolarmente rappresentativi i Myxozoa (45 specie) e gli Heterokontophyta (33 specie). Nel regno Plantae sono stati rilevati soltanto due phyla, Chlorophyta (15 specie) e Rhodophyta (14 specie), mentre nel regno Protozoa è stato identificato esclusivamente il phylum Choanozoa (7 specie).

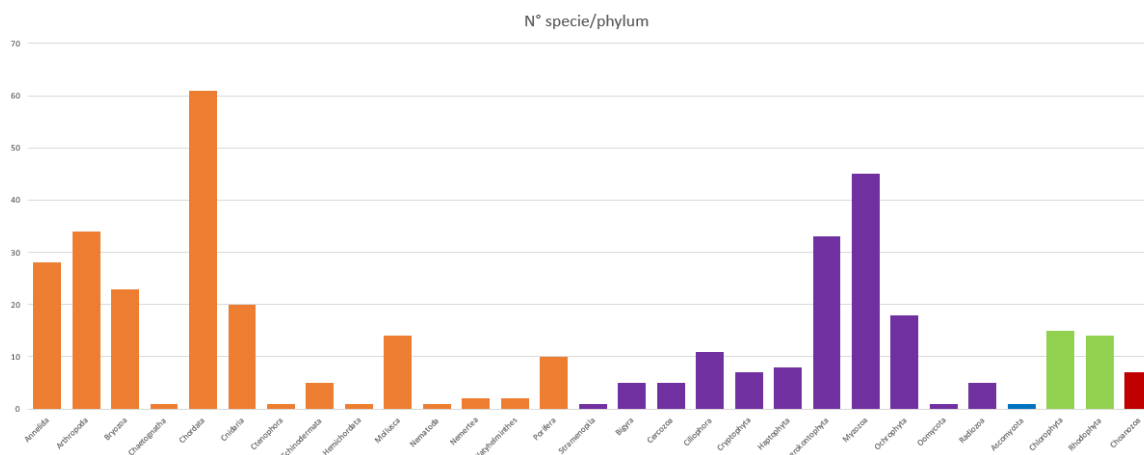


Figura 13. Numero di specie identificate presso l'Isola di Montecristo suddivise per phylum.

La lista completa delle identificazioni è riportata nel file **Allegato 1**.

In numerosi casi le specie sono state confermate da più di un marcatore, mentre altre risultano associate a un singolo marcatore, come peraltro atteso in ragione delle caratteristiche di specificità delle reazioni per i diversi gruppi tassonomici.

Complessivamente, le sequenze ottenute hanno consentito di raggiungere l'identificazione a livello di specie per la maggior parte dei taxa (≈ 240), mentre in altri casi l'assegnazione è stata possibile solo a livelli tassonomici superiori (per lo più genere, in alcuni casi famiglia, ordine o classe), in funzione della risoluzione del marcatore e della disponibilità di sequenze di riferimento nelle banche dati. In totale, sono stati assegnati 379 taxon. È importante sottolineare che il livello di profondità tassonomica raggiunta potrà aumentare nel tempo, a causa delle continue e costanti integrazioni delle banche dati cui un'ampia rete di ricercatori contribuisce. Questo, stante lo sforzo di sequenziamento profuso in questo progetto, potrà avvenire senza ulteriore spesa per l'ente.

Sulla base del confronto con le principali banche dati internazionali citate in precedenza, una parte delle specie ($N=159$) individuate costituisce nuove segnalazioni per l'area di studio. Di queste, 28 specie rappresentano la prima segnalazione anche per il Mar Mediterraneo; 58 specie rappresentano nuove segnalazioni anche per il Mar Tirreno; 73 specie risultano nuove esclusivamente per l'Arcipelago Toscano e, nello specifico, per l'Isola di Montecristo. Le restanti specie corrispondono invece a presenze già note per l'area, confermando la coerenza dei risultati con le conoscenze pregresse.

Tra le nuove segnalazioni per il Mar Mediterraneo ($N=28$) figurano 14 Chromista, 6 Animalia, 5 Plantae e 3 Protozoa. In particolare negli Animalia, le nuove segnalazioni comprendono 3 Annelida, 1 Platyhelminthes, 1 Nemertea e 1 Bryozoa.

Nel complesso, i dati ottenuti evidenziano la complessità e l'elevata diversità dell'ecosistema marino circostante l'Isola di Montecristo, confermandone il rilevante valore conservazionistico. Questo quadro è ulteriormente rafforzato dall'analisi comparativa con altri siti dell'Arcipelago Toscano (Giannutri, Isola

d'Elba, Giglio, Capraia, Pianosa), che mostra come Montecristo presenti la maggiore proporzione di specie rilevate, seguito da Elba e Giannutri, caratterizzati da valori simili tra loro (Fig. 14).

In questo contesto, l'isola di Montecristo, grazie al regime di tutela integrale degli ecosistemi terrestri e marini, si distingue per una biodiversità più elevata e strutturata rispetto alle altre isole, sottolineando l'efficacia e l'importanza delle misure di conservazione adottate.

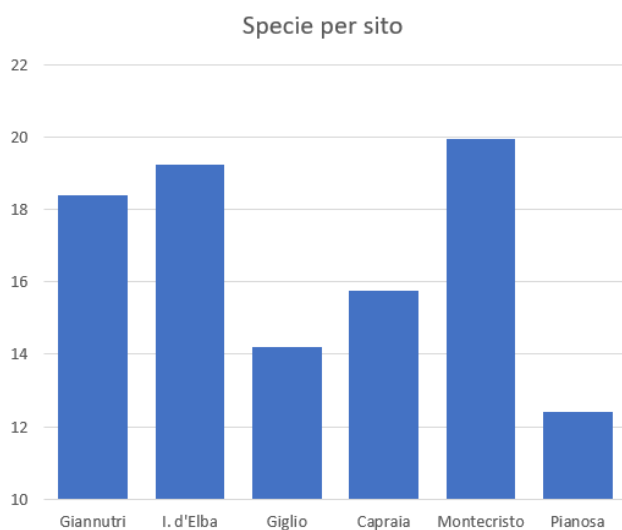


Figura 14. Proporzione di specie identificate presso l'Isola di Montecristo rispetto a quelle rilevate nelle diverse isole dell'Arcipelago Toscano.

3.3 Studio di genetica di popolazioni di *Discoglossus sardus*

L'analisi dell'eterozigosi individuale e della proporzione di siti polimorfici ha evidenziato differenze significative sia tra individui sia tra popolazioni di *Discoglossus sardus*. A livello di popolazione (Fig. 15), si osserva un discreto differenziamento nei livelli di variabilità espressi dalle popolazioni del Giglio e di Montecristo. A livello individuale, i valori di eterozigosi mostrano una variabilità piuttosto ampia (Fig. 16), con individui che presentano livelli di eterozigosi compresi mediamente tra 0,15 e 0,40, ma con casi estremi che raggiungono anche valori superiori (ad esempio 0,49 in alcuni individui dell'Isola del Giglio).

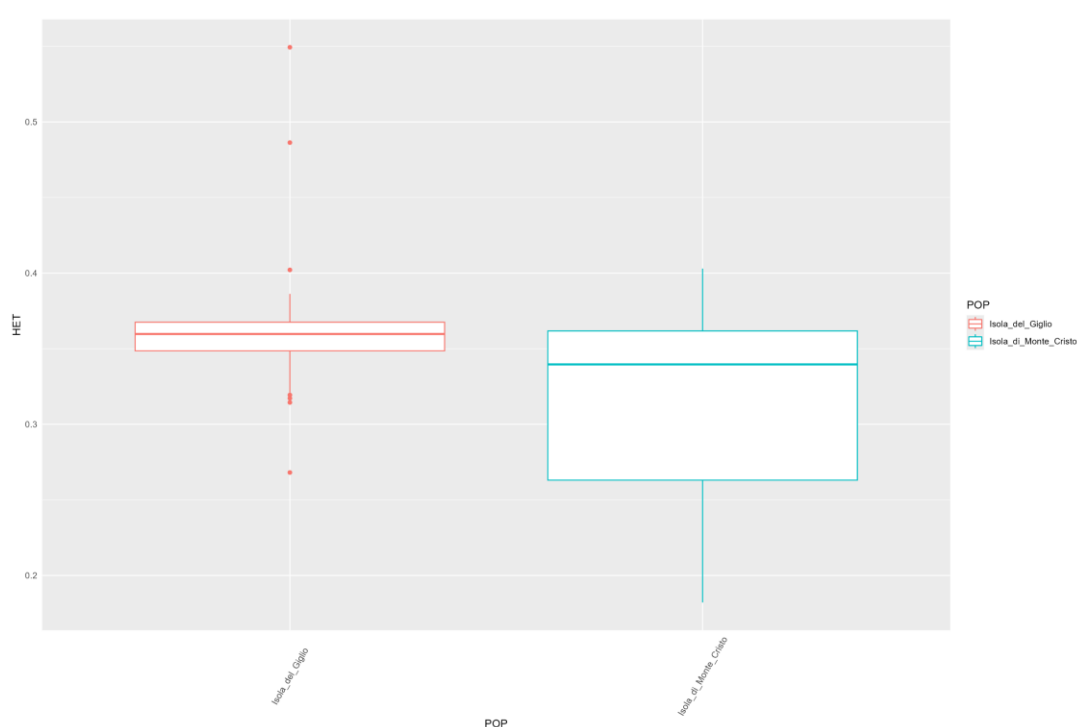


Figura 15 - Boxplot dei valori di eterozigosità (HET) nelle popolazioni analizzate: Isola del Giglio (in rosso) e Isola di Montecristo (in blu). L'Isola del Giglio mostra una più alta eterozigosità media e una distribuzione più omogenea tra individui. L'Isola di Montecristo presenta valori più bassi, ma con maggiore dispersione, suggerendo differenze individuali marcate nella variabilità genetica.

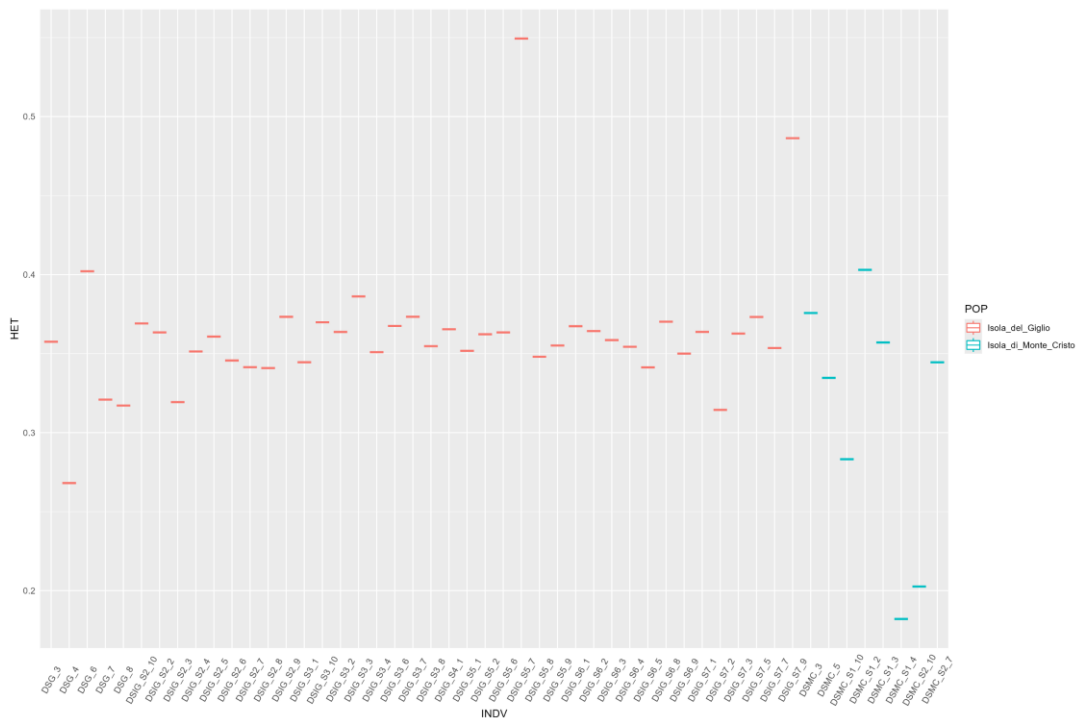


Figure 16 - Distribuzione dei valori di eterozigotà (HET) per ciascun individuo appartenente alle due popolazioni analizzate: Isola del Giglio (in rosso) e Isola di Montecristo (in blu).

La popolazione dell'Isola del Giglio mostra nel complesso i valori medi di eterozigosi più elevati (valori intorno a 0,34–0,37, con punte superiori a 0,40 in alcuni individui), indicando un buon grado di variabilità genetica interna. La popolazione di Montecristo presenta invece valori mediamente più bassi, con eterozigosi comprese tra 0,18 e 0,40, e una proporzione di siti polimorfici attorno a 0,30–0,34, suggerendo una variabilità più contenuta ma comunque consistente. A scopo comparativo, si consideri che la popolazione presente sul promontorio dell'Argentario risulta invece caratterizzata da un livello medio di eterozigosi ancora più ridotto ($\approx 0,28$), compatibile con una dimensione di popolazione più limitata.

Nel complesso, i dati confermano l'esistenza di una diversità genetica significativa nelle popolazioni insulari studiate, con una tendenza generale a valori di eterozigosi più elevati all'Isola del Giglio, a testimonianza di una storia demografica complessa e di una possibile persistenza di flussi genici residui tra le diverse aree dell'Arcipelago Toscano. Per contro, la diversità genetica minore osservata sull'Isola di Montecristo può essere attribuita all'impatto negativo sulle popolazioni di *Discoglossus* dell'introduzione a Montecristo del ratto nero (*Rattus rattus*), specie non autoctona. Come noto, infatti, prima della sua eradicazione completa dall'Isola (2016) il ratto nero ha esercitato una pressione diretta sulle popolazioni di molte specie autoctone, incluso il *Discoglossus*, il cui declino di popolazione ha probabilmente portato ad un collo di bottiglia genetico. I risultati osservati sono pienamente in linea con questo scenario.

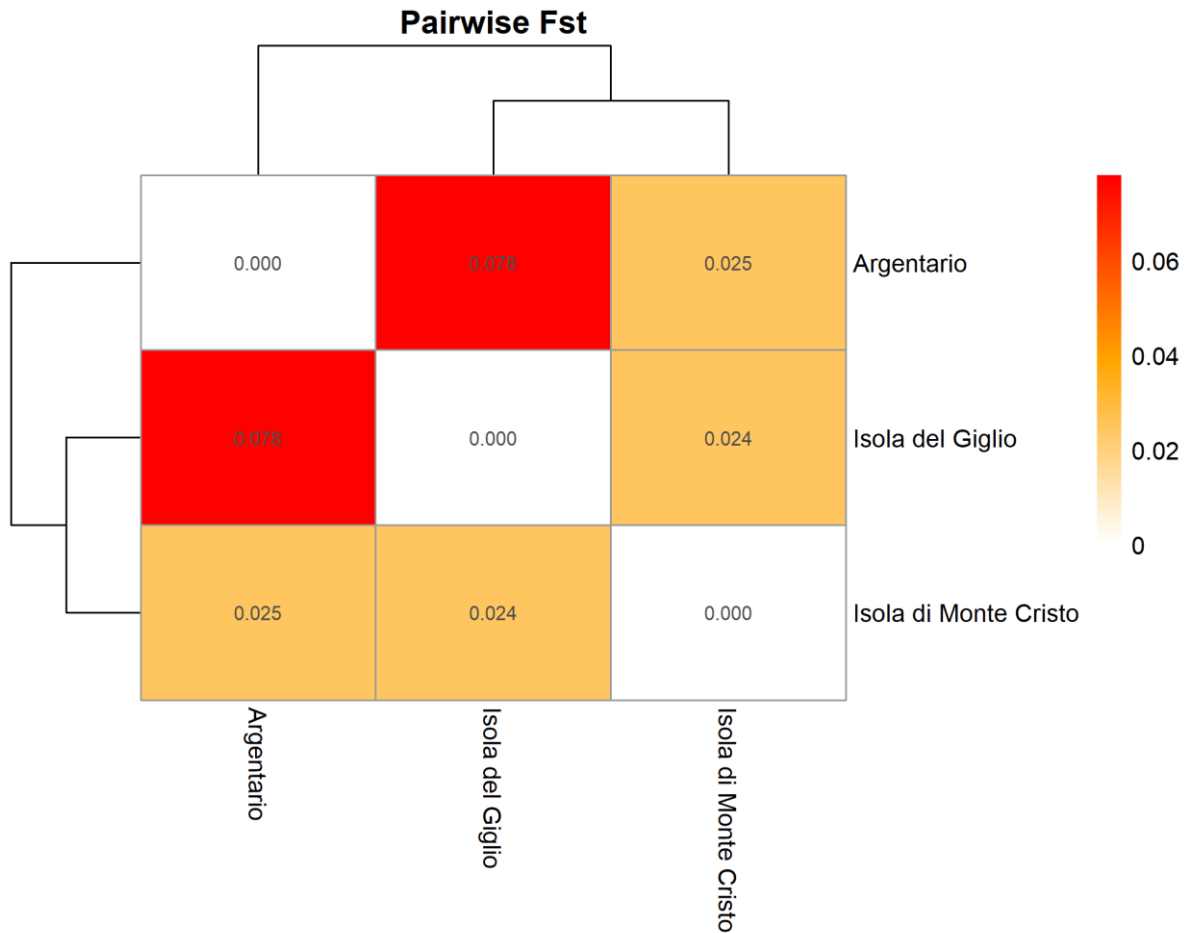


Figure 17 - Matrice di differenziazione genetica (Pairwise F_{st}) tra le tre popolazioni. I valori di F_{st} indicano una differenziazione maggiore tra Argentario e Isola del Giglio ($F_{st} = 0.078$), mentre le distanze genetiche tra Isola del Giglio e Isola di Montecristo ($F_{st} = 0.024$) e tra Argentario e Isola di Montecristo ($F_{st} = 0.025$) risultano più contenute. Nel complesso, i risultati evidenziano una moderata struttura genetica, con un certo grado di isolamento della popolazione di Argentario rispetto alle due isole.

Le analisi di differenziazione genetica, condotte a partire dal dataset filtrato (14.011 loci), hanno permesso di stimare i valori di F_{st} tra le popolazioni campionate nelle diverse isole dell'Arcipelago Toscano. I risultati, riportati nella matrice F_{st} e rappresentati graficamente tramite una *heatmap* (Fig. 17), mostrano un livello di differenziazione moderato tra la popolazione dell'Isola del Giglio e quella dell'Argentario ($F_{st} \approx 0,078$), mentre la popolazione di Montecristo risulta meno differenziata rispetto ad entrambe ($F_{st} \approx 0,025$ nei confronti dell'Argentario e $F_{st} \approx 0,024$ rispetto al Giglio). Il basso differenziamento che l'Isola di Montecristo mostra con le altre popolazioni potrebbe essere legato ad un'origine più recente, o ad un contributo sostanziale di

flusso genico da entrambe le popolazioni. Ulteriori analisi dei dati ottenuti, meglio se integrati con campioni sardo-corsi, saranno necessarie per definire ulteriormente la storia evolutiva delle popolazioni dell'Arcipelago Toscano, nonché determinare le complesse relazioni di metapopolazione che regolano il loro sostentamento nel tempo.

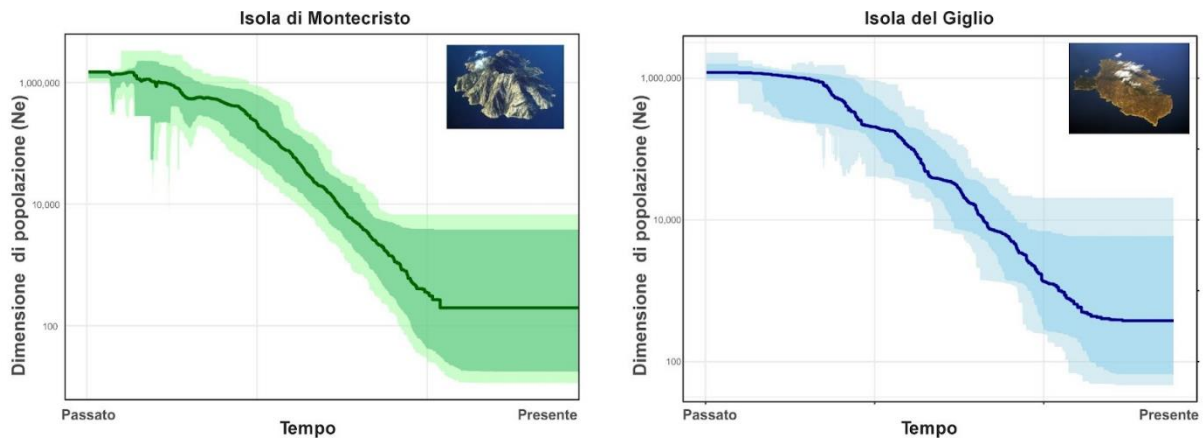


Figure 18 - Ricostruzione della variazione della dimensione effettiva di popolazione (N_e) del *Discoglossus sardus* nell'Isola di Montecristo (pannello di sinistra) e nell'Isola del Giglio (pannello di destra). Tempo e dimensione di popolazione sono rappresentati in scala logaritmica.

La ricostruzione dell'andamento della dimensione di popolazione del *Discoglossus* nel tempo nelle due isole è illustrata nella Fig. 18. Per entrambe le popolazioni, i risultati hanno evidenziato un forte declino demografico. Tale pattern è coerente con quanto osservato in molte specie insulari del Mediterraneo che, con l'innalzamento del livello del mare, hanno subito una riduzione e in molti casi una frammentazione dell'habitat. Nel caso del *Discoglossus* dell'Arcipelago Toscano, è verosimile che questo evento di frammentazione coincida con l'interruzione del flusso genico tra le popolazioni dell'Arcipelago e quelle del complesso Sardo-Corso. L'isolamento delle popolazioni dell'Arcipelago Toscano avrebbe pertanto comportato una contrazione demografica che ha ridotto la diversità genetica delle popolazioni, lasciando una traccia riconoscibile nei pool genetici delle popolazioni attuali.

Tuttavia, per entrambe le popolazioni, i risultati mostrano una stabilizzazione delle dimensioni di popolazione negli ultimi due decenni circa, suggerendo che le condizioni ambientali e l'applicazione di misure di conservazione e tutela degli habitat possano aver avuto un effetto positivo sulle popolazioni di *Discoglossus*. Le stime della dimensione effettiva di popolazione (N_e) indicano una dimensione di popolazione maggiore al

Giglio rispetto a Montecristo, sebbene non sia possibile da queste analisi stimare con accuratezza un valore assoluto. Pur trattandosi di stime, le dimensioni di popolazione ottenute risultano decisamente realistiche ed in linea con l'estensione relativa degli habitat potenzialmente idonei alla specie nelle due isole, maggiore al Giglio rispetto a Montecristo. Inoltre, sebbene questi valori confermino la piccola dimensione e la vulnerabilità di queste popolazioni, la loro stabilità demografica recente a fronte di un declino generalizzato a livello globale - in particolare negli Anfibi - rappresenta un segnale incoraggiante in risposta agli interventi di gestione e protezione della biodiversità attuati dal Parco e dalle altre istituzioni locali e nazionali coinvolte.

In particolare, l'eradicazione di specie invasive come il ratto nero (*Rattus rattus*) a Montecristo, insieme alle restrizioni sull'accesso umano e al mantenimento di habitat naturali intatti, sembrerebbero aver svolto un ruolo determinante nella stabilizzazione demografica osservata nel Discoglosso. Questi risultati sottolineano l'importanza di proseguire con programmi di monitoraggio e conservazione a lungo termine, fondamentali per garantire che queste popolazioni isolate mantengano la loro integrità genetica e la capacità di adattamento ai cambiamenti ambientali. Ulteriori indagini, attualmente già in corso, che includano un maggior numero di individui nonché rappresentanti delle popolazioni sardo-corse di Discoglosso risultano necessarie per aumentare il livello di risoluzione della scala temporale associata all'inferenza demografica ed evolutiva sulle popolazioni di Discoglosso dell'Arcipelago Toscano.

4. Conclusioni e indicazioni gestionali

I risultati del progetto ISOLE RARE hanno fornito un quadro aggiornato e dettagliato sullo stato di conservazione della biodiversità terrestre e marina delle isole minori dell'Arcipelago Toscano, integrando in modo sistematico dati storici, rilievi in campo, monitoraggi satellitari e approcci molecolari. I risultati conseguiti permettono di tracciare un bilancio complessivo che evidenzia come, pur in assenza di trasformazioni macroscopiche negli ultimi decenni, gli ecosistemi insulari siano caratterizzati da dinamiche complesse e da una stabilità solo apparente, che maschera fragilità strutturali e funzionali.

La vegetazione terrestre mostra, infatti, una sostanziale resilienza sul piano della copertura, che si mantiene continua e diffusa, ma risulta bloccata in assetti arbustivi e garigosi. Oltre due terzi dei rilievi condotti hanno evidenziato una copertura arbustiva superiore al 40%, e in una quota significativa di casi questa supera il 60%, confermando un assetto dominato dal piano arbustivo e l'assenza pressoché totale di rinnovazione arborea. I nuclei di lecceta a *Quercus ilex*, pur rappresentando un relitto di altissimo valore conservazionistico, non mostrano segni di espansione, e la mancanza di semenzali indica che i processi successionali sono congelati da decenni. Le analisi da telerilevamento hanno inoltre messo in luce la vulnerabilità delle comunità vegetali agli stress climatici: le annate siccitose del 2003, 2012, 2017 sono state associate a cali significativi di NDVI e altri indici funzionali, con recuperi parziali, a dimostrazione che la resilienza strutturale non coincide sempre con una piena capacità di recupero ecologico.

Riguardo alla biodiversità marina, il monitoraggio con eDNA ha rivelato un patrimonio di straordinaria ricchezza, con 379 taxa identificati e oltre 150 nuove segnalazioni per l'area, incluse alcune prime segnalazioni per l'intero Mediterraneo. Tuttavia, accanto a questo quadro di eccezionale diversità, emergono segnali inequivocabili di trasformazione: la presenza di specie termofile e aliene testimonia i rapidi processi di tropicalizzazione biologica legati al riscaldamento delle acque e alla crescente permeabilità ecologica del bacino. Montecristo si conferma quindi un hotspot di biodiversità marina, ma al tempo stesso un sistema vulnerabile che richiede una sorveglianza continua.

Per quanto riguarda la fauna terrestre, lo studio genomico delle popolazioni di *Discoglossus sardus* a Montecristo e al Giglio ha evidenziato livelli di variabilità genetica significativi ma differenziati. La popolazione di Montecristo presenta eterozigosità più basse e segnali di contrazioni demografiche pregresse, rivelando una condizione di isolamento che potrebbe limitare le possibilità di adattamento futuro. La popolazione dell'Isola del Giglio presenta una maggiore variabilità genetica, suggerendo la possibile persistenza di flussi genici tra le diverse aree dell'Arcipelago Toscano. Tale variabilità, insieme a una presumibilmente maggiore dimensione di popolazione rispetto alla popolazione di Montecristo, indica una potenziale capacità di resilienza più elevata di questa popolazione rispetto agli scenari di cambiamento ambientale.

Nel loro insieme, i risultati delle tre linee di ricerca convergono nel delineare ecosistemi apparentemente stabili, ma in realtà vulnerabili. La stabilità osservata è soprattutto strutturale, mentre sul piano funzionale e

dinamico emergono limiti evidenti: nella vegetazione, un blocco dei processi successionali; negli ecosistemi marini, l'ingresso di nuove componenti biotiche; nella fauna terrestre, una ridotta variabilità genetica. Questi elementi, se considerati congiuntamente, pongono le isole minori del PNAT in una condizione di equilibrio precario, che necessita di una gestione attenta e proattiva per evitare future semplificazioni irreversibili.

4.1 Indicazioni gestionali

Alla luce dei risultati conseguiti, emergono con chiarezza alcune indicazioni di carattere gestionale che il Parco Nazionale Arcipelago Toscano potrà integrare nei propri strumenti di pianificazione e conservazione.

Anzitutto, è fondamentale garantire la continuità del monitoraggio periodico integrato, combinando i dati da telerilevamento, i rilievi in campo e le analisi molecolari (sia eDNA in ambiente marino e sia genomica di popolazione di Discoglosso). Questo approccio consente di cogliere tempestivamente i segnali di cambiamento e di disporre di serie temporali robuste, indispensabili per distinguere variazioni naturali da tendenze di lungo periodo. L'esperienza maturata nel progetto dimostra come la complementarità di queste tecniche permetta di rilevare aspetti altrimenti invisibili con singoli strumenti.

In secondo luogo, occorre affrontare in maniera sistematica la questione delle specie invasive, che rappresentano una minaccia concreta sia negli ecosistemi terrestri sia in quelli marini. L'individuazione di *Ailanthus altissima* su Montecristo, sebbene limitata a pochi nuclei, è un campanello d'allarme da non sottovalutare: il contenimento precoce è molto più efficace e meno oneroso di interventi successivi, quando la specie avesse eventualmente colonizzato porzioni più ampie. Analogamente, in ambiente marino la presenza di taxa alloctoni e termofili richiede piani di sorveglianza specifici, così da attivare rapidamente misure di mitigazione.

Un ulteriore punto critico riguarda la conservazione degli habitat sensibili, che giocano un ruolo chiave nella resilienza complessiva degli ecosistemi. Nelle isole terrestri, impluvi e microhabitat umidi rappresentano aree prioritarie per la rinnovazione vegetale e per la sopravvivenza del Discoglosso sardo. In ambiente marino, i dati di eDNA disponibili a scala di arcipelago indicano alcuni settori particolarmente ricchi di biodiversità e che dovrebbero essere oggetto di tutela mirata, attraverso limitazioni d'uso e misure di protezione attiva.

Infine, si raccomanda di integrare sistematicamente i dati raccolti nei piani di gestione e nei report obbligatori per la Rete Natura 2000. Solo in questo modo le informazioni prodotte dalla ricerca potranno tradursi in strumenti operativi, capaci di orientare decisioni concrete in materia di conservazione.

Parallelamente, sarà importante garantire la continuità delle attività di ricerca e formazione, valorizzando le isole minori del PNAT come veri e propri laboratori naturali per lo studio delle risposte biotiche al cambiamento climatico.

In sintesi, le indicazioni che emergono non sono semplici raccomandazioni, ma costituiscono linee guida per rafforzare la capacità adattativa del Parco. La gestione dovrà basarsi su una visione di lungo termine, che consideri la stabilità attuale come un punto di partenza e non come una condizione garantita, e che sappia riconoscere nei segnali di vulnerabilità emersi delle opportunità per anticipare e prevenire criticità future.

5. Ringraziamenti

Il Dipartimento MESVA esprime la propria gratitudine all'Ente Parco Nazionale Arcipelago Toscano per il sostegno logistico e scientifico al progetto, in particolare alla dott.ssa Francesca Giannini, al Direttore dott. Maurizio Burlando e al Presidente dott. Giampiero Sammuri.

Un sentito ringraziamento va al Raggruppamento Carabinieri Biodiversità, e nello specifico al colonnello dei Carabinieri Forestali Giovanni Quilghini, comandante del Reparto Biodiversità di Follonica per l'assistenza nelle operazioni di campo e il coordinamento delle attività sull'isola di Montecristo.

Si ringraziano inoltre i ricercatori che hanno collaborato nei campionamenti e nelle analisi molecolari e di sequenziamento: Dr. Emanuele Berrilli e Dr. Matteo Garzia (Università dell'Aquila); Prof. Alessandro Chiarucci e Dott. Francesco Santi (Università di Bologna); Dott. Marco Massimi; Prof. Daniele Canestrelli, Dr. Andrea Chiocco, Dr. Paolo Franchini, Dr. Armando Macali, Dr.ssa Martina Mazzetti, Dr.ssa Maria Letizia Palomba, Dr. Claudio Pardo, Dr.ssa Elisa Serafini (Università degli Studi della Tuscia).

Infine, si riconosce il supporto del National Biodiversity Future Center (NBFC) e del programma PNRR – NextGenerationEU, che hanno reso possibile la realizzazione del progetto.

Bibliografia

- Aybar, C., Wu, Q., Bautista, L., Yali, R. & Barja, A., 2020. rgee: An R package for interacting with Google Earth Engine. *Journal of Open Source Software*, 5(51), 2272.
<https://doi.org/10.21105/joss.02272>
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Bartolucci, F., Peruzzi, L., Galasso, G., Albano, A., Alessandrini, A., Ardenghi, N.M.G., ... Conti, F., 2018. An updated checklist of the vascular flora native to Italy. *Plant Biosystems*, 152(2), 179–303. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1419996>
- Bartolucci, F., Domina, G., Adorni, M., Angiolini, C., Bacchetta, G., Bolpagni, R., ... Peruzzi, L., 2024. Checklist of the native vascular flora of Italy—Version 3.0. *Italian Botanist*, 17, 65–128.
<https://doi.org/10.3897/italianbotanist.17.119514>
- Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., ... Caporaso, J.G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Methods*, 16, 852–858. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0502-2>
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P. & Coissac, E. (2016). obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 176–182.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12428>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. & Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. & Madden, T.L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A. & Cresko, W.A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 3124–3140.
<https://doi.org/10.1111/mec.12354>
- Ceccato, P., Gobron, N., Flasse, S., Pinty, B. & Tarantola, S., 2002. Designing a spectral index to estimate vegetation water content from remote sensing data: Part 1—Theoretical approach. *Remote Sensing of Environment*, 82(2–3), 188–197. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00037-8)
- Filipello, S. & Sartori, F., 1981. *La vegetazione dell'Isola di Montecristo*. Roma: Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste (relazione tecnica).
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C.A., Banks, E., DePristo, M.A., ... 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>

- Gao, B.-C., 1996. NDWI—A normalized difference water index for remote sensing of vegetation liquid water from space. *Remote Sensing of Environment*, 58(3), 257–266.
[https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(96\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(96)00067-3)
- Galasso, G., Conti, F., Peruzzi, L., Ardenghi, N.M.G., Banfi, E., Celesti-Grapow, L., ... Stinca, A., 2018. An updated checklist of the alien flora of Italy. *Plant Biosystems*, 152(3), 556–592.
<https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1441197>
- Galasso, G., Domina, G., Adorni, M., Angiolini, C., Banfi, E., Bolpagni, R., ... Stinca, A., 2024. Checklist of the alien vascular flora of Italy—Version 3.0. *Italian Botanist*, 17, 129–184.
<https://doi.org/10.3897/italianbotanist.17.120016>
- Gorelick, N., Hancher, M., Dixon, M., Ilyushchenko, S., Thau, D. & Moore, R., 2017. Google Earth Engine: Planetary-scale geospatial analysis for everyone. *Remote Sensing of Environment*, 202, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2017.06.031>
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (anno corr.). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>
- Hijmans, R.J., 2023. terra: Spatial Data Analysis. R package version 1.7–55. <https://CRAN.R-project.org/package=terra>
- Hill, M.O. & Gauch, H.G., 1980. Detrended correspondence analysis: An improved ordination technique. *Vegetatio*, 42, 47–58. <https://doi.org/10.1007/BF00048870>
- Horton, T. et al. (2025). World Register of Marine Species (WoRMS). Available from: <https://www.marinespecies.org>
- Huete, A.R., 1988. A soil-adjusted vegetation index (SAVI). *Remote Sensing of Environment*, 25(3), 295–309. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(88\)90106-X](https://doi.org/10.1016/0034-4257(88)90106-X)
- Huete, A., Didan, K., Miura, T., Rodriguez, E.P., Gao, X. & Ferreira, L.G., 2002. Overview of the radiometric and biophysical performance of the MODIS vegetation indices. *Remote Sensing of Environment*, 83(1–2), 195–213. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00096-2](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00096-2)
- Kent, M., 2012. *Vegetation Description and Data Analysis: A Practical Approach*. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Korneliussen, T.S., Albrechtsen, A. & Nielsen, R. (2014). ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data. *BMC Bioinformatics*, 15, 356. <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0356-4>
- Landi, M., Zoccola, A., Crudele, G. & Del Prete, C., 2007. Monitoraggio e studio della vegetazione e della flora dell'Isola di Montecristo. Relazione tecnica per il Parco Nazionale Arcipelago Toscano (PNAT).
- Legendre, P. & Legendre, L., 2012. *Numerical Ecology*. 3rd English ed. Amsterdam: Elsevier.
- Liu, X. & Fu, Y.-X. (2015). Exploring population size changes using SNP frequency spectra. *Genetics*, 201(3), 927–938. (metodo Stairway Plot; citazione standard per inferenza demografica SFS)

- Machida, R.J., Leray, M., Ho, S.-L. & Knowlton, N. (2017). Metazoan mitochondrial gene sequence reference datasets for taxonomic assignment of environmental samples. *Scientific Data*, 4, 170027. (MIDORI2)
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M. & Hornik, K. (2022). cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., ... Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes. *Scientific Reports*, 5, 8650. <https://doi.org/10.1038/srep08800>
- Oksanen, J., Simpson, G.L., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., ... Wagner, H., 2022. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6–4. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- QGIS Development Team, 2023. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation. <http://qgis.org>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- R Core Team, 2023. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rock, B.N., Williams, D.L. & Vogelmann, J.E., 1986. Field and airborne spectral detection of vegetation water stress. *Remote Sensing of Environment*, 19(3), 221–237. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(86\)90044-3](https://doi.org/10.1016/0034-4257(86)90044-3)
- Tucker, C.J., 1979. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sensing of Environment*, 8(2), 127–150. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(79\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(79)90013-0)
- Wickham, H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer. <https://ggplot2.tidyverse.org/>
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T. & Stamatakis, A. (2014). PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>