

Indagini tassonomiche sul pino nero, *Pinus nigra* Arn. (*Pinaceae*), della Majella

P. BRUSCHI, D. DI SANTO, P. GROSSONI e C. TANI

ABSTRACT - *Taxonomic analysis of Pinus nigra Arn. (Pinaceae) from Majella* - The aim of this paper was to understand the taxonomic status of *Pinus nigra* from Majella (Italy, Central Apennines). Morpho-anatomical and molecular data show that the individuals sampled are referable to var. *italica* (*P. n. ssp. nigra* var. *italica* Hochst).

Key words: microsattellites, morpho-anatomical characters, *Pinus nigra*

Ricevuto il 14 Febbraio 2005
Accettato il 16 Novembre 2005

INTRODUZIONE

Fara S. Martino è un piccolo centro della fascia orientale del Parco Nazionale della Majella, in provincia di Chieti. Nel 1973 ANGERILLI, ALLAVENA diedero risalto alla presenza di due nuclei spontanei di pino nero (*Pinus nigra* Arn.) lungo i versanti N-NW di due valloni: il Vallone di Santo Spirito e il Vallone del Fossato-Val Serviera, tra 900 e 1400 m circa di quota.

Pinus nigra Arn. è specie critica molto complessa la cui ripartizione infraspecifica e le denominazioni dei ranghi subordinati sono state oggetto di numerose ricerche e relative discussioni (SCHWARZ, 1936; VIDAKOVIC, 1957; FUKAREK, 1958; GAUSSEN *et al.*, 1993). Per l'Europa, "MED-CHECKLIST" (GREUTER *et al.*, 1984) e GAUSSEN *et al.* (1993) hanno suddiviso il taxon in cinque sottospecie di cui due presenti anche nella flora italiana: *Pinus nigra* ssp. *nigra* e *P. n. ssp. laricio* (Poir.) Maire. In particolare, in Italia la sottospecie *nigra* è presente sulle «Alpi Venete, dal confine orientale al Bellunese; in Abruzzo a Villetta Barrea e in Campania al Cervialto» (PIGNATTI, 1982) mentre l'altra sottospecie è comune sui «Monti della Calabria e Etna» (PIGNATTI, 1982; è necessario precisare che questo autore considera le due sottospecie come specie separate all'interno di un gruppo). Venendo alla sottospecie *nigra*, le popolazioni alpine sono da riferirsi alla var. *austriaca* Loud. mentre quelle abruzzesi, endemiche, costituiscono la varietà *italica* Hochst. Negli anni '70 sul Monte Cervialto (Valle della Caccia, Salerno) è stata segnalata una

popolazione autoctona, morfologicamente riferibile alla var. *italica* (LA VALVA *et al.*, 1978).

Negli aghi dei pini abruzzesi, oggetto anche di questa indagine, Romano Gellini (1968) aveva messo in evidenza che il numero degli strati cellulari dell'ipoderma meccanico rappresenta un parametro anatomico-morfologico molto utile per la diagnosi tassonomica. In pini di Villetta Barrea spontanei il valore medio degli strati di ipoderma è risultato essere 2,55; particolarmente interessanti sono i risultati del confronto fra esemplari aventi diversa posizione sistematica ma cresciuti nello stesso ambiente (ovviamente *ex situ*): il numero medio di strati di ipoderma in aghi di pino di Villetta Barrea era, mediamente, di 2,38, valore intermedio fra quello della ssp. *laricio* (1,86) e quello della var. *austriaca* (3,20) (GELLINI, 1968). Questi dati, corrispondenti con quelli riportati da LONGO (1904) e da VIDAKOVICH (1957) e con quelli di successivi lavori (LA VALVA *et al.*, 1978; GELLINI *et al.*, 1983), evidenziano un cline geografico nella specie e permettono di separare la var. *italica* anche da altre sottospecie i cui aghi hanno dimensioni ed aspetto molto simili a quelli della var. *italica* (per esempio, la ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco). L'impiego del parametro "numero di strati di ipoderma meccanico" è importante non soltanto per una corretta attribuzione sistematica, ma anche per fini applicati. E' questo un aspetto rilevante dal momento che i vari pini neri (*laricio*, *austriaco*, etc.) hanno esigenze ecologiche ben diversificate e quindi diversi

ambienti di utilizzo.

Scopo di questo lavoro è stato quello di meglio comprendere la posizione sistematica della popolazione di pino nero di Fara San Martino. Almeno dalla metà del XIX secolo era nota la presenza di pini neri sulla Majella: PARLATORE (1848-72) segnala *Pinus laricio* Poir. (sin. *P. magellensis*) «... negli Abruzzi nel Monte Majella nella Valle Orienta (Ten! Guss!)»; SCHWARZ (1936), nel suo lavoro sulla sistematica e sulla nomenclatura in *Pinus nigra*, ha utilizzato anche un campione custodito in FI raccolto da Giovanni Gussone il 2. 3. 1858 sulla Majella, nella valle dell'Orfento. Questo per quanto riguarda il versante occidentale del massiccio; sul versante orientale, dove si trova Fara San Martino, dopo la segnalazione di ALLAVENA, ANGERILLI del 1973, solo TAMMARO, FERRI (1982) li citano, attribuendoli però, molto rapidamente, alla sottospecie *laricio*. Questa segnalazione è stata ripresa da CONTI (1998) nella sua check-list sulla flora d'Abruzzo pur proponendone l'attribuzione alla sottospecie *nigra*.

I due valloni che formano la stazione esaminata sono caratterizzati da pareti calcaree strapiombanti anche per qualche centinaio di metri dove il pino ha potuto sopravvivere grazie alle sue caratteristiche di pionierismo che lo hanno svincolato dalla concorrenza con il faggio (Fig. 1).

MATERIALI E METODI

Da 30 piante che crescono lungo Cima della Stretta presso Fara S. Martino (FARA) a una quota di 1400 m s.l.m. (Parco Nazionale della Majella) e da altrettante campionate nella zona della Camosciara, nel comune di Civitella Alfedena (CAMO), ad una quota di 1300 m s.l.m. (Parco Nazionale d'Abruzzo), alla fine del maggio 2003 sono stati prelevati rami di oltre 3 anni da cui sono state staccate 15 coppie di aghi completamente sviluppati (aghi di due o tre anni) per ciascuna pianta. Gli aghi utilizzati per la misura della lunghezza (10 coppie di aghi/pianta) sono stati conservati a -20°C ; le altre cinque coppie sono state fissate in formalina di Policard per le successive analisi anatomiche. Per ogni fascetto è stato sempre prelevato un solo ago.

1) Analisi morfoanatomiche

Mediante un calibro è stata misurata la lunghezza effettiva degli aghi (10 aghi/pianta). Dalla zona mediana degli aghi fissati in formalina di Policard (BECCARI, MAZZI, 1966) sono state ricavate sezioni trasversali di 40 μm di spessore. Le colorazioni impiegate sono state: (a) bleu di toluidina, (b) fluo-roglicinolo (sol. satura in HCl 20%), (c) miscela di Sudan 3 e Sudan 4 (sciolti in etanolo 70%) e (d) Sudan Black (etanolo 70%) per valutare eventuali differenze soprattutto a carico delle cellule epidermiche e ipodermiche. Le sezioni così colorate sono state osservate mediante microscopio ottico Nikon Eclipse E-400 provvisto di apparecchio fotografico Nikon Digital Net Camera, mentre i parametri dimensionali sono stati misurati tramite un microscopio ottico



Fig. 1

Pini neri adulti (frecce) nel Vallone del Fossato.
Old pines (arrows) in Vallone del Fossato.

Zeiss Axioplan provvisto di oculare micrometrico. I parametri dimensionali presi in esame sono stati:

- lunghezza totale dell'ago, in mm;
- spessore (altezza) della sezione dell'ago, in μm ;
- larghezza della sezione dell'ago, in μm ;
- altezza del cilindro centrale, in μm ;
- larghezza del cilindro centrale, in μm ;
- spessore dell'epidermide superiore (faccia convessa dell'ago), in μm ;
- spessore della cuticola dell'epidermide superiore, in μm ;
- spessore dell'ipoderma superiore, in μm ;
- numero di strati dell'ipoderma superiore;
- spessore dell'ipoderma angolare, in μm ;
- numero di strati dell'ipoderma angolare;
- spessore del mesofillo, in μm ;
- spessore dell'ipoderma inferiore (faccia piana dell'ago), in μm ;
- numero di strati dell'ipoderma inferiore;
- spessore dell'epidermide inferiore, in μm ;
- numero e posizione dei canali resiniferi.

I dati numerici sono stati organizzati su matrici Excel che sono state successivamente convertite in matrici "Statistica per Windows" e sottoposte ad elaborazio-

ne. Dapprima è stata effettuata un'analisi statistica descrittiva al fine di valutare la distribuzione dei dati e di determinare, in via preliminare, le differenze esistenti tra i valori medi delle due stazioni. Successivamente, i dati medi per pianta sono stati sottoposti ad analisi delle componenti principali (PCA). Le variabili ridondanti sono state compattate in 3 altre variabili (Fattori) che concentrano le informazioni sulla variabilità presente nel modello. I fattori così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA ad una sola via), con il fattore "popolazione" (due livelli) mantenuto come fattore fisso, allo scopo di individuare per ciascun fattore estratto eventuali differenze statisticamente significative tra le due popolazioni (FARA vs. CAMO).

2) Analisi del DNA plastidiale

Da ciascun individuo, tra quelli campionati per le analisi morfologiche, sono stati prelevati aghi di 1 anno. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il *Dneasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Chatsworth,

California, USA) seguendo il protocollo di estrazione fornito dalla ditta. L'analisi della diversità aploipica nelle due popolazioni di *Pinus nigra* è stata eseguita mediante l'utilizzo di 4 marcatori microsatelliti plastidiali (Pt1569, Pt63719, Pt71936, Pt87268) secondo il protocollo riportato in VENDRAMIN *et al.* (1996). Il genoma plastidiale, essendo nelle conifere ad ereditarietà paterna, non è soggetto a fenomeni di ricombinazione, per cui gli aplotipi molecolari rilevati a livello dei plastidi non vengono modificati e possono quindi essere utilizzati per definirne le relazioni in termini di divergenza genetica.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le analisi istochimiche non hanno messo in evidenza nessuna differenza significativa fra gli aghi di FARA e quelli di CAMO (Fig. 2). Solo lo spessore della cuticola dell'epidermide superiore di FARA è risultato, anche visivamente, maggiore di quello di CAMO. D'altra parte questo dato è stato meglio quantificato tramite le misurazioni eseguite.

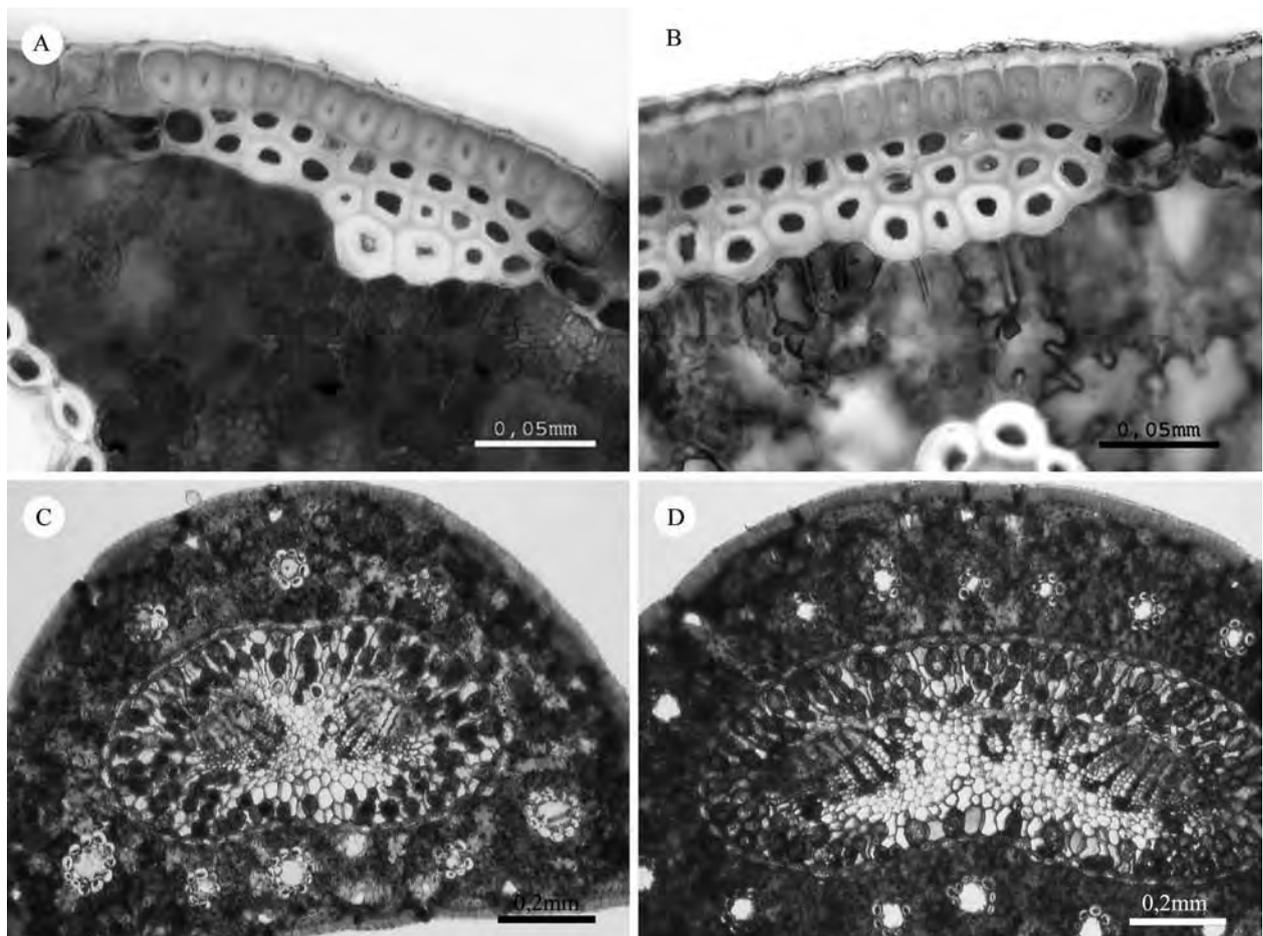


Fig. 2

Sezioni trasversali di aghi di due anni. A: ipoderma meccanico nella provenienza CAMO (bleu di toluidina); B: ipoderma meccanico nella provenienza FARA (bleu di toluidina); C: ago della provenienza CAMO; D: ago della provenienza FARA.

Transverse sections of 2 years needles. A: hypoderm in CAMO (toluidin blue); B: hypoderm in FARA (toluidin blue); C: needle of CAMO pine; D: needle of FARA pine.

1) Analisi morfoanatomiche

Confrontando i dati elaborati per le due popolazioni prese in esame (Tab. 1) è evidente che, per FARA, quasi tutte le variabili considerate mostrano coefficienti di variazione (CV%) più elevati. Fra FARA e CAMO, il parametro che mostra la differenza più accentuata fra i valori di CV% è *spessore dell'epidermide inferiore* (FARA 11,83%; CAMO 6,15), ma anche la media fra tutti i coefficienti di variazione di una stessa popolazione rimane maggiore in FARA (17,46% mentre CAMO è pari a 15,39%). Ciò significa che i valori misurati nei campioni di FARA, spaziando all'interno di intervalli numerici più ampi, mettono in risalto un grado di variabilità intrapopolazione maggiore.

Il coefficiente relativo al parametro *numero dei canali resiniferi* è quello che, in assoluto, in entrambe le popolazioni è risultato il più elevato sottolineando così ancora una volta la non affidabilità diagnostica di questo carattere (cfr. GELLINI, 1968 e LA VALVA *et al.*, 1978).

Per quanto riguarda l'analisi statistica delle componenti principali, dall'insieme delle variabili sono stati estratti tre fattori nei quali è concentrata la maggior parte delle informazioni. A carico del primo fattore agiscono cinque variabili (2, 3, 4, 5 e 12) mentre a carico del secondo agiscono sei variabili (8, 9, 10, 11, 13 e 14). Questi due fattori sono responsabili del 60% della varianza totale e non separano in maniera

netta le due popolazioni. Il terzo fattore (che raggruppa le altre variabili: 1, 6, 7, 15 e 16) rappresenta circa il 12% della varianza totale ed è in grado di separare in maniera maggiormente efficace le due popolazioni (Fig. 3). I primi due fattori non sono significativi all'analisi della varianza ($P > 0,05$) mentre il terzo mette in evidenza una differenziazione significativa fra le due popolazioni ($P > 0,001$).

I parametri che maggiormente pesano nel terzo fattore sono *lunghezza degli aghi* e *numero dei canali resiniferi*. Come già anticipato, si tratta di due parametri che "risentono" notevolmente delle condizioni stazionali e quindi non sono particolarmente affidabili. La minor lunghezza degli aghi e il maggior spessore della cuticola sono indici di adattamento a condizioni di forte aridità e, a questo proposito, si sottolinea il fatto che i pini campionati su Cima della Stretta vegetano in condizioni stazionali particolarmente difficili: TAMMARO, FERRI (1982) descrivono la stazione con le seguenti parole «*Si tratta di pareti inaccessibili e a strapiombo su forre, alte anche 400 m, alle quali si accede solo con scalata o calandosi dall'alto con funi.*». Invece, la stazione della Camosciara, dove si trova l'altra provenienza utilizzata, pur essendo un ambiente decisamente rupestre presenta una pendenza minore e, spesso, una certa quantità di suolo.

2) Analisi del DNA plastidiale

Nessun polimorfismo è stato rilevato attraverso l'a-

TABELLA 1

Medie e coefficiente di variazione (CV%) dei caratteri morfoanatomici analizzati per le due popolazioni campionate. Means and CV% of morphoanatomical characters analysed in the two sampled populations.

VARIABILE	FARA S. MARTINO (Cima della Stretta)		VILLETTA BARREA (Camosciara)	
	MEDIA	CV%	MEDIA	CV%
LUNGHEZZA AGO (mm)	72.54	13.39	92.12	11.97
SPESORE AGO (μm)	968.25	10.87	990.25	7.22
LARGHEZZA AGO (μm)	1563.25	11.14	1533.00	7.61
SPESORE CILINDRO CENTRALE (μm)	447.70	11.62	471.86	9.02
LARGHEZZA CILINDRO CENTRALE (μm)	838.46	15.23	857.20	11.47
SPESORE EPIDERMIDE SUPERIORE (μm)	42.05	11.26	22.40	11.38
SPESORE IPODERMA SUPERIORE (μm)	22.20	26.51	43.60	24.54
N° STRATI IPODERMA SUPERIORE	2.60	23.07	2.71	21.77
SPESORE MESOFILLO (μm)	390.36	12.41	400.5	8.97
SPESORE IPODERMA INFERIORE (μm)	33.20	24.24	30.73	24.91
N° STRATI IPODERMA INFERIORE	2.16	18.51	2.04	17.64
SPESORE EPIDERMIDE INFERIORE (μm)	20.70	11.83	20.30	6.15
SPESORE IPODERMA ANGOLARE (μm)	62.93	17.88	64.43	16.30
N° STRATI IPODERMA ANGOLARE	3.51	19.37	3.50	17.14
STRATI IPODERMA	2.76	15.21	2.75	14.54
SPESORE CUTICOLA SUPERIORE (μm)	5.96	20.58	5.35	17.28
N° CANALI RESINIFERI	8.31	33.81	5.91	33.84
Totale		17.46		15.39

nalisi delle regioni microsatellite plastidiali in ambedue le popolazioni analizzate nell'ambito del presente lavoro. Si è evidenziato, infatti, in entrambe le popolazioni un medesimo aplotipo.

CONCLUSIONI

I risultati delle analisi svolte hanno evidenziato che non solo i pini della popolazione di Fara S. Martino sono riferibili alla var. *italica* (*P. n. ssp. nigra* var. *italica* Hochst.) ma che, non essendo risultate significative le differenze nei parametri morfoanatomici e molecolari studiati, vi è una buona omogeneità fra i pini di questa stazione e quelli di Villetta Barrea.

Nell'analisi delle componenti principali (PCA), il fattore II, su cui agiscono proprio le variabili relative all'ipoderma meccanico (spessore e numero di strati), non separa nettamente le due popolazioni (Fig. 3). Anche la semplice media aritmetica delle misurazioni degli strati di ipoderma evidenzia una notevole identità: la media degli strati della faccia piana (ipoderma inferiore) negli aghi FARA è 2,16 mentre quella degli aghi CAMO è 2,04; per l'ipoderma superiore i valori sono, rispettivamente, 2,60 contro 2,71 e ancor meno differenziati sono i risultati delle misure effettuate sull'ipoderma angolare (3,51 contro 3,50). Nei pini di Villetta Barrea GELLINI (1968) aveva registrato un valore medio di 2,38 (*ex situ*) e 2,55 (*in situ*) mentre LA VALVA *et al.* (1978) riportavano un valore di 2,14 per i pini del Cervialto. Resta, semmai, interessante sottolineare come anche questa ricerca abbia ancora una volta evidenziato per questo parametro un comportamento della var. *italica* intermedio fra la ssp. *laricio* e la var. *austriaca*.

L'analisi del polimorfismo di regioni microsatellite per fini sistematici è materia di ampio dibattito. È stato riportato che il polimorfismo varia fortemente nelle specie ed una inattesa bassa differenza nelle dimensioni alleliche medie fra specie strettamente correlate è stata osservata per i loci microsatellite. Tuttavia, BUCCI *et al.* (1998) hanno dimostrato l'utilità di questi stessi marcatori per la discriminazione di entità di rango sottospecifico strettamente correlate nell'ambito del complesso *Pinus halepensis*. L'analisi molecolare, condotta a livello di regioni microsatellite plastidiali, non ha evidenziato alcuna diversità aplotipica, in nessuna delle due popolazioni analizzate in questa ricerca. Pur ritenendo il dato preliminare e da integrare con ulteriori analisi che prendano in considerazione altri loci e, soprattutto, altre popolazioni, questi risultati sembrano confermare una origine comune dei pini di Fara San Martino e di Villetta Barrea. A prima vista si potrebbe sostenere l'ipotesi che una delle due popolazioni potrebbe essere derivata per azione antropica dall'altra. Nel caso dei pini di Fara San Martino, la semplice considerazione sia delle difficoltà stazionali (TAMMARO, 1998) sia della loro maggiore variabilità intrapopolazionale (evidenziata da un CV% più elevato) rende poco giustificabile un'origine antropogenica e sottolinea ancora una volta il valore biogeografico di questa entità, da ritenere un'espressione relitta di un

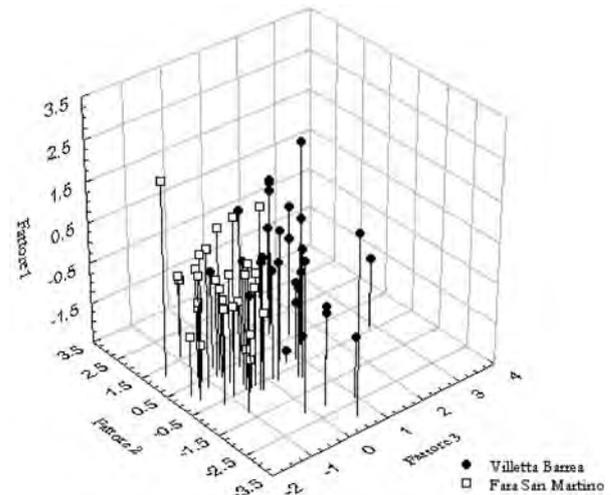


Fig. 3

Analisi delle componenti principali (PCA) per i primi tre fattori estratti.

Scatterplot of the first three factor loadings (PCA).

antico areale ben più vasto che doveva interessare tutto l'Appennino centrale.

LETTERATURA CITATA

- ANGERILLI A., ALLAVENA S., 1973 – *La Majella: una montagna da salvare*. Atti III Simp. Naz. Conservazione della Natura. Bari. II: 81-97.
- BECCARI N., MAZZI V., 1966 – *Manuale di tecnica microscopica. Guida pratica alla ricerca istologica e istochimica*. SEI. Torino.
- BUCCI M., ANZIDEI M., MADAGHIELE A., VENDRAMIN G.G., 1998 – *Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers*. Mol. Ecol., 7: 1633-1641.
- CONTI F., 1988 – *Flora d'Abruzzo*. Bocconea, 10: 1-273.
- FUKAREK P., 1957 – *Prilog poznavanju crnog bora (Pinus nigra Arn. s l.)*. Rad. Polj. ?um. Fakult., III, 3, B. Sumarstavo. Sarajevu: 3-92.
- GAUSSEN H., HEYWOOD V.H., CHATER A.O., 1993 – *Pinus*. In: TUTIN T.G., BURGESS N.A., CHATER A.O., EDMONDSON J.R., HEYWOOD V.H., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., S.M. WEBB S.M. (eds.), *Flora Europaea*, 1: 40-44. Cambridge University Press. Cambridge.
- GELLINI R., 1968 – *Posizione sistematica del pino nero di Villetta Barrea in base ai caratteri anatomici degli aghi*. Ann. Accad. Ital. Sci. Forest., 17: 101-122.
- GELLINI R., GROSSONI P., FINESCHI S., 1983 – *Researches on some Pinus laricio Poir. provenances*. Zbornik Radova povodom jubileja Akademika Pavla Fukareka. Rad. Knjiga LXXII: 137-148.
- GREUTER W., BURDET H.M., LONG G. (EDS.), 1984 – *MED-CHECKLIST. I. Pteridophyta. Gymnospermae. Dicotyledones (Acanthaceae-Cneoraceae)*. Editions des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. Genève.
- LA VALVA V., MORALDO B., CAPUTO G., 1978 – *Pinus nigra Arn. nel gruppo del Cervialto (Monti Picentini, Appennino campano)*. Delpinoa, 18: 3-15.
- LONGO B., 1904 – *Sul Pinus nigricans Host*. Ann. Bot., 1:

65-70.

PIGNATTI S., 1982 – *Flora d'Italia*. Vol. 1. Edagricole, Bologna.

SCHWARZ O., 1938 – *Über die Systematik und Nomenklatur der europäischen Schwarzkiefern*. Notiz. Bot. Gart. Museum Berlin-Dahlem, XIII, 117: 226-243.

TAMMARO F., 1998 – *Il paesaggio vegetale dell'Abruzzo*. Colecstre Edizioni, Penne (Pescara).

TAMMARO F., FERRI C., 1982 – *Il pino laricio*, *Pinus nigra* subsp. *laricio* (Poiret) Maire, di Fara S. Martino (Chieti). *Natura*, 73 (1-2): 38-43.

VENDRAMIN G.G., LELLI L., ROSSI P., MORGANTE M., 1996 – *A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae*. *Mol. Ecol.*, 5: 595-598.

VIDAKOVICH M., 1957 – *Oblici ornog bora u Jugoslaviji anatomijie iglica*. *Glasn. Sumske Pokuse Zagreb.*, 13:

111-248.

RIASSUNTO – Scopo della presente ricerca è stato quello di comprendere la posizione tassonomica della popolazione di pino nero di Fara San Martino (Chieti) mediante un approccio di tipo biosistemico. 30 piante di Fara San Martino e 30 campionate nella popolazione della Camosciara (Villetta Barrea, L'Aquila) sono state confrontate mediante l'utilizzazione di caratteri morfoanatomici e molecolari. I risultati delle analisi svolte hanno evidenziato che non solo i pini della popolazione di Fara San Martino sono riferibili alla var. *italica* (*P. n. ssp. nigra* var. *italica* Hochst.) ma che, non essendo risultate significative le differenze nei parametri morfoanatomici e molecolari studiati, vi è una buona omogeneità fra i pini di questa stazione e quelli di Villetta Barrea, anch'essi riferiti alla medesima var. *italica*.

AUTORI

Piero Bruschi*, Daniele Di Santo, Paolo Grossoni, Corrado Tani, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Firenze, Piazzale delle Cascine 28, I-50144 Firenze

*Autore di riferimento per la corrispondenza (piero.bruschi@unifi.it)