

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA

GRUPPO PER LA BIOSISTEMATICA VEGETALE

RIUNIONE SCIENTIFICA

FLORA ITALIANA:

IL CONTRIBUTO DELLA BIOSISTEMATICA

Catania  
31 maggio 2007



## PREMESSA

In questo Supplemento dell'Informatore Botanico Italiano vengono pubblicati, come lavori *in extenso*, gran parte dei contributi che sono stati oggetto di discussione nel corso della riunione scientifica del Gruppo per la Biosistemica Vegetale dell'anno 2007.

La riunione è stata articolata in due giornate distinte e presso due sedi diverse. La prima seduta, dedicata al tema "Flora italiana: il contributo della Biosistemica", si è svolta il giorno 31 maggio nei locali del Dipartimento di Botanica dell'Università di Catania, dove sono state presentate nove comunicazioni su varie tematiche di ricerca nel campo della Biosistemica Vegetale, dalla tassonomia alla citogenetica, fino alla filogenesi molecolare.

Il giorno 1 giugno, il Gruppo si è trasferito a Caltagirone, in provincia di Catania, ospitato dalla Stazione Sperimentale di Granicoltura della Sicilia in occasione dell'inaugurazione dei nuovi locali e laboratori. In presenza dei rappresentanti delle amministrazioni locali e regionali e dei ricercatori del Gruppo per la Biosistemica Vegetale, è stato affrontato il tema "Biodiversità: conoscerla per preservarla", con interventi a carattere scientifico ma anche politico-gestionale sul patrimonio vegetale siciliano, sia spontaneo che agronomico, nonché sul ruolo dei centri di ricerca nelle azioni di valorizzazione e tutela delle risorse fitogenetiche. Il personale della Stazione Sperimentale di Granicoltura, in particolare, ha illustrato le attività di lavoro e di ricerca svolte nel campo della cerealicoltura, del miglioramento genetico di cultivar e varietà locali e della conservazione del germoplasma, le quali vedono l'applicazione di metodi di indagine che ben si coniugano con la ricerca in ambito biosistemico. Lo scopo di questa giornata è stato quello di entrare in contatto e confrontarsi con realtà culturali diverse da quelle strettamente accademiche, comunque attivamente inserite nel mondo della ricerca scientifica a livello nazionale e internazionale.

La riunione scientifica del 2007 è stata anche l'occasione più opportuna per l'assegnazione di quattro premi destinati a giovani ricercatori non strutturati attivi nel campo della Biosistemica Vegetale. I premi sono stati messi a disposizione da ditte sponsorizzatrici con l'interessamento

della Stazione Sperimentale di Granicoltura. Lo scopo dell'iniziativa è stato quello di incoraggiare i giovani a perseverare nella ricerca scientifica e nella partecipazione costante alle attività del Gruppo di Lavoro. Dopo l'approfondita valutazione dei contributi pervenuti alla segreteria del Gruppo, sono stati selezionati ed assegnati: un premio per la migliore pubblicazione scientifica al dott. Fabrizio Grassi; un premio per la migliore tesi di dottorato al dott. Mario Avino; due premi per la migliore tesi di laurea al dott. Mirko Boracchia e al dott. Lorenzo Cecchi; un premio per lo sviluppo di metodologie innovative nel campo della ricerca al dott. Efsio Mattana. I giovani ricercatori hanno illustrato i risultati dei propri lavori nel corso della seconda giornata di riunione, a Caltagirone, in occasione delle quale sono stati ufficialmente premiati. Tali contributi sono presentati in questo Supplemento come lavoro *in extenso* o in forma di riassunto a discrezione dell'autore.

La riunione scientifica annuale si è conclusa con la visita ai campi sperimentali nei pressi di Caltagirone, destinati al mantenimento di collezioni di frumento autoctono per lo studio e la produzione.

Nel complesso, le comunicazioni presentate nel corso delle due giornate della riunione scientifica del Gruppo hanno evidenziato la costante attività e la qualità della ricerca biosistemica in seno alla Società Botanica Italiana, mostrando una tendenza sempre più diffusa all'approccio multidisciplinare attraverso l'applicazione di vari metodi di indagine nello studio dei gruppi tassonomici, dall'esame più tradizionale dei caratteri morfologici e anatomici, alle indagini citologiche e biometriche unitamente ai più moderni sistemi d'analisi genetica.

Va ricordato che la pubblicazione di questi Atti in un Supplemento dell'Informatore Botanico Italiano è stata possibile grazie al contributo finanziario del Dipartimento di Botanica dell'Università di Catania che ha ospitato e organizzato parte della riunione.

Infine, a tutti i partecipanti si deve un sincero ringraziamento per l'impegno e il costante interesse dedicato alle attività del Gruppo.

[a cura di A. MUSACCHIO]



## Geni espressi negli sporofilli fiorali per lo studio della domesticazione di *Vitis vinifera* L.

F. DE MATTIA, I. BRUNI, S. IMAZIO, F. GRASSI e M. LABRA

**ABSTRACT** - *Expressed genes in the floral sporophylls to study Vitis vinifera L. domestication* - Archaeobotanical-archaeological, cultural and historical data indicate that grapevine domestication can be dated back from 6000 to 7000 years ago and that it has taken place in the Caucasian and Middle East Regions. However, events leading to the domestication of this crop species are still an open issue. In this paper, 6 chloroplast microsatellites have been used to assess genetic similarities among, and within, domesticated and wild grapevine accessions representatives of 7 distinct geographical regions from the Middle-East to Western Europe. Results show that 2 out of the 6 analysed chloroplast loci are polymorphic within the 193 domesticated individuals and the 387 samples of the 69 wild populations. Allele variants of the cpSSR loci combine in a total of 6 different haplotypes. The data show that the haplotype distribution is not homogeneous: the 6 haplotypes are present in the domesticated varieties, but only 5 (haplotype VI is absent) are observed in the wild populations. The analysis of haplotype distribution allows to discuss the relationships between the two grape subspecies. The contribution of the wild grape germplasm to the domesticated gene pool still growing in different geographical regions can be, in cases, made evident, suggesting that beside domestication also gene introgression has played a role in shaping the current varietal landscape of the European viticulture.

*Key words:* chloroplast microsatellite, crop domestication, grapevine, *Vitis vinifera* L.

### INTRODUZIONE

La vite (*Vitis vinifera* L.) è una specie di notevole importanza agronomica, largamente diffusa nel mondo sia per la produzione di uva da tavola che per quella di vino (VIVIER, PRETORIUS, 2002). È rappresentata da due differenti sottospecie: *V. vinifera* subsp. *silvestris* ovvero la vite selvatica con un ampio areale di distribuzione che va dall'Asia sino al bacino del Mediterraneo ed include il centro e sud Europa (HEGI, 1925), e *V. vinifera* subsp. *vinifera* (vite coltivata), che deriva da un processo di domesticazione antropica a partire dalle popolazioni selvatiche (LEVADOUX, 1956). Le due sottospecie presentano caratteristiche distintive (GRASSI *et al.*, 2006) sia di natura morfologica, sia ecologica. La vite selvatica è una specie idrofila, cresce in zone umide e ripariali ed è capace di arrampicarsi e raggiungere rapidamente la vetta degli alberi. La vite coltivata, al contrario, è aridofila e viene coltivata in terreni con buona capacità drenante. La differenza più evidente tra le due sottospecie riguarda il sistema riproduttivo: la vite selvatica è una sottospecie dioica mentre quella coltivata è ermafrodita ed autogama. Numerosi studi sono stati condotti in merito alle relazioni tra le due sottospecie al fine di chiarire i fenomeni alla base del processo di domesticazione. MCGOVERN (2003), attraverso

studi archeobotanici, ha evidenziato come l'uomo conoscesse e consumasse uva già durante il paleolitico; sono stati infatti rinvenuti resti di vite selvatica in Turchia, Siria e Iran appartenenti a questo periodo storico. Le prime evidenze di domesticazione risalgono tuttavia al VI millennio a.C. nella Circum-Mesopotamia settentrionale (ZOHARY, SPIEGEL-ROY, 1975; OLMO, 1976; ZOHARY, HOPE, 2000). A partire da questo centro di domesticazione primaria la vite si sarebbe diffusa prima nelle aree del sud-est del Mediterraneo (Palestina, Libano, Giordania) (ZOHARY, SPIEGEL-ROY, 1975) e successivamente, durante il III millennio a. C., sarebbe giunta in Asia minore, Grecia, ed in tutta l'Europa orientale. Agli inizi del II millennio a. C., grazie agli intensi trasporti tra la Grecia e la Sicilia, la vite giunse nel sud Italia e da qui si diffuse verso il centro Europa (LOGOTHETIS 1970; KROLL 1991). Il nord Italia, la Francia e la Spagna presentano condizioni pedoclimatiche idonee alla coltivazione della vite, di conseguenza la vite coltivata in queste aree si diffuse molto rapidamente (LEVADOUX, 1956; FORNI, 1990; HOPF *et al.*, 1991).

OLMO (1976) e MCGOVERN (2003) supportano l'esistenza di un unico centro di domesticazione da cui

si sarebbero originate tutte le cultivar a partire da un pool ristretto di viti selvatiche. A questa ipotesi si contrappongono dati relativi alla variabilità genetica delle due sottospecie e ritrovamenti archeologici che dimostrerebbero la presenza di centri di domesticazione secondaria in diverse aree del Mediterraneo (DEDET, 1980; RIVERA-NUNEZ, WALKER, 1989; GRASSI *et al.*, 2003; SEFC *et al.*, 2003).

Grazie al sequenziamento del genoma della vite (JAILLON *et al.*, 2007; VELASCO *et al.*, 2007) e allo sviluppo di numerosi sistemi per l'analisi del DNA è oggi possibile studiare le relazioni tra le viti selvatiche e coltivate provenienti da diverse aree geografiche. In particolare, è possibile eseguire confronti basati sul DNA nucleare mediante marcatori random o analizzando singoli geni oppure effettuare indagini sul genoma plastidiale. Quest'ultimo è stato ampiamente indagato per studiare l'evoluzione e la distribuzione di numerose specie (KING, FERRIS, 1998; PALMÉ, VENDRAMIN, 2002) in quanto presenta caratteristiche differenti rispetto al DNA nucleare: non ricombina, ha una bassa frequenza di mutazione (FERRIS *et al.*, 1998; MARCHELLI *et al.*, 1998; FINESCHI *et al.*, 2002) e nella maggior parte delle angiosperme viene ereditato per via materna (RAJORA, DANCİK, 1992; DUMOLIN *et al.*, 1995). Le analisi del DNA plastidiali assumono quindi particolare rilevanza per lo studio della diffusione delle piante mediante semi. L'obiettivo del presente studio è stato quello di studiare la variabilità genetica nella vite selvatica e coltivata mediante marcatori molecolari SSR di cloroplasto. Sono state campionate 193 varietà coltivate e 387 accessioni di vite selvatica distribuite dall'Iran alla Spagna-Portogallo e raggruppate in 7 diversi cluster geografici. Attraverso l'analisi della distribuzione aplo-tipica nei diversi gruppi è stato possibile valutare le relazioni tra le due sottospecie nelle diverse aree geografiche.

#### MATERIALI E METODI

##### *Materiale vegetale*

Il lavoro ha previsto il reperimento e l'analisi di campioni di vite selvatica e coltivata raccolte in tutto l'areale della specie. In particolare, per quanto concerne la vite coltivata sono state campionate 193 cultivar provenienti da diverse collezioni e suddivise in 7 gruppi in base all'area di coltivazione (Tab. 1).

Gruppo 1- Iran: 55 accessioni;

Gruppo 2- Vicino Oriente: 18 accessioni per la maggior parte coltivate in Turchia e nella Regione Caucasicca;

Gruppo 3- Grecia: sono stati utilizzati i profili microsatelliti presenti in banca dati (<http://oldweb.biology.uoc.gr/gvd/contents/>) e relativi a 41 accessioni di vite coltivata.

Gruppo 4- Italia: 36 accessioni rappresentative del germoplasma tradizionale italiano;

Gruppo 5- Europa centrale: 8 accessioni provenienti da Austria e Germania;

Gruppo 6- Francia: 17 cultivar tradizionali francesi;

Gruppo 7- Penisola Iberica: 18 cultivar dei paesi dell'Europa occidentale quali Spagna e Portogallo.

Per quanto riguarda i campioni di vite selvatica è stato raccolto materiale vegetale da 387 individui derivanti da 69 popolazioni di vite selvatica provenienti dalla stessa area delle accessioni coltivate (Fig. 1).

A seconda della distribuzione geografica sono stati raggruppati in 7 gruppi corrispondenti a quelli del germoplasma coltivato. La Tab. 2 indica nomi, codice identificativo, numero di individui e coordinate geografiche delle popolazioni di vite selvatica identificati per i diversi gruppi geografici. Sebbene i campionamenti siano stati pianificati al fine di coprire l'intero areale di distribuzione della specie, non sono stati reperiti campioni di vite selvatica greci. È stato ipotizzato che in Grecia, in seguito all'attacco di *Phylloxera*, la vite selvatica sia oggi estinta (Angelakis-Roubelakis, com. pers.). In ogni popolazione campionata il numero di individui varia da 2 a 12. Maggiori dettagli sulla dimensione e sulla localizzazione delle popolazioni di vite selvatica campionata sono disponibili in GRASSI *et al.* (2006).

##### *Estrazione del DNA e analisi CpSSR*

Il DNA è stato estratto come descritto in LABRA *et al.* (2001) ad esclusione della fase di purificazione. Il DNA è stato analizzato con 6 loci microsatellite plastidiali: *ccmp2*, *ccmp3*, *ccmp4*, *ccmp6*, *ccmp7* e *ccmp10* (WEISING, GARDNER, 1999; GRASSI *et al.*, 2002). L'amplificazione è stata effettuata utilizzando il PCR-beads Ready-to-go KIT (Amersham-Bioscience, Italy) partendo da 10 ng di DNA totale e 5 ng di primer forward e reverse. Il primer forward è stato marcato con <sup>33</sup>P-ATP (Amersham, Italia). L'amplificazione PCR è stata effettuata seguendo il seguente profilo: 3 min a 94 °C di denaturazione seguiti da 35 cicli composti da denaturazione (45 s a



Fig. 1

Distribuzione delle popolazioni di vite selvatica campionate ed analizzate. La Tab. 2 descrive le caratteristiche di ogni popolazione e come queste sono state suddivise in gruppi secondo le coordinate geografiche.

Distribution of wild grape populations considered in the paper. Tab. 2 describes the characteristic of each population and the clustering strategy based on geographical coordinates.

TABELLA 1

Lista dei gruppi di accessioni di vite coltivata, siti di campionamento e aplotipi ottenuti per ciascuna accessione in base all'analisi dei loci *ccmp3* e *ccmp10*.

List of grapevine cultivar groups, their site of sampling with indications of their haplotypes at the marker loci *ccmp3* and *ccmp10*.

	Haplotype I	Haplotype II	Haplotype III	Haplotype IV	Haplotype V	Haplotype VI	
GR.1	Agh shani <sup>*</sup> , Akuz guzi <sup>*</sup> , Angotka <sup>*</sup> , Abi balo <sup>*</sup> , Bol mazo <sup>*</sup> , Chava ga <sup>*</sup> , Garmian <sup>*</sup> , Goj maleki <sup>*</sup> , Gonka <sup>*</sup> , Hosaini <sup>*</sup> , Inak amjaiti <sup>*</sup> , Khoshnav <sup>*</sup> , Klaka rev <sup>*</sup> , Lal ghermez <sup>*</sup> , Mam braima <sup>*</sup> , Rasha <sup>*</sup> , Sachakh <sup>*</sup> , Sayani <sup>*</sup> , Sarghola <sup>*</sup> , Shirazi <sup>*</sup> , Siah mamoli <sup>*</sup> , Taiefi <sup>*</sup> , Zardka <sup>*</sup> .	Agh melhi <sup>*</sup> , Ar ouzum <sup>*</sup> , Dizmari <sup>*</sup> , Fakhri <sup>*</sup> , Ghara ouzum <sup>*</sup> , Ghara shira <sup>*</sup> , Ghara melhi <sup>*</sup> , Lal bidaneh <sup>*</sup> , Lal siah <sup>*</sup> , Maierno <sup>*</sup> , Makaii <sup>*</sup> , Mosli <sup>*</sup> , Rezghi <sup>*</sup> , Rishbaba sefid <sup>*</sup> , Sorav <sup>*</sup> .				Alhaghi <sup>*</sup> , Askari <sup>*</sup> , Dastarchin <sup>*</sup> , Galin barmaghi <sup>*</sup> , Ghara gandoma <sup>*</sup> , Ghara shani <sup>*</sup> , Ghzl ouzum <sup>*</sup> , Gazandaiti <sup>*</sup> , Kazhav <sup>*</sup> , Keshmesh sefid <sup>*</sup> , Keshmesh ghermez <sup>*</sup> , Khalili <sup>*</sup> , Kalari <sup>*</sup> , Tabarza ghermez <sup>*</sup> , Rejin <sup>*</sup> , Rishbaba, Sahebi <sup>*</sup> .	
GR.2	Agialesci <sup>**</sup> , Aladasturi <sup>**</sup> , Alexandrouli <sup>**</sup> , Avassirkhva <sup>**</sup> , Brola <sup>**</sup> , Cetcipesci <sup>**</sup> , Charistvala <sup>**</sup> , Chichaveri <sup>**</sup> , Dondglabi <sup>**</sup> , Giani <sup>**</sup> , Gorula <sup>**</sup> , Jgya <sup>**</sup> , Kamouri <sup>**</sup> , Kapistoni Tetri-1 <sup>**</sup> , Kapistoni Tetri-2 <sup>**</sup> , Mteva <sup>**</sup> .	Armenia <sup>**</sup> .	Kisi <sup>**</sup> .				
GR.3	Agria Sultanina <sup>§</sup> , Akominato <sup>§</sup> , Dafnia <sup>§</sup> , Fraoula kokkini <sup>§</sup> , Kakotrygis <sup>§</sup> , Kritiko mavro <sup>§</sup> , Liatiko <sup>§</sup> , Mavrodafni <sup>§</sup> , Moemvasia <sup>§</sup> , Moschardina <sup>§</sup> , Moschato amvourgou <sup>§</sup> , Moschato aspro <sup>§</sup> , Moschato chondro <sup>§</sup> , Moschato kerkyras <sup>§</sup> , Moschato mazas <sup>§</sup> , Moschopatata <sup>§</sup> , Mouska <sup>§</sup> , Razaki lefkos <sup>§</sup> , Rome <sup>§</sup> .	Aetonychi <sup>§</sup> , Dermatas <sup>§</sup> , Eftakoilo <sup>§</sup> , Korithi mavro <sup>§</sup> , Psarosyriko <sup>§</sup> .		Fokiano <sup>§</sup> , Kotsifali <sup>§</sup> , Krystalli <sup>§</sup> , Moschato spinas <sup>§</sup> , Petrachladi <sup>§</sup> , Razaki chakidikis <sup>§</sup> , Razaki kavalas <sup>§</sup> , Sefka <sup>§</sup> , Tressallier <sup>§</sup> .	Karatsova naousis <sup>§</sup> , Kolokythas lefkos <sup>§</sup> , Nychato <sup>§</sup> , Perle de Csaba <sup>§</sup> , Razaki moschato <sup>§</sup> , Roditis kokkinos <sup>§</sup> , Roditis lefkos <sup>§</sup> , Tsaousi <sup>§</sup> .		
GR.4	Aglianico precoce <sup>**</sup> , Cesanese <sup>**</sup> , Prunesta <sup>**</sup> , Grego di Tufo <sup>**</sup> , Montepulciano <sup>**</sup> , Mammolo <sup>**</sup> , Trebbiano toscano <sup>**</sup> , Vernaccia di S. Gimignano <sup>**</sup> , Cigliegiolo <sup>**</sup> , Grechetto di Tod <sup>**</sup> , Bellone <sup>**</sup> , Monsonico <sup>**</sup> .	Aleatico <sup>**</sup> , Croatina <sup>**</sup> , Dolcetto <sup>**</sup> , Fiano <sup>**</sup> , Lambrusco marani <sup>**</sup> , Malvasia bianca <sup>**</sup> , Malvasia del Chianti <sup>**</sup> , Sangiovese <sup>**</sup> , Moscato terracina <sup>**</sup> , Teroldego <sup>†</sup> , Verdicchio <sup>**</sup> , Vespolina <sup>**</sup> .	Corvinone <sup>**</sup> .	Colorino <sup>**</sup> , Canaiolo <sup>**</sup> , Ucelut <sup>**</sup> .	Aglianico nero <sup>**</sup> , Cesanese comune <sup>**</sup> .	Aglianico <sup>**</sup> , Canaiolo <sup>**</sup> , Cannonau <sup>**</sup> , Frappato <sup>**</sup> , Latuario <sup>**</sup> , Nasco <sup>**</sup> .	
GR.5	Traminer <sup>**</sup> , Silvaner <sup>**</sup> .		S. Laurent <sup>**</sup> , Furmint <sup>**</sup> .	Riesling <sup>**</sup> .	Harslevelue <sup>**</sup> , Coarnaalba <sup>**</sup> , Limberger <sup>**</sup> .		
GR.6	Cabernet franc <sup>†</sup> , Cabernet sauvignon <sup>†</sup> , Gamay <sup>†</sup> , Mazuela <sup>††</sup> , Sauvignon blanc <sup>†</sup> , Semillon <sup>†</sup> .		Clairette <sup>**</sup> .	Aligotè <sup>**</sup> , Pansè <sup>**</sup> , Shiraz <sup>**</sup> .	Chardonnay <sup>**</sup> , Cot <sup>**</sup> , Merlot <sup>**</sup> .	Altesse <sup>**</sup> , Parellada <sup>**</sup> , Pinot noir <sup>††</sup> , Syrah <sup>**</sup> .	
GR.7	Albillo <sup>‡</sup> , Beba <sup>‡</sup> , Beba de Huelva <sup>‡</sup> , Beba de Jaen <sup>‡</sup> , Beba de Jerez <sup>‡</sup> , Blanca Temprana Almeria <sup>‡</sup> .	Arinto de Bucelas <sup>#</sup> .	Doradilla <sup>**</sup> .	Albino de Souza <sup>‡</sup> .	Arinto de Dao <sup>‡</sup> , Bobal <sup>‡</sup> .	Acheria <sup>‡</sup> , Ahmed <sup>**</sup> , Baladi Verdejo <sup>‡</sup> , Boal de Madere <sup>‡</sup> , Brancelho <sup>‡</sup> , Ciguentes <sup>**</sup> , Corrazon de Cabrillo <sup>**</sup> .	

\* - Agricultural Research Center of West Azarbaijan, Grapevine Collection of Kahriz, Ourmia- Iran;

\*\* - Regional Agency for Agriculture and Forests (ERSAF), Pavia, Italy;

\*\*\* - Regional Agency for Agriculture (ERSA), Gorizia, Italy;

§ - <http://oldweb.biology.uoc.gr/gvd/contents>;

† - Istituto Agrario di San Michele all'Adige (ISMA), Trento, Italy;

†† - Experimental Institute for Viticulture (ISV), Treviso, Italy;

# - Autochthonous Grapevine Germplasm Collection of Jerez de la Frontera (XF), Jerez de la Frontera, Spain.



TABELLA 2

Lista delle popolazioni di vite selvatica, codice, coordinate geografiche dei siti di campionamento (\* = Approssimazione  $\pm 3'$ ), numero di campioni analizzati in ogni popolazione (N) e aplotipi di ciascuna accessione ricavati in base all'analisi dei loci *ccmp3* e *ccmp10*. Le 69 popolazioni selvatiche sono state divise in 6 gruppi geografici. Non sono state considerate le accessioni greche per mancanza di campioni.

List of wild grapevine populations, code, geographic coordinates of sites of sampling (\* = Approx  $\pm 3'$ ), number of samples analysed in each population (N) and their haplotypes at the marker loci *ccmp3* and *ccmp10*. The 69 wild populations were divided in 6 geographical groups. No wild accessions from Greece were considered.

	POPULATION NAME	CODE	COORDINATES	N°	HAPLOTYPES				
					I	II	III	IV	V
GROUP 1	Sardasht - Ghasm rash	SG1	36°12'; 45°22'	10	6	4	-	-	-
	Sardasht - Ghasm rash	SG2	36°13'; 45°23'	10	1	9	-	-	-
	Sardasht - Shalmash	SHA	36°05'; 45°30'	8	1	7	-	-	-
	Sardasht - Shivakan	SS	36°25'; 45°22'	3	-	3	-	-	-
	Sardasht - Shakhiju	SHAK	36°09'; 45°28'	8	7	1	-	-	-
	Piranshahr - Prdanan	PR	36°14'; 45°05'	12	11	1	-	-	-
	Piranshahr - Bradinaveh	PB	36°34'; 45°11'	5	5	0	-	-	-
	Banah - Tazhan	BT	35°59'; 45°53'	10	2	8	-	-	-
GROUP 2	Armenia	AR1	41°03'; 44°54'	8	2	6	-	-	-
	Armenia	AR2	41°05'; 45°07'	4	1	2	-	1	-
	Armenia	AR3	40°55'; 45°11'	8	-	-	-	8	-
	Armenia - Talin	AR4	-	2	-	-	-	-	2
	Russia - Kabardino	R1	-	2	-	-	-	1	1
	Russia - Dagestan	R2	-	4	1	3	-	-	-
	Russia - Majkop	R3	-	4	-	-	1	3	-
	Azerbaijan	AZ1	-	4	1	-	1	2	-
Georgia - Kisi	G1	-	2	-	2	-	-	-	
GROUP 4	Liguria - Valgrande	I1	44°21'; 09°43'	3	-	-	-	3	-
	Liguria - Castiglione	I2	-	2	-	-	-	2	-
	Toscana - Grosseto	I3	42°81'; 10°95'	7	2	1	-	4	-
	Toscana - Parco Uccellina	I4	42°55'; 11°21'	12	4	1	-	6	1
	Toscana - Sticciano	I5	42°91'; 11°18'	6	-	-	2	4	-
	Toscana - Ringhiere	I6	-	6	-	2	-	4	-
	Toscana - Muro	I7	-	3	-	-	-	3	-
	Toscana - La Sterza; Era river	I8	-	3	-	-	1	2	-
	Lombardia - Po river	I9	-	2	-	-	-	1	-
	Lombardia - Bosco S. Negri	I10	45°12'; 09°03'	3	-	1	-	3	-
	Emilia Romagna - Mesola	I11	-	8	-	-	-	8	-
	Roma - Tolfà	I12	42°09'; 11°90'	13	7	3	1	2	-
	Frosinone	I13	41°60'; 12°82'	7	-	-	1	6	-
	Campania	I14	41°41'; 13°92'	2	1	-	-	1	-
	Calabria - Cosenza	I15	39°21'; 16°28'	2	-	-	-	2	-
	Calabria - Rossano	I16	39°58'; 16°70'	7	-	1	-	6	-
Calabria - San Anargia	I17	-	3	-	-	-	3	-	
Calabria - San Apollinare	I18	-	8	-	-	-	8	-	
Calabria - San Zaccaria	I19	-	9	-	-	-	9	-	
Molise - Isernia	I20	41°62'; 14°20'	6	2	3	-	1	-	
Basilicata - Sinni	I21	40°25'; 16°52'	7	1	1	1	4	-	
Basilicata - Tempa Martina	I22	40°20'; 15°96'	10	1	-	-	7	2	
GROUP 5	Austria	A1	48°10'; 16°30'	16	-	4	-	12	-
	Česká Rep. - Břeclav	C1	-	6	-	-	-	6	-
	Deutschland - Ketsch	D1	-	8	-	-	-	8	-
	Deutschland - Dirmstein	D2	49°61'; 08°23'	2	-	-	-	2	-
	Deutschland - Koller	D3	-	2	-	-	-	2	-
Deutschland - Hoerdt	D4	49°03'; 08°21'	2	-	-	-	2	-	
GROUP 6	Hendave	F1	43°10'; 01°22'	2	-	-	-	2	-
	Hendave	F2	43°10'; 01°31'	7	-	-	-	7	-
	Hendave	F3	43°19'; 01°22'	2	-	-	-	2	-
	Valence	F4	-	3	-	-	-	3	-
	Rio Esca - Huesca	F5	42°31'; 00°90'	12	-	-	-	12	-
	Rio Ver - Huesca	F6	42°30'; 00°70'	12	-	-	-	12	-
	Navarra	F7	-	4	-	-	-	4	-
	Guipuzcoa	F8	42°75'; -02°74'	2	-	-	-	2	-
GROUP 7	Cadiz	E1	-	4	-	-	-	1	3
	Ciudad Real	E2	-	9	-	1	-	8	-
	Menorca	E3	-	5	-	-	-	5	-
	La Mirilla	E4	37°39'; -06°09'	5	-	5	-	-	-
	Rivera del Huezmar	E5	37°55'; -05°42'	6	-	-	-	6	-
	Siviglia	E6	-	3	-	3	-	-	-
	Malaga	E7	-	3	-	-	-	3	-
	PN, Doñana	E8	36°52'; -06°23'	6	-	6	-	-	-
	PN, Doñana a Rocinas	E9	36°07'; -06°30'	4	-	4	-	-	-
	PN, Doñana Acebrón	E10	37°08'; -06°32'	2	-	2	-	-	-
	Rio Murtiga	E11	38°01'; -06°47'	6	-	5	-	1	-
	Arrovo Peguera	E12	36°22'; -05°38'	6	-	-	-	6	-
	Arrovo Nateruela	E13	36°20'; -05°37'	6	-	1	-	5	-
	El Chorreadero	E14	36°49'; -05°29'	4	-	-	-	4	-
	Pantano de los Hurones	E15	36°46'; -05°33'	3	-	-	-	2	1
Jaen	E16	-	2	-	2	-	-	-	



94 °C), annealing (30 s a 50 °C) ed estensione (1 min a 72 °C); infine una fase finale di 7 min a 72 °C. Nel caso del locus *ccmp2*, la temperatura di annealing è stata di 51,5 °C.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di sequenza. In particolare, a 5 µl dell'amplificato è stato aggiunto un eguale volume di loading buffer (80% formammide, 1 mg ml<sup>-1</sup> xylene cyanol FF, 1 mg ml<sup>-1</sup> blu di bromofenolo, EDTA 10mM, pH 8.0) ed un volume pari a 1.5 µl di questa miscela è stato caricato su gel di poliacrilammide. L'analisi elettroforetica è stata effettuata in tampone TAE per 3 ore a 80 W. Il gel è stato quindi fissato in acido acetico al 10% e sottoposto ad analisi autoradiografica. L'analisi della lastra fotografica ha permesso la determinazione la dimensione degli alleli per ciascuno dei loci cpSSR indagati.

### Analisi statistiche

La ricchezza aplotipica è stata calcolata come percentuale di accessioni che condividono lo stesso aplotipo in ogni gruppo, sia di viti coltivate che di selvatiche. I valori di diversità aplotipica (h) sono stati considerati come una misura della diversità genetica GD (NEI, 1987) e pertanto stimata come  $GD = (n / (n - 1)) (1 - \sum p_i^2)$ , dove n è il numero di individui campionati e p la frequenza di ogni allele.

E' stata analizzata la distribuzione dei diversi aplotipi tra le diverse aree geografiche e valutata la variazione dei singoli aplotipi da est a ovest e da nord a sud. I valori di R e P, calcolati con il programma Statistica 6.0 (2001), indicano la correlazione tra la frequenza aplotipica e la distanza geografica.

## RISULTATI

### Alleli cpSSR e forme aplotipiche

La diversità genetica presente tra i 580 individui campionati, 193 accessioni di vite coltivate e 387 di viti selvatiche, è stata analizzata mediante marcatori cpSSR. I risultati mostrano che, dei 6 loci SSR testati, due (*ccmp3* e *ccmp10*) sono polimorfici, con due (106 e 107 bp) e tre (114, 115 e 116 bp) forme alleliche rispettivamente (Tab. 3). La dimensione dei diversi alleli è stata dedotta mediante analisi elettroforetica su gel di poliacrilamide grazie al confronto con un marcatore di peso molecolare; al fine di confermare questi dati si è tuttavia proseguito con il sequenziamento di alcuni di essi (allele 106 da E1 e I12, popolazioni della Tab. 2; allele 107 dalle popolazioni I3 e AR1; allele 114 dalle popolazioni I12 e D1; allele 115 dalle popolazioni E8 e A1; allele 116 dalle popolazioni AR4 e E4) (dati non mostrati). In tutti i casi, i risultati confermano i dati ottenuti dall'analisi elettroforetica mostrando per tutti i loci una distribuzione unimodale, con gli alleli che differiscono uno dall'altro di 1 bp. Quindi la variazione osservata è conforme allo "stepwise mutation model" (SMM), che spiega la variazione della dimensione degli alleli come un errore-slittamento della polimerasi durante la replicazione del DNA (FREIMER, SLATKIN, 1996).

Dall'analisi della distribuzione degli alleli si evince che per il locus *ccmp3* l'allele più frequente nelle popolazioni selvatiche è quello di 106 bp mentre è di 107 bp nelle coltivate. Nel caso del locus *ccmp10* l'allele più frequente nelle popolazioni selvatiche è quello di 114 bp mentre quello di 116 bp è presente solo in 9 campioni.

La combinazione dei diversi alleli dei loci *ccmp3* e *ccmp10* ha generato un totale di 6 diverse forme aplotipiche (Tab. 3).

TABELLA 3

Descrizione degli alleli ottenuti per i loci *ccmp3* e *ccmp10* e definizione dei sei aplotipi sulla base delle combinazioni alleliche. Sizes (bp) of alleles at the *ccmp3* and *ccmp10* polymorphic chloroplast loci and definition of the six haplotypes based on allele combinations.

Haplotype	<i>ccmp3</i> (bp)	<i>ccmp10</i> (bp)	Haplotype	<i>ccmp3</i> (bp)	<i>ccmp10</i> (bp)
I	107	115	IV	106	114
II	106	115	V	106	116
III	107	114	VI	107	116

### Distribuzione degli aplotipi nei 7 gruppi geografici

Le Tab. 1 e 2 mostrano gli aplotipi per le accessioni coltivate e selvatiche analizzate. Dall'analisi delle tabelle si evince che la distribuzione dei sei aplotipi nei 7 gruppi geografici non è omogeneo (Figg. 2A, 2B), tuttavia non vi sono aplotipi gruppo-specifici ad eccezione dell'aplotipo VI che è presente solo nelle viti coltivate Italiane, Spagnole e Iberiche.

Al fine di poter confrontare la struttura genetica delle sue sottospecie, viene mostrata la variazione degli aplotipi nei diversi gruppi geografici da Est a Ovest e da Sud a Nord (Fig. 3). Nelle accessioni coltivate, l'aplotipo I è il più frequente ed ubiquitario in tutti i gruppi, ma con frequenze molto evidenti come si deduce dalla figura 2A. L'aplotipo V è ampiamente presente nelle cultivar di tutti i gruppi ad eccezione del 2. L'aplotipo II è riscontrabile nei primi quattro gruppi. L'aplotipo III è il più raro tra le accessioni di vite coltivate (Tab. 1), mentre il IV è quasi esclusivo delle accessioni del bacino del Mediterraneo (Fig. 2A).

La ricchezza aplotipica aumenta da Est a Ovest così come indicato dall'analisi della diversità genetica (GD) con i valori calcolati per ogni gruppo (Tab. 4). I valori della diversità genetica sono risultati alti all'interno di ogni gruppo tranne per le accessioni del vicino Oriente, dove la maggior parte dei campioni è caratterizzata dall'aplotipo I. Sulla base dei dati ottenuti risulta evidente che i paesi del Mediterraneo (dal Gruppo 3 al Gruppo 7) hanno il più alto livello di ricchezza genetica.

Non si evidenziano variazioni rilevanti per quanto riguarda la distribuzione degli aplotipi da Nord a Sud, così come suggerito anche dai dati relativi alla diversità genetica (Tab. 4).

Nei campioni analizzati l'aplotipo IV è presente in più del 50% delle accessioni ed in tutti i gruppi ad eccezione del 6. Solo 9 campioni mostrano l'aplotipo

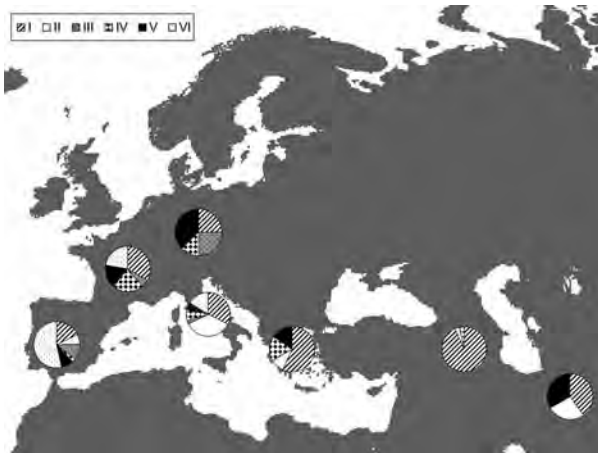


Fig. 2A

Distribuzione degli aplotipi nella vite coltivata (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*) nei diversi gruppi geografici considerati. Domesticated grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*) haplotype distribution in the analysed geographical groups.



Fig. 2B

Distribuzione degli aplotipi nella vite selvatica (*Vitis vinifera* L. ssp. *silvestris*) nei diversi gruppi geografici considerati. Wild grape (*Vitis vinifera* L. ssp. *silvestris*) haplotype distribution in the analysed geographical groups.

III e IV, mentre l'aplotipo VI è totalmente assente nella sottospecie selvatica.

I gruppi italiani e del vicino Oriente sono caratterizzati dalla presenza di tutti e 5 gli aplotipi, mentre le accessioni francesi e iraniane mostrano solo uno o due aplotipi (Fig. 2B). Si evince pertanto che la diversità genetica della vite selvatica è maggiore nelle popolazioni italiane e del vicino Oriente rispetto alle altre aree analizzate (Tab. 4).

L'analisi della distribuzione aplotipica da Sud a Nord evidenzia che i gruppi intermedi (2, 4 e 7) sono quelli caratterizzati da una maggiore diversità genetica rispetto ai campioni raccolti nelle regioni settentrionali (1 e 3) e meridionali (5 e 6) dell'areale di distri-

buzione della specie (Fig. 3).

L'analisi della frequenza aplotipica delle accessioni di vite selvatica e coltivata campionate nelle differenti aree geografiche (Tab. 4) indicano una correlazione tra i valori di GD, ovvero i valori di GD calcolati per ciascuna macroarea (coltivate + selvatiche) risultano più bassi della somma dei singoli valori di GD calcolati per le accessioni coltivate e quelle selvatiche separatamente. Questo è confermato per tutti i gruppi analizzati ad eccezione dei campioni delle regioni del vicino Oriente (gruppo 2).

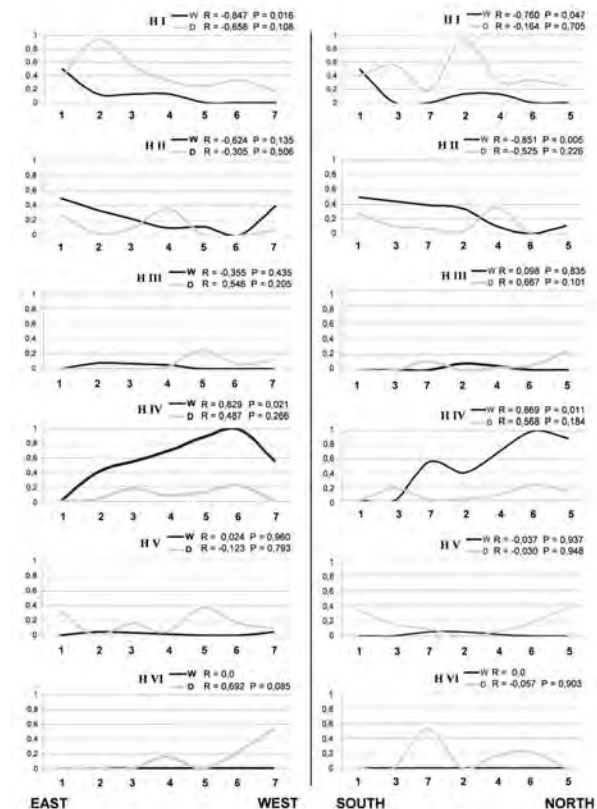


Fig. 3

Variation of the haplotype distribution in different geographical groups from East to West and from North to South. For each group were considered the following meridians and parallels: G1 (53°, 32°); G2 (43°, 42°); G3 (22°, 39°); G4 (12°, 43°); G5 (10°, 49°); G6 (2°, 46°); G7 (-3°, 40°). R values indicate the correlation between haplotype frequency and geographical distances for wild and domesticated grape, respectively. P indicates the significance of R values ( $\leq 0,05$ ).

Analysis of haplotype frequency distribution among different geographical groups from East to West and from North to South regions. For each group was considered the following meridians and parallels: G1 (53°, 32°); G2 (43°, 42°); G3 (22°, 39°); G4 (12°, 43°); G5 (10°, 49°); G6 (2°, 46°); G7 (-3°, 40°). R values indicate the correlation between haplotype frequency and geographical distances for wild and domesticated grape, respectively. P indicates the significance of R values ( $\leq 0,05$ ).

TABELLA 4

Valori di diversità genetica (NEI, 1987) calcolati per ogni gruppo di accessioni selvatiche, coltivate e di selvatiche + coltivate. GD = Gene diversità; SD = Deviazione standard. Values of the haplotype parameter diversity (NEI, 1987) calculated for each germoplasm group of domesticated and wild accessions. GD = Gene Diversity; SD = Standard Deviation.

	Domesticated		Wild		Wild and Domesticated	
	G.D.	S.D.	G.D.	S.D.	G.D.	S.D.
Group1	3,24653	0,12292	1,73611	2,45556	2,68472	1,06875
Group2	0,67847	0,29444	3,14097	1,06111	3,26944	0,26944
Group3	3,43889	0,0065	-	-	-	-
Group4	3,51319	0,07153	2,43819	0,47361	3,15972	0,69861
Group5	4,46389	0,61389	0,70556	0,97014	1,87986	1,03472
Group6	3,63056	0,18194	0	0	2,60972	0,71111
Group7	2,93889	1,19306	1,86319	2,63472	3,775	1,13056

## DISCUSSIONE

Obiettivo di questo lavoro è quello di valutare le relazioni di similarità genetiche tra accessioni di vite selvatica e coltivata campionate in sette macroregioni identificate lungo l'areale di distribuzione della specie. Negli ultimi anni lo sviluppo di numerosi marcatori molecolari ha permesso di definire le relazioni genetiche e le parentele dirette ed indirette tra diverse cultivar di vite (BOWERS *et al.*, 1999; VOUILLAMOZ, GRANDO, 2006; VOUILLAMOZ *et al.*, 2007). In lavori precedenti, marcatori SSR nucleari e AFLP sono

stati applicati al germoplasma viticolo ed hanno evidenziato un alto grado di diversità genetica nelle varietà coltivate diffuse nelle regioni mediterranee (SEFC *et al.*, 2000; FOSSATI *et al.*, 2001; ARADHYA *et al.*, 2003; MARTIN *et al.*, 2003). Nel caso specifico dei marcatori SSR nucleari, la ricchezza di alleli osservata e l'alto livello di eterozigosi, rende tuttavia questi marcatori meno efficienti nello studio delle relazioni genetiche tra ampi gruppi di cultivar (LABRA *et al.*, 2002; IMAZIO *et al.*, 2006).

I marker cpSSR presentano una ereditarietà materna e la loro variabilità è molto più modesta di quelli nucleari. A causa di queste caratteristiche, questi marker sono risultati idonei strumenti per analizzare campioni di vite non necessariamente correlati tra loro e definire le relazioni tra gruppi di accessioni sia di vite selvatica che coltivata (ARROYO *et al.*, 2002; PALMÈ, VENDRAMIN, 2002; SNOUSSI *et al.*, 2004).

Dalle nostre analisi sono stati evidenziati 2 marcatori cpSSR polimorfici; questi hanno permesso di analizzare la distribuzione aplotipica nelle diverse aree e di eseguire dei confronti tra le macroregioni orientali e quelle occidentali. Nel caso della vite selvatica la presenza di tutti gli aplotipi nei campioni del vicino Oriente suggerisce che quest'area sia un possibile centro di origine delle specie (LEVADOUX, 1956; GRASSI *et al.*, 2006). La ricchezza di aplotipi osservata nel bacino del Mediterraneo suggerisce invece la presenza di aree rifugio nel territorio italiano e spagnolo. La mancanza di rifugi e la rapida colonizza-

zione postglaciale spiegherebbe invece la ridotta diversità genetica (basso numero di aplotipi) delle regioni del Nord Europa (FERRIS *et al.*, 1998).

Nel caso di *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* i nostri dati mostrano quindi due maggiori hot spots di diversità genetica, localizzati nella penisola italiana e nelle regioni del vicino Oriente. È inoltre chiaro che il germoplasma della vite selvatica orientale è differente da quello dei paesi occidentali: gli aplotipi I e II, presenti nel germoplasma iraniano, non sono comuni nelle altre aree analizzate dove è più frequente l'aplotipo IV.

Nel caso delle accessioni di vite coltivata i campioni del vicino e medio Oriente (gruppo 1 e 2) hanno una ricchezza aplotipica minore rispetto alle cultivar occidentali. Questi dati sono molto interessanti perché potrebbero contraddire una comune credenza relativa al centro primario di domesticazione della vite. In particolare, sulla base di studi archeologici e storici (ZOHARY, SPIEGEL-ROY, 1975; ZOHARY, HOPE, 2000) il centro o i centri di domesticazione primaria della vite sarebbero localizzati nelle regioni del vicino Oriente; questo farebbe supporre che in queste aree vi sia la massima rappresentatività di diversità genetica. I nostri dati dimostrano invece l'esatto contrario, ovvero che la diversità genetica maggiore si riscontra nel bacino del Mediterraneo.

L'assenza di tre aplotipi nelle accessioni coltivate dei campioni iraniani e del vicino Oriente, può essere spiegata con due diverse ipotesi: 1) l'erosione genetica di numerose cultivar autoctone cresciute in queste regioni che ha generato una riduzione della diversità di aplotipi; 2) l'esistenza di centri di domesticazione secondaria, localizzati nelle regioni del Mediterraneo, che hanno contribuito alla variabilità genetica delle cultivar europee attuali.

La prima ipotesi viene supportata dal quadro culturale dei paesi orientali: gli aplotipi oggi assenti nei vitigni orientali potrebbero essere stati persi a causa del divieto imposto dalla religione mussulmana di produrre e consumare bevande alcoliche, tra cui il vino. I viticoltori si sarebbero quindi dedicati alla coltivazione di uva da tavola perdendo gran parte delle cultivar più vocate alla produzione enologica (TAFAZZOLI *et al.*, 1993). Tutto questo potrebbe aver determinato un fenomeno di erosione genetica e quindi di riduzione antropica della diversità aplotipica.

La seconda ipotesi implica che le cultivar attuali non derivino solo da un centro di domesticazione primaria situato nelle regioni del vicino e medio Oriente, ma da fenomeni di domesticazione secondaria o da eventi di ibridazione locali tra accessioni di vite selvatiche e coltivate (GRASSI *et al.*, 2003). Ricerche archeologiche condotte in Spagna mostrano che durante il terzo millennio a.C. nella penisola iberica era conosciute sia le pratiche di coltivazione della vite che il consumo di vino (RIVERA-NUNEZ, WALKER, 1989; HOPE, 1991). Nello stesso periodo in Gailhan (Francia) sono stati rinvenuti semi di vite dell'età del ferro (DEDET, 1980). Questi ed altri dati supporte-



rebbero l'ipotesi che la produzione ed il consumo di vino nel bacino del Mediterraneo sia una pratica antecedente l'arrivo dei popoli orientali e che l'introduzione nei paesi del Mediterraneo delle cultivar provenienti dai centri di domesticazione primaria abbia arricchito le varietà di vite locali ma non le abbia sostituite completamente. La distribuzione degli aplotipi nelle diverse aree geografiche suggerisce che il germoplasma viticolo attuale sia il risultato di eventi di domesticazione sia primaria (nelle aree orientali) che secondaria (nel bacino del Mediterraneo). Per esempio, la maggior parte delle cultivar dei gruppi 1 e 2 presenta l'aplotipo I che è anche quello maggiormente rappresentato nelle accessioni di vite selvatica di queste aree. Attraverso spostamenti demici e culturali le varietà di vite coltivate orientali si sarebbero spostate quindi verso occidente raggiungendo il Mediterraneo. Molte cultivar campionate nel bacino del Mediterraneo (gruppi da 3 a 7) sono caratterizzate infatti dall'aplotipo I, mentre questo aplotipo è completamente assente nelle viti selvatiche del centro Europa, della Francia, della Spagna e del Portogallo. In base a queste considerazioni le nostre analisi supportano l'origine extra-regionale delle varietà coltivate europee caratterizzate dall'aplotipo I.

Esaminando le accessioni di vite coltivate in Occidente (gruppi da 3 a 7) si osserva chiaramente che queste sono caratterizzate da un alto livello di diversità d'aplotipo: sei aplotipi in Spagna ed Italia, cinque in Francia e quattro nel centro Europa ed in Grecia. Questi dati indicano che oltre all'arrivo delle cultivar occidentali, altri fattori devono aver contribuito alla ricchezza genetica delle varietà coltivate europee; fenomeni come domesticazioni secondarie a partire da viti selvatiche locali o eventi di ibridazione tra le due sottospecie. Queste ipotesi vengono supportate dai nostri dati sulla distribuzione aplotipica. Per esempio, l'aplotipo IV è il più rappresentato nel germoplasma selvatico europeo ed è anche ampiamente presente in tutte le varietà coltivate della stessa area.

La distribuzione degli aplotipi nelle aree mediterranee suggerisce inoltre che in queste aree vi siano stati intensi fenomeni di circolazione varietale e questo viene confermato non solo dalle analisi molecolari ma anche dalla scoperta di strade del vino e di documenti storici attestanti lo scambio di cultivar tra i diversi paesi del Mediterraneo (LABRA *et al.*, 2002). Rimane infine da chiarire la presenza dell'aplotipo VI nelle cultivar italiane, francesi ed iberiche. Questo aplotipo non è mai stato riscontrato nelle accessioni di vite selvatica da noi analizzate, pertanto è possibile escludere l'origine delle viti coltivate con aplotipo VI a partire dalle viti selvatiche da noi considerate. Non possiamo tuttavia escludere che queste cultivar derivino dalla domesticazione di rare accessioni selvatiche locali oggi estinte o comunque non campionate ed analizzate in questo lavoro.

In conclusione, questo lavoro evidenzia come i mar-

catori plastidiali siano importanti strumenti per lo studio dell'origine e della diffusione della vite. È tuttavia necessario partire dalle informazioni ottenute dall'analisi della distribuzione aplotipica per costituire gruppi omogenei di accessioni utili per studiare geni legati allo sviluppo dei caratteri sessuali della vite; questo è infatti l'evento chiave su cui il coltivatore preistorico ha agito nel complesso processo di domesticazione della vite.

*Ringraziamenti* - Gli autori ringraziano l'Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste (ERSAF), il Dr. Anzani, il Prof. Ocete Rubio, le guardie forestali Brodolini (Roma), Congiu (Nuoro), Giura e Tommaso (Isernia), Guarnini (Potenza) per aver contribuito nel campionamento e nella propagazione delle piante di vite coltivate e selvatica. Si ringrazia il progetto INGENIO-Finlombarda dal titolo "Tracciabilità agroalimentari e ambientale" ed il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare che ha permesso lo sviluppo di questa ricerca nell'ambito di due progetti: "Creazione di una collezione *ex situ* atta a preservare la biodiversità della specie *Vitis vinifera*" e "Application of biotechnology to the protection of the environment, in collaboration with China peoples Republic".

Si ringraziano infine i professori Francesco Sala ed Attilio Scienza per gli importanti suggerimenti forniti durante la pianificazione del lavoro e la stesura del presente manoscritto.

#### LETTERATURA CITATA

- ARADHYA M.K., DANGL G.S., PRINS B.H., BOURSQUOT J.M., WALKER M.A., MEREDITH C.P., SIMON C.J., 2003 - *Genetic structure and differentiation in cultivated grape*, *Vitis vinifera* L. *Genet. Res.*, 81: 179-192.
- ARROYO-GARCIA R., LEFORT F., DE ANDRES M.T., IBANEZ J., BORREGO J., JOUVE J., CABELLO F., MARTINEZ-ZAPATER J.M., 2002 - *Chloroplast microsatellite polymorphism in Vitis species*. *Genome*, 14: 1142-1149.
- BOWERS J., BOURSQUOT J.M., THIS P., CHU K., JOHANSSON H., MEREDITH C., 1999 - *Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of Northeastern France*. *Science*, 285: 1562-1565.
- DEDET B., 1980 - *Premières recherches sur l'oppidium du Plan de la Tour Gailhan, Gard*. A.R.A.L.O., Caveirac, France.
- DUMOLIN S., DEMESURE B., PETIT R.J., 1995 - *Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method*. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 1253-1256.
- FERRIS C., KING R.A., VÄINÖLÄ R., HEWITT G.M., 1998 - *Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland*. *Heredity*, 80: 584-593.
- FINESCHI S., TURCHINI D., GRASSONI P., PETIT R.J., VENDRAMIN G.G., 2002 - *Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy*. *Forest Ecol. Manag.*, 156: 103-114.
- FORNI G., 1990 - *Gli albori dell'agricoltura*. REDA, Roma, Italy.
- FOSSATI T., LABRA M., CASTIGLIONE S., FAILLA O., SCIENZA A., SALA F., 2001 - *The use of AFLP and SSR molecular marker to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave"*. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 200-205.

- FREIMER N.B., SLATKIN M., 1996 – *Microsatellites: evolution and mutational processes. Variation in the human genome*. Ciba Foundation Symposium, 197: 51-72.
- GRASSI F., LABRA M., IMAZIO S., OCETE RUBIO R., FAILLA O., SCIENZA A., SALA F., 2006 – *Phylogeographical structure and conservation genetics of wild grapevine*. *Conserv. Genet.*, 7: 837-845.
- GRASSI F., LABRA M., IMAZIO S., SPADA A., SGORBATI S., SCIENZA A., SALA F., 2003 – *Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis*. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 1315-1320.
- GRASSI F., LABRA M., SCIENZA A., IMAZIO S., 2002 – *Chloroplast SSR markers to assess DNA diversity in wild and cultivated grapevines*. *Vitis*, 41: 157-158.
- HEGI G., 1925 – *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Band 5, Teil 3. München, Germany.
- HOPF M., 1991 – *South and Southwest Europe*. In: VAN ZEIST W., WASYLIKOWA K., BEHRE K.E. (Eds.), *Progress in Old World Paleoethnobotany*: 241-277. Balkema, Rotterdam, Brookfield.
- IMAZIO S., LABRA M., GRASSI F., SCIENZA A., FAILLA O., 2006 – *Chloroplast microsatellites to investigate the origin of grapevine*. *Genet. Resour. Crop Ev.*, 53: 1003-1011.
- JAILLON O., AURY J.M., NOEL B. *et al.*, 2007 – *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla*. *Nature*, 449: 463-467.
- KING A.R., FERRIS C., 1998 – *Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.* *Mol. Ecol.*, 7: 1151-1161.
- KROLL H., 1991 – *Sudosteuropana*. In: VAN ZEIST W., WASYLIKOWA K., BEHRE K.E. (Eds.), *Progress in Old World Paleoethnobotany*: 161-177. Balkema, Rotterdam, Brookfield.
- LABRA M., CARRENO-SANCHEZ E., BARDINI M., BASSO B., SALA F., SCIENZA A., 2001 – *Extraction and purification of DNA from grapevine leaves*. *Vitis*, 40: 101-102.
- LABRA M., FAILLA O., FORNI G., GHIANI A., SCIENZA A., SALA F., 2002 – *Microsatellites analysis to define genetic diversity of grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in central and western mediterranean countries*. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 36: 11-20.
- LEVADOUX L., 1956 – *Les populations sauvages et cultivées de *Vitis vinifera**. *Ann. ammelior. plantes cultivées*, 6: 50-110.
- LOGOTHETIS B.C., 1970 – *The development of the vines and of viticulture in Greece*. Tessaionica, Aristotelion Panepistemion Tessaionikis, Greece.
- MARCHELLI P., GALLO L., SCHOLZ F., ZIEGENHAGEN B., 1998 – *Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area*. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 642-646.
- MARTIN J.P., BORREGO J., CABELLO F., ORTIZ J.M., 2003 – *Characterisation of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers*. *Genome*, 46: 10-18.
- MCGOVERN P.E., 2003 – *Ancient wine: the search of the origin of Viniculture*. Princeton University Press, New Jersey.
- NEI M., 1987 – *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- OLMO H.P., 1976 – *Grapes*. In: SIMMONDS N.W. (Ed.), *Evolution of crop plants*: 294-298. Longman, London.
- PALMÉ A.E., VENDRAMIN G., 2002 – *Chloroplast DNA variation, postglacial recolonisation and hybridisation in hazel, *Corylus avellana**. *Mol. Ecol.*, 11: 1769-1779.
- RAJORA O.P., DANCİK B.P., 1992 – *Chloroplast DNA inheritance in *Populus**. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 280-285.
- RIVERA-NUNEZ D., WALKER M.J., 1989 – *A review of Palaeobotanical findings of early *Vitis* in the Mediterranean and of the origins of cultivated grapevines, with special reference to new pointers to prehistoric exploration in the western Mediterranean*. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 51: 205-237.
- SEFC K.M., LOPES M.S., LEFORT F., BOTTA R., ROUBELAKIS-ANGELAKIS K.A., IBANEZ I., PEJIÈ H.W., WAGNER J., GLOSSL H., STEINKELLNER H., 2000 – *Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European region and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivar*. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 489-505.
- SEFC K.M., STEINKELLNER H., LEFORT F., BOTTA R., CAMARA MACHADO A., BORREGO J., MALETIĆ E., GLÖSSL J., 2003 – *Evaluation of the genetic contribution of local wild vines to european germplasm*. *Am. J. Enol. Viticult.*, 54: 15-21.
- SNOUSSI H., HARBI BEN SLIMANE M., RUIZ-GARCÍA L., MARTÍNEZ-ZAPATER J.M., ARROYO-GARCÍA R., 2004 – *Genetic relationship among cultivated and wild grapevine accessions from Tunisia*. *Genome*, 47: 1211-1219.
- TAFAZZOLI A., HEKMATI J., FIROUZEH M., 1993 – *Grape*. Shiraz University Press, Shiraz, Iran.
- VELASCO R., ZHARKIKH A., TROGGIO M. *et al.*, 2007 – *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*. *PLoS ONE* 2(12): e1326. doi:10.1371/journal.pone.0001326
- VIVIER M.A., PRETORIUS I.S., 2002 – *Genetically tailored grapevines for the wine industry*. *Trends Biotechnol.*, 20: 472-478.
- VOUILLAMOZ J.F., GRANDO M.S., 2006 – *Genealogy of wine grape cultivars: "Pinot" is related to "Syrah"*. *Heredity*, 97: 102-110.
- VOUILLAMOZ J.F., MONACO A., COSTANTINI L., STEFANINI M., SCIENZA A., GRANDO M.S., 2007 – *The parentage of "Sangiovese", the most important Italian wine grape*. *Vitis*, 46: 19-22.
- WEISING K., GARDNER R., 1999 – *A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms*. *Genome*, 42: 9-19.
- ZOHARY D., HOPF M., 2000 – *Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe, and the Nile Valley*. Oxford University Press, England.
- ZOHARY D., SPIEGEL-ROY P., 1975 – *Beginnings of fruit growing in the old world*. *Science*, 187: 319-327.

RIASSUNTO - Lo studio dell'origine e della distribuzione della vite è estremamente complicato in quanto è necessario considerare diversi fattori di natura storica, archeologica oltre che dati botanici ed indagini del DNA. In questo lavoro sono state analizzati 580 campioni di vite di cui 193 sono cultivar appartenenti alla sottospecie *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* mentre le rimanenti 387 accessioni sono individui di vite selvatica, *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. Questi campioni sono stati suddivisi in macroaree al fine di poter studiare le relazioni tra le accessioni di vite selvatica e coltivata della medesima area geografica e confrontare la diversità genetica osservata tra le diverse regioni geografiche. L'analisi è stata condotta mediante marcatori microsatelliti di clorooplasto. Due dei 6 loci analizzati

sono risultati polimorfici e hanno permesso di definire 6 diverse forme aplo-tipiche. Dalla distribuzione aplo-tipica si evince che vi è una discontinuità di alcuni tratti genetici sia nelle viti selvatiche che in quelle coltivate. Sulla base della ricchezza aplo-tipica osservata si può pertanto sup-

portare che la vite sia stata domesticata nelle regioni del vicino e medio Oriente, come supportato da dati archeologici, ma che la ricchezza viticola dei paesi del Mediterraneo sia stata incrementata da fenomeni di domesticazione secondaria locale.

## AUTORI

*Francesco de Mattia, Serena Imazio, Dipartimento di Produzione Vegetale, Università di Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano*  
*Ilaria Bruni, Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali – CIRSA, Università di Bologna, Via Sant'Alberto*  
*163, 48100 Ravenna*

*Fabrizio Grassi, Orto Botanico di Cascina Rosa, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano*

*Massimo Labra, Dipartimento di Biologia e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca, Piazza della Scienza 2, 20126 Milano*



## Analisi della variabilità genetica nella specie endemica *Primula apennina* Widmer mediante marcatori molecolari ISSR

L. CONTE, C. COTTI, S. CREMA e G. CRISTOFOLINI

**ABSTRACT** - *Genetic diversity in the rare, endemic species Primula apennina Widmer, detected by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) - Primula apennina Widmer (Primulaceae) is an endangered rhizomatous herb endemic to the North Apennines. Its range is a narrow corridor of approximately 45 km x 5 km between Parma and Reggio Emilia provinces, where P. apennina grows on the mountain tops, mostly in north-facing ledges and sandstone crevices at 1,500-1,800 m a.s.l. ISSR (inter-simple sequence repeat) polymorphism was investigated in six natural populations representing the whole range of the species. The first three primers used identified pronounced levels of genetic variability both at population level and at species level, probably resulting from recent speciation (Pleistocene) and/or outcrossing favoured by floral heteromorphism. A moderate level of genetic differentiation among populations was detected and attributed to both habitat fragmentation and limited gene flow through pollen or seeds (isolation-by-distance). This pattern of differentiation was corroborated by the finding of a positive correlation between inter-plant spatial and genetic distances. Current results point out that the species still maintains relatively high levels of genetic diversity in spite of its extremely small geographic range. Additional studies, evaluating the extent of clonality, would be especially helpful in determining the role of vegetative reproduction on the genetic structure within single populations.*

*Key words:* endemism, genetic diversity, ISSR, *Primula apennina*

### INTRODUZIONE

La variabilità genetica di una specie e la sua distribuzione tra e entro popolazioni è determinata da diversi e complessi fattori. La storia evolutiva a lungo termine di una specie (es.: la frammentazione dell'habitat e l'isolamento geografico e riproduttivo delle popolazioni), le mutazioni, la deriva genetica, i sistemi riproduttivi, il flusso genico, la selezione e i fattori ecologici, possono determinare strutture genetiche complesse all'interno delle popolazioni. Non sempre è possibile prevedere l'entità e la distribuzione della variabilità genetica nelle specie vegetali sulla base dei loro meccanismi riproduttivi e della loro distribuzione geografica: molti esempi di specie endemiche altamente polimorfiche o di specie ampiamente diffuse caratterizzate da bassa variabilità genetica, come anche casi di specie allogame strutturate in popolazioni differenziate, dimostrano che non esistono correlazioni univoche tra ampiezza dell'areale o modalità riproduttive e pattern di variabilità. Non essendo quindi possibile costruire modelli applicabili a priori a tutte le specie, ogni singolo caso dovrebbe essere studiato indipendentemente. I marcatori molecolari forniscono una grande quantità di dati che si sono dimostrati indicatori appropriati nelle indagini sulla biodiversità. Le specie endemiche con areale ristretto sono spesso oggetto di studio in quanto ritenute più

soggette ad andare incontro a perdita di variabilità genetica a causa di fenomeni di deriva genetica. Ottenere informazioni sulla biologia di queste specie e sulla loro variabilità genetica è necessario anche per valutare eventuali misure di protezione e conservazione delle specie stesse e del loro habitat. La specie oggetto del presente studio, *Primula apennina* Widmer, è un'endemita del settore nord-occidentale dell'Appennino Tosco-Emiliano, definita "specie prioritaria" nell'Allegato II della Direttiva Habitat 92/43/CEE e nell'Allegato K dei manuali CORINE (1991); è inoltre segnalata nel Libro Rosso della Flora d'Italia come vulnerabile e definita strettamente protetta dalla Convenzione di Berna (19/09/1979). *P. apennina* è una delle 25 specie appartenenti alla sezione *Auricula* Duby. Questa sezione ha un areale frammentato che comprende tutte le catene montuose dell'Europa meridionale: la Cordigliera Cantabrica, i Pirenei, la Catena Alpina, gli Appennini, i Carpazi, i Monti Tatra e i Balcani. Il centro di diversità genetica della sezione è rappresentato dalla Catena Alpina dove sono presenti 21 delle 25 specie totali; 12 delle quali sono endemiche (ZHANG, KADEREIT, 2004). Le specie appartenenti alla sezione *Auricula* si sono originate e diversificate a partire dal Quaternario (2,3 Ma), in seguito alle

oscillazioni climatiche, caratterizzate dall'alternanza di cicli glaciali e inter-glaciali, che hanno interessato questo periodo geologico (ZHANG *et al.*, 2004). *P. apennina* è una specie orofita mediterranea a distribuzione ristretta; il suo areale copre una superficie che si estende da est a ovest per circa 45 km, dal Monte Prado in provincia di Reggio Emilia al Monte Orsaro in provincia di Parma a quote comprese tra i 1500 e i 1850 metri s.l.m. *P. apennina* è una pianta perenne emicriptofita rosulata, possiede una densa rosetta basale di foglie coriacee obovate e dentellate nella parte apicale, che hanno la caratteristica di possedere peli ghiandolari ialini sulla superficie. I fiori, di colore rosa, sono riuniti in una infiorescenza di 1-20 unità e sono caratterizzati da un'antesi sincrona e di breve durata (circa una settimana) in un periodo compreso tra Maggio e Giugno. *P. apennina* è una specie allogama caratterizzata da distilia: i fiori longistili e quelli brevistili sono generalmente auto-incompatibili. Il dimorfismo florale facilita quindi lo scambio di polline tra individui diversi. *P. apennina* può anche propagarsi vegetativamente attraverso rizomi sotterranei producendo quindi genets costituiti da numerosi ramets.

Lo scopo iniziale della ricerca su *P. apennina* è stato di stimare, attraverso un'analisi molecolare condotta con marcatori ISSR, il livello di variabilità genetica

della specie, verificando se il polimorfismo eventualmente presente sia sufficiente a garantirne la sopravvivenza nonostante l'areale ridotto.

In secondo luogo, considerando che le popolazioni di *P. apennina* sono separate geograficamente tra loro per la presenza di avvallamenti che interrompono per ampi tratti i crinali su cui esse crescono, il successivo obiettivo è stato quello di valutare la diversità genetica entro e tra popolazioni e di riscontrare possibili correlazioni tra la ripartizione della variabilità e fattori esogeni (distribuzione geografica) e endogeni (flusso genico).

#### MATERIALI E METODI

Il campionamento ha coinvolto 120 individui; 20 per ciascuna delle sei popolazioni analizzate (Fig. 1), scelte in modo che tutto l'areale della specie fosse interessato dall'indagine. Il materiale fogliare fresco è stato raccolto, conservato in gel di silice e successivamente liofilizzato. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando la procedura prevista dallo Spin Plant Mini Kit Invisorb (Invitex). Sono stati testati 25 primer di 16-18 nucleotidi (UBC primer set # 9, Biotechnology Laboratory, University of British Columbia). Le reazioni di PCR sono state condotte in volumi di 25  $\mu$ l utilizzando il kit Ready-To-Go

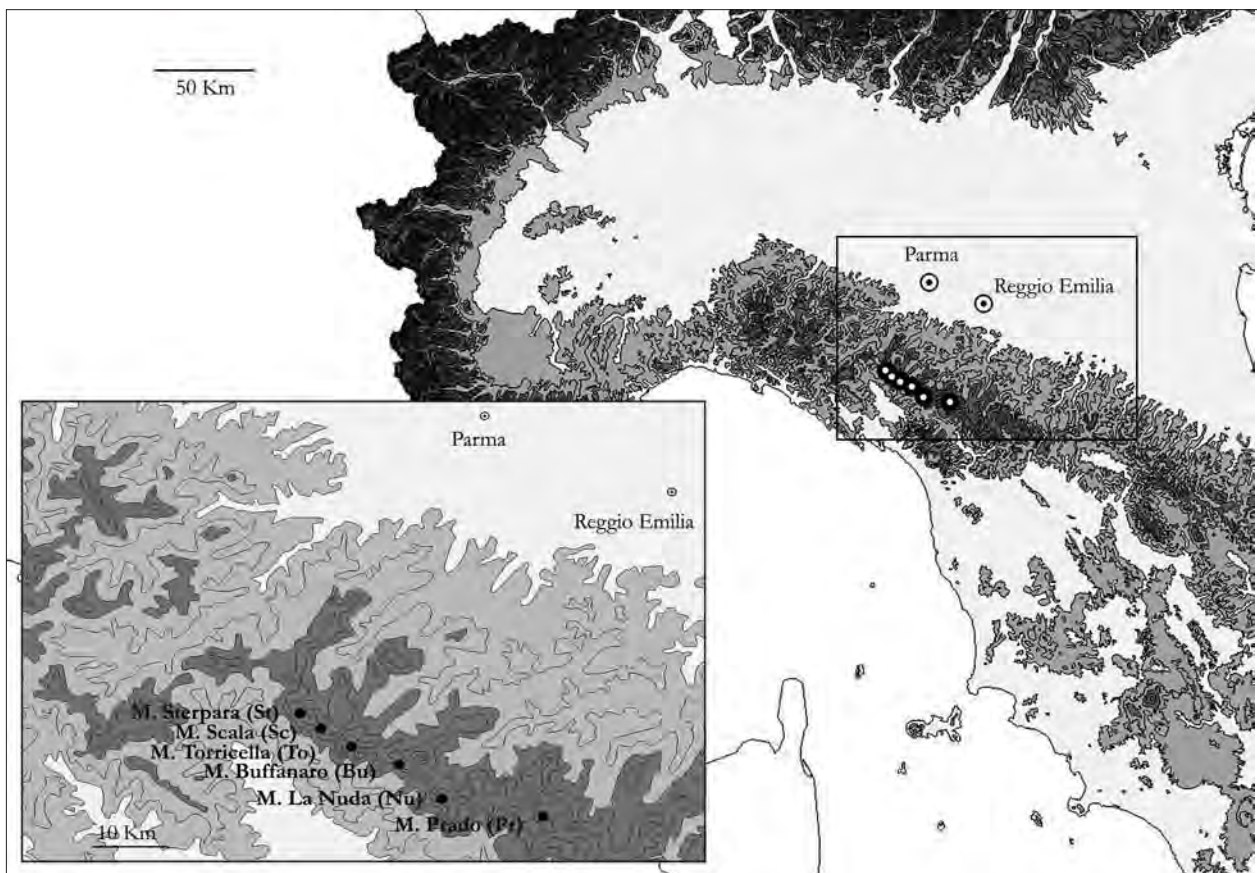


Fig. 1

Distribuzione geografica delle sei popolazioni campionate di *Primula apennina*.  
Geographic distribution of the six *Primula apennina* sampled populations.

PCR Beads (GE Healthcare) e aggiungendo al tubo da reazione, di 0.5 ml, 30 ng di DNA stampo, 40 pM di ogni primer e acqua sterile. Le reazioni di PCR sono state condotte nel termociclatore MJ-MINI (BIO-RAD) con le seguenti condizioni: 5 min a 94 °C, seguiti da 45 cicli di 1 min a 94 °C, 45 s di annealing a 57-59 °C, e 2 min di estensione a 72 °C, più un ciclo di estensione finale di 7 min a 72 °C. I prodotti di amplificazione sono stati evidenziati tramite elettroforesi automatizzata (PhastSystem, GE Healthcare) su minigel di poliacrilammide preconfezionati (PhastGel HD, GE Healthcare) e il pattern elettroforetico di ogni gel è stato analizzato mediante il software TotalLab (Fotodyne Inc.), ottenendo la matrice binaria relativa alla presenza-assenza delle bande. Il software POPGENE32 v. 1.31 (YEH *et al.*, 1999) è stato impiegato per misurare la percentuale di bande polimorfiche (*P*) e valutare la diversità genetica mediante l'indice di informazione di Shannon *I* (LEWONTIN, 1972) e l'indice di diversità genetica di Nei *H* (NEI, 1972), calcolati a livello sia di popolazione (*Ipop*, *Hpop*) che di specie (*Isp*, *Hsp*). Inoltre sono stati misurati il coefficiente di differenziazione genetica ( $G_{ST}$ ) e l'indice di diversità di Shannon  $[(Isp-Ipop)/Isp]$  per valutare le quote di variabilità genetica da attribuire a differenze entro e tra popolazioni, nonché l'identità genetica (*I*) e la distanza genetica (*D*) di Nei (1972) tra tutte le popolazioni. L'analisi cluster UPGMA è stata eseguita sulla matrice delle distanze genetiche di Dice per ottenere il relativo dendrogramma utilizzando il software Paup 4b10 (SWOFFORD, 1996). La matrice binaria è stata sottoposta inoltre a una procedura di ordinamento tramite Analisi delle Componenti Principali (PCA) effettuata a partire dalla matrice di covarianza dal software NTSYSpc v. 2.2 (ROHLF, 1998). Infine il software GenAlEx 6b4 (PEAKALL, SMOUSE, 2006) è stato impiegato per l'analisi della varianza molecolare AMOVA relativa alla ripartizione della variabilità tra ed entro le popolazioni e per il test di Mantel, relativo alla correlazione tra distanze genetiche e distanze geografiche degli individui campionati.

## RISULTATI

I primi tre primer analizzati (Tab. 1) hanno prodotto, in seguito all'amplificazione, 34 loci differenti. La percentuale di loci polimorfici (*P*) assume valori compresi tra 55,88% e 76,47% con una media di 65,69. L'indice di Shannon varia da 0,24 a 0,40 con una media di 0,30 a livello di popolazione (*Ipop*) e assume un valore di 0,42 a livello di specie (*Isp*). La diversità genetica media è 0,20 entro popolazioni (*Hpop*) e 0,27 a livello di specie (*Hsp*) (Tab. 2). Tra le sei popolazioni analizzate quella del M. Torricella presenta il livello più alto di variabilità genetica (*P*: 76,47; *Ipop*: 0,40; *Hpop*: 0,27), mentre la popolazione del Monte Prado presenta quello più basso (*P*: 55,88; *Ipop*: 0,24; *Hpop*: 0,16). Questi valori sono paragonabili a quelli ottenuti per altre specie endemiche congeneri: *P. interjacens* (XUE *et al.*, 2004), *P. ovalifolia* (NAN *et al.*, 2002) e *P. obconica* (NAN *et al.*, 2003).

TABELLA 1

Primer utilizzati per l'amplificazione degli ISSR.  
Primer used for ISSR amplification.

Codice UBC	Sequenza	Temperatura di annealing
807	(AG) <sub>8</sub> T	59 °C
808	(AG) <sub>8</sub> C	57 °C
827	(AC) <sub>8</sub> G	57 °C

TABELLA 2

Variabilità genetica entro popolazioni di *P. apennina* individuata tramite le analisi degli ISSR.  
Genetic variability within populations of *P. apennina* detected by ISSR analyses.

Pop.	<i>P</i> : % di bande polimorfiche	<i>I</i> : indice d'informazione di Shannon	<i>H</i> : Indice di diversità genetica di Nei
Pr	55,88	0,24	0,16
Nu	67,65	0,30	0,19
Bu	67,65	0,33	0,22
To	76,47	0,40	0,27
Sc	61,76	0,25	0,16
St	64,71	0,28	0,18
Media	65,69	0,30 <i>Ipop</i> 0,42 <i>Isp</i>	0,20 <i>Hpop</i> 0,27 <i>Hsp</i>

Il coefficiente di differenziazione genetica tra le popolazioni ( $G_{ST}=0,27$ ) e l'indice di diversità di Shannon  $[(Isp-Ipop)/Isp=0,28]$  assumono valori che concordano con quelli ottenuti con l'AMOVA, che attribuisce il 27% della variabilità totale a differenze tra popolazioni (Fig. 2). L'identità genetica varia da 0,815 a 0,960 con una media di 0,894. La media delle distanze genetiche di Nei è 0,113 con valori che vanno da 0,041 a 0,204 (Tab. 3). Il metodo UPGMA ha prodotto un dendrogramma in cui i 120 individui non formano cluster distinti equivalenti alle diverse popolazioni, ma si raggruppano in due cluster maggiori corrispondenti rispettivamente alle popolazioni orientali (M. Prado, M. Buffanaro, M.



Fig. 2

Analisi della varianza molecolare.  
Analysis of molecular variance.



TABELLA 3

Identità genetica *I* (sopra la diagonale) e distanza genetica *D* (sotto la diagonale) di Nei (1972) tra coppie di popolazioni. Nei's (1972) genetic identity *I* (above diagonal) and distance *D* (below diagonal) between pairs of populations.

Pop.	Pr	Nu	Bu	To	Sc	St
Pr	*	0,917	0,900	0,892	0,815	0,817
Nu	0,087	*	0,947	0,922	0,889	0,866
Bu	0,105	0,054	*	0,888	0,865	0,851
To	0,115	0,081	0,118	*	0,935	0,951
Sc	0,204	0,117	0,145	0,067	*	0,960
St	0,202	0,144	0,161	0,050	0,041	*

La Nuda) e a quelle occidentali (M. Torricella, M. Scala, M. Sterpara). Anche la PCA (Fig. 3) non rileva distinzioni tra le popolazioni sulla base dei dati analizzati fino ad ora. Il test di Mantel (Fig. 4) ha infine evidenziato una correlazione positiva e significativa ( $R_{xy}=0,31$ ;  $P=0,01$ ) tra distanze genetiche e distanze geografiche per gli individui di *P. apennina*.

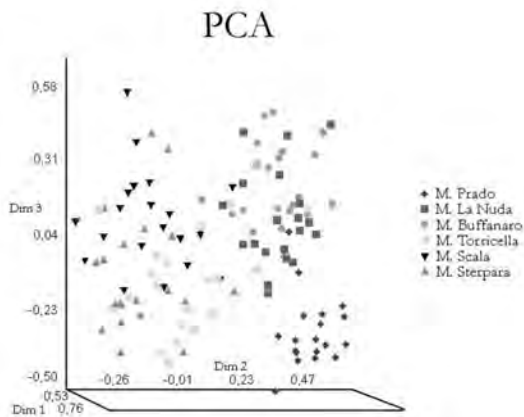


Fig. 3  
Analisi delle Componenti Principali.  
Principal Component Analysis.

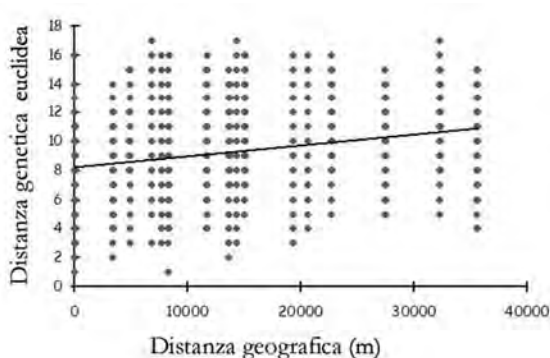


Fig. 4  
Test di Mantel.  
Mantel test.

## DISCUSSIONE

Nonostante *P. apennina* sia una specie ad areale contratto e quindi prevedibilmente sottoposta a deriva genetica, presenta un livello di variabilità intraspecifica moderatamente alto. La sua diversità genetica è infatti paragonabile a quella di altre primule a più ampia diffusione, come *P. ovalifolia* (NAN *et al.*, 2002) e *P. obconica* (NAN *et al.*, 2003). Questo può essere dovuto a fattori quali la recente speciazione avvenuta in seguito alla frammentazione dell'habitat di una specie a più ampia diffusione durante i cicli glaciali ed interglaciali del Pleistocene, o agli alti tassi di allogamia favorita dall'eterostilia che facilita lo scambio di polline tra individui geneticamente diversi, mantenendo un elevato flusso genico. La modesta differenziazione tra le popolazioni potrebbe essere attribuita ad una recente frammentazione dell'areale in conseguenza a cambiamenti climatici recenti e all'influenza delle attività umane. Le previsioni per questa specie sono quindi incoraggianti considerando l'alto tasso di variabilità intraspecifica mantenuta fino ad oggi, tuttavia sarebbe opportuno attuare strategie di protezione delle popolazioni naturali di *P. apennina* allo scopo di preservare tale variabilità.

*Ringraziamenti* - Si ringraziano per la loro disponibilità e le preziose indicazioni il Dr. Willy Reggioni, del Parco Nazionale dell'Appennino Tosco-Emiliano, la Dott.ssa Sonia Aneli, del Parco Regionale dei Cento Laghi, e i gestori del rifugio Mariotti presso il Lago Santo (Reggio Emilia).

## LETTERATURA CITATA

- LEWONTIN R.C. 1972 - *The apportionment of human diversity*. *Evol. Biol.*, 6: 381-398.
- NAN P., PENG S.L., REN H., SHI S.H., TIAN C.J., ZHONG Y., 2002 - *Genetic diversity of Primula ovalifolia from central and southwest China based on ISSR markers*. *J. Genet. Mol. Biol.*, 13: 119-123.
- NAN P., SHI S.H., PENG S.L., TIAN C.J., ZHONG Y., 2003 - *Genetic diversity in Primula obconica (Primulaceae) from central and south-west China as revealed by ISSR markers*. *Ann. Bot. (London)*, 91: 329-333.
- NEI M., 1972 - *Genetic distance between populations*. *Am. Nat.*, 106: 282-292.
- PEAKALL R., SMOUSE P.E., 2006 - *GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. *Mol. Ecol. Not.* 6: 288-295.
- ROHLF F.J., 1998 - *NTSYS-pc 2.0 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Exeter Software, New York.
- SWOFFORD D.L., 1996 - *PAUP\* version 4.0*. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, Massachusetts.
- XUE D.W., GE X.J., HAO G., ZHANG C.Q., 2004 - *High Genetic Diversity in a Rare, Narrowly Endemic Primrose Species: Primula interjacens by ISSR Analysis*. *Acta Bot. Sin.*, 46(10): 1163-1169.
- YEH F.C., YANG R.C., BOYLE T., 1999 - *POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31*. University of Alberta, Edmonton, Canada.
- ZHANG L.B., COMES H.P., KADEREIT J.W., 2004 - *The temporal course of Quaternary diversification in the European high mountain endemic Primula sect. Auricula*

(Primulaceae). Int. J. Plant Sci., 165(1): 191-207.  
ZHANG L.B., KADEREIT J.W., 2004 – *Classification of Primula sect. Auricula (Primulaceae) based on two molecular data sets (ITS, AFLPs), morphology and geographical distribution*. Bot. J. Linn. Soc., 146: 1-26.

RIASSUNTO - *P. apennina* Widmer è una emicriptofita rosulata endemica dei crinali dell'Appennino Tosco-Emiliano. Il suo areale è uno stretto corridoio di 45x5 Km situato tra il Monte Prado, in provincia di Reggio Emilia, e il Monte Orsaro, in provincia di Parma, a quote comprese tra i 1500 e i 1800 metri s.l.m. Su 6 popolazioni naturali di *P. apennina* è stata condotta un'analisi di variabilità molecolare tramite marcatori ISSR. I risultati preliminari ottenuti con i primi 3 primer ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) analizzati fino ad ora hanno rilevato un'elevata variabilità genetica a livello sia di specie che di

popolazione (Indice di Shannon e Indice di Nei), dovuta probabilmente alla speciazione recente (Pleistocene) ed all'allogamia facilitata dall'eterostilia. Il moderato livello di diversità genetica riscontrato invece tra popolazioni ( $G_{ST}$ , AMOVA, UPGMA, PCA) può essere attribuito al flusso genico limitato a causa dell'isolamento geografico e alla propagazione vegetativa attraverso rizomi sotterranei. Questo modello di differenziazione genetica è supportato anche dal test di Mantel che ha riscontrato una correlazione positiva tra distanze genetiche e geografiche. I risultati ottenuti evidenziano quindi che la specie mantiene alti livelli di diversità genetica nonostante il suo areale ridotto. Ulteriori studi, che valutino la quota di propagazione clonale e i meccanismi riproduttivi di *P. apennina*, saranno utili al fine di determinare la struttura e il flusso genetico entro e tra popolazioni.

#### AUTORI

Lucia Conte, Claudia Cotti, Silvia Crema, Giovanni Cristofolini, Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna, Via Irnerio 42, 40126 Bologna

## La poliploidia nel genere *Serapias* (*Orchidaceae*). Evidenze kariologiche e molecolari

F. BELLUSCI, G. PELLEGRINO, A.M. PALERMO e A. MUSACCHIO

**ABSTRACT** - *The polyploidy in the genus Serapias (Orchidaceae). Karyological and molecular evidences* - The occurrence of polyploid *taxa* among the Mediterranean *Orchidinae*, like *Orchis*, *Anacamptis*, *Serapias*, *Ophrys* and *Neotinea* genera, seems to be rare, while is well documented in *Dactylorhiza-Coeloglossum* and *Gymnadenia-Nigritella* clades, typical of the continental Europe. In this contribute, we present the results of molecular and karyological analyses on *Serapias* genus, showing that polyploidy is not confined just to *S. lingua*. The stimulus to find out more karyological information about this genus has been produced by a molecular phylogenetic study, that have pointed out close relationships among *S. lingua* and other endemic *taxa* considered of hybrid origin. The assessment of chromosome number of these *taxa* has revealed that *S. gregaria*, *S. olbia* and *S. strictiflora* are tetraploid. This finding has led to begin new investigations to clarify the origin of polyploid *taxa*, also in light of the likely autopolyploid origin of *S. lingua* by *S. parviflora* suggested by AFLP profiles. In any case, the evolutionary role of polyploidy in *Serapias* and, maybe, in the Mediterranean *Orchidinae* could have been underestimated.

*Key words*: AFLP, DNA plastidiale, numeri cromosomici, *Orchidinae* mediterranee, poliploidia, *Serapias*

### LA POLIPLIPIIDIA NELLE ORCHIDEE MEDITERRANEE

La poliploidia è la condizione in cui gli organismi mostrano tre o più corredi cromosomici completi. La speciazione poliploide è l'origine di nuove specie con un aumento del numero di corredi cromosomici, aumento che può determinare un pressoché immediato isolamento riproduttivo (COYNE, ORR, 2004). Una specie poliploide può derivare dalla duplicazione del corredo cromosomico di una specie (autopoliploidia) o dall'ibridazione di due specie con successivo raddoppio del corredo di ciascuna di esse (alloploidia o poliploidi ibridi). Sebbene sembri più complicata, la speciazione per alloploidia è quella più diffusa in natura ed è stata ormai dimostrata per un elevato numero di specie. Inoltre, anche se più rara e/o più difficile da accertare, è noto che la speciazione ibrida può dare origine anche a nuovi diploidi, detti omoploidi (BUERKLE *et al.*, 2000).

Nelle Angiosperme la poliploidia è un fenomeno ben noto e assai diffuso e varia dal 30-35% (STEBBINS, 1947) all'80% (MASTERSON, 1994), anche se la maggior parte degli autori stima la sua frequenza effettiva intorno al 50% (GRANT, 1981).

La speciazione per poliploidia può verificarsi in tutte le famiglie di Angiosperme, ma in molti casi la documentazione è insufficiente a valutarne adeguatamente la consistenza ed il ruolo evolutivo. In particolare,

le informazioni kariologiche per le orchidee euro-mediterranee, appartenenti in maggioranza alla sottofamiglia delle *Orchidinae*, sono state a lungo scarse perché le orchidee presentano particolari difficoltà tecniche (apici radicali inadatti, piccole dimensioni dei cromosomi) inerenti alla determinazione del numero cromosomico e alla caratterizzazione dei cariotipi (DAKER, 1970). Studi recenti di natura molecolare e kariologica hanno documentato eventi multipli di ibridazione e alloploidia nei cladi *Dactylorhiza-Coeloglossum* e *Gymnadenia-Nigritella* (PRIDGEON *et al.*, 1997), due gruppi largamente diffusi nell'Europa continentale. Di contro, nei più importanti generi a diffusione Mediterranea (*Orchis*, *Anacamptis*, *Serapias*, *Ophrys* e *Neotinea*) sono stati trovati solo *taxa* diploidi, ad eccezione di *Orchis palensis* e *Serapias lingua*. Questo dato, confermato anche per i generi più rappresentativi delle *Orchidinae* cinesi (LUO, 2004), ha suggerito che l'ibridazione e la poliploidizzazione abbiano avuto un ruolo limitato nell'evoluzione delle orchidee Mediterranee. Al riguardo, è interessante notare che la maggior parte di queste orchidee ha un sistema d'impollinazione senza ricompensa, basata su impollinatori aspecifici, ad eccezione del genere *Ophrys* (JERSÁKOVÁ *et al.*, 2006). Dal momento che comunemente più specie vivono in



simpatria, fioriscono nello stesso periodo e condividono gli stessi impollinatori, le opportunità per l'ibridazione sono frequenti. Tuttavia, è stato osservato che nelle zone di contatto prevalgono gli ibridi di prima generazione, di solito sterili, e che le specie mantengono la loro identità genetica grazie a forti barriere postzigotiche (COZZOLINO, WIDMER, 2005).

#### UNA NUOVA PROSPETTIVA FILOGENETICA PER IL GENERE *SERAPIAS*

*Serapias* L. è un genere a diffusione prevalentemente Mediterranea presente dalle Azzorre e dalle Canarie fino al Caucaso, ad est, ed alle isole Britanniche a nord. Come le altre *Orchidinae* euro-asiatiche terrestri, *Serapias* è una geofita perenne che, all'inizio della primavera, produce un corto germoglio vegetativo con poche foglie alternate e uno scapo fiorale avente un'infiorescenza più o meno densa (BAUMANN, KÜNKELE, 1989).

Le specie appartenenti a questo genere si distinguono per la tipica struttura del fiore, in cui le brattee sono dello stesso colore dei sepalì (entrambi con nervature scure), i sepalì lanceolati coalescenti ai bordi nascondono i due petalì (casco), il labello è rivolto verso il basso, diviso in ipochilo ed epichilo con due (o una in *S. lingua*) callosità alla base, lo sperone è assente, il retinacolo e la borsicola sono unici. I sepalì, i petalì e i lobi laterali dell'ipochilo formano un condotto tubolare (GRÜNANGER, 2001; DELFORGE, 2006).

La strategia d'impollinazione di *Serapias* è interessante poiché i fiori non producono nettare, ma attraggono gli insetti offrendo loro un rifugio, che può essere anche scambiato per un nido in cui deporre le uova (DAFNI *et al.*, 1981). Le differenze nella forma, diametro e profondità del tubo fiorale potrebbero rappresentare una barriera riproduttiva prezigotica e sarebbero responsabili del mantenimento dell'integrità delle specie (BAUMANN, KÜNKELE, 1989).

Al genere appartengono specie con corredo cromosomico generalmente diploide  $2n = 36$ , tranne *S. lingua* che è tetraploide con  $2n = 72$  (D'EMERICO *et al.*, 2000). Tutte si riproducono per via sessuata ad eccezione di *S. parviflora* in cui si riscontra un'autogamia facoltativa.

Studi molecolari basati sugli spaziatori interni non trascritti (ITS) del DNA ribosomale hanno supportato la monofilia del genere *Serapias*, ma non hanno risolto le relazioni filogenetiche tra le specie esaminate, suggerendo una loro origine recente (PRIDGEON *et al.*, 1997; BATEMAN *et al.*, 2003).

Nell'ambito degli studi sul genere *Serapias*, che il nostro gruppo di ricerca sta conducendo da alcuni anni, l'uso di sequenze plastidiali non codificanti ha consentito di ottenere l'analisi filogenetica di 14 specie rappresentative della variabilità complessiva del genere (BELLUSCI *et al.*, 2008) (Fig. 1). I risultati di questo studio sostengono fortemente la ripartizione del genere *Serapias* in due cladi principali, ciascuno dei quali include a sua volta due gruppi minori. In ciascuno di essi è presente una specie ad ampia distribuzione, ovvero *S. parviflora*, *S. lingua*, *S. vomera-*

*cea* e *S. cordigera*, e poche specie rare e/o endemiche ristrette. Con l'eccezione di *S. politisii*, le relazioni filogenetiche tra le specie nei gruppi sono totalmente risolte (BELLUSCI *et al.*, 2008) (Fig. 1).

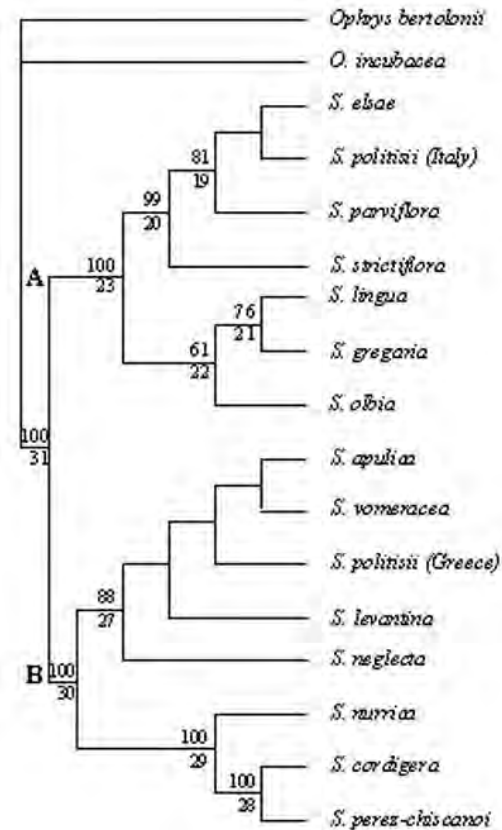


Fig. 1

Albero di massima parsimonia basato sulle sequenze del DNA plastidiale di 14 specie del genere *Serapias*. I due cladi principali sono indicati con A e B. Il numero di step e le percentuali di bootstrap sono riportate, rispettivamente, sotto e sopra i bracci.

Most parsimonious tree obtained based on cpDNA sequences of 14 *Serapias* species. Two main clades are denoted as A and B. Numbers of steps and bootstrap percentages are shown below and above branches, respectively.

Nel complesso, le relazioni filogenetiche da noi evidenziate mostrano alcune rilevanti differenze rispetto ai trattamenti tassonomici finora noti basati esclusivamente sulla morfologia dei tratti fiorali (BAUMANN, KÜNKELE, 1989; DELFORGE, 2006) suggerendo una nuova interpretazione delle relazioni evolutive tra le specie di *Serapias*.

I dati molecolari, infatti, suggeriscono che la ripartizione del genere *Serapias* in due sezioni sulla base della morfologia del callo posto alla base dell'ipochilo, come proposto da BAUMANN, KÜNKELE (1989), è chiaramente artificiosa. Infatti, *S. lingua* non è una specie isolata, ma, al contrario, strettamente affine a *S. gregaria* e *S. olbia*, due specie rare endemiche della regione di Var e delle Alpi Marittime (Francia).

Inoltre, *S. strictiflora* e *S. elsaе*, due endemismi delle coste NO dell'Africa e del sud della Spagna, si mostrano affini a *S. parviflora* e non a *S. lingua* come proposto da DELFORGE (2006). L'analisi molecolare ha evidenziato, ancora, una relazione finora insospettata tra *S. cordigera*, *S. perez-chiscanoi* e *S. nurrica*, e ha chiarito che il gruppo di *S. vomeracea* include entità poco divergenti che anche in passato sono state poste in sinonimia (GRÜNANGER, 2001).

Tuttavia, se si considera la composizione dei due gruppi principali ottenuti dalle analisi molecolari, si nota che le specie del gruppo A erano state poste da DELFORGE (2006) nei gruppi di *S. lingua* e *S. parviflora*, mentre le specie del gruppo B, con l'eccezione di *S. nurrica*, erano state incluse nel gruppo di *S. vomeracea*. Di conseguenza, esiste una corrispondenza tra la dimensione media dei caratteri fiorali e la variazione molecolare, e quindi le specie del gruppo A sono caratterizzate da fiori con tratti diagnostici dalle dimensioni minori, che chiameremo "piccoli", mentre le specie del gruppo B sono quelle con tratti fiorali dalle dimensioni maggiori, che chiameremo "grandi" (Fig. 1). L'individuazione di questa corrispondenza suggerisce che la variazione delle dimensioni fiorali e, quindi, i meccanismi d'isolamento florale possono avere avuto un ruolo decisivo al momento della divergenza dei gruppi principali. La presenza nel gruppo con fiori piccoli di *S. parviflora*, che è specie autogama, rende plausibile l'ipotesi che una riduzione del fiore può essersi verificata proprio in concomitanza dell'acquisizione di questo tipo di riproduzione sessuata. Infatti, è stato documentato che in varie famiglie di Angiosperme (ELLE, CARNEY, 2003 e referenze ivi riportate), comprese le *Orchidaceae* (RICHARDS, 1982), *taxa* autogami hanno fiori di dimensioni ridotte rispetto ai *taxa* affini con riproduzione allogama. Di contro, la speciazione avvenuta in ciascun sottogruppo potrebbe essere stata guidata anche da meccanismi diversi dall'isolamento florale, dal momento che questi comprendono specie i cui fiori presentano sovrapposizione delle variazioni delle dimensioni dei tratti fiorali (PELLEGRINO *et al.*, 2007).

Pertanto, l'individuazione di un'affinità filogenetica tra *S. lingua* ed altre specie a fiori piccoli ci ha indotto ad approfondire le conoscenze cariologiche del genere *Serapias*.

#### INDAGINI CARIOLOGICHE

La filogenesi molecolare del genere *Serapias* ha evidenziato che la tetraploide *S. lingua* è inclusa nel gruppo delle specie a fiori piccoli, le quali potrebbero essersi differenziate in seguito all'acquisizione di autogamia, una condizione che favorisce l'insorgenza di poliploidia (RAMSEY, SCHEMSKE, 1998). Inoltre, *S. lingua* è strettamente affine a due specie endemiche, *S. gregaria* e *S. olbia*, che DELFORGE (2006) ritiene di probabile origine ibrida (e quindi potenzialmente poliploidi) o con un'apparente contraddizione di tipo primitivo. Recentemente, VENHUIS *et al.* (2007) hanno utilizzato misure citofluorometriche per valu-

tare il livello di ploidia di alcune specie di *Serapias* ed evidenziando che *S. olbia* potrebbe essere esaploide. Attualmente, sul genere *Serapias* sono disponibili informazioni cariologiche su un ridotto numero di specie (Tab. 1), delle quali *S. lingua* ( $2n = 4x = 72$ ), *S. parviflora* e *S. politisii* ( $2n = 2x = 36$ ) appartengono al gruppo delle *Serapias* a fiori piccoli.

TABELLA 1

Informazioni cariologiche delle specie del genere *Serapias*.  
Karyological knowledge of *Serapias* species.

Specie	2n
<i>S. parviflora</i> Parl.	36
<i>S. politisii</i> Renz	36
<i>S. nurrica</i> Corrias	36
<i>S. bergonii</i> E.G. Camus	36
<i>S. vomeracea</i> (Burm.) Briq.	36
<i>S. perez-chiscanoi</i> Acedo	36
<i>S. orientalis</i> (Greuter) Baumann & Künkele	36
<i>S. apulica</i> (Baumann & Künkele) Delforge	36
<i>S. neglecta</i> De Notaris	36
<i>S. cordigera</i> L.	36
<i>S. levantina</i> Baumann & Künkele	?
<i>S. feldwegiana</i> Baumann & Künkele	?
<i>S. patmia</i> Hirth & Spaeth	?
<i>S. aphroditae</i> Delforge	?
<i>S. carica</i> Delforge	?
<i>S. cycladum</i> Baumann & Künkele	?
<i>S. istriaca</i> M. L. Perko	?
<i>S. ionica</i> E. Nelson ex Baumann & Künkele	?
<i>S. atlantica</i> D. Rückbrodt & U. Rückbrodt	?
<i>S. lorenziana</i> Baumann & Künkele	?
<i>S. cossyrensis</i> B. Baumann & H. Baumann	?
<i>S. lingua</i> L.	72
<i>S. olbia</i> Verguin	?
<i>S. gregaria</i> Godfery	?
<i>S. strictiflora</i> Welwitsch ex Veiga	?
<i>S. elsaе</i> Delforge	?

Pertanto, il nostro scopo è stato quello di ampliare le conoscenze cariologiche del genere, con particolare attenzione alle specie del gruppo di *Serapias* a fiori piccoli. A tal fine, sono stati raccolti in campo ovari immaturi da più esemplari di *S. olbia*, *S. gregaria* e *S. strictiflora*. Tutte e tre le specie sono tetraploidi con numero cromosomico  $2n = 72$ . I dettagli di quest'indagine cariologica sono oggetto di un lavoro sottoposto per la pubblicazione. Questi risultati sono del tutto in contrasto con quanto proposto da VENHUIS *et al.* (2007) per le stesse specie. Questi autori, stimando il contenuto di DNA, hanno dedotto che *S. gregaria* e *S. strictiflora* sono diploidi e che *S. olbia* è un esaploide con  $2n = 108$ . Riteniamo si possa confermare l'opinione di quegli autori che hanno sostenuto che la metodica citofluorometrica non è un sicuro indicatore del livello di ploidia, che può essere

determinato solo dalla conta cromosomica (YEATER *et al.*, 2004; LEONG-, KORNÍČKOVÁ, *et al.* 2007).

Pertanto ora sappiamo che la poliploidia caratterizza 4 delle 6 specie del gruppo delle *Serapias* a fiori piccoli, e di conseguenza possiamo affermare che la poliploidia nell'ambito delle *Orchidinae* non è una prerogativa dei gruppi *Dactylorhiza-Coeloglossum* e *Gymnadenia-Nigritella* (PRIDGEON *et al.*, 1997), ma è diffusa anche nel genere *Serapias* non ancora del tutto esaminato in tal senso.

Inoltre, l'esame della letteratura disponibile ha consentito ad AMICH *et al.* (2007) di evidenziare il ruolo della poliploidia nell'evoluzione delle orchidee della Penisola Iberica maggiore di quanto finora supposto. Infine, la poliploidia, sicuramente importante non solo nel genere *Dactylorhiza* ma anche in *Epipactis* e *Ophrys*, è stata segnalata, seppure in modo sporadico, anche in *Orchis* (D'EMERICO, 2001, AMICH *et al.*, 2007) e in *Anacamptis* (DEL PRETE *et al.*, 1991).

#### ANALISI AFLP

Per esaminare problematiche a livello di popolazione e fenomeni di ibridazione in *Serapias* il nostro gruppo ha anche sviluppato indagini con marcatori neutri altamente variabili, quali gli AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*).

Con questo metodo sono state esaminate 6 specie, di cui quattro a maggiore distribuzione (*S. vomeracea*, *S. cordigera*, *S. parviflora* e *S. lingua*) e due endemismi pugliesi (*S. apulica* e *S. politisii*). I 118 loci ottenuti hanno evidenziato un polimorfismo variabile dal 44,9 % al 77,9%, ma non sono state riscontrate bande esclusive per nessuna specie (BELLUSCI, 2006). L'AMOVA ha mostrato che la variabilità tra le specie è ripartita per il 32% tra le specie e per il rimanente (68%) nelle specie. L'albero ottenuto con il metodo del Neighbor-joining separa adeguatamente le specie esaminate fatta eccezione per *S. lingua*/*S. parviflora*, i cui individui si mescolano in un distinto clado. Allo stesso modo le due specie hanno formato un unico gruppo nel fenogramma prodotto dall'Analisi delle Componenti Principali (PCoA) (BELLUSCI, 2006) (Fig. 2).

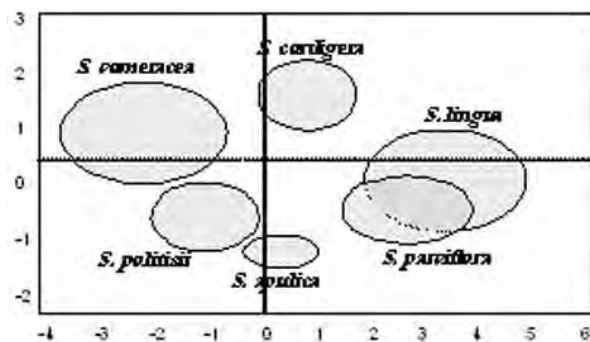


Fig. 2

Analisi delle componenti principali (PCoA) ottenuta per sei specie del genere *Serapias*.  
PCoA of six species of *Serapias* genus.

In generale, le analisi AFLP possono essere utili in quei casi in cui la variabilità molecolare di sequenze nucleari non è sufficiente a distinguere tra le specie. Nelle *Orchideae*, gli AFLP sono state utilmente applicati per rivelare dettagli della evoluzione della poliploidia nel genere *Dactylorhiza* (HEDRÉN *et al.*, 2001). In particolare, questi autori hanno ottenuto un fenogramma della PCoA nel quale i *taxa* tetraploidi di origine allopoliploide, derivati da ibridazione tra *taxa* diploidi di *D. incarnata* s.l. e *D. maculata* s.l., si posizionano tra i due gruppi parentali, mentre i campioni del gruppo di *D. maculata* s.l., comprendente la diploide *D. maculata* subsp. *fuchsii* e la tetraploide *D. maculata* subsp. *maculata*, formano un unico gruppo, a conferma della supposta origine autoploiploide della subsp. *maculata*.

Pertanto, dal momento che le nostre analisi hanno fornito un fenogramma conforme a quello ottenuto da HEDRÉN *et al.* (2001) per il gruppo di *D. maculata*, riteniamo che sia ragionevole sostenere che *S. lingua* è un autoploiploide derivato da *S. parviflora* o da una specie diploide a fiori piccoli antenata di entrambe. D'altro canto, un'affinità tra le due specie era stata proposta in precedenza in base ad analisi carilogiche che avevano evidenziato una chiara somiglianza dei cariotipi (D'EMERICO *et al.*, 2000). Un aspetto interessante è che, al contrario di quanto accade per altre orchidee di origine poliploide, *S. lingua* non occupa un areale diverso da quello di *S. parviflora*, con la quale vive spesso in simpatria e condivide il medesimo habitat.

L'origine di *S. lingua* da *S. parviflora* sarebbe molto verosimile se la prima fosse l'unica specie tetraploide del genere, così come comunemente ritenuto finora. Invece, alla luce delle nuove conoscenze sull'esistenza di altre specie tetraploidi si ritiene opportuno ed interessante estendere l'analisi AFLP ed altri eventuali approcci metodologici a tutti i *taxa* poliploidi per valutare la loro origine auto- o allopoliploide così da definirne meglio l'evoluzione della poliploidia nel genere *Serapias*. In ogni caso, quest'ultimo fenomeno ha certamente avuto un ruolo non secondario nella speciazione di questa orchidea Mediterranea.

#### LETTERATURA CITATA

- AMICH F., GARCÍA-BARRIUSO M., BERNARDOS S., 2007 – *Polyploidy and speciation in the orchid flora of the Iberian Peninsula*. Bot. Helv., 117: 143-157.
- BATEMAN R.M., HOLLINGSWORTH P.M., PRESTON J., YI-BO L., PRIDGEON A.M., CHASE M.W., 2003 – *Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae)*. Biol. J. Linn. Soc., 142: 1-40.
- BAUMANN H., KÜNKELE S., 1989 - *Die Gattung Serapias L. - eine taxonomische übersicht. Mitteilungsblatt Beiträge zur Erhaltung Erforschung heimischer Orchideen*, 21: 701-946.
- BELLUSCI F., 2006 – *Filogenesi e processi speciativi in Orchidee Mediterranee non nettariofero del genere Serapias L. (Orchidaceae)*. Tesi di dottorato.
- BELLUSCI F., PELLEGRINO G., PALERMO A.M., MUSACCHIO A., 2008 – *Phylogenetic relationships in the orchid genus Serapias L. based on non-coding regions of*



- the chloroplast genome. Mol. Phylogenet. Evol. (in stampa).
- BUERKLE A.C., MORRIS R.J., ASMUSSEN M.A., RIESEBERG L.H., 2000 – *The likelihood of homoploid hybrid speciation*. Heredity, 84: 441-451.
- COYNE J.A., ORR. H.A., 2004 – *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- COZZOLINO S., WIDMER A., 2005 – *The evolutionary basis of reproductive isolation in Mediterranean orchids*. Taxon, 54: 977-985.
- DAFNI A., IVRI Y., BRANTJES N.B.M., 1981 – *Pollination of Serapias vomeracea Briq. (Orch.) by imitation of holes for sleeping solitary male bees (Hym.)*. Acta Bot. Neerl., 30: 69-73.
- DAKER M. G., 1970 – *The Chromosome numbers of orchids: IV: Bulbophyllinae Schltr.* Kew Bulletin, 24: 179-184.
- D'EMERICO S., 2001 – *Tribe Orchideae cytogenetics*. In: PRIDGEON A.M., CRIBB P.J., CHASE M.W., RASMUSSEN F.N. (Eds.), *Genera Orchidacearum. 1. Orchidoideae. vol. 2*: 216-224. Oxford University Press.
- D'EMERICO S., PIGNONE D., SCRUGLI A., 2000 – *Giemsa C-banded karyotypes in Serapias L. (Orchidaceae)*. Bot. J. Linn. Soc., 133: 485-492.
- DELFORGE P., 2006 – *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East*. Timber Press Inc., Oregon, USA.
- DEL PRETE C., MAZZOLA P., MICELI P., 1991 – *Karyological differentiation and speciation in C. Mediterranean Anacamptis (Orchidaceae)*. Plant Syst. Evol., 174: 115-123.
- ELLE E., CARNEY R., 2003 – *Reproductive assurance varies with flower size in Collinsia parviflora (Scrophulariaceae)*. Am. J. Bot., 90: 888-896.
- GRANT V., 1981 – *Plant speciation*. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- GRÜNANGER P., 2001 – *Orchidaceae d'Italia*. Quad. Bot. Ambientale Appl., 11: 3-80.
- HEDRÉN M., FAY M.F., CHASE M.W., 2001 – *Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in Dactylorhiza (Orchidaceae)*. Am. J. Bot., 88: 1868-1880.
- JERŠÁKOVÁ, J., JOHNSON, S.D., KINDLMANN, P., 2006 – *Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids*. Biol. Rev., 81: 219-235.
- LEONG-ŠKORNIČKOVÁ J., ŠÍDA O., JAROLÍMOVÁ V., SABU M., FÉR T., TRÁVNÍČEK P., SUDA J., 2007 – *Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of Curcuma (Zingiberaceae)*. Ann. Bot. (London), 100: 505-526.
- LUO Y. B., 2004 – *Cytological studies on some representative species of the tribe Orchideae (Orchidaceae) from China*. Bot. J. Linn. Soc., 145: 231-238.
- MASTERTSON J., 1994 – *Stomatal size in fossil plants - evidence for polyploidy in majority of angiosperms*. Science, 264: 421-424.
- PELLEGRINO G., PALERMO A.M., NOCE M.E., BELLUSCI F., MUSACCHIO A., 2007 – *Genetic population structure in the Mediterranean Serapias vomeracea, a nonrewarding orchid group. Interplay of pollination strategy and stochastic forces?* Plant Syst. Evol., 263: 145-157.
- PRIDGEON A.M., BATEMAN R.M., COX A.V., HAPPEMAN J.R., CHASE M.W., 1997 – *Phylogenetics of Subtribe Orchidoideae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences 1. Intergeneric relationships and polyphyly of Orchis sensu lato*. Lindleyana, 12: 89-109.
- RAMSEY J., SCHEMSKE D.W., 1998 – *Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants*. Annu. Rev. Ecol. Syst., 29: 477-501.
- RICHARDS A.J., 1982 – *The influence of minor structural changes in the flower on breeding system and speciation in Epipactis Zinn (Orchidaceae)*. In: ARMSTRONG J.A., POWELL J.M., RICHARDS A.J. (Eds.), *Pollination and Evolution*: 47-53. Royal Bot. Gard., Sydney.
- STEBBINS G.L., 1947 – *Types of polyploids, their classification and significance*. Adv. Genet., 1: 403-429.
- VENHUIS C., VENHUIS P., OOSTERMEIJER J.G.B., VAN TIENDEREN P.H., 2007 – *Morphological systematics of Serapias L. (Orchidaceae) in Southwest Europe*. Plant Syst. Evol., 265: 165-177.
- YEATER K.M., BOLLERO G.A., BULLOCK D.G., RAYBURN A.L., 2004 – *Flow cytometric analysis for ploidy level differentiation of 45 hairy vetch accessions*. Ann. Appl. Biol., 145: 123-127.

RIASSUNTO - La presenza di taxa poliploidi tra le *Orchidinae* Mediterranee, quali *Orchis*, *Anacamptis*, *Serapias*, *Ophrys* e *Neotinea*, è considerata, al momento, sporadica, mentre ben documentata è la poliploidia nei gruppi *Dactylorhiza-Coeloglossum* e *Gymnadenia-Nigritella* tipici dell'Europa continentale. In questo contributo sono riepilogati i risultati di ricerche molecolari e citologiche che hanno portato alla scoperta, nel genere *Serapias*, di una poliploidia non limitata alla sola *S. lingua*. Lo stimolo ad ampliare le conoscenze citologiche all'interno di questo genere è venuto da uno studio filogenetico, che ha evidenziato strette affinità tra *S. lingua* e altri taxa endemici ritenuti di origine ibrida. La determinazione del numero cromosomico di tali specie ha rilevato che *S. gregaria*, *S. olbia* e *S. strictiflora* sono tetraploidi. Questo risultato suggerisce che nuove indagini potrebbero chiarire le origini dei taxa poliploidi di *Serapias*, giacché i profili AFLP sinora analizzati hanno già mostrato che *S. lingua* potrebbe essere una specie autopoliploide di *S. parviflora*. In ogni caso, il ruolo evolutivo della poliploidia in *Serapias* e, forse, nelle *Orchidinae* mediterranee è stato finora sottostimato.

## AUTORI

Francesca Bellusci, Giuseppe Pellegrino, Anna Maria Palermo, Aldo Musacchio, Dipartimento di Ecologia, Università della Calabria, Via Bucci 6/B, 87036 Arcavacata di Rende (Cosenza), e-mail aldo.musacchio@unical.it

## Analisi filogenetica del genere *Genista* L.: risultati preliminari da quattro marcatori molecolari

M. REGA, G. CRISTOFOLINI e P. CAPUTO

**ABSTRACT** - *Phylogenetic analysis on genus Genista L.: preliminary results from four DNA markers* - *Genista* L. is a large genus of spiny and harmless shrubs centred in the Mediterranean region. Relationships among the major clades of this genus are a long debated subject, and the subdivision in three subgenera has often been questioned. Phylogenetic relationships on 35 OTUs of *Genista* and related genera were assessed by the maximum parsimony analysis of sequences of the nrDNA internal transcribed spacers (ITS regions), and three cpDNA regions: *trnL* intron, *trnL-trnF* intergenic spacer and *trnS-trnG* intergenic spacer. Results would suggest that subgenera *Phyllobotrys* and *Genista*, as well as sect. *Spartocarpus* of subg. *Spartocarpus* are separate monophyletic units, the latter of which is basal in *Genista s.l.* Various satellite genera appear to be included in the monophylum to which all species of *Genista* belong. On the basis of the results, an evolutionary sketch is outlined. Possibly, the difficulties in unravelling phylogeny in the genistoid complex are related to the presence of morphological autapomorphies of various terminal *taxa* which prevented the understanding of relationships.

*Key words:* Fabaceae, *Genista*, molecular phylogeny

### INTRODUZIONE

Il genere *Genista* L. (*Fabaceae*) è distribuito prevalentemente nell'area circum-mediterranea, estendendosi fino all'Europa settentrionale, ed ha il limite orientale del suo areale in Russia. Il centro principale di differenziazione è la penisola Iberica, mentre l'area balcanica si presenta come un centro secondario (GIBBS, 1966). Nell'ultima monografia disponibile per il genere, GIBBS (1966) indica approssimativamente 70 specie ma, a tutt'oggi, sono state descritte oltre 100 entità (VALSECCHI, 1993). La suddivisione infragenerica fu stabilita da SPACH (1844, 1845) e successivamente modificata da GIBBS (1966) che, pur trasferendo varie specie in generi correlati, accettò la suddivisione in tre sottogeneri: *Genista*, *Spartocarpus* Spach, and *Phyllobotrys* Spach.

*Genista* subgen. *Genista* è diffuso ampiamente in tutto l'areale geografico del genere; *Genista* subgen. *Phyllobotrys* è presente nella parte occidentale della penisola iberica e in Nord Africa; *Genista* subgen. *Spartocarpus* è tipicamente circum-mediterraneo e presenta un'alta diversità in specie nella penisola balcanica e nel versante nord-occidentale dell'Africa (Marocco e Algeria).

Per quanto riguarda il riconoscimento delle specie, il tipo di ramificazione è un tratto fondamentale per discriminare tra i tre sottogeneri (GIBBS, 1966); la forma delle foglie ed il tipo di infiorescenza sono anch'essi caratteri discriminanti.

Negli ultimi anni sono stati prodotti numerosi con-

tributi sia sulla filogenesi del genere *Genista* e generi correlati, sia sulle *Cytiseae s.l.* Queste ricerche hanno permesso una migliore comprensione delle relazioni tra questi gruppi, utilizzando sia metodiche "classiche" che tecniche molecolari (CRISTOFOLINI *et al.*, 1977; CRISTOFOLINI *et al.*, 1984; KÄSS, WINK, 1997; CUBAS *et al.*, 1998; PERCY, CRONK, 2002; CRISTOFOLINI, CONTE, 2002; CUBAS *et al.*, 2002; DE CASTRO *et al.*, 2002; PARDO *et al.*, 2004).

In particolare, il contributo di PARDO *et al.* (2004) è di immenso aiuto nella comprensione della filogenesi delle specie genistoidi, specialmente per quanto attiene alle relazioni tra *Genista s. s.* ed i generi ad esso correlati; tuttavia, dato l'elevato numero di *taxa* e di caratteri impiegati in questo contributo, l'analisi filogenetica presenta un elevato numero di cladogrammi ad uguale parsimonia, oltre ad incongruenze nelle relazioni tra i sottogeneri; appunto per questo le relazioni tra i cladi principali del genere *Genista* sono state sempre oggetto di discussione, e la stessa suddivisione in tre sottogeneri è stata spesso messa in dubbio.

In questo contributo vengono presentati risultati preliminari dell'analisi filogenetica su *Genista* e generi correlati, ottenuti da un'espansione dei dati riportati da PARDO *et al.* (2004). In particolare, alle sequenze da loro impiegate sono state aggiunte due regioni di DNA plastidiale (l'introne *trnL* e lo spaziatore intergenico *trnS-trnG*).

## MATERIALI E METODI

La selezione dei *taxa* è stata effettuata in maniera tale da costituire una rappresentazione di tutta la variabilità all'interno del genere *Genista*, generi correlati e probabili outgroup. Sono state infatti globalmente impiegate oltre 200 OTUs (Operational Taxonomic Units) per gli ITS e oltre cento OTUs per l'introne del *trnL* del DNA plastidiale. Nelle indagini preliminari qui riportate riferiamo dei risultati ottenuti dalle analisi condotte su 35 OTUs utilizzando quattro marcatori molecolari, uno di origine nucleare (ITS) e tre regioni del DNA plastidiale (introne del *trnL*, spaziatore intergenico *trnL-trnF* e spaziatore intergenico *trnS-trnG*).

La scelta dei *taxa* impiegati in queste ultime analisi presenta almeno una OTU per ciascuna sezione. A questo scopo sono state prodotte o ottenute da letteratura sequenze per diversi *taxa* outgroup [*Adenocarpus anagyriifolius* Cosson & Bal., *Anagyris foetida* L., *Argyrocystis battandieri* (Maire) C. Raynaud, *Cytisus albidus* DC. and *Cytisus lanigerus* (Desf.) DC.] e per le seguenti specie appartenenti al genere *Genista*: *G. anglica* L., *G. carpetana* Lesesche ex Lange, *G. cilenitina* Valsecchi, *G. cinerascens* Lange, *G. cinerea* Vill., *G. falcata* Brot., *G. germanica* L., *G. hirsuta* M. Vahl, *G. hispanica* L., *G. januensis* Viv., *G. legionensis* (Pau) P. Gibbs, *G. linifolia* L., *G. majorica* Cantò et Sanchez, *G. microcephala* Cosson, *G. obtusiramea* Gay ex Spach, *G. pilosa* L., *G. pumila* (Debeaux et Reverchon) Vierh., *G. ramosissima* (Desf.) Poir., Del Arco, *G. sagittalis* L., *G. scorpius* (L.) DC., *G. sericea* Wulfen, *G. spartioides* Spach, *G. sylvestris* Scop., *G. tinctoria* L., *G. umbellata* (Desf.) Poir., *G. valdes-bermejoi* Talavera et Saez.

Sono state inoltre impiegate sequenze di specie una volta ricomprese all'interno di generi considerati affini a *Genista* ma che, in base a lavori recenti, sono state incluse all'interno del genere o delle quali quantomeno è stata ipotizzata l'inclusione (ad esempio *Retama* Rafin., *Spartium* L., *Stauracanthus* Link, *Ulex* L.).

Il DNA totale è stato estratto seguendo il metodo descritto in DE CASTRO *et al.* (2002), ed amplificato secondo le condizioni descritte in ACETO *et al.* (1999). I primer impiegati per gli ITS sono quelli riportati in ACETO *et al.* (1999); mentre l'introne *trnL*<sup>(UAA)</sup> e lo spaziatore intergenico (IGS) *trnL-trnF* sono stati amplificati utilizzando i primer descritti in TABERLET *et al.* (1991). I *TrnS-trnG* IGS sono stati amplificati utilizzando la seguente coppia di primer: TRNSf: 5'-GGAAAGAGAGGGATTTCGAAC-3' and TRNGr: 5'-TACCACTAAACTATACCCGC-3'.

Gli amplificati sono stati dapprima purificati e successivamente sottoposti a sequenziamento in entrambe le direzioni impiegando un sequenziatore automatico 373A Applied Biosystems Automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.).

Gli allineamenti sono stati effettuati utilizzando il software Clustal W ver. 1.83 (THOMPSON *et al.*, 1994) con i parametri base del programma, e successivamente sottoposti ad ispezione visiva per correggere la disposizione dei gap, mirando alla loro riduzione.

Le matrici per ITS, introne del *trnL*, spaziatori *trnL-trnF* e *trnS-trnG* sono state successivamente unite in una matrice combinata di 35 *taxa*; per preparare questa matrice sono state utilizzate OTUs per le quali erano disponibili almeno tre delle quattro regioni sequenziate. La regione non disponibile per alcune delle OTUs impiegate (che nella maggior parte dei casi è quella dello spaziatore *trnS-trnG*) è stata codificata come "sconosciuta" per quel marcatore.

La matrice combinata è stata sottoposta ad una analisi a Massima Parsimonia (MP), utilizzando il software T.N.T. (GOLOBOFF *et al.*, 2003), con un "tree-space" di almeno 10.000 alberi, 100 repliche, 100 alberi per replicazione. Quest'ultimo software è stato impiegato anche per calcolare l'indice di decadimento dei cladi (BREMER, 1994).

## RISULTATI

La matrice combinata ha una lunghezza di consenso di 2219 caratteri (1937 dei quali non informativi). L'analisi cladistica ha prodotto 2 cladogrammi MP (L=1400, C.I.=0.68, R.I.=0.52; rimuovendo i caratteri non informativi, L=831, C.I.=0.47, R.I.=0.52), il consenso stretto dei quali è mostrato in Fig. 1. In questo cladogramma l'ingroup si divide in due cladi principali. Il gruppo monofiletico basale include le specie afferenti a *Genista* e appartenenti alla sect. *Spartocarpus* subgen. *Spartocarpus* (*G. spartioides*, *G. valdes-bermejoi* e *G. cilenitina*). Questo clado è sister group di *Spartium junceum*. L'altro clado principale dell'ingroup si divide in due gruppi monofiletici, uno dei quali include *Retama monosperma* (L.) Boiss. alla sua base, ed un clado con *G. umbellata* (sect. *Cephalospartum* subg. *Spartocarpus*), *Stauracanthus boivinii* (Webb) Samp e *Ulex europaeus* L. Questo ultimo clado è sister group di un gruppo parzialmente collassato che include tutte le specie in studio appartenenti al subgen. *Phyllobotrys* e alla cui base si trova *G. microcephala* (sect. *Cephalospartum*).

Le specie rimanenti costituiscono un gruppo pienamente risolto con *G. linifolia* (un tempo inclusa nel genere *Teline* Medik.) alla base e le specie appartenenti al subg. *Genista* (*G. sagittalis*, un tempo inclusa nel genere *Chamaespartum* è inclusa qui come sister group di *G. januensis* e *G. tinctoria*). In questo ultimo gruppo sono evidenti alcuni cladi monofiletici: in particolare, un clado che include quattro specie appartenenti alla sect. *Spartioides* del genere *Genista* (*G. cinerea*, *G. ramosissima*, *G. majorica*, *G. sericea*) ed un clado che include i membri delle sect. *Spartioides* (*G. cinerascens* e *G. obtusiramea*) e *Erinacoides* (*G. legionensis* e *G. pumila*).

Il supporto di BREMER (1994) per i cladi in questa matrice è variabile: in particolare è possibile osservare che i cladi rappresentati le relazioni tra i gruppi di specie più grandi hanno un supporto più basso dei cladi interni. Tuttavia, tale supporto è in stretta relazione alla presenza di diverse OTUs relativamente molto distanti (per es. *Retama* o *Spartium*) che sono basali rispetto a gruppi di singole specie. Al contrario, i vari cladi che includono solo specie del genere *Genista* sono tipicamente molto ben supportati.



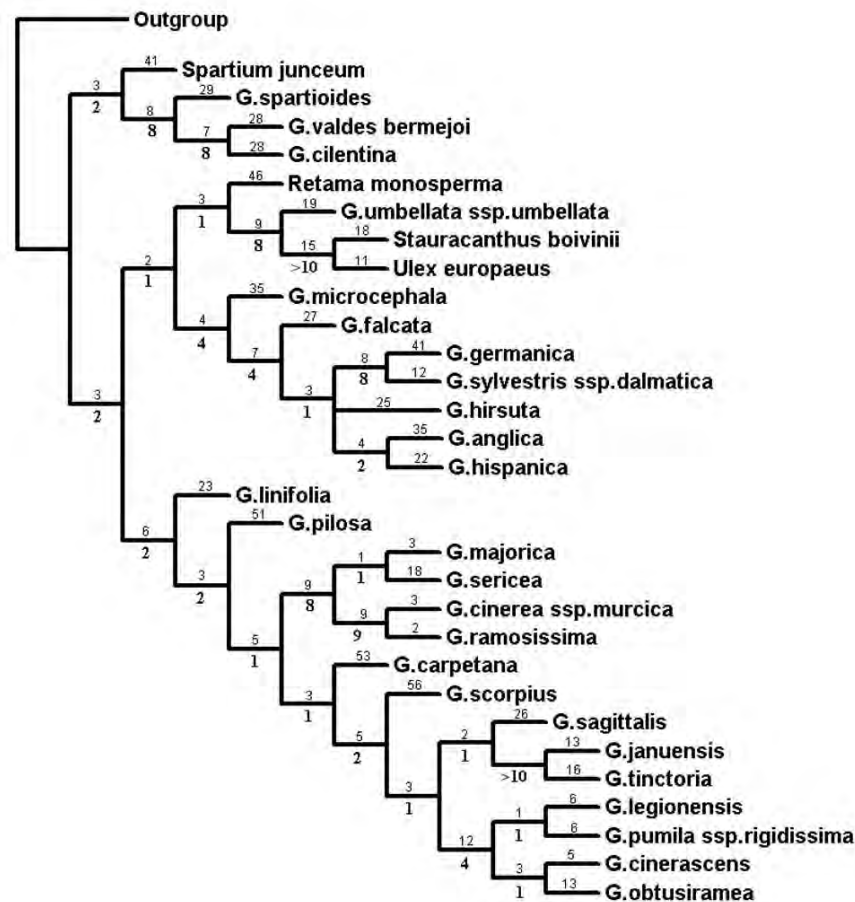


Fig. 1

Albero di consenso stretto tra due cladogrammi a massima parsimonia per le specie di *Genista* e di generi correlati oggetto dell'indagine (L=1400, C.I.=0.68, R.I.=0.52; dopo la rimozione dei caratteri non informativi, L=831, C.I.=0.47, R.I.=0.52). I numeri al di sopra degli internodi indicano le apomorfie; quelli al di sotto il supporto di BREMER (1994). Gli outgroup sono elencati nel testo.

Strict consensus of two MP cladograms for the investigated species of *Genista* and related genera (L=1400, C.I.=0.68, R.I.=0.52; by removing uninformative characters, L=831, C.I.=0.47, R.I.=0.52). Numbers above internodes represent apomorphies; numbers below internodes represent BREMER (1994) support. Outgroups are listed in the text.

## DISCUSSIONE

Le specie in esame sono state scelte in relazione alla loro rappresentatività nei cladi (in seguito ad analisi preliminari con un alto numero di specie) ed in relazione alla loro distribuzione geografica, rappresentativa della distribuzione del genere. E' quindi possibile affermare, osservando il cladogramma in Fig. 1 che la maggior parte delle specie meno derivate, quando localizzate geograficamente, si trovano nella parte occidentale del Mediterraneo, che può essere considerato, come spesso ipotizzato in letteratura, come il centro di origine del genere.

All'interno del genere *Genista* si sono evoluti vari piani corporei in risposta a differenti pressioni selettive; partendo da un generale piano corporeo di arbusto con adattamenti al clima xerico (fusti fotosintetici, rami spinosi, foglie composte con superficie traspirante ridotta, frutti polispermi), i rappresentanti moderni del genere o hanno evoluto adattamenti estremi all'ambiente arido (piante unifogliate o con foglie precocemente caduche, elevata spinescenza ed

estrema resistenza al pascolo, legumi pauci- o monospermi con baccelli coriacei) oppure, nei gruppi mesofili, piani corporei che presentano foglie persistenti e spinescenza ridotta o addirittura assente. Inoltre vari gruppi che sono inclusi in *Genista* da un punto di vista filogenetico, hanno sviluppato caratteri specifici che ne hanno causato un forte allontanamento dal piano corporeo plesiomorfico: ad esempio, *Spartium* ha sviluppato nettari ed un incremento notevole delle dimensioni dei pezzi floreali; *Stauracanthus* ha sviluppato fillodi fotosintetici; le specie di *Genista* un tempo ricomprese in *Teline* (tra le quali *G. linifolia* è presente qui) non hanno spine e presentano semi arillati.

In aggiunta, in seguito a pressioni selettive simili, vari caratteri morfologici si sono sviluppati ripetutamente, causando fenomeni di convergenza.

L'albero di consenso mostrato in Fig. 1 fornisce un quadro alquanto chiaro delle relazioni filogenetiche del genere *Genista*, sebbene nei limiti del numero di specie in analisi: due dei tre sottogeneri (*Phyllobotrys*

e *Genista*) appaiono chiaramente monofiletici, mentre all'interno del sottogenere *Spartocarpus* solo la sect. *Spartocarpus* è monofiletica; le specie appartenenti a questa sezione sono le più arcaiche del genere. Probabilmente, le difficoltà riscontrate in passato da vari autori nel collocare questo gruppo derivano dal fatto che le due sezioni principali non sono strettamente correlate tra loro ed una di esse (sect. *Cephalospartum*) non è monofiletica in sé (*G. microcephala* e *G. umbellata* sono infatti in due cladi differenti all'interno del cladogramma di Fig. 1). L'origine dei cladi principali mostrati in Fig. 1 è stata probabilmente rapida; infatti, il numero di sinapomorfie che compaiono nei cladi basali (Fig. 1) è comparativamente più basso rispetto a quelle che si osservano nei cladi terminali. Ciò potrebbe indicare (seppure in assenza di un orologio molecolare) che i nuovi assetti morfologici sono apparsi rapidamente all'interno dei gruppi principali, che successivamente sono stati sottoposti ad un lungo periodo di evoluzione separata. In conclusione, le difficoltà nel definire con chiarezza la filogenesi di questo gruppo di piante sono probabilmente state dovute all'alto numero di autoapomorfie che hanno fortemente modificato il piano corporeo originale, così come alla convergenza di diversi tratti morfologici e alla rapida origine dei cladi principali, i quali non hanno avuto il tempo di accumulare un numero sufficiente di apomorfie condivise.

#### LETTERATURA CITATA

- ACETO S., CAPUTO P., COZZOLINO S., GAUDIO L., MORETTI A., 1999 – *Phylogeny and evolution of Orchis and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity*. Mol. Phyl. Evol., 13: 67-76.
- BREMER K., 1994 – *Branch support and tree stability*. Cladistics, 10: 295-304.
- CRISTOFOLINI G., CONTE L., 2002 – *Phylogenetic patterns and endemism genesis in Cytisus Desf. (Leguminosae – Cytiseae) and related genera*. Israel J. Plant Sci., 50: S37-S50.
- CRISTOFOLINI G., FEOLI CHIAPELLA L., 1977 – *Serological systematics of the tribe Genisteeae (Fabaceae)*. Taxon, 26(1): 43-56.
- , 1984 – *Origin and diversification of the Genisteeae*. Webbia, 38: 105-122.
- CUBAS P., PARDO C., SÁNCHEZ-MATA D., CANTÓ P., 1998 – *Karyological and taxonomic notes on Genista L. (Papilionoideae, Leguminosae) from the Iberian Peninsula*. Bot. J. Linn. Soc., 128: 423-434.
- CUBAS P., PARDO C., TAHIRI H., 2002 – *Molecular approach to the phylogeny and systematics of Cytisus (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-trnF intergenic spacer)*. Plant Syst. Evol., 233: 223-242.
- DE CASTRO O., COZZOLINO S., JURY S., CAPUTO P., 2002 – *Molecular relationships in Genista L. Sect. Spartocarpus Spach (Fabaceae)*. Plant Syst. Evol., 231: 91-108.
- GIBBS P.E., 1966 – *A revision of the genus Genista L.* Notes Royal Bot. Garden Edinburgh, 27(1): 11-99.
- GOLOBOFF P., FARRIS J.S., NIXON K., 2003 – *T.N.T.: Tree analysis using new technology*. Program and documentation, available from the authors and at www.zmuc.dk/public/phylogeny.
- KÄSS E., WINK M., 1997 – *Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS1 and 2)*. Mol. Phyl. Evol., 8: 65-88.
- PARDO C., CUBAS P., TAHIRI H., 2004 – *Molecular phylogeny and systematics of Genista (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-trnF intergenic spacer)*. Plant Syst. Evol., 255: 93-119.
- PERCY D.M., CRONK Q.C.B., 2002 – *Different fates of island brooms: contrasting evolution in Adenocarpus, Genista and Teline (Genisteeae, Fabaceae) in the Canary islands and Madeira*. Amer. J. Bot., 89: 854-864.
- SPACH E., 1844 – *Revisio generis Genista*. I. Ann. Sci. Nat. (Paris), 2: 237-279.
- , 1845 – *Revisio generis Genista*. II. Ann. Sci. Nat. (Paris), 3: 102-158.
- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU G., BOUVET J., 1991 – *Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA*. Plant Mol. Biol., 17: 1105-1109.
- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J., 1994 – *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucl. Acids Res., 22: 4673-4680.
- VALSECCHI F., 1993 – *Il genere Genista L. in Italia. Le specie delle sezioni Erinacoides Spach, Ephedrospartum Spach, Aureospartum sect. nova*. Webbia, 48: 779-824.

RIASSUNTO – *Genista* L. è un ampio genere di arbusti spinosi od inermi distribuito in tutta l'area circum-mediterranea. Le relazioni tra i gruppi infragenerici principali di questo genere sono state a lungo dibattute, come anche la suddivisione in tre sottogeneri. In questo articolo si riferisce di una analisi cladistica a massima parsimonia condotta su 35 taxa di *Genista* e generi correlati con una matrice di 4 marcatori molecolari, di cui uno nucleare (gli spaziatori interni trascritti del DNA ribosomale nucleare) e tre plastidiali (introne del *trnL* e gli spaziatori intergenici *trnL-trnF* e *trnS-trnG*). I risultati indicano che i sottogeneri *Phyllobotrys* e *Genista*, oltre alla sezione *Spartocarpus* del sottogenere *Spartocarpus*, sono unità monofiletiche separate; quest'ultima è basale nel genere *Genista* s.l. Vari generi affini sono inclusi all'interno del clado cui appartengono tutte le specie studiate di *Genista*. Sulla base dei risultati, si prospettano ipotesi sull'evoluzione del genere.

#### AUTORI

Mario Rega, Paolo Caputo, Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione Biologia Vegetale, Università di Napoli Federico II, Via Foria 223, 80139 Napoli  
Giovanni Cristofolini, Erbario ed Orto Botanico, Dipartimento di Biologia, Università di Bologna, Via Irnerio 42, 40126 Bologna

## Contributo alla revisione dei caratteri diagnostici nel gruppo *Viola alba* W. Besser: analisi morfologica e cariologica delle popolazioni dei Monti della Tolfa

M. MATTEUCCI e F. LUCCHESI

**ABSTRACT** - *Revision of diagnostic characters in Viola alba complex: morphological and karyological analysis in Tolfa Mts. populations* - The *Viola alba* Besser complex exhibit a high variability at regional, local and individual scale, that, alongside with the frequent hybridization with taxon outside the complex, has led to the description of a lot of new species and subspecies and their relative distribution areas. At present, many authors prefer to consider *V. alba* a single species with an elevated morphological variability. In this study, the exact distribution of the *V. alba* populations has been accomplished in the territories of the "Monti della Tolfa" and Latium (central Italy). By means of biosystematic analysis (histological, morphometric and karyological), we have evaluated the phenotypic plasticity, the reliability of diagnostic traits and have defined the subspecific *taxa* really occurring in the investigated area. Voucher samples were prepared and compared with Herbarium specimens of RO, NAP, FI to evaluate intra and inter-populations variability. Cultivated samples have showed that diagnostic characters may be variable at different phenological phases and at different developmental steps, suggesting their reevaluation. Karyological analysis have suggested that populations of Tolfa Mts. are more resembling to subsp. *dehnhardtii* on the basis of Levan formula, but they are intermediate between the *typus alba* and *dehnhardtii*, according to the chromosome sizes and shapes. Therefore, it appear to be correct to separate *V. alba* W. Besser in three subspecies: *alba*, *dehnhardtii* and *cretica*, each deriving from 3 different glacial refugial areas.

*Key words:* karyotype, Italy, Lazio, species complex, Tolfa, *Viola alba*

### INTRODUZIONE

L'indagine sui caratteri diagnostici che definiscono il gruppo *Viola alba* W. Besser e i suoi *taxa* sottospecifici nel Lazio mira ad utilizzare in modo integrato tecniche biosistematiche per risolvere problematiche sistematico-tassonomiche su gruppi critici più in generale.

La storia del complesso *Viola alba* è, come quella di ogni gruppo critico, tanto tortuosa quanto affascinante. La specie appartenente a questo complesso presenta un'alta variabilità su scala regionale, locale ed individuale. Questa caratteristica e la frequente ibridazione con entità al di fuori del complesso hanno portato alla descrizione, negli ultimi due secoli, di un ampio numero di *taxa* di vario rango tassonomico e di diversa distribuzione (MARCUSSEN, BORGES, 2000).

L'areale di distribuzione della specie è di tipo eurasiatico e va dall'Africa nord-occidentale e dal versante orientale della Penisola Iberica fino al Caucaso e all'Asia Minore, mentre è stata probabilmente introdotta a scopo ornamentale in Svezia e Portogallo.

L'*habitat* primario della specie è caratterizzato dalle boscaglie e dai boschi di latifoglie o sempreverdi; la specie raggiunge anche elevate altitudini nella parte meridionale del suo areale, ma rimane comunque marcatamente termofila nella parte più settentrionale, sull'arco alpino e sui Carpazi.

Le varie entità appartenenti al complesso sono state tipificate da autori diversi a partire dagli inizi dell'800 fino agli inizi del secolo successivo. BECKER (1910) ha riunito questi *taxa* nel complesso *Viola alba*, suddividendoli in tre sottospecie: *Viola alba* L. subsp. *alba*, *Viola alba* L. subsp. *dehnhardtii* (Ten.) W. Becker, ben definite sia geograficamente che morfologicamente, *Viola alba* subsp. *sintensisii* (W. Becker) W. Becker, distribuita sulla costa del Mar Caspio in Azerbaijan, in Iran e in Turkmenistan; si tratta di un *taxon* parzialmente simpatico con la subsp. *alba*, ma morfologicamente distinto, che probabilmente può essere considerato come una specie separata (MARCUSSEN, 2003).

Dopo BECKER (1910), le due sottospecie *alba* e *dehn-*

*hardtii* sono state più volte rivisitate e in particolare la subsp. *alba* ha subito diversi rimaneggiamenti. All'interno dell'areale di questa sottospecie, dal Caucaso al Medio Oriente e fino all'Europa centro-meridionale, sono state identificate altre 3 entità: subsp. *armena*, subsp. *thessala* e subsp. *scotophylla*. Essendo le entità del complesso simpatiche, molti autori preferiscono ormai considerare *V. alba* come un'unica specie morfologicamente molto variabile e non più come un complesso di specie come avviene, ad es., nella Flora Iberica (MUÑOZ GARMENDIA *et al.*, 1993). L'interesse della problematica è dimostrato da ricerche condotte in altre regioni europee, come il recente lavoro sulle popolazioni caucasiche (HODALOVA *et al.*, 2008).

#### AREA DI INTERESSE

L'indagine è iniziata nel comprensorio dei Monti della Tolfa allo scopo di definire quale delle sottospecie fosse presente nel tolfetano e quali fossero le peculiarità morfologiche in relazione alle caratteristiche microclimatiche, al suolo, alla geologia.

Oltre ai popolamenti dell'area tolfetana, sono stati utilizzati due popolamenti di confronto in cui si evidenziavano i tre morfotipi presenti nel Lazio, *alba*, *scotophylla* e *dehnhardtii*, i primi due provenienti da Venafro, in Molise, e il terzo da Cori, in provincia di Latina.

All'interno dell'area di interesse è stato, infatti, possibile rintracciare i due morfotipi *dehnhardtii* e *scotophylla*, insieme a tracce del morfotipo *alba*, in popolamenti misti.

#### MATERIALI E METODI

La ricerca si è svolta su campo per due stagioni consecutive (2003-2005) durante le quali sono stati raccolti campioni da 14 località (Tab. 1).

TABELLA 1

*Località ed habitat dei popolamenti campionati nel Lazio e in Molise.*  
*Localities and habitat of sampled populations in Latium and Molise regions.*

Località		Habitat
M. Sant'Angelo	(T6)	cerreta mista
P.te di Ferro	(T9)	cerreta
M. Piantangeli	(T11)	ruderaie
M. Acqua Tosta	(T18)	ontaneta
M. Acqua Tosta	(T19)	ontan. - cerreta
P.te di Ferro	(T20)	ontaneta
Castellina	(T21)	castagneti
M. Piantangeli	(T25)	ruderaie
M. Piantangeli	(T25b)	cerreta ceduo
Poggio Casalavio	(T26)	calanchi
La Piscina	(T40)	querceto
Poggio Castellazzo	(T42)	forra
Cori (Latina)	CO	querceto
Venafro (Molise)	VE	prato

Sui campioni, coltivati nell'Orto botanico, sono state effettuate le indagini istologiche, morfometriche e cariologiche.

I relativi *exsiccata* sono stati utilizzati per il confronto con campioni di altri erbari (RO, NAP, FI) e questo ha permesso di verificare la variabilità infra- e intrapopolazionale che caratterizza il complesso, a livello sia regionale che nazionale.

Le misurazioni sono state effettuate sempre su campioni vivi, avendo rilevato che alcuni dei caratteri diagnostici subiscono cambiamenti sia durante la crescita in coltura sia con l'essiccamento.

Nella Tab. 2 sono elencati i caratteri diagnostici misurati e analizzati con test ANOVA attraverso il programma SPSS 12.0.

TABELLA 2

*Caratteri morfologici ritenuti diagnostici per il gruppo di V. alba.*  
*Morphological diagnostic characters of V. alba group.*

#### Caratteri diagnostici a livello di specie

Stipole	dimensione-forma
Sepali	dimensione-forma
Cellule di guardia degli stomi	dimensione-densità
Cromosomi	numero-forma

#### Caratteri diagnostici a livello di sottospecie

Stoloni	presenza-assenza
Capsule	dimensioni-pelosità-colore
Semi	dimensione-colore
Fiore	dimensione-colore
Brattee	livello di inserzione-forma
Lamina fogliare	dimensione-forma
Peli	lunghezza-densità-forma

L'analisi cariologica si è avvalsa della tecnica di colorazione Feulgen; il protocollo è stato affinato per trattare al meglio il citoplasma particolarmente denso di *V. alba*, che impediva una buona colorazione della cromatina, e per individuare il breve periodo di attività meristemica che caratterizza questo *taxon*. Per lo studio del cariotipo sono stati presi in esame i parametri basilari, quali il numero, la forma e le dimensioni dei cromosomi (lunghezza totale, lunghezza braccio corto e braccio lungo, rapporto tra i bracci). Il kariogramma è stato ricavato con l'ausilio del software CROMO2. La classificazione si basa su LEVAN *et al.* (1964).

#### RISULTATI DELL'ANALISI CARIOLOGICA

L'analisi cariologica ha rivelato che i campioni della Tolfa appartengono ad un *taxon* paleotetraploide con numero cromosomico somatico  $2n = 20$ ; la formula di Levan è  $L = 2n = 2x = 20: 14m + 6sm$  e le dimensioni dei cromosomi variano da 2,29 a 1,14  $\mu m$ . Questi dati concordano con quelli forniti da TINIAKOU (1992) per la subsp. *dehnhardtii*, tranne la coppia più lunga e la più corta che per l'autore sono



entrambe metacentriche, mentre nei campioni della Tolfa la più lunga è submetacentrica e la più corta è metacentrica, come riportato da TINIAKOU (l. c.) per la subsp. *thessala*

In base alla formula di Levan ed al confronto del cariotogramma (Fig. 1) e ideogramma dei diversi popolamenti, il *taxon* presente nel Lazio sembra concordare con il morfotipo della subsp. *dehnhardtii*, pur presentando alcuni caratteri propri della subsp. *alba*. Questo suggerisce che nei popolamenti laziali siano presenti fenomeni di ibridazione.

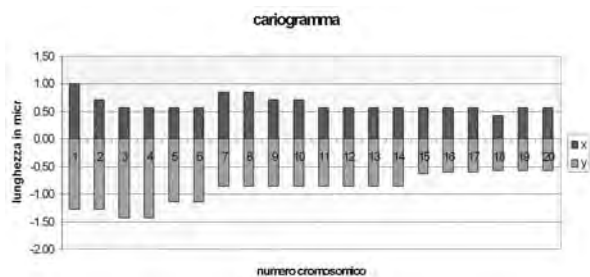


Fig. 1

Cariotipo di campioni del Lazio.  
Karyotype of Latium samples.

#### RISULTATI DELL'ANALISI MORFOLOGICA E ISTOLOGICA

**Stomi:** dimensione e densità delle cellule di guardia degli stomi (tipo anfianisocitico) variano nei diversi popolamenti in relazione al morfotipo o all'habitat. In Tab. 3 sono riportati i valori medi delle dimensioni stomatiche dei popolamenti analizzati, tra i quali non sono state, tuttavia, rilevate differenze apprezzabili e significative

TABELLA 3

Dimensioni degli stomi nelle popolazioni laziali.  
Stomata dimensions in Latium samples.

Lunghezza media	SD	SE
33.56 µm	± 0.04	± 3.33
Larghezza media	SD	SE
22.75 µm	± 0.03	± 2.55

**Stoloni:** si tratta di uno dei primi caratteri diagnostici evidenziati dalle varie flore e utilizzato nella sistematica del complesso.

Il carattere che identifica l'appartenenza di un campione al complesso *V. alba sensu lato* è la "presenza di stoloni epigei, allungati, esili, fioriferi già il primo anno ma non radicanti", solitamente gli ipogei non sono presenti.

Il *typus alba* prevede la presenza degli stoloni, mentre il *typus dehnhardtii* viene più volte identificato dalle chiavi come un fenotipo a "stoloni mancanti". Dall'esame del materiale d'erbario, questa definizione, comune a quasi tutte le flore, risulta, tuttavia,

poco pertinente, dato che anche nei campioni catalogati come *V. dehnhardtii* o *V. alba* subsp. *dehnhardtii* gli stoloni sono spesso presenti.

Quindi, appare più corretta la chiave proposta da MARCUSSEN (2003) in cui le tre sottospecie si distinguono come segue: subsp. *alba* con stoloni lunghi, in cui la massima lunghezza dell'internodo è 23-36 cm, subsp. *dehnhardtii* a stoloni corti (7.5-22 cm) e subsp. *cretica* dagli stoloni molto lunghi (21-55 cm).

È importante sottolineare che questo carattere varia durante la crescita della pianta; sui campioni della Tolfa, infatti, si è osservato che al momento della raccolta gli stoloni erano presenti e ben visibili solo nelle popolazioni con individui di maggiori dimensioni ed erano accentuati (in numero e dimensioni) nelle stazioni col terreno maggiormente scosceso o in pendenza (T11, T26, T6, T40) dove si riscontravano anche stoloni ipogei. Nel corso della coltivazione gli stoloni sono comparsi anche nei campioni delle altre popolazioni al termine del periodo di fioritura e al raggiungimento di una dimensione minima nell'*habitus* della pianta, che potremmo definire "matura". In altre parole, tutti i campioni che avevano un aspetto troppo giovanile o stentato hanno cominciato a produrre stoloni dopo almeno un anno di coltivazione. Riguardo alla natura degli stoloni epigei, anche nei campioni della Tolfa questi si presentano il primo anno fioriferi ma non radicanti, mentre prima della fioritura dell'anno successivo (gennaio-febbraio) iniziano a produrre gli abbozzi radicali tramite i quali si ancorano al terreno.

Riguardo alla lunghezza degli internodi proposta nella classificazione di MARCUSSEN (2003), nella Tab. 4 si può notare che la media della lunghezza degli internodi per i campioni della Tolfa si trova al limite del passaggio tra la subsp. *alba* e la subsp. *dehnhardtii*.

TABELLA 4

Lunghezza degli stoloni.  
Stolone length.

Taxa	Tipologia
MARCUSSEN (2003)	
subsp. <i>alba</i>	lunghi (23-36 cm)
subsp. <i>dehnhardtii</i>	corti (7.5-22 cm)
subsp. <i>cretica</i>	molto lunghi (21-55 cm)
LAZIO	
<i>V. alba</i>	lunghi (16-26.7 cm)

**Stipole e brattee:** la forma delle stipole è un carattere utile per la determinazione di *V. alba* e per la sua distinzione da *V. hirta* L. e *V. suavis* Bieb., ma non per le sue sottospecie.

Si tratta di un carattere preliminare utilissimo per circoscrivere il complesso, ma non sono state evidenziate differenze significative nelle dimensioni tra i diversi popolamenti; le stipole sono lineari-lanceolate, acuminatae, lungamente fimbriate e con fimbrie ciliate (Fig. 2).

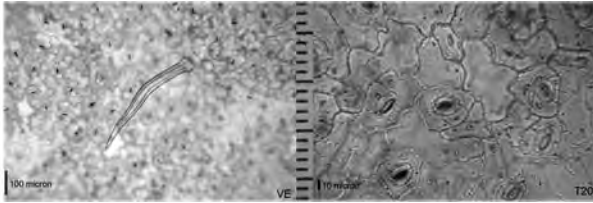


Fig. 2  
Forma delle stipole.  
Stipule shape.

Le brattee sono pure importanti per definire la specie, ma non la sottospecie. Inoltre, le informazioni in proposito sono molto scarse; le uniche due flore che ne parlano sono la Flora d'Italia (PIGNATTI, 1982) e la *Flora Europaea* (VALENTINE *et al.*, 1968): in entrambi i casi si specifica solo che l'inserzione delle brattee avviene sempre oltre la metà superiore del peduncolo (lunghezza totale 4-6 cm). Tutti i campioni della Tolfa analizzati presentano, invece, l'inserzione delle brattee nella metà inferiore del peduncolo (Tab. 5).

TABELLA 5  
*Inserzioni delle brattee.*  
*Bract insertions.*

Loc.	M Lunghezza. (x)	Inserz. (y)	(y/x)
T9	5.67 cm	2.23	2/5
T18	5.00 cm	2.00	2/5
T21	6.43 cm	2.40	3/8
T25	7.00 cm	2.72	2/5
T25b	7.27 cm	1.77	1/4
T26	6.80 cm	3.12	1/2

**Seme ed elaiosoma:** la dispersione dei semi nel genere *Viola* si attua (BEATTIE, LYONS, 1975) attraverso il trasporto da parte delle formiche (mirmecocoria) o attraverso una strategia mista (diplococoria) con l'espulsione esplosiva dei semi dalla capsula, seguita poi dal trasporto da parte delle formiche. Confrontando i dati delle subsp. *thessala* e *dehnhardtii* (TINIAKOU, 1992) è emerso che sia nelle popolazioni greche che in quelle laziali non vi sono differenze per quanto riguarda le dimensioni dei semi, che quindi non possono rappresentare un carattere distintivo per *taxa* sottospecifici (Tab. 6).

**Fiore:** nelle chiavi più utilizzate il carattere "colore del fiore" veniva adoperato per distinguere in maniera netta almeno la subsp. *alba*, a fiore bianco, dalla subsp. *dehnhardtii* a fiore scuro. In realtà, seguendo le teorie più accreditate (BECKER, 1910; TINIAKOU, 1991; MARCUSSEN, 2003) secondo cui la subsp. *scotophylla* e la subsp. *thessala* ricadrebbero nell'intervallo di variabilità della subsp. *alba*, anche questo carattere distintivo perde di forza.

TABELLA 6  
*Dimensione dei semi.*  
*Seed dimension.*

Lunghezza Media ( $\pm$ SD)	TINIAKOU (1992)
2.26 ( $\pm$ 0.14) cm	2.1-3.1 cm
Lungh. con elaiosoma ( $\pm$ SD)	TINIAKOU (1992)
3.55 ( $\pm$ 0.38) cm	2.8-4.5 cm
Larghezza Media ( $\pm$ SD)	TINIAKOU (1992)
1.74 ( $\pm$ 0.10) cm	1.5-1.9 cm

La colorazione del fiore, ma anche le screziature violacee presenti su foglie, interno del picciolo, stipole e capsule, sarebbero il risultato di una variazione biallelica in due loci, uno che codifica per la produzione di antociani e uno che codifica per la sua espressione nella corolla. La combinazione di queste due opportunità darebbe luogo a tre possibili morfotipi: il *typus alba*, con fiore bianco, foglie chiare e assenza di screziature viola sulla pianta; il *typus scotophylla* "a", con fiore bianco, foglie, picciolo, capsule e stipole screziate; il *typus scotophylla* "b", con fiore viola, foglia, picciolo, capsule e stipole screziate.

Queste combinazioni sono visibili in natura in molte popolazioni miste, come nel caso della popolazione di Venafro presa come confronto.

Il tipo di terminazione del fiore, lo sperone e il nettario vengono spesso citati nelle flore per le loro differenti colorazioni e per la loro forma; nei campioni analizzati la colorazione dello sperone era sempre identica a quella del fiore, più o meno scuro, mentre la forma, rotondeggiante o ad uncino non appare discriminante, essendo state rinvenute entrambe le forme all'interno della stessa pianta, sia in natura che in coltivazione (Fig. 3).

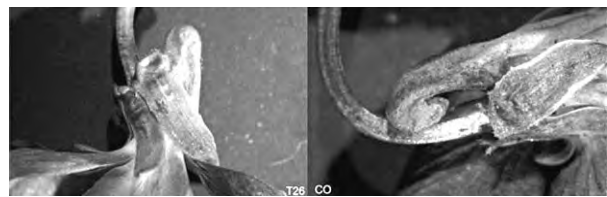


Fig. 3  
Forma di sperone e nettario.  
Spur and nectary shape.

**Capsule:** anche in questo caso si tratta di una serie di caratteri qualitativi poco distintivi. Secondo la maggior parte delle flore le capsule si dividono in pelose ascrivibili al *typus alba* (comprese le varietà *scotophylla* e *thessala*) e in poco pelose o glabre ascrivibili al *typus dehnhardtii*.

Le capsule pelose si distinguono, poi, in base al colore, verde chiaro (*alba*) e verde scuro o violaceo (*sco-*



*tophylla*). Il colore della capsula della subsp. *dehnhardtii* non viene preso in considerazione.

Tra le capsule visionate dei campioni della Tolfa nessuna è risultata glabra, tutte presentavano diversi gradi di pelosità e la colorazione subiva sempre la stessa graduale variazione nel tempo; da verde chiaro nelle capsule appena formate, il colore virava verso il verde scuro screziandosi di viola a completa maturazione della capsula.

**Pelosità:** il carattere pelosità, utilizzato in molte chiavi anche recenti, è risultato all'applicazione pratica difficilmente circoscrivibile; non vi sono intervalli apprezzabili tra "glabrescente, poco peloso o pelosetto" che possano definire dei tipi riconoscibili e di certa identificazione, utilizzabili in una chiave dicotomica.

Questo carattere è utilizzato da tutte le flore che contengano una chiave per il complesso *V. alba* e andrebbe sicuramente ridefinito.

Il campione su cui è stata descritta nel 1830 da Tenore la sottospecie *dehnhardtii* (*locus classicus* Camaldoli, NA) è completamente glabro e questo ha sicuramente contribuito a identificare il *typus dehnhardtii* come quello più glabro rispetto al *typus alba* più o meno peloso.

In realtà è ben chiaro, visionando i campioni conservati in erbario, come vi siano molti individui della subsp. *dehnhardtii* che presentano gradi di pelosità diversi.

Un'altra caratteristica da non sottovalutare è la conservazione della pelosità negli *exsiccata*. Infatti, è stato possibile osservare che dopo l'essiccazione si perde oltre la metà della pelosità che caratterizza il campione, così come si perde il colore dei petali.

Infine, bisogna sottolineare il valore ambiguo di un altro aspetto della pelosità, ovvero la forma dei peli. Questo carattere morfologico da alcune chiavi viene espresso come presenza di peli lunghi e diritti oppure brevi e ricurvi verso il basso, rispettivamente per il morfotipo *alba* e *dehnhardtii*. Sui campioni della Tolfa sono stati rinvenuti entrambi i tipi di peli, ma questi non possono però essere distintivi di un *taxon* in quanto la forma varia nel tempo: lunghi, fitti e dritti nelle foglie giovani, essi si diradano durante lo sviluppo e si incurvano nelle foglie adulte, fino quasi a scomparire in quelle vecchie, ma ancora verdi e fotosintetizzanti. Questo evento sembra relegare il carattere pelosità più ad una sfera fenologica della pianta che alla sfera tassonomica.

Nella Fig. 4 è possibile osservare le differenze tra i peli di piccioli fogliari giovani, lunghi, diritti e fitti (a sinistra), e quelli dei piccioli di foglie adulte, diradati e ricurvi (a destra), all'interno dello stesso campione.

Non sono stati rinvenuti in letteratura dati quantitativi con cui confrontare le misure dei peli, tranne che i dati di MARCUSSEN (2003) presentati in Tab. 7; anche in questo caso le dimensioni dei peli dei campioni del Lazio si trovano in posizione intermedia tra i due morfotipi.

**Foglie:** la morfologia fogliare è sicuramente uno dei caratteri più discussi e discutibili all'interno e all'e-

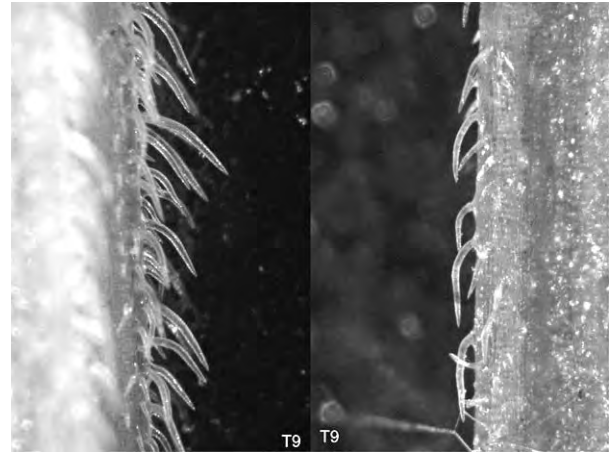


Fig. 4

Sviluppo dei peli sui piccioli (a sinistra giovani, a destra adulti).

Hair development on petioles, young (left), adult (right).

TABELLA 7

*Dimensione dei peli.*  
*Hair dimension.*

Lunghezza (mm)	<i>dehnhardtii</i>	<i>alba</i>	<i>cretica</i>
MARCUSSEN (2003)	0.4-0.6	0.5-0.8	1.0-1.3
M. della Tolfa		0.4-0.7	

sterno del complesso, in quanto spesso la variabilità che ci si trova ad osservare è così sottile e continua da non permettere la creazione di una dicotomia, presupposto necessario per una chiave analitica.

In generale, forse è più corretto riassumere il carattere "forma della foglia" attraverso delle indicazioni di massima per i tre morfotipi principali (MARCUSSEN, 2003) ed utilizzare questo carattere solo come un ulteriore indizio in una diagnosi più completa: *typus alba*, a foglie più o meno acute con margini diritti (triangolari-cordate) con 19-26 crenolature lungo il margine, e *typus dehnhardtii* (e *typus cretica*), a foglie più o meno ottuse con margini convessi (ovato-cordate) con 13-18 crenolature lungo il margine. Nel caso dei campioni della Tolfa la maggioranza delle foglie presentava un aspetto più o meno acuto ma molto variabile nel tempo. In molti campioni, infatti, le foglie avevano un aspetto acuto e bordi diritti da giovani e punta ottusa e margini convessi da adulte. All'interno poi degli stessi campioni sono state trovate contemporaneamente foglie di entrambi i morfotipi (Fig. 5).

Riguardo alle crenolature, queste sono nella maggioranza dei campioni inferiori a 20 per margine, quindi più vicine al *typus dehnhardtii* descritto da MARCUSSEN (l.c.).

Riguardo alle dimensioni fogliari risulta che solo due popolamenti (T11 e T42) si discostano dalla media (Tab. 8), ma solo in relazione alla crescita vigorosa della pianta in un suolo molto umido e ricco.

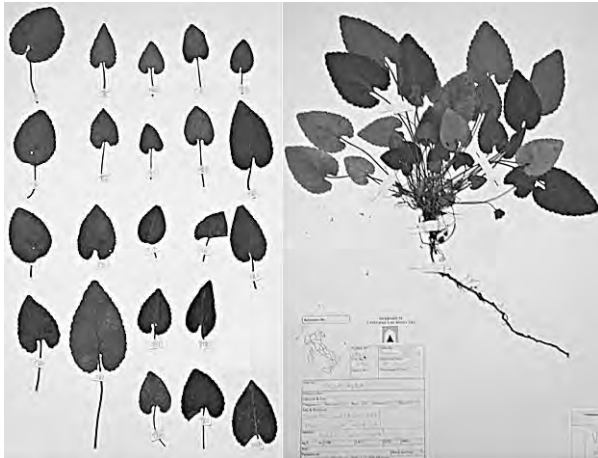


Fig. 5

Variabilità della forma nelle foglie.  
Variability in leaf shape.

TABELLA 8

Lunghezza della lamina fogliare.  
Leaf lamina length.

Loc.	Lungh. media	SD	SE
T6	3.10	±0.57	±0.11
T9	2.94	±0.48	±0.11
T11	6.15	±1.47	±0.47
T19	2.24	±0.67	±0.18
T20	2.43	±0.78	±0.26
T21	2.70	±0.48	±0.09
T25	3.81	±1.59	±0.39
T25B	2.57	±0.38	±0.13
T26	3.50	±0.82	±0.21
T40	4.79	±0.68	±0.17
T42	6.85	±0.94	±0.20
VE	4.65	±1.38	±0.34

## CONCLUSIONI

Le osservazioni morfometriche, istologiche e cariologiche dimostrano che i popolamenti dell'area dei Monti della Tolfa possono essere considerati come un'unica grande popolazione in cui il range di variabilità dei caratteri numerici accoglie una variazione pressoché continua dal *typus alba* al *typus dehnhardtii* con una preponderanza dei caratteri della sottospecie *dehnhardtii*. Questa conclusione può essere estesa tranquillamente anche ad una scala regionale, data la concordanza dei dati provenienti dai popolamenti di confronto di Cori e di Venafro.

Tutte le altre sottospecie, morfotipi e varietà presentate durante gli ultimi due secoli possono rientrare a pieno nella variabilità interna al gruppo e derivano probabilmente dalla facilità con cui la specie si ibrida con elementi interni o esterni al gruppo e dalla sua spiccata riproduzione vegetativa (stoloni radicanti e fioriferi e fiori cleistogami) che, al contrario, in habitat isolati geograficamente, plasma fenotipi peculiari.

Questo teoria è accreditata anche da recenti indagini di tipo filogeografico (MARCUSSEN, 2003), secondo le quali durante le glaciazioni del Würm la specie sarebbe rimasta isolata in tre diversi rifugi glaciali: ad occidente nell'Africa nord-occidentale, ad oriente nell'area pontico-caucasica e infine nell'isola di Creta. In queste tre isole-rifugio si sarebbero sviluppati i tre morfotipi che attualmente possiamo osservare nell'areale della specie, *dehnhardtii*, *cretica* e *alba* rispettivamente da occidente ad oriente. Successivamente ai cambiamenti climatici due degli areali rifugio (escluso quello dell'Isola di Creta rimasto ovviamente immutato per la barriera geografica insormontabile) si sarebbero ampliati, fino a sovrapporsi, dal Nord della Spagna alla Grecia, Italia compresa, in cui si è creata la variabilità continua di caratteri morfologici osservabile attualmente. Quindi, i due morfotipi differenziatisi ritornano ad essere nuovamente simpatici in questa area di sovrapposizione in cui rientra gran parte della penisola italiana e di conseguenza tutti i popolamenti del Lazio.

Questo fenomeno di "recente" simpatia spiegherebbe la variabilità continua dei caratteri morfometrici e i risultanti "morfotipi ibridi" che abbiamo incontrato nel Lazio e nell'Italia centro-meridionale (Venafro, Costiera Amalfitana, Sicilia, Basilicata).

Sarebbe interessante approfondire l'indagine su questo areale simpatico per definirne i "confini" e il gradiente tra le due sottospecie, indagare la variabilità al suo interno e comprendere meglio quale siano le relazioni *source-sink* tra le varie metapopolazioni che si trovano nell'area, possibilmente attraverso analisi di tipo molecolare atte a definire il flusso genico tra le popolazioni e le metapopolazioni indagate.

La revisione del complesso specifico è ancora in corso d'opera e i risultati di questo lavoro, relativo ad una piccola area, possono essere solo un contributo parziale rispetto all'indagine di tutta la diversità all'interno del gruppo.

*Ringraziamenti* – Si ringrazia la Dott.ssa Federica Avancini per il grande impegno quotidiano espresso durante tutti i campionamenti e tutte le analisi di laboratorio e in particolare per il continuo e proficuo scambio di idee che ha illuminato tutto il periodo della nostra contemporanea tesi di laurea.

## LETTERATURA CITATA

- BEATTIE A.J., LYON N., 1975 – *Seed dispersal in Viola* (Violaceae): *adaptations and strategies*. Amer J. Bot., 62: 714-722.
- BECKER W., 1910 – *Violae europaeae*. Dresden-N, Verlag von C. Heinrich.
- FIORI A., 1969 – *Nuova flora analitica d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- HODALOVA I., MEREDA P. JR., MARTONFI P., MARTONFIOVA L., DANIHELKA J., 2008 – *Morphological characters useful for the delimitation of taxa within Subsect. Viola* (Violaceae): *a morphometric study from the West Carpathians*. Folia Geobot., 43: 83-117.
- LEVAN A., FREDA K., SANDBERG A.A., 1964 – *Nomenclature for centromeric position on chromosomes*. Hereditas, 52: 201-220.
- MARCUSSEN T., 2003 – *Evolution, phylogeography and taxo-*

- nomy within the Viola alba complex (Violaceae)*. Plant Syst. Evol., 237: 51-74.
- MARCUSSEN T., BORGES L., 2000 – *Allozymic variation and relationships within Viola subsection Viola (Violaceae)*. Plant Syst. Evol., 223: 29-57.
- MUÑOZ GARMENDIA F., MONTSERRAT P., LAÍN Z M., ALDASORO J.J., 1993 – *Viola L. sect. Viola*. In: CASTROVIEJO S., AEDO C., CIRUJANO S., LAÍN Z M., MONTSERRAT P., MORALES R., MUÑOZ GARMENDIA F., FELINER N., RICO E., TALAVERA S., VILLAR L. (Eds.), *Flora Iberica*, 3: 276–298. Madrid, Real Jardín Botánico, C.S.I.C.
- PIGNATTI S., 1982 – *Flora d'Italia*. Vol. 2. Edagricole, Bologna.
- TINIAKOU A., 1991 – *Cytogeographical studies on some species of Viola sect. Viola (Violaceae) from Greece*. Willdenowia, 20: 153-158.
- , 1992 – *Viola alba subsp. dehnhardtii (Ten.) W. Becker*. Ber. Bayer. Bot. Ges., 8(2): 257.
- VALENTINE D.H., MERXMÜLLER H., SCHMIDT A., 1968 – *Viola L.* In: TUTIN T.G., HEYWOOD U.H., BURGESS N.A. VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A. (Eds.), *Flora Europaea*. Vol. 2. Cambridge University Press, Cambridge.

RIASSUNTO - Le specie appartenenti al complesso *Viola alba* Bess. presentano un'alta variabilità a livello regionale, locale e su scala individuale. Questo fenomeno ha portato alla descrizione, negli ultimi due secoli, di un ampio numero di *taxa* di vario rango tassonomico e di diversa distribuzione. Inoltre, la frequente ibridazione di questa specie con entità al di fuori del complesso ha aggiunto in molti casi ulteriore confusione. Essendo le entità del complesso in alcuni casi simpatriche, molti autori preferiscono ormai considerare *V. alba* come un'unica specie morfo-

logicamente molto variabile e non più come un complesso di specie. Attraverso il campionamento condotto nel comprensorio dei Monti della Tolfa e nel Lazio e le indagini di tipo biosistemico, è stato possibile evidenziare la distribuzione nel territorio della specie *Viola alba* e di rilevare la plasticità fenotipica del complesso. Le indagini istologiche, morfometriche e cariologiche sono state fondamentali per definire quale delle sottospecie fosse presente nell'area indagata ed inoltre quale fosse l'attendibilità dei caratteri diagnostici utilizzati per il riconoscimento. I relativi *exsiccata* sono stati utilizzati per il confronto con campioni di altri erbari (RO, NAP, FI) e questo ha permesso di verificare la variabilità infra- e intrapopolazionale che caratterizza il complesso. La coltivazione in orto ha evidenziato la variabilità dei caratteri diagnostici del gruppo nelle diverse fasi fenologiche e nei diversi stadi di sviluppo, rendendo necessaria una rivalutazione dei caratteri diagnostici stessi. L'analisi cariologica posiziona le popolazioni di Tolfa più vicine al cariotipo della subsp. *dehnhardtii* in base alla formula di Levan, ma per differenze di dimensioni e di morfologia cromosomica in posizione intermedia tra il *typus alba* e quello *dehnhardtii*. Attualmente, la divisione più corretta del complesso appare sicuramente quella in cui la specie *V. alba* Bess. viene suddivisa in tre entità: subsp. *alba*, subsp. *dehnhardtii* e subsp. *cretica*, derivanti da 3 diversi rifugi glaciali. L'Italia rientra in una zona di simpatria creata dall'ampliamento degli areali-rifugio in cui si è creata una variabilità continua dei caratteri morfologici evidenziata dai risultati ibridi a livello morfologico e cariologico dei campionamenti del Lazio. La revisione del complesso è ancora in corso d'opera e i risultati di questo lavoro, relativo ad una piccola area, sono da considerarsi un contributo parziale rispetto all'indagine di tutta la diversità all'interno del complesso.

## AUTORI

Maya Matteucci, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Roma "La Sapienza", Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma  
 Fernando Lucchese, Dipartimento di Biologia, Università Studi di Roma Tre, Viale Marconi 446, 00146 Roma

## Citogenetica di *Orchis pauciflora* Ten. del ciclo *O. mascula*

S. D'EMERICO, G. BARTOLO, S. COZZOLINO, S. PULVIRENTI, M.C. TERRASI e A. SCRUGLI

**ABSTRACT** - *Cytogenetical of Orchis pauciflora* Ten. of *O. mascula* group - In this work the cytogenetical relationships among *Orchis pauciflora*, *O. mascula* and *O. provincialis*, belonging to the *O. mascula* cycle, are analysed. The karyological investigations on these species have highlighted a remarkable homogeneity in the distribution of constitutive heterochromatin. Besides, C-banded somatic metaphase chromosomes show a particular heterochromatin distribution. Many chromosomes of the just mentioned species, after staining with DAPI, show a bright fluorescence at the telomeric or subtelomeric regions. However, this pattern does not correspond to that one of Giemsa C-band.

*Key words*: heterochromatin banding, *Orchidaceae*, *Orchis pauciflora*, phyletic relationships

### INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'analisi citogenetica, applicata largamente negli studi di filogenesi delle orchidee, ha avuto un ruolo determinante nelle indagini tassonomiche nomenclaturali della subtribù *Orchidinae* (BATEMAN *et al.*, 2003).

In questa subtribù, *Orchis* s.l. include un complesso di *taxa* in cui si osserva una certa variabilità nel numero cromosomico, nella morfologia dei cromosomi e nella quantità e distribuzione dell'eterocromatina costitutiva (D'EMERICO, 2001).

Precedenti indagini, sia carilogiche che inerenti la distribuzione dell'eterocromatina nel genere *Orchis* L., hanno permesso di individuare gruppi di *taxa* abbastanza omogenei (D'EMERICO *et al.*, 1992, 1996). Inoltre, analisi congiunte di citogenetica e biologia molecolare hanno consentito di dividere il genere in tre gruppi: *Anacamptis* s.l., che include tutte le specie con  $2n=36$  cromosomi, *Orchis* s.s. e *Neotinea* s.l., con 42 cromosomi (PRIDGEON *et al.*, 1997).

*Orchis* s.s. comprende circa 27 entità distribuite in Europa, Asia, Nord-Africa, Azorre, Isole Canarie, Ovest dell'Iran, Caucaso e Nord della Scandinavia (WOOD, 2001). Questo gruppo è costituito da piante con tuberi ovoidali o globosi, interi; foglie riunite in rosette basali; infiorescenza multiflora, con fiori di colore che vanno dal rosa al giallo, al violaceo; labello da intero a trilobato; ovario glabro, sessile, cilindrico, leggermente contorto. Gli impollinatori che visitano le entità di questo gruppo sono *Apis mellifera* e specie appartenenti ai generi *Bombus* e *Psithyrus*. In *Orchis* s.s., il ciclo di *O. mascula* (con le specie *O.*

*mascula*, *O. provincialis*, *O. pauciflora*) costituisce un esempio di diversità citogenetica rispetto a quello di *O. militares* (con le specie *O. militaris*, *O. simia*, *O. italica*, ecc.). Nei cromosomi delle specie del primo ciclo sono presenti sequenze di basi ripetute, non riscontrabili nelle entità del secondo (D'EMERICO *et al.*, 2002).

All'interno di *Orchis* s.s., analisi citogenetiche, che utilizzano metodiche differenziali di bandeggio con Giemsa ed alcuni fluorocromi (DAPI, CMA3), hanno consentito di osservare una notevole affinità tra *O. pauciflora*, *O. mascula* e *O. provincialis*.

### MATERIALI E METODI

Le osservazioni dei cromosomi sono state condotte su numerose piastre metafasiche della zona meristemica, ottenute previo schiacciamento di ovari immaturi, pretrattati con colchicina 0,3%, fissati in Carnoy (3:1) e colorati con la tecnica Feulgen e metodica di bandeggio con Giemsa. Con la tecnica della fluorescenza sono stati utilizzati i fluorocromi Hoechst 33258 e DAPI. Per il riconoscimento dei cromosomi è stata adottata la nomenclatura di LEVAN *et al.* (1964).

### RISULTATI E DISCUSSIONE

Sulla base dei risultati ottenuti in precedenti indagini (D'EMERICO *et al.*, 2002) è stato osservato che le specie *O. mascula* e *O. provincialis* presentano una notevole somiglianza sotto l'aspetto cariomorfologico, quando si analizzano con la metodica Feulgen (SCRUGLI, 1976, 1977), mentre assumono una diver-



sa identità citologica quando si utilizzano le metodiche di bandeggio.

Il cariotipo di *O. mascula* è costituito da 24 cromosomi metacentrici, 14 submetacentrici e 4 subtelocentrici. Il bandeggio con Giemsa ha evidenziato una particolare distribuzione eterocromatica. In 20 cromosomi l'eterocromatina occupa quasi l'intero cromosoma, escluso un segmento telomerico eucromatico. Le altre undici coppie di cromosomi sono caratterizzate da una sottile banda centromerica.

Il cariotipo di *O. provincialis* ha mostrato 22 cromosomi metacentrici, 14 submetacentrici e 6 subtelocentrici. Il bandeggio con Giemsa ha evidenziato sottili bande centromeriche in numerosi cromosomi del complemento. Solo tre coppie di cromosomi sono caratterizzate da una banda telomerica.

L'indagine con la tecnica di bandeggio, che utilizza i fluorocromi Hoechst 33258 o DAPI, ha messo in evidenza, in tutti i cromosomi di *O. provincialis*, grossi blocchi di eterocromatina DAPI<sup>+</sup> telomerica ricchi in sequenze ripetute A-T.

Simili risultati si sono ottenuti in *O. mascula*, che mostra bande DAPI<sup>+</sup> telomeriche, ma si distingue da *O. provincialis* per la ridotta quantità di eterocromatina (D'EMERICO *et al.*, 2002).

#### Cariologia di *Orchis pauciflora*

Le analisi citogenetiche in *Orchis pauciflora* hanno consentito di osservare una notevole affinità con *O. mascula* e *O. provincialis*. Il numero cromosomico di *O. pauciflora* è risultato sempre diploide con  $2n = 2x = 42$  in tutte le popolazioni esaminate. L'indagine con la tecnica di bandeggio con Giemsa ha mostrato tre coppie di cromosomi caratterizzate da una larga banda eterocromatica localizzata prevalentemente in posizione centromerica, una coppia con una banda centromerica e una subtelomerica, come pure numerosi cromosomi con una sottile banda centromerica (Fig. 1).

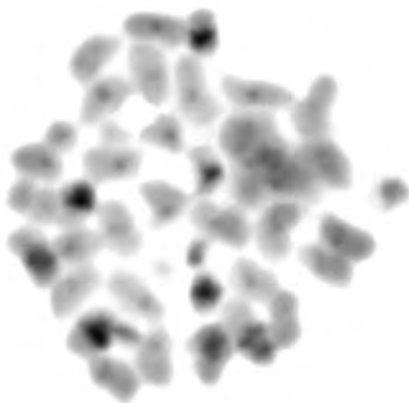


Fig. 1

*Orchis pauciflora*. Metafase somatica colorata con Giemsa.  
*Orchis pauciflora*. Giemsa C-banding somatic metaphase.

L'utilizzo dei fluorocromi Hoechst 33258 e DAPI ha reso evidente una distribuzione di eterocromatina totalmente differente da quella osservata con il Giemsa. Infatti, anche in *O. pauciflora*, come del resto riscontrato in *O. mascula* e in *O. provincialis*, sono state rilevate bande DAPI<sup>+</sup> telomeriche non evidenziate dalla metodica Giemsa (Fig. 2).

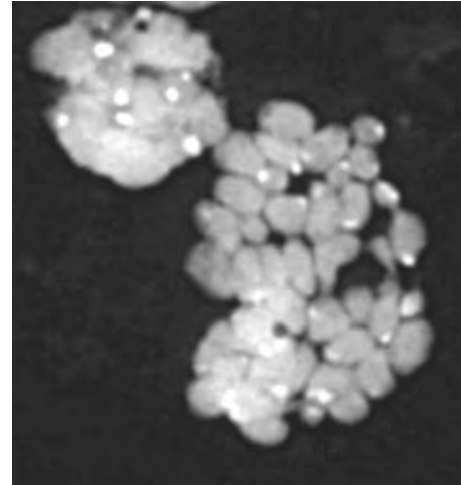


Fig. 2

*O. pauciflora*. Metafase somatica colorata con DAPI.  
*O. pauciflora*. DAPI-stained somatic metaphase.

#### CONCLUSIONI

Dalle analisi citogenetiche effettuate si deduce che in *Orchis pauciflora* la distribuzione generale dei blocchi eterocromatici DAPI<sup>+</sup> presenta una struttura simile a quella di *O. mascula*.

Infine, i risultati ottenuti rivelano che le entità del ciclo di *O. mascula* s.l. sono geneticamente diverse da quelle appartenenti alle restanti specie di *Orchis* s.s.; tali differenze aprono interessanti prospettive di indagine circa il coinvolgimento dell'eterocromatina nei processi evolutivi di queste entità.

#### LETTERATURA CITATA

- BATEMAN R.M., HOLLINGSWORTH M.P., PRESTON J., YIBO L., PRIDGEON A.M., CHASE M.W., 2003 – *Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae* (Orchidaceae). Bot. J. Linn. Soc., 142: 1-40.
- D'EMERICO S., 2001 – Orchideae, *Cytogenetics*. In: PRIDGEON A.M., CRIBB P.J., CHASE M.C., RASMUSSEN F.N. (Eds.), *Genera Orchidacearum. 2: Orchidoideae*. Oxford University Press, Oxford.
- D'EMERICO S., BIANCO P., MEDAGLI P., 1992 – *Karyological studies on Orchidaceae. Tribe Ophrydeae, subtribe Serapiadinae*. Carpologia, 45: 301-311.
- D'EMERICO S., COZZOLINO S., PELLEGRINO G., PIGNONE D., SCRUGLI A., 2002 – *Heterochromatin distribution in selected taxa of the 42-chromosomes Orchis s.l.* (Orchidaceae). Caryologia, 55(1): 55-62.
- D'EMERICO S., PIGNONE D., BIANCO P., 1996 – *Karyomorphological analyses and heterochromatin cha-*

- racteristic disclose phyletic relationships among  $2n = 32$  and  $2n = 36$  species of *Orchis* (Orchidaceae). *Pl. Syst. Evol.*, 200: 111-124.
- LEVAN A., FREDGA K., SANDBERG A.A., 1964 – *Nomenclature for centromeric position on chromosomes*. *Hereditas*, 52: 201-220.
- PRIDGEON A.M., BATEMAN R.M., COX A.V., HAPEMAN J.R., CHASE M.W., 1997 – *Phylogenetics of Subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato**. *Lindleyana*, 12: 89-109.
- SCRUGLI A., 1977 – *Numeri cromosomici per la flora italiana*. *Inform. Bot. Ital.*, 9(2): 116-125.
- SCRUGLI A., DE MARTIS B., MULAS B., 1976 – *Numeri cromosomici per la flora italiana*. *Inform. Bot. Ital.*, 8(1): 82-91.
- WOOD J., 2001 – *Orchideae, Cytogenetics*. In: PRIDGEON A.M., CRIBB P.J., CHASE M.C., RASMUSSEN F.N. (Eds.), *Genera Orchidacearum. 2: Orchidoideae*. Oxford University Press, Oxford.

RIASSUNTO - In questo lavoro vengono analizzate le relazioni citogenetiche tra *Orchis pauciflora*, *O. mascula* e *O. provincialis*, appartenenti al ciclo di *O. mascula*. Le analisi carilogiche in queste specie hanno evidenziato una notevole omogeneità nella distribuzione dell'eterocromatina costitutiva. Inoltre il bandeggio dei cromosomi ha mostrato una particolare distribuzione del contenuto eterocromatico. Molti cromosomi delle suddette specie, trattati con il DAPI, hanno mostrato blocchi di eterocromatina in posizione telomerica o subtelomerica. Questo modello strutturale, tuttavia, risulta differente da quello ottenuto con il bandeggio Giemsa.

## AUTORI

Saverio D'Emérico, Dipartimento di Biologia e Patologia vegetale, Università di Bari, Via Orabona 4, 70125 Bari, e-mail demerico@botanica.uniba.it, sdeme@yahoo.it

Giuseppina Bartolo, Santa Pulvirenti, Maria Carmen Terrasi, Dipartimento di Botanica, Università di Catania, Via A. Longo 19, 95125 Catania

Salvatore Cozzolino, Orto Botanico, Università di Napoli "Federico II", Via Foria 223, 80139 Napoli, e-mail cozzolin@unina.it

Antonio Scrugli, Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Cagliari, Via S. Ignazio 13, 09123 Cagliari, e-mail scrugli@unica.it

## Note citotassonomiche sul genere *Thapsia* L. (*Apiaceae*)

S. BRULLO, A. GUGLIELMO, S. PASTA, P. PAVONE e C. SALMERI

**ABSTRACT** - *Cytotaxonomical remarks on the genus Thapsia L. (Apiaceae)* - This study aims to clarify the taxonomic states and relations within the genus *Thapsia* from the Mediterranean area, with particular interest to the populations growing in Sicily. The results of morphological and karyological investigations on living plants, combined with herbarium surveys and literature data, allowed us to define an updated taxonomic profile of the genus *Thapsia*, with the description of a new species from the island of Lampedusa (SW Sicily), named *T. pelagica*. Moreover a new taxonomic combination is proposed for the populations of Peloritani Mts. (NE Sicily), which are here treated as subspecies *messanensis* of *T. garganica*.

*Key words:* *Apiaceae*, carilogia, *Thapsia*, *Thapsia pelagica*, tassonomia

### INTRODUZIONE

Il genere *Thapsia* L. (*Apiaceae*) è un piccolo gruppo che include una decina di specie di erbe perenni, distribuite nel Mediterraneo occidentale. Il massimo centro di differenziazione, dove si riscontrano il maggior numero di specie e la maggiore diffusione delle popolazioni, ricade nel settore iberico-mauritanico, ovvero in Spagna, Portogallo e nel Maghreb.

La tassonomia del gruppo è piuttosto complessa e controversa. Per l'Europa, TUTIN (1968) riporta solo tre specie: *T. garganica* L., a maggiore diffusione, *T. villosa* L. e *T. maxima* Mill. Successivamente, PUJADAS-SALVÀ, ROSSELLÒ (2003) per la flora iberica considerano *T. maxima* come sinonimo di *T. villosa* e citano, in aggiunta, le seguenti altre specie: *T. gymnesica* Rosselló & Pujadas, endemica delle isole Baleari, *T. transtagana* Brot., *T. nitida* Lacaita e *T. minor* Hoffmanns. & Link, quest'ultima ritenuta in passato sottospecie di *T. villosa* (cfr. PUJADAS-SALVÀ *et al.*, 1991; BAYER, LÓPEZ GONZÁLEZ, 1996; PUJADAS-SALVÀ 2000a, b). Inoltre, ARÁN, MATEO (2002) hanno rivalutato tassonomicamente la varietà *dissecta* di *T. villosa*, elevandola al rango specifico. Altri *taxa* sono riportati esclusivamente per il Nord Africa, tra questi *T. platycarpa* Pomel e *T. cinerea* Pujadas, presenti in Algeria e Marocco (PUJADAS-SALVÀ, PLAZA-ARREGUI, 2003).

In Italia è nota un'unica specie, *T. garganica* L., diffusa nelle regioni meridionali, in Sicilia, Sardegna e nelle piccole isole, ma presente anche lungo la costa tirrenica della Toscana, del Lazio e della Campania (PIGNATTI, 1982; CONTI *et al.*, 2005).

Nel corso di indagini sulla flora dell'isola di

Lampedusa, le popolazioni di *Thapsia* presenti, attribuite a *T. garganica* (SOMMIER, 1906-08; DI MARTINO, 1961; BARTOLO *et al.*, 1990; PASTA, 2001), sono risultate morfologicamente differenziate dalla specie tipica, soprattutto nella forma, nelle dimensioni e nell'indumento delle foglie, oltre che per vari caratteri fiorali.

Analogamente, altre campagne di raccolta in Sicilia, nel territorio dei Monti Peloritani, hanno evidenziato l'esistenza di popolazioni di *Thapsia* differenti dall'unica specie nota per l'Italia. Queste erano state già individuate da GUSSONE (1843) e descritte come *T. garganica* var. *messanensis*, distinta dalla specie tipica soprattutto per le foglie marcatamente irsute e per alcuni caratteri del frutto.

Il presente lavoro ha lo scopo di chiarire la problematica tassonomica del genere *Thapsia* in area mediterranea, con particolare riguardo alle popolazioni siciliane, avvalendosi dei risultati di un'indagine morfologica e cariologica, che vengono messi a confronto con i dati di letteratura esistenti per i *taxa* finora noti.

### MATERIALI E METODI

Lo studio morfologico è stato condotto sia su piante vive, raccolte in diverse località della Sicilia e dell'isola di Lampedusa e coltivate in vaso presso l'Orto Botanico di Catania, sia su campioni d'erbario. Per le specie non presenti in Sicilia, trattate in questo contributo, si è fatto riferimento ai dati di letteratura.

L'indagine cariologica è stata effettuata su apici radicali prelevati da esemplari coltivati in vaso. Il mate-

riale è stato pre-trattato con colchicina in soluzione acquosa allo 0,3%, fissato in Carnoy (alcol assoluto/acido acetico glaciale 3:1), idrolizzato in HCl 1N a 60°C per 7', quindi colorato secondo la tecnica Feulgen. Le piastre sono state elaborate con l'ausilio dei software Ikaros (Metasystems) e Zeiss Axiovision 4.1. La nomenclatura dei cromosomi fa riferimento a LEVAN *et al.* (1964), modificata secondo TZANOUDAKIS (1983).

## RISULTATI

**Morfologia** - Le indagini morfologiche condotte sulle specie del genere *Thapsia* attualmente note in letteratura hanno permesso di evidenziare significative differenze nelle foglie (forma, dimensioni, indumento e colore), nello scapo (altezza e diametro), nell'infiorescenza (n° di raggi primari e secondari e loro lunghezza) e nei frutti (forma, dimensioni e rapporto con lo stilo).

I risultati di questa indagine comparativa sono riportati nella Tab. 1. Da questa risulta che *Thapsia garganica* è un'erba perenne con fusti alti 45-110 cm, foglie primordiali ampiamente ovato-lanceolate, foglie basali glabre, dal contorno rombico o obovato, 2-3-pennatosette, con rachide verde e glabro e segmenti dell'ultimo ordine lineari-oblungi, di grandi dimensioni (50-80 x 2-3 mm), ombrelle a 10-20 o più raggi primari lunghi fino a 7 cm alla fioritura, 7-16 cm in fruttificazione, e 25-55 raggi secondari, fiori di colore giallo intenso con petali ovato-lanceolati, appendicolati all'apice, con nervatura mediana prominente, frutti ellittici, lunghi 17-22 mm, con ali di colore paglierino.

Gli esemplari raccolti a Lampedusa si differenziano marcatamente da *T. garganica* per una taglia più ridotta, foglie primordiali più piccole e strettamente lanceolate, foglie basali con rachide peloso e segmenti dell'ultimo ordine molto più brevi e più larghi, ispide, rugose e di colore verde-glaucoso nella pagina superiore, glauco-cineree e lungamente ciliate al margine e sulle nervature nella pagina inferiore, ombrelle più lasse, con 5-13 raggi primari, lunghi fino a 3 cm alla fioritura, 3-8(9) cm alla fruttificazione, e 10-30 raggi secondari, petali ovati, acuti all'apice, con nervatura mediana poco evidente, frutti più piccoli, lunghi 16-18 mm, con stilo normalmente più lungo del seno delle ali.

Anche le piante dei Monti Peloritani mostrano significative differenze rispetto a *T. garganica*. In particolare, esse hanno uno scapo alto fino a 150 cm, picciolo densamente irsuto e foglie con lamina triangolare, verde scura e sparsamente irsuta nella pagina superiore, di sotto più chiara e ciliata sul margine e sulle nervature, rachide villosa, segmenti terminali lunghi 5-25 mm, acuti all'apice, ombrelle con 20-35 raggi primari, frutto lungo 20-27 mm con ali più ampie.

**Cariologia** - Tutte le specie del genere *Thapsia* sono diploidi con numero cromosomico  $2n = 22$  (VALDÉS-BERMEJO, 1980; PIMENOV *et al.*, 1998; RASMUSSEN,

AVATO, 1998; GARCIA MARTINEZ, 2000). Popolazioni tetraploidi ed esaploidi sono state, tuttavia, segnalate per *T. villosa* nella penisola iberica (QUEIROS, 1978; AVATO *et al.*, 1996). Anche gli esemplari siciliani studiati sono risultati tutti diploidi con  $2n = 22$ . In particolare, le popolazioni di Lampedusa mostrano un cariotipo formato in prevalenza da 4 coppie di cromosomi più o meno metacentrici, con lunghezza che varia da 11,22  $\mu\text{m}$  a 9,85  $\mu\text{m}$ , da 3 coppie msm ovvero tendenti verso il tipo submetacentrico (con rapporto braccio lungo/braccio corto  $>1.30$ ) e da 4 coppie di cromosomi subterminali, una delle quali microsatellitata sul braccio corto (Fig. 1).

Nel complesso la lunghezza assoluta dei cromosomi varia da  $11,22 \pm 0,3 \mu\text{m}$  del cromosoma maggiore a  $5,61 \pm 0,22 \mu\text{m}$  del più corto. La formula cromosomica è la seguente:  $2n=2x=22 \text{ 8 m} + 6 \text{ msm} + 6 \text{ st} + 2 \text{ st}^s$ . Tale organizzazione del cariotipo è simile a quella riscontrata in *T. garganica* sia nel presente lavoro, che in letteratura (RASMUSSEN, AVATO, 1998). Per le popolazioni dei Monti Peloritani è stato possibile confermare solo il numero cromosomico  $2n = 22$ .

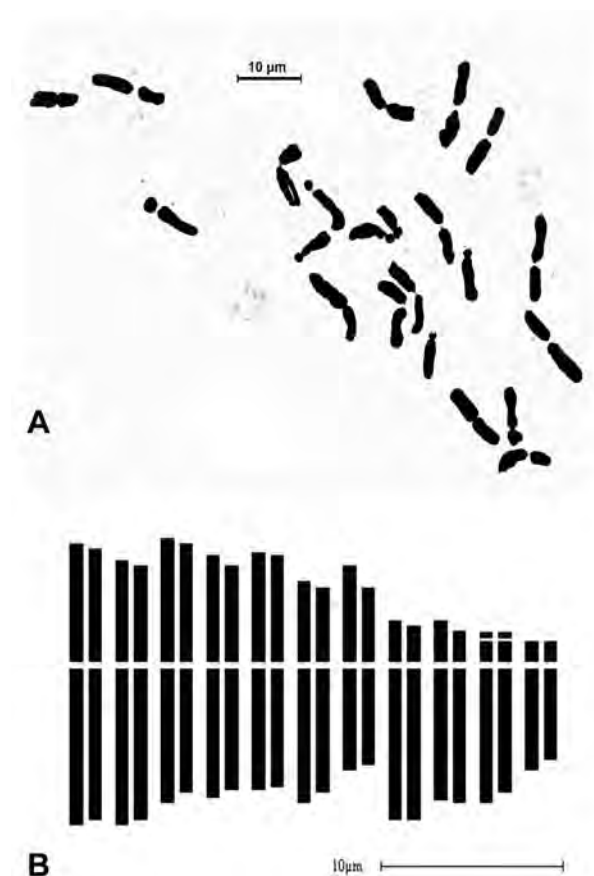


Fig. 1

Piastra metafasica (A) e cariotipo (B) di *Thapsia pelagica* (Cala Madonna, Lampedusa).  
Metaphase plate (A) and karyogram (B) of *Thapsia pelagica* (Cala Madonna, Lampedusa).



TABELLA 1

Comparazione dei principali caratteri morfologici diagnostici nella specie del genere *Thapsia*.  
Comparison of main diagnostic morphological characters in the species of the genus *Thapsia*.

Carattere	<i>T. garganica</i>	<i>T. garganica</i> <i>ssp. messanensis</i>	<i>T. pelagica</i>	<i>T. gymnesica</i>	<i>T. minor</i>	<i>T. villosa</i>	<i>T. dissecta</i>	<i>T. transtagana</i>	<i>T. platycarpa</i>	<i>T. cinerea</i>
H scapo (cm)	45-110(135)	80-150	35-55	45-105	33-93	(30)70-190	(30)70-190	140-180	45-60	n.d.
Ø scapo (mm)	7-20(28)	10-20	6-12	4-10	1.5-5.5	(3)5-25	(3)5-25	(4)8-16	n.d.	n. d.
Foglie basali	eretto-patenti	eretto-patenti	eretto-patenti	eretto-patenti	eretto-patenti	eretto-patenti	prostrate	eretto-patenti	eretto-patenti	erette
Largh. guaina fogliare (mm)	24-35	25-45	10-40	(11)14-29	4-11(18)	(12)20- 80(115)	(12)20- 80(115)	(12)20-45	12-24	2-4
Picciolo	glabro, verdastro	densamente irsuto, giallo- verdastro	glabro, porporino	ispidulo, porporino	da irto a villosa, rossiccio a verdastro	da irto a villosa, rossiccio	glabro, biancastro, appiattito	villosa, verdastro	da glabro a ispidulo, verde	lanuginoso, biancastro, appiattito
N° divisioni della foglia	(1)2-3	3	3	3-4	(2)-3	1-3	2-3	(1)2-4	(2)3-4	1-2(3)
Contorno lamina	rombico o obovato	triangolare	triangolare a rombico	triangolare	triangolare	triangolare	triangolare	rombico a ovato- triangolare	triangolare a rombico	ellittico- obovato
Dimensioni lamina (cm)	(17)20-35 x (10)13-24	10-40 x 8-35	10-30 x 5-25	18-25 x 13-22	8-16 x 7-15	(10)12-40 x (8)11-30	(10)12-40 x (8)11-30	(11)18-36 x (8)18-26	(15)19-30 x 16-26	(5)7-10 x (3)4-6
Pagina superiore della foglia	glabra, verde	sparsam. irsuta, verde scura	puberula, verde-glauc	glabrescente, verde-glauc	irto o subglabra, verde chiara	da irto a villosa, verde	irto, verde	densamente ispidula, verde	densamente ispidula, verde	sparsamente pelosa, verde scura
Pagina inferiore della foglia	glabra o rar. subglabra, glauc- verdastra	ciliata su nervi e margine, verde chiara	peloso-ciliata su nervi e margine, glauc-cinerea	densam. ispidula su nervi e margine, glauc- grigiastra	irto o sub- glabrescente, verde-giallastra a glauc	irto, da grigiastra a glauc o verdastra	irto, da grigiastra a glauc o verdastra	sparsamente ispidula su nervi e margine, glauc- grigiastra	densamente ispidula su nervi e margine, glauc	lanuginosa, cinereo
Indumento rachide	glabro	villosa	sparsamente peloso	irsuto	villosa	da villosa a irsuto	da villosa a irsuto	villosa	villosa	lanuginosa

(Segue Tab. 1)

Carattere	<i>T. garganica</i>	<i>T. garganica</i> <i>ssp. messanensis</i>	<i>T. pelagica</i>	<i>T. gymnesica</i>	<i>T. minor</i>	<i>T. villosa</i>	<i>T. dissecta</i>	<i>T. transtagana</i>	<i>T. platycarpa</i>	<i>T. cinerea</i>
Lobo terminale (mm)	(35)50-80 x (1)2-3(5)	5-25 x 1-4	5-12 x 1-4	(1)4-11 x 1-2(2.5)	2-10 x (1)2-3	3-45(60) x 8-32(40)	3-35 x 5-3	(15)20-60 x 2-7(20)	(1)4-10(20) x (0.5)0.9-2(3)	(1)2-7 x (1)1.2-1.9
Contorno lobo terminale	lineare-oblungo o lineare-lanceolato	lineare o lineare-lanceolato	oblungo o lineare-oblungo	lineare-oblungo o lineare-lanceolato	oblungo	oblungo	lineare, pinnato-partito	da lanceolato attenuato a oblungo	lineare-oblungo	strettamente oblungo
Apice lobo terminale	ottuso-subacuto, mucronato	acuto, brev. mucronato	ottuso, brev. mucronato	ottuso, mucronato o brev. mucronato	ottuso, mucronato	ottuso, mucronato	ottuso, mucronato	ottuso ad acuto, mucronato	ottuso-subacuto, mucronato	ottuso, mutico
Margine dei lobi	revoluto, intero	revoluto, intero	revoluto, intero	revoluto, intero	revoluto, crenato-dentato	revoluto, crenato-dentato	revoluto, crenato-dentato	piano o revoluto, intero	revoluto, intero	leggermente revoluto, intero
N° raggi primari	(6)10-20(24)	15-35	5-16	5-13	4-10(12)	(6)9-29	(6)9-29	(5)7-18	9-14	10-16
Raggi primari (cm)	7-16	8-15	1.5-8(9)	3-8.5	4-9	(4)6-12(16)	(4)6-12(16)	6-12	6-11	4-6.5
N° raggi second.	25-54	30-60	10-30	19-31	9-20	18-43(115)	18-43(115)	23-56	29-53	24-29
Colore dei petali	giallo intenso	giallo intenso	giallo intenso	salmone pallido	giallo	giallo intenso	giallo intenso	giallo intenso	giallo intenso	biancastro
Lunghezza stilo	≤ seno delle ali	< seno delle ali	≥ seno delle ali	≥ seno delle ali	< seno delle ali	≥ seno delle ali	≥ seno delle ali	< seno delle ali	< seno delle ali	< seno delle ali
Frutto (mm)	(15)17-22 x (10)11-14(17)	20-27 x 16-20	16-18(20) x 13-15	(7)9-12 x (5)7-10	9-12 x 6-10	(7)9-15 x (3.5)6-11	(6)6.5-9.5 x 2-3	(18)23-29(33) x 13-18	(15)19-25 x (9)13-15	20-22 x 15-18
Forma del frutto	ellittico	ellittico	ellittico	oblungo	ellittico	ellittico-oblungo	ellittico-oblungo	da ellittico a oblungo	ellittico	ellittico-oblungo
Ali (mm)	(3)4-5(6.5)	5-8	5-6	(1)1.5-2.7	(1.5)3-4	(1)2-4(5)	(1.5)1.9-2.5	3-5-7	(3)4-6(7)	4-6
Colore delle ali	da giallo-paglierino a giallo brillante	bruno-paglierino	giallo-paglierino	da bruno pallido a biancastro	giallastro	da giallastro a bruno	bruno-giallastro	da bruno chiaro a giallo-paglierino	paglierino o argenteo	paglierino

## CONCLUSIONI

Dall'analisi delle specie di *Thapsia* attualmente note (Tab. 1) si evince come le popolazioni di Lampedusa, finora attribuite a *T. garganica*, si distinguono nettamente da quest'ultima per rilevanti caratteri diacritici, mostrando invece maggiori affinità con alcuni *taxa* ibero-mauritanici, quali *T. platycarpa* e *T. minor*, e soprattutto con *T. gymnesica*, delle isole Baleari. Le correlazioni con queste specie riguardano soprattutto la morfologia fogliare (Fig. 2), ma le marcate differenze nei rimanenti caratteri morfologici permettono di considerare le popolazioni di Lampedusa appartenenti ad un *taxon* distinto a livello specifico, al quale viene dato il nome *T. pelagica*.

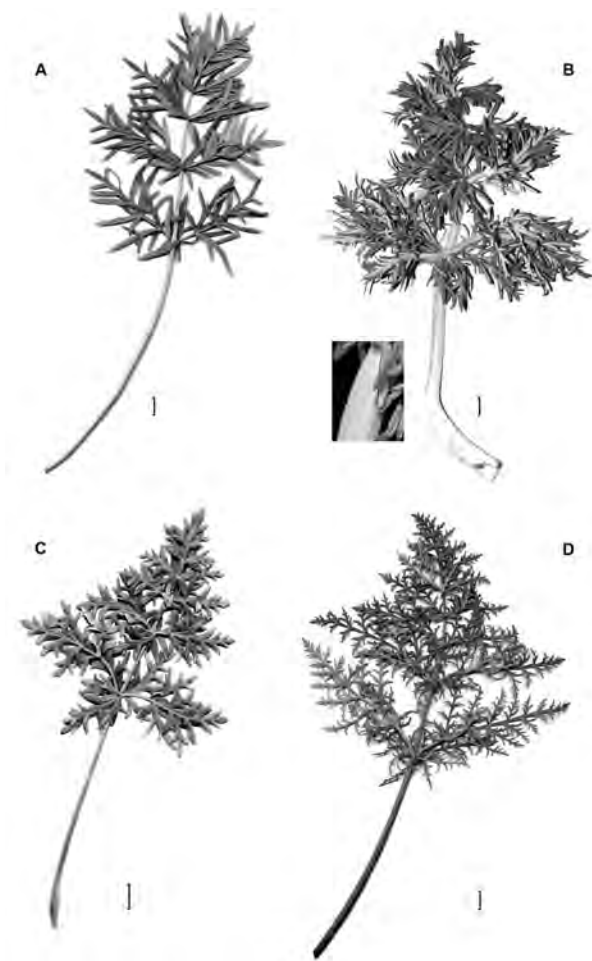


Fig. 2

Confronto della morfologia fogliare: A) *T. garganica* ssp. *garganica* (Marina di Modica); B) *T. garganica* ssp. *messanensis* (Monte Scuderi); C) *T. pelagica* (Cala Madonna, Lampedusa); D) *T. gymnesica* (Cala S. Vincenç, Maiorca). La barra corrisponde a 1 cm.

Comparison of leaf morphology: A) *T. garganica* ssp. *garganica* (Marina di Modica); B) *T. garganica* ssp. *messanensis* (Mt. Scuderi); C) *T. pelagica* (Cala Madonna, Lampedusa); D) *T. gymnesica* (Cala S. Vincenç, Majorca). Bar is 1 cm long.

Per quanto attiene le popolazioni in precedenza attribuite a *T. garganica* var. *messanensis*, invece, le differenze morfologiche rilevate, unitamente al loro isolamento geografico su alcuni rilievi della catena dei Peloritani, suggeriscono di attribuirle al ciclo di *T. garganica* differenziandole, tuttavia, a livello sottospecifico.

Di seguito viene riportato l'elenco aggiornato dei *taxa* appartenenti al genere *Thapsia*, con indicazioni sulla nomenclatura, sinonimie, iconografia e distribuzione geografica.

*Thapsia villosa* L., Sp. Pl. 261 (1753)

Lectotipo: LINN 368.1

Iconografia: Fig. 1487, Coste (1902), Fig. pag 328, Valdés et al. (1987)

Sinonimi:

≡ *Thapsia maxima* Mill., Gard. Dict. ed. 8 n.º 2 (1768); ≡ *Thapsia villosa* var. *latifolia* Boiss., Voy. Bot. Espagne 2: 255 (1840)

≡ *Thapsia laciniata* Rouy, Ill. Pl. Eur. 18: 142, tab. 431 (1903)

≡ *Thapsia villosa* var. *platyphyllos* Franco & P. Silva in Franco, Nova Fl. Portugal 1: 540, 554 (1971)

≡ *Thapsia villosa* subsp. *maxima* (Mill.) O. Bolòs & Vigo, Butll. Inst. Catalana Hist. Nat. 38: 84 (1974)

≡ *Thapsia villosa* var. *laciniata* (Rouy) O. Bolòs & Vigo, Butll. Inst. Catalana Hist. Nat. 38: 84 (1974)

Distribuzione: Spagna, Portogallo, S Francia, NO Africa

*Thapsia garganica* L., Mant. Pl. 57 (1767)

- subsp. *garganica*

Lectotipo: *Thapsia sive Turbith Garganicum femine latissimo*. Bahuin 1651, Hist. Pl. vol. 3, Lib. 27 *Umbelliferae*, Fig. pag. 50, qui designato.

Iconografia: Fig. 287, Sibthorp & Smith (1821); Fig. pag. 513, Font Quer (1962); Fig. 2355, Fiori (1933)

Sinonimi:

≡ *Thapsia garganica* subsp. *decussata* O. Bolòs & Vigo, Fl. Països Catalans 2: 488 (1990), p.p.

≡ *Thapsia garganica* f. *decussata* Knoche, Fl. Balear. 2: 252 (1922), p.p.

Distribuzione: Is. Baleari (Ibiza e Formentera), Penisola italiana, Sardegna, Sicilia, Grecia, N Africa

- subsp. *messanensis* (Guss.) Brullo, Guglielmo, Pasta, Pavone, Salmeri, **st. nov.**

Lectotipo: Messina al Brazzo di S. Ranieri, Gussone (NAP-GUSS), qui designato

Basionimo: *Thapsia garganica* var. *messanensis* Guss., Fl. Sic. Syn. 1: 359 (1843)

Distribuzione: Monti Peloritani (NE Sicilia)

*Thapsia transtagana* Brot., Fl. Lusit. 1: 468 (1804)

Tipo: non noto; ind. loc.: Portogallo, circa Montemor o novo, et prope Serpa in Transtagana

Iconografia: Fig. pag. 329, Valdés et al. (1987) sub *T. garganica*.

Sinonimi:

≡ *Thapsia decussata* Lag., Elench. Pl.: 12 (1816)



≡ *Thapsia garganica* subsp. *decussata* (Lag.) Maire, Bull. Soc. Hist. Nat. Afrique N. 29: 421 (1938)

≡ *Thapsia garganica* var. *decussata* (Lag.) DC., Prodr. 4: 202 (1830)

Distribuzione: Spagna, Portogallo, NO Africa

*Thapsia minor* Hoffmanns. & Link, Fl. Portug. 2: 431 (1834)

Tipo: distrutto (B); ind. loc.: Dans les bruyères près de Torres-vedras et autre part

Iconografia: Fig. 2, Bayer & Lopez Gonzales (1996); Fig. 127, Pujadas Salvà & Rosselló (2003)

Distribuzione: Spagna, Portogallo

Sinonimi:

≡ *Thapsia villosa* subsp. *minor* (Hoffmanns. & Link) M. Laínz, Aport. Fl. Gallega VI 18 (1968)

≡ *Thapsia villosa* var. *minor* (Hoffmanns. & Link) Cout., Fl. Portugal 455 (1913)

*Thapsia platycarpa* Pomel, Bull. Soc. Sci. Phys. Algérie 1874: 313 (1874)

Lectotipo: O. Ghar-Rouban, *Pomel* (MPU)

Iconografia: Fig. 2, Pujadas Salvà & Plaza-Arregui (2003)

Distribuzione: Algeria, Marocco

Sinonimi:

≡ *Thapsia garganica* var. *platycarpa* Batt., Fl. Algér.: 372 (1888)

*Thapsia nitida* Lacaïta, Cavanillesia 1: 13 (1928)

- subsp. *nitida*

Lectotipo: Sierra Morena, in silvaticis supra las Corredaras, loco dicto Sierra de los Pilonos, 21.5.1925, *Lacaïta* (MA 89002), qui designato

Iconografia: Lám. 126 e Fig. 20 a-c, Pujadas Salvà & Rosselló (2003)

Distribuzione: Spagna, Portogallo, Marocco?

- subsp. *meridionalis* (A. Pujadas) Rivas Martinez, Itinera Geobot. 15: 708 (2002)

Olotipo: Granada, Padul, S<sup>a</sup> Nevada, S<sup>a</sup> del Maner, Bco. de Peña Horada, suelo dolomitico, 30SVF49, 1100 m, 26.6.1984, *Pérez Raya* & *Molero Mesa* (GDA 17876)

Iconografia: Fig. 20 d-f, Pujadas Salvà & Rosselló (2003)

Sinonimi:

≡ *Thapsia nitida* var. *meridionalis* A. Pujadas, Anales Jard. Bot. Madrid 57: 465 (2000)

Distribuzione: SO Spagna, S Portogallo

*Thapsia gymnesica* Rosselló & A. Pujadas, Candollea 46: 66 (1991)

Olotipo: Islas Baleares, Mallorca: entre Cala Sant Vicenç y la Punta de Ses Coves Blanques (31SEE0419), 80 msm, 17.8.1989, *A. Pujadas* (COA 13183)

Iconografia: Fig. 128, Pujadas Salvà & Rosselló (2003)

Sinonimi:

≡ *Thapsia garganica* subsp. *gymnesica* (Rosselló & A. Pujadas) Romo, Fl. Silv. Baleares 197 (1994), comb. inval.

≡ *Thapsia garganica* subsp. *decussata* O. Bolòs &

Vigo, Fl. Països Catalans 2: 488 (1990), p.p.

≡ *Thapsia garganica* f. *decussata* Knoche, Fl. Balear. 2: 252 (1922), p.p.

Distribuzione: Is. Baleari (Maiorca e Minorca)

*Thapsia dissecta* (Boiss.) Arán & Mateo, Fl. Montiber. 20: 17 (2002)

Lectotipo: Clusio C. (1576), Rar. Stirp. Hisp., 2, t. pag. 430, qui designato

Iconografia: Figg. 3,4, Arán Redó & Mateo Sanz (2002)

Sinonimi:

≡ *Thapsia villosa* var. *dissecta* Boiss., Voy. Bot. Espagne 2: 255 (1840)

Distribuzione: Spagna, Francia

*Thapsia cinerea* A. Pujadas, Bot. J. Linn. Soc. 143: 437 (2003)

Olotipo: Maroc, Beni-Sidel, Segangan, 24.5.1934, *Sennen* & *Mauricio* (MAF 59036, sub *T. decussata* Lag.)

Iconografia: Fig. 4, Pujadas Salvà & Plaza-Arregui (2003)

Distribuzione: Marocco

*Thapsia pelagica* Brullo, Guglielmo, Pasta, Pavone, Salmeri, **sp. nova**

Olotipo: Lampedusa, Cala Madonna, 12.4.2008, *Bartolo*, *Brullo C.* & *Brullo S.* (CAT)

Iconografia: Fig. 3

Distribuzione: Lampedusa (Is. Pelagie)

DIAGNOSIS: *a Thapsia garganica* differt in scapo 35-55 cm alto, foliis triangularibus vel rombicis, puberulis et viridi-glaucis superne, piloso-ciliatis et glauco-cinereis inferne, rachide sparsim piloso, lobulis terminalibus 5-12 x 1-4 mm, radiis umbellarum 5-16, 1,5-8(9) cm longis, radiis umbellularum 10-30, fructu 16-18(20) mm longo, alis 5-6 mm latis, stylis brevioribus quam sino alorum.

Con lo scopo di definire le relazioni filogenetiche fra le specie del genere *Thapsia* è stata, inoltre, iniziata un'indagine molecolare basata sull'analisi degli spaziatori interni trascritti (ITS1 e ITS2) del DNA ribosomiale nucleare (nrDNA).

MATERIALE INDAGATO

*Thapsia garganica* subsp. *garganica*

Calanchi Schettino (Paternò, CT), 8.6.1984, *Brullo S.*, *Minissale*, *Spampinato* (CAT).

Valle del fiume Alcantara, Torrente S. Cataldo, 23.5.1984, *Brullo S.*, *Minissale* *Spampinato* (CAT).

Pantano Longarini (Pozzallo, SR), 24.4.1969, *Brullo S.* (CAT).

Pantano Longarini (Pozzallo, SR), 25.4.1969, *Brullo S.* (CAT).

Castellammare, 8.2.1984, *Brullo S.* (CAT).

Monte Passo del Lupo (TP), 5.11.1993, *Brullo S.*, *Minissale*, *Spampinato* (CAT).

Semaforo Pollara, Salina, 21.8.1993, *Spampinato* (CAT).



Cava Gisana, Marina di Modica, 11.6.2008, *Bartolo, Brullo C., Brullo S., Giusto* (CAT).

Madonie, Piano Zucchi, 28.6.2008, *Bartolo, Brullo C., Brullo S., Galesi* (CAT).

*Thapsia garganica* subsp. *messanensis*

Peloritani, Monte Scuderi, 13.05.2008, *Brullo C., Brullo S., Giusso, Sciandrello* (CAT).

Peloritani, Montagna Grande sulla cresta, 12.06.2008, *Galesi* (CAT).

*Thapsia pelagica*

Lampedusa, 23.4.1977, *Brullo* (CAT).

Lampedusa, 18.3.1985, *Brullo S., Minissale, Spampinato* (CAT).

Lampedusa, Vallone Imbriacole, 16.3.1985, *Brullo S., Minissale, Spampinato* (CAT).

Lampedusa, Pianoro roccioso sopra Cala Pulcino, 15.4.2007, *Pasta, La Mantia* (CAT).

Lampedusa, Cala Madonna, 12.04.2008, *Bartolo, Brullo C., Brullo S.* (CAT).

Lampedusa, 13.03.2008, *Bartolo, Brullo C., Brullo S.* (CAT).



Fig. 3

Olotipo di *Thapsia pelagica* Brullo, Guglielmo, Pasta, Pavone & Salmeri, endemica di Lampedusa (SO Sicilia). Holotype of *Thapsia pelagica* Brullo, Guglielmo, Pasta, Pavone & Salmeri, endemic of Lampedusa (SW Sicily).

LETTERATURA CITATA

ARÁN REDÓ V.J., MATEO SANZ G., 2002 – *Sobre una Thapsia infravalorada del Mediterráneo occidental*. Fl. Montib., 20: 16-20.

AVATO P., TRABACE G., SMITT U.W., 1996 – *Composition of the essential oil of fruits from polyploid types of Thapsia villosa L.: chemiotaxonomical evaluation*. J. Essent. Oil Res., 8: 123-128.

BARTOLO G., BRULLO S., MINISSALE P., SPAMPINATO G., 1990 – *Flora e vegetazione dell'Isola di Lampedusa*. Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat., 21 (1988): 119-255. Catania.

BAYER E., LÓPEZ GONZÁLES G., 1996 – *Una especie olvidada de Thapsia L. (Umbelliferae): Th. minor Hoffmanns. & Link.* An. Jard. Bot. Madrid, 54: 265-272.

CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C., 2005 – *An annotated checklist of the Italian vascular flora*. Palombi Editori, Roma. 420 pp.

DI MARTINO A., 1961 – *Flora e vegetazione*. In: ZAVATTARI E. et al. (Eds.), *Biogeografia delle Isole Pelagie*. Rend. Acc. Naz. dei XL, s. 4, 11: 163-210.

GARCÍA MARTÍNEZ X.R., 2000 – *Números cromosómicos de plantas occidentales, 818-826*. An. Jard. Bot. Madrid 58(1): 163.

GUSSONE G., 1843 – *Fl. Sic. Syn.* Vol. 1: 358-359.

LEVAN A., FREDA K., SANDBERG A.A., 1964 – *Nomenclature for centromeric position on chromosomes*. Hereditas, 52: 201-220.

PASTA S., 2001 – *Contributi alla conoscenza botanica delle isole minori circumsiciliane. I. Sintesi aggiornata delle conoscenze botaniche sull'isola di Lampedusa finalizzata alla conservazione delle sue emergenze floristico-vegetazionali*. Naturalista Sicil., s.4, 25 (Suppl): 19-70.

PIGNATTI S., 1982 – *Flora d'Italia*. Vol. 2. Edagricole, Bologna.

PIMENOV M.G., ALEXEEVA T.V., KLJUYKOV E.V., 1998 – *Mediterranean chromosome number reports 8 (905-935)*. Fl. Medit., 8: 221-245.

PUJADAS-SALVÀ A.J., 2000a – *Sobre la presencia de Thapsia minor Hoffmanns. & Link. (Umbelliferae) en la Península Ibérica*. An. Jard. Bot. Madrid, 57: 464-465.

—, 2000b – *Diversidad infraespecífica de Thapsia nitida Lacaita (Umbelliferae)*. An. Jard. Bot. Madrid, 57: 465-466.

PUJADAS-SALVÀ A.J., PLAZA-ARREGUI L., 2003 – *Studies on Thapsia (Apiaceae) from north-western Africa*. Bot. J. Linn. Soc., 143: 433-442.

PUJADAS-SALVÀ A.J., ROSSELLÓ J.A., 2003 – *Thapsia L.* In: CASTROVIEJO S. (Coord.), NIETO FELINER G., JURY S.L., HERRERO A. (vol. Eds.), *Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol. 10: 401-410. Real Jard. Bot. Madrid, CSIC, Madrid.

PUJADAS-SALVÀ A.J., ROSSELLÓ J.A., BARCELÓ P., 1991 – *De Flora Balearica Adnotationes (10). Thapsia gymnesica spec.nov.* Candollea, 46: 65-74.

QUEIROS M., 1978 – *Numeros cromosomicos para a flora Portuguesa 1-15*. Bol. Soc. Brot., ser. 2, 52: 69-77.

RASMUSSEN S.K., AVATO P., 1998 – *Characterization of chromosomes and genome organization of Thapsia garganica L. by localization of rRNA genes using fluorescent in situ hybridization*. Hereditas, 129: 231-239.

SOMMIER S., 1906-08 – *Le Isole Pelagie, Lampedusa, Linosa, lampione e la loro flora*. Boll. Reale Orto Bot. Giardino Colon. Palermo. 5 app., 6 app., 7 app.

TUTIN T.G., 1968 – *Thapsia L.* In: TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MOORE D.H., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A. (Eds.),

*Flora Europea*. Vol. 2. Cambridge University Press. Cambridge.

TZANOUDAKIS D., 1983 – *Karyotypes of ten taxa of Allium section Scorodon from Greece*. *Caryologia*, 36: 259-284.

VALDES-BERMEJO E., 1980 – *Numeros cromosomáticos de plantas occidentales*, 55-63. *An. Jard. Bot. Madrid*, 37: 193-198.

RIASSUNTO – Viene affrontata la problematica tassonomica del genere *Thapsia* in area mediterranea, con parti-

colare riguardo alle popolazioni siciliane. Attraverso un'indagine morfologica e cariologica condotta su piante vive e dal confronto con i campioni d'erbario e con i dati esistenti in letteratura viene presentato un quadro tassonomico aggiornato del genere *Thapsia*, con la descrizione di una specie nuova per la scienza, *T. pelagica* dell'isola di Lampedusa (SO Sicilia). Viene inoltre proposta una nuova combinazione relativa alle popolazioni dei Monti Peloritani di *T. garganica* (NE Sicilia), che vengono trattate come subsp. *messanensis*.

## AUTORI

Salvatore Brullo, Anna Guglielmo, Pietro Pavone, Salvatore Pasta, Dipartimento di Botanica, Università di Catania, Via A. Longo 19, 95125 Catania

Cristina Salmeri, Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Palermo, Via Archirafi 38, 90123 Palermo

## Avino Filogenesi molecolare delle *Marcgraviaceae* Choisy (*Ericales*): evidenze da due marcatori plastidiali

M. AVINO, S. DRESSLER, B.E. HAMMEL, A.E. SCHWARZBACH e J. SCHÖNENBERGER

Le *Marcgraviaceae* costituiscono una famiglia di piante rampicanti ristretta all'America centrale e meridionale che comprende 7 generi e circa 130 specie (THORNE, 1992; DRESSLER, 2004).

La famiglia è stata storicamente divisa in due sottofamiglie, le *Marcgravioidae* e le *Noranteoidae* (CHOISY, 1824; DELPINO, 1869; WITTMACK, 1878).

Le *Marcgravioidae* sono caratterizzate da infiorescenze umbellate nelle quali i fiori centrali sono sterili ed i relativi pedicelli adnati ai nettari, mentre i fiori periferici sono fertili e senza nettari; al loro interno, l'unico genere *Marcgravia* viene a sua volta diviso in due sottogeneri, a seconda della posizione dei fiori sui propri pedicelli (GILG, WERDERMANN, 1925).

Le *Noranteoidae* mostrano spighe allungate con fiori fertili provvisti di nettari attaccati ai pedicelli e sono state suddivise in due tribù in dipendenza del numero degli stami (DELPINO, 1869; WITTMACK, 1878): la tribù *Ruyschiaee* (con i generi *Souroubea* e *Ruyschia*) e la tribù *Noranteae* (con il genere *Norantea*). Il genere *Norantea*, per la diversa morfologia dei nettari e delle infiorescenze nelle sue specie, è stato ulteriormente separato in quattro gruppi elevati tutti a rango di genere: *Norantea*, *Schwartzia*, *Marcgraviastrum* e *Sarcopera* (BEDELL, 1985; DE ROON, DRESSLER, 1997).

I dati molecolari presenti in letteratura confermano la monofileticità della famiglia delle *Marcgraviaceae* e la sua posizione nelle *Ericales* (SCHÖNENBERGER *et al.*, 2005). Inoltre, la filogenesi interna conferma la divisione nelle due sottofamiglie, ma con un grado di risoluzione non soddisfacente (WARD, PRICE, 2002).

Nella presente analisi si raddoppia il numero di taxa e viene triplicato il numero dei caratteri utilizzando i marcatori plastidiali *ndhF* ed *rps16*.

L'analisi di parsimonia conferma la presenza di due gruppi principali che corrispondono perfettamente

alle due sottofamiglie riconosciute (CHOISY, 1824; DELPINO, 1869; WITTMACK, 1878; WARD, PRICE, 2002) e la suddivisione del genere *Marcgravia* nei sottogeneri *Plagiothalamium* Wittm. e *Orthotalamium* Delpino (GILG, WERDERMANN, 1925).

Lo studio, tuttavia, evidenzia anche la presenza di un collasso basale nella tribù delle *Noranteoidae*.

Si richiedono, pertanto, analisi ulteriori per approfondire i legami tra le specie e tra i generi di questo gruppo che sembrano mostrare parallelismi evolutivi.

### LETTERATURA CITATA

- BEDELL H.G., 1985 – *A generic revision of Marcgraviaceae I. The Norantea complex*. Ph. D. Dissertation, University of Maryland, College Park.
- CHOISY J.D., 1824 – *Marcgraviaceae*. In: DE CANDOLLE A.P., *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*, 1: 565-566. Treuttel and Würtz Eds., Paris.
- DE ROON A.C., DRESSLER S., 1997 – *New taxa of Norantea Aubl. s.l. (Marcgraviaceae) from Central America and adjacent South America*. Bot. Jahrb. Syst. Pflanzengesch. Pflanzengeogr., 119: 327-335.
- DELPINO F., 1869 – *Rivista monografica della famiglia delle Marcgraviaceae*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., 1: 257-290.
- DRESSLER S., 2004 – *Marcgraviaceae*. In: KUBITZKI K. (Ed.), *The families and genera of vascular plants*. 6. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- GILG E., WERDERMANN E., 1925 – *Marcgraviaceae*. In: ENGLER A., PRANTL K. (Eds.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. 94-106. 2nd Ed. Engelmann, Leipzig.
- SCHÖNENBERGER, J., ANDERBERG, A. A., SYTSMA, K. J., 2005 – *Molecular phylogenetics and patterns of floral evolution in the Ericales*. – Int. J. Plant Sci., 166: 265-288.
- THORNE R. F., 1992 – *Classification and geography of the flowering plants*. Bot. Rev., 58: 225-348.
- WARD N. M., PRICE R. A., 2002 – *Phylogenetic relationships of Marcgraviaceae: insights from three chloroplast genes*. Syst. Bot., 27(1): 149-160.
- WITTMACK L., 1878 – *Marcgraviaceae*. In: MARTIUS VON C.F.P., *Flora Brasiliensis*, 12: 213-258. Fleischer, Leipzig.

### AUTORI

Mariano Avino, Jürg Schönenberger, Department of Botany, Stockholm University, Lilla Frescativägen 5, SE-10691 Stockholm, Sweden  
 Stefan Dressler, Forschungsinstitut Senckenberg, Senckenberganlage 25, D-60325 Frankfurt, Germany  
 Barry E. Hammel, Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri 63166-0299, U.S.A.  
 Andrea E. Schwarzbach, Biology Department, Kent State University, Kent, OH 44242, U.S.A.

## Analisi molecolare per la ricostruzione filogenetica del genere *Vitis* L.

G. ZECCA, M. LABRA, S. WEIBANG, F. SALA e F. GRASSI

Il genere *Vitis* L., oggi tanto importante dal punto di vista culturale e commerciale, ha probabilmente le sue origini nel periodo Terziario.

Diversi milioni di anni fa esso popolò largamente l'Europa, l'Asia orientale e l'America del Nord.

In Europa, tuttavia, le glaciazioni determinarono l'estinzione di tutti i rappresentanti del genere con l'eccezione di un'unica specie: *Vitis vinifera* L.

In Asia e in Nord America, invece, l'impatto dei ghiacciai sul genere *Vitis* non fu così marcato. Attualmente, infatti, esistono circa una sessantina di specie diverse del genere *Vitis*, diffuse principalmente nelle aree a clima temperato e nelle zone subtropicali.

Una parte consistente di queste specie è distribuita in Asia orientale ed in particolare in Cina, soprattutto nelle province meridionali.

Questo gruppo di specie cinesi, sebbene numericamente rilevante, è stato fino ad ora poco studiato e le relazioni con le restanti specie del genere *Vitis* sono ancora poco note.

Analisi delle relazioni filogenetiche tra le specie potrebbero fornire nuove indicazioni utili per comprendere le dinamiche di diffusione e domesticazione del genere *Vitis* nel suo areale di distribuzione.

Nel presente studio ci siamo proposti di individuare dei marcatori molecolari utili a chiarire le relazioni

filogenetiche che intercorrono tra le specie del genere *Vitis*, da affiancare alle sequenze tradizionalmente impiegate in questo campo (ITS e TrnL) che all'interno del genere mostrano una bassa variabilità.

Per questo studio l'attenzione è stata posta su alcuni microsatelliti nucleari (nSSR) e alcune sequenze ricche di siti altamente variabili (SNP).

La variabilità presente nei microsatelliti non può essere abitualmente usata per gli studi filogenetici in quanto i meccanismi che la provocano spesso non sono noti e il numero di eventi che ad essa conducono non è facilmente ricostruibile in una sequenza ripetuta.

Questa prima fase di analisi ha, comunque, evidenziato la presenza di mutazioni nelle cosiddette "flanking region", ovvero nelle porzioni di DNA poste ai lati del microsatellite.

Successivamente, basandoci sui dati pubblicati dai ricercatori dell'Istituto Agrario di San Michele all'Adige, ci si è indirizzati all'identificazione di zone del DNA nucleare (EST) che presentassero al loro interno SNP.

Ad una prima analisi la variabilità individuata sembra poter fornire, nel complesso, informazioni utili a chiarire maggiormente i rapporti filogenetici all'interno del genere *Vitis* e le relazioni che intercorrono fra le specie asiatiche e americane.

### AUTORI

Giovanni Zecca, Francesco Sala, Fabrizio Grasi, Dipartimento di Biologia, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano  
Massimo Labra, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca, Piazza della Scienza 2, 20126 Milano  
Sun. Weibang, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China



## Filogenesi e filogeografia di *Saxifraga callosa*: ricchezza aplotipica e formazione di ibridi nelle aree rifugio

F. GRASSI, M. LABRA, L. MINUTO, G. CASAZZA e F. SALA

**ABSTRACT** - *Phylogenetic and Phylogeographical structure of Saxifraga callosa: haplotype richness and identification of hybrids in refugial areas* - *Saxifraga callosa* is a species spread in South-Eastern France and Italy with high diffusion in Maritime Alps. This species lives in more or less vertical limestone rocks at an altitude of between 200 and 2,000 m a.s.l. and it ranges from South-western Alps (Cottian and Maritime Alps, Provence) through the Apuane Alps and the Apennines to southern Italy, Sardinia and Sicily. A multiple molecular approach, using ITS, AFLP, chloroplast sequences and microsatellites, allowed a comprehension of the intra and inter specific relationships and the construction of a haplotype network. Genetic variability within populations was estimated by the number polymorphic haplotypes. The study of haplotypes legitimated conclusions on phylogeographical inferences across the species assortment and on the identification of diversity areas in the Maritime and Apuane Alps interpreted as peripheral glacial refugia during the Ice Ages. Moreover, the application of the 'NewHybrids' software to AFLP data-sets recognised *S. lantoscana* as a natural outcross between *S. callosa* subsp. *callosa* and *S. cochlearis*.

**Key words:** Apuane Alps, Genetic diversity, Maritime Alps, Periglacial local refugia, Phylogeographic patterns, Würm glaciations

### INTRODUZIONE

L'area mediterranea è stata interessata dalle glaciazioni per un lungo periodo (fino a circa 16.000 a.C., Würm) con forte influenza sulla distribuzione delle specie. Ampie zone delle alpi sono state completamente ricoperte da ghiaccio con la conseguente scomparsa di specie vegetali, tuttavia, le aree più periferiche a sud-est e sud-ovest delle alpi sono rimaste scoperte (TRIBSCH, SCHÖNSWETTER, 2003). In queste zone si sono rifugiate numerose specie endemiche (SCHÖNSWETTER *et al.*, 2002) e grazie all'elevata attività di speciazione si sono costituiti numerosi nuovi *taxa*. Le glaciazioni hanno anche portato ad una migrazione verso le montagne o pianure adiacenti con la conseguente modifica dell'areale di distribuzione dei diversi *taxa*. Infine, alcune cime sono risultate ottime aree di rifugio (nunataks) dalle quali le popolazioni hanno potuto successivamente ricolonizzare i territori persi (GUGERLI, HOLDEREGGER, 2001). La flora delle Alpi sud-occidentali (Alpi Marittime) è conosciuta per la sua notevole diversità vegetale (MÉDAIL, VERLAQUE, 1997; CASAZZA *et al.*, 2005). A causa del moderato impatto delle glaciazioni del quaternario e del clima particolarmente mite, diverse zone delle Alpi Marittime hanno agito come rifugio preservando un'elevata variabilità di specie tra cui numerosi endemismi (DIADEMA *et al.*, 2005; MINUTO *et al.*, 2006). Queste montagne sono inoltre caratterizzate da

un'elevata ricchezza di specie ibride (TABERLET *et al.*, 1998; HEWITT, 2000; SCHÖNSWETTER *et al.*, 2004) originatesi proprio grazie agli spostamenti delle differenti specie durante le diverse glaciazioni. Si sottolinea come il percorso di ricolonizzazione (Appennino/Alpi) con specie che dal Sud Italia risalgono fino alle Alpi rappresenta uno dei principali modelli filogeografici individuati fino ad oggi (LUCCHINI, RANDI, 1998; TABERLET *et al.*, 1998).

In assenza di fossili di piante alpine e appenniniche, i moderni approcci molecolari basati sulle analisi dei genomi, offrono nuovi strumenti per lo studio della filogeografia e dell'evoluzione della diversità vegetale (KING, FERRIS, 1998). E' quindi possibile attraverso l'analisi del DNA verificare la presenza di una specie o l'origine ibrida di un'altra o ancora evidenziare la presenza di una determinata specie nelle aree rifugio durante il Pleistocene lungo le Alpi (HEWITT, 1996; TABERLET *et al.*, 1998; WIDMER, LEXER, 2001; GRASSI *et al.*, 2008).

Il lavoro si inserisce in questo contesto ed in particolare si riferisce allo studio di *Saxifraga callosa* Sm. attraverso marcatori morfologici e molecolari. Questa specie è presente a Sud-Est della Francia e in Italia (Fig. 1) e appartiene alla sez. *Lingulatae* (CONTI *et al.*, 1999; GRASSI *et al.*, 2006). WEBB, GORNAL (1989) distinguono due subentità principali: *S. callo-*

sa subsp. *callosa* e *S. callosa* subsp. *catalunica* (Boiss. & Reut.) Webb; la prima è suddivisa in due varietà: var. *callosa* e var. *australis* (Moric.) Webb (incl. *S. lantoscana* Boiss.). Recenti studi hanno permesso di rilevare una nuova suddivisione all'interno della specie con l'iberica *S. catalunica* nuovamente assegnata al rango di specie (VARGAS, 1997). Il fine del lavoro è stato quello di chiarire le relazioni tra le differenti entità ed evidenziare eventuali fenomeni di ibridazione.



Fig. 1

Distribuzione geografica di *S. callosa* e *S. cochlearis*, come descritta da WEBB, GORNALL (1989). Abbreviazioni: cal, *S. callosa* subsp. *callosa*; cat, *S. callosa* subsp. *catalunica*; aus, *S. callosa* subsp. *australis*; lan, *S. lantoscana*; coc, *S. cochlearis*.

Geographic distributions of *S. callosa* and *S. cochlearis*, as described by WEBB, GORNALL (1989). Abbreviation: cal, *S. callosa* subsp. *callosa*; cat, *S. callosa* subsp. *catalunica*; aus, *S. callosa* subsp. *australis*; lan, *S. lantoscana*; coc, *S. cochlearis*.

#### MATERIALI E METODI

In questo lavoro sono stati raccolti 288 campioni appartenenti a 29 popolazioni. Il DNA è stato estratto tramite il kit Qiagen e successivamente sono stati analizzati 5 loci presenti su tre differenti regioni plastidiali (*TrnL-F*, *atpF intron*, *PsbA-TrnH*). La reazione è stata preparata con 15 ng di DNA genomico in un totale di 10 µl aggiungendo inoltre 10 ng di primer specifico per ciascuna coppia di primer e PureTaq Ready-To-Go PCR Beads Kit (Amersham Bioscience, Italy). Profilo di PCR usato: 7 min a 94 °C; 35 cicli: denaturazione (45 s a 94 °C), appaiamento (30 s a 50 °C), estensione (1 min a 72 °C), fase terminale 7 min a 72 °C. Un totale di 5 µl è stato caricato su gel al 6% di poliaccrilammide. Inoltre sono stati analizzati 6 combinazioni di primer AFLP. L'analisi AFLP è descritta in European Patent 0534858 (Keygene) ed in questo lavoro sono state amplificate le seguenti coppie di primer: M34-E49; M35-E46; M36-E37; M36-E38; M39-E34; M35-E39. Le analisi morfologiche e ITS sono state eseguite come descritto in GRASSI *et al.* (2006).

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

È stata eseguita un'analisi preliminare morfologica su piante appartenenti a ciascuna sottospecie di *S. callosa* ed alcuni outgroup: *S. cochlearis* Reichenb., *S. paniculata* Miller, *S. aizoides* L., *S. hostii* Tausch, *S. valdensis* DC., *S. cotyledon* L., *S. crustata* Vest., *S. florulenta* Moretti, *S. longifolia* Lapeyr. È stato prodotto un database di 32 caratteri morfologici informativi. Tali dati sono stati utilizzati per effettuare un'analisi filogenetica utilizzando il software PAUP 4.0 (SWOFFORD, 2001). I risultati sono evidenziati in Fig. 2A. Sono stati inoltre analizzati gli spaziatori di nrDNA (ITS1 e ITS2) amplificati tramite reazione di PCR (Fig. 2B). Per saggiare il livello di variabilità tra differenti individui della stessa sottospecie e verificare la presenza di ibridi sono stati applicati marcatori AFLP capaci di analizzare un'ampia porzione del genoma.

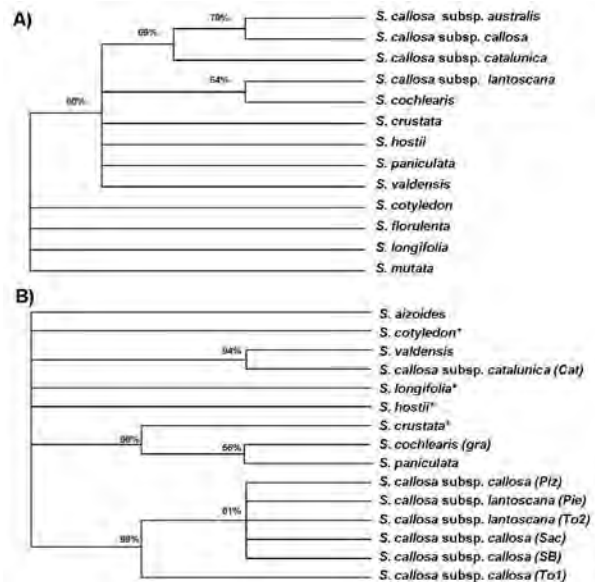


Fig 2

Albero di massima parsimonia basato su caratteri morfologici (analizzati con algoritmo Branch and Bound) (A) e sequenze ITS (analizzate con algoritmo Heuristic) (B). \* Dati ottenuti da GeneBank (CONTI *et al.*, 1999). Most parsimonious trees based on: (A) morphological characters data-set (analysed by Branch and Bound algorithm) and (B) ITS sequence data-set (analysed by Heuristic algorithm). \* Data obtained from GeneBank (CONTI *et al.*, 1999).

Un primo importante risultato di questo studio è stata la definizione della posizione filogenetica del *taxon catalunica*. Le analisi AFLP e ITS suggeriscono un diverso percorso evolutivo tra *S. callosa* e *S. catalunica* confermando, quindi, il bisogno di una rivalutazione tassonomica come recentemente suggerito da alcuni autori (VARGAS, 1997). Inoltre, utilizzando le potenzialità delle analisi morfologiche e molecolari, sono stati osservati eventi di introgressione all'interno della specie. Le analisi morfologiche hanno suggerito che le popo-

lazioni di *S. lantoscana* sono un *taxon* intermedio derivato da incroci tra *S. callosa* e *S. cochlearis*. L'analisi AFLP ha dimostrato grande variabilità all'interno delle popolazioni di *S. lantoscana* (Fig. 3A). Alcuni alleli osservati tramite l'analisi molecolare indicano un elevato livello di ibridazione, dato supportato anche tramite l'analisi statistica prodotta dal software 'NewHybrids' (Fig. 3B). Il fenomeno di ibridazione è stato inoltre confermato da marcatori plastidiali i quali hanno mostrato la presenza, all'in-

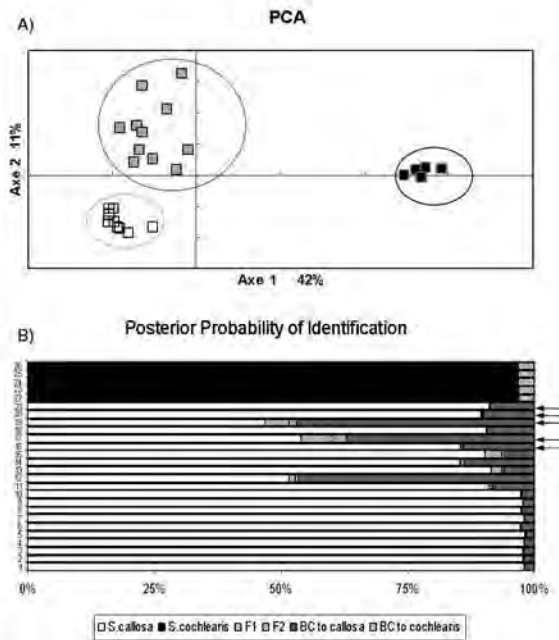


Fig. 3

(A) Analisi delle componenti principali ottenuta a partire dai dati AFLP per le specie *S. callosa* subsp. *callosa*, *S. lantoscana* and *S. cochlearis*. I campioni di *S. lantoscana* (grigio) mostrano un'alta variabilità genetica e una posizione intermedia tra *S. cochlearis* (nero) e *S. callosa* subsp. *callosa* (bianco). (B) La lunghezza di ciascuna barra riflette la probabilità Baesiana a posteriori di ciascun campione di appartenere ad un parentale oppure ad una differente classe di ibridi, F1, F2 o Backcross. I campioni 1-10 appartengono a *S. callosa*; i campioni 11-21 appartengono a *S. lantoscana*; gli ultimi 5 campioni (22-26) appartengono a *S. cochlearis*. Gli individui 16-17-19-20-21 (indicati dalle frecce) mostrano un frammento di cloroplasto appartenente a *S. cochlearis*.

(A) PCA analysis obtained by AFLP data matrix of *S. callosa* subsp. *callosa*, *S. lantoscana* and *S. cochlearis* samples. Plot of *S. lantoscana* individuals (gray squares) by first and second-principal components showing high genetic variability and an intermediate position between *S. cochlearis* (black square) and *S. callosa* subsp. *callosa* (white squares) samples. In (B), the length of each bar reflects the Bayesian Posterior Probabilities that the 26 analysed individuals belong to parental, or to a class of hybrids F1, F2 or BC (Backcross). Samples 1-10 belong to the *S. callosa* populations; samples 11-21 to the *S. lantoscana* populations; the last 5 samples (22-26) belong to the *S. cochlearis* populations. Moreover, individuals 16-17-19-20-21 (indicated by arrows) showed a cpDNA fragment deriving from *S. cochlearis*.

terno di *S. lantoscana*, di diversi alleli appartenenti a *S. cochlearis*.

Un secondo obiettivo del nostro studio è stato quello di determinare la struttura filogeografica di *S. callosa*, al fine di ricostruire la sua storia periglaciale, compresa l'individuazione di potenziali aree rifugio. L'analisi dei microsatelliti plastidiali, effettuata su 288 campioni, appartenenti a 29 diverse popolazioni di *S. callosa* campionate lungo l'intera area di distribuzione, ha permesso di identificare un centro primario di differenziazione nell'area delle Alpi Marittime. In questa specie la variazione genetica plastidiale è costituita da 11 aplotipi geograficamente separati tra Nord (oltre il 43° N di latitudine) e Sud (Fig. 4). Questa sembra essere dovuta ad un ridotto flusso di semi a causa di una probabile bar-

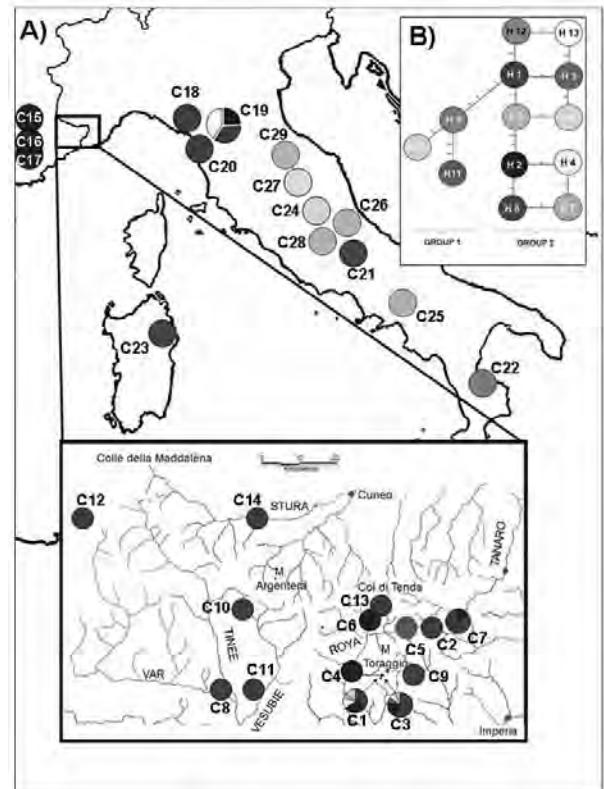


Fig. 4

A) Distribuzione geografica delle popolazioni di *S. callosa* analizzate e rispettivi aplotipi riscontrati. La distribuzione delle popolazioni nelle Alpi Marittime è rappresentata nel riquadro; B) Minimum Spanning Network costruito a partire dai dati plastidiali. Cerchi e numeri identificano gli aplotipi. Ciascun tratto contraddistingue la mutazione che intercorre tra due aplotipi. Gli aplotipi 13 e 12 appartengono rispettivamente a *S. cochlearis* e *S. lantoscana*.

A) Geographic distribution of the analysed *S. callosa* populations and haplotype represented by circles. Particular of distribution of haplotypes in the Maritime Alps is indicated in the insert; B) Minimum Spanning Network constructed using chloroplast data. Circles and numbers identify each haplotype. Each trait represents a single mutation change that interconnects two haplotype states. Haplotypes 13 and 12 belong to *S. cochlearis* and *S. lantoscana* respectively.



riera (BOSSART, PROWELL, 1998; LUGON-MOULIN, HAUSSER, 2002).

Indicazioni sul basso flusso di semi tra popolazioni sono confermate anche dalla frequente presenza di un solo aplotipo in ciascuna popolazione. La combinazione del limitato flusso di semi, della distribuzione irregolare degli aplotipi, dell'elevata diversità aplotipica in certe popolazioni e dell'alto numero di alleli rari supporta la localizzazione di un rifugio glaciale nella Alpi Marittime e nelle Alpi Apuane (Fig. 5). L'indagine molecolare di questa specie risulta, quindi, in accordo con altri recenti studi di biogeografia e filogeografia (GRASSI *et al.*, 2006; MINUTO *et al.*, 2006; CASAZZA *et al.*, 2008) che sottolineano la presenza di numerosi endemismi in questo settore delle Alpi.

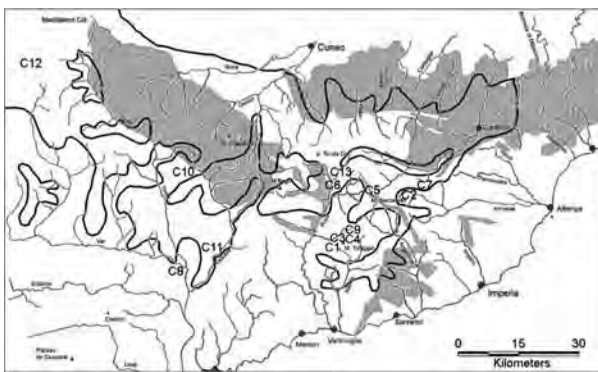


Fig. 5

Area di studio nelle Alpi Marittime. La linea scura indica i margini del Massimo Glaciale durante le ultime glaciazioni (glaciazione di Würm - 16.000 a.C.). Gli affioramenti silicei sono evidenziati in grigio e sono riportati i codici delle popolazioni saggiate.

The study area in the Maritime Alps. The black bold line indicates the margin of the last Glacial Maximum during the Würm glaciation (16.000 A.C.). Siliceous outcrops (grey area) are evidenced and codes of the Maritime Alps populations sampled are reported.

*Ringraziamenti* – Questa ricerca è finanziata dal Ministero Italiano dell'Ambiente all'interno del programma di ricerca "Research and development in biotechnology applied to the protection of the environment", dal progetto FIRB-RNBE01SF finanziato dal MIUR e dal progetto INGENIO finanziato da Regione Lombardia. Inoltre ringraziamo Roberto Brontini e Fabrizio Celia per le analisi molecolari, Nicodemo Passalacqua, Leonardo Gubellini, Fabio Conti e Sandro Ballelli per il campionamento del materiale vegetale.

#### LETTERATURA CITATA

- BOSSART J.L., PROWELL D.P., 1998 – *Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions*. Trends Ecol. Evol., 13: 202-205.
- CASAZZA G., BARBERIS G., MINUTO L., 2005 – *Ecological characteristics and rarity of endemic plants from Italian Maritime Alps*. Biol. Conserv., 123: 361-371.
- CASAZZA G., ZAPPA E., MARIOTTI M.G., MÉDAIL F., MINUTO L., 2008 – *Ecological and historical factors*

*affecting distribution pattern and richness of endemic plant species: the case of Maritime and Ligurian Alps hotspot*. Divers. Distrib., 14: 47-58.

- CONTI E., SOLTIS D.E., HARDIG T.M., SCHNEIDER J., 1999 – *Phylogenetic Relationships of the Silver Saxifrages (Saxifraga, Sect. Ligulatae Haworth): Implications for the Evolution of Substrate Specificity, Life Histories, and Biogeography*. Mol. Phylogenet. Evol., 13: 536-555.
- DIADEMA K., BRETAGNOLLE F., AFFRE L., YUAN Y., MÉDAIL F., 2005 – *Geographic structure of molecular variation of Gentiana ligustica (Gentianaceae) in the Maritime and Ligurian regional hotspot, inferred from ITS sequences*. Taxon, 54: 887-894.
- GRASSI F., DE MATTIA F., ZECCA G., SALA F., LABRA M., 2008 – *Historical isolation and range expansion of wild grape*. Biol. J. Linn. Soc. (in stampa).
- GRASSI F., LABRA M., MINUTO L., CASAZZA G., SALA F., 2006 – *Natural hybridization in Saxifraga callosa*. Sm. Plant Biol., 8: 243-252.
- GUGERLI F., HOLDEREGGER H., 2001 – *Nunatak survival, tabula rasa and the influence of the Pleistocene ice-ages on plant evolution in mountain areas*. Trends Plant Sci., 6: 397-398.
- HEWITT G.M., 1996 – *Some genetic consequences of the ice ages, and their role in divergence and speciation*. Biol. J. Linn. Soc., 58: 247-276.
- , 2000 – *The genetic legacy of the Quaternary ice ages*. Nature, 405: 907-913.
- KING R.A., FERRIS C., 1998 – *Chloroplast DNA phylogeography of Alnus glutinosa L.* Mol. Ecol., 7: 1151-1161.
- LUCCHINI V., RANDI E., 1998 – *Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeographical structure of rock partridge (Alectoris graeca) populations*. Heredity, 81: 528-536.
- LUGON-MOULIN N., HAUSSER J., 2002 – *Phylogeographical structure, postglacial recolonization and barriers to gene flow in the distinctive Valais chromosome race of the common shrew (Sorex araneus)*. Mol. Ecol., 11: 785-94.
- MÉDAIL F., VERLAQUE R., 1997 – *Ecological characteristics and rarity of endemic plants from southeast France and Corsica: implications for biodiversity conservation*. Biol. Conserv., 80: 269-281.
- MINUTO L., GRASSI F., CASAZZA G., 2006 – *Ecogeographic and genetic evaluation of endemic species in the Maritime Alps: the case of Moehringia lebrunii and M. sedoides (Caryophyllaceae)*. Plant Biosyst., 140: 146-155.
- SCHÖNSWETTER P., TRIBSCH A., BARFUß M., NIKLFELD H., 2002 – *Several Pleistocene refugia detected in the high alpine plant Phyteuma globulariifolium Sternb. & Hoppe (Campanulaceae) in the European Alps*. Mol. Ecol., 11: 2637-2647.
- SCHÖNSWETTER P., TRIBSCH A., STEHLIK I., NIKLFELD H., 2004 – *Glacial history of high alpine Ranunculus glacialis (Ranunculaceae) in the European Alps in a comparative phylogeographical context*. Biol. J. Linn. Soc., 81: 183-195.
- SWOFFORD D.L., 2001 – *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4.0b2*. Sinauer Associates, Sunderland MA.
- TABERLET P., FUMAGALLI L., WUST-SAUCY A.G., COSSON J.F., 1998 – *Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe*. Mol. Ecol., 7: 453-464.
- TRIBSCH A., SCHÖNSWETTER P., 2003 – *In search for Pleistocene refugia for mountain plants: patterns of endemism and comparative phylogeography confirm palaeo-environmental evidence in the Eastern European Alps*.



- Taxon, 52: 477-497.
- VARGAS P., 1997 – *Saxifraga L.* In: CASTROVIEJO S. (Coord.), AGUIAR C. *et al.* (vol. Eds.), *Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol. 5: 162-242. Real Jard. Bot., CSIC, Madrid.
- WEBB D.A., GORNALL R.J., 1989 – *Saxifrages of Europe*. Christopher Helm, London.
- WIDMER A., LEXER C., 2001 – *Glacial refugia: sanctuaries of allelic richness, but not for gene diversity*. Trends Ecol. Evol., 16: 267-269.

RIASSUNTO - *Saxifraga callosa* Sm. è una specie diffusa nel Sud-Est della Francia e in Italia soprattutto sulle Alpi Marittime. Questa specie vive su rocce calcaree ad un'altitudine compresa tra 200 e 2000 metri da Sud-Ovest delle Alpi (Alpi Marittime, Provenza), attraverso le Alpi Apuane

e gli Appennini fino al Sud Italia, comprese Sardegna e Sicilia. L'approccio molecolare, utilizzando ITS, AFLP, sequenze e microsatelliti di cloroplasto, ha permesso di confermare le relazioni intra- e interspecifiche tramite la costruzione di alberi evolutivi e di un network aplo-tipico. La variabilità genetica all'interno delle popolazioni è stata stimata a partire dal numero di aplotipi polimorfici. L'elevato numero di aplotipi e l'elevata diversità genetica individuata nelle Alpi Marittime e nelle Alpi Apuane ha, quindi, permesso di confermare l'importanza di queste aree come zone rifugio durante le fasi glaciali. Inoltre, l'applicazione del software 'NewHybrids' sui dati prodotti dall'analisi AFLP ha permesso di riconoscere come ibridi naturali tra *S. callosa* subsp. *callosa* e *S. cochlearis* alcune popolazioni di *S. lantoscana*.

#### AUTORI

*Fabrizio Grassi, Francesco Sala, Orto Botanico, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano*  
*Massimo Labra, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca, Piazza della Scienza 2, 20126 Milano*  
*Gabriele Casazza, Luigi Minuto, DIP.TE.RIS, Università di Genova, Corso Dogali 1M, Genova*

## Dati preliminari sulla filogenesi molecolare di *Lomelosia* Rafin. (*Dipsacaceae*)

M. AVINO, A. ESPOSITO e P. CAPUTO

**ABSTRACT** - Preliminary data on the molecular phylogeny of *Lomelosia* Rafin. (*Dipsacaceae*) - *Lomelosia* is a genus including over 50 annual and perennial species distributed in the Mediterranean area and its neighbouring south-eastern regions with outliers reaching Far East. A phylogenetic investigation on 17 species of the genus and an appropriate set of outgroups, based on nuclear (Internal Transcribed Spacer regions of the ribosomal DNA) and chloroplast (*trnL-trnF* intergenic spacer) DNA regions gave a fully resolved cladogram. The topology of this cladogram indicates, to the extent of the investigated *taxa*, that the basalmost species of *Lomelosia* is annual and that *Pycnocomon rutifolium* is nested in *Lomelosia*. Several morphological characters which were in the past regarded as potentially synapomorphic are indeed homoplasious; also in *Lomelosia*, as in other *taxa* of *Dipsacaceae*, selective pressures constrained several morphological traits of adaptive value, so originating similar morphologies in unrelated *taxa*.

*Key words*: molecular phylogeny, *Dipsacaceae*, *Lomelosia*, *Scabiosa*

### INTRODUZIONE

Le *Dipsacaceae* Juss. (*Dipsacales* Lindley) costituiscono una piccola famiglia (13 generi, 300-350 specie) distribuita principalmente nel bacino mediterraneo, con specie che si ritrovano anche in Medio ed Estremo Oriente e in Africa centrale e meridionale. La famiglia è senza dubbio monofiletica (EHRENDORFER, 1964; VERLÁQUE, 1977, 1984a,b; CAPUTO, COZZOLINO, 1994), e le sue sinapomorfie sono l'epicalice che racchiude l'achenio e l'infiorescenza a capolino. La monofilia della famiglia è stata anche dimostrata dal punto di vista molecolare (CAPUTO *et al.*, 2004).

Tuttavia, le delimitazioni tra generi e tribù all'interno delle *Dipsacaceae* sono state oggetto di numerose controversie, specialmente come conseguenza dei diffusi parallelismi in caratteri morfologici provvisti di valore adattativo (CAPUTO *et al.*, 2004). Nelle ultime due decadi, dopo gli studi di VERLÁQUE (1984a, 1985, 1986a, b) e DEVESA (1984) ed alcuni interventi nomenclaturali (DEVESA, 1984; GREUTER, BURDET, 1985), *Scabiosa* L. s. l. è stata suddivisa in molteplici unità monofiletiche indipendenti (non sempre strettamente correlate). Successivamente, LÓPEZ GONZÁLES (1987) e MAYER, EHRENDORFER (2000), hanno mostrato che, come *Scabiosa*, anche *Pterocephalus* (Vaill.) Adans. s. l. includeva diverse entità non correlate. MAYER, EHRENDORFER (1999)

hanno dato anche un inestimabile contributo al miglioramento nella conoscenza della circoscrizione dell'intera tribù delle *Scabioseae*. Come conseguenza del loro lavoro, che principalmente riguardava l'omologia delle parti dell'epicalice (con un riferimento speciale alla sua regione distale, che spesso si differenzia in un'espansione membranacea chiamata corona), le *Scabioseae* oggi includono solo *Lomelosia* Rafin., *Pterocephalus* s.s., *Pycnocomon* Hoffmans. et Link, *Scabiosa* s.s. (con *Sixalix* Rafin. = *Scabiosa* sect. *Cyrtostemma* nel loro studio). All'interno di questo gruppo, *Lomelosia* e *Pycnocomon* sono sister *taxa* e *Pterocephalus* è in relazione di sister group con *Scabiosa*. Tale delimitazione ristretta delle *Scabioseae* è stata confermata su base molecolare da CAPUTO *et al.* (2004), in un'analisi filogenetica a livello di genere dell'intera famiglia (solo *Pterocephalodes* Mayer et Ehrend. non era rappresentato). Gli stessi autori suggeriscono anche che gli adattamenti alla dispersione delle diaspore siano stati la forza trainante dell'evoluzione delle *Dipsacaceae* e che pressioni selettive simili abbiano parallelamente prodotto morfologie dell'epicalice e modalità di dispersione analoghe. Ad oggi, nessuna analisi filogenetica molecolare è disponibile per un singolo genere delle *Dipsacaceae*, nonostante molti generi mostrino tendenze evolutive che in passato sono state trattate come indicatori di

relazioni filogenetiche e che potrebbero essere invece parallelismi (ad esempio, dettagli morfologici del tubo dell'epicalice e della corona, taglia delle reste dell'epicalice, simmetria dei singoli fiori).

Il presente contributo affronta l'analisi filogenetica molecolare del genere *Lomelosia*. *Lomelosia* include circa 50 specie annuali e perenni, distribuite prevalentemente nel bacino mediterraneo e in Medio Oriente; alcune di esse raggiungono la regione himalayana.

La caratteristica più evidente di questo genere è la presenza di un epicalice fortemente elaborato, con la parte distale del tubo che si invagina in otto foveole. Il tubo dell'epicalice termina con un diaframma; distalmente ad esso vi è l'epidiaframma che si espande in una corona membranacea. Il calice, la cui parte basale attraversa il diaframma, è composto da cinque (otto-dieci in *L. brachiata*) reste rigide. *Lomelosia* è probabilmente monofiletico, poiché tutte le specie mostrano un epidiaframma allungato ed orizzontale, otto foveole profonde nel tubo dell'epicalice, che è rinforzato da due anelli sclerenchimatici (MAYER, EHRENDORFER, 1999), caratteri tutti sinapomorfici. La dispersione è mediata dal vento, ma il calice può contribuire all'aderenza al substrato o all'epizocoria. Un'ipotesi filogenetica basata sulla morfologia è già disponibile per il genere (DE CASTRO, CAPUTO, 2001). Uno degli obiettivi del presente contributo è quello di valutare se quelli che sembrano tratti morfologici derivati e condivisi siano o meno parallelismi diffusi.

Le regioni del DNA impiegate sono state gli Spaziatori Intergenici Trascritti (ITS) del DNA ribosomiale nucleare (nrDNA), che sono considerati filogeneticamente utili a livello di genere (BALDWIN *et al.*, 1995), e la regione dello spaziatore intergenico *trnL-trnF* (*trnL-trnF* IGS) del DNA plastidiale, anch'esso comunemente usato nelle analisi tassonomiche in circoscrizioni ristrette (GIELLY, TABERLET, 1995a, b, 1996).

#### MATERIALI E METODI

Individui in fiore o saggi d'erbario appartenenti a specie del genere *Lomelosia* sono stati campionati, con lo scopo di ottenere una rappresentazione della biodiversità nel genere. Sono state impiegate *L. argentea* (L.) Greuter et Burdet, *L. brachiata* (Sibth. et Smith) Greuter et Burdet, *L. calocephala* (Boiss.) Greuter et Burdet, *L. candollei* (Wall. Ex DC.) Soják, *L. caucasica* (M. Bieb.) Greuter et Burdet, *L. cretica* (L.) Greuter et Burdet, *L. flavida* (Boiss. et Haussnek.) Soják, *L. graminifolia* (L.) Greuter et Burdet, *L. leucactis* (Patzak) Soják, *L. micrantha* (Desf.) Greuter et Burdet, *L. palaestina* (L.) Rafin., *L. reuteriana* (Boiss.) Greuter et Burdet, *L. rhodopensis* (Stoj. et Stefanov) Greuter et Burdet, *L. rotata* (M.B.) Greuter et Burdet, *L. simplex* (Desf.) Rafin., *L. sphaciotica* (Roem. et Schult.) Greuter et Burdet, *L. stellata* (L.) Rafin. In aggiunta alle specie menzionate, rappresentanti dei rimanenti generi delle *Scabioseae* ed una selezione di specie delle *Dipsaceae*

sono stati utilizzati come outgroup (per una totale di 28 *taxa*). Il DNA totale è stato estratto come riportato in CAPUTO *et al.* (2004); gli ITS 1 e 2 e i *trnL-trnF* IGS sono stati amplificati tramite PCR secondo le condizioni di CAPUTO *et al.* (2004), usando i primer ivi descritti per gli ITS, e quelli riportati da TABERLET *et al.* (1991) per i *trnL-trnF* IGS. I prodotti di PCR sono stati purificati usando il kit Microcon 100 (Amicon, Danvers, MA, U.S.A.) e sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando un sistema ciclico di sequenziamento del doppio filamento di DNA con marcatori fluorescenti. Le reazioni di sequenza sono state poi caricate nel sequenziatore di DNA 373A Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.).

Gli allineamenti sono stati ottenuti utilizzando Clustal X (THOMPSON *et al.*, 1997) con i parametri di default, eccetto per il parametro MAXDIV (che controlla il ritardo dell'allineamento per le sequenze più divergenti), che è stato settato all'80%. Sei caratteri fittizi (N) sono stati aggiunti al termine 3' dell'ITS1 in tutti i *taxa* per prevenire eventuali disallineamenti.

Le sequenze allineate sono state poi visualizzate per correggere eventuali distribuzioni dei gap prive di significato biologico. Le sequenze sono state poi combinate ed utilizzate per l'analisi cladistica. Le inserzioni e delezioni (indel) sono state trattate come dati mancanti.

Tutte le operazioni sulle matrici e le analisi cladistiche sono state effettuate impiegando il software Winclada (NIXON, 1999), che utilizza Nona (GOLOBOFF, 1999) come sottoprocesso, con i seguenti parametri: hold 100000; hold/100; mult\*100; max. Gli stessi software sono stati usati per analisi di decadimento dei cladi (BREMER, 1994), fino 10 passi evolutivi in più rispetto alle soluzioni a massima parsimonia.

#### RISULTATI

L'analisi cladistica della matrice combinata (lunghezza della matrice ITS: 501 caratteri, dei quali 381 non informativi; lunghezza della matrice *trnL-trnF* IGS: 377 caratteri, dei quali 352 sono informativi) ha prodotto un singolo albero a massima parsimonia (Lunghezza=588, Indice di Consistenza=0.67, Indice di Ritenzione=0.65; escludendo i caratteri non informativi, L=419, C.I.=0.54, R.I.=0.65), mostrato in Fig. 1. L'ingroup mostra *L. brachiata* come il *taxon* basale e un clado più interno, a sua volta diviso in due gruppi monofiletici, uno dei quali include *L. flavida* e *L. candollei* e l'altro che comprende tutti gli altri *taxa*. All'interno di quest'ultimo gruppo sono visibili diversi cladi. Tra questi, si menzionano un gruppo che contiene *L. simplex*, *L. palaestina* e *L. stellata*, uno con *L. graminifolia* e *L. rhodopensis*, un altro con *L. argentea* e *L. sphaciotica*, un gruppo che include *L. leucactis* e *Pycnocomon rutifolium*, ed infine un gruppo con *L. calocephala* e *L. rotata*. Il supporto di BREMER (1994) per l'ingroup è generalmente basso, con poche ma notevoli eccezioni.



Fig. 1

Singolo cladogramma a massima parsimonia per le specie di *Lomelosia* analizzate (lunghezza = 588, C. I. = 0.67, R. I. = 0.65; dopo la rimozione dei caratteri non informativi, l = 419, C.I. = 0.54, R.I. = 0.65). I numeri al di sopra degli internodi indicano le apomorfie; quelli al di sotto il supporto di BREMER (1994).

Single MP cladogram for the investigated species of *Lomelosia*. (length = 588, Consistency Index = 0.67, Retention Index = 0.65; by excluding uninformative characters, l = 419, C.I. = 0.54, R.I. = 0.65). Numbers above internodes represent apomorphies; numbers below internodes represent BREMER (1994) support.

## DISCUSSIONE

Le specie in studio sono state scelte perché rappresentative della diversità nel genere e con l'obiettivo di un'ampia rappresentazione geografica. Infatti, sono state incluse piante con differenti habitus di crescita, da annuali (per esempio *L. brachiata*) ad arbustivi (per esempio *L. cretica*); specie con epicalici da grandi (per esempio *L. stellata*) a piccoli (per esempio *L. flavida*); specie con distribuzione da occidentale (per esempio *L. stellata*) a orientale (per esempio *L. calocephala*).

L'analisi filogenetica qui presentata, pur nei limiti dell'assenza di alcune specie critiche, fornisce nuove prospettive sulla filogenesi di *Lomelosia*. Il modello di discendenza mostrato è piuttosto diverso da quello suggerito dalla morfologia (VERLÁQUE, 1986b; DE CASTRO, CAPUTO, 2001) e indica che, anche al di sotto del livello di genere, nella famiglia i parallelismi dei caratteri con valore adattativo sono molto diffusi. La specie basale tra quelle utilizzate è un'annuale piuttosto aberrante, *Lomelosia brachiata*. Questa specie, distribuita nell'area centrale ed orientale del Mediterraneo, è l'unica nel genere *Lomelosia* a possedere 10 reste calicine pelose (esistono rare variazioni nel numero), invece di cinque, come succede nel

resto del genere (e nel genere correlato *Scabiosa*). Per questo motivo, *L. brachiata* è incontrastata soggetta ad una storia nomenclaturale abbastanza intricata, venendo trattata come una specie di *Knautia* L., *Pterocephalus* o *Scabiosa* L., od anche come genere monospecifico, *Tremastelma* Rafin. o *Callistemma* Boiss. *L. brachiata* fino ad ora è stata intuitivamente trattata come un membro derivato nel suo genere, a causa del suo habitus annuale, con capolini fortemente raggianti (cioè con fiori periferici zigomorfi), un epicalice derivato ed un numero cromosomico ( $n = 7$ ) che è fortemente indicativo di dispoloidia decrescente a partire dal numero cromosomico più comune nelle altre specie del genere ( $n = 9$ ) (VERLÁQUE, 1986b; DE CASTRO, CAPUTO, 1999 [2001]; MAYER, EHRENDORFER, 1999). Anche il ramo immediatamente più interno nel cladogramma di Fig. 1 include una specie annuale, *L. flavida*, impiegata come rappresentante della sect. *Olivierianae* (Rech. f.) V. Mayer & Ehrend., la quale è stata considerata, insieme agli altri membri della stessa sezione, come fortemente derivata (VERLÁQUE, 1986b; MAYER, EHRENDORFER, 1999); *L. candollei*, benché esclusa dalla sect. *Olivierianae* principalmente a causa del suo habitus perenne, è sufficientemente simile a *L.*



*flavida* da essere stata inclusa da VERLÁQUE (1986b) nello stesso gruppo informale.

Di grande interesse è la posizione di *Pycnocomon*. Questo genere, che in passato non era stato ritenuto immediatamente prossimo a *Lomelosia* (VERLÁQUE, 1986a; CAPUTO, COZZOLINO, 1994), oggi, invece, ne è considerato il sister group, sia da un punto di vista morfologico (MAYER, EHRENDORFER, 1999) che molecolare (CAPUTO *et al.*, 2004). In Fig. 1, tuttavia, *Pycnocomon* (o almeno *P. rutifolium* impiegato in questa analisi) è incluso in *Lomelosia*. Esso, perciò, andrebbe considerato solo come una specie aberrante di *Lomelosia* con brattee involucrali connate, un carattere distintivo del genere secondo VERLÁQUE (1986a) e MAYER, EHRENDORFER (1999), e con foveole poco profonde. Probabilmente, data l'ecologia della specie, che cresce principalmente in aree sabbiose, l'epicalice si sarebbe modificato a partire da un epicalice del tipo di quello di *Lomelosia*, per facilitare il rotolamento su sabbia (VERLÁQUE, 1986a). Tale adattamento è presente anche in varie specie di *Scabiosa* sect. *Cyrtostemma*, un gruppo ritenuto in passato strettamente correlato a *Pycnocomon* (VERLÁQUE, 1986a; CAPUTO, COZZOLINO, 1994). Infine, relativamente alla posizione di *Pycnocomon* nell'analisi filogenetica, è interessante notare che il mantenere *Lomelosia* come unità monofiletica che non includa *Pycnocomon* determina un incremento di almeno tre passi evolutivi rispetto all'ipotesi di massima parsimonia, (cioè L=591 invece di L=588). Proporre commenti dettagliati sulle relazioni tra tutte le specie mostrate in Fig. 1 sarebbe prematuro, poiché l'analisi include approssimativamente solo un terzo delle specie del genere. Tuttavia si rileva che, escludendo pochissimi casi di relazioni di strettissima prossimità già note (che non sono necessariamente da intendersi come relazioni di sister group, data l'assenza di vari taxa), molto poco di quanto presente nella topologia di Fig. 1 è congruente con il modello di discendenza suggerito dalla morfologia (VERLÁQUE, 1986b; DE CASTRO, CAPUTO, 2001). Tra i gruppi prossimi nel cladogramma, per i quali era già documentata forte affinità morfologica, si menzionano *L. candollei*/*L. flavida*, *L. graminifolia*/*L. rhodopensis*, *L. argentea*/*L. sphaciotica*, *L. rotata*/*L. calocephala*. A parte queste ovvie relazioni, il modello di discendenza in *Lomelosia* non corrisponde a quanto noto in passato. Considerato che varie specie [in particolare le presumibili specie arcaiche *L. camelorum* (Coss. & Durieu) Greuter et Burdet, *L. cypriaca* (Post) Greuter et Burdet, *L. kurdica*, *L. kurdica* (Post) Greuter & Burdet e *L. paucidentata* (Hub.-Mor.) Greuter et Burdet)] sono assenti dall'analisi qui presentata, non si può essere certi che le specie meno derivate del genere siano annuali. L'habitus annuale, tuttavia, sembra essersi evoluto diverse volte nel genere; tutti i membri basali del genere osservabili in Fig. 1, fino a *L. stellata* (e con l'eccezione di *L. candollei*) sono annuali; il clado che include *L. cretica*, *L. graminifolia* e *L. rhodopensis* è composto da piante perenni legnose o da arbusti; *L. argentea*, *L. sphaciotica*, *L. caucasica*, sono perenni; *L. leucactis*, *L.*

*micrantha*, *L. reuteriana*, *L. calocephala* e *L. rotata* sono annuali. Lo stesso tipo di variazione parallela negli stati dei caratteri sembrerebbe apparire anche in altre caratteristiche morfologiche, come la forma del tubo dell'epicalice, il numero dei nervi della corona, le dimensioni del calice in rapporto alla corona. I parallelismi, perciò, sembrano essere molto diffusi nel genere. Solo ulteriori studi, che impieghino ulteriori regioni di DNA per un numero più elevato di specie, permetteranno una valutazione accurata della distribuzione del parallelismo in quei caratteri provvisori di valore adattativo che sono stati in passato erroneamente interpretati come sinapomorfie.

#### LETTERATURA CITATA

- BALDWIN B.G., SANDERSON M.J., PORTER M.J., WOJCIECHOWSKI M.F., CAMPBELL C.S., DONOGHUE M.J., 1995 – *The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence in angiosperm phylogeny*. Ann. Missouri Bot. Gard., 82: 247-277.
- BREMER K., 1994 – *Branch support and tree stability*. Cladistics, 10: 295-304
- CAPUTO P., COZZOLINO S., 1994 – *A cladistic analysis of Dipsacaceae (Dipsacales)*. Plant Syst. Evol., 189: 41-61.
- CAPUTO P., COZZOLINO S., MORETTI A., 2004 – *Molecular phylogenetics of Dipsacaceae reveals parallel trends in seed dispersal syndromes*. Plant Syst. Evol., 246: 163-175.
- DE CASTRO O., CAPUTO P., 2001 – *A phylogenetic analysis of genus Lomelosia Rafin. (Dipsacaceae) and allied taxa*. Delpinoa, n.s., 41 (1999): 29-45.
- DEVESA J.A., 1984 – *Pseudoscabiosa, genere nuevo de Dipsacaceae*. Lagascalia, 12: 213-221.
- EHRENDORFER F., 1964 – *Über stammesgeschichtliche Differenzierungsmuster bei den Dipsacaceen*. Ber. Deutschen Bot. Gesellsch., 77: 83-94.
- GIELLY L., TABERLET P., 1995a – *Chloroplast DNA polymorphism at the intrageneric level: incidences in resolving plant phylogenies*. Compte Rendu Acad. Sci. III, Sciences de la Vie, 317: 685-692.
- , 1995b – *The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: non-coding versus rbcL sequences*. Mol. Biol. Evol., 11: 769-777.
- , 1996 – *A phylogeny of European gentians inferred from chloroplast trnL (UAA) intron sequences*. Bot. J. Linn. Soc. 120: 57-75.
- GOLOBOFF P., 1999 – *Nona. Instruction manual*. Published by the author, S. M. de Tucumán, Argentina.
- GREUTER W., BURDET R., 1985 – Dipsacaceae. In: GREUTER W., RAUS T., (Eds.), *Med-Checklist Notulae 11*. Willdenowia, 15: 71-76.
- LÓPEZ GONZÁLES G., 1987 – *Pterocephalidium, un nuevo género ibérico de la familia Dipsacaceae*. An.Jard. Bot. Madrid, 43: 245-252.
- MAYER V., EHRENDORFER F., 1999 – *Fruit differentiation, palynology, and systematics in the Scabiosa group of genera and Pseudoscabiosa (Dipsacaceae)*. Plant Syst. Evol., 216: 135-166.
- , 2000 – *Fruit differentiation, palynology, and systematics in Pterocephalus Adanson and Pterocephalodes, gen. nov. (Dipsacaceae)*. Bot. J. Linn. Soc., 132: 47-78.
- NIXON K.C., 1999 – *Winclada (beta) ver. 0.9.9*. Published by the author, Ithaca, NY.
- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU L., BOUVET J., 1991 –

- Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA.* Plant Mol. Biol., 17: 1105-1109.
- THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAC F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D.G., 1997 – *The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.* Nucleic Acids Res., 24: 4876-4882.
- VERLAQUE R., 1977 – *Importance du fruit dans la détermination des Dipsacaceae.* Bull. Soc. Bot. France, 124: 515-527.
- , 1984a – *A biosystematic and phylogenetic study of the Dipsacaceae.* In: GRANT R. (Ed.), *Plant biosystematics*: 307-320. Academic Press, Toronto.
- , 1984b – *Étude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. I. – Délimitation des Dipsacaceae à l'intérieur des Dipsacales, rapports avec les autres familles de l'ordre.* Rev. Gen. Bot., 91: 81-121.
- , 1985 – *Étude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. II – Caractères généraux des Dipsacaceae.* Rev. Cytol. Biol. Vég. Le Botaniste, 8: 117-168.
- , 1986a – *Étude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. IV – Tribus des Scabioseae (phylum n° 1, 2, 3).* Rev. Cytol. Biol. Vég. Le Botaniste, 9: 5-72.
- , 1986b – *Étude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. V – Tribus des Scabioseae (phylum n° 4) et conclusion.* Rev. Cytol. Biol. Vég. Le Botaniste, 9: 97-176.
- RIASSUNTO– *Lomelosia* è un genere che include più di 50 specie annuali e perenni, distribuite nella regione mediterranea e in Medio Oriente, raramente estendendosi fino all'Asia orientale. E' stata effettuata un'analisi filogenetica molecolare su 17 specie del genere con outgroup appropriati; sono state impiegate sequenze di DNA nucleare (gli spaziatori interni trascritti del DNA ribosomale) e plastidiali (lo spaziatore intergenico *trnL-trnF*). Il singolo cladogramma a massima parsimonia risultante indica, nei limiti dei *taxa* impiegati, che la specie basale del genere è annuale e che *Pycnocomon rutifolium* è interno a *Lomelosia*. Vari caratteri morfologici, che in passato erano considerati potenzialmente sinapomorfici, appaiono in realtà omoplasici; come in altre *Dipsacaceae*, anche in *Lomelosia* morfologie simili sono spesso la conseguenza di pressioni selettive analoghe esercitate su *taxa* non particolarmente correlati.

## AUTORI

Mariano Avino, Alfonso Esposito, Paolo Caputo, Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione Biologia Vegetale, Università di Napoli Federico II, Via Foria 223, 80139 Napoli

## Una specie vulnerabile della flora toscana: *Centaurea montis-borlae* (Asteraceae)

M. BORACCHIA

Sulle Alpi Apuane (Toscana), alle pendici del Monte Borla (1469 m d'altezza) è nota la presenza, altamente localizzata, di una rara specie endemica: *Centaurea montis-borlae* Soldano (Asteraceae).

Questa specie è stata descritta in tempi relativamente recenti (SOLDANO, 1978) e i contributi scientifici che la riguardano (VIEGI, CELA RENZONI, 1981) non esaminano in modo approfondito alcuni aspetti importanti, riguardanti soprattutto la distribuzione e la biologia riproduttiva della specie.

Il presente lavoro si è proposto di colmare la carenza di dati mediante approfondite indagini in campo ed analisi di laboratorio. In particolare, sono stati studiati in dettaglio vari aspetti inerenti *Centaurea montis-borlae*: la verifica e l'aggiornamento dell'area di distribuzione, le modalità di impollinazione, l'analisi degli acheni, la germinabilità, il numero cromosomico, la biologia della riproduzione e, infine, gli insetti che interagiscono con la specie (Fig. 1).

Le ricerche in campo hanno confermato tutte le stazioni già note in letteratura (FERRARINI, 2001). Inoltre, è stata rilevata la presenza di un individuo

sulle pendici del Monte Spallone, esternamente all'areale finora noto.

Le prove d'impollinazione hanno permesso di escludere la possibilità da parte della specie di effettuare auto-impollinazione; solo l'impollinazione di tipo incrociato garantisce la formazione di acheni fertili e vitali. È stato, altresì, notato che la maggior parte degli acheni prodotti presenta danni, soprattutto nella zona dell'elaiosoma, provocati da alcune specie di insetti, in modo particolare appartenenti alla famiglia *Tephritidae*.

Le prove di germinazione hanno evidenziato una maggiore percentuale di germinazione negli acheni sottoposti per circa un mese a vernalizzazione rispetto a quelli messi direttamente a germinare.

Il numero cromosomico somatico di *Centaurea montis-borlae* è  $2n = 88$  (Fig. 2), il che evidenzia un elevato grado di ploidia.



Fig. 1.  
*Centaurea montis-borlae* in fioritura.  
Flowering *Centaurea montis-borlae*.

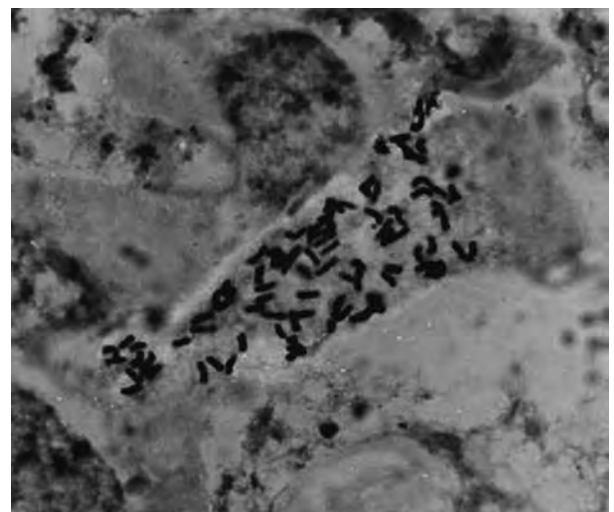


Fig. 2  
Piastra metafasica somatica di *Centaurea montis-borlae* ( $2n=88$ ).  
Mitotic metaphase plate of *Centaurea montis-borlae* ( $2n=88$ ).

Gli studi embriologici hanno confermato un normale sviluppo del gametofito maschile. Per quanto concerne lo sviluppo del gametofito femminile, invece, non è stato osservato il tipico modello 8-nucleato. A maturità sono stati riscontrati degli stadi con 4 cellule ben separate l'una dall'altra.

È emersa la necessità di ulteriori studi e approfondimenti, attualmente in corso, per stabilire con precisione lo sviluppo della linea femminile.

*Ringraziamenti* – Si ringraziano il prof. Fabio Garbari e la

prof.ssa Lucia Viegi del Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa, relatori di questo lavoro di tesi.

#### LETTERATURA CITATA

FERRARINI E., 2001 – *Prodromo alla Flora della Regione Apuana*. 3. Accad. Lunig. Scienze "G. Cappellini", La Spezia.

SOLDANO A., 1978 – *Centaurea montis-borlae, specie nuova delle Alpi Apuane*. Giorn. Bot. Ital., 112: 399-402.

VIEGI L., CELA RENZONI G., 1981 – *Numeri cromosomici per la flora italiana: 831-835*. Inform. Bot. Ital., 13: 168-171.

#### AUTORI

*Mirko Boracchia, Dipartimento di Biologia, Università di Pisa, Via Luca Ghini 5, 56126 Pisa*



## Dinamica evolutiva di regioni codificanti e non codificanti del gene HMG2 in *Lycopersicum*

L. CECCHI

La sottosezione *Lycopersicum*, parte del vasto e cosmopolita genere *Solanum*, comprende una decina di specie di piante erbacee di origine sudamericana, morfologicamente ben caratterizzate e ascritte fino a tempi recenti ad un genere distinto (SPOONER *et al.*, 1993).

Data l'importanza economica che una di esse, il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.), riveste ormai in molti paesi, la biologia di questo gruppo di piante è stata ampiamente studiata dal punto di vista fisiologico, biochimico e genetico, e un volume consistente di pubblicazioni è stato dedicato alle relazioni evolutive che intercorrono tra i suoi membri.

Quest'ultimo argomento è stato affrontato sulla base di informazioni morfologico-strutturali e genetiche e, più di recente, attraverso indagini biomolecolari, ma alcuni aspetti della sistemica di *Lycopersicum* non sono stati ancora del tutto chiariti (MC CLEAN, HANSON, 1986; ALVAREZ *et al.*, 2001; MARSHALL *et al.*, 2001; NESBITT, TANKSLEY, 2002).

Scopo di questo lavoro è stato quello di operare l'analisi comparativa di regioni funzionalmente differenziate di un'isoforma inducibile del gene *hmg*, che codifica la 3-idrossi-3-metilglutaril CoA riduttasi (HMGR), enzima chiave nella regolazione della via biosintetica degli isoprenoidi, valutando quale possa essere il valore informativo di sequenze di questo tipo alla luce del loro ruolo strutturale e delle ipotesi preesistenti sull'evoluzione di *Lycopersicum*.

A tal fine regioni codificanti e non codificanti del gene, da undici accessioni rappresentative di tutte le specie del gruppo, sono state amplificate per PCR mediante l'uso di primers specifici, opportunamente disegnati sulla sequenza del gene *hmg2* di *Solanum lycopersicum* depositata in banca dati. Successivamente i frammenti amplificati sono stati clonati in plasmidi e sequenziati.

La valutazione del valore informativo delle variazioni di sequenza, ai fini delle relazioni filogenetiche tra le specie, è stata effettuata con la costruzione di alberi filogenetici basati su algoritmi di allineamento multiplo di sequenza.

Il grado di polimorfismo nelle diverse regioni del gene è in buon accordo coi risultati attesi sulla base del differente ruolo che compete loro.

La maggior parte degli SNPs e degli INDELS tra le accessioni si concentra a livello dell'introne e, soprattutto, della regione *upstream* del gene.

Al contrario, tanto la sequenza del quarto esone – codificante la parte terminale del dominio catalitico dell'enzima – quanto la regione a valle di questa si mostrano altamente conservate, verosimilmente per effetto di forti costrizioni funzionali a loro carico.

Tali differenze sono confermate dall'analisi cladistica. Mentre i filogrammi ottenuti sulla base degli allineamenti delle due UTRs, della porzione codificante e della regione *downstream* risultano scarsamente informativi e tra loro discordi, quelli relativi alle sequenze della regione del promotore, e ancor più del terzo introne, sono in buon accordo con quanto ottenuto in precedenza dall'analisi di sequenze nucleari e organellari (MARSHALL *et al.*, 2001; NESBITT, TANKSLEY, 2002).

Pur restando irrisolti alcuni aspetti delle relazioni interspecifiche tra specie particolarmente polimorfiche o soggette a fenomeni introgressivi, questo risultato preliminare dimostra come l'*hmg* possa costituire un buon marcatore filogenetico a livello infragenerico.

Si conferma inoltre, al di là di aspetti meramente tecnici e computazionali, come porzioni funzionalmente differenziate di un dato *locus*, soggette a tassi di mutazione diversi e ad una diversa pressione selettiva, possano contribuire in maniera altrettanto diversificata alla storia evolutiva di un gruppo.

*Ringraziamenti* – Si ringraziano il prof. Marcello Buiatti e la dott.ssa Patrizia Bogani, dell'Università di Firenze, relatori di questo lavoro di tesi.

### LETTERATURA CITATA

ALVAREZ A.E., VAN DE WIEL C.C.M., SMULDERS M.J.M., VOSMAN B., 2001 – *Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus Lycopersicon*. Theor. Appl. Genet., 103: 1283-1292.

- MARSHALL J.A., KNAPP S., DAVEY M.R., POWER J.B., COCKING E.C., BENNETT M.D., COX A.V., 2001 – *Molecular systematics of Solanum section Lycopersicum (Lycopersicon) using the nuclear ITS rRNA region*. Theor. Appl. Genet., 103: 1216-1222.
- MC CLEAN P.E., HANSON M.R., 1986 – *Mitochondrial DNA sequence divergence among Lycopersicon and related Solanum species*. Genetics, 112: 649-667.
- NESBITT T.C., TANKSLEY S.D., 2002 – *Comparative sequencing in the genus Lycopersicon: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes*. Genetics, 162: 365-379
- SPOONER D.M., ANDERSON G.J., HANSEN R.K., 1993 – *Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes and pepinos (Solanaceae)*. Amer. J. Bot., 80: 676-688.

## AUTORI

Lorenzo Cecchi, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Firenze, Via G. La Pira 4, 50121 Firenze

## Nuove metodiche per la caratterizzazione e identificazione del germoplasma di piante spontanee mediante analisi d'immagine

G. BACCHETTA, O. GRILLO, E. MATTANA e G. VENORA

Viene presentata una nuova metodologia elaborata per la caratterizzazione e l'identificazione di diaspore di piante spontanee, sviluppata nell'ambito della collaborazione attivata nel 2006, mediante la firma di un protocollo d'intesa, tra la Stazione Sperimentale di Granicoltura della Sicilia di Caltagirone e il Centro Conservazione Biodiversità del Dipartimento di Scienze Botaniche, Università degli Studi di Cagliari. Tale collaborazione prevede l'applicazione dell'analisi d'immagine al germoplasma di specie autoctone della flora della Sardegna, e più in generale del bacino del Mediterraneo, al fine di caratterizzare, utilizzando parametri morfometrici e colorimetrici, le accessioni in ingresso in una banca del germoplasma.

Le tecniche di analisi d'immagine, che consentono di effettuare rapidamente misure precise e ripetibili sia del colore, sia della dimensione e forma degli oggetti contenuti in una immagine, da tempo vengono infatti applicate con successo in alcune specie d'interesse agrario (PETERSEN, KRUIZ, 1992; CHURCHILL *et al.*, 1993; LIAO *et al.*, 1994; JANSEN, 1995; WAN, 1999; McDONALD *et al.*, 2001; GRANITTO *et al.*, 2003a, b; DELL'AQUILA, 2006; VENORA *et al.*, 2007a, b, 2008).

La metodologia elaborata per l'applicazione di tali tecniche al germoplasma di specie autoctone e i primi risultati ottenuti sono stati pubblicati *in extenso* da BACCHETTA *et al.* (2008).

Le immagini digitali del germoplasma conservato *ex situ* presso la Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR), sono state elaborate presso la Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia. Le accessioni analizzate si riferiscono a 148 unità tassonomiche appartenenti a 102 generi e 47 famiglie, tipiche della flora della Sardegna, e più in generale del bacino del Mediterraneo.

La procedura per l'acquisizione delle immagini è stata modificata a partire da quanto riportato in VENORA *et al.* (2007a, b).

Le immagini sono state acquisite per mezzo di uno scanner piano ed elaborate mediante una macro appositamente sviluppata, presso i laboratori della

Stazione di Granicoltura, per la misura delle caratteristiche morfometriche e colorimetriche di diaspore di flora spontanea (BACCHETTA *et al.*, 2008).

Il metodo sviluppato ha permesso l'implementazione di un database per la caratterizzazione del germoplasma autoctono in ingresso alla banca e la realizzazione di classificatori statistici per la discriminazione di generi e specie all'interno delle famiglie *Apiaceae*, *Boraginaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cistaceae*, *Fabaceae* e *Scrophulariaceae*. Tali classificatori, basati sulla tecnica della LDA (Linear Discriminant Analysis) e testati mediante Cross Validation, presentano una performance compresa tra 74,3% e 96,4%.

Inoltre, per la famiglia delle *Fabaceae* e più nello specifico per il genere *Astragalus*, è stato possibile elaborare un classificatore in grado di identificare *taxa* di rango specifico relativi a gruppi di specie affini (Fig. 1), ottenendo una performance compresa tra 83,7% e 100%. Mediante l'implementazione di ulteriori parametri di classificazione si è perfezionato il classi-

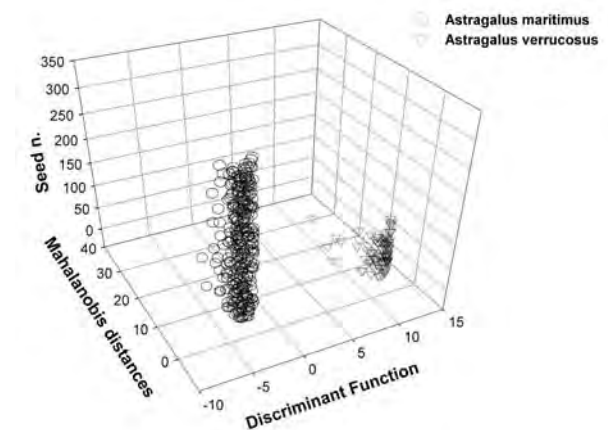


Fig. 1

Analisi Discriminante Lineare tra semi di *Astragalus maritimus* e *A. verrucosus* (tratto da MATTANA *et al.*, 2008).  
Linear Discriminant Analysis between *A. maritimus* and *A. verrucosus* seeds (from MATTANA *et al.*, 2008).

ficatore elaborato e si sono ottenute percentuali di corretta classificazione tra *Astragalus maritimus* Moris e *A. verrucosus* Moris pari al 100% (MATTANA *et al.*, 2008). Tali analisi hanno potuto dimostrare la validità della metodologia testata anche dal punto di vista tassonomico.

Il database è in continua evoluzione grazie all'implementazione delle immagini relative ai lotti in ingresso a BG-SAR, pertanto il sistema di classificazione viene costantemente perfezionato.

Vengono altresì proposte ulteriori evoluzioni metodologiche che possono presentare applicazioni in altri settori di ricerca. L'implementazione di un sistema di questo tipo può rappresentare, infatti, un valido ausilio a livello di genere, per la determinazione di semi di specie sconosciute nell'analisi delle banche dei semi del suolo, in studi ecologici o di tipo archeobotanico e, a livello infragenerico, per la determinazione e revisione di gruppi tassonomici critici o attualmente in fase di revisione.

#### LETTERATURA CITATA

- BACCHETTA G., GRILLO O., MATTANA E., VENORA G. 2008 – *Morpho-colorimetric characterization by image analysis to identify diaspores of wild plant species*. *Flora*, 203(8), in stampa.
- CHURCHILL D.B., BILSLAND D.M., COOPER T.M., 1993 – *Separation of mixed lots of tall fescue and ryegrass seed using machine vision*. *Trans. ASAE*, 36: 1383-1386.
- DELL'AQUILA A., 2006 – *Computerised seed imaging: a new tool to evaluate germination quality*. *Commun. Biometry Crop Sciences*, 1(1): 20-31.
- GRANITTO P.M., GARRALDA P.A., VERDES P.F., CECCATO H.A., 2003a – *Boosting classifiers for weed seeds identification*. *J. Comput. Sci. Technol.*, 3(1): 34-39.
- GRANITTO P.M., VERDES P.F., CECCATO H.A., 2003b – *Automatic identification of weed seeds*. Buenos Aires, JAIIO 2003, 32° Intern. Conf. Argentine Computer Science and Operational Research Society.
- JANSEN, P.I., 1995 - *Seed production quality in Trifolium balansaе and T. resupinatum: The role of seed colour*. *Seed Sci. Technol.*, 23: 353-364
- LIAO K., PAULSEN M.R., REID J.F., 1994 – *Real-time detection of colour and surface defects of maize kernels using machine vision*. *J. Agr. Eng. Res.*, 59: 263-271.
- MATTANA E., GRILLO O., VENORA G., BACCHETTA G., 2008 – *Germplasm image analysis of Astragalus maritimus and A. verrucosus* (Subgen. *Trimeniaeus*). *An. Jard. Bot. Madrid*, 65(1): 149-155.
- MCDONALD M.B., EVANS A.F., BENNET M.A., 2001 – *Using scanners to improve seed and seedling evaluations*. *Seed Sci. Technol.*, 29: 683-689.
- PETERSEN P.E.H., KRUTZ G.W., 1992 – *Automatic identification of weed seeds by colour machine vision*. *Seed Sci. Technol.*, 20: 193-208.
- VENORA G., GRILLO O., RAVALLI C., CREMONINI R., 2007b – *Tuscany beans landraces, on-line identifications from seeds inspection by image analysis and Linear Discriminant Analysis*. *Agrochimica*, 51 (4-5): 254-268.
- VENORA G., GRILLO O., SACCONI R., 2008 – *Misura in tempo reale della quantità di cariossidi vitree, bianconate e striminzite di frumento duro mediante sistema di analisi d'immagine*. *Tecnica Molitoria*, 59(1): 5-15
- VENORA G., GRILLO O., SHAHIN M.A., SYMONS S.J., 2007a – *Identification of Sicilian landraces and Canadian cultivars of lentil using image analysis system*. *Food Res. Int.*, 40: 161-166.
- WAN Y.Y., 1999 – *The design of an automatic grain quality inspection system*. ASAE Annual Intern. Meeting Toronto, July 18-21, Paper No. 99-3200.

#### AUTORI

Gianluigi Bacchetta, Efsio Mattana, Centro Conservazione Biodiversità (CCB), Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Cagliari, Viale S. Ignazio da Laconi 13, 09123 Cagliari, e-mail bgsar@ccb-sardegna.it  
Oscar Grillo, Gianfranco Venora, Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, Via Bouganvillea 20, 95041 Caltagirone (Catania), e-mail lab.biologia@granicoltura.it