

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA ONLUS

GRUPPO PER LA BIOSISTEMATICA VEGETALE

Convegno in omaggio
al Professor Fabio MAGGINI

**LA BIOSISTEMATICA VEGETALE OGGI.
DAGLI STUDI TRADIZIONALI AL DNA**

Viterbo
10-12 Aprile 2006

PREMESSA

Il Gruppo per la Biosistemica Vegetale ha svolto la riunione scientifica del 2006 presso la sede della Facoltà di Agraria dell'Università della Tuscia per rendere omaggio alla memoria del Prof. Fabio Maggini, che per molti anni ha rappresentato, nell'ambito del Gruppo, un saldo punto di riferimento per la sua disponibilità a condividere le sue innovative ricerche molecolari. Realizzata grazie alla sensibile iniziativa ed all'efficace impegno dei botanici di Viterbo, in particolare le Prof.sse A. Scoppola e M. Frediani, la manifestazione è stata validamente e generosamente sostenuta dall'Università della Tuscia, dalla Facoltà di Agraria, dal Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica e dal Centro Interdipartimentale dell'Orto Botanico. Merita di essere sottolineato il fatto che il Rettore Magnifico, Prof. Marco Mancini, il Preside, Prof. Edo Rugini, il Direttore del Dipartimento, Prof. Domenico Lafiandra, e il Direttore dell'Orto Botanico, Prof. Silvano Onofri hanno partecipato in modo tutt'altro che formale agli omaggi resi alla memoria del Prof. Fabio Maggini ed hanno seguito i lavori previsti fino ai saluti finali.

Per quanto riguarda le manifestazioni di omaggio, ritengo che ciascuno dei relatori ha efficacemente contribuito a ricordare le qualità umane e l'impegno scientifico dell'amico e del collega prematuramente scomparso. Nelle prime pagine di questi atti sono riportati gli interventi della Prof.ssa M. Frediani, che avendo strettamente collaborato con Fabio Maggini ha ben delineato la sua carriera scientifica, del Prof. F.M. Ritossa, che ha descritto in modo toccante le doti per le quali lo scomparso si era distinto quando era suo allievo a Bari, e della Prof.ssa A. Scoppola, che ha ripercorso lo sviluppo delle attività botaniche

presso l'Università della Tuscia fin dalla sua istituzione. Al termine di questi interventi è stato consegnato ai familiari di Fabio Maggini un volume con la raccolta dei lavori scientifici da lui pubblicati, di cui inseriamo in queste pagine l'elenco, ed è stato loro rinnovato il sincero apprezzamento per le doti umane e professionali di cui Fabio godeva da parte di tutti i partecipanti.

Una concreta e spontanea testimonianza di questi sentimenti è emersa dalle 22 comunicazioni scientifiche presentate per la maggior parte da ricercatori giovani, validi e motivati (una sola delle comunicazioni non è riportata di seguito per scelta degli autori). Molti di essi hanno riferito di aver meglio sviluppato le loro ricerche dopo aver frequentato il gruppo di Maggini e grazie anche ai suoi personali consigli e incoraggiamenti. La validità e attualità della attività scientifica dello scomparso è stata ulteriormente attestata dalle comunicazioni presentate dal gruppo di Viterbo, che ha voluto che una di esse avesse Fabio Maggini come primo autore.

Nel complesso, le comunicazioni presentate hanno evidenziato una elevata qualità e la tendenza ad utilizzare più tipi di analisi (morfologiche, cariologiche, molecolari, di biologia della riproduzione) per lo studio di aspetti sistematico-evolutivi delle specie e dei gruppi tassonomici considerati. Infine, vorrei ricordare che la pubblicazione di questi Atti è stata possibile grazie al generoso sostegno finanziario accordato dall'Università della Tuscia e dalla Fondazione Carivit e alla collaborazione delle organizzatrici dell'incontro.

[a cura di A. MUSACCHIO]

INDICE DEI CONTRIBUTI

- M. FREDIANI - Un ricordo del Prof. Fabio Maggini
- M. FREDIANI e M.T. GELATI [a cura di] - Elenco delle pubblicazioni del Prof. Fabio Maggini
- F. RITOSSA - Fabio Maggini genetista a Bari
- A. SCOPPOLA e S. ONOFRI - Venticinque anni di Botanica nell'Ateneo di Viterbo
- F. BELLUSCI, G. PELLEGRINO, A.M. PALERMO e A. MUSACCHIO - Bassa divergenza molecolare ed elevata fertilità interspecifica nel genere *Serapias* (*Orchidaceae*)
- S. D'EMERICO, G. BARTOLO, S. PULVIRENTI, M.C. TERRASI, A. COGONI e A. SCRUGLI - Mutazioni cromosomiche nella Tribù *Neottieae* (*Orchidaceae*)
- G. VENORA e C. RAVALLI - Il cariotipo come strumento per la classificazione di specie vegetali: il genere *Vicia* L.
- P. CAPUTO, R. CREMONINI, G. VENORA e M. FREDIANI - Verso una filogenesi molecolare del genere *Vicia* L. (*Fabaceae*)
- F. GRASSI, F. DE MATTIA, G. ZECCA, S. SGORBATI, F. SALA e M. LABRA - Analisi filogeografica della vite selvatica mediante marcatori microsatelliti
- F. DE MATTIA, F. GRASSI, S. IMAZIO, G. LO VICU, S. SGORBATI e M. LABRA - La vite selvatica e coltivata in Sardegna: strategie di analisi e conservazione
- M. CECCARELLI, V. SARRI e P.G. CIONINI - DNA ripetitivo ed evoluzione delle specie vegetali
- M. AVINO, G. TORTORIELLO e P. CAPUTO - La filogenesi delle *Dipsacaceae*: evidenze preliminari da due genomi
- A. COPPI, F. SELVI e M. BIGAZZI† - Cromosomi e filogenesi in *Borago* L. (*Boraginaceae*)
- R. BELLAROSA, M.C. SIMEONE, B. SCHIRONE, S. FINESCHI, F. SEBASTIANI, G.G. VENDRAMIN e D. MAGRI - La diversità genetica in *Quercus suber* L., *Q. cerris* L. e *Q. crenata* Lam.: implicazioni filogenetiche e biogeografiche
- G. TUCCI, B. TROMBETTA, R.I. DE DOMINICIS, C. GREGORI e M.O. WINFIELD - Alcune centauree endemiche della flora d'Italia: analisi filogenetica mediante le sequenze ITS ed ETS dell'rDNA nucleare
- F. MAGGINI†, M.T. GELATI, M. SPOLVERINI e M. FREDIANI - Lo spaziatore intergenico dei geni ribosomali in *Olea europaea*
- L. PERUZZI - Studi biosistemici nel genere *Gagea* Salisb. (*Liliaceae*): recenti acquisizioni e problemi ancora aperti
- M. MATTEUCCI, F. AVANCINI e F. LUCCHESI - *Muscari parviflorum* Desf.: sistematica delle popolazioni e stato di conservazione nell'area dei Monti della Tolfa
- M. RUFFINI CASTIGLIONE, M. FREDIANI, M.T. GELATI, G. VENORA, C. RAVALLI e R. CREMONINI - *Vicia esdrae-lonensis* Warb. & Eig (Sezione *Hypechusa*): recupero di una specie a rischio di estinzione
- M.C. SIMEONE, A. SALIS, A. PAPINI, R. BELLAROSA e B. SCHIRONE - Indagini preliminari sulla filogeografia di *Taxus baccata* L. in Italia
- S. BRULLO, A. GUGLIELMO, P. PAVONE e C. SALMERI - Indagine biosistemica su *Scilla s.l.* in Italia e generi affini (*Hyacinthaceae*)
- A. SPADA, R. MANTEGAZZA e F. SALA - Cambiamento del germoplasma del riso (*Oryza sativa*) coltivato in Italia negli ultimi due secoli
- F. AVANCINI, M. MATTEUCCI e F. LUCCHESI - Identificazione delle popolazioni del gruppo *Ranunculus ficaria* L. dei Monti della Tolfa (Lazio)
- M.O. WINFIELD, G. TUCCI, B. TROMBETTA, R.I. DE DOMINICIS e G.F. D'AMATO - Filogenesi del genere *Scorzonera* L. attraverso l'uso di indagini cariologiche e molecolari
- S. ONOFRI, L. ZUCCONI, L. SELBMANN, D. BARRECA e S. RUISI - Funghi delle rocce Antartiche: nuovi generi e specie endemici per genotipi unici

Un ricordo del Prof. Fabio Maggini

M. FREDIANI



Il Prof. Fabio Maggini nasce in provincia di Firenze nel gennaio del 1941. Nel 1967 si laurea in Scienze Biologiche a Pisa. Nello stesso anno vince un posto di tecnico presso l'Istituto di Genetica di Bari e qui rimarrà per molti anni ed inizierà la sua carriera scientifica ed accademica. Nel 1971 è assistente ordinario presso la Cattedra di Genetica, nel 1973 professore Incaricato di Genetica presso la Facoltà di Scienze Naturali e nel 1977 professore Incaricato di

Genetica presso la Facoltà di Scienze Biologiche dello stesso Ateneo.

Durante il soggiorno barese inizialmente collabora con il Prof. Emilio Battaglia interessandosi di metodiche citologiche rivolte allo studio del nucleolo e delle sua correlazione con le costrizioni secondarie. L'arrivo di quello che lui sempre definirà "il mio maestro", cioè del Prof. Ferruccio Ritossa alla direzione dell'Istituto di Genetica, segna una svolta nella sua attività scientifica che si indirizza allo studio degli acidi nucleici.

Ed è in questo periodo che incomincia a lavorare sui geni ribosomali, argomento questo che sarà il motivo conduttore di gran parte della sua attività scientifica, anche negli anni successivi e nel suo spostarsi da una sede all'altra. Nel 1980 è nominato professore ordinario di Botanica presso il Dipartimento di Ecologia dell'Università della Calabria e nel 1982 approda a Viterbo dove ricoprirà l'insegnamento di Botanica Agraria fino al giorno della sua scomparsa. I geni ribosomali quindi, come principale interesse nella sua attività di ricerca, geni studiati da molti punti di vista, utilizzando le metodiche più svariate, ma comunque sempre in linea con i tempi e le potenzialità offerte dalle tecniche più all'avanguardia. Geni ribosomali studiati altresì in molti sistemi, spaziando nel mondo vegetale dalle Pteridofite alle Angiosperme.

All'inizio il suo interesse è attratto essenzialmente dallo studio della eterogeneità dei geni ribosomali stessi, studio che, nell'ambito del genere *Allium*, lo porta già negli anni '70 a rilevare variazioni quantitative e qualitative, sia in specie affini che in individui appartenenti alla stessa specie. È ancora di questi anni lo studio che lo porta ad evidenziare e quantizzare fenomeni di amplificazione dei cistroni ribosomali durante la maturazione del metaxilema nella radice di *Allium*. Questo lavoro risulta notevolmente

innovativo e rappresenta il primo dato esistente in letteratura relativo a stime quantitative di amplificazione del DNA ribosomale in sistemi vegetali.

Negli anni successivi determina ed analizza la struttura dei geni ribosomali in molte specie appartenenti a vari generi, come *Scilla*, *Phaseolus*, *Quercus*, *Pinus*, *Picea*, ed ancora nelle *Cynareae*, tanto per citarne alcuni.

Un altro punto caratterizzante la sua attività è rappresentato dallo studio del genoma di alcune piante di notevole interesse agrario. Si interessa infatti dello studio di specifiche frazioni del DNA nucleare riuscendo ad isolare, clonare e sequenziare varie famiglie di sequenze ripetute. In particolare si tratta sia di famiglie di sequenze ripetute in tandem, vedi ad esempio gli studi condotti su *Olea europaea*, sia famiglie di sequenze ripetute disperse, quali la cosiddetta famiglia VFB di *Vicia faba*, sia famiglie di sequenze riferibili a elementi trasponibili, come evidenziato in *Helianthus*.

Molti di questi studi sono condotti in collaborazione con altre sedi universitarie, tra di esse Pisa, Perugia e l'Università della Calabria.

In questi lavori si attua un felice connubio tra l'analisi molecolare e l'analisi citologica: ad esempio, ancora in *Vicia*, vengono studiate le caratteristiche di specifiche brevi sequenze ripetute presenti nello spaziatore intergenico e si dimostra che queste stesse sequenze ripetute sono presenti anche in altri siti del genoma al di fuori delle regioni organizzatrici del nucleolo; ed in *Phaseolus* Fabio studia ancora lo spaziatore intergenico ed inoltre dimostra l'esistenza di una correlazione tra struttura dei geni ribosomali, loro localizzazione cromosomica e attività funzionale.

In gran parte della sua produzione scientifica, fin dalle prime pubblicazioni, lo studio del genoma o meglio di sue specifiche componenti è visto anche in relazione a problematiche più propriamente evolutive. Negli ultimi anni si rivolge ancor più specifica-

mente al settore della Biosistemica Vegetale percependo l'importanza di integrare i tradizionali metodi di indagine con l'uso di marcatori molecolari allo scopo di arrivare ad una più chiara definizione dei rapporti filogenetici tra le specie.

Con questa finalità determina le sequenze nucleotidiche di specifiche regioni dei geni ribosomali quali gli spaziatori interni trascritti di varie Pteridofite, Gimnosperme e Angiosperme, riuscendo a trarre da questi dati interessanti considerazioni filogenetiche. Negli ultimi anni l'attenzione per le piante di interesse agrario si concentra essenzialmente sulla ricerca di parametri molecolari per la caratterizzazione e la certificazione varietale e questo essenzialmente in *Olea europaea*; a questo scopo isola e caratterizza alcune sequenze microsatellitari.

L'ultimo lavoro che lo ha visto impegnato e che ancora non è stato pubblicato ha portato all'isolamento e alla determinazione della sequenza nucleotidica dello spaziatore intergenico di *Olea*, un lavoro impegnativo e lungo lungo ben 5629 basi.

Fin qui molto brevemente il resoconto, sicuramente sommario, di una attività scientifica lunga ed articolata; ma, se è stato relativamente facile raccontare, per così dire, il collega e lo studioso, è invece molto più difficile raccontare la persona, l'uomo, anche se mi aiuta il fatto che tutti noi abbiamo avuto modo di conoscerlo ed apprezzarlo.

Voglio solo ricordare la simpatia, l'entusiasmo, la disponibilità e quella irrefrenabile voglia di vivere che gli permetteva di affrontare tutte le situazioni sempre con il sorriso sulle labbra, ma anche con quella necessaria dose di distacco che certamente gli derivava dalla capacità di dare alle cose il loro proprio valore, il loro giusto peso.

Ed è quella stessa irrefrenabile voglia di vivere che lo ha portato ad affrontare anche la malattia, fino all'ultimo, con grande coraggio e con una grandissima dignità.

AUTORE

Manuela Frediani, Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo

Elenco delle pubblicazioni del Prof. Fabio Maggini

PUBBLICAZIONI PER ESTESO

1. BATTAGLIA E., MAGGINI F., 1968 - *The use of osmium for staining the nucleolus in squash technique*. *Caryologia*, 21: 287-292.
2. BATTAGLIA E., CESCA G., MAGGINI F., 1969 - *Mutazioni cromosomiche in Scilla peruviana L.* *Caryologia*, 22: 177-185.
3. MAGGINI F., 1972 - *The chromosome complement of Bellevalia dubia (Guss.) R. et S. and the problem of Bellevalia webbiana Parl.* *Ann. Bot. (Roma)*, 31: 115-123.
4. AVANZI S., MAGGINI F., INNOCENTI A.M., 1973 - *Amplification of ribosomal cistrons during the maturation of metaxylem in the root of Allium cepa*. *Protoplasma*, 76: 197-210.
5. MAGGINI F., 1975 - *DNA ripetitivo e implicazioni filogenetiche e tassonomiche nel regno vegetale*. *Inform. Bot. Ital.*, 7: 336-344.
6. MAGGINI F., 1975 - *Homologies of ribosomal RNA nucleotide sequences in monocots*. *J. Mol. Evol.*, 4: 317-322.
7. MUSANO L., MAGGINI F., 1976 - *Triploidia in Bellevalia dubia (Guss.) Roemer et Schultes*. *Inform. Bot. Ital.*, 8: 186-187.
8. MAGGINI F., DE DOMINICIS R.I., SALVI G., 1976 - *Similarities among ribosomal RNAs of Angiospermae and Gymnospermae*. *J. Mol. Evol.*, 8: 329-335.
9. MAGGINI F., BASSI P., STANZIANO P., 1976 - *Amount of DNA complementary to ribosomal RNA in polyploid series of Scilla autumnalis L. and Urginea maritima (L.) Baker*. *Giorn. Bot. Ital.*, 110: 331-335.
10. MAGGINI F., MARAZIA T., STANZIANO P., 1976 - *Caratterizzazione del DNA ripetitivo in Scilla sibirica, Allium cepa e Allium sativum per mezzo della cinetica di riassociazione*. *Ann. Bot. (Roma)*, 35: 435-446.
11. MAGGINI F., GARBARI F., 1977 - *Amounts of ribosomal DNA in Allium (Liliaceae)*. *Plant Syst. Evol.*, 128: 201-208.
12. MAGGINI F., DE DOMINICIS R.I., 1977 - *The ribosomal RNA gene number and the length of the nucleolar secondary constrictions in Bellevalia romana and B. dubia (Liliaceae): a possible correlation*. *Caryologia*, 30: 97-103.
13. MAGGINI F., MARAZIA T., 1978 - *Multiplicity of ribosomal RNA genes in five species of the Liliaceae*. *Giorn. Bot. Ital.*, 112: 215-218.
14. MAGGINI F., BARSANTI P., MARAZIA T., 1978 - *Individual variation of the nucleolus organizer regions in Allium cepa and A. sativum*. *Chromosoma*, 66: 173-183.
15. MAGGINI F., BASSI P., BIANCHI G., CARMONA M.J., 1980 - *rDNA content in Ornithogalum montanum (Liliaceae): correlation between molecular and cytological features*. *Caryologia*, 33: 203-213.
16. MARAZIA T., BARSANTI P., MAGGINI F., 1980 - *Individual quantitative rDNA variation in three species of the Cucurbitaceae family*. *Biochem. Genet.*, 18: 509-517.
17. MAGGINI F., BLANCO A., LICCI D., CARMONA M.J., 1980 - *Amount of ribosomal DNA and seed protein content in the genus Triticum*. *Experientia*, 36: 1047-1048.
18. MAGGINI F., CARMONA M.J., 1981 - *Sequence heterogeneity of the ribosomal DNA in Allium cepa (Liliaceae)*. *Protoplasma*, 108: 163-171.
19. BARSANTI P., MARAZIA T., MAGGINI F., 1981 - *Q-banding and A-T rich DNA in Ornithogalum montanum (Liliaceae)*. *Experientia*, 37: 467-468.
20. DE DOMINICIS R.I., SALVI G., MAGGINI F., 1983 - *Ribosomal DNA in several species of Gymnosperms*. *Ann. Bot. (Roma)*, 41: 134-137.
21. CARMONA M.J., DE DOMINICIS R.I., SALVI G., MAGGINI F., 1984 - *Ribosomal RNA genes in biotypes of Scilla peruviana (Liliaceae)*. *Plant Syst. Evol.*, 146: 1-11.
22. MAGGINI F., 1985 - *I geni per l'RNA ribosomiale come strumento per la valutazione delle affinità parentali nelle piante coltivate*. In: AA.VV., *Ricerca e applicazioni nelle Botaniche Speciali*: 41-46.
23. TUCCI G.F., MAGGINI F., 1986 - *Ribosomal RNA genes in species of the Cynareae tribe*

- (Compositae). *I. Protoplasma*, 132: 76-84.
24. MAGGINI F., TUCCI G.F., 1986 - *Clonaggio dei geni per l'RNA ribosomale in batteriofagi lambda*. In: AA.VV., *Ricerche e didattica delle Botaniche nelle Facoltà applicative*. 65-66.
 25. MAGGINI F., TUCCI G.F., GELATI M.T., 1988 - *Ribosomal RNA genes in species of the Cynareae tribe (Compositae)*. *II. Protoplasma*, 144: 125-131.
 26. BELLAROSA R., DELRE V., SCHIRONE B., MAGGINI F., 1990 - *Ribosomal RNA genes in Quercus spp. (Fagaceae)*. *Plant Syst. Evol.*, 172: 127-139.
 27. MAGGINI F., CREMONINI R., ZOLFINO C., TUCCI G.F., D'OIDIO R., DELRE V., DE PACE C., SCARASCIA MUGNOZZA G.T., CIONINI P.G., 1991 - *Structure and chromosomal localization of DNA sequences related to ribosomal subrepeats in Vicia faba*. *Chromosoma*, 100: 229-234.
 28. DE PACE C., DELRE V., SCARASCIA MUGNOZZA G.T., MAGGINI F., CREMONINI R., FREDIANI M., CIONINI P.G., 1991 - *Legumin of Vicia faba major: accumulation in developing cotyledons, purification, mRNA characterization and chromosomal location of coding genes*. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 17-23.
 29. MAGGINI F., TUCCI G.F., DE MARTIS A., GELATI M.T., AVANZI S., 1992 - *Ribosomal RNA genes of Phaseolus coccineus*. *I. Plant Mol. Biol.*, 18: 1073-1082.
 30. MAGGINI F., 1992 - *La struttura dei geni per l'RNA ribosomale: un sistema per la valutazione delle affinità parentali negli Eucarioti*. *Giorn. Bot. Ital.*, 126: 726-730.
 31. TAGLIASACCHI A.M., FORINO L.M.C., FREDIANI M., CREMONINI R., TUCCI G.F., MAGGINI F., AVANZI S., 1993 - *Ribosomal RNA genes in Phaseolus coccineus*. 2. *Differential distribution of ribosomal cistrons and cytological localization of various sized replication units in polytene chromosomes of embryo suspensor*. *Cytobios*, 75: 137-147.
 32. MAGGINI F., MARROCCO R., RUBERTI F., RUFFINI CASTIGLIONE M., AVANZI S., 1993 - *Ribosomal RNA genes of Phaseolus coccineus*. 3. *Differential amplification of replication units in the embryo suspensor*. *Cytobios*, 76: 139-150.
 33. TUCCI G.F., MAGGINI F., GREGORI C., SIMEONE M.C., 1993 - *I geni ribosomali in alcune specie della tribù Cynareae (Compositae)*. *Inform. Bot. Ital.*, 25: 65-68.
 34. TUCCI G.F., SIMEONE M.C., GREGORI C., MAGGINI F., 1994 - *Intergenic spacers of rRNA genes in three species of the Cynareae (Asteraceae)*. *Plant Syst. Evol.*, 190: 187-193.
 35. MAGGINI F., 1994 - *Structure of the telomeric DNA in the plant kingdom*. *Giorn. Bot. Ital.*, 128: 141-147.
 36. CECCARELLI M., MINELLI S., MAGGINI F., CIONINI P.G., 1995 - *Genome size variation in Vicia faba*. *Heredity*, 74: 180-187.
 37. MAGGINI F., MARROCCO R., GELATI M.T., 1995 - *Evoluzione molecolare delle sequenze nucleotidiche degli spaziatori interni dei geni per l'RNA ribosomale in Angiosperme, Gimnosperme e Pteridofite*. *Giorn. Bot. Ital.*, 129: 45-56.
 38. MAGGINI F., MARROCCO R., GELATI M.T., 1995 - *Analisi di sequenze nucleotidiche per la valutazione di rapporti filogenetici*. *Inform. Bot. Ital.*, 27: 291-293.
 39. MAGGINI F., BALDASSINI S., 1995 - *Ribosomal RNA genes in the genus Pinus*. *I. Caryologia*, 48: 17-25.
 40. MAGGINI F., D'OIDIO R., GELATI M.T., FREDIANI M., CREMONINI R., CECCARELLI M., MINELLI S., CIONINI P.G., 1995 - *FokI DNA repeats in the genome of Vicia faba: species specificity, structure, redundancy modulation and nuclear organization*. *Genome*, 38: 1255-1261.
 41. MARROCCO R., GELATI M.T., MAGGINI F., 1996 - *Nucleotide sequence of the internal transcribed spacers and 5.8S region of ribosomal DNA in Pinus pinea L.*. *DNA Sequence*, 6: 175-177.
 42. MAGGINI F., MARROCCO R., GELATI M.T., DE DOMINICIS R.I., 1998 - *Lengths and nucleotide sequences of the internal spacers of nuclear ribosomal DNA in gymnosperms and pteridophytes*. *Plant Syst. Evol.*, 213: 199-205.
 43. MARROCCO R., RUFFINI CASTIGLIONE M., RUBERTI F., MAGGINI F., AVANZI S., 1998 - *Ribosomal RNA Genes of Phaseolus coccineus*. IV. *Structure and Comparative-analysis of the Intergenic Spacer: Possible Involvement of Some Nucleotides in the Transcription Control of Coding Sequences*. *DNA Sequence*, 9: 45-48.
 44. RUFFINI CASTIGLIONE M., BINI L., PELOSI P., MARROCCO R., SANTUCCI A., RUBERTI F., MAGGINI F., AVANZI S., 1998 - *Ribosomal RNA genes of Phaseolus coccineus*. V. *Relationship between rDNA phenotype and somatic differentiation*. *Protoplasma*, 203: 75-83.
 45. BITONTI M.B., COZZA R., CHIAPPETTA A., CONTENTO A., MINELLI S., CECCARELLI M., GELATI M.T., MAGGINI F., BALDONI L., CIONINI P.G., 1999 - *Amount and organization of the heterochromatin in Olea europaea and related species*. *Heredity*, 83: 188-195.
 46. FREDIANI M., GELATI M.T., MAGGINI F., GALASSO I., MINELLI S., CECCARELLI M., CIONINI P.G., 1999 - *A family of dispersed repeats in the genome of Vicia faba: structure, chromosomal organization, redundancy modulation, and evolution*. *Chromosoma*, 108: 317-324.
 47. VENORA G., BLANGIFORTI S., FREDIANI M., MAGGINI F., GELATI M.T., RUFFINI CASTIGLIONE M., CREMONINI R., 2000 - *Nuclear DNA contents, rDNAs, chromatin organization, and karyotype evolution in Vicia sect. faba*. *Protoplasma*, 213: 123-129.
 48. MAGGINI F., FREDIANI M., GELATI M.T., 2000 - *Nucleotide Sequence of the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA in Picea abies Karst.* *DNA Sequence*, 11: 87-89.

49. MINELLI S., MAGGINI F., GELATI M.T., ANGIOLILLO A., CIONINI P.G., 2000 - *The chromosome complement of Olea europaea L.: characterization by differential staining of the chromatin and in-situ hybridization of highly repeated DNA sequences*. Chromosome Res., 8: 615-619.
50. RUGINI E., BIASI R., MUGANU M., PANNELLI G., AVERSA G., MAGGINI F., MARTELLI G.P., ZAMBONI E., ZUCCHERELLI G., BARBA M., 2001 - *L'organizzazione di un moderno vivaismo olivicolo alla base della produzione di piante certificate*. Frutticoltura, Anno LXIII n. 5: 11-24.
51. CONTENTO A., CECCARELLI M., GELATI M.T., MAGGINI F., BALDONI L., CIONINI P.G., 2002 - *Diversity of Olea genotypes and the origin of cultivated olives*. Theor. Appl. Genet., 104: 1229-1238.
52. SANTINI S., CAVALLINI A., NATALI L., MINELLI S., MAGGINI F., CIONINI P.G., 2002 - *Ty1/copia- and Ty3/gypsy-like DNA sequences in Helianthus species*. Chromosoma, 111: 192-200.
53. FREDIANI M., MAGGINI F., GELATI M.T., CREMONINI R., 2004 - *Repetitive DNA sequences as probes for phylogenetic analysis in Vicia genus*. Caryologia, 57(4): 379-386.
54. PAPINI A., TRIPPANERA G.B., MAGGINI F., FILIGHEDDU R., BIONDI E., 2004 - *New insights in Salicornia L. and allied genera (Chenopodiaceae) inferred from nrDNA sequence data*. Plant Biosystems, 138 (3): 215-223.
- te. Giorn. Bot. Ital., 113: 480.
9. CAPINERI R., D'AMATO G.F., MARCHI P., MARAZIA T., MAGGINI F., 1979 - *Polimorfismo del Q-banding in Ornithogalum montanum Cyr ex Ten. (Liliaceae)*. Atti A.G.I., 24: 83-85.
10. BIANCHI G., BASSI P., CARMONA M.J., MAGGINI F., 1980 - *Contenuto di DNA ribosomale e regioni organizzatrici nucleolari in Ornithogalum montanum (Liliaceae)*. Atti A.G.I., 25: 44-45.
11. CARMONA M.J., MAGGINI F., 1980 - *Struttura dei geni per l'RNA ribosomale in Allium cepa*. Atti A.G.I., 26: 71-73.
12. DE DOMINICIS R.I., CARMONA M.J., BISIGNANO R., MAGGINI F., 1981 - *Geni per l'RNA ribosomale in biotipi di Scilla peruviana (Liliaceae)*. Giorn. Bot. Ital., 115: 394-395.
13. CARMONA M.J., DE DOMINICIS R.I., BISIGNANO R., MAGGINI F., 1981 - *Geni per l'RNA ribosomale in biotipi di Scilla peruviana (Liliaceae)*. Atti A.G.I., 28: 97-98.
14. TUCCI G.F., MAGGINI F., 1995 - *I geni per l'RNA ribosomale in specie della tribù "Cynareae"*. Giorn. Bot. Ital., 119: 43.
15. TUCCI G.F., MAGGINI F., 1987 - *Ribosomal RNA genes in species of the Cynareae tribe (Compositae)*. Giorn. Bot. Ital., 121: 176-177.
16. DELRE V., DE PACE C., MAGGINI F., SCARASCIA MUGNOZZA G.T., QUALSET C.O., 1988 - *Ribosomal DNA spacer length polymorphism in Dasypyrum villosum populations*. Crop Improvement: Intern. Symposium, Davis, California: 16.
17. DELRE V., DE PACE C., MAGGINI F., MANCINI R., 1988 - *Evidence on the rDNA spacer length polymorphism in Vicia faba and related species*. Gen. Agr., 42.
18. MAGGINI F., TUCCI G.F., 1988 - *Analisi citogenetiche e molecolari in specie della tribù Cynareae (Compositae)*. Giorn. Bot. Ital., 122 (suppl.1): 121.
19. TUCCI G.F., CREMONINI R., ZOLFINO C., MAGGINI F., CIONINI P.G., 1988 - *In situ hybridization in Vicia faba with subrepeating sequences from the intergenic spacer of ribosomal DNA*. Giorn. Bot. Ital., 122 (suppl. 2): 150-151.
20. CREMONINI R., FREDIANI M., DE PACE C., DELRE V., SCARASCIA MUGNOZZA G.T., MAGGINI F., CIONINI P.G., 1989 - *Localizzazione citologica dei geni per la legumina in Vicia faba L.* Giorn. Bot. Ital., 123 (suppl.1): 193.
21. BELLAROSA R., DELRE V., SCHIRONE B., MAGGINI F., 1989 - *Geni ribosomali e relazioni tassonomiche nel genere Quercus*. Giorn. Bot. Ital., 123 (suppl. 1): 109.
22. TUCCI G.F., GREGORI C., GELATI M.T., MAGGINI F., 1989 - *Clonaggio ed analisi molecolare della regione intergenica del DNA ribosomale delle Cynareae*. Giorn. Bot. Ital., 123 (suppl. 1): 128.
23. TUCCI G.F., GELATI M.T., GREGORI C., AVANZI S., MAGGINI F., 1989 - *Ribosomal RNA genes in Phaseolus coccineus*. Giorn. Bot. Ital., 123

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

- MAGGINI F., 1974 - *Omologia delle sequenze nucleotidiche dell'RNA ribosomale delle monocotiledoni*. Atti A.G.I., 19: 37-38.
- MAGGINI F., DE DOMINICIS R.I., 1975 - *Correlazione tra lunghezza delle costrizioni secondarie nucleolari e quantità di DNA ribosomale nel genere Bellevalia (Liliaceae)*. Atti A.G.I., 20: 204-206.
- MAGGINI F., DE DOMINICIS R.I., 1975 - *Omologia delle sequenze nucleotidiche dell'RNA ribosomale nelle Angiosperme e nelle Gimnosperme*. Giorn. Bot. Ital., 109(4-5): 294-295.
- STANZIANO P., MAGGINI F., 1976 - *Caratterizzazione del DNA ripetitivo in Scilla sibirica (Liliaceae) per mezzo della cinetica di rinaturazione*. Atti A.G.I., 21: 66-69.
- MAGGINI F., 1977 - *Variazioni del contenuto di DNA ribosomale in Allium cepa*. Atti A.G.I., 22: 193-195.
- MAGGINI F., 1978 - *Variabilità individuale del DNA ribosomale in Allium cepa e Allium sativum*. Atti A.G.I., 23: 167-168.
- MAGGINI F., 1979 - *Ribosomal RNA genes in plants as a tool for evaluation of systematic correlations*. Webbia, 34: 515.
- MAGGINI F., MARAZIA T., 1979 - *Variabilità individuale del DNA ribosomale in alcune pian-*

- (*suppl.* 2): 150.
24. TAGLIASACCHI A.M., CREMONINI R., FREDIANI M., FORINO L.M.C., TUCCI G.F., AVANZI S., MAGGINI F., 1989 - *Sequences from the intergenic spacer of ribosomal DNA of Phaseolus coccineus localized in extra ribosomal loci*. *Giorn. Bot. Ital.*, 123 (*suppl.* 2): 151.
 25. DE PACE C., DELRE V., SCARASCIA MUGNOZZA G.T., MAGGINI F., CREMONINI R., FREDIANI M., CIONINI P.G., 1989 - *Legumin in Vicia faba major: Pattern of temporal accumulation, chromosomal location of coding genes and improvement strategy*. XII Eucarpia Congr., Göttingen (Germany): Science for Plant Breeding, 15: 13-17.
 26. TUCCI G.F., GREGORI C., MAGGINI F., DE DOMINICIS R.I., 1990 - *Analisi dei geni ribosomali in Cycas revoluta Thunb.* *Giorn. Bot. Ital.*, 124: 58.
 27. MAGGINI F., TUCCI G.F., GELATI M.T., CIONINI P.G., 1990 - *Comparazione di una sequenza nucleotidica ripetuta di Vicia faba con sequenze ripetute di altri eucarioti*. Atti Conv. annuale S.I.G.A., 34: 168.
 28. MAGGINI F., CREMONINI R., TUCCI G.F., GELATI M.T., D'OVIDIO R., CIONINI P.G., 1990 - *Subrepeats in the intergenic spacer of rDNA and related sequences in Vicia faba*. Third European Congr. Cell Biology: Intern. Report, 14: 85.
 29. BELLAROSA R., DELRE V., SCHIRONE B., GIORDANO E., MAGGINI F., 1991 - *Ribosomal RNA genes in species of the genus Quercus*. In: FINESCHI S., MALVOLTI M.E., CANNATA F., HATTEMER H.H. (Eds.), *Biochemical markers in the population genetics of forest trees*: 243. SBP Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.
 30. MAGGINI F., TUCCI G.F., GELATI M.T., D'OVIDIO R., 1991 - *Analisi della struttura del DNA eterocromatico in Vicia faba*. *Giorn. Bot. Ital.*, 125: 207.
 31. TAGLIASACCHI A.M., CREMONINI R., FREDIANI M., FORINO L.M.C., TUCCI G.F., MAGGINI F., AVANZI S., 1991 - *I cromosomi organizzatori del nucleolo di Phaseolus coccineus*. *Giorn. Bot. Ital.*, 125: 211.
 32. TUCCI G.F., MAGGINI F., GREGORI C., SIMEONE M.C., 1991 - *Struttura molecolare dello spaziatore intergenico ribosomale di alcune specie della tribù Cynareae*. *Giorn. Bot. Ital.*, 125: 293.
 33. BALDASSINI S., MAGGINI F., 1991 - *Geni per l'RNA ribosomale nel genere Pinus*. *Giorn. Bot. Ital.*, 125: 295.
 34. BALDASSINI S., MAGGINI F., 1992 - *Localizzazione e sequenza nucleotidica dell'RNA ribosomale 5,8S di Pinus pinea*. *Giorn. Bot. Ital.*, 126: 307.
 35. MAGGINI F., TUCCI G.F., BALDASSINI S., GELATI M.T., 1992 - *Analisi di sequenze del DNA eterocromatico in Vicia faba*. Atti Conv. annuale S.I.G.A., 36: 164.
 36. BELLAROSA R., SCHIRONE B., MAGGINI F., 1993 - *Geni per l'RNA ribosomale in Quercus crenata Lam.* *Giorn. Bot. Ital.*, 127: 508.
 37. BELLAROSA R., SCHIRONE B., MAGGINI F., FINESCHI S., 1994 - *Inter and intraspecific variation in three Mediterranean oaks (Q. cerris, Q. suber, Q. crenata)*. Atti Workshop "Inter-Intraspecific variation in European oaks: Evolutionary implication and practical consequences", Brussels.
 38. MAGGINI F., D'OVIDIO R., GELATI M.T., FREDIANI M., CREMONINI R., CECCARELLI M., MINELLI S., CIONINI P.G., 1994 - *The Fok I sites of Vicia faba chromosomes*. Chromosome Conf. IV, Royal Botanic Garden Kew.
 39. MAGGINI F., D'OVIDIO R., GELATI M.T., FREDIANI M., CREMONINI R., CECCARELLI M., MINELLI S., CIONINI P.G., 1994 - *Una sequenza di DNA altamente ripetuta nel genoma di Vicia faba L. (Leguminosae): struttura, specie-specificità, organizzazione del nucleo*. *Giorn. Bot. Ital.*, 128: 152.
 40. DE DOMINICIS R.I., D'OVIDIO R., GELATI M.T., MAGGINI F., 1994 - *Variazioni degli spaziatori del DNA ribosomale nelle Pteridofite, Gimnosperme e Angiosperme*. *Giorn. Bot. Ital.*, 128: 249.
 41. CECCARELLI M., MINELLI S., MAGGINI F., CIONINI P.G., 1994 - *Plasticità quantitativa del genoma nucleare in Vicia faba*. *Giorn. Bot. Ital.*, 128: 288.
 42. MARROCCO R., RUFFINI CASTIGLIONE M., RUBERTI F., MAGGINI F., AVANZI S., 1995 - *Ribosomal RNA genes in Phaseolus coccineus: some structural and functional aspects of the intergenic spacer*. *Chromosome Res.*, 3: 102.
 43. BITONTI B., MARROCCO R., COZZA R., CHIAPPETTA A., GELATI M.T., MAGGINI F., 1995 - *Caratteristiche nucleari e genomiche in Olea europea L.* *Giorn. Bot. Ital.*, 129: 112.
 44. FREDIANI M., GELATI M.T., MARROCCO R., MAGGINI F., 1996 - *Analisi delle sequenze nucleotidiche degli spaziatori interni dei cistroni ribosomali in specie diverse della sezione Faba del genere Vicia*. *Giorn. Bot. Ital.*, 130: 371.
 45. BELLAROSA R., MARROCCO R., SCHIRONE B., MAGGINI F., 1997 - *Variazioni dell'ITS in alcune popolazioni italiane di Quercus suber L. (Fagaceae)*. *Inform. Bot. Ital.*, 29: 316-317.
 46. FREDIANI M., GELATI M.T., MAGGINI F., 1997 - *Phylogenetic relationships in the Vicia L. genus*. *Inform. Bot. Ital.*, 29: 322-323.
 47. FREDIANI M., GELATI M.T., MAGGINI F., GALASSO I., MINELLI S., CECCARELLI M., CIONINI P.G., 1998 - *Chromosomal organization, structure, redundancy modulation and evolution of a family of dispersed repeats in the genome of Vicia faba*. 13th Intern. Chromosome Conf., Ancona, Cyt. Cell Genet., 81: 106-115.
 48. RUFFINI CASTIGLIONE M., FREDIANI M., PUNINA E., CREMONINI R., 1998 - *The DNA methylation pattern in two Angiosperm with low*

- chromosome number in their haploid complement (n=2). 13th Intern. Chromosome Conf., Ancona, Cyt. Cell Genet., 81: 106-115.*
49. SANTINI S., NATALI L., MAGGINI F., CIONINI P.G., CAVALLINI A., 1998 - *Isolation and characterization of repeated DNA in sunflower. 13th Intern. Chromosome Conf., Ancona, Cyt. Cell Genet., 81: 237.*
50. MINELLI S., CONTENTO A., FREDIANI M., MAGGINI F., CIONINI P.G., 1998 - *Chromosome banding and in situ hybridization of repeated DNA sequences in Olea europaea. 13th Intern. Chromosome Conf., Ancona, Cyt. Cell Genet., 81: 106-115.*
51. FREDIANI M., CAPUTO P., MAGGINI F., 1999 - *Analisi delle sequenze nucleotidiche degli spaziatori interni dei cistroni ribosomali in specie diverse del genere Cicer. Atti 94° Congr. S.B.I., Ferrara, 25-29 Settembre 1999: 53.*
52. GELATI M.T., MAGGINI F., 1999 - *Gli spaziatori interni dei geni per l'RNA ribosomale in Picea abies Karst. Atti 94° Congr. S.B.I., Ferrara: 60.*
53. FREDIANI M., MAGGINI F., GELATI M.T., CREMONINI R., 2000 - *Approcci molecolari nello studio delle relazioni filogenetiche tra le specie di Vicia sezione Faba. Atti 95° Congr. S.B.I., Messina: 18.*
54. GELATI M.T., FREDIANI M., MAGGINI F., 2000 - *Lo spaziatore intergenico dei geni per l'RNA ribosomale in Pinus pinea L. Atti 95° Congr. S.B.I., Messina: 61.*
55. PAPINI A., MAGGINI F., FREDIANI M., GELATI M.T., BIONDI E., FILIGHEDDU R., 2000 - *Affinità genetica e sistematica tra salicornie italiane. Atti 95° Congr. S.B.I., Messina: 82.*
56. MAGGINI F., FREDIANI M., GELATI M.T., PAPINI A., FILIGHEDDU R., BIONDI E., 2001 - *Analisi degli ITS dei geni ribosomali nella famiglia Chenopodiaceae. Atti 96° Congr. S.B.I., Varese: 23.*
57. MAGGINI F., GELATI M.T., SPOLVERINI M., FREDIANI M., 2007 - *Lo spaziatore intergenico dei geni ribosomali in Olea europaea. Inform. Bot. Ital., 39 Suppl. 1: 139-142.*

[a cura di M. FREDIANI e M.T. GELATI]

Fabio Maggini genetista a Bari

F. RITOSSA

Fabio a Bari, comincia con la Genetica Vegetale. Inizialmente l'approccio è di tipo cariologico: risolve l'assetto cromosomico di *Bellevalia dubia* e *Bellevalia webbiana* ed analizza traslocazioni che possono condizionare i rapporti evolutivi tra le due specie; in *Scilla peruviana*, evidenzia mutazioni strutturali che, assieme a variazioni di ploidia, rappresentano i motori fondamentali della evoluzione di questo cariotipo. In queste analisi, di interesse particolare per Fabio sono i cromosomi che portano le regioni organizzatrici del nucleolo.

Fabio mantiene questi interessi di base anche dopo aver acquisito molte tecniche di analisi molecolare, quali l'ibridazione tra acidi nucleici, l'uso di enzimi di restrizione, il sequenziamento del DNA: egli tende a mantenere, anche dopo questo necessario spostamento verso il molecolare, una forte curiosità naturalistica basata sulla variabilità, i meccanismi che la generano e gli effetti che essa induce sulla evoluzione. Ad esempio, usa l'ibridazione tra DNA ed RNA ribosomale per calcolare il numero di geni per l'RNA ribosomale. La domanda che si pone è questa: Quanto varia questo numero in individui raccolti in natura rispetto ad individui che appartengono a linee selezionate? Nell'ambito delle *Cucurbitaceae*, analizza piante di *Ecballium* raccolte in natura e le confronta con le linee selezionate di *Cucumis* e *Cucurbita*. Il numero medio di geni è simile ma la varianza è molto più alta in *Ecballium* che in *Cucurbita* e *Cucumis*.

Penso che le *Liliaceae* fossero le piante favorite di Fabio; ricordo che spesso arrivava in laboratorio con un bel fascio di cipolle ramate. Lo sottevamo un po' ma noi che lavoravamo con le mosche avevamo assai poco da ridere. Sempre sul problema dei geni per l'RNA ribosomale, Fabio computa i relativi geni in *Allium cepa* ed *Allium sativum*, usando, in entrambi i casi, cultivar selezionate. L'attesa è che, in entrambi i

campioni, il numero di geni sia poco variabile: in *A. sativum* infatti la variabilità è bassa ma in *A. cepa* il numero di geni è molto variabile.

Discrepanze? Forse no. Forse è il favoloso mondo delle piante che cede, ma solo lentamente i suoi segreti.

Una spiegazione può forse venire dall'osservazione di Silvana Avanzi e collaboratori, che rilevano nelle cellule del metaxilema di *A. cepa* fenomeni di amplificazione del DNA; un fenomeno non totalmente risolto, che Fabio studia insieme a Silvana.

Usando l'ibridazione competitiva tra RNA ribosomali, Fabio insieme a Ilio De Dominicis ha evidenziato che la maggioranza delle Angiosperme ha gli RNA ribosomali molto conservati; invece questi stessi geni sono assai diversi tra di loro nelle Gimnosperme. L'ibridazione competitiva è stata anche usata per costruire alberi filogenetici. Con la scoperta degli enzimi di restrizione, diventa possibile analizzare la eventuale variabilità di geni ripetuti. Con Maria Josè Carmona, Fabio evidenzia la presenza di almeno due tipi di geni ribosomali in *A. cepa* e questa eterogeneità si rinviene in ciascuno degli individui della popolazione.

Mi ha fatto piacere rileggere un po' dei lavori di Fabio perché ci ho trovato intelligenza e pazienza ma anche tantissima passione. Fare la Genetica a Bari ha voluto dire anche fare lezioni, seminari, Consigli ed assemblee di tipo vario ma soprattutto fare centinaia di esami. Mai che una sola volta Fabio si sia arrabbiato o si sia sottratto a questa maledizione. Ricordo la sua pazienza, la sua intelligenza nel portare gli studenti alla comprensione.

Non posso dimenticare l'affiatamento tra docenti, tecnici e studenti a Genetica a Bari tra il 1970 e il 1980; il culmine era il veglione di Carnevale. Fabio era il leader alla chitarra e cantava benissimo. Ogni interno, ogni tecnico ed ogni docente si beccava una

strofa di sfottò che preparavamo con meticolosità professionistica. Poi si ballava. Fabio era bello, sempre elegante, magari un po' dandy, mentre la massa a quei tempi viaggiava in giubbotto e maglione. Io ricordo che Valeria lo controllava abbastanza, così

anche per gli altri c'era qualche possibilità con le ragazze.

Caro Fabio, stiamo ricordando tempi produttivi e felici.

È così che tu sei e resterai sempre con noi.

AUTORE

Ferruccio Ritossa, Via Montecalderaro 5821, 40024 Castel San Pietro Terme, Bologna

Venticinque anni di Botanica nell'Ateneo di Viterbo

A. SCOPPOLA e S. ONOFRI

INTRODUZIONE

L'Università Statale degli Studi della Tuscia fu istituita nell'aprile 1979 dopo la soppressione della Libera Università della Tuscia costituita dalle Facoltà di Magistero, di Economia e Commercio e di Scienze Politiche.

Del nuovo Ateneo viene subito attivata la Facoltà di Agraria e dopo qualche anno, nel 1983, la Facoltà di Lingue e Letterature straniere moderne; la Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, con il primo corso di laurea in Scienze Biologiche, vede la luce nel 1987.

Oggi, a venticinque anni dall'istituzione, nell'Ateneo viterbese la Botanica è insegnata in 8 corsi di laurea della Facoltà di Scienze, in 10 corsi di laurea di quella di Agraria e nei corsi di laurea della Facoltà di Beni Culturali. Nel primo caso le materie botaniche all'interno dei diversi *curricula* sono complessivamente: Algologia, Biologia vegetale, Bioindicatori della qualità ambientale, Biotecnologie vegetali, Botanica generale, Botanica sistematica, Botanica sistematica e Micologia, Ecologia applicata, Ecologia microbica, Ecologia vegetale, Laboratorio di Botanica sistematica, Laboratorio di monitoraggio ambientale (*p.p.*, C.I.), Laboratorio di Tassonomia animale e vegetale (*p.p.*, C.I.), Laboratorio di tecniche per lo studio dei sistemi biologici (*p.p.*, C.I.), Microscopia e ultrastruttura. In Facoltà di Agraria al SSD BIO/03 afferiscono i corsi di Analisi floristica, Botanica agraria, Biologia animale e vegetale (*p.p.*, C.I.), Biologia vegetale con elementi di Sistematica, Botanica ambientale, Botanica ambientale forestale, Conoscenza dell'ambiente alpino (*p.p.*, C.I.), Conservazione delle Risorse naturali, Fondamenti di Analisi floristica, Fondamenti di Botanica e Genetica (*p.p.*, C.I.), Geobotanica agraria e forestale applicata, Scienza della vegetazione. Infine, nella terza Facoltà viene impartita una Botanica applicata ai beni culturali.

I Botanici della Tuscia afferiscono alle seguenti strutture: in Facoltà di Scienze, al Dipartimento di Scienze Ambientali con 1 P.O. (BIO/02), 2 P.A.



Fig. 1

Il Ministro della Pubblica Istruzione, Sig.ra F. Falcucci, in visita all'Ateneo nel 1986 con il Rettore G.T. Scarascia Mugnozza e con F. Maggini e G. Tucci.

The Minister for Education, the Hon. F. Falcucci, visiting the Viterbo University in 1986 with the University President G.T. Scarascia Mugnozza, F. Maggini and G. Tucci.

(BIO/01 e BIO/03), 1 R.U. BIO/02 e al Dipartimento di Ecologia e Sviluppo economico sostenibile con 1 R.U. (BIO/02). I botanici sistematici (BIO/02) del DISA, nel 2007 si trasferiranno al

DECOS. In Facoltà di Agraria afferiscono tutti al Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica – Sez. Botanica con 2 P.O. (BIO/03), 1 P.A. (BIO/03) e 1 R.U. (BIO/03, *in itinere*).

UN PO' DI STORIA

Il primo dei Botanici ad entrare di ruolo a Viterbo fu Fabio Maggini che arrivò come Professore straordinario nel 1982 in Facoltà di Agraria (nell'Istituto di Biologia Agraria, ora Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica - DABAC), per ricoprire l'insegnamento di Botanica generale; proveniva dalla Facoltà di Scienze dell'Università della Calabria dove era stato Direttore del Dipartimento di Ecologia.

Prima di allora gli insegnamenti di Botanica in Facoltà di Agraria erano ricoperti da docenti a contratto provenienti da Roma, in particolare la Botanica generale da C. Ruggeri dal 1980 fino all'arrivo di F. Maggini e, dall'anno successivo, la Botanica sistematica da A. Scoppola.



Fig. 2

F. Maggini e M. Giannattasio ad un convegno organizzato nel 1986 nell'Aula Magna dell'Università a S. Giovanni Decollato.

F. Maggini and M. Giannattasio during a conference held in 1986 in the University homeroom.

Gianfranco Tucci arriva a Viterbo nell'Anno Accademico 1983-1984 come Assistente ordinario, chiamato sulla Botanica generale per Scienze Forestali; proviene dall'Università degli Studi di Napoli dove ricopriva tale ruolo già dal 1973; nel 1985 diverrà Professore Associato. Nello stesso anno entra di ruolo ad Agraria, come Ricercatore, A. Scoppola che aveva avuto fino ad allora il contratto di insegnamento, mentre per l'attività di ricerca (floristica e fitosociologia) collaborava con l'Università 'La Sapienza' di Roma, e inoltre studiava in Francia dal Prof. J.M. Géhu (Bailleul) con una borsa del CNR.

Nel 1986 arriva da Roma, dove era Professore Ordinario dal 1971, Angelo Rambelli, micologo, chiamato dal Rettore G.T. Scarascia Mugnozza per organizzare l'insegnamento e la ricerca botanica in Facoltà di Scienze con l'attivazione del Corso di lau-

rea in Biologia. Sarà Preside per alcuni anni, e curerà la realizzazione dell'Orto Botanico. A ricoprire l'incarico di Botanica generale a Biologia è G. Tucci mentre A. Rambelli inizialmente è sulla Botanica sistematica e passerà in seguito sulla Micologia.

Silvano Onofri arriva nella Facoltà di Scienze nel 1989 quando A. Rambelli lo chiama da Bari dove era divenuto da poco Professore Associato proveniente da Roma ed era impegnato nelle spedizioni della missione italiana in Antartide. È a lui che passa l'incarico di insegnamento della Botanica sistematica. Con S. Onofri, micologo, arriva anche Laura Zucconi Galli Fonseca, trasferita dall'Università "La Sapienza" di Roma dove ricopriva dal 1986 l'incarico di Conservatore dell'Erbario. L. Zucconi sarà il primo Curatore del nascente Orto Botanico di Viterbo e più tardi, nel 1992, diventerà Ricercatore.



Fig. 3

Inaugurazione dell'Orto Botanico nel 1991 alla presenza del Ministro Prof. A. Ruberti, con A. Rambelli, F. Garbari e G.T. Scarascia Mugnozza.

The opening ceremony of the University Botanical Garden in 1991, attended by the Minister for Education A. Ruberti, with A. Rambelli, F. Garbari and G.T. Scarascia Mugnozza.

Il gruppo dei "micologi di Scienze", come i colleghi di Agraria li chiamavano, viene incrementato ulteriormente dall'arrivo nel 1990 di un nuovo Ricercatore, Sabine Riess, proveniente dall'Orto Botanico di Roma dove lavorava con A. Rambelli. Si occuperà di micorrize di latifoglie e di orchidee sia spontanee che esotiche, divenendo Presidente dell'Associazione Italiana di Orchidologia. Dal 2002 è in pensione.

In quegli anni A. Rambelli e collaboratori lavorano alla realizzazione dell'Orto Botanico di Viterbo, inaugurato nel 1991. A. Rambelli ne diviene il Direttore mentre S. Onofri sarà nominato presto vice-direttore e la struttura gravita principalmente, com'è naturale, attorno alla Facoltà di Scienze.

L'Orto Botanico sorge ad ovest della città, su una bassa collina formata da deposizioni calcaree di travertino alla cui sommità si trova una sorgente di acque termo-minerali ("bulicante"), la sorgente del Bulicame. Il complesso del Bulicame si estende su

una superficie di circa 15 ha ed è suddiviso nel vero e proprio Orto Botanico dell'Università (6 ha), situato nella parte più bassa e ospitale della collina, e nel Parco comunale del Bulicame (9 ha) che include la sorgente sulfurea calda. Il Bulicame deve la sua rilevanza storica alla presenza di resti archeologici di epoca etrusca, romana e medievale e alle citazioni di Dante nei *Canti dell'Inferno*.



Fig. 4
L. Zucconi Galli Fonseca in Antartide nel 2005.
L. Zucconi Galli Fonseca in Antartica in 2005.

Negli anni '90 lavorava come borsista presso l'Orto Botanico Marcella Pasqualetti, che entrò di ruolo nel 1995 con la qualifica di Curatore in sostituzione di L. Zucconi divenuta Ricercatore; è suo il progetto iniziale del "Giardino dei Semplici". A. Rambelli e M. Pasqualetti descriveranno nuove specie di Funghi Mitosporici e si occuperanno fra l'altro della caratterizzazione delle successioni microbiche associate alla decomposizione della lettiera nelle principali specie della macchia mediterranea.

In Facoltà di Scienze la Botanica si era ulteriormente espansa grazie all'arrivo di Sergio Sgorbati, chiamato da Milano come Professore Associato in BIO/01, che si fermerà a Viterbo solo negli anni accademici 1990-1991 e 1991-1992 incaricato dell'insegnamento di Botanica. Si occuperà di analisi del ciclo cellulare nelle piante e dei popolamenti microbici delle acque mediante citometria di flusso. Nello stesso periodo viene chiamato a Scienze come Professore Associato in BIO/01 anche Antonio Tiezzi, proveniente dall'Università di Siena e tuttora a Viterbo sull'insegnamento di Botanica generale.

A. Tiezzi è Direttore del Centro Interdipartimentale di Microscopia Elettronica (CIME) dal 1997 al 2003 e studia l'apparato citoscheletrico nei vegetali, il polline e il tubetto pollinico; tra i suoi principali successi scientifici vi è la scoperta del motore molecolare *Kinesina* nei vegetali, responsabile del movimento degli organelli nel citoplasma, e del motore molecolare *Dineina* nel tubetto pollinico; inoltre, individua molecole di potenziale interesse farmacologico nella pianta di *Aloe*.

In Facoltà di Agraria la Botanica si espande più lentamente. Nel 1991 A. Scoppola, geobotanica, era passata al ruolo di Professore Associato in BIO/03, liberando il posto che F. Maggini ambiva per il suo gruppo di ricerca e che verrà ricoperto nel 1995 da Manuela Frediani, chiamata da Pisa dove era Tecnico laureato dal 1988. La Frediani insegnerà Biologia vegetale presso la sede distaccata di Velletri e poi Botanica Agraria, collaborando con F. Maggini nella ricerca e nella didattica.

Nel 1990, presso il Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica era nato l'Erbario della Tuscia grazie alla donazione all'Università di oltre 6.000 saggi dell'*Erbario A. Scoppola*, su invito di F. Maggini, all'epoca Direttore del Dipartimento, il quale desiderava molto la creazione di tale struttura. Nel 1996 l'Erbario ottiene la registrazione nell'*Index Herbariorum*, con l'attribuzione dell'acronimo "UTV".



Fig. 5
F. Maggini con A. Scoppola al lavoro nel 1996 presso l'Erbario della Tuscia. In secondo piano: A.M. Gallo e E. Scarici.
F. Maggini and A. Scoppola at work in the UTV Herbarium in 1996. Background: A.M. Gallo and F. Scarici.

Conserva *exsiccata* di piante vascolari provenienti dall'Italia - soprattutto dal Lazio - e da alcuni Paesi europei ed esteri fra cui Bulgaria, Kenya, Marocco, Spagna e Germania e dal 1997 effettua l'archiviazione informatica dei dati. I saggi informatizzati sono oggi più di 25.000, ripartiti in 300 pacchi; dal 2003 il database è in rete. I locali dell'Erbario, tuttora ospitati dal DABAC, hanno una superficie complessiva di circa 50 mq e sono suddivisi in un locale principale adibito allo stoccaggio e alla consultazione dei saggi e alcuni spazi annessi adibiti allo studio e al

trattamento dei saggi in preparazione. Questa sistemazione è ancora provvisoria. L'utilità scientifica dell'Erbario è legata principalmente al settore della floristica; tuttavia, è servito a G. Tucci per studi filogenetici e tassonomici fondati sulla comparazione di specifiche regioni del DNA estratto da porzioni di tessuto prelevate da saggi di alcune *Cynareae*.

Ad Agraria nel 2001 A. Scoppola diviene Professore Ordinario, M. Frediani è Professore Associato dal 2002, infine G. Tucci diviene Professore Ordinario nel 2003; tutti e tre afferiscono al SSD BIO/03 come il nuovo Ricercatore, Goffredo Filibeck, che prenderà servizio nell'autunno del 2006.



Fig. 6

A. Scoppola in commissione di laurea nel 2004.

A. Scoppola attending undergraduate dissertations in 2004.

I principali temi di ricerca sviluppati in questi anni nel settore della botanica molecolare sono lo studio dei rapporti filogenetici tra specie mediante marcatori molecolari, la localizzazione citologica di specifiche sequenze di DNA e l'analisi del genoma dal punto di vista strutturale e funzionale. Nel settore della geobotanica le ricerche vertono principalmente sulla descrizione di nuove associazioni di vegetazione forestale e prativa, sulla cartografia della vegetazione e sui censimenti floristici; negli ultimi anni l'interesse si è spostato sul monitoraggio e la conservazione di specie e habitat a rischio di estinzione e sulla conservazione *ex situ* di specie autoctone presso l'Orto Botanico.

Tornando alla botanica in Facoltà di Scienze, S.



Fig. 7

Il laboratorio di botanica molecolare del DABAC nel 2006 con C. Gregori, M.T. Gelati, V. Delre e M. Frediani. The molecular botany laboratory of the Agrobiology and Agrochemistry Department in 2006 (C. Gregori, M.T. Gelati, V. Delre and M. Frediani).

Onofri diviene Professore Ordinario nel 2001 (BIO/02) e L. Zucconi Professore Associato nel 2005 (BIO/03). Partecipano a numerose campagne nell'ambito del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide, con ricerche micologiche e microbiologiche, in particolare sull'evoluzione e adattamento dei funghi e licheni in ambienti estremi. Nel 2006 il gruppo si accresce con l'ingresso di un nuovo Ricercatore in BIO/02, Laura Selbmann incaricata del corso di Laboratorio di tecniche per lo studio dei sistemi biologici (classe 6/S). Le ricerche svolte dal Laboratorio di genetica molecolare dei funghi diretto da S. Onofri portano alla descrizione di 29 nuove specie e 4 nuovi generi, di cui alcuni molto significativi. Il gruppo cura la redazione della Checklist dei funghi italiani che raccoglie i dati dell'omonimo progetto di cui S. Onofri è coordinatore nazionale. Dal 2003 S. Onofri è Direttore del Centro Interdi-



Fig. 8

S. Onofri guida una visita all'Orto Botanico nel 2005.

S. Onofri while leading a guided tour of the Botanical Garden in 2005.

partimentale dell'Orto Botanico (COB), centro di Ateneo a cui afferiscono i dipartimenti DISA, DABAC, DISAFRI, DIPROV e DIPROP delle Facoltà di Scienze e di Agraria, a cui si aggiunge nel 2007 il DECOS. Dallo stesso anno A. Scoppola è vice-direttore. Il COB svolge attività didattiche e di ricerca e cura la coltivazione di specie autoctone ed esotiche. È in allestimento una banca del germoplasma, che dal 2005 è uno dei nodi della Rete Italiana Banche del germoplasma per la conservazione *ex situ* della flora spontanea italiana (RIBES). Viene inoltre attivata la Sezione Micologica del Museo Nazionale dell'Antartide presso cui è collocata l'importante collezione di rocce antartiche colonizzate da microrganismi criptoendolitici e la relativa collezione di colture che sono uniche al mondo.

All'Orto Botanico vengono svolte le esercitazioni per i vari corsi di Botanica e materie affini per Scienze e Agraria e negli ultimi anni sono stati realizzati numerosi tirocini e tesi di laurea (Relatori: S. Onofri, A. Scoppola). Ospita inoltre un Master di II Livello per *Curatore di Parchi, Giardini ed Orti Botanici*, collabora all'organizzazione di corsi di giardinaggio mediterraneo e corsi di formazione per disabili. È frequentato dagli studenti del Master internazionale *Ambiente e Salute* di cui S. Onofri è direttore.

Monica Fonck è attualmente il Curatore dell'Orto Botanico: micologo di origine, coordina le varie attività didattiche e gestionali e si interessa in particolare della banca del germoplasma. Si avvale della collaborazione di 4 unità fra tecnici e amministrativi e di un buon numero di braccianti agricoli stagionali, nonché della preziosa opera di contrattisti e assegnisti fra cui Sara Magrini che oltre a occuparsi della banca del germoplasma e delle collezioni dell'Orto, con A. Scoppola, svolge ricerche in campo floristico.

CONCLUSIONI

I successi scientifici raggiunti dai Botanici dell'Università della Tuscia in campo nazionale e internazionale sono tanti e diversificati e risulta impossibile enumerarli tutti. I settori a cui vanno principalmente attribuiti sono gli studi di tassonomia, filogenesi e biodiversità; la descrizione di nuove entità fungine e il ritrovamento di specie botaniche scomparse o nuove per la regione, la genetica molecolare dei funghi, la specializzazione nel saprofitismo e lo studio delle micorrize; lo studio dell'adattamento degli organismi ad ambienti estremi e della resistenza a disseccamento, radiazioni e basse temperature anche nello spazio; lo studio del polline, del tubetto pollinico, dell'apparato citoscheletrico e la scoperta di motori molecolari, l'analisi del ciclo cellulare delle piante, l'analisi strutturale e funzionale di frazioni del genoma; il monitoraggio di specie botaniche e habitat a rischio di estinzione e il biomonitoraggio



Fig. 9

S. Magrini e M. Fonck all'Orto Botanico di Viterbo nel 2006. S. Magrini and M. Fonck at the Viterbo University Botanical Garden in 2006.

raggio mediante licheni, la descrizione di nuove associazioni vegetali e la cartografia della vegetazione; infine la realizzazione e gestione di banche dati naturalistiche.

Molti sono o sono stati gli incarichi istituzionali dei botanici presso organi e strutture dell'Ateneo di Viterbo; fra questi la Direzione di Dipartimenti, dell'Orto Botanico e del Centro di Microscopia Elettronica; le cariche di Consigliere in Senato Accademico e in Consiglio di Amministrazione; etc. Molti anche gli incarichi nell'ambito di Società o Istituzioni scientifiche nazionali e internazionali: fra questi, OPTIMA, la Società Botanica Italiana, la Società Italiana di Fitosociologia, l'International Mycological Association, European Cytoskeleton Forum, la Presidenza del Parco Nazionale d'Abruzzo, etc.

Fra i prossimi impegni va sottolineata l'incentivazione delle attività scientifiche dell'Orto Botanico con il completamento della Banca del Germoplasma e la realizzazione della Rete degli Orti Botanici del Lazio; la risoluzione dell'annoso problema della collocazione definitiva e dell'individuazione di adeguati spazi e personale per l'Erbario della Tuscia che per le sue funzioni richiede di essere "fisicamente" connesso con l'Orto Botanico. Le due strutture, già inserite singolarmente nel Sistema Museale di Ateneo, da qualche anno collaborano proficuamente con attività scientifiche e didattiche comuni, con l'intento di promuovere la Botanica sia all'interno che all'esterno dell'Ateneo viterbese e nella speranza di poter dar vita nel prossimo futuro ad un Museo Botanico unitario, così come già avviene nella maggior parte degli altri Atenei.

AUTORI

Anna Scoppola, Silvano Onofri, Centro Interdipartimentale dell'Orto Botanico, Università della Tuscia, Strada S. Caterina, 01100 Viterbo; e-mail: scoppola@unitus.it

Bassa divergenza molecolare ed elevata fertilità interspecifica nel genere *Serapias* (*Orchidaceae*)

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

ABSTRACT - *Low molecular divergence and high interspecific fertility in genus Serapias (Orchidaceae)* - This paper reports preliminary results of our efforts to evaluate either molecular relationships among 14 species of the Mediterranean orchid genus *Serapias* as well as the occurrence and the efficacy of the intra- and inter-specific reproductive barriers among some of these species. The low variability found at the cpDNA (*trnL*-F intergenic spacer, *AtpF* intron and *rps16* intron) groups the examined species in two clades. Experiments of hand crossing reveal that the spontaneous autogamy is very low, that induced autogamy and geitonogamy produce seeds less viable than outcrossing. Highly levels of fruit production, seeds viability and germinability were observed in interspecific crosses. Overall, the low molecular divergence and high inter-specific fertility may reflect a very recent and/or still incipient speciation and/or a highly interspecific gene flow. As a consequence, the role of both pre- and post-zygotic barriers in the species differentiation might be reconsidered.

Key words: cpDNA, hand pollination, *Serapias*

INTRODUZIONE

Il genere *Serapias* è un gruppo critico che include un numero variabile di *taxa* la cui distinzione su base morfologica è spesso problematica e non suggerisce possibili relazioni evolutive. Ricerche condotte con approcci molecolari non hanno finora aiutato a chiarire quest'ultimo aspetto. In particolare, l'analisi filogenetica delle *Orchidinae* basata sulle sequenze degli spaziatori interni (ITS) del DNA ribosomiale (BATEMAN *et al.*, 1997) ha evidenziato che *Serapias* è un gruppo monofiletico, ma non ha chiarito le relazioni tra le specie a causa della bassa o assente variabilità molecolare. Allo stesso modo, presso il nostro laboratorio è stato osservato che nelle principali specie esiste un alto grado di omologia delle sequenze dell'introne del tRNA plastidiale per la Leucina (*trnL*) (dati non pubblicati).

In questo lavoro sono presentati dati preliminari riguardanti ulteriori indagini molecolari ed esperimenti di biologia della riproduzione nell'ambito dello studio dei processi di speciazione del genere *Serapias*.

Sono state, quindi, analizzate regioni plastidiali già note per la loro natura altamente polimorfica e, in contemporanea, sono stati effettuati incroci manuali su piante rappresentative di cinque specie italiane, al fine di ottenere informazioni dettagliate sulle barriere intra- e inter-specifiche, eventualmente presenti, e per valutare il grado di autogamia spontanea proprio di ciascuna specie.

MATERIALI E METODI

In tutto l'areale del Mediterraneo sono state campionate numerose popolazioni rappresentative di 14 specie del genere *Serapias* (Tab. 1).

Per ciascun individuo è stato estratto il DNA totale seguendo il protocollo di DOYLE, DOYLE (1990); gli

TABELLA 1
Specie campionate.
Collected species.

Specie	Provenienza geografica
<i>S.vomeracea</i>	Italia, Grecia, Francia
<i>S.cordigera</i>	Italia, Grecia
<i>S.olbia</i>	Francia
<i>S.levantina</i>	Israele
<i>S.lingua</i>	Italia
<i>S.parviflora</i>	Italia, Grecia
<i>S.nurrica</i>	Italia
<i>S.politisii</i>	Italia, Grecia
<i>S.neglecta</i>	Italia, Francia
<i>S.perez chiscanoi</i>	Spagna
<i>S.gregaria</i>	Francia
<i>S.strictiflora</i>	Spagna, Portogallo
<i>S.stenopetala</i>	Portogallo
<i>S.apulica</i>	Italia

amplificati di diversi tratti plastidiali sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di primers universali (TABERLET *et al.*, 1991, WEISING, GARDNER, 1999), purificati e sequenziati su un ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems).

L'analisi RFLP, ha riguardato frammenti plastidiali di diversa lunghezza (*rps16* intron, *trnS-trnG* - intergenic spacer, *atpB-rbcL* - intergenic spacer, *trnT-psbCr* intergenic spacer, *trnV-rbcL* intergenic spacer) che, una volta amplificati, sono stati digeriti con 25 differenti endonucleasi di restrizione.

Il risultato è stato visualizzato mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% e la lunghezza dei frammenti ottenuti determinata con un 100 bp ladder.

Su *S. vomeracea*, *S. parviflora*, *S. cordigera*, *S. lingua* e *S. politisii*, sono stati condotti incroci manuali a livello interspecifico. Per *S. vomeracea* e *S. cordigera* è stata valutata anche la fitness di incroci intraspecifici di allogamia, geitonogamia e autogamia indotta.

Alcune piante rappresentative di ciascuna specie non sono state sottoposte ad alcun tipo di manipolazione, ma protette solo dal contatto con eventuali impollinatori al fine di valutarne il grado di autogamia spontanea.

I semi delle capsule prodotte sono stati osservati al microscopio ottico, contando quali contenessero embrioni e quali no, ed usati successivamente per esperimenti di germinazione asimbiotica *in vitro*.

RISULTATI

L'analisi molecolare delle varie regioni esaminate, mostra polimorfismo solo nella sequenza dello spaziatore interposto tra il *trnL* e il *trnF*, in quella parziale dell'introne dell'*AtpF* e nell'analisi RFLP dell'introne dell'*rps16*, frammenti tutti di natura plastidiale.

La regione interposta tra i geni codificanti per il *trnL* (UAA) e per il *trnF* (GAA), ritenuta ampiamente polimorfica e particolarmente adatta a studi filogenetici (SHAW *et al.*, 2005), è lunga 341 bp, di cui solo 6 variabili; la regione dell'*AtpF* intron, invece, risulta polimorfica solo per 5 delle 229 bp.

L'unico enzima di restrizione che digerendo l'introne dell'*rps16* ha prodotto bande polimorfiche è stato *DraI*.

Nel complesso, questi dati suddividono le specie esaminate in due gruppi: il primo comprende *S. vomeracea*, *S. levantina*, *S. nurrica*, *S. cordigera*, *S. neglecta*, *S. perez chiscanoi*; l'altro *S. parviflora*, *S. lingua*, *S. olbia*, *S. gregaria*, *S. stenopetala* e *S. strictiflora*. *S. politisii*, invece, ha un profilo molecolare strettamente correlato alla sua duplice provenienza geografica: le popolazioni greche si collocano nel primo gruppo, quelle italiane nel secondo.

Dagli esperimenti di biologia della riproduzione, si dimostra una fitness significativamente alta negli incroci di allogamia intra- e inter-specifica (Tab. 2a), più modesta per quelli di autogamia e geitonogamia. Il 70% dei semi contenuti nelle capsule derivanti dagli incroci di allogamia hanno un embrione (Tab. 2b, Fig. 1); nettamente più scarsa è, invece, la per-

TABELLA 2a

Percentuale di capsule prodotte per ciascun incrocio interspecifico.

Fruit set percentage for each cross pollination.

O	<i>S. vomeracea</i>	<i>S. cordigera</i>	<i>S. parviflora</i>	<i>S. lingua</i>
O				
<i>S. vomeracea</i>	71	90	50	100
<i>S. cordigera</i>	72	71	100	67
<i>S. parviflora</i>	100	100	-	100
<i>S. politisii</i>	92	-	78	-
<i>S. lingua</i>	78	100	100	-

TABELLA 2b

Percentuale di semi con embrione per ciascun incrocio interspecifico.

Embryo seeds percentage for each cross pollination.

O	<i>S. vomeracea</i>	<i>S. cordigera</i>	<i>S. parviflora</i>	<i>S. lingua</i>
O				
<i>S. vomeracea</i>	92	79	41	36
<i>S. cordigera</i>	59	87.5	75.6	38
<i>S. parviflora</i>	43	89	-	78.35
<i>S. politisii</i>	73.75	-	56	-
<i>S. lingua</i>	65.2	65.6	43.55	-



Fig. 1

Semi con o senza l'embrione.
Seeds with or without embryo.

centuale riscontrata nelle capsule autogamiche e geitonogamiche (11-36).

I semi embrionati degli incroci tra *S. vomeracea* e *S. cordigera* sono stati sottoposti a germinazione asimbiotica *in vitro* mostrando un tasso di vitalità pari al 98%.

Questi risultati mettono in evidenza un'alta compatibilità tra le specie esaminate, traducibile in una bassa efficacia di barriere pre- e post-zigotiche solo negli incroci di allogamia.

Infine, è stato verificato che *S. parviflora* è una specie con autogamia spontanea ed i semi prodotti hanno un embrione nel 68% dei casi.

DISCUSSIONE

Sebbene i risultati delle indagini molecolari siano ancora insufficienti per delineare un quadro sistematico evolutivo soddisfacente, contengono interessanti elementi di riflessione e stimolo per ulteriori indagini. In generale, non c'è dubbio che il genere *Serapias* ha una variabilità molecolare particolarmente bassa.

Per esempio, nel genere *Ophrys* la variabilità dei frammenti plastidiali non codificanti del *trnL* e del *trnL-F* è pari al 5,3% (SOLIVA *et al.*, 2001) contro lo 0,3% riscontrato in *Serapias* nei medesimi tratti. Inoltre, la presenza nelle due zone disgiunte dell'areale di *S. politisii* pone interessanti domande sull'origine e sulla filogeografia di questa specie, ma ancor di più suggerisce che potrebbe esistere in *Serapias* una più diffusa evoluzione reticolata. In tal senso, sembra opportuno ricorrere all'uso di marcatori molecolari nucleari più variabili, quali gli AFLP, che ultimamente sono stati usati anche per analisi filogenetiche (DESPRÉS *et al.*, 2003).

Nel complesso, i risultati delle indagini molecolari sono in sintonia con gli esperimenti di incrocio manuale. Infatti, la elevata fertilità interspecifica da noi osservata permette di ipotizzare che eventi di flusso genico tra le specie possano essere frequenti anche in natura, favoriti dal fatto che spesso più specie di *Serapias* vivono in simpatria. Questo pone in primo piano la necessità di definire la strategia d'impollinazione e il tipo di barriere riproduttive attive in questo genere, per poter poi comprendere i probabili processi speciativi.

A lungo, la speciazione delle orchidee è stata vista come il risultato di un "isolamento florale", determinato dal comportamento degli impollinatori. Più di recente è stato osservato che le orchidee non nettariere, quale è *Serapias*, hanno impollinazione non specialistica, che favorisce fenomeni di ibridazione.

Tuttavia, poiché gli sciami ibridi sono rari, è stato dedotto che debbano essere attive barriere post-zigotiche dovute a riarrangiamenti cromosomici che, riducendo la fitness, permettono l'isolamento riproduttivo in popolazioni simpatriche (COZZOLINO, WIDMER, 2005). Alla luce di queste teorie, i risultati delle nostre indagini contengono interessanti implicazioni perché si pongono in contrasto con l'ipotesi delle barriere post-zigotiche dal momento che i semi ibridi hanno un elevato tasso di germinazione.

Nello stesso tempo, la bassa variabilità molecolare suggerisce che anche l'isolamento florale è scarso. Le specie in esame, infatti, vivono spesso in situazione di simpatria, non sono isolate da un punto ecologico e condividono gli stessi insetti impollinatori.

I dati così ottenuti possono essere interpretati come la possibilità che le specie appartenenti al genere *Serapias* siano soggette ad un processo di speciazione incipiente. In alternativa, si può ipotizzare che le popolazioni naturali di *Serapias* siano formate da numerosi ibridi che, però, non possono essere individuati né su base morfologica né molecolare.

In ogni caso, *Serapias* rappresenta un modello intrigante per indagare sui meccanismi di isolamento

riproduttivo e di speciazione tra le orchidee non nettariere del Mediterraneo.

LETTERATURA CITATA

- BATEMAN R.M., PRIDGEON A.M., CHASE M.W., 1997 - *Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of Orchis sensu stricto*. *Lindleyana*, 12: 113-141.
- COZZOLINO S., WIDMER A., 2005 - *The evolutionary basis of reproductive isolation in Mediterranean orchids*. *Taxon*, 54: 977-985.
- DESPRÉS L., GIELLY L., REDOUTET B., TABERLET P., 2003 - *Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability*. *Mol. Phylogen. Evol.*, 27: 185-196.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L., 1990 - *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *Focus*, 12: 13-15.
- SHAW J., LICKEY E.B., BECK J.T., FARMER S.B., LIU W., MILLER J., SIRIPUN K.C., WINDER C.T., SCHILLING E.E., SMALL R.L., 2005 - *The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis*. *Am. J. Bot.*, 92(1): 142-166.
- SOLIVA M., KOCYAN A., WIDMER A., 2001 - *Molecular Phylogenetics of the sexually deceptive orchid genus Ophrys (Orchidaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences*. *Mol. Phylogen. Evol.*, 20: 78-88.
- 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.
- WEISING K., GARDNER R.C., 1999 - *A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms*. *Genome*, 42: 9-19.

RIASSUNTO – In questo lavoro sono riportati dati preliminari che riguardano sia le relazioni molecolari di 14 specie di orchidee del genere *Serapias*, sia l'efficacia di barriere riproduttive intra- e interspecifiche tra alcune di queste specie. La bassa variabilità molecolare riscontrata al livello dell'introne dell'*AtpF*, dello spaziatore interposto tra il *trnL-F* e dell'introne dell'*rps16*, suddivide le specie esaminate in due gruppi. Esperimenti di incroci manuali mostrano che l'autogamia spontanea è molto bassa e che l'autogamia e la geitonogamia indotta producono semi molto meno vitali rispetto a quelli prodotti negli incroci di allogamia. Di questi semi ne è stata testata la vitalità mediante esperimenti di germinazione asimbiotica *in vitro*. Nel complesso, la bassa variabilità molecolare e l'elevata fertilità interspecifica, possono indicare che in questo genere il processo di speciazione sia recente o ancora in atto e il flusso genico interspecifico molto forte. Di conseguenza, è opportuno rivalutare il ruolo delle barriere pre- e post-zigotiche nei processi di speciazione.

AUTORI

Francesca Bellusci, Giuseppe Pellegrino, Anna Maria Palermo, Aldo Musacchio, Dipartimento di Ecologia, Università della Calabria, Via Bucci 6/B, 87036 Rende, Cosenza

Mutazioni cromosomiche nella Tribù *Neottieae* (*Orchidaceae*)

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

ABSTRACT - *Chromosomal mutations within the Neottieae Tribe (Orchidaceae)* - A karyological study on Italian species belonging to the genera *Cephalanthera*, *Epipactis*, *Limodorum*, *Listera* and *Neottia* was undertaken. Karyomorphological data and C-banding were used to describe Robertsonian mutations and heterochromatin distribution. Chromosomal rearrangements involving the large and medium-large chromosomes constituted the principal mechanism of karyotype evolution in this group.

Key words: chromosome banding, karyotype analysis, karyotype evolution, *Neottieae*, *Orchidaceae*

INTRODUZIONE

Una mutazione cromosomica è il risultato di un processo che può generare cambiamenti nel numero e nella morfologia dei cromosomi. Nell'ambito delle mutazioni, è ampiamente accettato che la fusione e la dissociazione centrica sono importanti meccanismi per spiegare i suddetti cambiamenti. Tra i due processi, il secondo sembra quello più osservato nelle piante; infatti, la dissociazione centrica produce nuovi cromosomi all'interno di una popolazione aumentando la probabilità dell'isolamento genetico e quindi della speciazione (PERRY *et al.*, 2004).

Queste alterazioni cromosomiche ben indagate in altri gruppi di piante, sono poco documentate nella famiglia delle *Orchidaceae*.

Recentemente, analisi del cariotipo in *Phragmipedium* e *Paphiopedilum* (Tribù *Cypripedioideae*) (COX *et al.*, 1998), in *Cephalanthera* (SCHWARZACHER, SCHWEIZER 1982; D'EMERICO *et al.*, 1999) ed *Epipactis* (Tribù *Neottieae*) (D'EMERICO *et al.*, 1999) hanno rivelato mutazioni cromosomiche generate da fissione Robertsoniana.

In questo contributo vengono presentati i risultati emersi da una serie d'indagini cariologiche, condotte su alcune entità appartenenti alla tribù *Neottieae* che comprendono 5 generi (*Cephalanthera*, *Epipactis*, *Limodorum*, *Listera* e *Neottia*).

MATERIALI E METODI

Le analisi cariologiche sono state effettuate con la tecnica Feulgen e metodiche di bandeggio con Giemsa e fluorocromi. A tale scopo sono stati utilizzati tessuti meristemati di ovari immaturi pretrattati in soluzione acquosa di colchicina allo 0,3% per 2

h circa e successivamente fissati in Carnoy da 20 a 60 minuti. Per la metodica Feulgen, dopo alcuni lavaggi in H₂O distillata, i tessuti meristemati sono stati idrolizzati in HCl 1N a temperatura ambiente per 20 minuti, quindi colorati in fucsina leucobasica per circa 10 minuti e schiacciati in acido acetico glaciale al 45%.

Per la caratterizzazione dei cromosomi è stata adottata la nomenclatura di LEVAN *et al.* (1964).

Per le analisi cariomorfometriche sono stati utilizzati gli indici di asimmetria di ROMERO ZARCO (1986): A₁ (indice intracromosomale, che descrive il grado di simmetria del cariotipo) e A₂ (indice intercromosomale, che descrive la variazione nelle dimensioni dei cromosomi).

Le analisi di bandeggio con Giemsa ed alcuni fluorocromi sono state condotte seguendo le indicazioni riportate da D'EMERICO *et al.* (1996).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il gruppo *Neottieae* è caratterizzato da un cariotipo "standard" asimmetrico di tipo bimodale nel quale le lunghezze dei cromosomi hanno una diversa distribuzione, costituendo due/tre gruppi di differenti dimensioni. STEBBINS, (1971) ha suggerito che la bimodalità è una forma estrema e specializzata del cariotipo asimmetrico, il quale si origina da una combinazione di processi come fissione centrica, inversione e ineguale traslocazione.

Mutazioni robertsoniane sono state suggerite da SCHWARZACHER, SCHWEIZER (1982) per spiegare l'origine del cariotipo nel genere *Cephalanthera*. Questi autori hanno proposto un modello in cui un citotipo

ancestrale con $2n = 32$ cromosomi, può evolversi in un citotipo con $2n = 36$, attraverso dissociazione centrica delle prime due coppie di cromosomi.

Cephalanthera damasonium (Miller) Druce è una pianta rizomatosa con radici sottili, fibrose, fusto eretto, spiga fiorale da 2-10 fiori bianco-avorio, semi-chiusi, con fioritura in maggio-giugno. In questa specie possono verificarsi processi di autogamia e cleistogamia. Il suo cariotipo è costituito da tre coppie di cromosomi lunghi e da quindici di piccole dimensioni.

Recentemente sono state individuate ed analizzate due popolazioni sarde di *C. damasonium* morfologicamente simili; una presente in territorio di Perdasdefogu, l'altra presso S'Astaria (Laconi).

Dalla comparazione dei dati cariologici è emerso che le due popolazioni presentano citotipi differenti, ma con lo stesso numero cromosomico. Un citotipo è simile a quello già rilevato per le stazioni dell'Italia Peninsulare ed extraitaliane, caratterizzato dalla prima e seconda coppia telocentrica e dalla terza coppia submetentrica. Il secondo citotipo mostra, invece, una variazione nella struttura del cariotipo, con la prima coppia telocentrica, la seconda submetentrica e la terza submetentrica; differenze che suggeriscono un'ipotesi alternativa nell'evoluzione del cariotipo di *Cephalanthera damasonium* (D'EMERICO *et al.*, 2000) (Fig. 1).



Fig. 1

a) *Cephalanthera damasonium* proveniente dalla stazione S'Astaria; bandeggio con Giemsa, corredo aploide. b) *C. damasonium* proveniente dalla stazione Perdasdefogu.

a) *Cephalanthera damasonium* from S'Astaria; Giemsa C-banding, haploid set. b) *C. damasonium* from Perdasdefogu.

In quest'ultima ipotesi, il numero cromosomico $2n = 36$ si genera da un numero ancestrale $2n = 32$, attraverso dissociazione centrica della prima coppia e da una non identificata coppia di cromosomi metacentrica o submetentrica. Successivamente la dissociazione pseudocentrica della seconda coppia, con inversione e translocazione sul braccio lungo del segmento del braccio corto, conduce alla formazione del citotipo più comunemente osservato. Pertanto è possibile affermare che il citotipo di Perdasdefogu e dell'Italia Peninsulare è derivato da un citotipo simile a quello di S'Astaria, probabilmente più ancestrale (Fig. 2).

Il genere *Epipactis* comprende più di cinquanta entità ripartite in due sezioni, *Arthrochilium* ed *Epipactis*. I numeri cromosomici riportati in letteratura per le

suddette entità sono $2n = 38$ e $2n = 40$, con cariotipi asimmetrici bimodali caratterizzati da quattro coppie di cromosomi lunghi e da quindici-sedici coppie di piccole dimensioni. Le analisi effettuate con il bandeggio con Giemsa hanno evidenziato, in tutte le specie analizzate, una o due coppie di cromosomi costituite da un braccio corto completamente eterocromatico. L'origine di questo assetto è da ascrivere, con tutta probabilità, a dissociazione centromerica in alcuni cromosomi metacentrici o submetentrici, seguita da amplificazione di sequenze ripetute di DNA (D'EMERICO *et al.*, 1999). Nel gruppo *Epipactis* sono state osservate "quadruple strutture" nelle regioni centromeriche, indicando probabili fusioni centriche, come descritte in *Cephalanthera* da SCHWARZACHER, SCHWEIZER (1982).

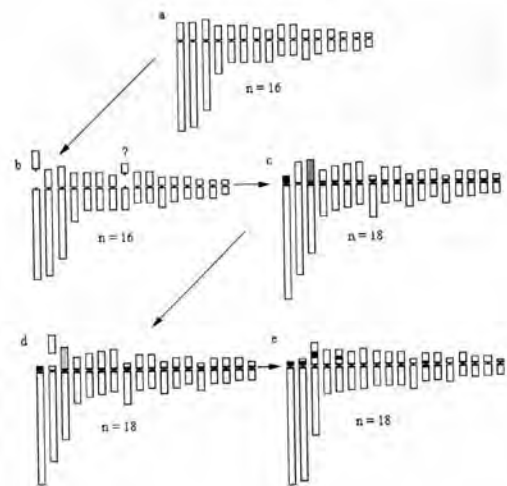


Fig. 2

Probabile evoluzione del cariotipo di *Cephalanthera damasonium*.

Probable evolution of the karyotype of *Cephalanthera damasonium*.

Il genere *Limodorum* comprende entità caratterizzate da un numero cromosomico elevato ($2n = 54, 56, 58, 60$) e cariotipi bimodali. Questo gruppo, in Italia, è rappresentato da tre specie morfologicamente distinte: *L. abortivum* (L.) Swartz con da due staminodi, *L. trabutianum* Battandier con tre staminodi e *L. brulloi* Bartolo & Pulvirenti con cinque staminodi.

Un'analisi cariologica dettagliata delle tre specie ha rivelato differenze nelle prime due coppie di cromosomi lunghi. In *L. abortivum* e *L. trabutianum* la prima coppia di cromosomi è telocentrica, con una larga banda eterocromatica sul braccio lungo in prossimità del centromero. La seconda coppia mostra una larga banda intorno alla costrizione secondaria presente sul braccio corto.

Il cariotipo e il bandeggio dei cromosomi di *L. brulloi*, hanno evidenziato una struttura e una quantità

di eterocromatina che lo separa chiaramente dalle altre specie del genere *Limodorum* (BARTOLO *et al.*, 2002). *L. brulloi* differisce dalle altre due specie per avere la prima coppia submetacentrica con il braccio corto interamente eterocromatico e per la presenza di una banda subcentromerica prossima al centromero. Pertanto, i dati cariologici indicano che *L. abortivum* e *L. trabutianum* hanno subito nel corso dell'evoluzione un riarrangiamento cromosomico maggiore rispetto a *L. brulloi*. Inoltre, le differenze cariologiche osservate nelle tre specie confermano quanto ipotizzato dagli studi morfologici secondo cui *L. brulloi* è ancestrale rispetto a *L. abortivum* e *L. trabutianum*. Un cambiamento strutturale con evidenti mutazioni centriche a carico di alcuni cromosomi è stato riscontrato nel genere *Listera*, rappresentato in Italia da due sole specie: *L. ovata* (L.) R. Brown e *L. cordata* (L.) R. Brown.

Listera ovata presenta numero cromosomico $2n = 34$, diverso quindi da $2n = 32, 35, 36, 38, 40, 42$ riportati da altri AA. (KLIPHUIS, 1963; MEILI-FREI, 1966). Questa specie mostra un cariotipo costituito da $2M+18m+12sm+2st^s$. Nessuno tra i cromosomi ha mostrato eterocromatina centromerica; solo la coppia n. 9 presenta il braccio corto completamente eterocromatico.

Listera cordata ha mostrato $2n = 38$ cromosomi in accordo con i dati riportati in letteratura (KLIPHUIS, 1963; MEILI-FREI, 1966). Il cariotipo è caratterizzato da $12M+14m+4sm+2st+6t$. Tutti i cromosomi mostrano eterocromatina centromerica mentre solo alcune coppie sono munite anche di evidenti bande eterocromatiche telomeriche ed intercalari (D'EMERICO *et al.*, 2000) (Fig. 3).



Fig. 3

Listera cordata. metafase somatica colorata con la tecnica di bandeggio con Giemsa.

Listera cordata: Giemsa C-banded somatic metaphase.

La cariomorfologia comparata tra le due specie, suggerisce che il cariotipo di *Listera cordata* presenta una certa affinità con quello di *Listera ovata* anche se l'analisi di bandeggio con Giemsa ha mostrato un'importante differenza nella quantità e nella distribuzione di eterocromatina. Attraverso quest'ultima metodica in *L. cordata* sono state rilevate mutazioni cromosomiche in cui sono implicati processi di dissociazione centrica, a carico di un ipotetico cariotipo ancestrale a $2n = 34$, che hanno dato origine all'attuale assetto del cariotipo. Inoltre, la notevole quantità di eterocromatina riscontrata in questa specie, conferma l'idea relativa ad una recente riorganizzazione del cariotipo (Fig. 4).

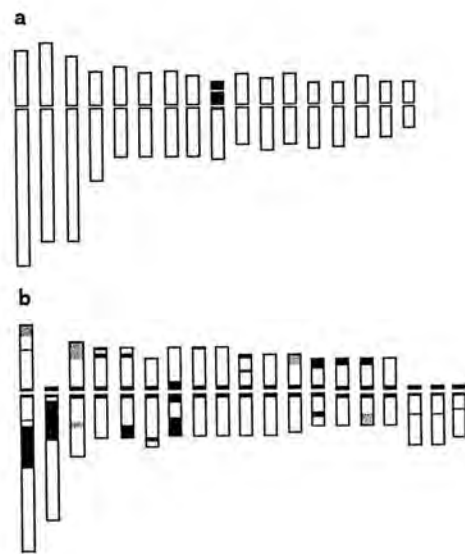


Fig. 4

Idiogrammi aploidi del corredo cromosomico e distribuzione dell'eterocromatina. a) *Listera ovata*, b) *Listera cordata*.

Idiograms of haploid chromosome sets and heterochromatin distribution. a) *Listera ovata*, b) *Listera cordata*.

Il genere *Neottia* in Italia è rappresentato solo da *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Richard ($2n = 36$). Essa possiede un cariotipo caratterizzato da numerosi cromosomi telocentrici. La metodica di bandeggio con Giemsa ha messo in evidenza bande eterocromatiche in posizione centromerica e telomerica. Degna di nota è l'osservazione di cromosomi telocentrici in fase di fusione. Questi dati indicano recenti e reversibili riordinamenti strutturali nel corredo cromosomico.

In conclusione, mutazioni Robertsoniane e variazioni della quantità dell'eterocromatina costitutiva suggeriscono che entrambi questi parametri giocano un ruolo rilevante nell'evoluzione del cariotipo di molte entità appartenenti alla tribù *Neottieae*.

LETTERATURA CITATA

BARTOLO G., D'EMERICO S., PULVIRENTI S., SCRUGLI A.,

- TERRASI M.C., 2002 - *Karyotype structure and chromosome banding in Limodorum brulloi Bartolo & Pulvirenti* (Orchidaceae). *J. Eur. Orch.*, 34: 87-96.
- COX V.A., ABDELNOUR J.G., BENNETT D.M., LEITCH J., 1998 - *Genome size and karyotype evolution in the slipper orchids* (Cypripedioideae: Orchidaceae). *Am. J. Bot.*, 85: 681-687.
- D'EMERICO S., GRÜNANGER P., SCRUGLI A., PIGNONE D., 1999 - *Karyomorphological parameters and C-band distribution suggest phyletic relationships within the subtribe Limodorinae* (Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.*, 217: 147-161.
- D'EMERICO S., PIGNONE D., BIANCO P., 1996 - *Karyomorphological analyses and heterochromatin characteristics disclose phyletic relationships among $2n = 32$ or $2n = 36$ species of Orchis L.* (Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.*, 200: 111-124.
- D'EMERICO S., PIGNONE D., SCRUGLI A., 2000 - *Karyomorphology and evolution in Italian populations of three Neottieae species* (Orchidaceae). *Cytologia*, 65: 189-195.
- KLIPHUIS E., 1963 - *Cytological observations in relations to the taxonomy of the orchids of the Netherlands*. *Acta Bot. Neerl.*, 12: 172-194.
- LEVAN A., FREDGA K., SANDBERG A., 1964 - *Nomenclature for centromeric position on chromosomes*. *Hereditas*, 52: 201-220.
- MEILI-FREI E., 1966 - *Cytogenetik und cytotaxonomie einheimischer arten von Epipactis, Listera, Neottia* (Orchidaceae). *Ber. Schweiz. Bot. Geo.*, 75: 219-292.
- PERRY J., SLATER R.H., CHOO H.K., 2004 - *Centric fission-simple and complex mechanisms*. *Chrom. Res.*, 12: 627-640.
- ROMERO ZARCO C., 1986 - *A new method for estimating karyotype asymmetry*. *Taxon*, 35: 526-530.
- SCHWARZACHER T., SCHWEIZER D., 1982 - *Karyotype analysis and heterochromatin differentiation with Giemsa C-banding and fluorescent counterstaining in Cephalanthera* (Orchidaceae). *Plant Syst. Evol.*, 141: 91-113.
- STEBBINS G., 1971 - *Chromosomal Evolution in Higher plants*. Arnold, London.
- RIASSUNTO – Viene riportato uno studio cariologico su alcune specie italiane appartenenti ai generi *Cephalanthera*, *Epipactis*, *Limodorum*, *Listera* e *Neottia*. Dati cariomorfologici e di bandeggio sono stati utilizzati per descrivere le mutazioni Robertsoniane e la distribuzione dell'eterocromatina. Mutazioni cromosomiche che coinvolgono i cromosomi più lunghi e medio-lunghi sembrano essere, in questo gruppo, il meccanismo principale nell'evoluzione del cariotipo.

AUTORI

Saverio D'Emérico, Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università di Bari, Via Orabona 4, 70125 Bari
 Giuseppina Bartolo, Sante Pulvirenti, Carmen Maria Terrasi, Dipartimento di Botanica, Università di Catania, Via A. Longo 19, 95125 Catania
 Annalena Cogoni, Antonio Scrugli, Università di Cagliari, Dipartimento di Scienze Botaniche, Viale S. Ignazio 13, 09123 Cagliari

Il cariotipo come strumento per la classificazione di specie vegetali: il genere *Vicia* L.

G. VENORA e C. RAVALLI

ABSTRACT - *Karyotype as a tool to classify plant species: genus Vicia L.* - Karyotypes of 27 species of subgenus *Vicia* L. have been inserted as *training set* in the Linear Discriminant Analysis (a statistic procedure that uses the variables of *known* groups to classify new *unknown* groups using the same variables). Many of the accessions inserted in the classifier as *unknown* (48 new accessions analysed) have been classified correctly. Besides, classification mistakes or species attribution have been highlighted. In fact, in some cases, the karyotype of the analysed accession could not be overlapped to the literature data; before, this only allowed stating the possible mistake by the germplasm bank that gave the accession. In these cases the Linear Discriminant Analysis (Classifier) has given a precise indication of the similarity of the analysed karyotype in the Data Base (Training set), with the specie having the similar chromosomes. This type of classification, realised only with the karyotype data, seems the first example of the use of karyotype as a tool to classify plant species, using multivariate analysis techniques.

Key words: classifier, karyotype, Linear Discriminant Analysis (LDA), *Vicia*

INTRODUZIONE

L'insieme delle caratteristiche cromosomiche di una specie costituiscono il cariotipo; esso è uno schema ordinato del corredo cromosomico di una cellula, nel quale i singoli cromosomi sono identificati in base alle loro caratteristiche morfologiche. Tutte le specie, animali e vegetali, hanno un cariotipo ben definito e caratteristico (VON SENGBUSCH, Botanik online, 2003).

La scoperta della costante specificità del numero di cromosomi da parte di STRASBURGER (1910), porta a porre la seguente domanda: "può il cariotipo fornire informazioni circa la posizione sistematica di una specie?".

Nel genere *Cicer* (*Fabaceae*), sono stati studiati i cariotipi delle otto specie annuali, per evidenziare le loro relazioni filetiche e le distanze genetiche, per elucidare le barriere all'interincrocio tra le specie selvatiche e quella coltivata, il *Cicer arietinum* L., per l'introggressione di geni utili (OCAMPO *et al.*, 1992). Tutte le otto specie hanno mostrato un cariotipo caratteristico. Sono state studiate, anche, quattro varietà coltivate di *Cicer arietinum* L. allo scopo di stabilire un cariotipo standard della specie coltivata, in particolare per il tipo "Kabuli", maggiormente diffuso nel bacino del mediterraneo. Si è notato che all'interno della specie, le quattro varietà sono distinguibili per piccole variazioni cromosomiche imputa-

bili ad inversioni pericentriche (VENORA *et al.*, 1995b, 1997)

In un altro gruppo di *Fabaceae*, il genere *Vigna*, è stato dimostrato che è possibile riconoscere le specie dal loro peculiare cariotipo (VENORA, SACCARDO, 1993; VENORA *et al.*, 1995a; VENORA *et al.*, 1999). La rappresentazione grafica degli indici di simmetria, calcolati dai cariotipi (VENORA *et al.*, 1999), consente un raggruppamento delle specie in accordo con la classificazione morfologica (MARECHAL *et al.*, 1978). Nello stesso genere *Vigna* sono identificabili, attraverso l'analisi del cariotipo, alcune varietà botaniche della specie coltivata *Vigna unguiculata* L. (Walper), grazie all'individuazione di cromosomi 'marker' (VENORA, PADULOSI, 1997). Ciò è stato fattibile anche per l'uso di un sistema di analisi d'immagine che ha reso possibile lo studio del cariotipo con elevata precisione e dettaglio (VENORA *et al.*, 1991)

Il genere *Vicia* L. include approssimativamente 190 specie (ILDIS, 1999) ampiamente distribuite nella zona temperata di entrambi gli emisferi (KUPICHA, 1976); esso è membro della tribù delle leguminose *Viciae* (*Fabaceae*). BALL (1968) divise il genere in quattro sezioni: *Vicia*, *Cracca* Gray, *Ervum* (L.) Gray e *Faba* (Mill.) Gray; successivamente KUPICHA (1976) riconobbe due sottogeneri, *Vicilla* e *Vicia*, con 17 e 5 sezioni rispettivamente. Il sottogenere

Vicia contiene meno specie che *Vicilla* ma include le specie agronomicamente più importanti come la fava (*Vicia faba* L.), la veccia di narbonne (*V. narbonensis* L.) e la veccia comune (*V. sativa* L.). Più recentemente, MAXTED (1993) ha riesaminato il sottogenere *Vicia* e ha proposto una nuova classificazione con nove sezioni.

L'analisi dei cariotipi di alcune specie di *Vicia*, sono stati utilizzati come diagnostici per l'identificazione di singole specie. Infatti, HANELT, METTIN (1989) riferiscono di una chiave per la determinazione di alcune specie del genere *Vicia*, basata solamente sulle caratteristiche dei loro cromosomi (SVENIKOVA, 1927); inoltre, vi sono altri esempi nello stesso genere (METTIN, HANELT, 1964; HANELT, METTIN, 1966; HANELT, METTIN 1970).

Recentemente, è stato dimostrato che è possibile distinguere gruppi critici, molto simili morfologicamente o ibridi, grazie all'utilizzo dei dati citologici e morfologici elaborati con tecniche di analisi statistica multivariata, quali la cluster analysis e le variabili canoniche; gli autori riferiscono dei risultati ottenuti su 26 accessioni di *Pennisetum* spp. (*Poaceae*) raccolte in campo che furono correttamente classificate con i dati cariologici e morfologici; di contro, non lo sarebbero stati con le sole metodiche classiche (TECHIO *et al.*, 2002).

Basandoci su questi presupposti, e utilizzando unicamente i cariotipi, il presente contributo riporta il tentativo di adoperarli per l'identificazione (Classificazione) di alcune specie del genere *Vicia* sottogenere *Vicia*.

È stato realizzato un classificatore statistico (Linear Discriminant Analysis) che è una metodica utilizzata per la classificazione di gruppi definiti da variabili quantitative e qualitative (FISHER, 1936; 1940); in questo caso sono stati utilizzati i dati dei cariotipi di alcuni gruppi (specie) precedentemente codificati per la individuazione e identificazione di nuovi gruppi ignoti.

MATERIALI E METODI

Il classificatore è stato realizzato mediante l'applicazione della 'Stepwise Linear Discriminant Analysis' (LDA) (SPSS, release 13.0 Inc 1989- 2005), procedura utilizzata per classificare gruppi definiti da variabili quantitative e qualitative (FISHER, 1936; 1940). Questa tecnica di classificazione prevede la costituzione di un *training set* (addestramento), in altre parole di un certo numero di gruppi noti a priori, sulla base dei quali l'algoritmo trova le migliori variabili, nel nostro caso le caratteristiche cariomorfologiche, per la classificazione dei diversi gruppi ignoti (specie = cariotipi). Le variabili sono selezionate ciclicamente (*stepwise*), per il loro contributo nel determinare la capacità di classificazione; il processo è automaticamente interrotto quando nessuna caratteristica inserita aumenta la capacità di classificazione ($P \geq 0.001$).

Considerando il materiale da esaminare, numerose specie diverse tra loro, si è pensato di realizzare il clas-

sificatore per blocchi; quindi, sono stati costituiti ed utilizzati tre distinti classificatori uno per ogni numero cromosomico ($2n = 10$, $2n = 12$ e $2n = 14$) ed infine un quarto, generico *Vicia*, per tutto il gruppo di specie studiate, indipendente dal numero cromosomico, ma comprensivo dei tre precedenti.

Questa lunga procedura si è resa necessaria per delimitare il campo di classificazione e consentire una migliore comprensione del procedimento di classificazione utilizzato con il metodo applicato (LDA); di contro, ciò non sarebbe stato possibile nel classificatore generico *Vicia*.

Il nome, la fonte e l'accessione delle specie utilizzate come *training set* sono riportati nella Tab. 1. Tutti i dati utilizzati nel *training set* delle specie provengono da cariotipi di letteratura di alcune sezioni del sottogenere *Vicia* (VENORA *et al.*, 2000; FREDIANI *et al.*, 2005; CAPUTO *et al.*, 2006; RUFFINI CASTIGLIONE *et al.*, 2007), mentre quelli ignoti del *test set* sono accessioni diverse dalle corrispondenti specie studiate precedentemente, ma i cariotipi sono stati appositamente analizzati per questo studio. I cariotipi di queste accessioni sono stati realizzati con la metodica già utilizzata in precedenza (VENORA *et al.*, 2000); il nome, la fonte e l'accessione sono riportati nella Tab. 2. In Tab. 3 sono elencati tutti i parametri cariomorfologici, inseriti come variabili nella Linear Discriminant Analysis.

RISULTATI

Per brevità non vengono qui riportati i risultati dei classificatori intermedi, cioè quelli relativi alle specie con $2n = 10$, $2n = 12$ e $2n = 14$, ma solo il Classificatore generico *Vicia*.

Classificatore generico *Vicia*

I tre classificatori, realizzati per blocchi di specie con numero cromosomico pari a $2n = 10$, $2n = 12$ e $2n = 14$, sono stati riuniti in un unico classificatore, in cui sono stati mantenuti i gruppi identificati in ciascuno dei singoli classificatori. Esso è costituito da 27 specie diverse, con 51 accessioni, per un totale di 354 piastre metafasiche classificate. Il risultato del classificatore per il genere *Vicia* è che il 100% dei casi classificati a priori sono stati correttamente raggruppati. L'accuratezza è accettabile, infatti le distanze di *Mahalanobis* hanno fatto registrare valori compresi tra 0 e 163.

Successivamente, nel 1° passo, sono state inserite come ignote tutte le accessioni studiate cariologicamente e non ancora classificate nei precedenti classificatori, precisamente sedici accessioni (Tab. 2). In questa fase è stata classificata un'accessione come *V. hyrcanica* nel 100% dei casi e precisamente *V. hyrcanica* PI 250797.

Nel 2° passo, dopo l'aggiunta nel *training set* dell'accessione classificata nel passo precedente, è stata classificata come *V. hyrcanica* l'accessione *V. michauxii* PI 561420.

Nel 3° passo, sono state classificate come *V. hyrcanica* due accessioni e precisamente *V. hyrcanica* W6-6268 e *V. pannonica* PI 220887; un'altra accessione è

TABELLA 1

Specie di Vicia, codice delle accessioni, banca del germoplasma e numero di piastre metafasiche analizzate nel training set, distinti per numero cromosomico.

Vicia species, accession code, source and number of metaphase plate analysed of in the training set, divided for chromosome complement number.

Specie	Codice Accessione	Banche germoplasma	Numero piastre metafasiche
Numero cromosomico 2n=10			
<i>V. melanops</i> Sibth. & Smith ^c	IG 64074	ICARDA	14
<i>V. ciliatula</i> Lipsky ^c	IG 63373	Jaaska	8
<i>V. anatolica</i> Turritt ^c	IG 64625	ICARDA	9
<i>V. mollis</i> Boiss & Hausskn. Ex Boiss. ^b	IG 62649	ICARDA	3
<i>V. mollis</i> Boiss & Hausskn. Ex Boiss. ^b	IG 108434	ICARDA	4
Numero cromosomico 2n=12			
<i>V. assyriaca</i> Boiss. ^c	IG 64098	ICARDA	3
<i>V. esdraelonensis</i> Warb & Eig. ^d	Herbarium	Hebrew Univ. Jerusalem	4
<i>V. tigridis</i> Mout. ^c	IG 63488	ICARDA	3
<i>V. galeata</i> Boiss. ^c	PI 602380	USDA	4
<i>V. hyrcanica</i> Fisch. & Mey. ^c	PI 561419	USDA	13
<i>V. noeana</i> (Re. in B.) Boiss ^c	IG 63757	ICARDA	6
<i>V. pannonica</i> Crantz ^c	PI 369156	USDA	7
<i>V. hybrida</i> L. ^c	IG 60008	ICARDA	9
<i>V. sericocarpa</i> Fenzl. ^c	IG 64103	ICARDA	8
<i>V. faba</i> L. ^a	113064	IGV	11
<i>V. sativa</i> L. ^c	253426	USDA	4
Numero cromosomico 2n=14			
<i>V. lutea</i> L. ^c	201994	USDA	5
<i>V. michauxii</i> Sprengel ^b	831	IPK	9
<i>V. peregrina</i> L. ^b	W6-12096	USDA	8
<i>V. aintabensis</i> Boiss. ^b	W6-17514	USDA	8
<i>V. narbonensis</i> L. ^a	105786	IGV	7
<i>V. eristalioides</i> Maxt. ^a	877321	UK	4
<i>V. galilaea</i> Plitm. et Zoh. ^a	112018	IGV	8
<i>V. hyaeniscyamus</i> Mout. ^a	112008	IGV	4
<i>V. johannis</i> Tamash. ^a	112019	IGV	10
<i>V. kalakhensis</i> Khatt. & al. ^a	867095	UK	7
<i>V. serratifolia</i> Jacq. ^a	NAR 121/77	IPK	8
<i>V. bithynica</i> L. ^a	Vic 303/79	IPK	6

Banche Germoplasma:

ICARDA= International Center Agricultural Resarch in Dry Areas – Aleppo - Syria

IGV= Istituto Genetica Vegetale, CNR, Bari, Italy;

UK= Genebank, University of Southampton, U.K.;

IPK= Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany;

USDA= United States Department of Agriculture, Pullman, USA.

V. Jaaska = Dept. of Botany, Estonian Agricultural University of Tartu, Estonia

Herbarium – The Hebrew University of Jerusalem

Tutti dati cariomorfologici del *training set* sono dati pubblicati:

^a = VENORA *et al.* (2000)

^b = FREDIANI *et al.* (2005)

^c = CAPUTO *et al.* (2006)

^d = RUFFINI CASTIGLIONE *et al.* (2007)

stata classificata come *V. sericocarpa*, precisamente la *V. mollis* IG 63797.

Nel 4° passo, sono state classificate come *V. hyrcanica* tre accessioni e precisamente *V. sericocarpa* IG 60014, *V. sericocarpa* IG 60702 e *V. mollis* IG 63743.

Il classificatore ottenuto per le specie del genere *Vicia* è così costituito: sono state utilizzate 30 variabili (Tab. 3), i valori di *Mahalanobis* sono compresi tra 0 e 198, entro i limiti di una sufficiente accuratezza; il data base di classificazione è stato realizzato con cinquanta accessioni di ventisette specie diverse del sottogenere *Vicia*, per un totale di 424 piastre metafasiche.

Otto accessioni, per un totale di 80 piastre metafasiche (Tab. 2), sono rimaste non classificate perché avevano valori di *Mahalanobis* superiori al valore massimo d'affidabilità (>200).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Alla domanda “*può il cariotipo fornire informazioni circa la posizione sistematica di una specie?*”, si può dare una risposta anche con i risultati di questa ricerca, che ha evidenziato ancora una volta, ma con nuove tecniche, come ciascuna specie possieda un cariotipo peculiare e distintivo.

TABELLA 2

Specie di Vicia, codice delle accessioni, banca del germoplasma e numero di piastre metafasiche analizzate nel test set (campioni ignoti), distinti per numero cromosomico e gruppi di classificazione

Vicia species, accession code, gene bank and metaphase plate number analysed of the test set (unknown samples), divided for chromosome complement number and classification groups.

Specie	Codice Accessione	Banca germoplasma	Numero piastre metafasiche	Gruppi di Classificazione
Numero cromosomico 2n=10				
<i>V. melanops</i> *	IG 63373	ICARDA	8	<i>V. ciliatula</i>
<i>V. ciliatula</i>	EN 3102	ICARDA	6	<i>V. ciliatula</i>
<i>V. mollis</i>	IG 63747	ICARDA	4	<i>V. mollis</i>
<i>V. mollis</i>	IG 63380	ICARDA	3	<i>V. mollis</i>
<i>V. mollis</i>	IG 63435	ICARDA	5	<i>V. mollis</i>
Numero cromosomico 2n=12				
<i>V. hybrida</i>	IG 116210	ICARDA	6	<i>V. hybrida</i>
<i>V. pannonica</i> *	PI 170008	USDA	4	<i>V. hybrida</i>
<i>V. hybrida</i>	IG 63593	ICARDA	10	<i>V. hybrida</i>
<i>V. hybrida</i> *	IG 64621	ICARDA	5	<i>V. sericocarpa</i>
<i>V. mollis</i> *	IG 63797	ICARDA	8	<i>V. sericocarpa</i>
<i>V. noeana</i>	IG 64241	ICARDA	17	<i>V. noeana</i>
<i>V. noeana</i>	IG 63535	ICARDA	9	<i>V. noeana</i>
<i>V. noeana</i>	IG 63814	ICARDA	6	<i>V. noeana</i>
<i>V. hyrcanica</i>	PI 250797	USDA	13	<i>V. hyrcanica</i>
<i>V. michauxii</i> *	PI 561420	USDA	6	<i>V. hyrcanica</i>
<i>V. hyrcanica</i>	W6-6268	USDA	8	<i>V. hyrcanica</i>
<i>V. pannonica</i> *	PI 220887	USDA	5	<i>V. hyrcanica</i>
<i>V. sericocarpa</i> *	IG 60014	ICARDA	7	<i>V. hyrcanica</i>
<i>V. sericocarpa</i> *	IG 60702	ICARDA	16	<i>V. hyrcanica</i>
<i>V. mollis</i> *	IG 63743	ICARDA	7	<i>V. hyrcanica</i>
<i>V. hybrida</i> °	IG 63861	ICARDA	5	Non Classificata
<i>V. hybrida</i> °	IG 64249	ICARDA	6	Non Classificata
Numero cromosomico 2n=14				
<i>V. lutea</i>	632673	USDA	4	<i>V. lutea</i>
<i>V. lutea</i>	249922	USDA	3	<i>V. lutea</i>
<i>V. lutea</i>	249880	USDA	8	<i>V. lutea</i>
<i>V. michauxii</i> *	IG 63533	ICARDA	5	<i>V. lutea</i>
<i>V. michauxii</i>	IG 63351	ICARDA	4	<i>V. michauxii</i>
<i>V. michauxii</i>	IG 64629	ICARDA	4	<i>V. michauxii</i>
<i>V. lutea</i> *	W6-2766	USDA	14	<i>V. peregrina</i>
<i>V. michauxii</i> *	IG 62570	ICARDA	9	<i>V. peregrina</i>
<i>V. michauxii</i> *	IG 63164	ICARDA	6	<i>V. peregrina</i>
<i>V. peregrina</i> *	420425	USDA	6	<i>V. aintabensis</i>
<i>V. peregrina</i> *	227472	USDA	7	<i>V. aintabensis</i>
<i>V. peregrina</i> *	IG 61156	ICARDA	7	<i>V. aintabensis</i>
<i>V. michauxii</i> °	756	IPK	6	Non Classificata
<i>V. michauxii</i> °	730	IPK	12	Non Classificata
<i>V. michauxii</i> °	746	IPK	13	Non Classificata
<i>V. michauxii</i> °	IG 63719	ICARDA	19	Non Classificata
<i>V. michauxii</i> °	W6-16257	USDA	12	Non Classificata
<i>V. peregrina</i> °	393824	USDA	7	Non Classificata

*Accessione classificata diversamente rispetto alla classificazione della Banca di germoplasma.

°Non Classificata, distanze di Mahalanobis fuori dal range di affidabilità (> 200)

Banche Germoplasma:

ICARDA= International Center Agricultural Research in Dry Areas – Aleppo - Syria

IPK= Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany;

USDA= United States Department of Agriculture, Pullman, USA.

TABELLA 3

Parametri utilizzati nell'analisi discriminante, rilevati in ogni piastra metafasica di ciascuna accessione analizzata.
Parameters used in discriminant analysis, recorded in any plate of every analysed accession.

Parametri	Code n.	Descrizione	Formula
TF %	1	L'indice TF% (Total Form %) costituito dal rapporto tra la somma dei bracci corti di ciascun cromosoma e la lunghezza del complemento aploide	$TF\% = \frac{\text{lunghezza dei bracci corti}}{\text{lunghezza complemento aploide}} \times 100$
Rec	2	L'indice Rec è la media dei rapporti delle lunghezze di ciascun cromosoma (CL _i) rispetto al più lungo (LC)	$Rec = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{CL_i}{LC}}{n} \times 100$ n = numero cromosomi analizzati
Sy _i	3	Sy _i indica il rapporto della lunghezza media dei bracci corti rispetto ai bracci lunghi del complemento	$Sy_i = \frac{\text{lunghezza media dei bracci corti}}{\text{lunghezza media dei bracci lunghi}} \times 100$
Cl	4	Lunghezza totale del complemento aploide	\sum^n n = numero aploide dei cromosomi analizzati
2n	5	Numero diploide dei cromosomi	
N. cro. sat	6	Numero di coppie satellitate	
1 ^a satellite	7	Lunghezza del 1° satellite	
1 ^a Sat. Pos.	8	Posizione del satellite braccio corto o lungo	
2 nd satellite	9	Lunghezza del 2° satellite	
2 nd Sat. Pos.	10	Posizione del satellite braccio corto o lungo	
3 rd satellite	11	Lunghezza del 3° satellite	
3 rd Sat. Pos.	12	Posizione del satellite braccio corto o lungo	
N. cro. m	13	Numero di coppie metacentriche	
N. cro. sm	14	Numero di coppie submetacentriche	
N. cro. st	15	Numero di coppie subtelocentriche	
N. cro. t	16	Numero di coppie telocentriche	
C1 L	17	Lunghezza 1° cromosoma	
C1 ar	18	Rapporto lunghezza bracci 1° cromosoma, esclusa quella del satellite	$ar = \frac{\text{braccio lungo}}{\text{braccio corto}}$
C1 CI	19	Indice Centromerico cromosoma 1° = rapporto tra braccio corto e la lunghezza del cromosoma	$CI = \frac{\text{braccio corto}}{\text{lunghezza cromosoma}} \times 100$
C2 L	20	Lunghezza 2° cromosoma	
C2 ar	21	Rapporto bracci 2° cromosoma	
C2 CI	22	Indice Centromerico cromosoma 2°	
C3 L	23	Lunghezza 3° cromosoma	
C3 ar	24	Rapporto bracci 3° cromosoma	
C3 CI	25	Indice Centromerico cromosoma 3°	
C4 L	26	Lunghezza 4° cromosoma	
C4 ar	27	Rapporto bracci 4° cromosoma	
C4 CI	28	Indice Centromerico cromosoma 4°	
C5 L	29	Lunghezza 5° cromosoma	
C5 ar	30	Rapporto bracci 5° cromosoma	
C5 CI	31	Indice Centromerico cromosoma 5°	
C6 L	32	Lunghezza 6° cromosoma	
C6 ar	33	Rapporto bracci 6° cromosoma	
C6 CI	34	Indice Centromerico cromosoma 6°	
C7 L	35	Lunghezza 7° cromosoma	
C7 ar	36	Rapporto bracci 7° cromosoma	
C7 CI	37	Indice Centromerico cromosoma 7°	

Le tecniche d'analisi multivariata, tra cui quella utilizzata per la realizzazione del classificatore per il sottogenere *Vicia*, sono da lungo tempo applicate come algoritmi utili per problematiche tassonomiche (FISHER, 1936). La possibilità di utilizzare variabili quantitative rende queste tecniche facilmente applicabili negli studi di analisi morfologica per la distinzione di specie vegetali difficilmente distinguibili; un esempio recente è stato riportato per alcune specie di *Cyperaceae* del genere *Carex* (DOWNER, HYATT, 2003; REPKA, 2003). L'analisi discriminante è anche applicata nel riconoscimento di piante infestanti le colture sulla base della forma e colore delle foglie (CAMARGO NETO *et al.*, 2006). Analogamente, i dati del cariotipo sono stati utilizzati, nel nostro caso, quali caratteristiche quantitative della morfologia dei cromosomi ed utilizzati nella distinzione delle specie del sottogenere *Vicia*.

Il classificatore, passo dopo passo, si è incrementato di casi assumendo una consistenza di 424 piastre metafasiche di 27 specie diverse (60 accessioni).

Molte differenze sono state riscontrate tra il nome della specie assegnato ad ogni accessione dalla banca di germoplasma che le ha fornite e i nostri risultati di classificazione. In particolare, su 48 accessioni pari al 100% dei campioni esaminati in questo studio, 16 accessioni (33.3%) sono state classificate come specie diverse e 8 (16.6%) non sono state identificate in nessuna specie nota; quindi il 49,9% dei nomi (classificazioni) delle accessioni delle banche di germoplasma sono in disaccordo rispetto ai nostri risultati. Bisogna ricordare che le specie di riferimento classificate a priori (*training set*) rispetto a cui le accessioni ignote sono state paragonate e classificate in questo lavoro, sono anch'esse provenienti da banche di germoplasma e sulle quali non è stata da noi effettuata nessuna verifica preliminare riguardo alla corrispondenza tra accessione e caratteristiche morfologiche o biologiche della specie in questione, assumendo che le banche di germoplasma ci avessero fornito campioni già adeguatamente controllati per questo aspetto e correttamente classificate.

Otto accessioni sono risultate non classificabili perché hanno fatto registrare cariotipi molto diversi da quelli presenti nel data base del classificatore per le corrispondenti specie. Anche in questo caso è possibile un errore da parte delle banche del germoplasma o un nostro "peccato originale", in altre parole è possibile che siano state da noi utilizzate specie non corrispondenti al cariotipo *typus* della specie in questione; ciò ovviamente falsa i risultati finali. Il metodo però rimane valido come strumento per la classificazione di specie mediante tecniche d'analisi multivariata dei cariotipi; in tale modo si potrebbe controllare se un'accessione è o no la specie in questione e ciò sarebbe di grande utilità per le banche di germoplasma che operano con una quantità enorme di materiali molto diversi tra loro, con inquinamenti e scambi inconsapevoli di materiale sempre possibili; risulterebbe quindi un metodo più veloce ed alternativo alla coltivazione dei semi per la verifica delle caratteristiche morfo-fisiologiche del *typus* nella

pianta intera durante tutto il suo ciclo biologico.

I risultati sono molto incoraggianti. Molte delle accessioni inserite come *ignote* nel classificatore sono state correttamente classificate. Sono stati, inoltre, evidenziati errori di classificazione o attribuzione di specie. Infatti, in alcuni casi, il cariotipo dell'accessione in analisi non era sovrapponibile ai dati di letteratura e ciò consentiva al momento solo di affermare il possibile errore da parte della banca di germoplasma che aveva fornito l'accessione. In questi casi la Linear Discriminant Analysis (Classificatore), invece, ha dato un'indicazione precisa della somiglianza del cariotipo in esame con la specie con i cromosomi più simili presente nel data base (*training set*) del classificatore.

Sembra possibile utilizzare, almeno nel genere *Vicia*, le informazioni cariologiche per discriminare i *taxa* attraverso la realizzazione di specifici classificatori, ma è fondamentale utilizzare materiale di sicura classificazione a priori; cioè sarebbe il caso, almeno in futuro, di verificare la corretta classificazione dell'accessione prima di essere considerata come "*cariotipo standard*" di riferimento.

Questo tipo di Classificazione, realizzata esclusivamente con i dati del cariotipo, sembra uno tra i pochi esempi dell'uso del cariotipo come strumento per la classificazione di specie vegetali mediante tecniche di analisi multivariata.

LETTERATURA CITATA

- BALL P.W., 1968 - *Vicia L.* In: TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A. (Eds), *Flora Europaea: 129-136*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- CAMARGO NETO J., MEYER G.E., JONES D.D., SAMAL A.K., 2006 - *Plant species identification using elliptic fourier leaf shape analysis*. Computer and Electronics in Agriculture, 50: 121-134.
- CAPUTO P., FREDIANI M., VENORA G., RAVALLI C., AMBROSIO M., CREMONINI R., 2006 - *Nuclear DNA contents, rDNAs, and karyotype evolution in subgenus Vicia. III. The heterogeneous section Hypechusa*. Protoplasma, 228: 167-177.
- DOWNER R.G., HYATT P.E., 2003 -- *Recommendations concerning the identification of Carex retroflexa and Carex texensis (Cyperaceae; Section Phaestoglochin Dumort)*. Castanea, 68: 245-243.
- FISHER R.A., 1936 - *The use of Multiple measurements in taxonomic problems*. Ann. Eugen., 7 (2): 179-188.
- , 1940 - *The precision of discriminant functions*. Ann. Eugen., 10 n. 4.
- FREDIANI M., CAPUTO P., VENORA G., RAVALLI C., AMBROSIO M., CREMONINI R., 2005 - *Nuclear DNA contents, rDNAs, and karyotype evolution in subgenus Vicia. II. Section Peregrinae*. Protoplasma, 226: 181-190.
- HANELT P., METTIN D., 1966 - *Cytosystematische Untersuchungen in der Artengruppe um Vicia sativa L. Kulturpflanze*, 14: 137-161.
- , 1970 - *Bemerkungen zur karyologie und systematik einiger sippen der gattung Vicia L. Kulturpflanze*, 77: 11-30.
- , 1989 - *Biosystematics of the genus Vicia L. (Leguminosae)*. Ann. Rev. Ecol. Syst., 20: 199-223.
- ILDIS 1999 - *International Legume Database and Information Service*. (www.ildis.org).

- KUPICHA F.K., 1976 - *The infrageneric structure of Vicia*. Not. R. Bot. Gard. Edinb., 34: 278-326.
- MARÉCHAL R., MASCHERPA J.M., STAINER F., 1978 - *Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres Phaseolus et Vigna (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique*. Boissiera, 28: 1-273.
- MAXTED N., 1993 - *A phenetic investigation of Vicia L. subgenus Vicia (Leguminosae, Viciae)*. Bot. J. Linn. Soc., 111: 155-182.
- METTIN D., HANELT P., 1964 - *Cytosystematische Untersuchungen in der Artengruppe um Vicia sativa L. I. Kulturpflanze*, 12: 163-225.
- OCAMPO B., VENORA G., ERRICO A., SINGH K.B., SACCARDO F., 1992 - *Karyotype analysis in the genus Cicer*. J. Gen. Breed., 46: 229-240.
- REPKA R., 2003 - *The Carex muricata aggregate in the Czech republic: multivariate analysis of quantitative morphological characters*. Preslia Praha, 75: 233-248.
- RUFFINI CASTIGLIONE M., FREDIANI M., GELATI M.T., VENORA G., RAVALLI C., CREMONINI R., 2007 - *Vicia esdraelonensis Warb. & Eig (Sezione Hypechusa): recupero di una specie a rischio di estinzione*. Inform. Bot. Ital., 39 Suppl. 1: 155-158.
- STRASBURGER E., 1910 - *Chromosomenzahl*. Flora, 100 Bd.
- SVESNIKOVA I.N., 1927 - *Karyological studies on Vicia*. Trudy printk bot. genet. Seleke, 17: 37-72.
- TECHIO V.H., DAVIDE L.C., PEREIRA A.V., BEARZOTI E., 2002 - *Cytotaxonomy of some species and of interspecific hybrids of Pennisetum (Poaceae, Poales)*. Gen. Mol. Biol., 25: 203-209.
- VENORA G., BLANGIFORTI S., CREMONINI R., 1999 - *Karyotype analysis of twelve species belonging to genus Vigna*. Cytologia, 64: 117-127.
- VENORA G., BLANGIFORTI S., FREDIANI M., MAGGINI M., GELATI M.T., RUFFINI CASTIGLIONE M., CREMONINI R., 2000 - *Nuclear DNA contents, rDNAs, chromatin organization and karyotype evolution in Vicia sect. Faba*. Protoplasma, 213: 118-125.
- VENORA G., CONICELLA C., ERRICO A., SACCARDO F., 1991 - *Karyotyping in plant by an image analysis system*. J. Gen. Breed., 45: 233-240.
- VENORA G., GALASSO I., PIGNONE D., 1995a - *Retrospects and Perspectives of Cytogenetical Studies in Vigna*. Biol. Zentrabl., 114: 231-241.
- VENORA G., OCAMPO B., SACCARDO F., 1997 - *The last decade of cytogenetic studies on wild and cultivated Cicer species. New perspectives for an ancient species* Atti: "The chickpea in the economy and diet of Mediterranean peoples". Roma, 5-12-1995: 84-95.
- VENORA G., OCAMPO B., SINGH K.B., SACCARDO F., 1995b - *Karyotype of the Kabuli-type chickpea (Cicer arietinum L.) by image analysis system*. Caryologia, 48: 147-155.
- VENORA G., PADULOSI S., 1997 - *Karyotypic analysis of wild taxa of V. unguiculata (L.) Walpers*. Caryologia, 50: 125-138.
- VENORA G., SACCARDO F., 1993 - *Mitotic Karyotype analysis in the Vigna genus by means of an image analyser*. Caryologia, 46: 139-149.
- VON SENGBUSCH P., 2003 - *Botanik online* (www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e00/index.htm).

RIASSUNTO – I cariotipi di 27 specie del sottogenere *Vicia* L. sono stati inseriti come training set nella Linear Discriminant Analysis procedura statistica che utilizza le variabili di un gruppo noto, per classificare i nuovi casi ignoti sulla base delle stesse variabili. Molte delle accessioni inserite come *ignote* (48 nuove accessioni analizzate) nel classificatore, sono state correttamente classificate. Sono stati, inoltre, evidenziati errori di classificazione o attribuzione di specie. Infatti in alcuni casi il cariotipo dell'accessione in analisi non era sovrapponibile ai dati di letteratura; ciò consentiva in precedenza solo di affermare il possibile errore da parte della banca di germoplasma che aveva fornito l'accessione. In questi casi la Linear Discriminant Analysis (Classificatore), invece, ha dato un'indicazione precisa della somiglianza del cariotipo in esame con la specie con i cromosomi più simili presente nel Data Base (*Training set*) del Classificatore. Questo tipo di Classificazione, realizzata esclusivamente con i dati del cariotipo, sembra il primo esempio d'utilizzo del cariotipo come strumento per la classificazione di specie vegetali utilizzando tecniche di analisi multivariata.

AUTORI

Gianfranco Venora (autore di riferimento), Concetta Ravalli, Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, Via Bouganvillea 20, 95041 Caltagirone. e-mail: lab.biologia@granicoltura.it

Verso una filogenesi molecolare del genere *Vicia* L. (*Fabaceae*)

P. CAPUTO, R. CREMONINI, G. VENORA e M. FREDIANI

ABSTRACT - *Towards a molecular phylogeny of genus Vicia L. (Fabaceae)* - Authors undertook a phylogenetic analysis of genus *Vicia* L. (*Fabaceae*), with special reference to subg. *Vicia*, employing Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences of the nuclear ribosomal DNA. Seventy-seven species of *Vicia* were considered, as well as an appropriate set of outgroups from related genera (*Lathyrus*, *Lens*, *Melilotus*, *Pisum*, and *Trifolium*). A single most parsimonious cladogram resulted from the investigation. Among the most relevant indications obtained is the position of *V. faba*, which seems closer to *V. bithynica* (L.) L. than previously noted in similar molecular analyses. Moreover, with the exception of sects. *Narbonensis* and *Peregrinae*, no other section seems to be strictly monophyletic. Molecular phylogeny of genus *Vicia* does not strictly correspond to morphology-based hypotheses, as a consequence of widespread parallelisms developed in gross morphology.

Key words: *Fabaceae*, ITS1, ITS2, *Vicia*, *Vicilla*

INTRODUZIONE

Il genere *Vicia* L. appartiene alla tribù delle *Vicieae*, della famiglia delle *Fabaceae*. Esso include quasi 200 specie distribuite prevalentemente nelle regioni temperate dei due emisferi. Sebbene il genere abbia subito varie vicissitudini tassonomiche, oggi viene comunemente ritenuto diviso in due sottogeneri, *Vicilla* e *Vicia* (KUPICHA, 1976). La classificazione più recente del sottogenere *Vicia* (MAXTED, 1993) propone nove sezioni, *Atossa* (Alef.) Asch. & Graebner, *Microcarinae* Maxted, *Hypechusa* (Alef.) Asch. & Graebner, *Peregrinae* Kupicha, *Wiggersia* (Alef.) Maxted, *Vicia*, *Narbonensis* (Radzhi) Maxted, *Bithynicae* (B. Fedtsch. ex Radzhi) Maxted, e *Faba* (Miller) Ledeb.; le ultime due sezioni sono unità monospecifiche. Recentemente (FREDIANI *et al.*, 2005) è stato evidenziato come almeno alcune delle sezioni sopra elencate non siano monofiletiche.

Il sottogenere *Vicia*, che include meno specie di *Vicilla*, tuttavia racchiude varie specie di notevole interesse agronomico, tra le quali la fava (*V. faba* L.) e la veccia comune (*V. sativa* L.). In particolare, della fava, legume importante sotto il profilo alimentare nelle regioni temperate boreali, non sono del tutto chiare né la linea ancestrale né le immediate relazioni filogenetiche (MAXTED *et al.*, 1991 e citazioni in esso contenute).

Evidenze recenti, tuttavia, indicano che essa è più distante dalle specie della sect. *Narbonensis* di quanto non si supponesse in precedenza (FREDIANI *et al.*, 2005 e citazioni in esso contenute).

Le difficoltà di reperimento delle linee ancestrali della fava (l'individuazione delle quali è importante in relazione all'impiego di germoplasma di specie selvatiche come fonte di caratteristiche nuove da introdurre in coltura) e la constatazione dello status non

monofiletico di alcune sezioni sembra rendere necessaria un'analisi simultanea di tutto il genere, in quanto vari dei caratteri morfologici suggeriti da MAXTED (1993) come diagnostici delle sezioni si sono probabilmente evoluti più volte (CAPUTO *et al.*, 2006).

Si riferiscono qui i risultati preliminari di uno studio che ha per obiettivo la filogenesi molecolare del genere *Vicia*, con particolare riguardo al sottogenere omonimo.

MATERIALI E METODI

Sono stati impiegati *taxa* appartenenti a tutte le sezioni dei due sottogeneri di *Vicia*, con l'intento di garantire una rappresentazione molto ampia dei vari tipi morfologici del genere, per un totale di 77 specie e *taxa* infraspecifici. Come outgroup sono stati impiegati rappresentanti dei generi *Lathyrus*, *Lens*, *Melilotus*, *Pisum*, *Trifolium*, per un totale di nove *taxa*. Le sequenze degli spaziatori interni trascritti del DNA ribosomale nucleare (ITS1 e ITS2) sono stati ottenuti come in FREDIANI *et al.*, (2005) o da dati di letteratura.

Le sequenze sono poi state allineate con ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) e sottoposte ad analisi cladistica mediante il software TNT (GOLOBOFF *et al.*, 2003).

RISULTATI

La matrice ITS ottenuta (87 *taxa*, 490 caratteri di cui 167 informativi) ha prodotto un singolo cladogramma a massima parsimonia (L=637, C.I.=0,57, R.I.=0,65). Dal cladogramma si osserva che il genere *Vicia*, come oggi circoscritto, è parafiletico. In altre parole, alcune specie di *Vicia* (per esempio, *V. ervilia*,

V. sylvatica, *V. tetrasperma*, *V. hirsuta*) appartengono a cladi che includono *taxa* scelti come outgroup. La maggior parte del genere, tuttavia, si trova in un insieme monofiletico e, sebbene con qualche eccezione, in detto clado sono riconoscibili un insieme di specie (parafiletico) riconducibile al sottogenere *Vicilla* ed un altro (monofiletico) riferibile al sottogenere *Vicia*. In quest'ultimo gruppo compare *V. faba*, in posizione di sister group con *V. bythinica*. Con l'esclusione delle sezioni *Peregrinae* e *Narbonensis*, che si evidenziano come gruppi naturali, i raggruppamenti monofiletici interni al sottogenere *Vicia* non corrispondono alle sezioni. In particolare, la sect. *Hypechusa* è costituita da un insieme principale parafiletico (che include anche la sect. *Microcarinae*) e da un'entità (*V. anatolica*) che si raggruppa insieme con la maggior parte delle specie della sect. *Vicia*; la sect. *Wiggersia* (con *V. lathyroides* e *V. cuspidata*) è in realtà costituita da due entità prossime rispettivamente alla sect. *Peregrinae* e alla sect. *Narbonensis*. Alcune tra le specie tradizionalmente attribuite al sottogenere *Vicilla*, inoltre, appaiono all'interno del gruppo riconducibile al sottogenere *Vicia*.

DISCUSSIONE

I dati riportati in questo articolo rappresentano il primo tentativo di affrontare la filogenesi di tutto il genere *Vicia* dal punto di vista molecolare. Dai risultati si evince come i confini tra *Vicia* ed alcuni generi vicini (in particolare, *Lathyrus*, *Lens* e *Pisum*) siano sfumati e che alcune specie del genere (per esempio, *V. ervilia*, *V. selvatica*, *V. tetrasperma*) dovrebbero essere riconsiderate in quanto ad appartenenza. Altro dato interessante che emerge dai risultati è quello relativo al rapporto di sister group tra *V. faba* e *V. bythinica*. Infatti, precedenti evidenze molecolari fondate su un numero ridotto di specie (si veda ad esempio VENORA *et al.*, 2000), indicavano come le due specie non fossero particolarmente correlate. Questa differenza tra le indagini precedenti e questa è da attribuirsi presumibilmente soltanto all'incremento nel numero di specie in analisi. Pur aumentando il numero di *taxa*, tuttavia, i risultati ottenuti danno indicazioni che molte tra le categorie infrageneriche nelle quali il genere è suddiviso sono parafiletiche o polifiletiche. Tra esse, anche quelle che, come la sect. *Hypechusa*, sono caratterizzate da quelle che appaiono come vistose sinapomorfie morfologiche. Sarà pertanto necessario in futuro investigare in dettaglio tali caratteristiche morfologi-

che al fine di verificare se sia possibile documentare, anche dal punto di vista morfologico, la loro evoluzione parallela.

LETTERATURA CITATA

- CAPUTO P., FREDIANI M., VENORA G., RAVALLI C., AMBROSIO M., CREMONINI R., 2006 - *Nuclear DNA contents, rDNAs, and karyotype evolution in subgenus Vicia: III. The heterogeneous section Hypechusa*. *Protoplasma*, 228(4): 167-177.
- FREDIANI M., CAPUTO P., VENORA G., RAVALLI C., AMBROSIO M., CREMONINI R., 2005 - *Nuclear DNA contents, rDNAs and karyotype evolution in subgenus Vicia. II. Section Peregrinae*. *Protoplasma*, 226: 181-190.
- GOLOBOFF P., FARRIS J.S., NIXON K., 2003 - *TNT (Tree analysis using New Technology), Version 1.0*. Published by the authors, Tucumán, Argentina.
- KUPICHA F.K., 1976 - *The infrageneric structure of Vicia*. *Not. R. Bot. Gard. Edinb.*, 34: 278-326.
- MAXTED N., 1993 - *A phenetic investigation of Vicia L. subgenus Vicia (Leguminosae, Viciae)*. *Bot. J. Linn. Soc.*, 111: 155-182.
- MAXTED N., KHATTAB A.M.A., BISBY F.A., 1991 - *The newly discovered relatives of Vicia faba do little to resolve the enigma of its origin*. *Bot. Chronika*, 10: 435-465.
- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J., 1994 - *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucl. Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- VENORA G., BLANGIFORTI S., FREDIANI M., MAGGINI F., GELATI M.T., RUFFINI CASTIGLIONE M., CREMONINI R., 2000 - *Nuclear DNA contents, rDNAs, chromatin organization and karyotype evolution in Vicia sect. faba*. *Protoplasma*, 213: 118-125.

RIASSUNTO – Gli autori hanno intrapreso un'indagine filogenetica del genere *Vicia* L. (*Fabaceae*), con particolare riferimento al sottogenere *Vicia*, mediante l'impiego delle sequenze degli spaziatori interni trascritti (ITS) del DNA ribosomale nucleare. Sono state utilizzate 77 specie di *Vicia*, oltre ad un appropriato insieme di outgroup dai generi affini (*Lathyrus*, *Lens*, *Melilotus*, *Pisum* e *Trifolium*). Dall'analisi cladistica è stato ottenuto un singolo cladogramma a massima parsimonia. Tra gli aspetti rilevanti dei risultati vi è la posizione di *V. faba*, che sembra più prossima a *V. bithynica* L. di quanto non sia stato rilevato in precedenti indagini molecolari. Inoltre, con l'esclusione delle sezioni *Narbonensis* e *Peregrinae*, nessun'altra sezione del sottogenere *Vicia* sembra essere monofiletica in senso stretto. La filogenesi molecolare di *Vicia* non corrisponde in dettaglio alle ipotesi formulate a partire dalla morfologia, come conseguenza di numerosi eventi di evoluzione parallela in varie caratteristiche morfologiche.

AUTORI

Paolo Caputo, Dipartimento delle Scienze biologiche, sezione di Biologia vegetale, Università di Napoli Federico II, Via Foria 223, 80139 Napoli
 Roberto Cremonini, Dipartimento di Biologia, Università di Pisa, Via L. Ghini 5, 56126 Pisa
 Gianfranco Venora, Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, Via Bouganvillea 20, 95041 Caltagirone (Catania)
 Manuela Frediani, Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia, Via S. Camillo De Lellis s.n.c., 01100 Viterbo

Analisi filogeografica della vite selvatica mediante marcatori microsatelliti

F. GRASSI, F. DE MATTIA, G. ZECCA, S. SGORBATI, F. SALA e M. LABRA

ABSTRACT - Phylogeographic analysis of wild grape by using SSR markers - The distribution of *Vitis vinifera* subsp. *silvestris*, the wild grapevine subspecies of *Vitis vinifera* L., has been dramatically reduced in its major sites of diffusion, at first by the spread, over the last 150 years, of pathogens from North America and, more recent, with fragmentation of habitat and disbranching by human. In order to adopt conservation strategies, it is now important to estimate and catalogue its residual genetic diversity. In this work, wild grapevine samples were collected in their main Mediterranean distribution areas, including the Caucasus area, and the extent of their genetic variability evaluated by analysing chloroplast microsatellite DNA polymorphism. Results evidence low haplotype diversity value with 5 haplotypes detected within 78 collected populations. A principal chloroplast lineage was found to be fixed in several locations, in the Northernmost European countries and in the Southern island of Sardinia. The highest within-population haplotypic diversity, with the presence of all 5 probable haplotypes, was found in the central regions of Italy and in the Caucasus regions. These results draw attention to two different refugium sites in the in Mediterranean basin and suggest that conservation priority should be given to grapevine populations still preserved in hotspots of these regions.

Key words: biodiversity, chloroplast microsatellite, conservation, *Vitis vinifera* subsp. *silvestris*

INTRODUZIONE

Le specie vegetali a rischio sono oggi numerose e nell'area mediterranea molte di queste hanno stretti rapporti con le varietà di pregio della nostra agricoltura, rappresentando i diretti progenitori selvatici delle specie domestiche agricole. La riduzione o l'estinzione delle popolazioni di queste specie comporta la perdita di un grande numero di genotipi che potrebbero essere utilizzati dall'uomo in programmi di miglioramento genetico delle varietà coltivate. La vite selvatica (*Vitis vinifera* ssp. *silvestris*) appartiene a questo gruppo di specie a rischio e deve essere protetta non solo come emergenza botanica e ambientale, ma anche per la sua stretta parentela con la sottospecie domestica. L'ultimo rilevante censimento relativo alla vite selvatica è stato svolto nel 1998 (ARNOLD, 1998) ed ha evidenziato che molte popolazioni europee presentavano una grave riduzione di individui sia a causa delle diverse patologie che colpiscono la vite, sia in seguito alle modificazioni e alla distruzione dell'habitat naturale dovute a opere di bonifica e all'incremento dei terreni agricoli. Al fine di valutare qual'è lo stato di conservazione attuale della vite selvatica e se le pressioni biotiche ed abiotiche abbiano avuto effetto sulla variabilità genetica delle popolazioni,

è stato intrapreso un progetto di ricerca internazionale con l'obiettivo di studiare, mediante marcatori molecolari del DNA, i livelli di diversità genetica delle popolazioni di vite selvatica ancora presenti nell'areale di distribuzione della specie.

MATERIALI E METODI

Giovani foglioline apicali sono state prelevate da 78 differenti popolazioni di vite selvatica (*Vitis vinifera* ssp. *silvestris*) composte da un numero di individui variabile di 5-20 individui. Per ciascun campione è stato estratto il DNA tramite l'utilizzo del metodo sviluppato da DOYLE, DOYLE (1990) con opportune modifiche (LABRA *et al.*, 2001).

Il DNA genomico estratto è stato utilizzato per eseguire analisi con marcatori microsatelliti plastidiali. In particolare sono stati indagati otto loci microsatelliti di cloroplasto: ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp5, ccmp6, ccmp8, ccmp9, ccmp10 (GRASSI *et al.*, 2002).

L'amplificazione dei loci cpSSR è stata eseguita utilizzando gli opportuni primer (GRASSI *et al.*, 2002) seguendo il seguente profilo di amplificazione: 94 °C per 30 sec, 50 °C per 30 sec, 72 °C per 30 sec. Tale programma è stato ripetuto per 35 cicli a cui è seguita una fase di estensione finale a 72 °C per 7 min.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di polyacrilamide al 6 % e le bande sono state rilevate attraverso la marcatura con P33 (GRASSI *et al.*, 2002).

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'amplificazione degli 8 loci SSR è stata eseguita su tutte le accessioni campionate. La maggior parte dei loci è risultata monomorfica, mentre sono state trovate tre diverse forme alleliche per il locus CCMP10, rispettivamente di 114, 115 e 116 bp e due forme alleliche per il locus CCMP3 (106 e 107 bp).

La combinazione delle diverse forme alleliche nei due loci (CCMP3 e CCMP10) ha portato alla determinazione di cinque aplotipi presenti nelle popolazioni del bacino del Mediterraneo (Tab. 1).

La Fig. 1A mostra la distribuzione dei differenti aplotipi nelle diverse popolazioni analizzate. La variabilità genetica all'interno delle popolazioni è risultata particolarmente bassa; infatti nessuna popolazione ha mostrato la presenza di tutti e cinque gli aplotipi con frequenti casi di fissazione di un unico aplotipo, anche in popolazioni geograficamente vicine.

La fissazione aplotipica risulta particolarmente frequente nelle popolazioni più a nord e nelle isole

TABELLA 1

Aplotipi e dimensione degli allei (bp) dei loci ccmp3 e ccmp10 rilevati nell'analisi delle popolazioni di vite selvatiche.

Haplotypes and alleles size (bp) of ccmp3 and ccmp10 SSR markers, evidenced in the analysed wild grapevine populations.

Aplotipo	ccmp3	ccmp10
I	107	115
II	106	115
III	107	114
IV	106	114
V	106	116

(Sardegna) dove sono più frequenti fenomeni di isolamento genetico. Le aree dell'Italia centrale e del Caucaso risultano invece preservare il massimo livello di variabilità genetica plastidiale. Questo dato confermerebbe la funzione dell'Italia e del Caucaso come aree di rifugio durante le ultime glaciazioni (HEWITT, 1999). Infine, a partire dalle frequenze alleliche dei microsatelliti, è stato sviluppato un modello che rappresenta l'evoluzione e la diffusione della specie (Fig. 1B).

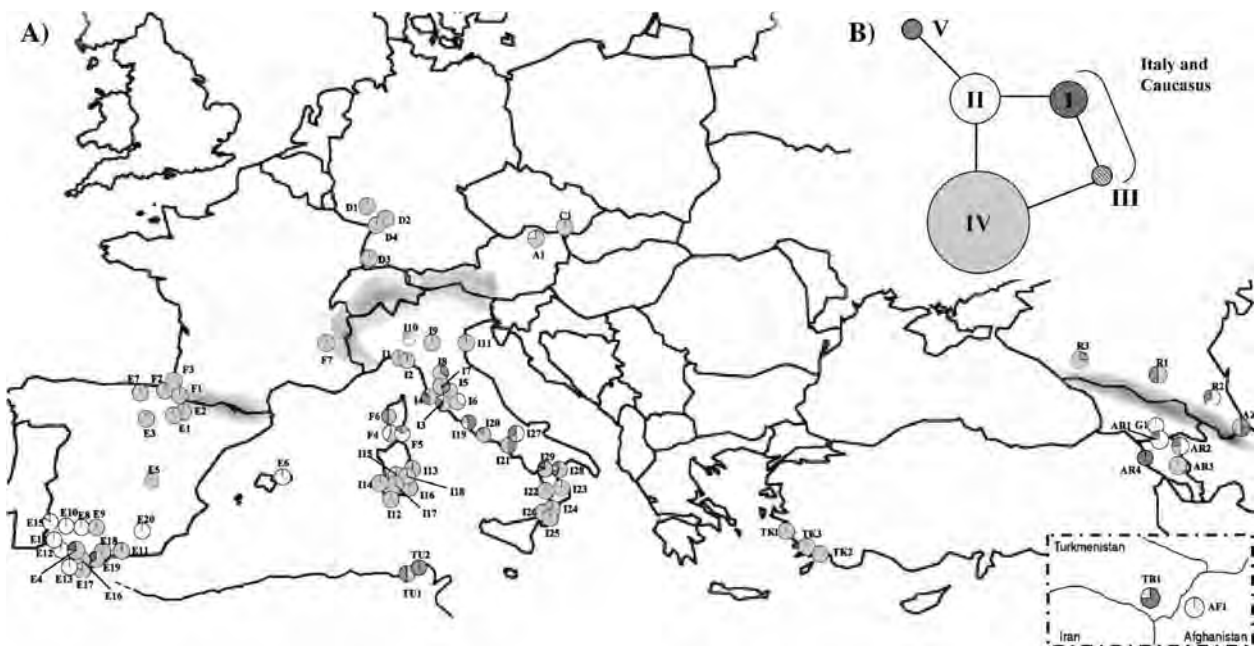


Fig. 1

A) Distribuzione delle popolazioni di vite selvatiche e analisi della diversità aplotipica espressa come frequenza. Le aree in grigio corrispondono, da sinistra a destra, alle catene montuose dei Pirenei, delle Alpi e del Caucaso. B) Rete dei rapporti evolutivi costruito tramite il programma Arlequin versione 2.0. Tutti gli aplotipi differiscono di un singolo 'step' di mutazione. Le dimensioni dei cerchi riflettono le frequenze degli aplotipi.

A) Geographic distribution of wild grape populations and haplotypes frequencies. Darkened areas correspond, from left to right, to the Pyrenees, Alps and Caucasus mountain ranges. B) Minimum spanning tree constructed using microsatellite cpDNA data by the software Arlequin version 2.0. All haplotypes differ by single steps, and the dimension of circle represents haplotype frequencies.

LETTERATURA CITATA

- ARNOLD C., 1998 - *Situation de la vigne sauvage (Vitis vinifera ssp. silvestris) en Europe*. *Vitis*, 37 : 159-170.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L., 1990 - *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *Focus*, 12: 13-15.
- GRASSI F., LABRA M., SCIENZA A., IMAZIO S., 2002 - *Chloroplast SSR Markers to asses DNA diversity in wild and cultivated grapevines*. *Vitis*, 41: 157-158.
- HEWITT G.M., 1999 - *Post-glacial recolonization of European Biota*. *Biol. J. Linn. Society*, 68: 87-112.
- 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.

RIASSUNTO – Negli ultimi anni le popolazioni di vite selvatica (*Vitis vinifera* subsp. *silvestris*) sono state estremamente ridotte, inizialmente a causa dell'introduzione di

patogeni dagli USA e successivamente in seguito alla frammentazione dell'habitat naturale dovuto allo sfruttamento antropico del territorio. Al fine di proteggere e conservare questa specie è necessario censire le popolazioni presenti e determinare se vi sono aree rifugio da introdurre in programmi di protezione. In questo lavoro vengono discussi i risultati delle analisi del DNA condotte su 78 differenti popolazioni distribuite dal Caucaso al Mediterraneo occidentale. I dati ottenuti dall'analisi con marcatori microsatteliti di cloroplasto hanno evidenziato 5 differenti aplotipi. La maggior parte delle popolazioni hanno evidenziato un elevato grado di fissazione aplotipica soprattutto per quelle del centro-nord Europa e quelle delle isole del mediterraneo. Le popolazioni con maggiore diversità sono risultate quelle del centro sud Italia e del Caucaso; saranno quindi gli individui provenienti da queste popolazioni che costituiranno la base per programmi di conservazione *in situ* ed *ex situ*.

AUTORI

Fabrizio Grassi, Giovanni Zecca, Francesco Sala, Orto Botanico, Dipartimento di Biologia, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano

Fabrizio De Mattia, Massimo Labra, Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Milano-Bicocca, Piazza della Scienza 1, 20126 Milano

La vite selvatica e coltivata in Sardegna: strategie di analisi e conservazione

F. DE MATTIA, F. GRASSI, S. IMAZIO, G. LO VICU, S. SGORBATI e M. LABRA

ABSTRACT - *Strategy of analysis and conservation of Sardinia wild and cultivated grapevine* - The origin of the grapevine was investigated with archaeobotanical, cultural and historical data. A primary domestication centre was located in the Near East region but there is no agreement on the existence or role of secondary domestication centres located in the Mediterranean regions. In this work, PCR-based microsatellite analysis has been employed to study the origin of some cultivated grapevines from *in situ* direct domestication of the wild autochthonous grapevine. The analysis has been applied on cultivated and wild grapevine distributed in Sardinia island. High biodiversity has been recorded among the analysed cultivars. In some cases accessions known with different names display the same SSR allele size, proving the occurrence of synonyms. In other case, identical denominations did not correspond with the genomic identity. Cluster analysis performed on all analysed samples showed a high value of genetic distance between cultivated and wild accessions. These preliminary results excluded the hypothesis about the direct origin of Sardinian cultivars from local wild accessions.

Key words: DNA markers, grapevine, plant domestication, SSR, *Vitis vinifera* L.

INTRODUZIONE

Lo studio dell'origine della vite coltivata e la storia del vino hanno affascinato da sempre gli studiosi di diverse discipline che hanno cercato di ricostruire il percorso compiuto dalla viticoltura e dall'enologia dalle origini sino ad oggi. Coloro che supportano un'origine monocentrica della vite individuano la Mezza Luna fertile come l'area di domesticazione primaria. Le teorie correnti, sviluppate su base storica ed archeologica, presuppongono che dalla Mezza Luna fertile, tramite il passaggio attraverso la Mesopotamia, l'Anatolia e l'Egitto, la vite domestica sia giunta nel Mediterraneo occidentale. Al contrario i sostenitori dell'ipotesi policentrica evidenziano oltre al centro primario di domesticazione anche aree secondarie di origine della vite coltivata distribuite in diverse zone del Mediterraneo. Secondo questi ultimi la vite coltivata presente nel Mediterraneo sarebbe il risultato di diversi fenomeni di domesticazione sia primari che secondari avvenuti in luoghi e tempi differenti. Seguendo quest'ultima ipotesi il nostro gruppo di ricerca ha intrapreso uno studio delle aree del Mediterraneo che presentano le condizioni podologiche, geografiche e sociali adatte a favorire fenomeni di domesticazione secondaria. Tra le aree di particolare interesse sono state selezionate alcune isole del Mediterraneo tra cui la Sardegna. Quest'ultima, oltre ad avere un'abbondante presenza di vite allo stato spontaneo potenzialmente domesticabile, risulta separata dal resto della penisola e quindi poco interessata dagli scambi commerciali che hanno intro-

dotto nel Mediterraneo occidentale le cultivars domestiche nei centri primari. Sulla base di ricostruzioni storiche la vite sarebbe giunta in Sardegna grazie ai Fenici e nei secoli il patrimonio varietale sardo sarebbe stato arricchito dall'opera dei diversi conquistatori e colonizzatori soprattutto nell'epoca spagnola. Il ruolo della Sardegna nella domesticazione e coltivazione della vite selvatica è stato poco considerato dagli studiosi sino alla scoperta di semi di vite in alcuni siti nuragici risalenti ad un periodo antecedente l'arrivo dei Fenici. Tali semi sono stati rinvenuti in un contesto di agricoltura avanzata, stanziale, e non sono associabili a resti di semplici raccoglitori (BAKELS *et al.*, 2002). Questi ritrovamenti supportano l'ipotesi che i popoli sardi utilizzassero la vite selvatica o paradomestica per la produzione del vino ancora prima dell'avvento dei vitigni medio orientali. È quindi plausibile pensare che i diversi colonizzatori abbiano contribuito ad arricchire il patrimonio varietale dell'isola introducendo nuove cultivars, ma non si può escludere che alcune varietà domestiche localmente siano state adottate dagli stessi colonizzatori per la produzione di vino nell'isola. Al fine di chiarire le relazioni tra le differenti varietà e di comprendere se realmente vi sono stati fenomeni di domesticazioni locali o di incroci tra le diverse cultivars, sono stati sviluppati dei metodi basati sull'analisi del genoma di vite. In particolare sono state sequenziate diverse porzioni del DNA di *Vitis vinifera* L. e identificate sequenze di DNA ipervariabili

non soggette a pressioni selettive. Tali sequenze, dette microsattelliti o SSR (Simple Sequence Repeat), sono estremamente polimorfiche e contraddistinguono in modo univoco il tratto cromosomico su cui sono localizzate (MORGANTE, OLIVIERI, 1993).

Attraverso la determinazione della dimensione dei diversi alleli SSR è possibile evidenziare omonimie e sinonimie e determinare le parentele tra le differenti cultivars e tra queste e la vite selvatica locale.

Lo scopo del lavoro svolto è stato quello di reperire ed analizzare le cultivars sarde e di confrontare i profili SSR con quelli ricavati dalle analisi di alcune popolazioni di vite selvatica campionate in diverse zone della Sardegna. Lo scopo finale del lavoro è stato duplice; da un lato è stato possibile verificare le parentele tra le diverse accessioni e ricostruire la storia della vite in Sardegna, dall'altro i profili SSR prodotti sono stati utilizzati per costituire una collezione di germoplasma per la protezione delle cultivars autoctone.

MATERIALI E METODI

Sono state campionate 167 cultivars sarde ed un totale di sei differenti popolazioni di vite selvatica diffuse nell'area centro-meridionale dell'isola. La Fig. 1 descrive la localizzazione delle diverse popolazioni, mentre la Tab.1 riporta il numero di individui campionati.

Le accessioni selezionate sono state sottoposte ad estrazione del DNA genomico a partire da giovani foglioline o da gemme apicali. Il metodo di estrazione utilizzato, basato sull'impiego di Esadeciltrimetilammonio Bromuro (DOYLE, DOYLE, 1990), è stato applicato al materiale vegetale opportunamente polverizzato in azoto liquido. Il DNA genomico estratto è stato quantificato ed utilizzato per l'analisi di 6 loci microsattelliti: VZAG62, VZAG79, VVMD27, VVS2, VVMD5, VVMD7 (BOWERS *et al.*, 1996). Tali marker sono stati selezionati in quanto capaci di contraddistinguere in modo univoco le diverse cultivars di vite. L'amplificazione è stata eseguita in un termociclatore seguendo il seguente profilo: 94°C per 30 sec, 50°C per 30 sec e 72°C per 30 sec. Sono stati eseguiti 35 cicli di tale programma a cui è seguita una fase di distensione a 72°C per 7 min.

La determinazione della lunghezza degli alleli è stata ottenuta mediante elettroforesi su gel di polyacrilamide al 6% (Acrylamide:bis-acrylamide 19:1). Le bande relative ai diversi alleli sono state evidenziate mediante marcatura con P³³ (GRASSI *et al.*, 2003). L'autoradiografia ha permesso di evidenziare la presenza di una o due bande (omozigosi o eterozigosi) per ciascuna accessione di vite analizzata. Attraverso il confronto con bande a peso molecolare è stato possibile risalire alla dimensione esatta dei diversi alleli espressa in paia di basi.

L'analisi statistica dei dati è stata ottenuta trasformando il fingerprint molecolare in una matrice binaria. Sono stati quindi considerati gli alleli di ogni locus microsattellite esaminato ed è stato assegnato il valore (0) oppure il valore (1) in caso di assenza o



Fig. 1
Localizzazione delle popolazioni di *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*.
Map showing the distribution of sampled wild grape populations.

TABELLA 1
Campioni raccolti per popolazione.
Samples collected per population.

Sigla	Popolazione	N. campioni
A	Rio Antas	10
B	Orroa de Saide	5
C	Urruos	10
D	Querceto	15
E	Monte Arcosu	13
F	Ristalu	5

presenza della banda relativa ad una determinata dimensione. I risultati sono stati poi analizzati usando un opportuno software SPSS-PROGRAMME che permette di trasformare la matrice 1/0 in matri-

ce di similarità mediante diversi coefficienti statistici (SNEATH, SOKAL, 1973)

L'elaborazione è stata effettuata con l'indice di Jaccard:

$$CJ = A / (N - D)$$

A= bande comuni ai 2 genotipi analizzati

N= numero totale di bande polimorfiche

D= numero di bande assenti in entrambi i genotipi comparati.

La matrice di similarità ottenuta è stata poi sottoposta alla cluster analysis mediante il metodo UPGMA ("Unweighted Pair Group Method, based on Arithmetic average"), che permette di visualizzare graficamente le relazioni che intercorrono tra le accessioni analizzate (OTUs).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il primo importante risultato ottenuto è stata la produzione del fingerprint molecolare di tutte le accessioni raccolte. Attraverso la cluster analysis è stato possibile evidenziare omonimie e sinonimie tra le differenti cultivars sarde. Le figure successive mostrano alcuni esempi di tali relazioni.

Tra queste vi sono casi di vere sinonimie, ovvero di campioni che presentano nomi differenti ma un identico profilo SSR (Fig. 2), o di errate sinonimie (Fig. 3) come evidenziato nel caso dei 4 campioni di Cagnulari provenienti da diverse zone dell'isola che risultano identici a coppie.

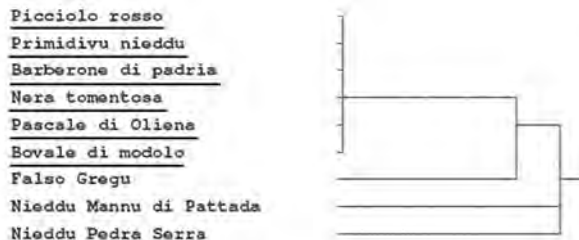


Fig. 2

Esempio di vera sinonimia rilevata tra le cultivars tramite SSR analysis.

Example of true synonymous among cultivars detected by SSR analysis.

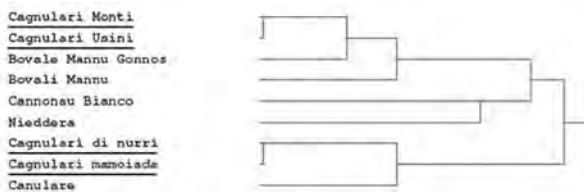


Fig. 3

Esempio di errata sinonimia rilevata tra le cultivars tramite SSR analysis.

Example of false synonyms among cultivars detected by SSR analysis.

Il lavoro svolto ha permesso di identificare casi di errate attribuzioni (Fig. 4) come il campione Cannonau di Gonnos geneticamente affine a due campioni di Granazza.



Fig. 4

Esempio di errata attribuzione rilevata tra le cultivars tramite SSR analysis.

Example of wrong attribution among cultivars detected by SSR analysis.

Infine va sottolineato il caso dei due campioni di Licronaxu Nuraxinieddu a bacca bianca e nera che sono risultati geneticamente identici per ciò che concerne il profilo dei 6 SSR considerati (Fig. 5). Tale fenomeno potrebbe essere spiegato dalla presenza di un trasposone che interrompendo la sintesi degli antociani trasforma la bacca da nera a bianca (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

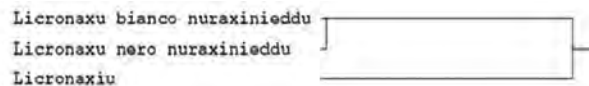


Fig. 5

Esempio di variabilità clonale rilevata tra le cultivars tramite SSR analysis.

Example of clonal variability among cultivars detected by SSR analysis.

In generale è possibile concludere che per una regione di dimensioni limitata come la Sardegna, vi è un elevato grado di diversità genetica tra le cultivars. Questa grande diversità è compatibile con la storia dell'isola che ha visto l'introduzione di vitigni da parte dei diversi colonizzatori. Al tempo stesso questa grande diversità potrebbe anche essere il frutto di fenomeni di domesticazione locale. Al fine di verificare quest'ultima ipotesi sono stati confrontati i profili SSR ottenuti dall'analisi delle cultivars con quelli relativi alle popolazioni di vite selvatica. I risultati ottenuti non hanno mostrato alcuna relazione di similarità genetica rilevante tra i campioni delle 6 popolazioni di vite selvatica e le cultivars oggetto di studio (dati non mostrati). Questo escluderebbe un'origine locale delle varietà analizzate o almeno una parentela stretta tra le cultivars oggi presenti in Sardegna e le varietà selvatiche delle 6 popolazioni considerate. È tuttavia importante sottolineare che è necessario incrementare il campione di viti selvatiche dell'isola visto lo scarso scambio genico tra le popolazioni. Solo attraverso un confronto ampio è infatti possibile escludere relazioni di parentela tra le viti selvatiche e quelle coltivate dell'isola.

LETTERATURA CITATA

- BAKELS C., 2002 - *Plant remains from Sardinia, Italy, with notes on barley and grape*. Veg. Hist. Archaeobot., 11: 3-8.
- BOWERS J.E., DANGL G.S., VIGNANI R., MEREDITH C.P., 1996 - *Isolation and characterisation of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (Vitis vinifera L.)*. Genome, 39: 628-633.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L., 1990 - *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus, 12: 13-15.
- 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. Gen., 107: 1315-1320.
- KOBAYASHI S., GOTO-YAMAMOTO N., HIROCHIKA H., 2004 - *Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Colour*. Science, 304: 982.
- MORGANTE M., OLIVIERI A.M., 1993 - *PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics*. Plant J., 3: 175-182.
- SNEATH P.H.A., SOKAL R.R., 1973 - *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.

RIASSUNTO – Secondo informazioni storiche e archeologiche la vite (*Vitis vinifera* ssp. *vinifera*) sarebbe stata domesticata nella Mezza Luna fertile e da qui sarebbe stata diffusa in tutto il Mediterraneo occidentale. Le attuali indagini eseguite sul DNA tuttavia non escludono la presenza di siti secondari di domesticazione. Sulla base di queste ipotesi è stato deciso di analizzare mediante marcatori microsatelliti le relazioni di parentela tra le cultivars sarde e le popolazioni di vite spontanea dell'isola. I risultati hanno mostrato una grande ricchezza varietale; interessanti sinonimie, omonimie e false attribuzioni sono state rilevate attraverso il confronto dei profili SSR ricavate per ciascuna varietà. Un ridotto grado di similarità genetica è stato invece evidenziato tra le varietà coltivate e le popolazioni selvatiche dell'isola. Ad oggi questo esclude un'origine locale delle cultivars analizzate dalle viti spontanee locali anche se un più esteso campionamento di queste ultime sarebbe auspicabile per eseguire un confronto più ampio ed esaustivo.

AUTORI

Fabrizio De Mattia, Sergio Sgorbati, Massimo Labra, Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Milano-Bicocca, Piazza della Scienza 1, 20126 Milano
Fabrizio Grassi, Orto Botanico, Dipartimento di Biologia, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano
Serena Imazio, Dipartimento di Produzione Vegetale, Università di Milano, Via Caloria 2, 20133 Milano
Gianni Lovicu, Centro Regionale Agrario Sperimentale, Viale Trieste 111, 09123 Cagliari

DNA ripetitivo ed evoluzione delle specie vegetali

M. CECCARELLI, V. SARRI e P.G. CIONINI

ABSTRACT - Repetitive DNA and plant evolution - Data obtained by studying *Linum usitatissimum*, *Vicia faba*, *Helianthus annuus*, *Festuca arundinacea*, and *Dasyphyrum villosum* show that repeated DNA sequences of different kind can modulate their redundancy in the nuclear DNA, so producing alterations in the size and organization of the genome that differentiate both different populations of a species and individual plants within a single population. These genomic alterations, which can occur within a short developmental period of a single generation, modify traits of the cellular phenotype and then dynamics of development and reproduction. Significant correlations between environmental parameters and these genomic changes were found. These observations suggest that redundancy modulations of repeated DNA sequences produce quantitative genetic variation having a role in environmental adaptation and then in plant evolution.

Key words: environmental adaptiveness, evolution, genome plasticity, plants, repetitive DNA

INTRODUZIONE

È noto che il DNA ripetitivo rappresenta la frazione di gran lunga maggiore del genoma delle maggior parte degli eucarioti e che è particolarmente abbondante nelle piante. Attraverso meccanismi molecolari, alcuni dei quali sono noti (ad esempio, la trasposizione replicativa degli elementi di DNA mobili; BENNETZEN, 2000) mentre altri rimangono ancora da chiarire, le sequenze di DNA ripetute possono modulare la loro ridondanza – e, se elementi trasponibili, la posizione – nel DNA nucleare, così alterandone la quantità e l'organizzazione. Variazioni nel numero di copie di sequenze ripetute possono ovviamente prodursi, entro una lunga scala temporale, come risultato di processi di selezione in seguito ad eventi casuali che si verificano nel genoma. Vi sono però risultati sperimentali in alcune specie che mostrano come cambiamenti nel genoma in cui è implicata la sua frazione ripetitiva possono rappresentare risposte dirette a stimoli ambientali, che si verificano entro un breve periodo di sviluppo nell'arco di una singola generazione (CULLIS, CLEARY, 1986; NATALI *et al.*, 1995; CAVALLINI *et al.*, 1996; JOHNSTON *et al.*, 1996; PRICE, JOHNSTON, 1996; CACERES *et al.*, 1998; CULLIS, 1999; CECCARELLI *et al.*, 2002). A parte alcune sequenze presenti in molte copie nel DNA nucleare la cui funzione è nota, quali quelle che codificano per l'RNA ribosomiale, il ruolo funzionale del DNA ripetitivo rimane argomento di discussione e le sequenze ripetute, nella loro maggior parte, sono state addirittura considerate parassitiche

o 'egoiste', prive di funzioni definite nel genoma ospite (DOOLITTLE, SAPIENZA, 1980; ORGEL, CRICK, 1980). Variazioni nelle dimensioni e nella organizzazione del genoma dovute a modulazioni quantitative di sequenze appartenenti alla sua frazione ripetitiva sono state osservate in più specie vegetali. In alcune di esse, quali *Linum usitatissimum*, *Vicia faba*, *Helianthus annuus*, *Festuca arundinacea* e *Dasyphyrum villosum* sono state studiate in particolare dettaglio e sono state indicate correlazioni significative fra modificazioni nel DNA nucleare di questo tipo da una parte e sia fattori ambientali che aspetti del fenotipo vegetativo e riproduttivo della pianta dall'altra. I risultati ottenuti in queste cinque specie sono di seguito riassunti e discussi nell'ottica di una possibile funzione del DNA ripetitivo nel produrre variazioni genetiche quantitative aventi un ruolo nell'adattamento ambientale e quindi nella evoluzione.

Linum usitatissimum

Il caso del lino è ormai considerato classico. Piante con determinati genotipi che crescono in presenza di particolari condizioni di temperatura o di sbilanciamenti dei nutrienti minerali sviluppano fenotipi alterati (genotrofi). Le caratteristiche di questi fenotipi sono ereditabili ed i genotrofi differiscono per la quantità di DNA nucleare (DURRANT, 1962). Le alterazioni che si verificano nel genoma di lino sono state oggetto di molti studi a livello molecolare e ne è scaturita la dimostrazione che esse sono dovute a

variazioni nel numero di copie con cui sequenze appartenenti a varie classi di DNA ripetitivo (altamente ripetute, mediamente ripetute, sequenze per l'RNA ribosomale 5S, alcuni elementi trasponibili) sono presenti nel DNA nucleare (CULLIS, CLEARY, 1986; SCHNEEBERGER, CULLIS, 1991; CULLIS, 1999). Questo di *L. usitatissimum* è un chiaro esempio di modificazione del genoma che si produce come risposta diretta ad uno stimolo ambientale. Infatti, poiché la varietà il cui genotipo è competente (Stormont Cirrus) è autogama e tutte le piante sono in grado di svilupparsi in presenza delle condizioni inducenti e di contribuire alla generazione successiva, i cambiamenti osservati nel genoma non possono essere ipotizzati come dovuti ad una qualche forma di selezione entro una popolazione genotipicamente eterogenea (CULLIS, 1999).

Vicia faba

Popolazioni locali di questa specie, variamente distribuite nel bacino del Mediterraneo, possono differire fino al 35% per le dimensioni del genoma (CECCARELLI *et al.*, 1995). È stato mostrato che il numero di copie sia di sequenze altamente ripetute organizzate in tandem che di alcune sequenze intersperse nel DNA nucleare e che rappresentano elementi trasponibili o loro residui differisce nel DNA estratto da piante appartenenti a differenti popolazioni ed è significativamente correlato con le dimensioni del genoma (MAGGINI *et al.*, 1995; FREDIANI *et al.*, 1999). La proliferazione e la distensione cellulare sono influenzate da queste alterazioni nel DNA nucleare, che sono capaci di modificare le dinamiche di sviluppo delle piante. Infatti, il potere di germinazione dei semi ed il tasso di crescita di alcuni organi sono favoriti dalle maggiori dimensioni del genoma, che rallentano invece la crescita di altri organi (MINELLI *et al.*, 1996).

Helianthus annuus

È stato mostrato che le dimensioni del genoma di girasole possono differire fra varietà e/o linee diverse, e significative differenze nel contenuto in DNA nucleare sono osservabili perfino fra plantule che si sviluppano da semi raccolti in posizioni diverse della calatide di piante appartenenti a linee omozigotiche (CAVALLINI *et al.*, 1986). Uno studio dettagliato ha dimostrato che i singoli membri di una progenie acquisiscono precocemente durante l'embriogenesi differenti quantità di DNA nucleare secondo un gradiente, basato sulle dimensioni del genoma della pianta madre, che decresce andando dalla periferia al centro della calatide (CAVALLINI *et al.*, 1989). I risultati di cinetiche di denaturazione e rinaturazione del DNA estratto e di esperimenti di ibridazione molecolare hanno indicato che modulazioni della ridondanza di sequenze ripetute, incluso il DNA ribosomale, vanno di pari passo con i cambiamenti delle dimensioni del genoma. Queste modulazioni, cui si accompagnano variazioni nella metilazione del

DNA, coinvolgono in particolare una determinata frazione del DNA ripetitivo che comprende differenti famiglie di sequenze. La maggior parte di queste famiglie è maggiormente rappresentata nel DNA estratto da piante con genoma più grande, ma sequenze di alcune altre famiglie sono invece amplificate nel DNA di piante il cui genoma ha minori dimensioni (CAVALLINI *et al.*, 1996). La proliferazione cellulare è più veloce nei meristemi di queste ultime piante rispetto alle prime, in cui il ciclo mitotico è più lungo di 1 ora e 30 minuti. Le dimensioni dei genomi sono significativamente correlate in maniera positiva con le dimensioni delle cellule nei tessuti differenziati e con il tempo e l'intervallo di fioritura delle piante (NATALI *et al.*, 1993).

Festuca arundinacea

La quantità di DNA nucleare può variare fino al 32% in popolazioni italiane di *F. arundinacea* esaploide, ed è positivamente correlata con la temperatura media annuale e quella del mese più freddo alle stazioni e negativamente con la loro latitudine (CECCARELLI *et al.*, 1992). Lo studio dettagliato di queste variazioni quantitative del genoma ha mostrato che esse sono dovute ad una risposta diretta del DNA nucleare alla temperatura durante la germinazione del seme. Facendo germinare a differenti temperature semi prelevati da differenti popolazioni, è stato osservato che la quantità di DNA aumenta con l'aumentare della temperatura ed in misura tanto maggiore quanto minore è la quantità di partenza. Questa osservazione suggerisce che, nella festuca, vi sono differenti dimensioni genomiche ottimali per la germinazione del seme e lo sviluppo della pianta a seconda della temperatura ambientale (CECCARELLI *et al.*, 1997). Un ulteriore studio ha mostrato che le variazioni quantitative nel DNA nucleare sono dovute a variazioni nella ridondanza di sequenze di DNA intersperse nel genoma che rappresentano quasi certamente elementi trasponibili. È particolarmente interessante l'osservazione che la maggior parte delle sequenze capaci di modulazione quantitativa viene amplificata alle alte temperature, ma che altre sequenze ripetute sono invece amplificate alle temperature più basse (CECCARELLI *et al.*, 2002). Come in *H. annuus*, la durata del ciclo mitotico è influenzata dalle dimensioni del genoma. Ad esempio, in piante con un valore C del DNA intorno a 6 pg il ciclo è più breve di 3 ore rispetto al ciclo osservato in piante con un valore C intorno a 8 pg. Il potere di germinazione dei semi ed il tasso di crescita di radici e foglie, eventi dello sviluppo che si verificano durante l'inverno e l'inizio della primavera, sono correlati in maniera negativa con le dimensioni del genoma, con cui, invece, sono correlati positivamente i caratteri quantitativi di altri organi della pianta che si sviluppano nella stagione più calda. Le dimensioni del genoma sono anche correlate positivamente con il tempo minimo di generazione (CECCARELLI *et al.*, 1993).

Dasypyrum villosum

In *D. villosum*, sono state osservate differenze fino al 17,6% nelle dimensioni medie del genoma di popolazioni diverse e la quantità di DNA può variare fino al 66,2% fra individui di una stessa popolazione. Una correlazione positiva, altamente significativa, è stata osservata fra le dimensioni del genoma e l'altitudine delle stazioni delle popolazioni, e le differenze nel contenuto in DNA fra individui sono per regola maggiori nelle popolazioni con stazioni in montagna (CACERES *et al.*, 1998). Variazioni nella ridondanza di una sequenza ripetuta organizzata in tandem, che tuttavia non possono da sole spiegare le differenze osservate nelle dimensioni dei genomi, sono correlate alle variazioni della quantità di DNA. Come in *F. arundinacea*, è stato osservato che la plasticità di frazioni del DNA nucleare si manifesta particolarmente durante la germinazione del seme (FREDIANI *et al.*, 1994) e la riproduzione (CACERES *et al.*, 1998). Le dimensioni genomiche medie delle popolazioni sono correlate negativamente con alcuni caratteri quantitativi di organi delle piante, ad esempio con le dimensioni delle foglie. All'interno di una stessa popolazione, è stata osservata una correlazione positiva fra la quantità di DNA dei singoli individui ed il peso del seme dal quale si sono originati. Appare poi particolarmente significativa l'osservazione che piante con differenti dimensioni del genoma mostrano anche un differente intervallo di fioritura (CACERES *et al.*, 1998).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

I dati che sono stati riassunti mostrano che nel DNA nucleare delle specie studiate esistono porzioni fluide, costituite da sequenze ripetute di vario tipo, che consentono al genoma risposte programmate agli stimoli ambientali. Poiché le sequenze ripetute, nella loro grande maggioranza, non sono codificanti, è possibile pensare che modulazioni della loro ridondanza abbiano il solo significato di alterare il nucleotipo, cioè la massa ed il volume del DNA nucleare (BENNETT, 1972). Studi comparativi condotti in specie differenti di angiosperme suggeriscono che le dimensioni del genoma possono di per se stesse influenzare caratteristiche ed attività cellulari quali il volume del nucleo (BAETCKE *et al.*, 1967) e della cellula (PRICE *et al.*, 1973; CAVALIER-SMITH, 1978), la durata del ciclo mitotico (VAN'T HOF, SPARROW, 1963; VAN'T HOF, 1965; EVANS, REES, 1971) o della meiosi (BENNETT, 1971). A sua volta, il fenotipo cellulare può influenzare le dinamiche di sviluppo ed il fenotipo dell'intero organismo (BENNETT, 1987). I risultati sopra esposti mostrano che questo può essere vero anche a livello intraspecifico. Il concetto di nucleotipo non esclude una possibile natura parassitica delle sequenze di DNA capaci di modulazioni quantitative (DOOLITTLE, SAPIENZA, 1980; ORGEL, CRICK, 1980) e che quindi i possibili vantaggi della loro autoreplicazione per il genoma ospite siano soltanto indiretti. Tuttavia, la specificità di risposta agli

stimoli ambientali, osservata con particolare chiarezza in *F. arundinacea* (CECCARELLI *et al.*, 1997, 2002) e *H. annuus* (CAVALLINI *et al.*, 1996), suggerisce che le variazioni genomiche osservate costituiscano risposte programmate, controllate dall'intero genoma.

Gli esempi fatti mostrano come la capacità di alterare le dimensioni del genoma e la sua organizzazione attraverso modulazioni nella ridondanza di sequenze ripetute rappresenta una via evolutiva attraverso la quale è possibile l'adattamento sia alla diversificazione delle condizioni ambientali che alla variabilità delle condizioni in un medesimo ambiente. La plasticità del genoma sembra funzionale al raggiungimento del primo traguardo ad esempio in *F. arundinacea*, in cui esistono dimensioni genomiche ottimali per la germinazione del seme e lo sviluppo della pianta a determinate temperature. Questa plasticità, insieme alla calibrazione su più larga scala della quantità di DNA in relazione alla temperatura ambientale dovuta alla diversificazione dei livelli di ploidia (le forme tetraploidi sono comuni in Francia, le esaploidi prevalgono in Italia, Spagna e Portogallo, mentre le ottoploidi e decaploidi sono confinate nel Nord Africa; BORRILL *et al.*, 1972), può spiegare l'amplicissima distribuzione geografica di questa specie (MARKGRAF-DANNENBERG, 1980). La diversificazione delle dinamiche di sviluppo e, segnatamente, del tempo minimo di generazione e dell'intervallo di fioritura legata alle modificazioni del genoma continuamente introdotte nelle popolazioni di *H. annuus* e *D. villosum* con la riproduzione, sembrano invece piuttosto favorire la capacità di singole popolazioni di far fronte alla variabilità delle condizioni in un medesimo ambiente. Questa idea sembra supportata dalla osservazione che le differenze nelle dimensioni del genoma di singole piante tendono ad essere maggiori nelle popolazioni di *D. villosum* con stazioni in montagna, dove l'ambiente è particolarmente variabile e limitante.

Per concludere, i dati riportati, che rappresentano solo una parte dei risultati reperibili nella letteratura in questo campo, suggeriscono l'esistenza nel genoma delle piante di informazioni che vanno al di là di quelle contenute nelle sequenze codificanti ed indicano nel DNA ripetitivo una delle basi della variazione genetica quantitativa. Queste evidenze possono condurre alla formulazione di modelli evolutivi che superano l'idea convenzionale di evoluzione basata sulla sola diversificazione degli alleli per determinati caratteri.

LETTERATURA CITATA

- BAETCKE K.P., SPARROW A.M., NAUMAN C.H., SCHWEMMER S.S., 1967 - *The relationship of DNA content to nuclear and chromosome volumes and to radiosensitivity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58: 533-540.
 BENNETT M.D., 1971 - *The duration of meiosis*. Proc. R. Soc. Lond., Ser. B, Biol. Sci., 178: 277-299.
 —, 1972 - *Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants*. Proc. R. Soc. Lond., Ser. B, Biol. Sci., 191: 109-135.
 —, 1987 - *Variation in genomic form in plants and its eco-*

- logical implications. *New Phytol.*, 106: 177-200.
- BENNETZEN J.L., 2000 - *Transposable element contributions to plant gene and genome evolution*. *Plant. Mol. Biol.*, 42: 251-269.
- BORRILL M., TYLER B., LLOYD-JONES M., 1972 - *Studies in Festuca*. I. *A chromosome atlas of bovine and scariosa*. *Cytologia*, 36: 1-14.
- CACERES M.E., DE PACE C., SCARASCIA-MUGNOZZA G.T., KOTSONIS P., CECCARELLI M., CIONINI P.G., 1998 - *Genome size variations within Dasypyrum villosum: correlations with chromosomal traits, environmental factors and plant phenotype characteristics, and behaviour in reproduction*. *Theor. Appl. Gen.*, 96: 559-567.
- CAVALIER-SMITH T., 1978 - *Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox*. *J. Cell Sci.*, 34: 247-278.
- CAVALLINI A., NATALI L., GIORDANI T., DURANTE M., CIONINI P.G., 1996 - *Nuclear DNA changes within Helianthus annuus L.: variations in the amount and methylation of repetitive DNA within homozygous progenies*. *Theor. Appl. Gen.*, 92: 285-291.
- CAVALLINI A., ZOLFINO C., CIONINI G., CREMONINI R., NATALI L., SASSOLI O., CIONINI P.G., 1986 - *Nuclear DNA changes within Helianthus annuus L.: cytophotometric, karyological and biochemical analyses*. *Theor. Appl. Gen.*, 73: 20-26.
- CAVALLINI A., ZOLFINO C., NATALI L., CIONINI G., CIONINI P.G., 1989 - *Nuclear DNA changes within Helianthus annuus L.: origin and control mechanism*. *Theor. Appl. Gen.*, 77: 12-16.
- CECCARELLI M., ESPOSITO M.C., ROSCINI C., SARRI V., FREDIANI M., GELATI M.T., CAVALLINI A., GIORDANI T., PELLEGRINO R.M., CIONINI P.G., 2002 - *Genome plasticity in Festuca arundinacea: direct response to temperature changes by redundancy modulation of interspersed repeats*. *Theor. Appl. Gen.*, 104: 901-907.
- CECCARELLI M., FALISTOCCO E., CIONINI P.G., 1992 - *Variation of genome size and organization within hexaploid Festuca arundinacea*. *Theor. Appl. Gen.*, 83: 273-278.
- CECCARELLI M., GIORDANI T., NATALI L., CAVALLINI A., CIONINI P.G., 1997 - *Genome plasticity during seed germination in Festuca arundinacea*. *Theor. Appl. Gen.*, 94: 309-315.
- CECCARELLI M., MINELLI S., FALCINELLI M., CIONINI P.G., 1993 - *Genome size and plant development in hexaploid Festuca arundinacea*. *Heredity*, 71: 555-560.
- CECCARELLI M., MINELLI S., MAGGINI F., CIONINI P.G., 1995 - *Genome size variation in Vicia faba*. *Heredity*, 74: 180-187.
- CULLIS C.A., 1999 - *The environment as an active generator of adaptive genomic variation*. In: LERNER H.R. (Ed.), *Plant responses to environmental stresses*: 149-160. Marcel Dekker Inc., New York.
- CULLIS C.A., CLEARY W., 1986 - *Rapidly varying DNA sequences in flax*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28: 252-259.
- DOOLITTLE W.F., SAPIENZA C., 1980 - *Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution*. *Nature*, 284: 601-603.
- DURRANT A., 1962 - *The environmental induction of heritable changes in Linum*. *Heredity*, 17: 27-61.
- EVANS G.M., REES H., 1971 - *Mitotic cycles in dicotyledons and monocotyledons*. *Nature*, 223: 350-351.
- FREDIANI M., COLONNA N., CREMONINI R., DE PACE C., DELRE V., CACCIA R., CIONINI P.G., 1994 - *Redundancy modulation of nuclear DNA sequences in Dasypyrum villosum*. *Theor. Appl. Gen.*, 88: 167-174.
- FREDIANI M., GELATI M.T., MAGGINI F., GALASSO I., MINELLI S., CECCARELLI M., CIONINI P.G., 1999 - *A family of dispersed repeats in the genome of Vicia faba. Structure, chromosomal organization, redundancy modulation, and evolution*. *Chromosoma*, 108: 317-324.
- JOHNSTON J.S., JENSEN A., CZESCHIN D.G., PRICE H.J., 1996 - *Environmentally induced 2C DNA content instability in Helianthus annuus (Asteraceae)*. *Ann. J. Bot.*, 83: 1113-1120.
- MAGGINI F., D'OVIDIO R., GELATI M.T., FREDIANI M., CREMONINI R., CECCARELLI M., MINELLI S., CIONINI P.G., 1995 - *FokI DNA repeats in the genome of Vicia faba: species specificity, structure, redundancy modulation, and nuclear organization*. *Genome*, 38: 1255-1261.
- MARKGRAF-DANNENBERG I., 1980 - *Festuca L.* In: TUTIN T.G. et al. (Eds.), *Flora Europaea*, 5: 125-133. Cambridge University Press, Cambridge
- MINELLI S., MOSCARIELLO P., CECCARELLI M., CIONINI P.G., 1996 - *Nucleotype and phenotype in Vicia faba*. *Heredity*, 76: 524-530.
- NATALI L., CAVALLINI A., CIONINI G., SASSOLI O., CIONINI P.G., DURANTE M., 1993 - *Nuclear DNA changes within Helianthus annuus L.: changes within single progenies and their relationships with plant development*. *Theor. Appl. Gen.*, 85: 506-511.
- NATALI L., GIORDANI T., CIONINI G., PUGLIESI C., FAMBRINI M., CAVALLINI A., 1995 - *Heterochromatin and repetitive DNA frequency variation in regenerated plants of Helianthus annuus L.* *Theor. Appl. Gen.*, 91: 395-400.
- ORGELE C.E., CRICK F.H.C., 1980 - *Selfish DNA: the ultimate parasite*. *Nature*, 284: 604-607.
- PRICE H.J., JOHNSTON J.S., 1996 - *Influence of light on DNA content of Helianthus annuus Linnaeus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11264-11267.
- PRICE H.J., SPARROW A.H., NAUMAN A.F., 1973 - *Correlations between nuclear volume, cell volume and DNA content in meristematic cells of herbaceous angiosperms*. *Experientia*, 29: 1028-1029.
- SCHNEEBERGER R., CULLIS C.A., 1991 - *Specific DNA alterations associated with the environmental induction of heritable changes in flax*. *Genetics*, 128: 619-630.
- VAN'T HOF J., 1965 - *Relationships between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the root meristem of several plants*. *Exp. Cell Res.*, 39: 48-58.
- VAN'T HOF J., SPARROW A.H., 1963 - *A relationship between DNA content, nuclear volume, and minimum mitotic cycle time*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 49: 897-902.
- RIASSUNTO – Sono riassunte e discusse alcune evidenze sperimentali ottenute in *Linum usitatissimum*, *Vicia faba*, *Helianthus annuus*, *Festuca arundinacea* e *Dasypyrum villosum*, che mostrano come sequenze di DNA ripetute di vario tipo possano modulare la loro ridondanza nel DNA nucleare. Queste modulazioni determinano alterazioni nelle dimensioni e nella organizzazione del genoma che possono differenziare popolazioni diverse di una stessa specie così come individui entro una stessa popolazione. Le variazioni quantitative nel DNA ripetitivo, che possono verificarsi entro un breve periodo dello sviluppo di una singola generazione modificando il fenotipo cellulare e

quindi alcune dinamiche di sviluppo, sono capaci di determinare cambiamenti nel fenotipo dell'intero organismo e di influenzare alcuni aspetti della riproduzione. Le relazioni osservate fra stimoli ambientali e modificazioni del

genoma di questo tipo suggeriscono un significato adattativo di queste ultime e quindi un ruolo del DNA ripetitivo nella evoluzione delle specie vegetali.

AUTORI

Marilena Ceccarelli, Vania Sarri, Pier Giorgio Cionini, Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Sezione di Biologia Cellulare e Molecolare, Università di Perugia, Via A. Pascoli, 06123 Perugia

La filogenesi delle *Dipsacaceae*: evidenze preliminari da due genomi

M. AVINO, G. TORTORIELLO e P. CAPUTO

ABSTRACT - Dipsacaceae phylogeny: preliminary evidence from two genomes - We undertook a phylogenetic analysis of *Dipsacaceae* Juss. using Maximum Parsimony analysis on nucleotide sequence data from both chloroplast (*trnL* intron, *trnL-trnF* intergenic spacer, *psbB-psbH* gene complex) and nuclear genomes (ITS1 and ITS2). Both chloroplast and nuclear data partitions, as well as the combined data, show *Dipsacaceae* as a well-supported monophyletic group. Topology in the tribe *Scabioseae* is quite similar to those of other recent studies, except for the position of two species belonging to the genus *Pycnocomon*, which appear as nested in *Lomelosia*. *Pycnocomon* (whose chromosome base number, pollen grain structure and epicalix morphology closely resemble those of the former genus) is therefore interpreted as a psammophyllous morphotype to be included in *Lomelosia*. The position of *Pterocephalodes* is basal to the rest of the family. Its remoteness from *Pterocephalus* has been confirmed through molecular evidences.

Key words: *Dipsacaceae*, *Dipsaceae*, filogenesi, introne *trnL*, ITS1, ITS2, *psbB-psbH*, *Scabioseae*, *trnL-trnF* IGS

INTRODUZIONE

Le *Dipsacaceae* Juss. (Dipscales Lindley) costituiscono una piccola famiglia di piante primariamente paleotemperate composta da 13 generi e 250-350 specie (EHRENDORFER, 1965; VERLÁQUE, 1977a). La loro distribuzione è principalmente circum-mediterranea, con estensioni in Asia Centrale fino all'Estremo Oriente e in Africa, dalle montagne dell'Africa Centrale fino al Sudafrica.

Le caratteristiche morfologiche tradizionalmente usate per distinguere le *Dipsacaceae* sono la presenza di un epicalice e di una infiorescenza a capolino. Le specie sono per lo più erbacee, annuali o perenni, fino a suffruttescenti. Le foglie sono opposte e prive di stipole, indivise o in vario modo pinnate, o lirate. L'infiorescenza a capolino è costituita tipicamente da numerosi fiori molto piccoli, ermafroditi o femminili, da attinomorfi (di rado) a zigomorfi, con corolla tubulosa, regolare o irregolare, posti su un ricettacolo provvisto di setole o bratteole scariose che si inseriscono tra i fiori stessi. Il ricettacolo è l'allargamento del peduncolo ed il capolino è circondato dall'involucro di brattee. Ogni singolo fiore presenta un involucro fatto a guisa di collare (epicalice o involucretto), costituito da bratteole connate che possono o meno espandersi distalmente in una corona che contiene all'interno il calice. Quest'ultimo in genere presenta margini dentellati, oppure è provvisto di reste. Il calice è piccolo, cupuliforme, o diviso in 4-5-numerose reste, lisce o piumose. La corolla è costituita da 4 o 5 petali, liberi o, a volte, fusi a formare

un labbro. L'androceo è costituito da 4 stami epipetalati (2 soltanto in *Pterocephalidium diandrum* [Lag.] G. López). L'ovario è infero, uniloculare, con un solo ovulo anatropo. Lo stigma è semplice o bilobato. Il frutto si presenta secco, indeiscente, racchiuso nell'epicalice e spesso sormontato da un calice persistente; il seme è privo di endosperma.

La delimitazione dei *taxa* all'interno della famiglia è stata sempre oggetto di controversie; conseguentemente la circoscrizione dei generi e delle tribù è stata ripetutamente modificata, a causa della complessiva similarità morfologica fra i *taxa* nella famiglia e della loro diversità nei dettagli strutturali. La famiglia è stata tradizionalmente suddivisa in tre tribù: *Dipsaceae*, con *Dipsacus* L. e *Cephalaria* Schrad., *Knautieae*, col solo genere *Knautia* L., e *Scabioseae*, con *Pterocephalus* (Vaill.) Adans s.l., *Scabiosa* L. s.l., *Succisa* Necker e *Succisella* Beck. Gli studi effettuati da VERLÁQUE (1977a,b, 1984a,b, 1985a,b, 1986a,b), e le loro conseguenze sulla nomenclatura dei *taxa* (GREUTER, BURDET, 1985; LÓPEZ GONZÁLES, 1987; DEVESA, 1984) hanno portato alla segregazione di varie entità, soprattutto dal genere *Scabiosa*: detto genere è stato suddiviso (sulla base delle differenze strutturali dell'epicalice) in *Lomelosia* Rafin., *Scabiosa* s.s., *Sixalix* Rafin., *Pseudoscabiosa* Devesa, *Pycnocomon* Hoffmans. et Link. In maniera simile, dal genere *Pterocephalus* sono stati rimossi *Pycnocomon intermedium* (Lag.) Greuter et Burdet [= *Pterocephalus intermedium* (Lag.) Coutinho], e *Pterocephalus*

lidium G. López [*Pterocephalidium diandrum* (Lag.) G. López = *Pterocephalus diandrus* (Lag.) Lag.]. Recentemente, MAYER, EHRENDORFER (1999) hanno rivisto, in maniera critica, la struttura dell'epicalice, basandosi su studi di microscopia elettronica, suggerendo che le *Scabioseae*, per essere considerate monofiletiche, dovrebbero includere meno generi di quanti precedentemente ascritti ad essa. Inoltre, gli stessi autori hanno segregato tre specie asiatiche del genere *Pterocephalus* nel nuovo genere *Pterocephalodes* Mayer et Ehrendorfer (MAYER, EHRENDORFER, 2000). Oggi, quindi, le *Dipsacaceae* includono 13 generi: *Lomelosia*, *Pterocephalus*, *Pycnocomon*, *Scabiosa*, *Sixalix*, inclusi nelle *Scabioseae* come ridefinite da MAYER, EHRENDORFER (1999); *Cephalaria*, *Dipsacus*, *Pseudoscabiosa*, *Pterocephalidium*, *Pterocephalodes*, *Succisa*, *Succisella*, putativamente inclusi, quindi, tra le *Dipsaceae* (MAYER, EHRENDORFER, 2000), oltre a *Knautia*, non presa in considerazione negli studi appena menzionati. Il motivo di tutte queste complicità è dovuto principalmente ai parallelismi che hanno avuto luogo tra i vari generi, dovuti specialmente alle sindromi di dispersione dei semi (MAYER, EHRENDORFER, l.c.; CAPUTO *et al.*, 2004). Nei *taxa* anemocori, infatti, la corona (cioè la parte distale dell'epicalice) si sviluppa in maniera omoplasica in un ampio margine membranoso (come in *Lomelosia*, *Pseudoscabiosa* p.p., *Scabiosa*), o le reste calicine si moltiplicano e diventano più o meno piumose (come in *Pseudoscabiosa grosii*, *Pterocephalidium*, *Pterocephalodes*, *Pterocephalus*, *Pycnocomon intermedium*). In alcune (seppur poche) specie, entrambe le caratteristiche sono presenti (come in *Lomelosia brachiata* (Sm.) Greuter et Burdet, *Pterocephalus pyrethrifolius* Boiss. et Hohen. e *P. wendelboi* Rech. f., *Pterocephalodes bretschnideri* (Batal.) V. Mayer et Ehrendorfer e *P. siamensis* (Craib) V. Mayer et Ehrendorfer). Ad oggi, l'unico studio filogenetico, basato su marcatori molecolari, disponibile per la famiglia (CAPUTO *et al.*, 2004) è basato su una matrice di 1042 caratteri comprendente DNA nucleare (Internal Transcribed Spacers - ITS) e plastidiale (introne *trnL*) per 19 *taxa*. Nel lavoro gli autori confermano i risultati di MAYER, EHRENDORFER (1999) sulle *Scabioseae* e la suddivisione presumibile delle *Dipsaceae*, che, secondo gli stessi, assorbe anche un nuovo genere, *Knautia*. Gli autori stessi, tuttavia, suggeriscono che, a causa della ridotta presenza nelle analisi di alcuni *taxa* presumibilmente molto significativi della tribù delle *Dipsaceae* e dell'assenza di specie del genere *Pterocephalodes*, i risultati della loro indagine vadano intesi come provvisori.

In questo lavoro gli autori presentano i risultati preliminari di un più vasto studio molecolare che include oltre 30 *taxa* e quattro marcatori genetici: la regione nucleare ITS (ITS1 e 2); lo spaziatore intergenico plastidiale *trnL-trnF*, l'introne plastidiale *trnL*; il complesso genico plastidiale *psbB-psbH*.

MATERIALI E METODI

La scelta dei *taxa* include rappresentanti di tutti i generi della famiglia, scelti con l'obiettivo di massi-

mizzare la variazione morfologica. Gli outgroup appartengono alla famiglia delle *Morinaceae* J. Agardh ed a quella delle *Valerianaceae* Batsch, molto vicine alla nostra famiglia di interesse. Le specie provengono da campioni di erbario o da piante ottenute da semi coltivati nell'Orto botanico di Napoli e depositate a NAP.

Una piccola quantità di tessuto vegetale è stata raccolta e pestata con azoto liquido. L'estrazione del DNA genomico è stata condotta utilizzando il DNeasy Plant Mini Kit Qiagen (Sigma). Presenza, concentrazione e peso molecolare del DNA sono stati valutati tramite elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,8%.

I marcatori utilizzati sono stati isolati ed amplificati tramite PCR (Polymerase chain reaction) e valutati in lunghezza su gel d'agarosio all'1,5%. I frammenti amplificati sono stati successivamente purificati mediante il kit GFX PCR DNA Purification Qiagen. Sono state quindi allestite reazioni di sequenza utilizzando l'ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit e, successivamente, i campioni sono stati sequenziati.

È stata così costruita una matrice di *taxa* per ogni marcatore molecolare, sul quale si è prima ottenuto l'allineamento e poi l'analisi cladistica, su base euristica, per la ricerca degli alberi a Massima Parsimonia (MP).

RISULTATI

La matrice ITS (33 *taxa*, 582 caratteri, 5 alberi MP, lunghezza = 608 passi, C.I. = 0.65, R.I. = 0.63) ha prodotto un albero di consenso in cui si nota la monofileticità della famiglia (dati non mostrati). Internamente ad essa *Pterocephalodes* risulta in posizione basale rispetto a tutta la famiglia dove si osservano due cladi principali in relazione di *sister group*, il primo contenente specie che oggi sono considerate appartenere alle *Scabioseae* e quello completamente risolto delle specie oggi ascritte alle *Dipsaceae* in cui si nota anche la presenza del genere *Knautia*. La matrice *trnF-trnL* (33 *taxa*, 413 caratteri, 4 alberi MP, lunghezza = 150 passi, C.I. = 0.86, R.I. = 0.90) ha prodotto un albero di consenso con un ampio collasso alla base delle *Dipsacaceae* in cui però si denotano il clado delle *Cephalaria* e quello quasi completamente risolto dei generi appartenenti alla tribù delle *Scabioseae* (dati non mostrati). La matrice *trnL* (33 *taxa*, 628 caratteri, 169 alberi MP, lunghezza = 152 passi, C.I. = 0.89, R.I. = 0.89) ha prodotto anch'essa un albero di consenso con un largo collasso alla base della nostra famiglia di interesse (dati non mostrati). Si possono comunque notare i cladi che contengono il genere *Dipsacus*, quello contenente i generi *Pycnocomon* e *Lomelosia* ed il clado contenente in posizione basale *Pterocephalus* in relazione di *sister group* con i generi *Sixalix* e *Scabiosa*. La matrice *psbB-psbH* (29 *taxa*, 669 caratteri, 4 alberi MP, lunghezza = 121 passi, C.I. = 0.90, R.I. = 0.86) ha prodotto un albero di consenso collassato alla base delle *Dipsacaceae* in cui sono visibili i cladi *Succisella-Pseudoscabiosa* ed il clado, collassato alla base, contenente i generi ascritti alle *Scabioseae*, *Pycnocomon* è

in quest'albero interno al genere *Lomelosia* (dati non mostrati). La matrice combinata dei quattro marcatori (33 *taxa*, 2292 caratteri, 2 alberi MP, lunghezza = 1041 passi, C.I. = 0.65, R.I. = 0.63) ha prodotto un albero di consenso quasi completamente risolto, nel quale le *Dipsacaceae* risultano monofiletiche (Fig. 1). Alla base della famiglia troviamo il genere *Pterocephalodes*, *sister group* del resto della famiglia. Quest'ultima si divide in due cladi principali; il primo contiene le specie che appartengono alla tribù delle *Scabioseae*, con due cladi interni, uno dei quali include il genere *Lomelosia* (che presenta al suo interno *Pycnocomon*) e l'altro con *Pterocephalus* in posizione basale e *sister group* al clado *Scabiosa*/*Sixalix*. L'altro clado principale contiene tutte le specie appartenenti alla tribù delle *Dipsaceae* e include due sottogruppi, uno contenente *Pseudoscabiosa* in posizione basale rispetto al clado *Succisa*/*Succisella* e l'altro contenente il clado *Pterocephalidium*/*Knautia* e il clado *Cephalaria-rial*/*Dipsacus*.

DISCUSSIONE

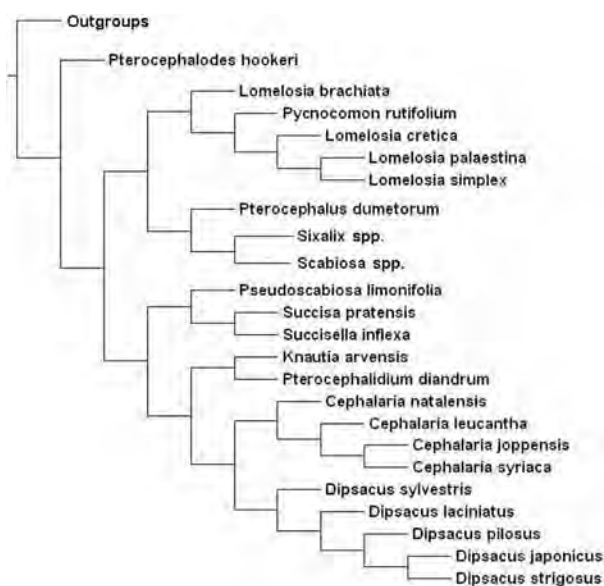


Fig. 1

Cladogramma MP per la matrice combinata (dettagli nel testo).

MP cladogram for the combined matrix (see text for details).

Pur aumentando il numero di *taxa* e il numero di marcatori i risultati ottenuti sono simili a quelli di CAPUTO *et al.* (2004). Tuttavia l'aggiunta del genere *Pterocephalodes* e di varie specie dei generi *Cephalaria*, *Dipsacus*, *Lomelosia*, *Pseudoscabiosa* e *Pycnocomon* ha permesso di acquisire ulteriori dati sull'evoluzione della famiglia.

Il genere *Pterocephalodes* (Fig. 1), costituito da tre *taxa* asiatici e segregato da poco dal genere *Pterocephalus* (MAYER, EHRENDORFER, 2000) a causa di alcune caratteristiche morfologiche dell'epicalice,

è basale nella famiglia, contrariamente all'opinione di MAYER, EHRENDORFER (2000), che lo includevano nelle *Dipsaceae*.

Nel genere *Cephalaria* (Fig. 1) la topologia è simile a quella ricostruita in VERLÁQUE (1985a, 1986b) e CAPUTO, COZZOLINO (1994). Infatti *C. natalensis* Kuntze, appartenente al sottogenere sudafricano *Lobatocarpus* Szabó, è basale, ed è seguita da *C. leucantha* (L.) Roem. & Schult., appartenente al sottogenere paleoendemico mediterraneo *Fimbriatocarpus* Szabó, e da due rappresentanti del sottogenere *Cephalaria*, distribuito dal Mediterraneo all'Iran. Questa topologia farebbe pensare ad un antico evento di vicarianza tra il Sudafrica (sottogenere *Lobatocarpus*) e il bacino mediterraneo (con il resto del genere).

Nel genere *Dipsacus* (Fig. 1) non ci sono corrispondenze tra quanto indicato dai risultati di questa indagine e le ipotesi basate sulla morfologia: infatti, le due specie appartenenti alla sezione *Spaerodipsacus* Lange (*D. japonicus* Miq. e *D. pilosus* L.), ipotizzata in passato come arcaica (VERLÁQUE, 1985b), si ritrovano inserite tra le specie della sezione *Dipsacus*.

Molto interessante è la topologia mostrata nel cladogramma di Fig. 1 per le specie del genere *Lomelosia*. Dista attenzione, infatti, la posizione basale della specie *L. brachiata* [collocata in passato nel genere monospecifico *Tremastelma* Rafin.], una mediterranea annuale con un numero raddoppiato di reste calicine (10 invece di cinque) e con un epicalice abbastanza robusto con 8 ampie foveole. Anche se il numero di specie del genere considerato in questa analisi potrebbe non essere sufficiente per trarre conclusioni generali, tutta la precedente letteratura (VERLÁQUE, 1986a, b) indica come l'annualità e l'allargamento delle foveole siano tratti derivati del genere. Inoltre, *Pycnocomon*, con il suo epicalice prismatico adattato a rotolare sulla sabbia (VERLÁQUE, 1986b), si trova all'interno di *Lomelosia* (Fig. 1) e dovrebbe essere interpretato solo come un morfotipo psammofilo del genere in questione, a dispetto delle sue divergenti caratteristiche morfologiche (involucro connato, eterocarpi). Infatti, *Pycnocomon* e *Lomelosia* condividono il numero cromosomico di base ($x=9$), il polline triporato e opercolato, e la morfologia dell'epicalice con foveole profonde e con un secondo anello sclerenchimatico nella sua struttura anatomica (VERLÁQUE, 1986a; MAYER, EHRENDORFER, 1999).

Alcune considerazioni sono doverose sulla suddivisione in tribù delle *Dipsacaceae*. MAYER, EHRENDORFER (1999), sulla base di un accurato studio morfologico, suggerirono una nuova circoscrizione della tribù delle *Scabioseae*, che includesse solo *Pterocephalus*, *Lomelosia*, *Pycnocomon*, *Scabiosa* e *Sixalix*, ben differente da quella indicata negli studi di VERLÁQUE (1986b) e di CAPUTO, COZZOLINO (1994), ma perfettamente congruente con le indagini molecolari di CAPUTO *et al.* (2004) e con quelle riportate qui.

I risultati preliminari qui presentati indicherebbero che, come per le *Scabioseae*, anche le *Dipsaceae* sono un'entità monofiletica. Tuttavia, allo stato non è pos-

sibile individuare in modo chiaro una o più sinapomorfie morfologiche che le caratterizzino, in particolare poiché *Pterocephalodes* (non incluso nelle *Dipsaceae* secondo il cladogramma di Fig. 1) condivide con esse vari caratteri che debbono essere interpretati come simplesiomorfici.

Il genere *Knautia*, trattato in passato come unico rappresentante di una tribù monogenerica (*Knautieae*) (VERLÁQUE, 1986a) viene incluso nella nostra analisi all'interno delle *Dipsaceae* in accordo con i risultati di CAPUTO *et al.* (2004).

LETTERATURA CITATA

- 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.
- DEVESA J.A., 1984 - *Pseudoscabiosa, genere nuevo de Dipsacaceae*. *Lagascalia*, 12: 213-221.
- EHRENDORFER F., 1965 - *Evolution and karyotype differentiation in a family of flowering plants: Dipsacaceae*. In: AA. VV., *Genetics Today* (Proc. XI Intern. Congr. Genetics, The Hague, The Netherlands, 1963) 2: 399-407. *Gesellsch.*, 77: 83-94.
- GREUTER W., BURDET R., 1985 - *Dipsacaceae*. In: GREUTER W., RAUS T., (Eds.), *Med-Checklist Notulae 11*. *Willdenowia*, 15: 71-76.
- LOPEZ GONZALES G., 1987 - *Pterocephalidium, un nuevo género ibérico de la familia Dipsacaceae*. *Anales 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.
- VERLAQUE R., 1977a - *Rapports entre les Valerianaceae, les Morinaceae et les Dipsacaceae*. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 124: 475-482.
- , 1977b - *Importance du fruit dans la détermination des Dipsacaceae*. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 124: 515-527.

AUTORI

Mariano Avino, Paolo Caputo, Dipartimento di Scienze biologiche, sezione di Biologia vegetale, Università di Napoli Federico II, Via Foria 223, 80139 Napoli
Giuseppe Tortoriello, Dipartimento di Biologia strutturale e funzionale, Università di Napoli Federico II, Via Cintia, Complesso M. Sant'Angelo, 80126 Napoli

- , 1984a - *A biosystematic and phylogenetic study of the Dipsacaceae*. In: GRANT R. (Ed.), *Plant biosystematics*: 307-320. Academic Press, Toronto.
- , 1984b - *Etude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. I. – Délimitation des Dipsacaceae al' intérieur des Dipsacales, rapports avec les autres familles de l'ordre*. *Rev. Gen. Bot.*, 91: 81-121.
- , 1985a - *Etude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. II - Caractères généraux des Dipsacaceae*. *Rev. Cytol. Biol. Veg. Le Botaniste*, 8: 117-168.
- , 1985b - *Etude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. III – Tribus des Knautieae et des Dipsacaceae*. *Rev. Cytol. Biol. Veg. Le Botaniste*, 8: 171-243.
- , 1986a - *Etude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. IV – Tribus des Scabioseae (phylum n. 1, 2, 3)*. *Rev. Cytol. Biol. Veg. Le Botaniste*, 9: 5-72.
- , 1986b - *Etude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. V - Tribus des Scabioseae (phylum n. 4) et conclusion*. *Rev. Cytol. Biol. Veg. Le Botaniste*, 9: 97-176.

RIASSUNTO – È stata effettuata un'analisi filogenetica sulle *Dipsacaceae* Juss. su sequenze nucleotidiche provenienti da DNA plastidiale (introne *trnL*, spaziatore intergenico *trnL-trnF*, complesso genico *psbB-psbH*) e da DNA nucleare (ITS1 e 2). Entrambi i marcatori, come la loro matrice combinata, mostrano che le *Dipsacaceae* sono un gruppo monofiletico ben supportato. La topologia nella tribù delle *Scabiosae* è molto simile a quella proposta in recenti studi, eccetto per la posizione delle due specie appartenenti al genere *Pycnocomon*, che appaiono interne a *Lomelosia*. *Pycnocomon* è perciò da interpretare come un morfotipo psammofilo e deve essere incluso in *Lomelosia*. L'esclusione dei generi *Pseudoscabiosa*, *Pterocephalidium*, *Pterocephalodes*, *Succisa* e *Succisella* dalle *Scabioseae* è confermata. La posizione di *Pterocephalodes* è basale rispetto al resto della famiglia. La sua segregazione da *Pterocephalus* è stata confermata su *Dipsaceae* secondo il cladogramma mostrato in figura, ma condivide con esse vari caratteri che debbono essere interpretati come simplesiomorfici. Il genere *Knautia*, trattato in passato come unico rappresentante di una tribù monogenerica (*Knautieae*) (VERLÁQUE, 1986a), viene incluso nella nostra analisi all'interno delle *Dipsaceae* in accordo con i risultati di CAPUTO *et al.* (2004).

Cromosomi e filogenesi in *Borago* L. (*Boraginaceae*)

A. COPPI, F. SELVI e M. BIGAZZI†

ABSTRACT - *Chromosomes and phylogenetic analyses in Borago L. (Boraginaceae)* - Aiming to elucidate relationships among species with different chromosome features, karyological variation in *Borago* and cytogeography of subg. *Buglossites* were investigated in Corsica, Sardinia and Tuscan Archipelago, in combination with a molecular phylogenetic analysis. Karyotype analysis was performed on sampled populations of *B. pygmaea*, *B. morisiana*, *B. trabutii* and *B. officinalis*; phylogenetic analyses were based on ITS1, nrDNA, and matK cpDNA sequences. We found four haploid numbers, $x = 6, 8, 9$ and 15 , and three ploidy levels based on $x = 8$. In subg. *Buglossites* the rare endemic *B. morisiana* is diploid with $2n = 18$, while *B. pygmaea* includes three allopatric cytotypes with $2n = 30$ (Sardinia), $2n = 32$ (southern Corsica) and $2n = 48$ (central-northern Corsica and Capraia). In subg. *Borago*, the rare Moroccan endemic *B. trabutii* has the lowest number in *Boragineae*, $2n = 12$, while *B. officinalis* has $2n = 16$. Molecular data support the monophyly of *Borago*, while relationships in subgenus *Borago* remain unclear. *B. trabutii* appears as the earliest divergent lineage and sister to a clade with *B. officinalis*, *B. morisiana* and *B. pygmaea*. Subgenus *Buglossites* is also monophyletic, but no correspondence occurs between ITS1 phylogeny and *B. pygmaea* cytotypes. High sequence variation in the tetra- and hypotetraploid races of the autopolyploid *B. pygmaea* suggests a multiple-event origin. On the contrary, the lower polymorphism of the hexaploid race and its allopatric distribution support a single origin via union of unreduced ($n = 32$) and reduced ($n = 16$) gametes.

Key words: *Boraginaceae*, *Borago*, chromosomes, cytogeography, ITS1, karyotype, matK, molecular phylogeny, polyploidy

INTRODUZIONE

Borago è un piccolo genere di cinque specie, quattro delle quali endemiche di parte del Mediterraneo sud-occidentale. Secondo GUFFULEAC (1928) esso è diviso in due sottogeneri corrispondenti a due distinte linee evolutive. Oltre alla comune specie *B. officinalis*, il sottogenere *Borago* comprende *B. trabutii* Maire, endemica dell'Atlante marocchino, e *B. longifolia* Poir. endemica di Algeria e Tunisia. L'altra linea evolutiva è rappresentata dal subgen. *Buglossites* e include *B. pygmaea* (DC.) Chater & Greuter endemica di Sardegna, Corsica ed isola di Capraia, e *B. morisiana* Bigazzi & Ricceri esclusiva della Sardegna centro-meridionale.

Da un punto di vista cariologico, i pochi dati disponibili indicavano per questo genere il solo numero base $x = 8$ e la condizione tetraploide di *B. pygmaea*. Tuttavia, da nostri recenti osservazioni cariologiche (BIGAZZI *et al.*, 2005) è emerso un livello di variabilità cromosomica ben maggiore.

B. trabutii è risultata diploide con $2n = 12$, *B. officinalis* diploide con $2n = 16$ e *B. morisiana* diploide con $2n = 18$, mentre *B. pygmaea* è risultata contenere tre citotipi tetra-, ipotetra- ed esaploide con, rispettivamente, $2n = 32, 30$ e 48 .

Allo scopo di formulare ipotesi sulle relazioni filoge-

netiche fra le specie con diversi numeri base e fra i diversi citotipi di *B. pygmaea* sono state analizzate le sequenze nucleotidiche della regione ITS1 del nrDNA (BALDWIN, 1992) e della regione matK del DNA cloroplastidiale.

MATERIALI E METODI

Il materiale utilizzato in questo lavoro proviene da tessuto fogliare prelevato da individui osservati in natura o cresciuti da seme in orto botanico. Il materiale prelevato è stato essiccato in gel di silice e mantenuto a -20° C. Per l'estrazione del DNA genomico si è reso necessario modificare il protocollo classico di estrazione proposto da DOYLE, DOYLE (1990) per la presenza di un'elevata quantità di sostanze mucillaginose, proteiche e polisaccaridiche, che hanno reso difficoltosa la reazione di amplificazione. I *taxa* indagati sono riportati in Tab. 1.

RISULTATI

Regione matK. Le sequenze allineate presentano una lunghezza pari a 531 bp, comprese le posizioni dei gap codificati. Nell'analisi filogenetica 461 posizioni risultano costanti, 52 variabili ma filogeneticamente non informative, mentre 18 sono variabili ed infor-

TABELLA 1

Taxa di *Borago* analizzati con provenienze geografiche e numero cromosomico.

Geographic proveniences and chromosome number of examined *Borago* taxa.

Taxon	Cod.	Provenienza (B & S: collezione M. Bigazzi & F. Selvi)	Numero cromosomico
<i>B. officinalis</i>	-	IT, Toscana, Firenze, B & S 90.001 (FI*)	$2n = 16$
<i>B. trabutii</i>	-	MO, Marrakech, Tizi-n-Ouzla, B & S (FI)	$2n = 12$
<i>B. morisiana</i>	MP	IT, Sardegna, Is. S. Pietro, B & S 88.001 (FI, CAG**)	$2n = 18$
<i>B. morisiana</i>	ML	IT, Sardegna, Laconi, B & S 03.02 (FI, CAG)	$2n = 18$
<i>B. pygmaea</i>	CP	IT, Toscana Isola Capraia, B & S 03.50 (FI)	$2n = 48$
<i>B. pygmaea</i>	BI	FR, Corsica, Bastia, Bigornu, B & S 04.50 (FI)	$2n = 48$
<i>B. pygmaea</i>	OL	FR, Corsica, Bastia, Olcani, B & S 88.002 (FI)	$2n = 48$
<i>B. pygmaea</i>	GT	FR, Corsica, Corte, B & S 88.003 (FI, CAG)	$2n = 48$
<i>B. pygmaea</i>	AL	FR, Corsica, Ajaccio, Alata, B & S 86.001 (FI)	$2n = 32$
<i>B. pygmaea</i>	CG	FR, Corsica, Sartene, Cargiaca, B & S s.n. (FI)	$2n = 32$
<i>B. pygmaea</i>	CL	IT, Sardegna, Sassari, Calangianus, B & S 04.51 (FI)	$2n = 30$
<i>B. pygmaea</i>	LA	IT, Sardegna, Nuoro, Laconi, <i>Bacchetta et al.</i> s.n. (CAG) 0	$2n = 3$
<i>B. pygmaea</i>	SI	IT, Sardegna, Cagliari, Sinnai, <i>Bacchetta et al.</i> s.n. (CAG)	$2n = 30$

FI*: Herbarium Universitatis Florentinae, Italia; CAG**: Herbarium, Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Cagliari, Italia.

native. Il singolo albero più parsimonioso, topologicamente identico a quello Neighbor-Joining, è mostrato in Fig. 1.

Il genere *Borago* costituisce un clado monofiletico molto ben supportato (94% BS) ed al suo interno l'endemita marocchino *B. trabutii* assume una posizione basale; *B. officinalis* si posiziona invece come sister rispetto alle specie del sottogenere *Buglossites*. Regione ITS1. Le sequenze allineate risultano lunghe 282 bp (codifica dei gap compresa) ed è possibile osservare una elevata variabilità interna all'ingroup, con 115 posizioni variabili. Nell'analisi filogenetica, 131 caratteri risultano costanti, 83 variabili non informativi e 68 variabili informativi. Uno degli alberi filogenetici più parsimoniosi è mostrato in Fig. 2. Rispetto agli outgroups utilizzati, *Borago* costituisce un clado monofiletico, all'interno del quale *B. trabutii* assume una posizione basale rispetto al resto degli ingroup. *B. officinalis* risulta sister al sottogenere *Buglossites* che costituisce un gruppo monofiletico ben supportato (98% BS). All'interno di quest'ultimo non si ha una chiara corrispondenza tra i cladi e i citotipi di *B. pygmaea* analizzati.

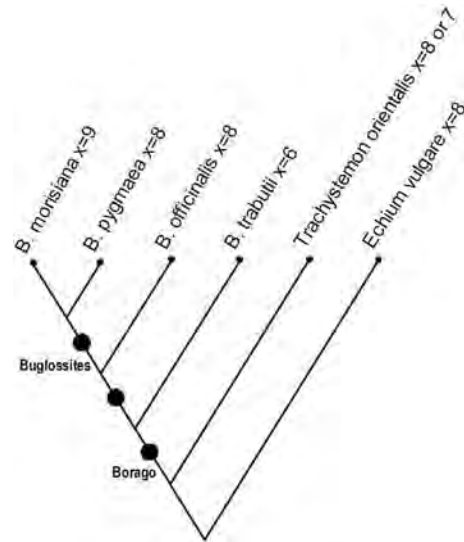


Fig. 1

Albero filogenetico di massima parsimonia ottenuto dalle sequenze matK ($L = 77$, $CI = 0.95$, $RI = 0.80$). I punti neri riportati sui rami indicano un elevato valore di Bootstrap (> 90%). Per le specie appartenenti all'ingroup viene riportato il numero cromosomico base.

The single most parsimonious phylogeny generated by matK sequences ($L = 77$, $CI = 0.95$, $RI = 0.80$). Black dots on branches indicate strong bootstrap support (> 90%). Base chromosome numbers are indicated for the ingroup species.

CONCLUSIONI

Entrambi i marcatori confermano che *Borago* è un genere monofiletico e che l'endemita *B. trabutii* occupa la posizione più basale all'interno di esso. Ciò potrebbe fornire un elemento di conferma all'ipotesi che il numero base $x = 6$ rappresenti la condizione cariologica ancestrale all'interno del gruppo. Tuttavia, da entrambe le ricostruzioni cladistiche rimane aperta anche l'ipotesi che sia $x = 8$ il numero aploide ancestrale in virtù della sua presenza anche nei generi outgroup *Anchusa*, *Echium* e probabilmente *Trachystemon*. In tal caso $x = 6$ e $x = 9$ potrebbero esser derivati per aneuploidia, discendente e ascendente, rispettivamente. Il subg. *Borago* non viene però risolto come gruppo monofiletico a causa della posizione di *B. officinalis* che non forma un clado con *B. trabutii*. Sia nell'albero matK che ITS1, *B. officinalis* risulta il sister group del subg. *Buglossites*, con le cui specie forma un clado ben sostenuto. Un elemento di possibile collegamento evolutivo fra *B. officinalis* ($2n = 16$) e questo sottogenere è dato dalla base $x = 8$ presente anche nelle popolazioni corse di *B. pygmaea*. La monofilia del sottogenere *Buglossites*, a differenza del subg. *Borago*, è ben sostenuta. Tuttavia la topologia dell'albero ITS non chiarisce appieno le relazioni fra le razze cromosomiche di *B. pygmaea*.

In particolare si è osservato un elevato polimorfismo nei citotipi tetra- ed ipotetraploidi di questa specie, suggerendo una loro origine attraverso eventi multi-

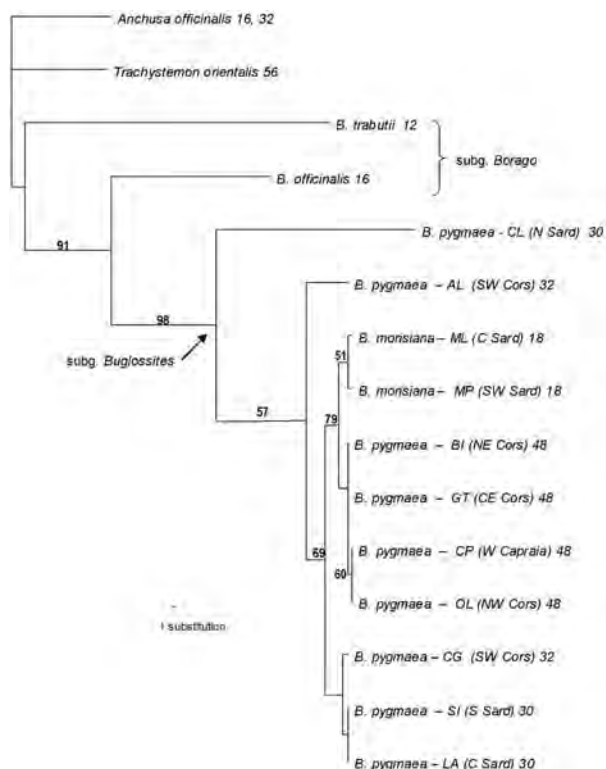


Fig. 2

Uno degli alberi più parsimoniosi di *Borago* (topologicamente identico all'albero di consenso stretto e Neighbor Joining, L = 208, CI = 0.89, RI = 0.82). I valori di Bootstrap sono mostrati quando > 50%. Le sigle delle popolazioni di *Buglossites* sono riportate in Tab. 1. Sono indicati il numero cromosomico e l'origine geografica di ogni popolazione.

One of the most parsimonious trees of *Borago* with branch lengths (topologically identical to the strict consensus and Neighbor Joining trees, L = 208, CI = 0.89, RI = 0.82). Bootstrap values are shown above branches when > 50%. Abbreviations of *Buglossites* accessions follow Tab. 1. Chromosome numbers and geographic origin are indicated for each accession.

pli indipendenti, anche se non può essere scartata l'ipotesi della presenza di geni paraloghi, cosa frequente in specie allo- e autopoliploidi. L'analisi cariologica ha permesso di ipotizzare per il citotipo $2n = 32$ un'origine autopoliploide attraverso unione di gameti non ridotti tra individui diploidi con $2n = 16$, oggi probabilmente estinti come già ipotizzato da CONTANDRIOPOULOS (1962). Nell'albero ITS1 le popolazioni sarde ipotetaploidi, originatesi molto probabilmente per aneuploidia discendente, non formano un gruppo omogeneo ma appaiono mescolate a quelle tetraploidi della Corsica meridionale. In particolare una popolazione della Sardegna settentrionale (Gallura), con $2n = 30$, risulta sister rispetto al resto di *Buglossites* a causa del notevole numero di variazioni nucleotidiche di tipo autapomorfico. Al contrario, le popolazioni esaploidi della Corsica settentrionale e dell'isola di Capraia ($2n = 48$) risultano un gruppo più omogeneo e probabilmente monofi-

letico grazie ad un minore polimorfismo ITS1. Questo fornisce elementi di sostegno all'ipotesi di una loro più recente origine attraverso un singolo evento di unione tra un gamete non ridotto ($n = 32$) ed uno ridotto ($n = 16$) in seno a popolazioni tetraploidi posizionate al margine settentrionale dell'area di distribuzione. Di particolare interesse risulta la perfetta corrispondenza molecolare e cariologica fra le popolazioni della Corsica settentrionale e quella dell'isola di Capraia, lasciando supporre una derivazione di quest'ultima da quelle corse. Tenuto conto dell'assenza di mezzi di dispersione dei semi a lunga distanza (specie mirmecocora o idrocora a breve raggio), e dell'origine vulcanica di Capraia, avvenuta ca. 7.3 e 6 m.a., si pone quindi l'interrogativo di come e quando questa specie abbia colonizzato la piccola isola toscana. Escludendo l'ipotesi di una recente introduzione antropica, tale evento potrebbe essere collocato o durante il periodo Messiniano (ca. 5.9-5.3 m.a. fa), quando Corsica e Capraia furono collegate, o forse più recentemente in epoca Pleistocenica quando, secondo alcuni autori, esistette un secondo ponte terrestre fra di esse.

LETTERATURA CITATA

- BALDWIN B.G., 1992 - *Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae*. Mol. Phyl. Evol., 1: 3-16.
- BIGAZZI M., SELVI F., COPPI A., BACCHETTA G., 2005 - *Variazione citogeografica ed evoluzione del cariotipo di Borago, con particolare riferimento al subgen. Bulossites (Boraginaceae)*. Inform. Bot. Ital., 37 (1, parte A):14-15.
- CONTANDRIOPOULOS J., 1962 - *Recherches sur la flore endémique de la Corse et sur ses origines*. Ann. Fac. Sci. Marseille, 32: 1-354.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L., 1990 - *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus, 12: 13-15.
- GUFFULEAC M., 1928 - *Die monotypischen und artenarmen Gattungen der Anchuseae (Caryolopha, Brunnera, Hormuzakia, Gastrocotyle, Phyllocara, Trachystemon, Procopiaia und Borago)*. Bul. Fac. Sti. Cernauti, 2: 394-461.

RIASSUNTO - I pochi dati cariologici disponibili riportavano per il genere *Borago* un solo numero base, $x = 8$ e la condizione tetraploide di *B. pygmaea*. Nostre osservazioni cariologiche hanno portato alla luce un livello di variabilità cromosomica ben maggiore di quanto conosciuto. Allo scopo di formulare ipotesi sulle relazioni filogenetiche fra le specie con diversi numeri base e fra i diversi citotipi, sono state analizzate le sequenze nucleotidiche della regione ITS1 del nrDNA di nove provenienze di *B. pygmaea*, due popolazioni sarde di *B. morisiana* ed una ciascuna di *B. officinalis* e *B. trabutii*. Sono state analizzate inoltre le sequenze nucleotidiche relative alla regione matK del DNA cloroplastidiale. Entrambi i marcatori confermano la monofilia di *Borago* così come la monofilia di *Buglossites*. Al contrario il sottogenere *Borago* non viene risolto come gruppo monofiletico a causa della posizione di *B. officinalis* che non forma un clado con *B. trabutii*. La topologia dell'albero ITS non chiarisce appieno le relazioni fra le razze cromosomiche tetra- ed ipotetaploidi osservate per *B. pygmaea*, le quali mostrano un'elevata variabilità. Al contrario, sem-

pre per *B. pygmaea*, le popolazioni esaploidi osservate per la Corsica settentrionale e Isola di Capraia risultano un gruppo più omogeneo e probabilmente monofiletico grazie ad un minore polimorfismo ITS1. Questo fornisce elementi

di sostegno all'ipotesi di una loro più recente origine attraverso un singolo evento di poliploidizzazione in seno a popolazioni tetraploidi situate al margine settentrionale dell'areale di distribuzione.

AUTORI

Andrea Coppi, Federico Selvi, Massimo Bigazzi[†], Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Firenze, Via G. La Pira 4, 50121 Firenze

La diversità genetica in *Quercus suber* L., *Q. cerris* L. e *Q. crenata* Lam.: implicazioni filogenetiche e biogeografiche

R. BELLAROSA, M.C. SIMEONE, B. SCHIRONE, S. FINESCHI, F. SEBASTIANI, G.G. VENDRAMIN e D. MAGRI

ABSTRACT - *Genetic variation in Quercus suber L., Q. cerris L. e Q. crenata Lam.: phylogenetic and biogeographic implications* - Phylogenetic relationships within *Q. suber* L., *Q. cerris* L. e *Q. crenata* Lam. were defined by means of nuclear ribosomal DNA sequences encoding the 5.8S RNA and the flanking internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2). The genetic variability of the Italian *Q. suber* populations was checked by means of nrITS and cpDNA PCR-RFLP. The haplotypes we found could not discriminate the three species, whereas the ITS variation provided a valid resolution. Finally the status of hybrid species of *Q. crenata* (*Q. cerris* x *Q. suber*) was confirmed.

Key words: cpDNA, ITSs, phylogeny and biogeography, *Q. cerris*, *Q. crenata*, *Q. suber*

INTRODUZIONE

Il genere *Quercus* comprende 350-500 specie presenti nelle foreste decidue delle zone temperate del Nord America, Europa, Asia e nella macchia mediterranea (KUBITZKI, 1993; NIXON, 1993). I numerosi studi, condotti sulla base dei caratteri morfologici (e.g. TRELEASE, 1924; CAMUS, 1936-1954; SCHWARZ, 1936-1939, 1964; NIXON, 1993), non hanno completamente chiarito la tassonomia di questo genere che appare tuttora incerta soprattutto per le variazioni morfologiche intraspecifiche dovute all'ibridazione (BURGER, 1975) e agli adattamenti ai cambiamenti ambientali. Un importante contributo alla comprensione della tassonomia e della filogenesi del genere *Quercus* è stato ottenuto impiegando i marcatori molecolari e tra questi, in particolare, va menzionato il DNA ribosomale che è stato per la prima volta utilizzato in uno studio delle querce italiane (BELLAROSA *et al.*, 1990) nell'ambito di una nostra collaborazione con il Prof. Fabio Maggini, al quale va il merito di averci avviato allo studio della caratterizzazione genetica delle specie forestali.

La sughera e il cerro, il cui prodotto di ibridazione è la crenata, sono tra le più rappresentative specie quercine italiane appartenenti al gruppo *Cerris* (i.e. Subgen. *Cerris*, SCHWARZ, 1936-1939; section *Cerris*, CAMUS, 1936-1954; subsection *Cerris*, NIXON, 1993) che annovera 20-40 specie prevalentemente diffuse in Eurasia e le cui relazioni tassonomiche sono ancora oggetto di discussione.

La sughera (*Quercus suber* L., *Fagaceae*) è una specie con distribuzione Mediterranea centro-occidentale:

dalla penisola iberica all'Italia tirrenica e lungo la fascia costiera Nordafricana. Attualmente il suo limite orientale è rappresentato da una sporadica presenza in Puglia, mentre numerose aree disgiunte sono presenti nelle maggiori isole del Mediterraneo, lungo la Costa Azzurra e nelle Lande Francesi. Il centro d'origine della specie è tuttora dibattuto essendo, per alcuni autori, nella penisola iberica (TOUMI, LUMARET, 1998) e per altri nell'area caucasica (BELLAROSA *et al.*, 2005).

Il cerro (*Quercus cerris* L.) ha una distribuzione decisamente più orientale: forma boschi nella penisola italiana, in Grecia e nei Balcani e si estende fino al Mar Nero. Ritrovamenti fossili sono concordi nello stabilire quest'ultima area come il più probabile centro di origine della specie (PALAMAREV, 1989). Inoltre, proprio il cerro è considerato la specie più antica dell'intera sezione *Cerris*, alla quale sughera e crenata appartengono (SCHWARZ, 1936-1939).

La crenata (*Quercus crenata* Lam.) (syn. *Q. pseudosuber* Santi), specie la cui natura ibrida tra sughera e cerro è stata confermata da analisi molecolari (BELLAROSA *et al.*, 1996, 2005), può rinvenirsi anche lontana dai popolamenti di sughera, con presenze sporadiche sugli Appennini, sulla costa Adriatica italiana e della Slovenia nonché in Istria. Pertanto, il territorio italiano si prefigura come l'unica area dove le tre specie sono contemporaneamente presenti.

In questa nota, riportiamo alcuni dei risultati, di prossima pubblicazione, ottenuti indagando con l'ausilio dei marcatori nucleari (ITS) e citoplasmatici

(PCR-RFLP) sulla biogeografia di alcune popolazioni italiane di quercia da sughero al fine di approfondire la conoscenza della struttura genetica della sughera in Italia tentando di chiarirne l'origine. Abbiamo ritenuto opportuno estendere le analisi anche alle altre due querce simpatriche, cerro e crenata, strettamente imparentate con la sughera, per meglio comprendere i rapporti co-evolutivi che le legano sul territorio italiano

MATERIALI E METODI

Campionamento ed estrazione del DNA

Come materiale vegetale sono stati usati germogli raccolti da tre-cinque individui per popolamento italiano di ciascuna delle tre specie oggetto dello studio. Solo per la sughera è stato analizzato anche materiale di origine straniera proveniente, per la quasi totalità, da piante cresciute nel campo sperimentale di Roccarespanpani (Viterbo) dove è presente una collezione di provenienze europee e nord-africane. Il DNA totale è stato estratto dalle foglie usando il DNeasy Plant minikit (QIAGEN).

Amplificazione dell'ITS ed analisi

Le regioni ITS sono state amplificate mediante PCR secondo il metodo descritto in BELLAROSA *et al.* (2005). I frammenti di amplificazione sono stati visualizzati tramite gel di agarosio all'1%, purificati mediante Nucleospin Extract (Macherey & Nagel) e sequenziati direttamente in entrambe le direzioni. I dati sono stati raccolti tramite il lettore automatico ABI Prism 310. Le sequenze ITS ottenute sono state controllate visivamente con il software CHROMAS 2.3 (www.technelysium.com.au) ed allineate, secondo diversi parametri, con il Sequence Analysis Software DNAMAN-1999 (Lynnon Biosoft). Le parti terminali delle regioni ribosomali trascritte ITS1 e ITS2, nonché del 5,8S, sono state determinate per confronto con le sequenze di numerose angiosperme già disponibili in GenBank (tra gli altri: MANOS *et al.*, 1999, BELLAROSA *et al.*, 2005).

Le relazioni sistematiche fra le tre specie quercine sono state definite avvalendosi delle sequenze di querce già prodotte dagli autori o disponibili in GenBank.

Analisi PCR-RFLP del cpDNA

Il DNA totale, estratto come sopra, è stato amplificato con 5 coppie di primers universali corrispondenti ai frammenti CD, DT, AS, TF, SR scelti tra quelli che avevano dato i risultati migliori per la sughera (JIMÉNEZ *et al.*, 2004). I frammenti di cpDNA amplificati sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione TaqI (CD, DT) e HinfI (AS, TF e SR) e separati su gel di poliacrilamide all'8%. I frammenti polimorfici sono stati evidenziati con la tecnica del "Silver staining" e la loro dimensione è stata valutata per confronto con "1 kb ladder" e "123 bp ladder". I polimorfismi riscontrati, basati sulla diffe-

renza nella dimensione delle bande e loro presenza/assenza, hanno permesso l'identificazione degli aplotipi. I parametri di diversità genetica inter- e intrapopolazioni (Gst e Nst, PETIT *et al.*, 2005) sono stati determinati con il software PERMUT mentre il dendrogramma filogenetico è stato ottenuto con l'analisi TCS.

RISULTATI

Analisi delle sequenze degli ITS

La gran parte dei popolamenti di sughera analizzati hanno mostrato sequenze degli ITS al 100% identiche negli individui campionati. Esclusivamente nei popolamenti di Brindisi sono state messe in evidenza due importanti inserzioni rispettivamente di 7 bp e di 1 bp condivise solo con alcuni individui di popolamenti stranieri di sughera (dati non riportati) e con quelli di cerro, coccifera e leccio. La dimensione assoluta della regione ITS1+5,8S+ITS2 (senza interruzioni) misurava da 584 bp a 592 bp e, precisamente, l'ITS1 da 214 bp a 221 bp, l'ITS2 da 207 a 208 bp e il 5,8S 163 bp. La gran parte delle variazioni nucleotidiche (indels) sono state riscontrate nell'ITS1. La struttura filogeografica delle provenienze italiane di sughera è riportata in Fig. 1 che mostra una più stretta relazione tra le sughere di provenienza ligure e sardo-corsa, da una parte, e quelle toско-laziali, dall'altra. Le provenienze brindisine si dispongono alla base del gruppo delle sughere in stretta associazione con le crenate di origine più meridionale mentre le crenate laziali e liguri si dispongono nel clado delle sughere più settentrionali. Tutte le provenienze di cerro si collocano alla base del gruppo delle sughere con le quali vanno a costituire il raggruppamento delle specie del subgen. *Cerris* in netta separazione da quelle del subgen. *Sclerophylloides*.

PCR-RFLP cpDNA

Tranne la coppia di primer DT che non ha prodotto alcun polimorfismo, tutte le altre riportate in Tab. 1 hanno evidenziato 3 bande polimorfiche che hanno dato origine a 5 gruppi di aplotipi. Dei 5 aplotipi, tre si rinvenivano nella parte centro-orientale dell'areale e, precisamente, l'aplotipo H3 è esclusivo della penisola italiana compresa la Sicilia; l'aplotipo H1 è condiviso dalle isole maggiori del Mediterraneo con la porzione più occidentale della Liguria e le popolazioni tunisine ed algerine; il terzo aplotipo H4 si riscontra esclusivamente nella stazione brindisina. I restanti due aplotipi (H2 e H5) sono presenti solo nelle popolazioni franco-iberico-marocchine (dati non mostrati). Alcune provenienze brindisine, al pari di quanto riscontrato con il marcatore ITS, posseggono un aplotipo che è esclusivo di questa area vegetazionale. L'intero areale della sughera, analizzato con i marcatori molecolari ITS e cpDNA PCR-RFLP, ha presentato una distribuzione biogeografia suddivisa essenzialmente in tre macro-aree: una orientale, una occidentale e una centrale. Questo risultato è stato

nord, da una parte, e quelle del centro-sud dall'altra. Ciò supporterebbe l'ipotesi sostenuta da CRISTOFOLINI, CREMA (2005), sulla base di analisi morfometriche, di una differenziazione tra le popolazioni dell'Italia del sud e della Sicilia da quelle del nord. D'altra parte, la presenza della crenata in aree orientali del Mediterraneo (Slovenia ed Istria), dove è assolutamente assente la sughera, e l'assoluta identità aplotipica riscontrata con il cpDNA PCR-RFLP delle popolazioni di cerro e di quelle di crenata con le popolazioni della sughera tirrenica danno maggiore consistenza all'ipotesi dell'origine orientale della sughera che troverebbe proprio nella crenata una testimonianza della sua antica presenza in aree più orientali rispetto al suo areale attuale.

Le analisi condotte sulla variabilità genetica delle popolazioni di sughera in Italia hanno messo in evidenza una strutturazione geografica della specie piuttosto ben definita con aplotipi che si localizzano in maniera esclusiva nella fascia atlantica, nel Mediterraneo occidentale, in quello centrale e nella sua parte orientale. In particolare gli aplotipi trovati in Italia sono strettamente imparentati e assenti dalle altre regioni dell'areale; l'Italia si presenta, pertanto, come la regione con la maggiore variabilità genetica. La strutturazione geografica della sughera così ben delimitata può essere dovuta sia ad eventi paleogeografici molto remoti, sia all'attività antropica che, da un lato, può aver diffuso principalmente genotipi migliori e, dall'altro, può aver ridotto la variabilità genetica originale attraverso ripetuti disboscamenti e, soprattutto, favorendo una rigenerazione vegetativa appesantita dagli effetti degli incendi assai diffusi e frequenti in tutto il bacino del Mediterraneo.

La separazione tra le popolazioni italiane del centro nord e del centro sud può essere interpretata come la conseguenza di ricolonizzazioni da rifugi glaciali separati.

Di particolare importanza per la sua esclusività è l'aplotipo pugliese che con le analisi dell'ITS risulta il più antico confermando il carattere atavico delle popolazioni di sughera brindisine caratterizzate da anomalie riproduttive ed associate ad una flora con caratteri relittuali che si è mantenuta per le caratteristiche ambientali della Puglia che ha rappresentato un "rifugio stabile" per numerose specie (cfr. SCHIRONE, SPADA, 1995, FINESCHI *et al.*, 2002).

Ringraziamenti – Si ringraziano tutti gli appassionati di querce che ci hanno fornito campioni da tutta Italia.

LETTERATURA CITATA

- BELLAROSA R., DELRE V., SCHIRONE B., MAGGINI F., 1990 - *Ribosomal RNA genes in Quercus spp.* (Fagaceae). *Pl. Syst. Evol.*, 172: 127-139.
- BELLAROSA R., SCHIRONE B., MAGGINI F., FINESCHI S., 1996 - *Inter- and intraspecific variation in three mediterranean oaks* (*Q. cerris*, *Q. suber*, *Q. crenata*). In: *Proc. Workshop Inter- and Intraspecific Variation in European Oaks: Evolutionary Implications and Practical Consequences*: 239-276. June 1994, Bruxelles. OV. Publ. European Communities, Luxem-

bourg: 15-16.

- BELLAROSA R., SIMEONE M.C., PAPINI A., SCHIRONE B., 2005 - *Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian Quercus spp.* *Mol. Phyl. Evol.*, 34: 355-370.
- BURGER W.C., 1975 - *The species concept in Quercus*. *Taxon*, 24: 45-50.
- CAMUS A., 1936-1954 - *Les Chenes. Monographie du genre Quercus and monographie du genre Lithocarpus*. *Encycl. Econ. Sylvic.*, Vol. VI, VII, VIII. Lechevalier, Paris.
- CRISTOFOLINI G., CREMA S., 2005 - *A morphometric study of the Quercus crenata species complex*. *Bot. Helv.*, 115: 155-167.
- FINESCHI S., TAURCHINI D., GROSSONI P., PETTIT R.J., VENDRAMIN G.G., 2002 - *Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy*. *For. Ecol. Manag.*, 156: 103-114.
- JIMENEZ P., DE HEREDIA U.L., COLLADA C., LORENZO Z., GIL L., 2004 - *High variability of chloroplast DNA in three Mediterranean evergreen oaks indicates complex evolutionary history*. *Heredity*, 93: 510-515.
- KUBITZKI K., 1993 - *The families and genera of vascular plants*. In: KUBITZKI K., ROHWER J.G., BITTRICH W., (Eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- KVACEK Z., WALTHER H., 1989 - *Paleobotanical studies in Fagaceae of the European Tertiary*. *Plant Syst. Evol.*, 162: 213-299.
- MANOS P.S., DOYLE J.J., NIXON K.C., 1999 - *Phylogeny, biogeography and processes of molecular differentiation in Quercus subgenus Quercus* (Fagaceae). *Mol. Phyl. Evol.*, 12: 333-349.
- NIXON K.C., 1993 - *Infrageneric classification of Quercus* (Fagaceae) *and typification of sectional names*. *Ann. Sci. Forest.*, 50 (Suppl. 1): 25-34.
- PALAMAREV E., 1989 - *Palaeobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora*. *Plant Syst. Evol.*, 162: 93-107.
- PETTIT R.J., DUMINIL J., FINESCHI S., HAMPE A., SALVINI D., VENDRAMIN G.G., 2005 - *Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations*. *Mol. Ecol.*, 14: 689-701.
- SAUVAGE C.H., 1961 - *Recherches géobotaniques sur les sub-écoles marocaines*. *Série Botanique b*, 21. I.S.C. Rabat.
- SCHIRONE B., SPADA F., 1995 - *Anomalies in reproductive phenology and vegetation history: the case of SE Italy*. *Coll. Phytosoc.*, 14: 847-857.
- , 2001 - *Some remarks on the conservation of genetic resources of Mediterranean oaks*. In: *Mediterranean Oaks. Network*, 1st Meeting, 12-14 October 2000, Antalya, Turkey, IPGRI, Rome: 21-26.
- SCHWARZ O., 1936-1939 - *Monographie der Eichen Europas, besonders des Mittelmeergebietes*. *Feddes Rep.*, Sonderbeih. D, 1-200.
- , 1964 - *Quercus L.*. In: TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MORRE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A. (Eds.), *Flora Europaea I*, 1st ed.: 72-76. Cambridge University Press, Cambridge.
- TOUMI L., LUMARET R., 2001 - *Allozyme characterisation of four Mediterranean evergreen oak species*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29: 799-817.
- TRELEASE W., 1924 - *The American oaks*. *Mem. Natl. Acad. Sci.*, 20: 1-255.

RIASSUNTO – In questa nota vengono presentati i dati relativi alla variabilità genetica nel complesso *Q. suber* L., *Q. cerris* L. e *Q. crenata* Lam. ottenuti con l'uso delle

sequenze ITS del DNA ribosomale e con i marcatori PCR-RFLP applicati al DNA cloroplastico (cpDNA). Gli aplotipi trovati hanno fornito una notevole differenziazione dei popolamenti di sughera, ma non sono stati in grado

di discriminare le tre specie quercine. Al contrario, la variazione dell'ITS ha consentito una buona risoluzione, permettendo anche di confermare lo status di ibrispecie di *Q. crenata* (*Q. cerris* x *Q. suber*).

AUTORI

Rosanna Bellarosa, Marco Cosimo Simeone, Bartolomeo Schirone, Dipartimento di tecnologie, ingegneria e scienze dell'Ambiente e delle Foreste (D.A.F.), Università della Tuscia, Via S. Camillo de' Lellis, 01100 Viterbo

Silvia Fineschi, CNR, Istituto di Protezione delle Piante, Via Madonna del Piano, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze)

Sebastiani Francesco, Donatella Magri, Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Firenze, Via Madonna del Piano, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze)

Giovanni Vendramin, CNR, Istituto di Genetica Vegetale, Via Madonna del Piano, 50019 Sesto Fiorentino (Firenze)

Alcune centauree endemiche della flora d'Italia: analisi filogenetica mediante le sequenze ITS ed ETS dell'rDNA nucleare

G. TUCCI, B. TROMBETTA, R.I. DE DOMINICIS, C. GREGORI e M.O. WINFIELD

ABSTRACT - *Phylogenetic analysis of some endemic Centaurea of the Italian flora by using ITS and ETS sequences* -The extensive morphological and karyological diversity and the pollen heteromorphism make the taxonomy of the genus *Centaurea* highly controversial. In this study, we examine some Italian endemic species of this genus and use the alignment of nuclear rDNA ITS and ETS orthologous sequences to construct phylogenetic trees by Neighbor-Joining method. We discuss the congruence of our results with the taxonomic prospect of *Centaurea* in "Flora d'Italia" of S. Pignatti.

Key words: *Centaurea*, ITS and ETS region, phylogenetic trees, Taxonomy

INTRODUZIONE

Il genere *Centaurea* L. (tribù: *Cardueae*) è considerato, tassonomicamente, uno dei più critici nell'ambito delle *Asteraceae*. Esso comprende specie di variabilità morfologica talmente estesa e complessa da rendere problematica l'individuazione della discontinuità tra i *taxa*, sia a livello specifico che intraspecifico. A seconda delle classificazioni, il genere *Centaurea* comprende da 400 a 700 specie distribuite prevalentemente nell'emisfero boreale (BREMER, 1994).

La sua complessità tassonomica deriva non solo dalla grande variabilità dei parametri morfologici o dei diversi tipi di polline, ma anche dalla variabilità dei numeri cromosomici di base che mostrano frequenza di assetti disploidi.

PIGNATTI (1982) annovera, nella flora italiana, più di 60 specie, costituenti un gruppo da lui ritenuto polifiletico, in cui è difficile chiarire le relazioni evolutive tra le specie, ragione per cui il gruppo stesso varia secondo le differenti flore, e dove l'assegnazione dei ranghi tassonomici è, a volte, del tutto ipotetica.

Nel presente lavoro vengono utilizzate, per ciascuna specie studiata, le sequenze di due regioni diverse dell'rDNA nucleare, la regione ITS e quella ETS. Queste regioni, come è noto, posseggono ciascuna una variabilità utile per inferenze filetiche a basso livello tassonomico (HAMBY, ZIMMER, 1992; BENA *et al.*, 1998). Lo scopo raggiunto, è stato quello di ricavare, dall'allineamento di sequenze ortologhe, non solo alberi filogenetici che permettessero di saggiare la validità della collocazione di alcune specie endemiche nei vari raggruppamenti tassonomici delineati in letteratura, ma anche, più in generale, la validità

cladistica dei gruppi stessi in cui è stato suddiviso il genere nella flora italiana.

MATERIALI E METODI

In questo studio preliminare, che ha come base la Flora d'Italia (PIGNATTI, 1982), il nostro approccio molecolare inizia dalle seguenti entità endemiche afferenti al complesso di *C. cineraria*:

C. cineraria L.;

C. leucadea Lacaïta ritenuta, da Pignatti, "nexum mirabile" tra *C. cineraria* L. e *C. diomedea* Gasparr. (presa qui in considerazione, ma riferita al gruppo *deusta*);

C. busambarensis Guss.;

C. ucrae Lacaïta.;

C. circae L.;

C. veneris (Somm.) Beg.;

C. gymnocarpa Moris et De Not.;

C. aeolica Guss.;

A queste specie abbiamo aggiunto *C. aplolepa* Moretti, per le possibili implicazioni con il gruppo *Cineraria*.

Le nostre indagini sono state condotte in parte su materiale fresco raccolto in diverse località del paese e in parte su frammenti di *exsiccata* gentilmente forniti dal Dipartimento di Scienze Botaniche dell'Università di Pisa.

L'estrazione del DNA nucleare è stata eseguita secondo il metodo di ROGERS, BENDICH (1994). La regione ITS è stata amplificata tramite PCR a partire dal DNA nucleare, utilizzando i primer di WHITE (WHITE *et al.*, 1990). I primer utilizzati per l'amplificazione di una parte della regione ETS sono stati

ricavati, invece, da una sequenza dello spaziatore intergenico (IGS) di *Cynara cardunculus* (TUCCI *et al.*, 1994). I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati secondo SANGER (1977).

Per costruire gli alberi filogenetici è stato usato il metodo Neighbor-Joining (NJ), basato su un algoritmo che è ritenuto di grande affidabilità in studi di filogenesi (DURBIN *et al.*, 1988).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Gli alberi filogenetici ottenuti sono quelli rappresentati in Fig. 1.

Dallo studio dei tre alberi e dal loro confronto, si evince che quelli basati sulle sequenze dell'ITS1 e dell'ITS2 non sono ben risolti, e ciò è probabilmen-

te dovuto alla presenza di un elevato tasso di ibridazione tra le entità studiate, accompagnato da una evoluzione concertata coinvolgente l'intero genere, che non permette di avere, a livello di queste sequenze ed in questo caso, differenze tali da riuscire ad essere validi indicatori filogenetici. La regione ETS, pur non essendo immune da questo fenomeno di appiattimento, presenta una maggiore variabilità e possiede una migliore capacità di descrivere alcuni termini della storia evolutiva del gruppo.

Risulta così evidente che i 4 gruppi sovraspecifici basati sulla tipologia della squama e indicati da PIGNATTI come A, B, C, D, essendo polifiletici non hanno valore cladistico e quindi non possono essere considerati come autentici ranghi tassonomici.

In questo contesto, il gruppo di *C. jacea* (*sensu*

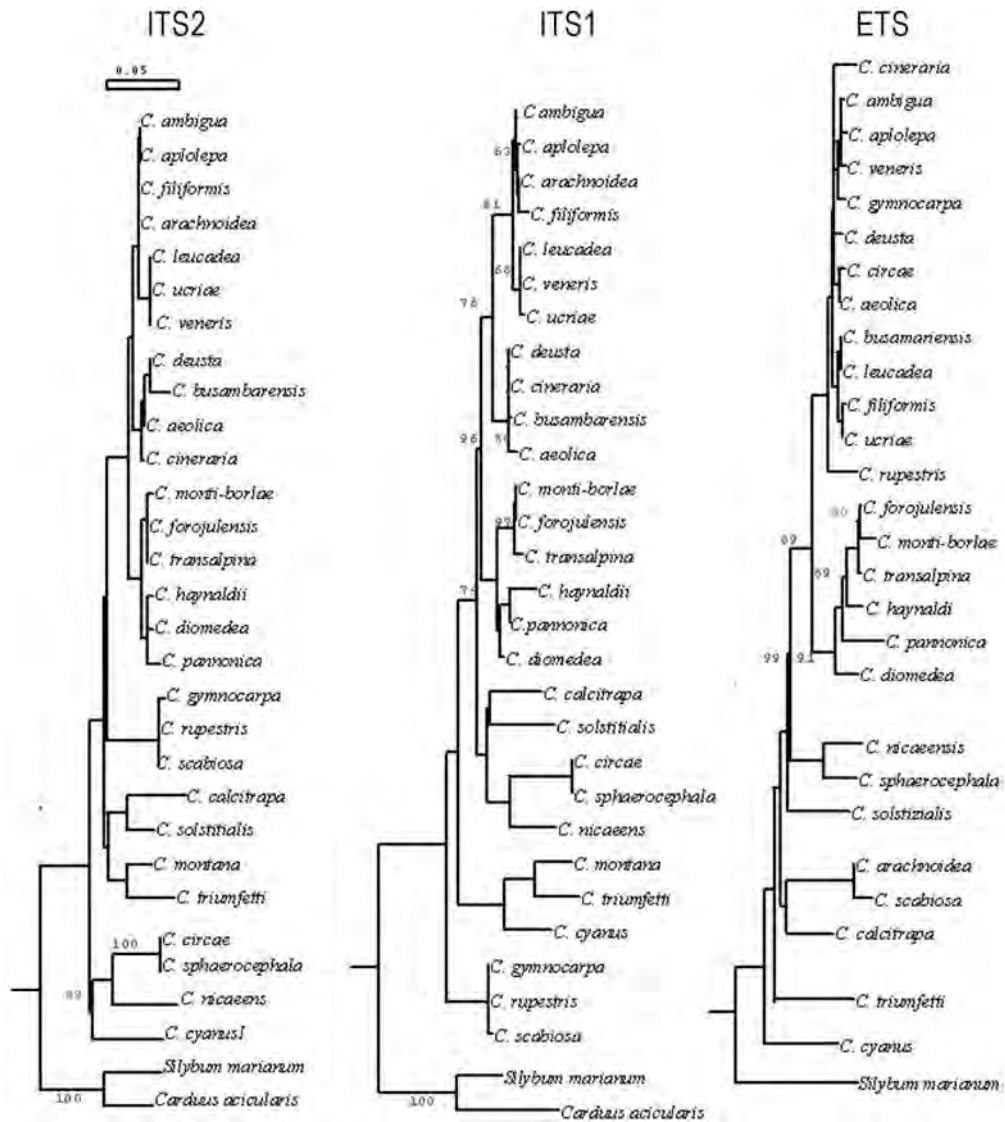


Fig. 1

Alberi filogenetici basati rispettivamente sull'allineamento delle sequenze delle regioni ITS1, ITS2 ed ETS dell'rDNA nucleare. Gli alberi sono stati costruiti con il metodo del Neighbor-Joining.

Phylogenetic trees obtained based on the alignment of the sequences ITS1, ITS2 and ETS rDNA regions. The trees have been constructed with the method of the Neighbor-Joining.

PIGNATTI) appare monofiletico, ma i suoi limiti dovrebbero allargarsi ad includere *C. monti-borlae* e probabilmente anche *C. diomedea* (attribuita attualmente al gruppo *deusta*) la cui posizione necessita di essere meglio risolta.

Il gruppo di *C. deusta*, secondo le nostre indagini dovrebbe essere scomposto, dato che le due entità analizzate (*C. deusta* e *C. diomedea*) sono molto distanti tra loro.

Il gruppo *Triumfetti* invece risulta essere un clado monofiletico in buon accordo con i dati morfologici. *C. arachnoidea* sembra che non sia possibile considerarla come sottospecie di *C. rupestris*, bensì un'entità distinta, che potrebbe essere elevata al rango di specie. Le relazioni di questo *taxon* con *C. rupestris* andrebbero, comunque, indagate più estesamente.

I dati riferibili all'ETS sembrano maggiormente congrui con quelli morfologici. Risulta evidente come *C. cyanus* si separi precocemente dalle altre entità convalidando così il fatto che essa è stata recentemente elevata al rango di genere (genere *Cyanus*) (CONTI *et al.*, 2005).

Il gruppo di *C. cineraria* (*sensu* PIGNATTI) risulta essere polifiletico e per avere una valenza cladistica dovrebbe comprendere anche altre specie come: *C. ambigua*, *C. aplolepa*, *C. deusta* e *C. filiformis* (la posizione di quest'ultima necessita, però, di ulteriori indagini).

Gli alberi filogenetici da noi elaborati suggeriscono, infine, che le due sottospecie *C. circae* e *C. ucriae* siano da considerare entità indipendenti, appartenenti comunque al gruppo di *C. cineraria*, mentre *C. gymnocarpa* sembra staccarsene più di quanto ritenuto finora.

C. aplolepa e *C. aeolica* appaiono come due entità nettamente distinte, senza rapporti stretti di parentela.

Da questi risultati preliminari, risulta evidente la necessità di estendere le indagini, integrando i classici dati morfologici, cariologici, palinologici e biogeografici con quelli molecolari, i quali suggeriscono, con forza, una revisione del genere con relative conseguenze anche di carattere nomenclaturale.

Ringraziamenti – Si ringrazia sentitamente la Prof. Lucia Viegi per i materiali forniti e per aver agevolato il nostro lavoro.

LETTERATURA CITATA

- BENA G., JUBIER M.F., OLIVIERI I., LEJEUNE B., 1998 - *Ribosomal external and internal transcribed spacers: Combined used in the phylogenetic analysis of Medicago* (Leguminosae). *J. Mol. Evol.*, 46: 299-306.
- BREMER K., 1994 - *Asteraceae cladistic & classification*. Timber press, Portland, Oregon.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C., 2005 - *An annotated Checklist of the Italian vascular flora*. Palombi e Partner ed., Roma.
- DURBIN R., EDDY S., KROGH A., MITCHISON G., 1998 - *Biological sequence analysis*. Cambridge University Press.
- HAMBY R.K., ZIMMER E.A., 1992 - *Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics*. In: SOLTIS P.S., SOLTIS J.E., DOYLE J.J. (Eds.), *Molecular systematics of plants*: 50-91. Chapman and Hall, New York.
- PIGNATTI S., 1982 - *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- ROGERS S.O., BENDICH A.J., 1994 - *Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi*. *Plant Mol. Biol. Manual*. D1: 1-8.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R., 1977 - *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- TUCCI G.F., SIMEONE M.C., GREGORI C., MAGGINI F., 1994 - *Intergenic spacers of rRNA genes in three species of the Cynareae* (Asteraceae). *Plant Syst. Evol.*, 190: 187-193.
- WHITE T.J., BURNS T., LEE S., TAYLOR J., 1990 - *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: INNIS M. A., GELFAND D. H., SNINSKY J., WHITE T. J. (Eds.), *PCR protocols*: 315-322. Academic Press, New York.

RIASSUNTO – L'ampia diversità morfologica e cariologica e l'eteromorfismo del polline rendono la tassonomia del genere *Centaurea* altamente controversa. In questo studio sono state esaminate alcune specie endemiche italiane di questo genere e, attraverso l'allineamento di sequenze ortologhe ITS e EST dell'rDNA nucleare, sono stati ottenuti degli alberi filogenetici. L'interpretazione degli alberi ottenuti permette di valutare in modo critico la congruenza dei nostri dati con le informazioni ricavate nell'ambito del progetto *Centaurea* descritto in "Flora d'Italia" di S. Pignatti.

AUTORI

Gianfranco Tucci, Carlo Gregari, Dipartimento D.A.B.A.C., Università della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo
Raffaele Ilio De Dominicis, Beniamino Trombetta, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Roma "La Sapienza", P.le A. Moro, 00185 Roma

Mark Owen Winfield, Functional Genomics Group, OB120 School of Biological Sciences, University of Bristol, Woodland Road Bristol BS8 1UG, United Kingdom

Lo spaziatore intergenico dei geni ribosomali in *Olea europaea*

F. MAGGINI[†], M.T. GELATI, M. SPOLVERINI e M. FREDIANI

ABSTRACT - *The intergenic spacer of ribosomal genes in Olea europaea* - The intergenic spacer (IGS) region of rDNA in *Olea europaea* is 5629 bp long and it can be subdivided into several regions (A-F), two of which, located upstream and downstream of the putative transcription initiation site (TIS) respectively, contain prominent and unrelated subrepeats. The upstream subrepeats (region B) are 75-86 bp in length and the downstream ones (region E) are about 160 bp in length. The first type shares a mutual similarity of 82.5 % and is represented by an unusually high number (36) of iterations. In the central part of the spacer region, an AT-rich sequence (region C) is present, preceding the TIS. In *Olea* a single sequence (TATTATAGGGGG) is found which fits the reported TIS of plants and the position +1 would correspond to the adenine at position 3622 after the end of 25S rDNA.

Key words: intergenic spacer, *Olea*, ribosomal genes

INTRODUZIONE

Negli Eucarioti i geni per gli RNA ribosomali sono disposti in lunghe serie di ripetizioni in tandem ed ognuna di queste ripetizioni consiste di singole regioni codificanti rispettivamente per 18S, 5.8S e 25S rRNA, separate da segmenti spaziatori interni (tra 18S e 5.8S è presente lo Spaziatore Interno Trascritto 1, o ITS1, e tra 5.8S e 25S è presente lo Spaziatore Interno Trascritto 2, o ITS2) e fiancheggiate da uno spaziatore intergenico (IGS) che va dalla estremità 3' del 25S di una unità di ripetizione fino alla estremità 5' del 18S dell'unità successiva.

Mentre le sequenze codificanti per 18S, 5.8S e 25S rRNA sono altamente conservate, altre parti dei geni ribosomali, quali ITS e IGS sono molto più variabili e per questo motivo negli ultimi anni sono state ampiamente usate come marcatori molecolari in studi di filogenesi (BALDWIN *et al.*, 1995; LINDER *et al.*, 2000). Per quanto riguarda più specificamente l'IGS è comunque importante sottolineare il fatto che esso è criticamente importante per la regolazione del metabolismo dell'rRNA.

In questo lavoro presentiamo ed analizziamo la sequenza nucleotidica dell'IGS di una pianta di notevole interesse agrario, tipica del bacino mediterraneo, quale *Olea europaea* L.

MATERIALI E METODI

Estrazione del DNA, digestione con enzimi di restrizione ed ibridazione

Il DNA è stato estratto da foglie di *Olea europaea* cv.

Dolce Agogia, secondo ANGIOLILLO *et al.* (1999). Digestioni con enzimi di restrizione, elettroforesi ed ibridazione sono state condotte in accordo con quanto precedentemente pubblicato (MAGGINI, BALDASSINI, 1995). Frammenti subclonati contenenti o 18S o 25S rDNA di *Populus deltoides* (D'OIDIO *et al.*, 1991) sono stati utilizzati in esperimenti di ibridazione per costruire le mappe di restrizione, dopo essere stati marcati con digossigenina-11- dUTP (Roche) con un random primed DNA labelling kit (Promega).

Preparazione di una libreria genomica e selezione di cloni

Il DNA genomico è stato parzialmente digerito con Sau3AI (Roche) e clonato in vettori Lambda GEM 12 (Promega), come descritto in MAGGINI, BALDASSINI (1995). La libreria genomica è stata amplificata e piastrata ed i cloni sono stati identificati mediante "plaque hybridization" con le sonde precedentemente descritte. I cloni positivi sono stati isolati e il loro DNA, estratto secondo MANIATIS *et al.* (1982), è stato digerito con vari enzimi di restrizione ed analizzato mediante Southern blotting. I frammenti idonei sono stati inseriti in plasmidi pUC18 BamHI/Bap. I plasmidi ricombinanti sono stati analizzati mediante digestioni singole e doppie con vari enzimi di restrizione.

DNA sequencing

Il DNA dei vari cloni è stato sequenziato con il

sequenziatore automatico ABI Prism 310 (Applied Biosystems). L'analisi delle sequenze è stata effettuata mediante il software DNAMAN (Lynnon Biosoft).

RISULTATI E DISCUSSIONE

La sequenza nucleotidica dell'IGS di *Olea europaea* è depositata in EMBL con il numero di accessione AJ865673.

L'IGS di *Olea* ha una lunghezza di 5629 bp con un contenuto in GC pari al 59,1%. Nella Fig. 1 vengono riportate la mappa di restrizione dei geni ribosomali di *Olea europaea*, ricavata dalle digestioni singole e doppie con gli enzimi di restrizione EcoRI, BamHI e SacI e la mappa di restrizione dell'IGS.

Nella successiva esposizione, per maggiore chiarezza, l'intera regione IGS viene suddivisa in 6 porzioni (A-F) in base alle diverse caratteristiche strutturali e funzionali. La regione A (393 bp, 48.1% GC), contigua all'estremità 3' del 25S, inizia, analogamente a quanto verificato in molti organismi vegetali (HEMLEBEN, ZENTGRAF, 1994 e relativa bibliografia), con una serie di pirimidine, 12 in *Olea* e precisamente CCTCCCCCTTCC. La regione A è priva di ripetizioni e non presenta omologie con altre sequenze presenti in Genbank. Il tratto successivo (regione B) è lungo 2743 bp, ha un contenuto in GC pari al 62.2% ed è caratterizzato da una serie di ripetizioni in tandem di una stessa sequenza di 75-86bp. L'omologia tra i subrepeats è molto alta (82.5%) e la maggior parte di essi rappresenta la variante più corta, mentre i 7 subrepeats di 86bp presentano una inserzione di 11 bp pressoché identica (Fig. 2).

La presenza di subrepeats a monte, così come vedremo anche a valle del TIS, è una costante dell'IGS, ma

in *Olea* il loro numero è eccezionalmente alto (36) e notevole è anche l'omogeneità riscontrata tra le varie ripetizioni. Sul significato di questi motivi ripetuti, ubiquitari sia nell'IGS dei vegetali che degli animali ma estremamente variabili nella loro sequenza ed organizzazione, ancora non vi è accordo tra i ricercatori. Nelle piante, in analogia con quanto visto su organismi vegetali, è stato suggerito che essi abbiano funzione di stimolo sulla trascrizione dell'rDNA (FLAVELL, 1986; MAGGINI *et al.*, 1992; HEMLEBEN, ZENTGRAF, 1994; e relativa bibliografia).

Il tratto successivo di 492 bp (regione C) è invece privo di ripetizioni, ad alto contenuto in AT (62.6%) e contiene il sito di inizio della trascrizione (TIS). Il TIS per la RNA polimerasi I nell'IGS di *Olea* è stato identificato in base alla omologia con il TIS determinato sperimentalmente in alcune leguminose (GERNSTER *et al.*, 1988; KATO *et al.*, 1990; UEKI *et al.*, 1992). Questa regione, caratterizzata da motivi TATA e GGGG, appare molto ben conservata nelle piante (HEMLEBEN, ZENTGRAF, 1994) e la posizione +1, determinata sperimentalmente, corrisponde al residuo A prima della serie di G e nel caso di *Olea* corrisponde quindi alla posizione 3622 dopo l'estremità 3' del 25S. Nell'IGS di *Olea* è presente una sola sequenza (TATTATAGGGGGG) riferibile al TIS. La regione successiva D (187 bp, 65.3% GC) non presenta ripetizioni. La regione E (608 bp, 62.9% GC) presenta invece 4 ripetizioni di una stessa sequenza di 159-162 bp che non ha omologia con i subrepeats presenti a monte del TIS né con altre sequenze presenti in GenBank (Fig. 3).

La regione F (1206bp, 62.9% GC) adiacente alla estremità 5' del gene 18S della successiva unità esibisce una omologia del 78.07% con sequenze parziali

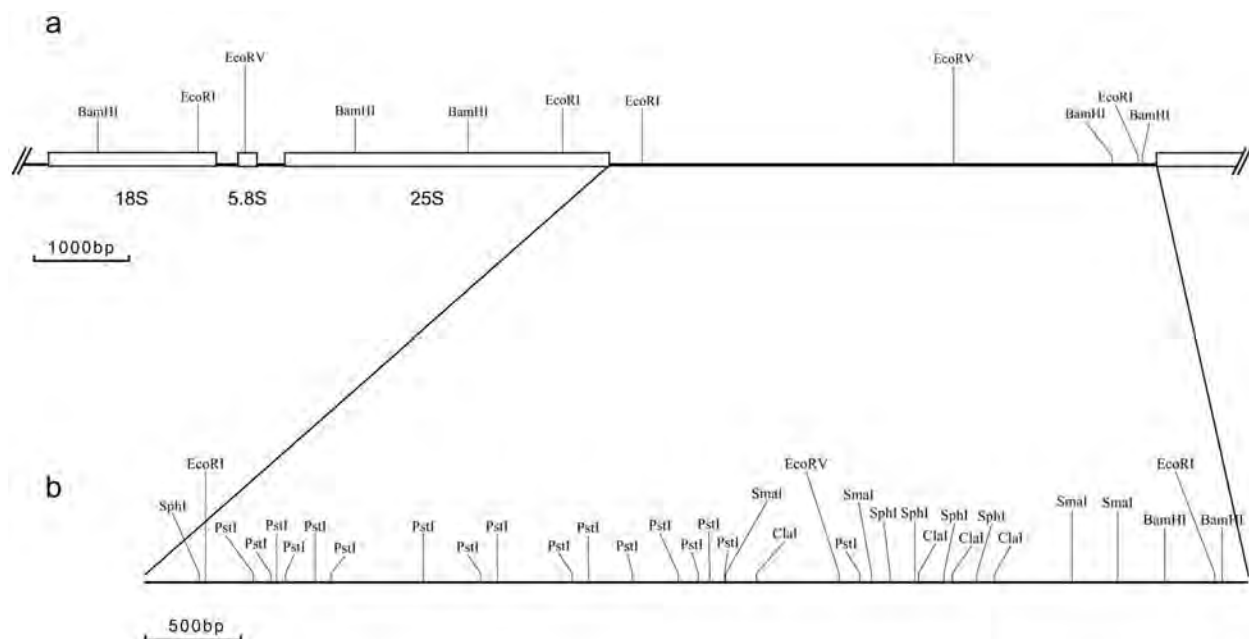


Fig. 1

I geni ribosomali di *Olea*. A. Organizzazione delle unità di ripetizione; B. Mappa di restrizione della regione IGS. The *Olea* ribosomal genes: A. General organization of the rDNA units; B. Restriction map of the IGS region.

B6	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B1	AGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B2	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAAGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACAAAGGCC	75
B3	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGTCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B4	TGCACACCGTACACAGAAACT	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCA	86
B5	TGTCCTGCAG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGAACATGGCC	77
B12	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B7	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGTCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B8	TGCACACCGTGCACAGAAACT	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	86
B9	TGCACTCGG	TGCCCAGAATTGCCTAAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B10	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAAGCTGCGTCCCTACGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B11	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B18	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGACGCGTCCCTGCAGTGGTCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B13	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATAAGGTTGCGTCCCTGCGGTGGTCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B14	TGCACACCGTGCCAGAAACT	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	86
B15	TGCACTCGG	TGCCCAGAATTGCCTAAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B16	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAAGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B17	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B24	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATTAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B19	TGCACACCGTGCACAGAAACT	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	86
B20	TGCACTCGG	TGCCCAGAATTGCCTAAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B21	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAAGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B22	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B23	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATAAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGTCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B30	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B25	TGCACACCGTGCACAGAAACT	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	86
B26	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCGGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B27	TGCACATGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATAAGGTTGCGTCCCTGCGGTGGTCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B28	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATTAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B29	TGCACACCGTGCACAGAAACT	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAAGCTGCGTCCCTGCAATGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	86
B35	TGCACACAG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATGAGGCTGCGTCCCTGCGCGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B31	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATTAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B32	TGCACACCGTGCACAGAAACT	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	86
B33	TGCACACGG	TGCCCAGAATTGCCTGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
B34	AGCACACGG	TGCCCAGAATTGCATGAAAATCAGGCTGCGTCCCTGCAGTGGCCAGGACGCGTCCCGGACATGGCC	75
C.s	tgCacacgG	TGCCCAgAAtTGCcTgAAAATcagGctGcGtCCCTgCagtggcCagGACgcTCCcggACAtGGCc	

Fig. 2

Allineamento delle ripetizioni presenti nella regione B e Sequenza Consenso (C.s.).
Alignment of repeats from region B and Consensus Sequence (C.s.).

E4	GGACGGAGGGCATGCGTGGGGAC . . GAAACCGCGCGCGTGTGCGTGCATTTGGCCTAGGCATAAGACGCACGCTGCAACGCA	80
E1	GGACGGAACGCATGCGTGGGCAC . . GAAATCGCGTTGCGCGTCGAGAGAT . GGCTCGGATTTCCCGCAATTGCCTATTTC	79
E2	GGACGGAGGGCATGCGCGGGGGCAAGAAACCGCGCGACGTGTCGATCGATTGGCCTAGGCATAAGACGCACGTTGCAACGTA	82
E3	GGACGGAGGGCATGCGTGGGGAC . . GAAACCGCGCGCGTGTGCGATCGATTGGCCTAGGCATAAGACGCACGCTGCAACGTA	80
C. s	GGACGGAggGCATGCGtGGGgaC GAAAcCGCGcggCGtGTCGatcGATtGGCCTaGGcaTaagacGCacgttgCaAcgta	
E4	GCTCTCGGAATGCACTCCTTCCGATCGGGTTGCCTAAAAATCGATCGAAGCTCGTGCCTTGATCCCGCGTTGCCTTTGGA .	162
E1	GGTCCAGAAACGGAGTAAAGACCCGACAAGAGTGGGAGGAACAATCC	126
E2	GTGCTCGCAACTTCCCAATGTCGATCGGTTGGTACGAAATTTCCCGAATCGAGACCGTGTGAGGCACAACGAT . . . GCA	161
E3	GTCCCCGTAACCTTCCCAACGTCGATCGGGAGGCGCGAAATCGTTTCGAAACGAGACCGTCGAAAGGCACGACGAT . . . GCA	159
C. s	GttC cGcaAct cccaagtCCqatCqqa qqcqc aaA qt cc	

Fig. 3

Allineamento delle ripetizioni presenti nella regione E e Sequenza Consenso (C.s.).
Alignment of repeats from region E and Consensus Sequence (C.s.).

di ETS di altre *Oleaceae* presenti in GenBank. Motivi metilabili CCGG e GCGC, 46 e 17 rispettivamente, sono presenti in alto numero nello IGS di *Olea* e la loro distribuzione interessa differenzialmente, sia a livello quantitativo che qualitativo, le varie regioni dell'IGS.

LETTERATURA CITATA

ANGIOLILLO A., MENCUCINI M., BALDONI L., 1999 - *Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms*. Theor. Appl. Gen., 98: 411-421.
BALDWIN B.G., SANDERSON M.J., PORTER J.M., WOJCIECHOWSKI M.F., CAMPBELL C.S., DONOGHUE M.J., 1995 - *The ITS region of nuclear ribosomal DNA:*

- a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny.* Ann. Miss. Bot. Gard., 82: 247-277.
- D'OVIDIO R., SCARASCIA MUGNOZZA G., TANZARELLA O.A., 1991 - *rDNA cloning and rapid hybrid identification in Populus deltoides spp.* (Salicaceae). Plant Syst. Evol., 177: 165-174.
- FLAVELL R.B., 1986 - *The structure and control of expression of ribosomal RNA genes.* Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol., 3: 252-274.
- GERNSTER J., SCHIEBEL K., VON WALDBURG G., HEMLEBEN V., 1988 - *Complex organization of the length heterogeneous 5' external spacer of mung bean (Vigna radiata) ribosomal DNA.* Genome, 30: 723-733.
- HEMLEBEN V., ZENTGRAF U., 1994 - *Structural organization and regulation of transcription by RNA polymerase I of plant nuclear ribosomal RNA genes.* In: NOVER L. (Ed.), *Results and problems in cell differentiation 20: Plant promoters and transcription factors*: 3-24. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg.
- KATO A., NAKAJIMA T., YAMASHITA J., YAKURA K., TANIFUJI S., 1990 - *The structure of the large spacer region of rDNA in Vicia faba and Pisum sativum.* Plant Mol. Biol., 14: 983-993.
- LINDER C.R., GOERTZEN L.R., HEUVEL B.V., FRANCISCO-ORTEGA J., JANSEN R.K., 2000 - *The complete external transcribed spacers of 18S-26S rDNA: amplification and phylogenetic utility at low taxonomic levels in Asteraceae and closely allied families.* Mol. Phyl. Evol., 14: 285-303.
- MAGGINI F., BALDASSINI S., 1995 - *Ribosomal RNA genes in the genus Pinus.* I. Caryologia, 48: 17-25.
- MAGGINI F., TUCCI G.F., DEMARTIS A., GELATI M.T., AVANZI S., 1992 - *Ribosomal RNA genes of Phaseolus coccineus.* I. Plant Mol. Biol., 18: 1073-1082.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J., 1982 - *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY.
- UEKI M., UCHIZAWA E., YAKURA K., 1992 - *The nucleotide sequence of the rDNA intergenic spacer region in a wild species of the genus Vicia, Vicia angustifolia.* Plant Mol. Biol., 18: 175-178.
- RIASSUNTO – Lo spaziatore intergenico dei geni ribosomali di *Olea europaea* ha una lunghezza di 5629 bp ed è articolato in diverse regioni (A-F) che presentano caratteristiche strutturali e funzionali diverse. Due di queste regioni sono caratterizzate dalla presenza di ripetizioni. In particolare quelle localizzate prima del TIS, la cui lunghezza varia da 75 a 86 bp, sono in numero eccezionalmente alto (36) ed evidenziano un elevato grado di omologia (82,5 %). In *Olea* una sola sequenza TIS (TATTATAGGGGGG) è presente ed è preceduta da un tratto ricco in AT. La posizione +1 corrisponde alla adenina in posizione 3622 dalla estremità 3' del 25S rDNA.

AUTORI

Fabio Maggini*, Maria Teresa Gelati, Michela Spolverini, Manuela Frediani, Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis s.n.c., 01100 Viterbo

Studi biosistemati nel genere *Gagea* Salisb. (*Liliaceae*): recenti acquisizioni e problemi ancora aperti

L. PERUZZI

ABSTRACT - *Biosystematic studies in the genus Gagea Salisb. (Liliaceae): recent acquisitions and still opened problems* - A survey of the state of the art in the study of the genus *Gagea*, with particular reference to Italy, is presented. In that area, 6 *Gagea* sections and 23 species are presently known, 3 of them (all within sect. *Didymobulbos*) falling into "species aggregates" which require further study. Finally, *G. lojaconoi* Peruzzi *nom. nov.* is proposed, in substitution of *G. longifolia* Lojac. *nom. illeg. non Gand.*

Key words: flora, *Gagea*, Italy, Liliaceae, taxonomy

Già da diversi anni sono in corso indagini mirate all'approfondimento delle conoscenze biosistematiche sul genere *Gagea* Salisb. in Italia (PERUZZI, TISON, 2004a).

Sono stati finora effettuati studi circa la cariologia (PERUZZI, 2003, 2006a; PERUZZI, AQUARO, 2005), distribuzione geografica (PERUZZI, 2004, 2005; PERUZZI, GARGANO, 2005; BARTOLUCCI, PERUZZI, 2006), biologia della riproduzione (CAPARELLI *et al.*, 2006; GARGANO *et al.*, 2007; L. Peruzzi, D. Gargano, in prep.), nomenclatura (PERUZZI, TISON, 2004b, 2005) e problematiche filogenetiche su base morfologica (PERUZZI, 2006b, c).

PERUZZI, TISON (2004a) riportavano per l'Italia tredici specie (due delle quali aggregate, che univano provvisoriamente svariati *taxa*) raggruppate in sei sezioni.

Più recentemente, TISON (2004a) ha descritto per le Alpi e l'Appennino meridionale *G. polidorii* J.-M. Tison, specie esaploide a $2n = 72$ cromosomi (PERUZZI, AQUARO, 2005) di possibile origine ibridogena, morfologicamente intermedia tra *G. villosa* (M. Bieb.) Sweet ($2n = 48$) e *G. fragifera* (Vill.) Ehr. Bayer & G. López ($2n = 84$).

Oltre a ciò, sono stati rinvenuti nell'Italia Centrale (Abruzzo e Lazio) popolamenti riferibili a *G. luberonensis* J.-M. Tison, altra entità di possibile origine ibridogena, morfologicamente intermedia tra *G. granatellii* (Parl.) Parl./*G. dubia* A. Terracc. e *G. bohemica* (Zauschn.) Schult. & Schult. f. Tale specie era conosciuta precedentemente solo per Spagna, Francia e Creta (PERUZZI, BARTOLUCCI, 2006). Di rilievo anche il fatto che in Italia centrale, dove sono presenti tutte e tre le specie ritenute più affini, queste ultime risultano tutte tetraploidi ($2n = 48$), mentre *G. luberonensis* risulta triploide ($2n = 36$) lascian-

do supporre che, se un evento di ibridogenesi vi sia stato, questo debba essere necessariamente avvenuto in un altro luogo.

Le popolazioni dell'Italia Centrale (Toscana e Lazio) precedentemente riferite a *G. pusilla* (F. W. Schmidt) Sweet, nonostante condividano con essa l'assetto primitivo diploide $2n = 24$, sono risultate ben caratterizzabili su base morfologica, ontogenetica, ecologica e fitogeografica e quindi descritte come una specie nuova per la scienza (PERUZZI *et al.*, 2007).

Importanti aggiornamenti floristici riguardano *G. reverchonii* Degen, segnalata genericamente in passato per le Alpi Marittime, ma che probabilmente non cresce in territorio Italiano (S. Peccenini, com. pers.) anche se recentemente è stata rinvenuta in territorio francese a soli 8 Km dal confine con l'Italia (J.M. Tison, com. pers.).

Di notevole rilievo è pure la conferma della presenza allo stato spontaneo nel Nord Italia della microterma *G. spathacea* (Hayne) Salisb., recentemente scoperta nell'Appennino Modenese (DELFINI *et al.*, 2005), così come la conferma della presenza in Sicilia, in diverse località, della macroterma *G. trinervia* (Viv.) Greuter (GALESI *et al.*, 2005). In particolare per quest'ultima specie, durante quest'anno è stato possibile raccogliere materiale vivo per studi ontogenetici, morfo-anatomici e cariologici (L. Peruzzi, in prep.) che contribuiranno alla comprensione delle sue relazioni tassonomiche con la presunta affine *G. graeca* (L.) Irmisch (GREUTER, 1970).

Di grande importanza fitogeografica anche il rinvenimento in territorio Italiano di *G. peduncularis* (J. & C. Pres.) Pasch., specie tipica del Mediterraneo orientale, che sarà a breve oggetto di un lavoro a parte (L. Peruzzi, K. F. Caparelli, in prep.).

Restano ancora da chiarire diversi aspetti biosistema-

tici, ad esempio relativi al valore di alcuni *taxa* all'interno di *G. chrysantha* Schult. & Schult. f. ("*G. longifolia* Lojac." *nom. illeg.* e *G. sicula* Lojac.) e *G. granatellii* (Parl.) Parl. (*G. lacaitae* A. Terracc.). Inoltre, le popolazioni Italiane e Francesi attribuite sinora a *G. mauritanica* Durieu - attualmente sotto studio - sembrano differire dalla "vera" *G. mauritanica* del N Africa e di Maiorca (TISON, 2004b). Infine, resta da indagare anche *G. brentae* Evers, entità enigmatica descritta per le Alpi di Brenta (Trentino-Alto Adige), forse identificabile con *G. lutea* (L.) Ker-Gawl. Sono attualmente in corso studi filogenetici, anche su base molecolare, su tutte le specie italiane (con

particolare riguardo ai presunti "ibridi" *G. polidorii* e *G. luberonensis*) e su altre entità critiche del Mediterraneo Centrale (es. *G. chaberti* A. Terracc. del N Africa; *G. elliptica* (A. Terracc.) D. Prain e *G. nevadensis* Boiss. della Spagna) ad esse correlate. Sono in programma anche studi sulla morfologia dei granuli pollinici in tutte le unità Italiane, già risultata molto utile dal punto di vista tassonomico per le specie Iraniane (ZARREI, ZARRE, 2005). Concludendo, allo stato attuale delle conoscenze, le specie di *Gagea* presenti sul territorio Italiano risultano essere 23 (20 + 3 riferite ad "aggregati di specie"), raggruppate in 6 sezioni (Fig. 1, Tab. 1).



Fig. 1

Specie rappresentative delle 6 sezioni di *Gagea* presenti in Italia: *G. trinervia* – Niscemi (Caltanissetta), Apr 2006, foto di L. Peruzzi (A); *G. foliosa* – Madonie (Palermo), Apr 2004, foto di L. Peruzzi (B); *G. spathacea* – Serramazzone (Modena), Apr 2005, foto di C. Santini (C); *G. fragifera* – Masistri (Cosenza), Apr 2005, foto di L. Peruzzi (D); *G. lutea* – Masistri (Cosenza), Apr 2005, foto di L. Peruzzi (E); *G. minima* - M. Manfredonia (Cosenza), May 2004, foto di L. Peruzzi (F). Le lettere corrispondono a quelle delle sezioni nella Tab. 1.

Well representative species of the 6 *Gagea* sections occurring in Italy: *G. trinervia* – Niscemi (Caltanissetta), Apr 2006, photo by L. Peruzzi (A); *G. foliosa* – Madonie (Palermo), Apr 2004, photo by L. Peruzzi (B); *G. spathacea* – Serramazzone (Modena), Apr 2005, photo by C. Santini (C); *G. fragifera* – Masistri (Cosenza), Apr 2005, photo by L. Peruzzi (D); *G. lutea* – Masistri (Cosenza), Apr 2005, photo by L. Peruzzi (E); *G. minima* - M. Manfredonia (Cosenza), May 2004, photo by L. Peruzzi (F). Littering corresponds to that of sections in Tab. 1.

TABELLA 1

Prospetto tassonomico provvisorio delle specie di *Gagea Salisb.* presenti nella flora Italiana.
Provisional taxonomic setting for Italian *Gagea* species.

- A) sect. *Anthericoides*
- 1 *G. trinervia* (Viv.) Greuter
- B) sect. *Didymobulbos*
- 2 *G. bohémica* (Zauschn.) Schult. & Schult. f.
3 *G. chrysantha* Schult. & Schult. f. aggr.
a. *G. chrysantha* Schult. & Schult. f.
b. *G. lojacanoi* Peruzzi **nom. nov.**
? *G. longifolia* Lojac., Fl. Sic. 3: 133 (1909) *nom. illeg.*, non Gand. (1876)
c. *G. sicula* Lojac.
- 4 *G. dubia* A. Terracc.
5 *G. foliosa* (J. & C. Presl) Schult. & Schult. f.
6 *G. granatellii* (Parl.) Parl. aggr.
a. *G. granatellii* (Parl.) Parl.
b. *G. lacaitae* A. Terracc.
7 *G. luberonensis* J.-M. Tison
8 *G. mauritanica* Durieu s.l.
9 *G. soleirolii* Schultz
10 *G. peduncularis* (J. & C. Presl) Pasch.
11 *G. polidorii* J.-M. Tison
12 *G. villosa* (M. Bieb.) Sweet
- C) sect. *Euspathaceae*
- 13 *G. spathacea* (Hayne) Salisb.
- D) sect. *Fistulosae*
- 14 *G. fragifera* (Vill.) Ehr. Bayer & G. López
- E) sect. *Gagea*
- 15 *G. lutea* (L.) Ker-Gawl.
16 *G. paczoskii* (Zapal.) Grossh. (*vel. sp. aff.*)
17 *G. pratensis* (Pers.) Dumort.
18 *G. pusilla* (F. W. Schmidt) Sweet
19 *G. tisoniana* Peruzzi *et al.*
- F) sect. *Minimae*
- 20 *G. minima* (L.) Ker-Gawl.

LETTERATURA CITATA

- BARTOLUCCI F., PERUZZI L., 2006 - *Distribuzione del genere Gagea Salisb.* (Liliaceae) nell'Appennino centro-settentrionale. Atti XXXVI Congr. Società Italiana Biogeografia: "Biogeografia dell'Appennino centrale e settentrionale: trenta anni dopo!". L'Aquila, 6-9/09/2006.
- CAPARELLI K.F., PERUZZI L., CESCO G., 2006 - *A comparative analysis of embryo-sac development in three closely related Gagea Salisb. species* (Liliaceae), with some consideration on their reproductive strategies. *Plant Biosystems*, 140(2): 1-8.
- DELFINI L., FIANDRI F., LODESANI U., SANTINI C., 2005 - *Notulae alla Checklist della flora italiana - 1: 1151*. *Inform. Bot. Ital.*, 37(2): 1173.
- GALESI R., GIARDINA G., ROSSELLO F., 2005 - *Nuovi dati sulla Flora Sicula*. *Inform. Bot. Ital.*, 37(2): 1161-1166.
- GARGANO D., PERUZZI L., CAPARELLI K.F., CESCO G., 2007 - *Preliminary observations on the reproductive strategies in five early-flowering species of Gagea Salisb.* (Liliaceae). *Bocconea* (in stampa).
- GREUTER W., 1970 - *The taxonomical position of Lloydia graeca* (Liliaceae) and related species. *Israel J. Bot.*, 19: 155-160.
- PERUZZI L., 2003 - *Contribution to the cytotaxonomical knowledge of the genus Gagea Salisb.* (Liliaceae) sect. *Foliatae A. Terracc. and synthesis of karyological data*. *Caryologia*, 56(1): 115-128.
- , 2004 - *Segnalazioni Floristiche Italiane: 1004*. *Inform. Bot. Ital.*, 36(1): 78-79.
- , 2005 - *Notulae alla Checklist della flora italiana - 1: 1152*. *Inform. Bot. Ital.*, 37(2): 1173.
- , 2006a - *Contribution to the cytotaxonomical knowledge of the genus Gagea Salisb.* (Liliaceae). III. *New karyological data from the C Mediterranean area*. *Proc. IV Balkan Botanical Congr. Sofia, Bulgaria*, 20-26/06/2006.
- , 2006b - *Hybridity as a main evolutionary force in the genus Gagea Salisb.* (Liliaceae). *Intern. Symp.: "Hybrids and Iris"*. Firenze, 5-7/05/2006.
- , 2006c - *Phylogenetic relationships of Gagea Salisb.* (Liliaceae) in Italy, inferred from morphological data matrix. *Proc. IV Balkan Botanical Congr. Sofia, Bulgaria*, 20-26/06/2006.
- PERUZZI L., AQUARO G., 2005 - *Contribution to the cytotaxonomical knowledge of the genus Gagea Salisb.* (Liliaceae). II. *Further karyological studies on Italian populations*. *Candollea*, 60(1): 237-253.
- PERUZZI L., BARTOLUCCI F., 2006 - *Gagea luberonensis J.-M. Tison* (Liliaceae) new for the Italian flora. *Webbia*, 61(1): 1-12.
- PERUZZI L., BARTOLUCCI F., FRIGNANI F., MINUTILLO F., 2007 - *A new species of Gagea Salisb. sect. Gagea* (Liliaceae) from C Italy: *G. tisoniana sp. nov.* *Bot. J. Linn. Soc.*, 151 (in stampa).
- PERUZZI L., GARGANO D., 2005 - *Distribuzione del genere Gagea Salisb.* (Liliaceae) in Calabria. *Inform. Bot. Ital.*, 37(2): 1117-1124.
- PERUZZI L., TISON J.M., 2004a - *Verso una revisione biosistemica del genere Gagea Salisb.* (Liliaceae) in Italia. *Un nuovo tipo di approccio*. *Inform. Bot. Ital.*, 36(2): 470-475.
- , 2004b - *Typification and taxonomic status of eleven taxa of Gagea Salisb.* (Liliaceae) described by Achille and Nicola Terracciano and conserved at Napoli (NAP). *Candollea*, 59(2): 325-346.
- , 2005 - *Typification and taxonomic status of eleven taxa of Gagea Salisb.* (Liliaceae) described from Sicily and conserved at Palermo (PAL). *Candollea*, 60(2): 289-298.
- TISON J.M., 2004a - *Gagea polidorii J.-M. Tison, espèce méconnue du sud-ouest des Alpes et des Apennins*. *Acta Bot. Gallica*, 151(3): 319-326.
- , 2004b - *Contribution à la connaissance du genre Gagea Salisb.* (Liliaceae) en Afrique du Nord. *Lagascalia*, 24: 67-87.
- ZARREI M., ZARRE S., 2005 - *Pollen morphology of the genus Gagea* (Liliaceae) in Iran. *Flora*, 200: 96-108.

RIASSUNTO – Viene presentata l'attuale situazione circa lo studio del genere *Gagea*, con particolare riferimento al territorio Italiano. In quest'area, sono attualmente note 6 sezioni e 23 specie, 3 delle quali (tutte appartenenti alla

sezione *Didymobulbos*) sono riferite ad “aggregati di specie” che richiedono ulteriori studi. Infine viene proposto *G. lojaconoi* Peruzzi *nom. nov.*, in sostituzione di *G. longifolia* Lojac. *nom. illeg.* non Gand.

AUTORE

Lorenzo Peruzzi, Dipartimento di Biologia, Orto Botanico e Museo Botanico, Unità di Botanica Generale e Botanica Sistemática, Università di Pisa, Via L. Ghini 5, 56126 Pisa. e-mail: lperuzzi@biologia.unipi.it

Muscari parviflorum Desf.: sistematica delle popolazioni e stato di conservazione nell'area dei Monti della Tolfa

M. MATTEUCCI, F. AVANCINI e F. LUCCHESI

ABSTRACT - *Muscari parviflorum* Desf.: *population systematics and conservation in Tolfas Mountains* - *M. parviflorum* Desf. is an endangered species in Italy and for this importance we carried out systematic and cytotoxic analyses about some populations of Tolfa district in Latium region. The work is part of a larger project on critical systematic groups of Tolfa Mountains in Central Italy. The aim of the research was to solve systematic problems and to provide information on the presence of the species in the area. We carried out morphological, histological and cytological analyses on all samples. The results confirmed a peculiar polyploid level of Latium populations, pentaploid ($2n=45$). Samples with number $2n=36$ chromosome have only been documented in the Gaeta population. The species reproduces every three years by apomixy and vegetative reproduction through the bulbs. Furthermore, some populations of *M. neglectum* resulted as triploids ($2n=27$), a new chromosome number never found in Italy before. Conservation of Tolfa populations is extremely important because many Latium populations have already disappeared and many others are in a critically endangered state. We emphasize the importance to preserve population biodiversity of cytotypes as result of an evolutionary process. Rapid and effective conservation of the area is essential for the survival of the species in Italy.

Key words: cytological analysis, cytotoxicology, conservation, *Muscari*, polyploidy complex, symmetry of karyotypes

INTRODUZIONE

L'indagine sistematica su *Muscari parviflorum* Desf. si inquadra all'interno di un progetto di ricerca più ampio che riguarda i gruppi critici dell'area dei Monti della Tolfa. Scopo del lavoro era quello di risolvere problematiche di natura sistematica o tassonomica e fornire informazioni certe sulla presenza nell'area di determinate specie critiche utilizzando tecniche di natura biosistemica.

La specie ha una distribuzione mediterranea, con areale a gravitazione centro-orientale che si estende dalla Penisola Iberica (Spagna), Africa settentrionale (Algeria, Egitto, Libia, Tunisia) e Europa Sud-orientale (Grecia, Italia e Jugoslavia) fino all'Asia occidentale (Cipro e Turchia); in Italia la specie è particolarmente rara (forse anche poco osservata), sono segnalate stazioni nella Sicilia meridionale, in provincia di Ragusa, in Calabria, in provincia di Catanzaro, dove è stata recentemente ritrovata dopo una segnalazione risalente alla fine dell'800, nella Liguria occidentale presso Sanremo e nel Lazio in due località, sia a Gaeta che a Civitavecchia.

Recentemente vi sono state delle segnalazioni di nuovi ritrovamenti anche in Puglia in provincia di Lecce (MELE *et al.*, 2002).

Solitamente si trova in luoghi erbosi e aridi, al mas-

simo fino ai 300 m s.l.m.

Sono state analizzate per un periodo di indagine triennale tutte le località all'interno o in prossimità dell'area tolfetano-cerite in aggiunta alla stazione di Gaeta (Monte Dragone, 365 m), analizzando così tutte le località conosciute per il Lazio e in cui era stata evidenziata la peculiarità del cariotipo pentaploide (ROSSI, CAPINERI, 1982). Oltre ad aver rinvenuto nuove stazioni di *M. parviflorum*, sono state rinvenute anche popolazioni di *M. neglectum*. I campioni raccolti sono stati coltivati nel Giardino Sperimentale di Roma Tre per essere sottoposti ad indagini di tipo morfometrico classico, istologico e cariologico, per approfondimenti di natura sistematica e sull'ecologia della specie.

AREA DI STUDIO E STAZIONI

Le stazioni nel comprensorio dei Monti della Tolfa sono state per la prima volta individuate dal Dr. Warion nel 1862. La segnalazione è comprovata da un campione tuttora presente nell'Herbarium Romanum con le seguenti indicazioni "Muscari parviflorum Desf.- Civita-Vecchia, maquis près la Mignone- 16 settembre 1862- je l'ai récoltè aussi à Porto-Clementino ed a Corneto - Dr. A. Warion."

Successivamente le stazioni indicate da Warion vengono ricercate infruttuosamente da W. Rossi e R. Capineri nel 1982, che invece individuano un'altra stazione, vicina a quelle indicate da Warion e sita in località Salse di Sant'Agostino, sempre al confine tra il comune di Civitavecchia e quello di Tarquinia.

Attualmente non è stato possibile trovare campioni nel sito Salse di Sant'Agostino, una località in cui la pianta cresceva a pochi metri da una chiesa su suolo travertino. Recentemente infatti, la località è stata soggetta alla costruzione di molte infrastrutture quali parcheggi, ampliamento della strada, costruzione di bagni pubblici e occupazione del suolo da parte di ambulanti, a causa dell'incentivato "turismo religioso" creatosi attorno al Santuario della zona di Pantano. Della popolazione segnalata da Rossi e Capineri non vi è più alcuna traccia. Così pure per un'altra stazione descritta da Warion e identificata come "macchia presso la foce del Mignone", il fiume che segna i confini comunali tra Civitavecchia e Tarquinia, ora conosciuta come Bagni di Sant'Agostino. Si tratta di dune sabbiose accanto alla foce del fiume, utilizzate dal turismo balneare e anche in questo caso, probabilmente, la costruzione di numerose strutture ricreative in prossimità della linea di costa ha distrutto il fragile ecosistema dunale in modo che non si sono trovate più tracce delle popolazioni di muscari.

Località San Giorgio

Invece per quanto riguarda la segnalazione più antica, quella di Porto Clementino da parte di Warion, è stata rinvenuta una popolazione ampia e in buono stato di espansione non molto distante dal luogo originario, denominata nella catalogazione dei campioni coltivati in orto con la sigla T4. Anche questa località, attualmente conosciuta come San Giorgio e confinante con la Riserva Naturale delle Saline di Tarquinia, è soggetta ad un turismo di tipo balneare. L'area però non presenta costruzioni sulla spiaggia ma solo nell'entroterra, oltre la pineta e la Riserva Naturale che circondano la spiaggia in questione. Unica struttura artificiale sono gli approdi per le piccole barche da pesca e una strada sterrata che costeggia parte della spiaggia. Quindi la posizione riparata della popolazione e la fioritura in concomitanza del periodo in cui il luogo è pressoché deserto hanno permesso la sua conservazione negli anni.

La popolazione si trova a pochissimi metri dal mare (2-5 metri) e si estende parallelamente alla costa in una "striscia" sottile, che raggiunge i tre metri nei punti più ampi e si ritrae a meno di un metro nei punti più stretti. Le piante si trovano al limitare di una pineta artificiale a *Pinus pinea* L., messa a dimora nel dopoguerra dall'Ente Maremma per proteggere i campi di frumento che si trovavano nell'entroterra dai venti di Libeccio. La popolazione di muscari quindi cresce su suolo sabbioso, compatto, tra gli aghi di pino e i cumuli di foglie di *Posidonia oceanica* L. trasportate a terra dalle correnti del mare antistante.

Gli individui crescono lungo una traccia di sentiero che corre parallelo alla costa, nel periodo della fioritura completamente deserto e quasi irriconoscibile, durante la stagione estiva attraversato da automezzi di ogni tipo e dimensione.

Nella parte più settentrionale del popolamento è stato possibile rinvenire negli ultimi mesi anche qualche individuo di *M. neglectum* Guss., frammisto agli individui di *M. parviflorum* Desf. Tutti gli individui sono di dimensioni ridotte e ad oggi solo due individui sono giunti a fioritura e fruttificazione, uno allo stato naturale e l'altro in coltivazione controllata.

Località Valdambri

Inoltre, durante il monitoraggio dell'area tolfetanocerite è stata rinvenuta su segnalazione del Dott. Pisani una popolazione di grandi dimensioni di *M. parviflorum* Desf. in un'area in cui non ne era mai stata segnalata la presenza, sita a Sud di Santa Marinella in località Valdambri, una collina arida prospiciente al mare a circa 160 metri di altezza, caratterizzata da suolo argilloso misto a flysh.

Originariamente l'area era occupata alla base dalle serre utilizzate per la coltivazione di ortaggi e fiori e la parte più in alto della collina era scarsamente abitata e manteneva una macchia mediterranea abbastanza bassa e qualche residuo di cerreta. Attualmente la zona è soggetta a lottizzazione e la costruzione di grandi ville sta parcellizzando il territorio così che molte delle piante analizzate sono state prelevate su bordo strada o lungo le recinzioni che dividono i lotti.

Nonostante la precarietà della situazione, il popolamento di Valdambri resta quello più numeroso e in ottimo stato. Durante il triennio di indagine è stato possibile notare sia la notevole fioritura che la successiva fruttificazione che ha caratterizzato questa località rispetto alle altre. È da sottolineare come la produzione di semi avvenga comunque per apomissia, dato che tutti gli individui analizzati si sono sempre rivelati con assetto cromosomico pentaploide ($5x = 45$).

Località Montejanne

Altra nuova località rinvenuta nell'area tolfetana riguarda un sito ancor più a sud dei precedenti, al confine tra i comuni di Santa Marinella e Santa Severa, lungo il sentiero naturalistico del Biancone.

Si tratta di un'area ancora libera da grandi infrastrutture con una densità abitativa molto bassa rispetto alle città vicine, all'interno dell'area identificata negli anni '70 per ospitare il Parco dei Monti della Tolfa, mai realizzato.

In località Montejanne è stato rinvenuto un piccolo popolamento di muscari all'inizio non ben identificato in quanto gli individui non sono giunti a fioritura né in coltivazione controllata né in natura per i primi due anni. I campioni prelevati da questo popolamento sono stati sottoposti a tutti i tipi di analisi che hanno interessato i campioni di *M. parviflorum* Desf.; né le indagini istologiche, né quelle morfometriche hanno portato ad una determinazione specifica certa. Solo grazie all'analisi cariologica e ad alcuni

caratteri fenologici, come la produzione di bulbilli e il "risveglio meristemato" degli apici, si è giunti ad attribuire questo popolamento alla specie *M. neglectum* Guss.; la successiva fioritura di alcuni individui in coltivazione controllata, al terzo anno di indagine, ha confermato la determinazione specifica. Quello che all'inizio è sembrato uno spiacevole inconveniente si è rivelato successivamente un ottimo modo per saggiare l'attendibilità della metodologia stessa di indagine.

MATERIALI E METODI

Le piante utilizzate per le analisi kariologiche, istologiche e morfo-anatomiche provengono da tutte le località sopra descritte catalogate attraverso dei codici identificativi (Tab. 1).

TABELLA 1
Località di raccolta.
Resorts of collection.

Specie	Cod.	Località
<i>M. parviflorum</i> Desf.	T1	Valdambrini (bordo strada)
<i>M. neglectum</i> Guss.	T4	San Giorgio (lungo costa)
<i>M. parviflorum</i> Desf.	T10	Valdambrini (sommità)
<i>M. neglectum</i> Guss.	T13	Montejanne (sommità)
<i>M. neglectum</i> Guss.	T15	Montejanne (pendici)
<i>M. neglectum</i> Guss.	T52	San Giorgio (bordo strada)
<i>M. parviflorum</i> Desf.	GA	M. Dragone (Gaeta)

L'analisi kariologica è stata portata a termine attraverso colorazione Feulgen standard, la più adatta per rendere visibili i cromosomi in metafase, su tessuto meristemato di apici radicali. Gli apici sono stati prelevati dalle piante durante tutta la fase vegetativa dei campioni in coltivazione controllata definendo così quale sia il periodo migliore per tale analisi. Gli apici sono stati prelevati dai campioni durante le prime ore della mattina (entro le 10) e successivamente tagliati e lavati, quindi immersi in una soluzione di acqua distillata e colchicina (5 mg/cc) per 4-5 ore in frigorifero, necessaria per bloccare il ciclo cellulare in metafase. Successivamente gli apici sono stati fissati in una soluzione di Carnoy (alcol etilico assoluto e acido acetico glaciale in rapporto 3:1) per circa 15 minuti a temperatura ambiente. L'idrolisi è stata effettuata in HCl 1 N per circa 7 minuti a 60°C e la successiva colorazione immergendo gli apici in Fucsina leucobasica per 3-5 ore in base alla colorabilità degli apici radicali. Il meristema è stato successivamente schiacciato con orceina acetica o acido acetico al 45% relativamente allo stadio di colorazione raggiunto dagli apici e i preparati permanenti sono stati preparati utilizzando azoto liquido per staccare il vetrino coprioggetto e chiudendo definitivamente il vetrino portaoggetti con un montante (Eukitt o Euparal).

I preparati kariologici sono stati osservati e fotografati con un microscopio ottico Zeiss Axioplan 2, collegato ad una telecamera digitale Axiophot 2. Le

migliori piastre metafasiche complanari sono state fotografate con un ingrandimento di 1000 o 1600 X dovuto alle lenti del microscopio ottico, al quale se ne è aggiunto un altro, variabile, dovuto alla messa a fuoco della macchina fotografica. Per calcolare l'ingrandimento finale è stata utilizzata la scala di un vetrino micrometrico, grazie alla quale è stata poi eseguita la conversione delle misure dei cromosomi da millimetri a micron.

L'analisi dei dati kariologici è stata effettuata attraverso il confronto degli indici di Simmetria più usati in letteratura: Indice di Simmetria ($Sy_i = [(X \text{ medio} / Y \text{ medio}) \times 100]$), Indice di Rassomiglianza Cromosomica $[(Y + X)_n / (Y + X)_1] \times 100$ con $(Y + X)_1$ = il cromosoma più lungo) e Categoria di Stebbins attraverso la quale viene comparata la percentuale dei cromosomi con rapporto $y/x > 2$ tra il cromosoma di maggiori dimensioni e quello di dimensioni minori. Sono state inoltre effettuate analisi istologiche per evidenziare la forma e per comparare le dimensioni delle cellule di guardia degli stomi con coloranti specifici (rosso congo) e aspecifici (blu di toluidina), per colorare rispettivamente le pareti celluloso-pectiche e le cellule epidermiche.

Lo studio morfologico ed istologico si è avvalso dell'utilizzo di un microscopio ottico Zeiss Standard 25 ed uno stereomicroscopio Zeiss Stemi 2000-C, corredati di vetrino micrometrico, entrambi collegati ad una macchina fotografica digitale Nikon Coolpix 995.

Per ogni individuo è stata prelevata a caso una foglia su cui sono state prelevate aree di tessuto epidermico a diversa altezza (prossimale, mediana e distale). Per ogni stazione sono stati analizzati più individui (5-7) scelti a caso all'interno del popolamento. È stata quindi ottenuta la media delle dimensioni delle cellule di guardia degli stomi per ogni individuo, quella per ogni stazione e infine quella specie-specifica.

RISULTATI

Analisi kariologica

Muscari parviflorum Desf.

Durante le analisi kariologiche sugli individui di *M. parviflorum* Desf. è stato confermato per la stazione di Gaeta sia il numero $2n=36$ (anche se raramente) sia $2n=45$, che è risultato essere il livello di ploidia più frequente in questo popolamento. Per le stazioni dei Monti della Tolfa l'unico numero cromosomico confermato è $2n=45$ e non sono state trovate piastre metafasiche a 36 cromosomi.

Questo può far supporre che col tempo le popolazioni laziali si stiano "assestando" su di un unico numero cromosomico e che gli individui pentaploidi siano i più adattati a questi ambienti così estremi e disturbati.

Dall'analisi delle migliori piastre metafasiche complanari (Fig. 1) è stato possibile ricavare i valori medi che descrivono il kariogramma: a) lunghezza media del cariotipo (Σt) = 159,86 μm ; b) lunghezza totale del genoma ($\Sigma t/x$) = 31,97 μm (x indica il livello di ploidia in questo caso 5x); c) indice di simmetria



Fig. 1
Piastra metafasica di *M. parviflorum* Desf. ($2n = 45$).
Mitotic metaphase of *M. parviflorum* Desf. ($2n = 45$).

(Sy_i) = 52,34; d) indice di rassomiglianza cromosomica media (rec medio) = 65,51.
La categoria cariotipica secondo STEBBINS (1958) corrisponde alla categoria 2B (Tab. 2).

TABELLA 2
Categoria secondo Stebbin.
Category of Stebbins.

Crom >/<	Cromosoma con rapporto $y/x > 2$			
	nessuno	Fino 50%	50-90%	tutti
tra 1 e 2	1A	2A	3A	4A
tra 2 e 4	1B	2B	3B	4B
> 4	1C	2C	3C	4C

La formula cromosomica secondo LEVAN *et al.* (1964) risulta essere: $L = 2n = 45 = 15m + 20sm + 5sm^* + 4st + 1st^*$. L'assetto cromosomico (Fig. 2) risulta abbastanza simmetrico, con dimensioni cromosomiche via via decrescenti, senza i cromosomi di piccole dimensioni.

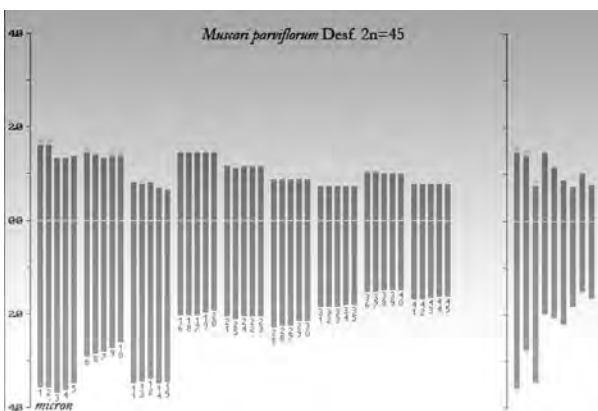


Fig. 2
Cariogramma e idiogramma di *M. parviflorum* Desf. (5x).
Karyogram and idiogram of *M. parviflorum* Desf. (5x).

In due piastre della località Valdambri (Fig. 3) sono ben visibili satelliti sul braccio corto di uno dei cromosomi subtelocentrici e di cinque cromosomi submetacentrici.

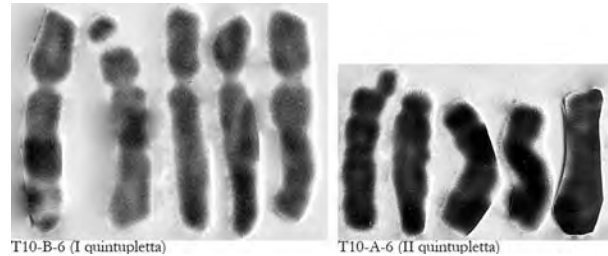


Fig. 3
Satellite della prima e della seconda quintupletta nelle piastre T10-B-6 e T10-A-6 di *M. parviflorum* Desf.
Satellites in mitotic metaphase of T10-B-6 and T10-A-6 of *M. parviflorum* Desf.

Muscari neglectum Guss.

L'analisi cariológica (Fig. 4) ha sempre evidenziato individui triploidi ($2n = 27$).



Fig. 4
Piastra metafasica di *M. neglectum* Guss. ($2n = 27$).
Mitotic metaphase of *M. neglectum* Guss. ($2n = 27$).

Anche nell'ultimo popolamento individuato in località San Giorgio, giunto a fioritura nel marzo 2006, l'analisi cariológica ancora in atto ha evidenziato fino ad ora solo individui triploidi.

Si tratta di un nuovo numero cromosomico per questa specie in Italia, dopo l'unica altra segnalazione di una popolazione triploide di *M. neglectum* nella Turchia europea (JOHNSON *et al.*, 1995). La formula cromosomica secondo LEVAN *et al.* (1964) risulta essere: $L = 2n = 27 = 23m + 4sm^* + 6sm$.

Dall'analisi cariológica risultano: a) lunghezza media del cariotipo (TM_t) = 98,64 μ m; b) lunghezza totale del genoma (TM_t/x) = 32,88 μ m; c) indice di Simmetria (Sy_i) = 64,98; d) Indice di Rassomiglianza

Cromosomica (rec medio) = 77,42; e) Categoria secondo Stebbins: 2A (Tab. 3).

TABELLA 3
Categoria secondo Stebbins.
Category of Stebbins.

Crom >/< tra 1 e 2 tra 2 e 4 > 4	Cromosoma con rapporto y/x > 2			
	nessuno	Fino 50%	50-90%	tutti
1A	2A	3A	4A	
1B	2B	3B	4B	
1C	2C	3C	4C	

In alcune piastre sono visibili (Fig. 5) anche satelliti sul braccio corto di cromosomi metacentrici, sul primo cromosoma della prima tripletta (cr. 1*), sul terzo della quinta (cr. 15*) e sui primi due dell'ottava tripletta (cr. 22* e 23*).

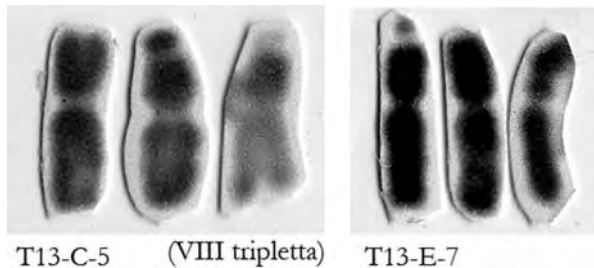


Fig. 5
Satelliti dell'ottava tripletta nella piastre T13-C-5 e in T13-E-7 di *M. neglectum* Guss.
Satellites in mitotic metaphase of T13-C-5 and T13-E-7 of *M. neglectum* Guss.

Si tratta di un assetto cromosomico tendenzialmente unimodale e particolarmente simmetrico (Fig. 6).

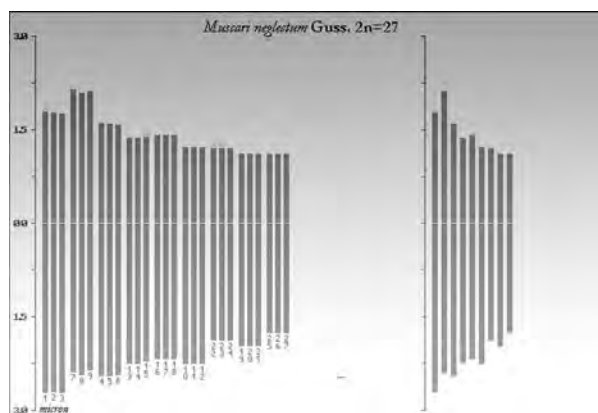


Fig. 6
Cariogramma e idiogramma per in *M. neglectum* Guss. (3x).
Karyogram and idiogram of *M. neglectum* Guss. (3x).

I dati cariologici delle due specie sono stati comparati (Fig. 7) attraverso i tre indici di simmetria sopra citati (Sy_i , rec medio e Categoria di Stebbins).

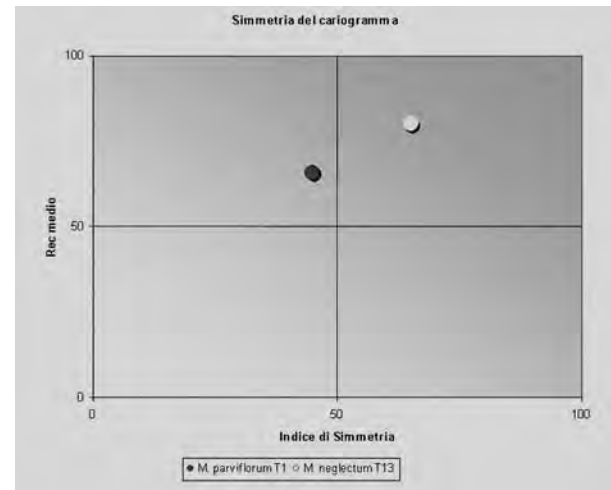


Fig. 7
Simmetria dei kariogrammi a confronto.
Comparison of karyotypes symmetry.

Come si può notare dal grafico di dispersione si tratta in entrambi i casi di kariogrammi particolarmente simmetrici, soprattutto per *M. neglectum* Guss. che si posiziona nel quadrante in alto a destra del grafico denotando un'alta simmetria sia dei singoli cromosomi (rec medio maggiore del 77,42%) che del kariogramma come insieme (Sy_i maggiore del 64,98%). Purtroppo, non è stato possibile estendere ad altre località il confronto, se non in modo parziale, in quanto i dati in letteratura sono spesso incompleti, forniscono cioè solo uno o due dei tre indici a disposizione per misurare la simmetria dei kariogrammi oppure ne forniscono di alternativi. Comunque il parziale confronto con i dati in letteratura è risultato utile e i dati dell'area tolfetana confermano sufficientemente i dati precedenti.

Analisi istologica

Stomi

Oltre che ai caratteri morfologici, l'analisi anatomica si è concentrata su forma, dimensione e colorabilità delle cellule di guardia degli stomi e sulla sezione fogliare (Figg. 8, 9).

La disposizione delle cellule di guardia risulta essere sempre di tipo paracitico, nella forma e nelle dimensioni non si evidenziano grosse differenze, neanche tra le popolazioni di *M. parviflorum* Desf. pentaploidi di certa attribuzione e quella di *M. neglectum* triploide Guss. di Rio Fiume.

All'interno delle popolazioni laziali, la dimensione delle cellule di guardia varia in lunghezza dai 38,80 ai 47,55 μm e in larghezza dai 25,60 ai 28,50 μm (Tab. 4).



Fig. 8
Stomi di *M. parviflorum* Desf. (5x).
Stomatal complex of *M. parviflorum* Desf. (5x).



Fig. 9
Stomi di *M. neglectum* Guss.
Stomatal complex of *M. neglectum* Guss.

TABELLA 4
Valori medi delle dimensioni stomatiche.
Mean values of stomatal complex.

Stazioni	Lunghezza	D.S.	Larghezza	D.S.
	Media		media	
<i>Muscari parviflorum</i> Desf.				
Valdambrini	47,55 μm	$\pm 3,72$	28,50 μm	$\pm 4,62$
San Giorgio	42,60 μm	$\pm 3,24$	25,60 μm	$\pm 3,57$
Gaeta	38,80 μm	$\pm 2,10$	26,60 μm	$\pm 3,20$
<i>Muscari neglectum</i> Guss.				
Rio Fiume	41,24 μm	$\pm 3,25$	27,12 μm	$\pm 2,39$

Sarebbe interessante confrontare i dati con quelli di altre popolazioni della penisola, ma da questi risultati finora non sembra comunque che il valore della lunghezza delle cellule di guardia possa essere un carattere utilizzato per discriminare le varie specie di muscari, mentre può essere utile nel confronto intra-specifico, tra le varie popolazioni della stessa specie.

Sezione fogliare

Per quanto riguarda la sezione fogliare, è stato possi-

bile confrontare i risultati con un lavoro precedente (SPETA, 1982). In questo lavoro era ben chiara la differenza di sezione nelle foglie di *M. parviflorum* e di *M. neglectum*, la prima di dimensioni minori e dal perimetro "scanalato", la seconda dal contorno meno netto e dalla dimensioni maggiori. Nel caso dei popolamenti laziali è stato possibile riscontrare questa distinzione solo per alcuni campioni, quelli riconducibili al fenotipo più classico. Non sono state rilevate grandi differenze neanche tra gli individui pentaploidi e tetraploidi appartenenti alle due specie in questione. Quindi il carattere "sezione fogliare" può essere utilizzato come un buon carattere diagnostico se non ci si trova di fronte a popolazioni molto polimorfe o di individui che non hanno ancora raggiunto la maturità o in eventuali ibridi.

CONCLUSIONI

Dalle indagini effettuate è stato quindi possibile confermare per la località di Monte Dragone i due livelli di ploidia conosciuti anche in precedenza (4x e 5x) anche se va sottolineato come il livello pentaploide risulti più frequente (sono state contate solo tre piastre a 36 cromosomi sul totale delle piastre di Gaeta contate e fotografate, circa 40).

Per l'area tolfetana invece l'unico numero cromosomico di tutti i popolamenti rintracciati resta $2n=45$. Concludendo, tranne le piccole differenze imputabili alla diverse caratteristiche ambientali delle stazioni e all'isolamento delle popolazioni laziali di *M. parviflorum* Desf., risultano confermati la fenologia, i caratteri diagnostici della specie e il numero cromosomico.

Tra le differenze fenotipiche più evidenti si ha la presenza di fiori dai petali molto più scuri (viola-blu) nel popolamento di Valdambrini rispetto agli individui delle altre località.

Per quanto riguarda i caratteri diagnostici bisogna aggiungere solo la notevole produzione di bulbilli ipogei delle popolazioni laziali di *M. parviflorum* Desf. che risulta maggiore rispetto a quella descritta nelle Flore con 3 bulbilli per individuo, fino a 7-10 bulbilli per individuo. Questo fattore probabilmente è collegato alla necessità di riproduzione vegetativa atta a compensare la scarsa riproduzione sessuata caratteristica di questi cariotipi poliploidi (tutti i semi vengono prodotti comunque per apomissia).

La riproduzione sessuata in *Muscari parviflorum* Desf. è affidata alla fioritura autunnale, durante la quale i campioni, in natura e in coltura, hanno sviluppano un lungo racemo (20-25 cm), che superava generalmente la lunghezza delle foglie (10-15 cm). Sul racemo si presentano 10-15 fiori dal peduncolo eretto-patente, che rimane tale anche nel campione secco; il perigonio è a fauce non ristretta e angoloso nella parte distale e sono ben visibili 6 linee più scure di colore violetto decorrenti lungo gli angoli.

Al termine della fioritura solo 1-3 fiori per racemo hanno portato alla formazione di capsule, mentre nel caso della popolazione di S. Giorgio alcuni individui

in natura hanno prodotto al massimo 5-7 capsule su racemi di almeno 15 fiori. All'interno di ogni capsula verde scuro si trovano due semi di colore bruno nerastro di 2-3 mm di lunghezza (Fig. 10).

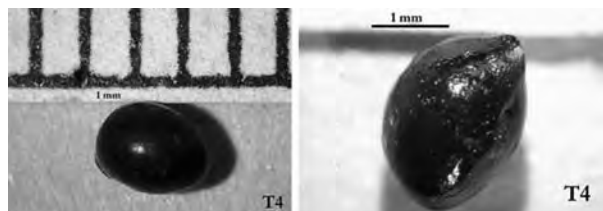


Fig. 10

Semi di *M. parviflorum* Desf.
Seeds of *M. parviflorum* Desf.

La riproduzione vegetativa procede per tutta la primavera, anche dopo la perdita delle foglie, e nei campioni di *M. neglectum* di Rio Fiume è stato possibile osservarla fino a primavera inoltrata.

Durante questo periodo l'attività delle cellule meristematiche degli apici radicali è sempre molto alta, cosicché è stato possibile ottenere buone piastre metafasiche fino all'inizio della primavera per tutti i campioni e fino alla fine della primavera per quelli di Rio Fiume.

Va sottolineato però che in tutti i campioni di *Muscari parviflorum* Desf. il risveglio "meristemático" degli apici radicali è avvenuto subito dopo la fine della fruttificazione, a fine Novembre.

Sempre nell'area tolfetana sono state individuate due località in cui sono presenti due piccoli popolamenti di *M. neglectum* Guss. triploide ($2n=27$).

Gli individui di queste due località presentano dimensioni ridotte e una scarsissima riproduzione sessuata, contrapposta ad una notevole riproduzione vegetativa. Nel triennio di indagine meno di una decina di individui sono giunti a fioritura sia in natura che in coltivazione, di questi poco più del 50% sono giunti a fruttificazione.

Sono da segnalare anche i nuovi tipi di terreno in cui sono state rinvenute le popolazioni laziali: quello sabbioso di San Giorgio e quello argilloso misto a flysh di Valdambri, oltre che a quello calcareo e travertino già noti.

In riferimento alla conservazione, *Muscari parviflorum* Desf. è specie rara in Italia ed è riportata nelle Liste Rosse regionali (CONTI *et al.*, 1997) per il Lazio (VU) e Sicilia (LR). Lo stato di conservazione attuale delle località laziali di *M. parviflorum* Desf. e delle due stazioni triploidi di *M. neglectum* Guss. è particolarmente critico (Tab. 5) per cui sarebbero necessari interventi repentini per mantenere almeno lo stato attuale.

In base alla situazione attuale, la sua conservazione nel Lazio è messa ancora di più in pericolo per la scomparsa delle stazioni di Sant'Agostino e Pantano e per il precario stato di conservazione delle altre sta-

TABELLA 5

Stato di conservazione delle stazioni.
Conservation status of resorts.

Località	Anno di Ritrovamento	Stato attuale
<i>Muscari parviflorum</i> Desf.		
Porto Clementino (Monti della Tolfa)	1862	scomparsa
Porto Corneto (Saline Tarquinia)	1862	scomparsa
Sant'Agostino (Monti della Tolfa)	1982	scomparsa
Monte Dragone (Gaeta)	1982	buono
San Giorgio (Monti della Tolfa)	2003	stabile
Valdambri (Monti della Tolfa)	2003	a rischio
<i>Muscari neglectum</i> Guss.		
Rio Fiume (Monti della Tolfa)	2003	a rischio
San Giorgio (Monti della Tolfa)	2006	a rischio

zioni tolfetane.

La tutela di queste popolazioni è indispensabile in quanto esse conservano la traccia unica e irripetibile della loro evoluzione; pertanto si sottolinea l'importanza di salvaguardare una biodiversità popolazionale rappresentata da citotipi differenziati.

LETTERATURA CITATA

- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1997 - *Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia*. 140 pp. Camerino.
- JOHNSON M.A.T., OZHATAY N., GARBARI F., 1995 - *The genus Muscari (Hyacinthaceae) in Turkey taxonomy, distribution and chromosome analysis*. In: Southwest and Central Asia Symp.: 34-53. 21-28 May 1995, Izmir Turkey. Ege Univ. Press.
- LEVAN A., FREDGA K., SANDBERGA A., 1964 - *Nomenclature for centromeric position on chromosome*. Hereditas, 52: 201-220.
- MELE C., MEDAGLI P., MARCHIORI S., 2002 - *Segnalazioni Floristiche Italiane: 1042*. Inform. Bot. Ital., 33 (2) (2001): 421-424.
- ROSSI W., CAPINERI R., 1982 - *Osservazioni su Muscari parviflorum Desf. in Italia*. Ann. Bot. (Roma), 40: 107-110.
- SPETA F., 1982 - *Über die Abgrenzung und Gliederung der Gattung Muscari, und Über ihre Beziehungen zu anderen Vertretern der Hyacinthaceae*. Bot. Jahrb. Syst., 103: 247.
- STEBBINS L.G., 1958 - *Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 23: 365-378.

RIASSUNTO - *Muscari parviflorum* Desf. è una specie minacciata in Italia e per questa importanza abbiamo condotto la presente ricerca allo scopo di evidenziare aspetti problematici sulla sistematica e sullo stato di conservazione di alcune popolazioni laziali. Lo studio si inquadra in un ampio progetto riguardante la sistematica dei gruppi critici dell'area dei Monti della Tolfa. Le popolazioni sono state sottoposte ad indagine morfologica classica, istologi-

ca ed cariologica. I risultati hanno confermato un livello particolare di poliploidia delle popolazioni tolfetane, risultate pentaploidi ($2n=45$), uniche rispetto alla popolazione di Gaeta in cui è stato documentato un numero $2n=36$. La specie si riproduce ogni 3 anni per apomissia e riproduzione vegetativa attraverso numerosi bulbilli. Durante la ricerca, sono state indagate anche alcune popolazioni di *M. neglectum* che sono risultate triploidi ($2n=27$), un

nuovo numero cromosomico per l'Italia. La conservazione delle popolazioni tolfetane è molto importante poiché molte popolazioni laziali sono già scomparse e molte altre sono in uno stato critico. Oltre alla conservazione della specie, risulta importante mirare alla conservazione dei citotipi che testimoniano un aspetto evolutivo della disgiunzione delle popolazioni. Interventi rapidi ed efficaci sono essenziali per la salvaguardia della specie in Italia.

AUTORI

*Maya Matteucci, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Roma "La Sapienza", Piazzale A. Moro 5, 00185 Roma
Federica Avancini, Fernando Lucchese, Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tre, Viale G. Marconi 446, 00146 Roma*

Vicia esdraelonensis Warb. & Eig (Sezione *Hypechusa*): recupero di una specie a rischio di estinzione

M. RUFFINI CASTIGLIONE, M. FREDIANI, M.T. GELATI, G. VENORA, C. RAVALLI e R. CREMONINI

ABSTRACT - *Vicia esdraelonensis* Warb. & Eig (Section *Hypechusa*): recovery of a dying species - Nuclear DNA content, automated karyotype analysis and sequences of rDNA spacers have been determined for *V. esdraelonensis*. The karyomorphological and the phylogenetic data generated from the comparison with the data of the other species belonging to *Hypechusa* section confirmed the position of *V. esdraelonensis* inside this section.

Key words: DNA content, karyotype, phylogeny, rDNAs, *Vicia esdraelonensis*

INTRODUZIONE

Il genere *Vicia* L. comprende circa 190 specie ampiamente distribuite nelle zone temperate dei due emisferi. Numerose sono le classificazioni che si sono succedute negli anni. BALL (1968) divise il genere in quattro sezioni: *Vicia*, *Cracca*, *Ervum* e *Faba*; successivamente KUPICHA (1976) all'interno del genere identificò due sottogeneri, *Vicilla* e *Vicia*, rispettivamente con 17 e 5 sezioni. Più recentemente MAXTED (1993) ha riesaminato il sottogenere *Vicia* e ha proposto una nuova classificazione con nove sezioni: *Atossa* (Alef.) Asch. & Graebner, *Microcarinae* Maxted, *Hypechusa* (Alef.) Asch. & Graebner, *Peregrinae* Kupicha, *Wiggersia* (Alef.) Maxted, *Vicia* L., *Faba* (Miller) Ledeb., *Narbonensis* (Radzhi) Maxted e *Bithynicae* (B. Fedtsch. Ex Radzhi) Maxted; queste ultime due sezioni sono monofiletiche.

È da tempo riconosciuta l'importanza dell'analisi dei rapporti filogenetici tra *Vicia faba* e le specie spontanee ad essa correlate proprio nell'ottica dello studio del germoplasma delle specie spontanee. Tali specie potrebbero essere utilizzate in programmi di miglioramento genetico come fonte di nuove caratteristiche.

Sulla base delle considerazioni sopra esposte il nostro gruppo di ricerca ha iniziato da tempo uno studio filogenetico riguardante le nove sezioni del sottogenere *Vicia*.

Le relazioni tra le sezioni *Bithynicae*, *Narbonensis* e *Faba* sono state analizzate con metodi morfologici, cariologici e molecolari (VENORA *et al.*, 2000 e

bibliografia ivi riportata) e molti di questi studi hanno confermato la classificazione di MAXTED (1993), suggerendo una maggiore vicinanza filogenetica di *V. faba* con specie appartenenti non tanto alla sezione *Narbonensis* ma alla sezione *Peregrinae* come evidenziato successivamente da LEHT, JAASKA (2002) con analisi morfologiche ed isoenzimatiche e confermato con analisi cariologiche e molecolari da FREDIANI *et al.* (2005). Come marcatori molecolari sono state utilizzate le sequenze degli spaziatori interni trascritti (ITS) dei geni ribosomali che sono più informative rispetto ai geni codificanti gli rRNA ribosomali stessi.

Più recentemente CAPUTO *et al.* (2006) hanno analizzato i rapporti filogenetici tra le specie appartenenti alla Sezione *Hypechusa*, ma non è stata analizzata *Vicia esdraelonensis* in quanto non fu possibile reperirla presso le numerose banche del germoplasma italiane ed estere.

Successivamente questa specie è stata rintracciata presso l'Orto Botanico dell'Università di Gerusalemme ed è stato possibile iniziarne lo studio.

MATERIALI E METODI

Analisi citofotometriche

Radici lunghe 1 cm furono fissate in etanolo-acido acetico (3:1, v/v) per 12 ore. Dopo un abbondante lavaggio le radici furono trattate per 30 minuti a 37°C con pectinasi di *Aspergillus niger* al 5% (Sigma, St. Louis U.S.A.) in soluzione acquosa, con l'aggiunta di EDTA (1 mM) per inibire eventuali attività di

DNasi endogene. Dopo la digestione enzimatica i relativi apici meristemati, privati della caliptra, furono strisciati in acido acetico al 45%. I vetrini furono successivamente idrolizzati in HCl 5N a temperatura ambiente per 30 minuti e colorati al Feulgen secondo quanto riportato in KOTSERUBA *et al.* (2000). L'assorbimento Feulgen fu misurato con il microdensitometro integratore Leitz MPV3 alla lunghezza d'onda di 550 nm. Per poter elaborare i relativi dati di densità ottica, gli strisci di *V. esdraelonensis* furono colorati insieme a preparati di apici radicali di *V. faba*; l'assorbimento di nuclei meristemati 4C fu utilizzato per convertire le unità arbitrarie in picogrammi di DNA.

Cariomorfometria

Gli strisci degli apici radicali furono preparati secondo quanto descritto in VENORA *et al.* (2000). L'investigazione microscopica fu condotta utilizzando un microscopio ottico collegato ad un analizzatore di immagine Kontron KS 400, con un software specifico per la cariotipizzazione Ikaros 3.4 (Metasystem GmbH, Altlußheim, Germany). Con il sistema computerizzato furono misurati tutti i parametri cromosomici quali lunghezza totale, lunghezza dei bracci corti, lunghi e del satellite (VENORA *et al.*, 1991). Per la classificazione dei cromosomi è stata seguita la nomenclatura di LEVAN *et al.* (1964). Come indici cromosomici sono stati utilizzati l'indice Total Form (TF%) di HUZIWARA (1962) e gli indici Rec e Syi di GREILHUBER, SPETA (1976).

Sequenziamento del DNA

Il DNA fu estratto e purificato da radici secondarie dopo decapitazione della primaria in accordo a MAGGINI *et al.* (1978). La regione del rDNA comprendente ITS1, 5.8S ed ITS2 fu amplificata tramite PCR e il prodotto sequenziato con il sequenziatore automatico ABI Prism 310 (Applied Biosystems). La sequenza nucleotidica così determinata, depositata presso EMBL nucleotide sequence database con il n° di accesso AM 181810, è stata allineata mediante il programma Clustal V (THOMPSON *et al.*, 1994) con le analoghe sequenze nucleotidiche delle altre specie della sezione (CAPUTO *et al.*, 2006).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il contenuto in DNA risultò essere 30.89 pg per nucleo 4C, valore compreso nel range della Sezione *Hypechusa* così come il numero cromosomico diploide pari a 12 è uguale a quello di tutte le specie appartenenti alla serie *Hyrcaicae*. La piastra metafasica, il relativo cariotipo e l'idiogramma sono riportati in Fig. 1 mentre i relativi dati cariomorfometrici in Tab. 1.

La formula cariotipica risultò essere $sm^{sc} + 5sm$, la lunghezza totale del set aploide $38.79 \mu m$ e gli indici cariomorfometrici Rec, Syi e TF% erano rispettivamente 71.02, 43.86 e 26.77. I rapporti fra i cariotipi delle specie appartenenti alla sezione *Hypechusa* sono rappresentati in Fig. 2 ed è ben evidente come

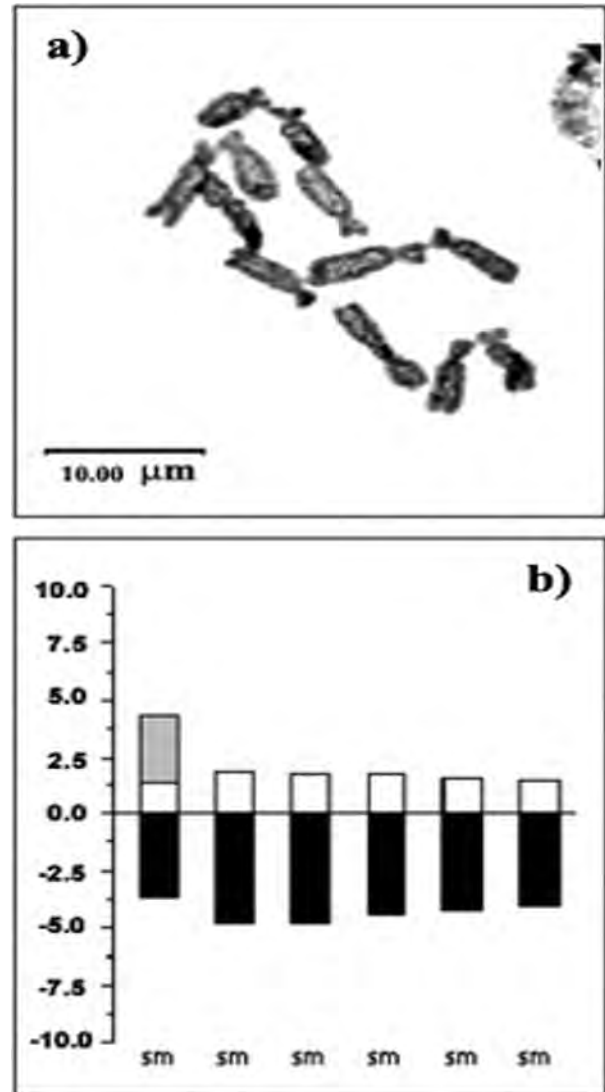


Fig. 1

a) Piastra metafasica di *V. esdraelonensis*. b) Idiogramma del complemento cromosomico aploide del cariotipo di *V. esdraelonensis*.

a) *V. esdraelonensis* metaphase plate. b) Idiogram of the haploid chromosomal complement of *V. esdraelonensis* karyotype.

TABELLA 1

Dati morfometrici relativi al complemento cromosomico di *Vicia esdraelonensis*.

Chromosome morphometric data of *V. esdraelonensis*.

Chromosome number	Chromosome length (μm , mean \pm SE)	Satellite length (μm , mean \pm SE)	Long/short arm ratio
1	7.93 ± 0.37 a	2.84 ± 0.09	2.55 a
2	6.75 ± 0.65 b		2.53 a
3	6.58 ± 0.77 c		2.77 a
4	6.14 ± 0.39 d		2.46 a
5	5.82 ± 0.37 d		2.60 a
6	5.57 ± 0.37 d		2.65 a

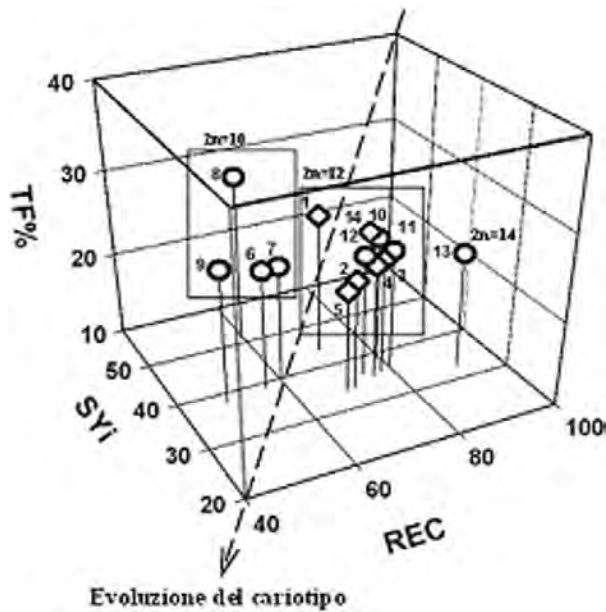


Fig. 2
 Simmetria del cariotipo nelle specie della sezione *Hypechusa*: ◇ = serie *Hyrcanicae* (1- *V. assyriaca*; 2- *V. tigridis*; 3- *V. galeata*; 4- *V. hyrcanica*; 5- *V. noeana*; 14- *V. esdraelonensis*); ○ = serie *Hypechusa* (6- *V. melanops*; 7- *V. ciliatula*; 8- *V. anatolica*; 9- *V. mollis*; 10- *V. pannonica*; 11- *V. hybrida*; 12- *V. sericocarpa*; 13- *V. lutea*), con gli indici Rec, Syi and TF%. I rettangoli includono le specie con lo stesso numero cromosomico.
 Karyotype symmetry of the species of section *Hypechusa*: ◇ = series *Hyrcanicae* (1- *V. assyriaca*; 2- *V. tigridis*; 3- *V. galeata*; 4- *V. hyrcanica*; 5- *V. noeana*; 14- *V. esdraelonensis*); ○ = series *Hypechusa* (6- *V. melanops*; 7- *V. ciliatula*; 8- *V. anatolica*; 9- *V. mollis*; 10- *V. pannonica*; 11- *V. hybrida*; 12- *V. sericocarpa*; 13- *V. lutea*), with Rec, Syi and TF% indices. Boxes include species with the same chromosome number.

```

t cGATGCCCTTACATGCAGTCCAAACACGTGGAATAAGTTTGAACACATACGg 50
TGGGCTTGAGGTGTCCACACCTCGaCTTACCTCGGatCGGAGGCGGAC 100
GACAAAGTGCCTTCTTCTCCGCGCCAAACCTCAAACCCGGCGCTGAATG 150
CCTCAAGGAATTAATTTTGTCTGAGGCGCACCTGCATGGCACTGGAGA 200
CGGTTTCTGTCGGGGTTGTGTTTTGACACATGATATAGAAATGACTCTCGG 250
CAACGGATATCTAGGCTCTTGATCGATGAAGAACCTAGCGAAATGCGAT 300
ACTTGGTGTGAATTCGAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCA 350
GTTGCGCCCGATGCCATTAGGTGAGGGCACGCTCTGCCTGGGTGTCACAT 400
AcCGAAGCCCTCCTGCCAATTTCCCTTTGATTATTGTGCAGGGTGGATGTT 450
GGCCTCCGCTGAGCTCTTTTGTCTCATGGTTGGTTGAAATTTGAGACCTT 500
GGTAgGGTGTGCATGATAGATGGTGGTTGTGTGACCACGAGACCAATC 550
ATGCGCTACTcTATTAATTTGGCCTCTTTTGGCCATATGCGTTTCTAA 600
CGCTCGTg. a.
    
```

Fig. 3
 Sequenza dell' ITS1, 5.8S (sottolineato) ed ITS2 dei geni ribosomali di *V. esdraelonensis* (EMBL accession number AM 181810). In lettera minuscola sono indicate le basi non corrispondenti nell'allineamento multiplo con le analoghe sequenze nucleotidiche delle altre specie della sezione *Hypechusa* (CAPUTO *et al.*, 2006).
 ITS1, 5.8S (underlined) and ITS2 sequences of *V. esdraelonensis* ribosomal genes (EMBL accession number AM 181810). In small letters the unrelated bases in the multiple alignment with the corresponding nucleotide sequences of the other species in the *Hypechusa* section are indicated (CAPUTO *et al.*, 2006).

V. esdraelonensis si collochi spazialmente nella stessa zona delle specie della sezione con numero cromosomico $2n=12$.
 Dallo studio delle sequenze ITS (Fig. 3) è stato possibile ottenere una ulteriore indicazione a favore della inclusione di *V. esdraelonensis* nella sezione stessa.

LETTERATURA CITATA

BALL P.W., 1968 - *Vicia* L. In: TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A. (Eds), *Flora Europaea*: 129-136. Cambridge University Press, Cambridge.
 CAPUTO P., FREDIANI M., VENORA G., RAVALLI C., AMBROSIO M., CREMONINI R., 2006 - *Nuclear DNA contents, rDNAs and karyotype evolution in subgenus Vicia. III The heterogeneous section Hypechusa*. *Protoplasma*, 228: 167-177.
 FREDIANI M., CAPUTO P., VENORA G., RAVALLI C., AMBROSIO M., CREMONINI R., 2005 - *Nuclear DNA contents, rDNAs, and karyotype evolution in Vicia subgenus Vicia: II. Section Peregrinae*. *Protoplasma*, 226: 181-190.
 GREILHUBER J., SPETA F., 1976 - *C.-banded karyotypes in the Scilla hohenackeri Group, S. Persica and Pushkinia* (Liliaceae). *Plant Syst. Evol.*, 126: 149-188.
 HUZIWARA Y., 1962 - *Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosomes of Aster*. *Am. J. Bot.*, 49: 116-119.
 KOTSERUBA V.V., VENORA G., BLANGIFORTI S., RUFFINI CASTIGLIONE M., CREMONINI R., 2000 - *Cytology of Vicia species. IX. Nuclear DNA amount, chromatin organization and computer aided karyotyping of a Russian accession of Vicia faba L.* *Caryologia*, 55: 195-204.
 KUPICHA F.K., 1976 - *The infrageneric structure of Vicia*. *Not. Royal Bot. Gar. Edinb.*, 34: 278-326.
 LEHT H., JAASKA V., 2002 - *Cladistic and phenetic analysis of relationships in Vicia subgenus Vicia by morphology and isozymes*. *Plant Syst. Evol.*, 232: 237-260.
 LEVAN A., FREDA K., SANDBERG A.A., 1964 - *Nomenclature for centromeric position of chromosomes*. *Hereditas*, 52: 201-220.
 MAGGINI F., BARSANTI P., MARAZIA T., 1978 - *Individual variation of the NOR in Allium cepa and A. sativum*. *Chromosoma*, 66: 173-183.
 MAXTED N., 1993 - *A phenetic investigation of Vicia L. subgenus Vicia* (Leguminosae, Viciae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 111: 155-182.
 THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J., 1994 - *Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, positions-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucl. Acids Res.*, 22: 4673-4680.
 VENORA G., BLANGIFORTI S., FREDIANI M., MAGGINI F., GELATI M.T., RUFFINI CASTIGLIONE M., CREMONINI R., 2000 - *Nuclear DNA contents, rDNAs, chromatin organization, and karyotype evolution in Vicia sect. Faba*. *Protoplasma*, 213: 118-125.
 VENORA G., CONICELLA C., ERRICO A., SACCARDO F., 1991 - *Karyotyping in plant by an image analysis system*. *J. Gen. Breed.*, 45: 233-240.

RIASSUNTO – Il cariotipo di *Vicia esdraelonensis* è stato descritto tramite un sistema di analisi d'immagine computerizzato e tramite i parametri cariomorfometrici ne è stata determinata la posizione nell'ambito della sezione

Hypechusa. È stato altresì determinato il contenuto di DNA nucleare nei nuclei postsintetici 4C. L'analisi delle sequenze degli spaziatori interni trascritti dei geni riboso-

mali (ITS1 e ITS2) ha confermato l'inclusione di questa specie nella sezione *Hypechusa*.

AUTORI

Monica Ruffini Castiglione (autore di riferimento), Roberto Cremonini, Dipartimento di Biologia, Università di Pisa, Via L. Ghini 5, 56126 Pisa; e-mail: mruffini@biologia.unipi.it
Manuela Frediani, Maria Teresa Gelati, Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica, Università della Tuscia, Via S.C. de Lellis, 01100 Viterbo
Concetta Ravalli, Gianfranco Venora, Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, Via Rossini 1, 95041 Caltagirone

Indagini preliminari sulla filogeografia di *Taxus baccata* L. in Italia

M.C. SIMEONE, A. SALIS, A. PAPINI, R. BELLAROSA e B. SCHIRONE

ABSTRACT - *Preliminary investigations on the phylogeography of Taxus baccata L. in Italy.* - We are currently investigating several Italian populations of yew (*Taxus baccata* L.), aiming at defining the ecological and molecular characteristics of this ancient, extremely adaptable but yet unknown tree species. A full inventory of the stands is being established, and climatic, edaphic and vegetational data are going to implement description of the eco-physiological features of each population and the biology of the individuals. Great relevance is given to the monitoring of the sex-reversal phenomenon. Furthermore, a first molecular inspection in the among-populations genetic diversity is attempted by means of nuclear ribosomal ITS sequence variation analysis. This latter includes several *Taxus* species in order to assess the yet unclear taxonomy of the genus. Preliminary results are here reported, showing an unexpected ability of the yew to cope with different environmental situations, from the most extreme to the more relaxed. Sex ratio and the regeneration ability of the stands may constitute effective indicators of the good health of the populations, as well as of the naturalness of the stand. Molecular data are consistent with the general geographic subdivision of the yew species, highlighting the possibility that *Taxus wallichiana* might be better ranked to the level of *T. baccata* subspecies. Inter-specific genetic diversity of the Italian population could not be well assessed because of the low variation displayed by the marker, although some relict populations were identified; we will next attempt a phylogeographical characterisation of the Italian yew stands by use of mitochondrial and chloroplast DNA.

Key words: biodiversity, ecology, evolution, physiology, *Taxus baccata*

INTRODUZIONE

L'inquadramento sistematico, attualmente riconosciuto, di *Taxus baccata* L. lo vede appartenente alla famiglia delle *Taxaceae*, sottodivisione *Coniopherytyna*, classe *Pinatae*, ordine *Pinales*. In passato le *Taxaceae* si collocavano in un ordine distinto, le *Taxales* (FLORIN, 1948), sistemazione venuta meno grazie alle evidenze genetiche che hanno appurato come queste siano in effetti monofiletiche con altre conifere (CHAW *et al.* 1993).

I fiori, unisessuali come in tutta la divisione, non sono avvolti da brattee. Caratteristica della famiglia è la presenza di microsporofilli peltati, ascellari e solitari, o riuniti in infiorescenze terminali, che presentano 2-8 androsporangî e ovuli solitari portati all'apice dei rami fertili, rispetto ai coni multiovulati delle *Pinaceae*. Il carattere morfologico che più le distingue filogeneticamente è però l'assenza di strobilo femminile. I fiori femminili, isolati all'ascella delle foglie, portano un unico ovulo circondato da un involucre che dopo la fecondazione diviene carnoso e rosso (arillo). La semplicità dell'apparato riproduttore rispetto alle altre *Pinales* non è però dovuta ad una conservazione di un carattere primitivo, quanto ad una riduzione morfologica (GELLINI, GROSSONI, 1996); il cono uniovulato indicherebbe

infatti un carattere di maggiore evoluzione rispetto a quello delle *Pinaceae*.

Le foglie sono tipicamente aciculate con picciolo decorrente sul ramo. Altro macroscopico carattere di distinzione è l'assenza di resina nel legno e, conseguentemente, di canali resiniferi. Il legno è caratterizzato dai raggi omogenei privi di tracheidi trasversali e da ispessimenti spirali delle tracheidi verticali.

La famiglia delle *Taxaceae* comprende cinque generi, quasi tutti situati nell'emisfero boreale e suddivisi in 2 tribù: le *Torreya*, comprendenti *Torreya* Arn. (7 specie tra Asia e Stati Uniti sud-orientali) e *Amentotaxus* Pilg. (4 specie diffuse in Cina e SE Asia), caratterizzate dalla presenza di canali resiniferi fogliari; e le *Taxae*, ove tali canali sono assenti, comprendenti *Austrotaxus* Compton. (1 specie endemica della Nuova Caledonia), *Pseudotaxus* Cheng (= *Nothotaxus* Florin, 1 specie diffusa in Cina centrale) e *Taxus* L. Per tutte le specie il numero cromosomico è $2n=24$, fatta eccezione per la *Torreya* Arnott ($2n=22$).

Studi filogenetici recenti, basati sull'analisi della variabilità nucleotidica dei frammenti ITS (CHENG *et al.*, 2000), hanno effettivamente suddiviso le *Taxaceae* in due cladi sostanzialmente paralleli, quello di *Torreya/Amentotaxus* e quello di *Taxus/Pseudo-*

taxus/Austrotaxus, in accordo con la suddivisione della famiglia in due tribù, *Torreya* e *Taxaeae*.

La classificazione specifica del genere *Taxus* è al centro di discussioni tassonomiche in quanto, secondo alcuni autori, l'intera diffusione boreale della pianta sarebbe riconducibile ad un'unica specie con differenze troppo ridotte per assumere valore sistematico; secondo la maggior parte degli autori, tuttavia, *Taxus* L. comprende 8 specie: *T. baccata* distribuito in Europa, Nord Africa e Asia Minore, *T. wallichiana* nelle montagne dell'Asia centrale, *T. chinensis* in Cina, *T. floridana* in Florida, *T. globosa* in Messico, *T. canadensis* nel versante orientale del Nord America, *T. brevifolia* nelle coste Pacifiche nordamericane e *T. cuspidata* in Giappone. Quest'ultima è l'unica entità che si differenzia in modo palese per la morfologia fogliare, tipicamente falcata e mucronata all'apice. Tuttavia, studi relativi alla composizione chimica del duramen di *T. baccata*, *T. brevifolia*, *T. cuspidata* e *T. floridana*, ne hanno messo in evidenza la totale indistinguibilità (BELLAROSA, 2003). Inoltre, dalle analisi di composizione di 6 *taxani* fogliari (VAN ROZENDAAL *et al.*, 1999), si sono potuti riconoscere 3 gruppi omogenei: 1) *T. globosa-floridana-canadensis*; 2) *T. baccata-cuspidata*; 3) *T. brevifolia*; *T. wallichiana* e *T. chinensis* non sono risultati chiaramente ascrivibili a nessuno dei gruppi precedenti.

Tali apparenti incertezze nella sistemazione tassonomica subgenerica di *Taxus* s.p., supportate da una sostanziale omogeneità a livello fenotipico, inducono a ritenere che il genere abbia esaurito le sue possibilità di differenziazione speciativa, raggiungendo l'acme dell'adattabilità con stirpi che hanno fissato solo localmente alcune variazioni morfo-ecologiche.

Da qui la collocazione di *Taxus baccata* tra le "specie relitte".

L'areale di *T. baccata* è molto vasto, pur se fortemente frammentato. Abbraccia l'intera Europa fino al 62° 30' del parallelo N sulle coste occidentali della Norvegia e il 30° del meridiano E. Lo si ritrova inoltre in Marocco, Algeria, Iran settentrionale, Caucaso e Asia Minore, evidenza che lo colloca tra le specie eurasiatiche *sensu lato* (SPADA, 2003). Data la sua estensione, si può tranquillamente affermare che l'areale di *Taxus baccata* sia superato in estensione solo da quello di *Betula alba* s.l. e da quello di *Populus tremula*.

In Italia, stazioni di tasso sono presenti lungo l'intero arco alpino, appenninico e dolomitico della penisola, con una distribuzione fortemente frammentata e discontinua; lo si rinviene inoltre nelle principali isole del medio Mediterraneo: Sicilia, Sardegna, Corsica e Isola d'Elba.

Una caratteristica eco-fisiologica molto interessante del tasso (normalmente dioico, raramente monoico; SCHIRONE, 2003) è costituita dal fenomeno dell'inversione sessuale, osservato anche in *T. brevifolia*. È stato infatti notato, come anche in Ginepro (ALLISON, 1991), che l'espressione sessuale, pur essendo sotto controllo genico, può subire l'effetto dell'ambiente (luce e disponibilità di acqua e nutrienti) e del vigore delle piante [diametro del

tronco e della volta arborea (SVENNING, MAGÅRD, 1999)]. L'espressione del sesso in una tasseta è variabile; dal 44% di femmine in Inghilterra al 67% in Spagna. In genere, si ritiene che le migliori condizioni ecologiche esaltino il sesso femminile. Sembra però che l'equilibrio migliore, registrato in foreste vetuste nordeuropee, sia di 1-1,3 in favore dei maschi. In Caucaso inoltre si sono potute osservare alcune piante monoiche (1%).

Negli ultimi anni, il laboratorio di Ecologia Molecolare degli Alberi Forestali (Dipartimento D.A.F.) dell'Università della Tuscia ha intrapreso un progressivo censimento e descrizione ecologica e genetica dei popolamenti a *T. baccata* italiani. Gli obiettivi prefissati sono quelli di: (1) raccogliere primi dati per una descrizione ecologico-molecolare di *Taxus baccata*; (2) caratterizzare la biodiversità dei popolamenti italiani; (3) verificare la possibilità di identificare una strutturazione geografica delle diversità; (4) fornire nuove evidenze per una classificazione tassonomica omogenea del genere *Taxus*.

MATERIALI E METODI

Il censimento dei popolamenti si basa sulle informazioni derivate da foto aeree, carte di uso del suolo e Carte Tecniche Regionali, completate da ricognizioni in bosco. Di ogni popolamento è stata determinata l'estensione, il numero di individui, il loro sesso, l'età (metodi dendrometrici), i diametri e le altezze, lo stato fitosanitario e la rigenerazione osservabile. In ogni stazione sono state inoltre valutate le condizioni climatiche ed edafiche e le composizioni fitologiche. Le analisi molecolari hanno previsto il prelievo di 3-6 campioni, l'estrazione del DNA totale mediante il sistema DNA Plant Minikit (Quiagen) e la caratterizzazione degli Spaziatori Trascritti Interni (ITS) dei geni ribosomali, mediante amplificazione PCR con oligonucleotidi specifici (MAGGINI *et al.*, 1998) e determinazione delle sequenze nucleotidiche. Sequenze omologhe sono state prelevate tra quelle disponibili in banca dati (GenBank) per valutare la variabilità intra- ed inter-specifica. Gli alberi filogenetici sono stati costruiti con il della Massima Parsimonia. Nel presente lavoro vengono presentati i risultati relativi ai popolamenti elencati in Tab. 1.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il nostro studio si pone in un'ottica di ampliamento della conoscenza della specie *T. baccata*, al fine della sua salvaguardia perché specie antichissima, autoctona (e come tale facente parte della cultura e delle tradizioni della nostra civiltà), indicatrice della naturalità dei paesaggi e dei boschi, importante nutrimento dell'avifauna e dei selvatici, nonché simbolo delle potenzialità farmacologiche della natura per la lotta ad importanti patologie dell'uomo, quali il cancro.

I popolamenti forestali censiti e studiati, ad oggi (Fig. 1), sono ampiamente caratterizzati dalla presenza, anche esclusiva, di tasso a da fenomeni di rinnovazione della specie più che soddisfacenti, se non in alcune stazioni dove, ancora una volta, l'aspetto brul-

TABELLA 1

Materiale di studio.
Investigated material.

Elenco dei popolamenti di tasso studiati	Elenco delle sequenze ITS di <i>Taxus</i> sp. prelevate in GenBank e loro numero di accessione
Monti della laga	<i>Taxus globosa</i> , AF259286
Monti lepini	<i>T. wallichiana</i> , AF259293
Gargano	<i>T. cuspidata</i> a, AF259289
Monte Limbara	<i>T. cuspidata</i> b, AF259290
Bolotana	<i>T. brevifolia</i> , AF259295
Supramonte	<i>T. canadensis</i> , AF259298
Monte Linas	<i>T. chinensis</i> , AF 259292
Talassemtane (Marocco)	<i>T. chinensis</i> ssp. <i>mairei</i> , AF 259294
Arendal (Norvegia)	<i>T. floridana</i> , AF 259299 <i>T. baccata</i> (Roma, Giard. Bot.), X93991 <i>T. baccata</i> (Harvard Bot. Gard.), AF259291



Fig. 1

Distribuzione dei popolamenti di *Taxus baccata* in Italia (preliminare).

Preliminary report of the *Taxus baccata* populations in Italy.

lo ed inospitale dei suoli è da imputarsi all'azione antropica, sia di pascolo eccessivo, che incendio e di disboscamento (ad esempio, in Sardegna). In alcuni casi (Isola d'Elba, Sardegna meridionale), abbiamo potuto osservare popolamenti nettamente marginali ed isolati dalle cenosi boschive più vicine e che, quin-

di, risultano aver significato relittuale. Trattasi, in questi casi, di situazioni decisamente particolari, le cui origini sono in qualche modo nascoste nei dettagli ecologici che le contraddistinguono.

Il tasso è un albero sempreverde, di portamento maestoso (20-40 m); a maturità la chioma assume forma globosa o piramidale. Le dimensioni sono tuttavia fortemente variabili a seconda dei caratteri stazionali: lo possiamo osservare con portamento cespuglioso o prostrato, se in condizioni ecologiche difficili o estreme; più comunemente lo si può ritrovare sotto forma di arbusto o di alberello alto dai 2 ai 3 metri o meno, fino ad individui di dimensioni ben maggiori segnalati in Puglia, Lazio e Sardegna (fino ai 30-32 metri nella dolina "Neulacoro" a Urzulei (Nuoro) o esemplari di 40 metri segnalati nella costa meridionale del Mar Caspio). Il diametro della pianta può arrivare all'eccezionale misura di cinque metri (esemplare millenario cavo presso Fortingall a Tayside, Perth, in Gran Bretagna con diametro alla base di 5.4 m) a causa del forte concrescimento di più polloni che si fondono assieme dando appunto l'illusione di un unico cormo.

L'architettura della pianta è molto variabile a causa della sua nota capacità di produrre nuovi getti verdi da radici, fusto e rami anche vecchi. La specie è caratterizzata da lento accrescimento e grande longevità potendo arrivare ai mille anni e più; agli esemplari della Kinsley Vale sono stati attribuiti dai 1500 ai 5000 anni. Tuttavia stime tanto grandi possono considerarsi esagerate, soprattutto se attribuite ad esemplari monumentali, considerazione nata dal fatto che l'alta variabilità intraspecifica e l'ambiente possono fortemente condizionare il tasso di crescita, impedendo di conseguenza un valido e unico metodo di stima di incremento da usare come riferimento.

Si aggiunga a questo la caratteristica che accomuna il tasso ad altre specie, in cui esemplari vecchi possono dar luogo a nuovi fusti dalla vecchia ceppaia generando una pianta che comunque appare giovane, complicando ancora il criterio di stima dell'età.

Accrescimento lento, tardivo, longevo, habitus plastico, la specie si è inoltre dimostrata indifferente al tipo di suoli: tutte queste caratteristiche dimostrano come sia una specie impostata sulla tolleranza agli stress ambientali. In Italia la ritroviamo in zone con temperature varianti da minime pari a -30°C, fino a massime di 40°C e, pur essendo una specie a temperamento oceanico, in ambienti sottoposti a forti stress idrici (<320 pioggia mm/anno). Degni di nota sono alcuni esemplari osservati in Sardegna, che da secoli sopravvivono anche in situazioni estreme quali forre calcaree e crepacci, in condizioni di pendenza prossime al 200%. Tale plasticità trova riscontro anche nell'autoecologia della specie. Infatti, *T. baccata*, tradizionalmente considerata specie conclusiva, tardo successionale, per la sua longevità (resiste e trova giovamento dagli schianti di alberi vecchi), l'habitus (gli attributi di altezza e diametro, l'attitudine pollonifera) e il fototemperamento ombra-tollerante, è stato comunque registrato, nella realtà italiana, anche in stadi pionieri (con *Pinus*), intermedi

(con *Quercus* e *Corylus*) e regressivi o fortemente degradati (alcune tassete pure intorno a vecchie cave minerarie in Sardegna) delle successioni. Un'ulteriore esempio della enorme plasticità eco-fisiologica della specie viene dallo studio della sua fisiologia riproduttiva.

Infatti, il tasso è universalmente conosciuto come specie dioica con fioriture maschili e femminili primaverili che portano alla maturazione del frutto sulle piante di sesso femminile nell'autunno dello stesso anno. In realtà, il monitoraggio delle fioriture suggerito dall'osservazione di episodi di antesi maschili autunnali su varie popolazioni italiane (Gargano, Zompo lo Schioppo, Monte Genzana, Sardegna, Monti Lepini) ha fornito risultati inattesi. Specialmente le indagini sul popolamento dei Lepini (M. Sempervisa) ha consentito di impostare un nuovo modello illustrativo delle strategie riproduttive della specie di cui le antesi autunnali costituiscono solo un aspetto minore (e non ancora del tutto chiarito). Infatti, delle 24 piante monitorate per cinque anni consecutivi, solo tre mostravano "fissato" il proprio sesso (nello specifico, maschile). Nelle altre i fenomeni di *sex reversal* o di monoicismo rappresentavano la norma. Così come non era raro il passaggio dalla riproduzione gamica alla moltiplicazione vegetativa (propagazione per polloni radicali): nella Sardegna sud-orientale, una isolatissima popolazione di tasso risulta da anni costituita esclusivamente da individui di sesso maschile.

Sulla base delle indagini di alcuni autori sulle relazioni tra sesso e adattabilità negli alberi (FREEMAN *et al.*, 1980) e delle osservazioni sull'occasionale cosuesualità di *T. brevifolia* (HOGG *et al.*, 1966) e di *T. canadensis* (ALLISON, 1991), si può proporre per *T. baccata* un modello di riproduzione complessa e articolata che si palesa con strategie differenti a seconda delle condizioni ambientali. Quando queste non sono particolarmente favorevoli si affermano le piante maschili che cedono invece il posto a quelle di sesso femminile nelle situazioni migliori. Tale ripartizione può stabilizzarsi ma, laddove le condizioni dell'intorno dovessero modificarsi, si può sempre avere un'inversione sessuale che può servire a fornire la risposta più appropriata al momento contingente. In altre circostanze ancora, forse in occasione di stazioni o momenti particolarmente critici, le fioriture interesserebbero entrambi i sessi per garantire le maggiori probabilità di riproduzione (per autogamia). Quando, infine, le condizioni diventano estreme ai pur flessibili meccanismi di riproduzione gamica si sostituisce una prorompente capacità di propagazione agamica.

È probabilmente grazie a questa ampia facoltà di adattamento riproduttivo che il tasso è riuscito a sopravvivere, nonostante le formidabili pressioni antropiche e ambientali, dal Terziario fino ad oggi, sia pure in cenosi differenti da quelle originarie. Poi, nelle stazioni contraddistinte da clima più permissivo, le varie potenzialità riproduttive hanno conservato la possibilità di esprimersi tutte al massimo grado. Le valutazioni dei tassi di rigenerazione nei popola-

menti studiati hanno fornito dati incoraggianti per la perpetuazione degli stessi. La rinnovazione è una misura della *fitness* del popolamento nell'ecosistema in cui esso vegeta. Diversi elementi portano a considerare che proprio laddove siano rispettati i maggiori elementi di naturalità dell'ambiente la specie sembra potersi conservare ed autopotenziare. Fattori negativi per la rigenerazione sono risultate le esposizioni a sud, troppo calde e soleggiate, soprattutto se aggiunte a stratificazioni monoplane del bosco (aumento evapotraspirazione) e di scarsa altezza media (<10 m). Anzi, è stata osservata correlazione positiva tra basse altezze, grossi diametri e scarsa rigenerazione. Ciò porta ad intuire che la rigenerazione è migliore nelle condizioni di maggiore stratificazione sia verticale che orizzontale, cioè laddove tutte le classi del processo silvi-genetico siano egualmente rappresentate, anche per l'importanza osservata di piante nutrici (piante madri o altre specie, quali agrifoglio o rovo).

La presenza delle *Taxaceae* è attestata già più di 200 milioni di anni fa (BEHERENSMEYER *et al.*, 1992).

Le 6-8 specie attualmente presenti e distribuite nell'emisfero boreale possono essere interpretate, forse, come un'unica varietà, dando in questo modo indicazione di una "entità filogeneticamente antica che abbia saturato, a livello fenotipico, le sue capacità di differenziazione speciativa" (cit. SPADA, 2003), evidenziando in questo modo il suo ruolo di relitto del prequaternario.

La comparsa del tasso nella flora europea risale al Neogene, in una situazione di clima più caldo e umido dell'attuale, e pertanto riconducibile all'attuale analogo subtropicale.

Dall'analisi della morfologia fogliare si nota in effetti come la specie possieda caratteri adattativi tipici delle Gimnosperme delle regioni sub-tropicali, come la forma appiattita e dilatata degli aghi a favore della luce incidente, foglie opposte a disposizione pettinata sui rami plagiotropici. Tutte caratteristiche, queste, che indicherebbero una funzionalità tipica di specie di formazioni forestali con escursioni termiche più ampie e riconducibili ad adattamenti al clima tropicale e subtropicale montano, al quale anche *Abies* è riconducibile.

Con tutta probabilità, è proprio la sua capacità di adattamento, il suo *habitus*, che ancora oggi è possibile osservare, ad avergli consentito non solo di sopravvivere, ma anche di mantenere le sue posizioni attuali, adattamento verosimilmente maturato proprio in un quadro tropicale o tropical-montano (SPADA, 2003).

Com'è facilmente considerabile infatti, le glaciazioni hanno causato un repentino ed improvviso depauperamento nella biodiversità europea, a favore di specie più frugali rispetto ai competitori di maggiori dimensioni e più esigenti: fenomeno estendibile a tutte le specie legnose europee tra cui si ricorda *Corylus* e *Carpinus* in luogo di foreste preesistenti a *Carya* e *Liriodendron*.

Nel cambiamento, dunque, il tasso è probabilmente riuscito a partecipare alla violenta modifica flo-

ristica come una sorta di "spettatore passivo" della scomparsa di numerose latifoglie di origine terziaria e di conifere quali *Sequoia* e *Sciadopitys*, situazione che immediatamente dopo lo favorirà ulteriormente, venendo a mancare tutti i suoi principali competitori.

Per quanto riguarda l'analisi filogenetica del genere *Taxus* (Fig. 2), i dati dell'analisi genetica tra le specie, pur preliminari, sembrano confermare una differenziazione tra le specie in accordo con la loro distribuzione geografica e con quanto riportato in letteratura; è da rilevare come tutti i popolamenti analizzati di *T. baccata* costituiscano un clado monofiletico, comprendente anche *T. wallichiana*.

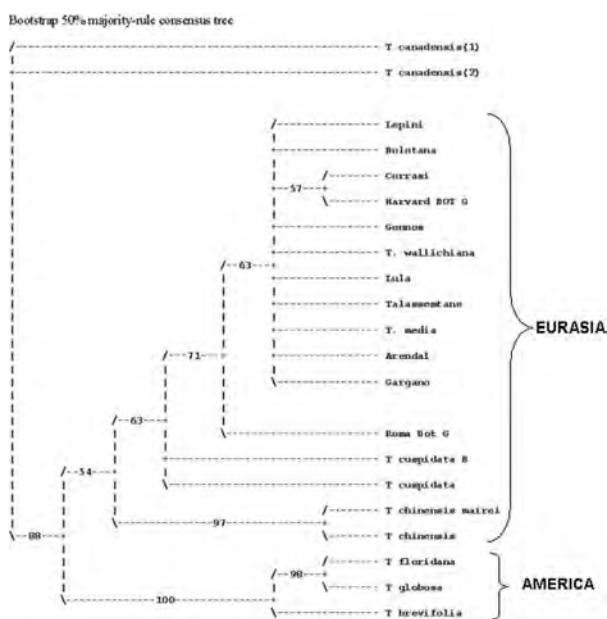


Fig. 2

Albero di Consenso di Massima Parsimonia delle sequenze ITS di *Taxus* sp. e di alcune provenienze di *T. baccata*. Consensus MP tree of the of ITS sequences in *Taxus* sp. and some *T. baccata* provenances.

La posizione di quest'ultimo è una conferma ulteriore di altri studi che asseriscono la totale indistinguibilità tra le due specie, in favore di plausibili endemismi da isolamento; la corologia di *T. wallichiana* può infatti essere interpretata come prolungamento orientale di quella di *T. baccata*.

La presenza di *T. cuspidata* in posizione basale, è in accordo con l'origine eurasiatica del tasso così come pure la presenza di *T. chinensis* come "sister group" di entrambi.

Le specie rimanenti, a distribuzione Nord americana risultano in posizioni più distanti, con *T. canadensis* in posizione di outgroup.

I popolamenti italiani studiati hanno mostrato l'esistenza di una scarsa variabilità intra-popolazione ed inter-popolazione, che dovrà essere necessariamente approfondita e quantificata con altri marcatori mole-

colari; in alcuni casi, l'assoluta omogeneità riscontrata all'interno dei popolamenti potrebbe trovare spiegazione nelle condizioni estreme dei biotopi stessi, quasi a voler indicare la sopravvivenza di individui simili accomunati dalle forti caratteristiche adattative. Non si esclude la probabile elevata presenza di cloni. In altri casi, la presenza del popolamento in una area relativamente aperta agli scambi genetici con altre tassete, il numero omogeneo di maschi e femmine e la rigenerazione osservata possono deporre a favore della diversità intra-popolazione rilevata. Il marcatore ITS non è stato in grado di mostrare alcuna strutturazione geografica della variabilità, al contrario di quanto rilevato in altre specie forestali (es. *Quercus* spp., *Acer* spp., *Tilia* spp., *Eucalyptus* spp.), per altro tutte latifoglie. Infatti anche in *Pinus* spp. si è riscontrata una bassa variabilità intraspecifica e solo una marcata differenziazione tra specie. Ulteriori approfondimenti con marcatori molecolari più adatti ad uno studio biogeografico dovranno vedere necessariamente coinvolte le analisi di DNA mitocondriali (ad eredità materna) e cloroplastici (ad eredità paterna).

Tuttavia, le nostre indagini sono riuscite ad evidenziare la peculiarità genetica di un popolamento sardo (Canali Mau, Sardegna meridionale). Questo popolamento sembrerebbe testimoniare passate relazioni paleogeografiche (con l'area maghrebina) e potrebbe costituire un prezioso serbatoio di variabilità genetica e biologica; inoltre potrebbe costituire un popolamento modello per lo studio dell'espressione sessuale. Però la tasseta è seriamente minacciata e non presenta rigenerazione: questo sembrerebbe dipendere dalle avverse condizioni ecologiche, peggiorate dall'attività dell'uomo; riteniamo pertanto necessaria la conservazione *in-situ* del biotopo e quella *ex-situ* (e, possibilmente in DNA-bank) degli individui più antichi e della loro informazione genetica.

LETTERATURA CITATA

- ALLISON T.D., 1991 - *Variation in sex expression in Canadian yew (Taxus canadensis)*. Am. J. Bot., 78: 569-578.
- BELLAROSA R., 2003 - *Il tasso un albero da conoscere e conservare*. Cogecstre. Penne.
- BEHRENSMEYER A.K., DAMUTHJ D., DIMICHELE W.A., POTTS R., DUES H.D., WINGS S.L., 1992 - *Terrestrial ecosystems through time*. Chicago. 568 pp.
- CHAW S.M., LONG H., WANG B.S., ZHARKIKH A., LI W.H., 1993 - *The phylogenetic position of Taxaceae based on 18S rRNA sequences*. J. Mol. Evol., 37: 624-630.
- CHENG Y., NICOLSON R.G., TRIPP K., CHAW S.M., 2000 - *Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae genera inferred from Chloroplast matK Gene and nuclear rDNA ITS region*. Mol. Phyl. Evol., 14: 353-365.
- FLORIN R., 1948 - *On the morphology and relationships of the Taxaceae*. Bot. Gaz., 110: 31-39.
- FREEMAN D.C., HARPER K.T., CHARNOV E.L., 1980 - *Sex change in plants: old and new observations and new hypotheses*. Oecologia, 47: 222-232.
- GELLINI R., GROSSONI P., 1996 - *Botanica Forestale*, 1: 170-172. Ed. Cedam, Padova.
- HOGG K.E., MITCHELL A.K., CLAYTON M.R., 1966 -

- Confirmation of cosexuality in Pacific yew (Taxus brevifolia)*. Great Basin Naturalist, 54: 377-378.
- MAGGINI F., MARROCCO R., GELATI M.T., DE DOMINICIS R., 1998 - *Lengths and nucleotide sequences of the internal spacers of nuclear ribosomal DNA in gymnosperms and pteridophytes*. Plant Syst. Evol., 213: 199-205.
- SCHIRONE B., 2003 - *Alcuni appunti sul tasso (Taxus baccata L.)*. In: AA.VV., *Il tasso un albero da conoscere e conservare*: 8-12. Cogecstre. Penne.
- SPADA F., 2003 - *Considerazioni sulla fitogeografia e sulla genesi delle comunità a Taxus baccata L. in Europa*. In: AA.VV., *Il tasso un albero da conoscere e conservare*: 13-32. Cogecstre. Penne.
- SVENNING J.C., MAGARD E., 1999 - *Population ecology and conservation status of the last natural population of English yew Taxus baccata in Denmark*. Biol. Cons., 88: 173-182.

VAN ROZENDAAL E.M.L., KURSTJENS S.J.L., VAN BEEK T.A., VAN DER BERG R.G., 1999 - *Chemotaxonomy of Taxus*. Phytochemistry, 52: 427-433.

RIASSUNTO – Viene presentata una nota di studio preliminare sul tasso (*Taxus baccata* L.), allo scopo di definire le caratteristiche ecologiche e molecolari di questa antica, estremamente adattabile ma ancora in parte sconosciuta, specie forestale. Viene presentato un censimento dei popolamenti italiani, corredato di descrizioni edafiche, vegetazionali, eco-fisiologiche e biologiche delle stazioni e dei singoli individui. Particolare importanza viene assegnata al fenomeno del cambiamento di sesso. Si riportano, infine, i risultati di un'analisi molecolare condotta sulle diverse specie appartenenti al genere *Taxus* e su individui dei diversi popolamenti italiani di tasso, allo scopo di una prima ispezione filogeografica sulla specie.

AUTORI

Marco Cosimo Simeone, Antonello Salis, Rosanna Bellarosa, Bartolomeo Schirone, Dipartimento di tecnologie, ingegneria e scienze dell'Ambiente e delle foreste (D.A.F.), Università della Tuscia, Via S. Camillo de' Lellis, 01100 Viterbo
Alessio Papini, Dipartimento di Biologia vegetale, Università di Firenze, Via G. La Pira 4, 50121 Firenze

Indagine biosistemica su *Scilla s.l.* in Italia e generi affini (*Hyacinthaceae*)

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

ABSTRACT - *Biosystematic study on Scilla s.l. in Italy and allied genera (Hyacinthaceae)* - The taxonomic assessment of the genus *Scilla s.l.* and its related genera growing in Italy is defined based on literature data and our own morphological, karyological and phenological studies. A cladistic analysis is also performed in order to test taxonomic role of the selected diagnostic characters. Results agree with the most recent revisions and give support for the proposed synoptical key.

Key words: cladistics, karyology, Italian flora, *Hyacinthaceae*, *Scilla*, systematics

INTRODUZIONE

Il genere *Scilla* così come inteso da LINNEO (1753, 1754) è da tempo ritenuto un gruppo tassonomicamente molto eterogeneo, in quanto sotto questo nome vengono comunemente riuniti *taxa* ben diversificati dal punto di vista filogenetico.

In passato, esso è stato suddiviso in numerosi sottogeneri e sezioni poco affini, che perlopiù ne evidenziavano il carattere artificiale.

Revisioni recenti (SPETA 1987, 1998a, 1998b, 2001; KRENN *et al.* 2001; PFOSSER, SPETA 1999, 2004) sono state condotte su caratteri morfologici e anatomici, riguardanti strutture vegetative e riproduttive come bulbo, foglie, infiorescenza e seme, ma soprattutto su aspetti cariologici, biochimici e biomolecolari che hanno separato le Scille in diversi generi naturali correlati ma tassonomicamente ben differenziati all'interno della famiglia delle *Hyacinthaceae*.

Attualmente il genere *Scilla* s.s. comprende 30 specie riferibili al ciclo di *S. bifolia* L. (incluso il genere *Chionodoxa* Boiss.), distribuite nei territori euro-asiatici, dalla Spagna settentrionale, Francia, Italia e penisola balcanica, fino all'Asia minore e Caucaso.

S. bifolia è l'unica specie di questo gruppo presente nel territorio italiano, poiché gli altri *taxa* che in passato erano trattati come *Scilla* sono oggi inclusi nei generi *Oncostema*, *Prospero*, *Chouardia*, *Hyacinthoides*, *Nectaroscilla*, *Charybdis* e *Urginea* (SPETA l.c.; CONTI *et al.*, 2005; KRENN *et al.*, l.c.).

Questo contributo si propone di rivedere e definire il quadro delle Scille presenti in Italia sulla base di indagini morfometriche, fenologiche e cariologiche, evidenziando i principali caratteri diagnostici che ne consentono una chiara discriminazione. I risultati di

un'analisi cladistica, condotta prevalentemente su parametri morfologici, sottolineano la netta distinzione dei diversi *taxa* italiani e supportano il significato diacritico e filogenetico dei caratteri studiati.

MATERIALI E METODI

Le indagini morfologiche sono state condotte sia su campioni d'erbario che su piante vive, in campo o coltivate nell'Orto Botanico di Catania. I caratteri diagnostici qualitativi e quantitativi sono stati definiti su almeno 15-20 esemplari per ciascun *taxon*, in relazione alla sua diffusione e/o rarità, definendo range costanti ben rappresentativi della variabilità tra tutti i campioni analizzati.

Lo studio cariologico è stato svolto su piastre metafasiche somatiche da apici radicali pretrattati con soluzione acquosa di colchicina 0.3%, fissati in Carnoy e colorati secondo il metodo Feulgen.

L'analisi cladistica ha preso in esame 19 *taxa* presenti sul territorio italiano. *Brimeura fastigiata* (Viv.) Chouard è stata scelta come outgroup. Sono stati selezionati in totale 23 caratteri, tutti relativi a parametri morfologici, ad eccezione del numero cromosomico e della fenologia. La matrice di dati è stata elaborata con il software PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 2003) usando il criterio della massima parsimonia, con analisi bootstrap degli alberi più parsimoniosi, condotta mediante 100 repliche e percentuale di consenso >50%.

RISULTATI

L'unica specie del genere *Scilla* s.s. presente in Italia è

S. bifolia. Si tratta di una orofita nemorale, diffusa in tutto il territorio e caratterizzata da bulbi di piccola taglia, due foglie strette non ciliate e contemporanee ai fiori, scapo solitario con brattee minute o assenti e senza profilli, ovario con logge pluriovulate, semi muniti di elaiosoma biancastro; il numero cromosomico base è $x = 9$, con assetto diploide o più raramente poliploide ($3x$, $4x$, $6x$) (SPETA, 1982; GREILHUBER, SPETA, 1985).

Il genere *Oncostema* comprende una decina di specie in passato riferite al gruppo di *S. peruviana* L., presenti in Italia meridionale, Sicilia, Sardegna, Malta, penisola iberica e Nordafrica. Nel territorio italiano sono segnalate *O. elongata* (Parl.) Speta, *O. sicula* (Tineo ex Guss.) Speta, *O. cerulea* (Raf.) Speta, *O. hughii* (Tineo ex Guss.) Speta, *O. dimartinoi* (Brullo & Pavone) Conti & Soldano. Sono tutte specie endemiche, con areale molto ristretto e talora puntiforme, che si contraddistinguono per avere grossi bulbi, foglie proterante, ampie e ciliate, scapo solitario centrale, larghe brattee, tepali persistenti e filamenti staminali saldati alla base, ovario con logge pluriovulate; il numero cromosomico base è $x = 7$ e 8 , con popolazioni diploidi e tetraploidi (MAUGINI, 1953, 1956; BARTOLO *et al.*, 1979; BRULLO, PAVONE, 1987; FERRARELLA, 1988).

Il genere *Prospero* include, invece, le specie a fioritura tardiva ascritte in passato al ciclo di *S. autumnalis* L., ampiamente diffusa su tutto il territorio italiano. Si differenzia per i bulbi piccoli, le foglie isterante e glabre, 1-4(-8) scapi fioriferi laterali alle foglie, privi di brattee e profilli, pedicelli florali brevi e patenti, ovario con logge biovulate, semi scuri, privi di elaiosoma; ha numero cromosomico base pari a $x = 4$ e $x = 7$ con arrangiamento assai variabile da diploide a tetraploide ed esaploide, e persino aneuploide ($2n = 12$) (BATTAGLIA, 1957, 1963; CONTANDRIOPOULOS, ZEVACO-SCHMITZ, 1989; BALDINI, 1990; SPETA, 1993; EBERT *et al.*, 1996; TISON, 2006). Attualmente in Italia sono noti i seguenti *taxa*: *P. autumnale* (L.) Speta diffuso su tutto il territorio, *P. obtusifolium* (Poir.) Speta subsp. *intermedium* (Guss.) Soldano & Conti, endemismo siculo-sardo-corso; *P. corsicum* (Boullu) Tison, della Sardegna e Corsica; *P. elisae* Speta, segnalato solo per il Friuli.

Il genere *Chouardia* è presente nel nostro territorio con un unico *taxon* *C. litardierei* (Beistr.) Speta, noto per il Friuli e caratterizzato da bulbi piccoli, foglie proterante, larghe e nastriformi, scapi 1-2 centrali, con brattee e profilli piccoli, ovario con logge biovulate, semi privi di elaiosoma, numero cromosomico $2n = 26$ (SPETA, 1998a).

Hyacinthoides è rappresentato in Italia da *H. italica* (L.) Rothm., spontanea in Piemonte e Liguria, e da *H. ispanica* (Miller) Rothm. e *H. non-scripta* (L.) Chouard. ex Rothm., entrambe non conosciute allo stato spontaneo e naturalizzate nelle regioni centro-settentrionali. Esse si contraddistinguono per i bulbi di media dimensione, foglie proterante, nastriformi carenate, scapo solitario centrale, brattee larghe e profilli piccoli, fiori campanulati, ovario con logge pluriovulate, semi senza elaiosoma. Per tutte il corre-

do cromosomico è diploide con $2n = 16$ (SPETA, 1979, 1987).

Il genere *Nectaroscilla* è presente con l'unica specie *N. hyacinthoides* (L.) Parl. naturalizzata su tutto il territorio e caratterizzata da grossi bulbi, foglie larghe e ciliate, antecedenti la fioritura, scapo solitario centrale, brattee e profilli piccoli, tepali persistenti, ovario con logge biovulate, semi neri senza elaiosoma; il corredo cromosomico è diploide ($2n = 20$) (SPETA, 1979; SCRUGLI, COGONI, 1991).

Al genere *Charybdis* vanno riferite molte delle popolazioni in passato ascritte ad *Urginea*, che a differenza degli altri *taxa*, tutti appartenenti alla sottofamiglia *Hyacinthoideae*, è incluso nelle *Urginoideae* in base alla presenza di composti biochimici esclusivi e ai semi solitamente appiattiti. In accordo con PFOSSER, SPETA (2004), in Italia risultano attualmente segnalate: *C. maritima* (L.) Speta, esaploide con $2n = 60$ e nota per l'arcipelago toscano; *C. pancration* (Steinh.) Speta, diploide con $2n = 20$, diffusa nelle regioni centro-meridionali e nelle Isole; *C. undulata* (Desf.) Speta, anch'essa diploide con $2n = 20$ e in Italia nota solo per la Sardegna (MARTINOLI, 1949). Queste specie sono caratterizzate da grossi bulbi piriformi, foglie ampie ed isterante, scapo solitario laterale alle foglie, brattee strette e presenza di profilli, ovario glanduloso, con logge solitamente pluriovulate, semi compressi.

Nel genere *Urginea* rimane inclusa solo *U. fugax* (Moris) Steinh. presente in Sardegna e Italia meridionale, con popolazioni esclusivamente diploidi ($2n = 20$) (BATTAGLIA, GUANTI, 1968; PFOSSER, SPETA, 2004) che si differenziano dal genere *Charybdis* per le foglie filiformi scanalate, lo scapo breve, le brattee squamiformi e l'ovario glabro.

I numerosi dati di letteratura e nostre indagini condotte soprattutto sui generi *Prospero* e *Oncostema*, documentano l'importanza dell'assetto cariologico e della struttura del cariotipo per la distinzione dei diversi *taxa*.

In realtà, la marcata variabilità riscontrata sia nel grado di ploidia che nella morfologia dei cromosomi, rimarca l'esigenza di ulteriori e approfondite indagini sulle diverse popolazioni italiane allo scopo di chiarirne le relazioni a livello tassonomico.

L'analisi cladistica elaborata su caratteri morfologici, cariologici (numero cromosomico base e grado di ploidia) e fenologici (fogliazione e fioritura) ha evidenziato la netta distinzione tra i diversi generi oggi individuati in seno a *Scilla s.l.* Dei 23 caratteri usati (Tab. 1) 21 sono risultati informativi per l'analisi, ad eccezione della disposizione delle squame del bulbo e della presenza di elaiosoma nel seme, tipico solo di *S. bifolia*. L'analisi ha generato 254 alberi ugualmente parsimoniosi lunghi 108 step (CI=0.54, RI=0.67), che sono stati sottoposti ad analisi bootstrap (percentuale di consenso >50%). Nell'albero di semi-stretto consenso (Fig. 1) è possibile osservare come *Scilla*, *Nectaroscilla* e *Chouardia* formino cladi distinti e basali, ben isolati dai rimanenti generi, i quali mostrano invece una maggiore correlazione. Essi formano due cladi distinti, il primo che riunisce i gene-

TABELLA 1

Lista dei caratteri utilizzati per l'analisi cladistica e loro stato.

List of characters and character states for the cladistic analysis.

1 Diametro del bulbo (mm), <10 (0), 10-20 (1), >20-50 (2), ≤50-100 (3), ≤100-150 (4). 2 Squame del bulbo imbricate (0), fastigate (1). 3 Squame persistenti 1 anno (0), 3 anni (1). 4 Fogliazione sinanta (0), proteranta (1), isteranta (2). 5 Foglie 2 (0), 2-5 (1), 5-10 (2), >10 (3). 6 Larghezza foglie (mm) 1-≤3 (0), 3-30 (1), >30-100 (2). 7 Margine fogliare glabro (0), ciliato (1). 8 Scapo centrale (0), laterale (1). 9 Scapo solitario (0), 2-molti (1). 10 Lunghezza scapo (cm) ≤10 (0), 10-50 (1) >50 (2). 11 Fioritura precoce (0), primaverile (1), autunnale (2). 12 Infiorescenza racemo (0), corimbo (1), unilaterale (2). 13 Fiori 1-≤10 (0), 10-50 (1), >50 (2). 14 Brattee (mm) assenti (0), <1.5 (1), 2-10 (2), >10-30 (3), >30 (4). 15 Profilli assenti (0), piccoli (1), >15 mm (2). 16 Perigonio stellato (0), campanulato (1), urceolato (2). 17 Perigonio (mm) <5 (0), 5-10 (1), >10-20 (2). 18 Tepali liberi (0), saldati (1). 19 Ovuli per loggia 2 (0), 2-6 (1), >6 (2). 20 Seme globoso (0), oblungo (1), trigono (2), compresso (3). 21 Elaiosoma assente (0), presente (1). 22 N° crom. base 4 (0), 7 (1), 8 (2), 9 (3), 10 (4), >10 (5). 23 Ploidia 2x (0), 4x (1), 6x (2).

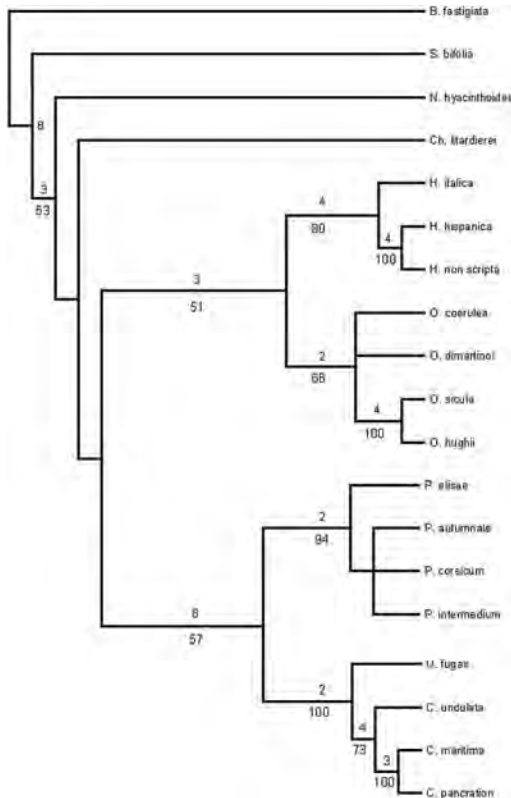


Fig. 1

Albero filogenetico di *Scilla* e generi affini calcolato con il criterio della massima parsimonia. Le percentuali di supporto bootstrap dei cladi sono mostrate se >50%.

Majority rule consensus tree of *Scilla* and allied *taxa* based on maximum parsimony criterion. Percentage of bootstrap support is shown under the branches when >50%.

ri con foglie proterante (*Hyacinthoides* e *Oncostema*) e l'altro quelli con foglie isterante (*Prospero* e le Urgineoidee *Charybdis* e *Urginea*).

Tale risultati trovano una certa corrispondenza in recenti studi filogenetici condotti su dati biomolecolari da PFOSSER, SPETA (1999) per l'intera famiglia delle *Hyacinthaceae*, dove i suddetti generi si separano in modo simile, supportando il valore diacritico dei diversi caratteri utilizzati nella nostra analisi cladistica.

Pertanto, per una facile identificazione delle *Scille* presenti nel territorio italiano, sulla base dei suddetti caratteri sono state elaborate le seguenti chiavi analitiche:

1. Piante a fioritura autunnale (isterante); scapo posto lateralmente alla rosetta fogliare.....2
1. Piante a fioritura primaverile (sinante e proterante); scapo posto al centro della rosetta fogliare....9
2. Infiorescenza multiflora (oltre 50 fiori).....3
2. Infiorescenza pauciflora (2-20 fiori).....5
3. Foglie undulate al margine, larghe 3-10 mm; bulbo largo 2-3,5 cm; scapo alto 20-50 cm; tepali lunghi 10-14 mm.....*Charybdis undulata*
3. Foglie piane al margine, larghe 40-100 mm; bulbo largo 5-15 cm; scapo alto 50-150 cm; tepali lunghi 6-8 mm.....4
4. Bulbo largo 10-15 cm; foglie larghe 5-10 cm; $2n=60$*Charybdis maritima*
4. Bulbo largo 5-10 cm; foglie larghe 4-6 cm; $2n=20$*Charybdis pancration*
5. Foglie oltre 10; brattee presenti; tepali lunghi 10-12 mm; ovario con logge pluriovulate; seme compresso.....*Urginea fugax*
5. Foglie 2-10; brattee assenti; tepali lunghi 3-7 mm; ovario con logge biovulate; seme oblungo..6
6. Foglie larghe 5-25 mm.....*Prospero obtusifolium* ssp. *intermedium*
6. Foglie larghe 1-2 mm.....7
7. Tepali 6-7 mm.....*Prospero elisae*
7. Tepali 3-5 mm.....8
8. Scapo alto 3-6 cm con 2-6 fiori.....*Prospero corsicum*
8. Scapo alto 6-20 cm con 6-20 fiori.....*Prospero autumnale*
9. Foglie 2; racemo con 1-5 fiori; brattee assenti; semi con elaiosoma.....*Scilla bifolia*
9. Foglie più di 2; racemo con più di 5 fiori; brattee sempre presenti; semi senza elaiosoma.....10
10. Tepali lunghi 3-5 mm; semi trigoni; $n=13$*Chouardia litardierei*
10. Tepali lunghi 5-20 mm; semi subglobosi; $n=7-10$11
11. Bulbo 10-20 mm con catafilli annuali; foglie con margine glabro.....12

11. Bulbo 20-80 mm con catafilli triennali; foglie con margine ciliato.....14
12. Foglie larghe 3-6 mm; infiorescenza sub-corimbosa; tepali leggermente saldati alla base, lunghi 5-7 mm.....*Hyacinthoides italica*
12. Foglie larghe 7-35 mm; infiorescenza racemosa; tepali lungamente saldati, lunghi 10-20 m.....13
13. Scapo lungo 5-15 cm; infiorescenza unilaterale, pendula; tepali urceolati; brattee e profilli lunghi 15-25 mm.....*Hyacinthoides non-scripta*
13. Scapo 20-50 cm; infiorescenza mai unilaterale, eretta; tepali campanulati; brattee e profilli lunghi meno di 15 mm.....*Hyacinthoides hispanica*
14. Pianta sinante; infiorescenza racemosa; brattee lunghe max. 1,5 mm; ovario con logge biovulate; $n=10$*Nectaroscilla hyacinthoides*
14. Pianta proterante; infiorescenza corimbosa; brattee lunghe 10-80 mm; ovario con logge 4-6 ovulate; $n=7-8$15
15. Bulbi 2-4 cm; foglie prostrate; scapo alto 7-10 cm.....*Oncostema dimartinoi*
15. Bulbi 4-8 cm; foglie erette o sub-erette; scapo alto 15-50 cm.....16
16. Foglie acute, larghe 5-16 mm; scapo lungo 15-20 cm; infiorescenza lassa con 15-20 fiori.....*Oncostema cerulea*
16. Foglie ottuse, larghe 30-90 mm; scapo lungo 30-50 cm; infiorescenza densa con più di 20 fiori.....17
17. Tepali blu-violetti, lunghi 9-10 mm.....*Oncostema hughii*
17. Tepali bianco-violetti, lunghi 10-12 mm.....*Oncostema sicula*

Ringraziamenti – Il lavoro è stato svolto grazie al contributo finanziario dell'Università degli Studi di Catania (Fondi d'Ateneo).

LETTERATURA CITATA

- BALDINI R.M., 1990 - *Numeri cromosomici per la flora italiana: 1164-1166*. Inform. Bot. Ital., 20: 624-626.
- BARTOLO G., BRULLO S., PAVONE P., 1979 - *Numeri cromosomici per la flora italiana: 617-631*. Inform. Bot. Ital., 11: 149-158.
- BATTAGLIA E., 1957 - *Scilla autumnalis L.: biotipi 2n, 4n, 6n e loro distribuzione geografica*. Caryologia, 10: 75-95.
- , 1963 - *Una mutazione con B cromosomi 2n=14+3B, in Scilla autumnalis L. (Liliaceae)*. Caryologia, 16: 609-618.
- BATTAGLIA E., GUANTI G., 1968 - *New data on the distribution and frequency of B chromosomes in a population of Urginea fugax (Liliaceae) from Sardinia*. Caryologia, 21: 283-285.
- BRULLO S., PAVONE P., 1987 - *Scilla dimartinoi spec. nov. (Liliaceae) from Lampedusa and its relationships with*

- Scilla sicula Tin.* Candolle, 42: 613-620.
- CONTANDRIOPOULOS J., ZEVACO-SCHMITZ C., 1989 - *À propos d'un endémisme cyrno-sarde méconnu: Scilla corsica Boullu*. In: JEANMONOD D., BURDET H. M. (Eds.), *Notes et contributions à la flore de Corse, IV*. Candolle, 44: 337-401.
- CONTI F., ABBATE A., ALESSANDRINI A., BLASI C., (Eds.) 2005 - *An annotated checklist of the Italian vascular flora*. Palombi Editori, Roma
- EBERT I., GREILHUBER J., SPETA F., 1996 - *Chromosome banding and genome size differentiation in Prospero (Hyacinthaceae): diploids*. Plant Syst. Evol., 203: 143-177.
- FERRARELLA A.M., 1988 - *Osservazioni cariologiche su entità sicule appartenenti al gruppo Scilla peruviana L.* Giorn. Bot. Ital., 122: 51.
- GREILHUBER J., SPETA F., 1985 - *Geographical variation of genome size at low taxonomic levels in the Scilla bifolia alliance (Hyacinthaceae)*. Flora, 176: 431-438.
- KRENN L., KOPP B., SPETA F., KUBELKA W., 2001 - *Chemotaxonomical investigation of the genus Charybdis Speta (Urgineoideae, Hyacinthaceae)*. Stapfia, 75: 101-120.
- LINNEO C., 1753 - *Species Plantarum*. Salvii, L., Holmiae.
- , 1754 - *Genera Plantarum*. IV Ed. Salvii, L., Holmiae.
- MARTINOLI G., 1949 - *Ricerche citotassonomiche sui generi Urginea e Scilla della flora sarda*. Caryologia, 1: 329-357.
- MAUGINI E., 1953 - *Ricerche cito-sistematiche su Scilla hughii Tin. (Liliaceae)*. Caryologia, 5(2):167-177.
- , 1956 - *Ricerche citosistematiche su Scilla cupani Guss. (Liliaceae)*. Caryologia, 8: 370-378.
- PFOSSER M., SPETA F., 1999 - *Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences*. Ann. Missouri Bot. Gard., 86: 852-875.
- , 2004 - *From Scilla to Charybdis – is our voyage safer now?* Plant Syst. Evol., 246: 245-263.
- SCRUGLI A., COGONI A., 1991 - *Structural heterozygosity in Scilla hyacinthoides L. and Scilla amoena L. (Liliaceae). Kariological analysis*. Giorn. Bot. Ital., 124: 623-629.
- SPETA F., 1979 - *Karyological investigations in "Scilla" in regard to their importance for taxonomy*. Webbia, 34: 419-431.
- , 1982 - *Die Gattungen Scilla L. s. str. und Prospero Salisb. Im Pannonischen Raum*. Veröff. Intern. Arbeitsgem. ClusiusForschung Güssing: 1-19.
- , 1987 - *Die verwandtschaftlichen Beziehungen von Brimeura Salisb.: ein Vergleich mit den Gattungen Oncostema Rafin., Hyacinthoides Medic. Und Camassia Lindl. (Hyacinthaceae)*. Phytion (Horn, Austria), 26: 247-310.
- , 1993 - *The autumn-flowering Squills of the Mediterranean region*. Proc. 5th OPTIMA Meeting: 109-124. Istanbul, 8-15 Sept. 1986.
- , 1998a - *Systematische Analyse der Gattung Scilla L. (Hyacinthaceae)*. Phytion (Horn, Austria), 38: 1-141.
- , 1998b - *Hyacinthaceae*. In: KUBITZKI K. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, 3: 261-285. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- , 2001 - *Die echte und die falsche meerzwiebel: Charybdys Speta und Stellarioides Medicus (Hyacinthaceae), mit neubeschreibungen und neukombinationen im Anhang*. Stapfia, 75: 139-176.
- SWOFFORD D.L., 2003 - *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TISON J.M., 2006 - *Notes et contributions à la flore de Corse, XXI*. In: JEANMOND D., SCHLÜSSEL A. (Eds.). *Candollea*, 61: 100.

RIASSUNTO – Gli autori definiscono, sulla base dei dati di letteratura e di indagini morfologiche, cariologiche e fenologiche, l'inquadramento sistematico dei *taxa* appar-

tenenti al genere *Scilla s.l* presenti nel territorio italiano. Per valutare la validità tassonomica dei caratteri diacritici selezionati è stata applicata un'analisi cladistica, la quale conferma la netta distinzione tra le Scille italiane in accordo con le più recenti revisioni. I risultati ottenuti hanno, altresì, permesso l'elaborazione di chiavi analitiche per il riconoscimento dei diversi *taxa*.

AUTORI

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

Cambiamento del germoplasma del riso (*Oryza sativa*) coltivato in Italia negli ultimi due secoli

A. SPADA, R. MANTEGAZZA e F. SALA

ABSTRACT - *Temporal trends in Italian rice germ plasm (Oryza sativa)* - Italian rice accessions developed in Italy from 1880 to 2001 were analysed by SSR and AFLP. The accessions were divided in four groups, and for each group several genetic indexes were computed. The level of genetic diversity detected within Italian rice germ plasm remained high during the past two centuries.

Key words: AFLP, genetic diversity, rice, SSR, temporal trends

INTRODUZIONE

Il riso venne importato in Italia nel XV secolo ad opera degli arabi. Da allora molte varietà sono state selezionate con l'obiettivo di migliorare la loro resistenza a stress biotici e abiotici e per rispondere alle esigenze di mercato. Oggi più di 149 varietà sono iscritte al Registro Nazionale.

Durante la storia della sua coltivazione alcune varietà di riso sono state importate dall'estero e sono diventate fonte di caratteri favorevoli per la costituzione di piante migliori.

Una delle tematiche più dibattute è la perdita di biodiversità delle piante coltivate dovuta ad un intenso lavoro di miglioramento e al ridotto numero di parentali utilizzati (ROUSSEL *et al.*, 2004).

In questo lavoro sono state studiate tutte le varietà presenti presso la banca di germoplasma dell'Ente Nazionale Risi, le quali rappresentano l'intero patrimonio genetico italiano (SPADA *et al.*, 2004).

Sul materiale vegetale sono state effettuate analisi utilizzando due tipi di marcatori discontinui, AFLP e SSR.

MATERIALI E METODI

È stato estratto il DNA da germogli di centotrentacinque varietà di riso coltivate in Italia a partire dal 1880 al 2001. Tutte le accessioni sono state analizzate attraverso due marcatori discontinui, SSR (Simple Sequence Repeat) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). I dati ottenuti sono stati usati per la costruzione di due matrici binomiali, analizzate con diversi programmi statistici in grado di fornire indici utili per lo studio della diversità del riso coltivato in Italia quali: PCO (Principal Coordinate

Analysis), AMOVA (Analysis of Molecular Variance) G.D (Gene Diversity), genetic distance, numero di alleli rari e loro variazione (Tab. 1).

TABELLA 1

Percentuale di alleli rari presenti o persi durante la coltivazione del riso tra ciascun gruppo. Number: numero di alleli rari presenti in ciascun gruppo, Percentage: percentuale di alleli rari riferiti al numero totale di alleli rari uguale a 100%, Appear: percentuale di alleli rari comparsi tra due gruppi consecutivi, Disappear percentuale di alleli rari non presenti tra due gruppi consecutivi.

Rare alleles percent appearing and disappearing over time among each groups. Number: total number of rare allele detect in the group; Percentage: of rare allele with 100% representing the total number of rare alleles; Appear: percentage of rare alleles appearing between two consecutive rice groups; Disappear: percentage of rare alleles disappearing between two consecutive rice groups.

	Number	Percentage	Appear	Disappear	
G1	3	15			
G2	4	20	15%	10%	G1-G2
G3	3	15	15%	21%	G2-G3
G4	15	73	73%	0%	G3-G4
Total	19				

CONCLUSIONI

Tutti gli indici ottenuti concordano nell'evidenziare come la diversità del riso italiano non sia diminuita durante la sua coltivazione.

Ciò sembra in gran parte dovuto al mantenimento

del materiale genetico storico, principalmente utilizzato per i piatti tipici (risotto), all' introduzione di nuovo materiale per il miglioramento genetico per la produzione di nuove varietà in grado di soddisfare le nuove esigenze di mercato (es. risi aromatici).

LETTERATURA CITATA

ROUSSEL V., KOENIG J., BECKERT M., BALFOURIER F.,
2004 - *Molecular diversity in french bread wheat accession related to temporal trends and breeding programmes.*
Theor. Appl. Genet., 108: 920-930.
SPADA A., MANTEGAZZA R., BILONI. M., CAPORALI E.,

SALA F., 2004 - *Italian rice varieties: historical data, molecular markers and pedigrees to reveal their genetic relationships.* *Plant Breed.*, 123: 105-111.

RIASSUNTO – In questo lavoro sono state analizzate attraverso marcatori molecolari (SSR e AFLP) le accessioni di riso coltivate in Italia dal 1880 al 2001. Le varietà sono state divise in quattro gruppi e la variabilità genetica presente in ciascun gruppo è stata calcolata attraverso diversi indici. I risultati indicano che la diversità genetica presente nel germoplasma di riso italiano non è diminuita durante il tempo.

AUTORI

Alberto Spada, Raffaella Mantegazza, Francesco Sala, Dipartimento di Biologia, Università di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milano

Identificazione delle popolazioni del gruppo *Ranunculus ficaria* L. dei Monti della Tolfa (Lazio)

F. AVANCINI, M. MATTEUCCI e F. LUCCHESI

ABSTRACT - *Identification of Ranunculus ficaria L. group populations from Tolfa Mountains (Lazio)* - Some *Ranunculus ficaria* complex populations from the Tolfa Mountains were investigated among a wider floristic study carried out in this area. Morphology, caryology, ecology and phenology were studied to solve some systematic and taxonomic topics. The results of these investigations were that all the populations collected were identified as *R. ficaria* L. subsp. *ficaria* instead of subsp. *bulbilifer* Lambinon. As indicated in the recent *Checklist of the Italian Vascular Flora* the presence in Lazio of this taxon is confirmed. Some morphological features mentioned in international floras resulted not valid (nectaries, petals overlapping degree), some others resulted partially valid (flowers and leaves size). The presence/absence of bulbils in leaf axils and well developed achenes helps to distinguish between the diploid and tetraploid cytotype. From the karyological point of view all the samples collected in this area resulted tetraploid with chromosome number $2n = 32$. Levan formula, karyotype length and some symmetry indices (Sy, REC, Stebbins Category) were calculated. Some samples collected in Umbria were also analysed and resulted diploids ($2n = 16$).

Key words: caryology, diploid and tetraploid cytotype, identification, morphology, species complex

INTRODUZIONE

Alcune popolazioni del gruppo *Ranunculus ficaria* L. dei Monti della Tolfa sono state indagate, nell'ambito di un lavoro più ampio sulla flora, con lo scopo di approfondire alcune tematiche sistematiche e tassonomiche del gruppo attraverso indagini morfologiche, cariologiche e fenologiche. Inoltre, queste indagini sperimentali possono contribuire ad individuare dei caratteri "guida" utili per il riconoscimento e allo stesso tempo a migliorare le chiavi sistematiche già esistenti, con particolare attenzione a quei caratteri morfologici spesso ambigui e soggettivi.

Infatti, il gruppo *R. ficaria* L. comprende un insieme di taxa molto affini in cui esistono problemi di sinonimia con confusione nomenclaturale (Tab. 1), tali da

condurre spesso ad una identificazione non corretta.

La regione tolfetana comprende un'area delimitata ad ovest e nord-ovest dal Mar Tirreno e a partire da nord, proseguendo in senso orario, dai corsi del fiume Mignone, del fiume Lenta, del fosso della Caldara ed infine del fosso della Mola. Tale regione forma così un'unità idrogeologica costituita in parte dai rilievi vulcanici della Tolfa e dei Monti Ceriti ed in parte dal complesso dei rilievi flyscioidi che li circondano. Il grande valore naturalistico di quest'area è innegabile; infatti, è caratterizzata da straordinari aspetti geomorfologici, floristici e faunistici e per questo le prime segnalazioni ed istanze di tutela risalgono a molti anni fa.

Già nel 1963 Anzalone segnalava quest'area tra le "zone da proteggere"; nel 1969 l'area figurava tra i "parchi e riserve naturali di preminente importanza nazionale". Attualmente nell'area sono stati individuati tre Siti di Importanza Comunitaria (SIC): 1) IT6030001 Fiume Mignone (medio corso), 2) IT6030003 Boschi mesofili di Allumiere; 3) IT6030004 Valle di Rio Fiume. Tali siti ricadono nella Zona di Protezione Speciale (ZPS) IT 6030005 "Comprensorio meridionale dei Monti della Tolfa".

Come già è stato accennato, la flora dei Monti della Tolfa è stata oggetto di varie ricerche (LUCCHESI, PIGNATTI, 1990a, b; LUCCHESI, DE LILLIS, 1991), ma finora non è disponibile un elenco esauriente di tutte le specie presenti. Ricerche condotte da vari

TABELLA 1

Classificazione del gruppo di R. ficaria L. nelle flore internazionali.

Classification of R. ficaria L. group according to international floras.

Flora d'Italia 1982	Flora Europaea 1993	Flora Italica 1976	N. Flora Analitica d'Italia, 1923-1925
<i>R. ficaria</i> L.	<i>R. ficaria</i> L.	<i>R. ficaria</i> L.	<i>R. ficaria</i> L.
subsp. <i>ficaria</i>	subsp. <i>ficaria</i>	subsp. <i>ficaria</i>	var. <i>typicus</i>
subsp. <i>bulbilifer</i>	subsp. <i>bulbilifer</i>	subsp. <i>bulbilifer</i>	—
subsp. <i>nudicaulis</i>	subsp. <i>calthifolius</i>	subsp. <i>calthifolius</i>	var. <i>nudicaulis</i>
—	subsp. <i>crisocephalus</i>	—	—
<i>R. ficariiformis</i>	subsp. <i>ficariiformis</i>	subsp. <i>ficariiformis</i>	var. <i>grandiflorus</i>

anni (Lucchese, non pubblicato) indicano per il distretto tolfetano circa 1100 entità; tra queste risultano elementi notevoli per rarità e aspetti biogeografici: *Osmunda regalis* L., *Blechnum spicant* L., *Genista pilosa* L., *Adenocarpus complicatus* (L.) Gay, *Anagyris foetida* L., *Vitex agnus-castus* L., *Carex grioletii* Roemer, *Catananche lutea* L., *Isoetes hystrix* Bory, *Lavandula stoechas* L., *Muscari parviflorum* Desf., *Notobasis syriaca* (L.) Cass., *Ulex europaeus* L., *Polygala vulgaris* L.

Inoltre, le diverse influenze bioclimatiche, oceaniche e continentali hanno fatto di questa regione una zona d'incontro fra specie mediterranee (*Quercus ilex*, *Q. suber*), elementi atlantici (*Fagus sylvatica*, *Ruscus aculeatus*, *Ilex aquifolium*) ed elementi orientali-balcanici (*Cercis siliquastrum*). Inoltre, la geomorfologia e l'esposizione verso il mare provocano un effetto di "inversione climatica", che si evidenzia nella presenza del faggio anche a quote di 350 m ca.

MATERIALI E METODI

Le popolazioni del gr. *R. ficaria* sono state individuate e raccolte in alcune località (Tab. 2), che ricadono quasi tutte in due zone principali: Rio Fiume e il Marano; sono stati esaminati cinque campioni per stazione per un totale di 35 campioni.

TABELLA 2

Località di campionamento.
Sites of sampling.

Cod.	località	ambiente
T5	Poggio Casalavio	Bosco misto ripariale
T7	M. Tolfaccia	Perazzeta
T8	Pozzo di Ferro	Cerreta
T12	M. Piantangeli	Prato
T16	Castellazzo	Ontaneto
T19	M. dell'Acqua Tosta	Ontaneto
T22	Infernaccio	Prato

L'analisi cariologica è stata eseguita sugli apici radicali dei campioni raccolti e coltivati in orto. Questi sono stati colorati utilizzando la tecnica Feulgen standard, in quanto questo procedimento è considerato il più adatto per caratterizzare il cariotipo in relazione al numero e alla morfologia dei cromosomi. I preparati cariologici sono stati osservati e fotografati con un microscopio ottico e dalle piastre metafasiche complanari migliori sono stati messi in evidenza: il numero cromosomico, la posizione del centromero, le dimensioni dei cromosomi, numero e posizione dei satelliti.

Sono state calcolate la formula di Levan, la lunghezza totale del cariotipo aploide ($^{TM} (Y + X)$) e poliploide ($^{TM} [(Y + X) \times N]$ in cui N = livello di ploidia), l'indice di simmetria $Sy_i = [(X \text{ medio} / Y \text{ medio}) \times 100]$ e di rassomiglianza cromosomica $REC = \text{rec medio}$, dove $\text{rec} = [(Y + X)_n / Y_1] \times 100$, con Y_1 = il cromosoma più lungo (GREILHUBER, SPETA, 1976) e la Categoria di Stebbins (STEBBINS, 1958).

RISULTATI

Morfologia ed istologia

Per identificare le entità è stato necessario porre l'attenzione sui caratteri morfologici riportati nelle diverse chiavi analitiche (FIORI, 1923-1925; ZANGHERI, 1976; PIGNATTI, 1982; TUTIN *et al.*, 1993): portamento, diametro dei fiori, misure delle foglie, larghezza dei petali e loro grado di sovrapposizione, presenza di bulbilli all'ascella delle foglie, produzione di frutti e loro pelosità. Inoltre, sono stati presi in esame altri due caratteri utilizzati da PIGNATTI (l.c.) e VESELÁ (1969) per differenziare *R. ficaria* L. da *R. ficariiformis* (F. W. Schultz) Rouy & Fouc.: le nervature dei petali e la forma dei nettarii. La coltivazione ha permesso di osservare che il portamento dei campioni si modifica notevolmente nel tempo e che la pianta può assumere un aspetto più eretto e compatto nelle prime fasi della crescita per poi diventare più lasso e prostrato una volta raggiunto il massimo sviluppo. Inoltre, questo carattere può essere influenzato dalla dimensione della pianta e soprattutto dall'ambiente in cui cresce.

Le misure effettuate sui fiori, petali, foglie (Tab. 3) concordano con quanto riportato da PIGNATTI (l.c.) e Flora Europaea per la subsp. *ficaria*, sebbene il range di variabilità si sovrappone anche a quanto riportato per la subsp. *ficariiformis*.

TABELLA 3

Variabilità dei principali caratteri considerati nelle chiavi analitiche.

Variability of the main characters used in analytical keys.

Stazione	Ø Fiori (cm)	Petali (mm)	Foglie (cm)
	± dev. st.	± dev. st.	± dev. st.
T5	3.03 ±0.45	13.51 x 3.52 ±3.86 ±1.04	3.34 x 3.05 ±0.46 ±0.29
T7	2.94 ±0.61	12.56 x 3.41 ±1.62 ±0.87	4.03 x 3.51 ±0.80 ±0.79
T8	2.86 ±0.27	12.90 x 2.90 ±2.42 ±1.10	3.92 x 3.56 ±0.75 ±0.86
T12	2.52 ±0.35	10.97 x 2.41 ±1.54 ±0.99	2.93 x 2.62 ±0.35 ±0.41
T16	3.0 ±0.52	15.31 x 3.62 ±3.29 ±1.39	3.46 x 3.26 ±0.93 ±0.81
T19	2.94 ±0.31	14.50 x 3.10 ±1.51 ±0.74	3.28 x 2.94 ±0.47 ±0.36
T22	2.93 ±0.39	13.10 x 3.60 ±2.23 ±0.84	4.49 x 3.97 ±0.95 ±0.72

Per quanto riguarda il grado di sovrapposizione dei petali (Fig. 1), non risulta un carattere diagnostico preciso poiché si è trovata un'ampia variabilità al riguardo, anche tra i fiori della stessa popolazione.

Per quanto riguarda la presenza di bulbilli all'ascella delle foglie cauline, è un carattere diagnostico delle piante con corredo cromosomico tetraploide (MARSDEN-JONES, TURRILL, 1952; JONES, 1966) che determina una pronunciata capacità di propagazione vegetativa (PERJE, 1951). Quando i bulbilli raggiun-



Fig. 1

Grado di sovrapposizione dei petali.
Petals overlapping degree.

gono il massimo sviluppo, i semi incominciano a deteriorarsi e raramente germinano, poiché il nutrimento necessario per la produzione dell'endosperma viene convogliato nella produzione di queste strutture (MARSDEN-JONES, 1933). I campioni prelevati nell'area di studio presentavano tutti i bulbilli aerei (Fig. 2) e una scarsa produzione di frutti (Fig. 3). Su 35 campioni esaminati, solo 5 presentavano 1-2 acheni maturi e in questi si osservava anche una leggera pelosità.

Per quanto concerne la forma dei nettarii, i campioni tolfetani presentavano entrambe le alternative già menzionate (Fig. 4); tale variabilità è stata riscontrata anche all'interno dello stesso fiore ed è stato anche osservato uno stato intermedio, cioè nettarii di forma allungata e bilobati (Fig. 5).

Per quanto riguarda le nervature dei petali (Fig. 6), sono state riscontrate nervature poco ramificate, un carattere che si avvicina maggiormente a *R. ficaria* L. rispetto a *R. ficariiformis* (F. W. Schultz) Rouy & Fouc., come riportato in letteratura; comunque, sarebbe necessario approfondire il limite oggettivo tra "poco o molto ramificato", come riportato in PIGNATTI (l.c.).

Le popolazioni della Tolfa sono state analizzate anche per le dimensioni e la densità degli stomi (Tab. 4) con lo scopo di verificare alcune ipotesi contrastanti emerse dalla letteratura (NICHOLSON, 1983; WEE SZE YUAN *et al.*, 2003) sulla possibile correlazione tra il livello di ploidia e le dimensioni degli stomi, che in questo caso sembrano abbastanza uniformi e correlabili perciò all'unico assetto tetraploide rinvenuto.

Analisi cariologica

Dal punto di vista cariologico, i tassonomi riconoscono diversi *taxa* intraspecifici all'interno di questo "species-complex", ma dai lavori esaminati è evidente come le quattro sottospecie maggiormente riconosciute siano morfologicamente molto simili e non sempre distinguibili. È possibile, però, individuare (Tab. 5) due dif-



Fig. 2

Bulbills aerei.
Bulbils in leaf axils.

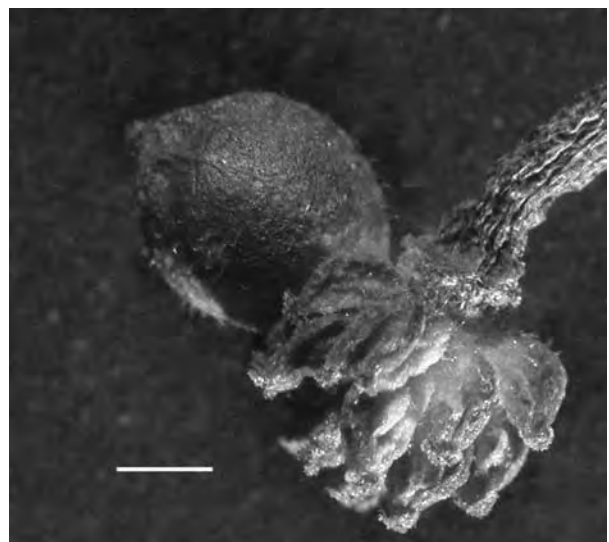


Fig. 3

Achenio maturo (bar 1mm).
Mature achene.

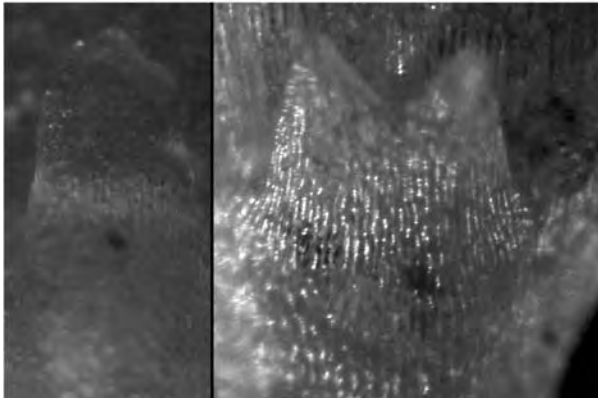


Fig. 4
Nettarii ovali-allungati e arrotondati bilobati.
Oval-extended and round-bilobates nectarines

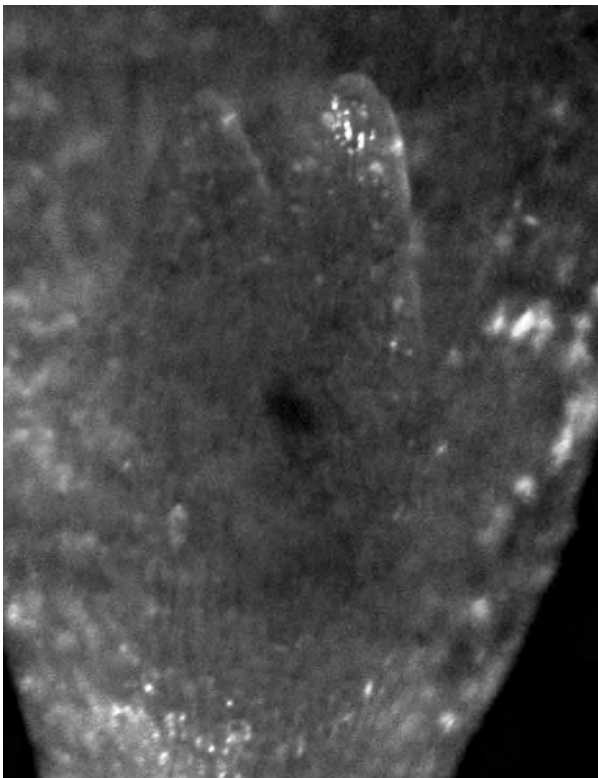


Fig. 5
Nettarii allungati e bilobati.
Extended-bilobates nectarines.

ferenti citotipi (HEYWOOD, WALKER, 1961; GILL, JONES 1972): uno diploide ($2n = 16$) ed uno tetraploide ($2n = 32$).

I campioni raccolti nell'area di Tolfa sono risultati tetraploidi e con numero cromosomico $2n = 32$ (Fig. 7). Dall'analisi delle piastre metafasiche e della loro rielaborazione sono stati ottenuti la formula cromosomica secondo la classificazione di LEVAN *et al.* (1964): $4M + 8m + 8sm + 4st + 4t + 4t^*$; le lunghezze del cariotipo aploide e tetraploide rispettivamente: $44.68 \mu\text{m}$ e

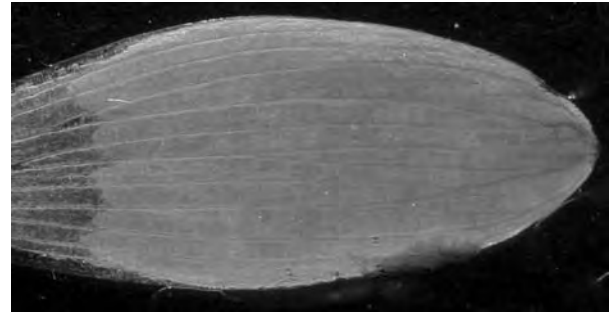


Fig. 6
Nervature dei petali considerate come poco ramificate.
Petal ribs classified as "scarcely branched".

TABELLA 4
Misure e densità stomatica.
Stomata measures and density.

Stazione	Dimensioni (μm) \pm dev. st.	Dens. n°/mm ² \pm dev. st.
T5	48.67 x 39.67 $\pm 7.19 \pm 5.50$	45.00 ± 4.12
T7	56.57 x 41.33 $\pm 3.09 \pm 6.11$	44.60 ± 3.58
T8	45.33 x 36.33 $\pm 4.81 \pm 4.81$	45.40 ± 3.85
T12	48.67 x 39.00 $\pm 6.40 \pm 7.37$	66.00 ± 4.42
T16	48.33 x 37.00 $\pm 6.76 \pm 6.49$	45.40 ± 3.85
T19	48.00 x 39.33 $\pm 6.76 \pm 5.63$	46.20 ± 3.90
T22	51.00 x 39.33 $\pm 7.12 \pm 5.63$	43.20 ± 4.15

TABELLA 5
I numeri cromosomici confermati ripetutamente in Europa.
European chromosome numbers.

<i>R. ficaria</i>	Num. Crom.
subsp. <i>calthifolius</i> (Rchb.) Arc.	$2n = 16$
subsp. <i>fertilis</i> (Clapham) Lawalrée	$2n = 16$
subsp. <i>bulbifer</i> (Marsden-Jones) Lawalrée	$2n = 32$
subsp. <i>ficariiformis</i> Rouy et Fouc	$2n = 32$

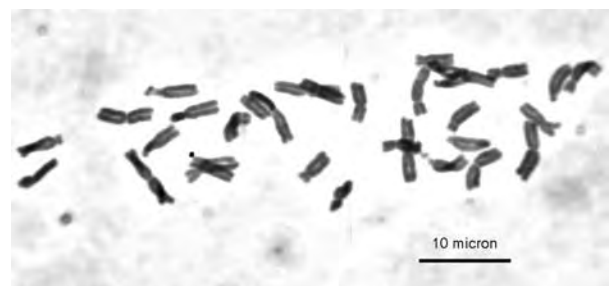


Fig. 7
Piastra metafasic, citotipo tetraploide. ($2n = 32$).
Metaphase plate, tetraploid cytotype ($2n = 32$)

178.72 μm ; l'indice di simmetria Sy_i (GREILHUBER, SPETA, 1976): 48.80; l'indice di rassomiglianza cromosomica REC (GREILHUBER, SPETA, l.c.): 68.61; la categoria, secondo STEBBINS (1958): 2 A.

Da tutti questi dati sono stati ricavati un idiogramma e un cariogramma (Figg. 8, 9).

DISCUSSIONE

Le popolazioni provenienti dai Monti della Tolfa sono risultate inizialmente ascrivibili alla subsp. *bulbillifer* Lambinon che, al momento delle indagini, era considerata rara nella regione mediterranea (JALAS, SUOMINEN *et al.* 1989), in particolare nel Lazio, dove ANZALONE (1996) la segnalava come "forse rara".

La revisione tassonomica condotta da LAEGAARD (2001) contribuisce a chiarire in parte la corretta nomenclatura intraspecifica, indicando, per la forma diploide che non presenta i bulbilli alle ascelle delle foglie, la subsp. *fertilis* Clapham *ex* Laegaard, mentre per la forma tetraploide, con bulbilli ascellari dopo la fioritura, la subsp. *ficaria*.

A seguito di questa revisione i campioni indagati devono essere identificati con la forma tetraploide e quindi attribuiti a *R. ficaria* L. subsp. *ficaria*. Tale attribuzione risulta anche quella più diffusa a livello regionale in Italia, come riportato nella "Checklist of the Italian Vascular Flora" (CONTI *et al.*, 2005).

Tra i caratteri utilizzati nelle chiavi analitiche delle diverse flore per distinguere i *taxa* intraspecifici, alcuni non risultano validi (nettarii, grado di sovrapposizione dei petali) e altri lo sono in parte (dimensione

di fiori e foglie). La presenza/assenza di bulbilli aerei e di frutti ben sviluppati permette però di distinguere i due citotipi diploide e tetraploide.

La fenologia è risultata maggiormente concentrata da febbraio a marzo, rispetto al periodo che viene normalmente indicato nelle flore (gen-mag).

Dal punto di vista cariologico si conferma il numero cromosomico $2n = 32$ e i diversi indici calcolati indicano un cariotipo abbastanza asimmetrico, tendente alla bimodalità, costituito in maggioranza da cromosomi eterobrachiali.

Inoltre, si è potuto osservare che nel citotipo tetraploide bulbillifero ricorrono tutti i tipi cromosomici della forma diploide, inclusi i cromosomi dotati di satelliti. Questo sembrerebbe confermare l'ipotesi avanzata da LARTER (1932) su una possibile derivazione autoploiploide del citotipo tetraploide. Il Sy_i e il REC dei campioni di Tolfa sono stati confrontati con quelli calcolati da D'OVIDIO *et al.* (1985) per *R. ficaria* L. subsp. *calthifolius* (Rchb.) Arcangeli (Tab. 6), in un lavoro sulla "progressione evolutiva" del cariotipo nel genere *Ranunculus* L. I valori sono molto vicini a quelli riportati, e possono quindi contribuire a confermare l'ipotesi secondo cui il cariotipo del genere tenderebbe verso una minore simmetria.

Nell'ambito di queste indagini sono stati raccolti anche dei campioni in altre aree dell'Italia centrale in modo da avere materiale da confrontare con quello dell'area di studio dal punto di vista morfologico e cariologico. Tra questi è interessante segnalare che tre

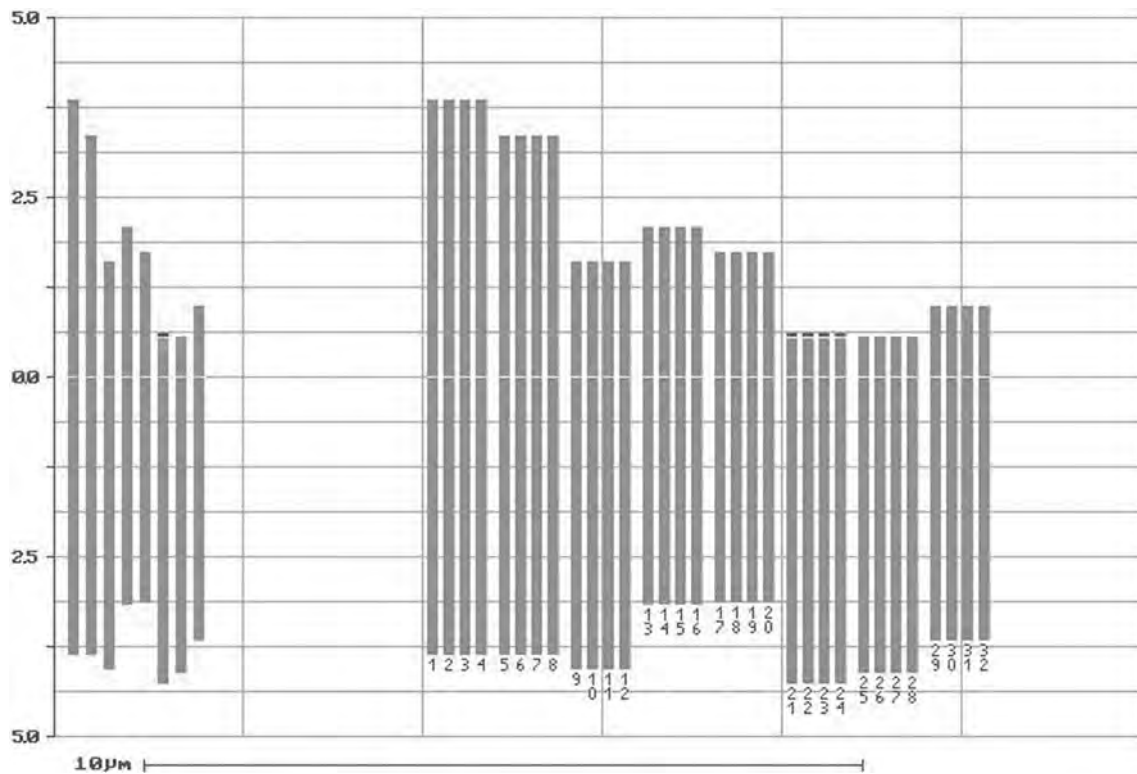


Fig. 8
Idiogramma dai Monti della Tolfa.
Idiogram from Mts. Tolfa.

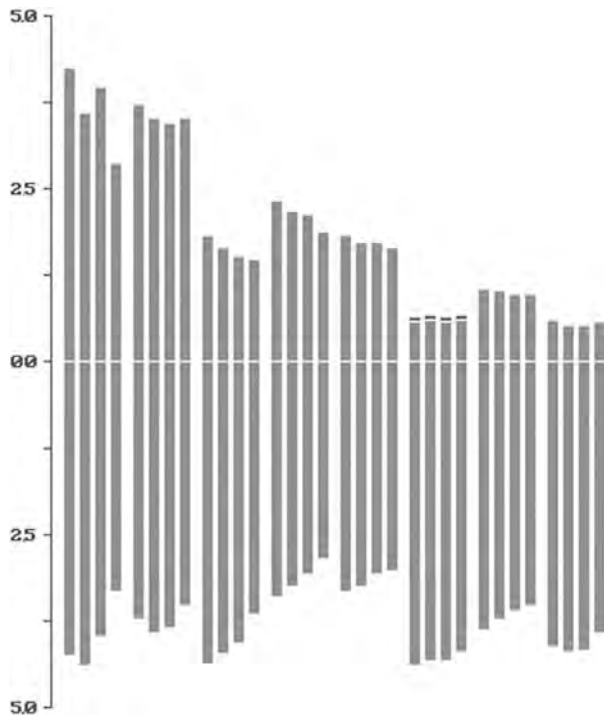


Fig. 9

Cariogramma dai Monti della Tolfa.
Karyogram from Mts. Tolfa.

TABELLA 6

Confronto con gli indici di D'OIDIO et al. (1985).
Comparison with Marchi's indices.

Taxon	lunghezza genoma (μm)	Syi	Rec
subsp. <i>calthifolius</i>	43.09	47.80	69.58
subsp. <i>bulbifer</i>	44.68	48.80	68.61

individui, provenienti dalla località Monte Aspra, in provincia di Terni, a circa 1600 m s.l.m., sono risultati con citotipo diploide e numero cromosomico $2n = 16$ (Fig. 10). Questo dato è molto importante perché nessuna entità con citotipo diploide viene segnalata per l'Umbria e per il Lazio (CONTI et al., 2005).



Fig. 10

Piastra metafasica, citotipo diploide da Monte Aspra ($2n = 16$).
Metaphase plates, diploid cytotype from Mt. Aspra ($2n = 16$).

Ringraziamenti – Si ringrazia il professor G. D'Amato per "l'ospitalità" e i preziosi consigli.

LETTERATURA CITATA

- ANZALONE B., 1996 - *Prodromo della flora romana (elenco preliminare delle piante vascolari spontanee del Lazio). Aggiornamento. Parte 1a.* Ann. Bot. (Roma), 52 (1994), Suppl. 11 (1): 1-81.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C., 2005 - *An annotated checklist of the Italian vascular flora.* Palombi Editori, Roma.
- D'OIDIO R., MARCHI P., MASCI S., VISONÀ L., 1985 - *Evoluzione e cariotipo nel genere Ranunculus L.* Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., Serie B, 92: 299-309.
- FIORI A., 1923-1925 - *Nuova Flora Analitica d'Italia*, vol I: 665-666. Tip. Ricci, Firenze.
- GILL J.J.B., JONES B.M., 1972 - *The distribution of chromosome races of Ranunculus ficaria L. in the British Isles.* Ann. Bot., 36: 31-47.
- GREILHUBER J., SPETA F., 1976 - *C banded karyotypes in the Scilla hohenackeri group, S. persica and puschkinia (Liliaceae).* Plant Syst. Evol., 126: 149-188.
- HEYWOOD V.H., WALKER S., 1961 - *Morphological separation of cytological races in Ranunculus ficaria L.* Nature, 189: 604-605.
- JALAS J., SUOMINEN J. et al., 1989 - *Atlas of Florae Europaeae. Distribution of vascular plants in Europe, 8 (Nymphaeaceae to Ranunculaceae).* Helsinki.
- JONES B.M.G., 1966 - *Variation in Ranunculus ficaria L.* Proc. Botanical Society British Isles, 6: 275.
- LAEGAARD S., 2001 - *Validation of Ranunculus ficaria L. sp. fertilis Clapham ex Laegaard (Ranunculaceae).* Nord. J. Bot., 20 (5): 525-526.
- LARTER L.N.H., 1932 - *Chromosome variation and behaviour in Ranunculus L.* J. Genet., 26: 255-283.
- LEVAN A., FREDGA K., SANDBERG A.A., 1964 - *Nomenclature for centromeric position on chromosomes.* Hereditas, 52: 201-220.
- LUCCHESI F., DE LILLIS M., 1991 - *Productivity and structure in mediterranean pasturelands characterized by Cynara cardunculus L. subsp. cardunculus.* Ann. Fac. Agr. Campobasso, 2: 43-53.
- LUCCHESI F., PIGNATTI S., 1990a - *Sguardo sulla vegetazione del Lazio marittimo.* In: *Ricerche ecologiche, floristiche e faunistiche sulla fascia costiera mediotirrenica italiana.* Accad. Naz. Lincei Quad., 264: 5-48.
- , 1990b - *Cynaro—Cichorietum pumili, un example de diversité floristique exceptionnelle dans les environs de Rome (Italie).* Ecol. Medit., 16: 279-290.
- MARSDEN-JONES E.M., 1933 - *Ranunculus ficaria L.* Proc. Linn. Soc. London, 145: 118-121.
- MARSDEN-JONES E.M., TURRILL W.B., 1952 - *Studies on Ranunculus ficaria L.* J. Genet., 50: 522-534.
- NICHOLSON G.G., 1983 - *Studies on the distribution and the relationship between the chromosome races of Ranunculus ficaria L. in S.E. Yorkshire.* Watsonia, 14: 321-328.
- PERJE A.M., 1951 - *Some causes of variation in Ranunculus ficaria L.* Ark. Bot. Andr. ser., 2: 251-264.
- PIGNATTI S., 1982 - *Flora d'Italia*, 1: 318. Edagricole, Bologna.
- STEBBINS L.G., 1958 - *Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants.* Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 23: 365-378.
- TUTIN T.G., HEYWOOD U.H., BURGESS N.A. et al., 1993 - *Flora Europaea*, 1: 281. Cambridge University Press.
- VESELÁ E., 1969 - *Beitrag zur Taxonomie der Art Ficaria verna Huds.* Preslia (Praha), 41: 313-322.
- WEE SZE YUAN S., THAME A., TIM WING Y., 2003 -

Influence of the increase of ploidy levels (2N to 4N) on the physical attributes of Epidendrum spirit of volunteerism.
Atti "15th Science Research Congr." National University of Singapore.

ZANGHERI P., 1976 - *Flora Italica*, 1: 150. Cedam. Padova.

RIASSUNTO – Alcune popolazioni del gruppo *R. ficaria* L. dei Monti della Tolfa sono state indagate nell'ambito di un lavoro più ampio sull'approfondimento delle conoscenze floristiche di quest'area. Per affrontare alcune tematiche sistematico-tassonomiche del gruppo sono stati indagati aspetti morfologici, cariologici, ecologici e fenologici. Dalle indagini eseguite è risultato che le entità raccolte sui Monti della Tolfa sono identificabili come *R. ficaria* L. subsp. *ficaria* anziché subsp. *bulbilifer* Lambinon (tenendo conto della revisione tassonomica di Laegaard del 2001). Si conferma la presenza di questo *taxon* nel

Lazio come indicato dalla recente *Checklist of the Italian Vascular Flora*. Tra i caratteri utilizzati nelle chiavi analitiche delle diverse flore per distinguere i *taxa* intraspecifici, alcuni non risultano validi (nettarii, grado di sovrapposizione dei petali, lunghezza del peduncolo florale) e altri lo sono in parte (dimensione di fiori e foglie). La presenza/assenza di bulbilli all'ascella delle foglie cauline e di acheni ben sviluppati permette però di distinguere i due citotipi diploide e tetraploide. Dal punto di vista cariologico i campioni esaminati sono risultati tetraploidi e con numero cromosomico $2n = 32$. Sono state ricavate la formula cromosomica di Levan, la lunghezza del cariotipo aploide e tetraploide, l'indice di simmetria Sy_i , l'indice di rassomiglianza cromosomica REC e la categoria secondo Stebbins. Nell'ambito di queste indagini alcuni campioni provenienti dall'Umbria sono risultati avere citotipo diploide ($2n = 16$).

AUTORI

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

Filogenesi del genere *Scorzonera* L. attraverso l'uso di indagini cariologiche e molecolari

M.O. WINFIELD, G. TUCCI, B. TROMBETTA, R.I. DE DOMINICIS e G.F. D'AMATO

ABSTRACT - *Phylogenetic study of the genus Scorzonera L. using chromosome and molecular analysis* – The subtribe *Scorzonerinae* is a morphologically diverse group with its centre of geographic distribution in the Mediterranean and Middle East. It is well supported as monophyletic, but generic circumscription and relationships within the group have proved to be problematic. Particularly problematic is the genus *Scorzonera* L. with regional Florae presenting varying treatments of the species contained therein. In "Flora Europaea", for instance, the *taxa* found in Italy are treated as belonging to one genus, *Scorzonera*. In contrast, "Flora d'Italia" describes two genera, *Scorzonera* and *Podospermum*. Following this latter treatment, in Italy there are twelve species of *Scorzonera* and three of *Podospermum*. To better clarify the relationship of these species, a survey was carried out using three separate approaches: i) chromosome analysis including chromosome number, morphology and banding with Giemsa (C banding) and Quinacrine (Q banding); ii) analysis of Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs); iii) sequence analysis of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and external transcribed spacer (ETS) regions. The three approaches used were consistent with each other but showed different levels of resolution. Taken together, they indicate that the genus *Scorzonera* is composed of at least four highly supported clades. The genus *Scorzonera s.l.* is clearly not a monophyletic grouping and taxonomic revision is called for.

Key words: AFLP, chromosomes, ETS, ITS, phylogeny, *Scorzonera*, taxonomy

INTRODUZIONE

Le *Asteraceae* rappresentano una delle più consistenti famiglie di angiosperme, comprendendo oltre 20.000 specie distribuite in tre sottofamiglie che, a loro volta, sono divise in tribù e sottotribù.

La sottotribù *Scorzonerinae* è un gruppo morfologicamente differenziato la cui distribuzione geografica copre il bacino del Mediterraneo ed il Medio Oriente. Nonostante sia consistentemente accertata la sua origine monofiletica i confini dei generi e le relazioni filetiche interne al gruppo risultano di non facile definizione: alcuni autori ritengono che nella sottotribù siano presenti 7 generi (BREMER, 1994), altri fanno crescere questo numero a 12.

In questo contesto uno dei generi più problematici è *Scorzonera* comprendente circa 160 specie, sull'inquadramento tassonomico delle quali permangono argomentate incertezze (NAZAROVA, 1997; MAVRODIEV *et al.*, 2004).

"Flora d'Italia" (PIGNATTI, 1982), a questo proposito, separa, a seconda della presenza di foglie intere o pennatosette, *Scorzonera* da *Podospermum*; "Flora europaea" (CHARTER, 1976), invece non attribuisce a *Podospermum* il rango di genere, ma divide *Scorzonera* in tre sezioni: *Podospermum* (L.) DC

Boiss, *Scorzonera* L. e *Lasiospora* Less.

In aggiunta a quanto detto, va ricordato che le relazioni tra le varie specie non sempre sono concordanti: *Scorzonera hispanica* L. è descritta in "Flora Europaea" come un'unica specie altamente variabile, mentre, "Flora d'Italia" reputa che a questa devono essere strettamente correlate *S. glastifolia* Willd. e *S. trachysperma* Guss. Inoltre, "Flora Europaea", distingue *S. villosa* Scop. da *S. hirsuta* L. sulla scorta della presenza dell'achenio, glabro oppure irsuto, caratteri questi, che si possono entrambi presentare in *S. villosa* subsp. *columnae* (PIGNATTI, 1982). "Flora Europaea", sottintendendo una maggiore distanza filetica, include *S. villosa* e *S. hirsuta* in sezioni separate (rispettivamente *Scorzonera* e *Lasiospora*).

In questo studio, attraverso un approccio sia cariologico che molecolare, si argomentano dati che chiariscono le relazioni tra i generi *Scorzonera* e *Podospermum* e le specie correlate.

MATERIALI E METODI

I *taxa* oggetto di questo studio sono quelli presenti in Italia: *P. canum* C.A. Meyer (syn.: *S. cana*), *P. laci-*

niatum (L.) DC, (syn.: *S. laciniata*), *S. aristata* Ramond, *S. austriaca* Willd., *S. callosa* Moris, *S. deliciosa* Guss., *S. glastifolia* Willd, *S. hirsuta* L., *S. hispanica* L., *S. humilis* L., *S. purpurea* L., *S. trachysperma* Guss., and *S. villosa* Scop.; *S. rosea* e *P. resedifolium* non essendo stati rinvenuti, di conseguenza, sono stati esclusi. Le sequenze ITS ed ETS di *Centaurea aeolica* Guss. e *Silybum marianum* (L.) Gaertner sono state prodotte e utilizzate come outgroup per le analisi molecolari.

I campioni raccolti nei loro ambienti naturali, sono conservati sia in vivo che come saggi d'erbario nel Dipartimento di Biologia vegetale della "Sapienza" di Roma.

Cariologia

Apici radicali sono stati prelevati da piante raccolte in natura o cresciute in vaso. Essi appartengono a 11 delle 13 specie studiate, infatti, *P. laciniatum* era disponibile solo come saggio d'erbario, *S. callosa* in vaso non ha fornito il materiale necessario.

Gli apici sono stati trattati con colchicina 0.3% per 2h a temperatura ambiente, fissati in etanolo - acido acetico 3:1 almeno per 2h e conservati a 4 °C fino all'uso. Quindi sono stati idrolizzati in HCl 1N a 60°C per 7'-8' e colorati con il metodo Feulgen (HEITZ, 1936). Il C-banding ed il Q-banding sono stati effettuati come descritto rispettivamente da D'AMATO, DE DOMINICIS (1996) e D'AMATO *et al.*, (1977).

Estrazione del DNA

Il DNA genomico totale è stato estratto da singole foglie fresche secondo il protocollo del CTAB ROGERS, BENDICH (1994). Solo per *P. laciniatum* è stato usato materiale d'erbario. Amplificazione, sequenziamento, "editing" ed allineamento delle sequenze delle regioni ITS ed ETS eseguiti come descritto in WINFIELD *et al.* (2006).

Le analisi filogenetiche necessarie sono state sviluppate usando PAUP come descritto in WINFIELD *et al.* (l.c.).

AFLP

Lo studio degli AFLP è stato condotto utilizzando tre paia di primers. La matrice binaria dei marcatori AFLP è stata esaminata attraverso "Principal Coordinate Analysis" (PCO) usando Genstat (PAYNE *et al.*, 1993), come riportato in WINFIELD *et al.* (2006).

RISULTATI

Studi cariologici

Il risultato più evidente è la discriminazione netta, sulla base del numero cromosomico, degli appartenenti al genere *Scorzonera* a due gruppi distinti (Fig. 1).

Delle 11 specie esaminate solo *S. hirsuta* e *S. villosa* hanno un cariotipo $2n = 12$, tutte le altre $2n = 14$. Le due specie $2n = 12$ mostrano un cariotipo caratteristico in termini di morfologia cromosomica generale. Infatti, entrambe posseggono una coppia di gran-

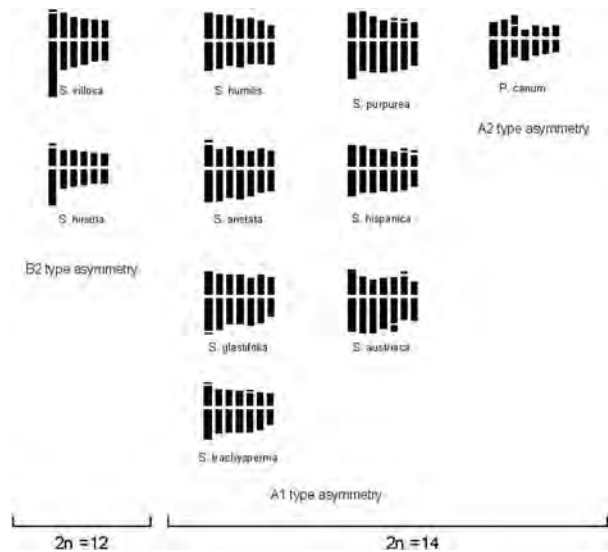


Fig. 1

Numeri cromosomici e cariotipi delle scorzonere studiate. Karyotype and chromosome numbers of the studied *Scorzonera* accessions.

di cromosomi submetacentrici. La simmetria cariotipica è di tipo 2 B. (STEBBINS, 1971).

Utilizzando gli stessi parametri morfologici le specie $2n = 14$ possono essere divise in due sottogruppi (Fig. 1): *S. aristata*, *S. austriaca*, *S. deliciosa*, *S. glastifolia*, *S. hispanica*, *S. humilis*, *S. purpurea* e *S. trachysperma* mostrano un cariotipo a simmetria 1A con tutti i cromosomi di tipo metacentrico; i satelliti, a prescindere dal loro numero, sono sempre terminali. Da questa morfologia si discostano due *taxa*, *P. canum* (syn.: *S. cana*) e *P. laciniatum* (syn.: *S. laciniata*) in cui l'indice di simmetria cariotipica è risultato essere il più basso rispetto alle altre scorzonere con numero cromosomico $2n = 14$.

Il bandeggio sia C che Q non ha prodotto risultati apprezzabili nella maggioranza dei casi studiati. Soltanto in *P. canum* abbiamo potuto riscontrare un bandeggio C in tutti i cromosomi (Fig. 2a). *S. purpurea* è l'unico dei *taxa* studiati a mostrare un caratteristico bandeggio Q (Fig. 2b).

Analisi degli AFLP

Il numero totale dei frammenti prodotti dalle tre coppie di primers è di 177, tutti polimorfici e molti specifici per il singolo taxon. L'analisi PCO, fondata sulla matrice dei dati, individua tre distinti clusters (Fig. 3). La prima coordinata principale (13.9% di variabilità) separa tre *taxa* *S. callosa*, *S. hirsuta* e *S. villosa* dagli altri (cluster A). La seconda coordinata (11.1% di variabilità) separa *S. glastifolia*, *S. hispanica* e *S. trachysperma* (cluster B) dai rimanenti *taxa* (cluster C).

Analisi delle sequenze

La lunghezza delle regioni concatenate ed allineate (ETS, ITS1, 5.8S, ITS2) è di 1084 paia di basi (bp);

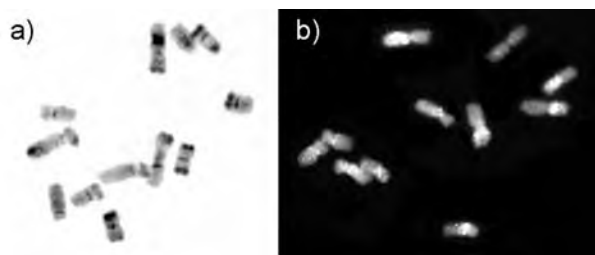


Fig. 2

a) C-banding dei cromosomi di *P. laciniatum*; b) Q-banding dei cromosomi di *S. purpurea*.
a) C-banding of *P. laciniatum* chromosomes; b) Q-banding of *S. purpurea* chromosomes.

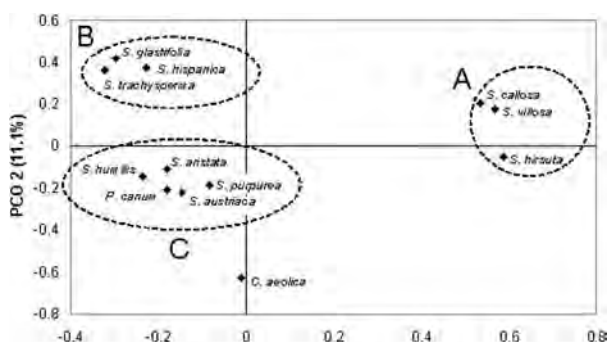


Fig. 3

PCO plot basato sui dati AFLP. Si individuano chiaramente i tre clusters in cui ricadono le specie di *Scorzonera* analizzate. *Centaurea aeolica* cade completamente fuori dei taxa in-group.

PCO plot based on AFLP data. The *Scorzonera* species fall into three clusters. The outgroup taxon *Centaurea aeolica* lies distant from the ingroup taxa.

la lunghezza delle sequenze varia tra 1021 bp (*S. aristata*) e 1048 bp (*S. hirsuta*). Le sequenze ETS sono leggermente più variabili di quelle ITS (media della distanza tra i taxa: 0.208; 0.187; 0.175 rispettivamente per ETS; ITS1; ITS2).

Esclusa la regione 5.8S dall'analisi filogenetica, le sequenze concatenate mostrano 521 caratteri variabili di cui 371 sono informativi. Questi dati permettono la costruzione e la risoluzione di due alberi filogenetici: Maximum likelihood (ML) e Bayesian tree congruenti l'uno con l'altro da cui emerge l'evidenza di quattro distinti cladi sostenuti al 97% ad ognuno dei quali è stato dato, per convenienza, il nome di un taxon in essi contenuti: *Hirsuta*; *Hispanica*; *Aristata* e *Podospermum*. *Hirsuta* comprende: *S. callosa*, *S. hirsuta* e *S. villosa*; *Hispanica*: *S. trachysperma*, *S. deliciosa*, *S. glastifolia* e *S. hispanica*; *Aristata*: *S. aristata* ed *S. humilis*; *Podospermum*: *S. cana*, *S. laciniata* e *S. purpurea*. Per quest'ultima si può considerare in alternativa una collocazione sister rispetto al clado *Podospermum* (Fig. 4).

Resta risolta ambiguamente la posizione di *S. austriaca* sia dall'albero ML che dal Bayesian tree: il primo

forma una politomia con il clado *Hispanica* e quelli *Aristata/ Podospermum*, nel secondo sostiene scarsamente il clado *Hispanica* (valore di credibilità 68).

DISCUSSIONE

Sulla sola base dell'analisi del cariotipo è possibile separare il genere *Scorzonera* in tre cladi. È possibile interpretare i risultati come istanze rappresentative sia di "Flora Europaea", che divide *Scorzonera* in tre sezioni, sia di "Flora d'Italia" in cui *Podospermum* è trattato come genere; tuttavia, i risultati contrastano con quanto sostenuto da "Flora Europaea" che sistema *S. hirsuta* e *S. villosa* in sezioni separate; l'analisi cariologica al contrario evidenzia una grande affinità tra loro nettamente distaccata dagli altri appartenenti al genere. Combinando questi dati con quelli forniti dagli AFLP emerge un quadro ancor meglio definito, che compatta i taxa in tre gruppi. Il gruppo a miglior definizione contiene *S. callosa*, *S. hirsuta* e *S. villosa*, taxa in cui $2n = 12$ (N.B.: pur non avendo potuto produrre evidenze cariologiche per *S. callosa*, sulla scorta dei dati di questo studio è ragionevole predire per questa specie $2n = 12$). Gli AFLP sostengono la separazione di *S. hispanica*, *S. glastifolia* e *S. trachysperma* dagli altri taxa $2n = 14$. Tuttavia è da tenere in conto che la percentuale di bande condivise dai singoli taxa all'interno dello stesso gruppo è piuttosto bassa e questa situazione è comparabile con quella presente in *Gentianella* (WINFIELD *et al.*, 2003). In generale, si riceve da essa l'impressione che le varie specie di *Scorzonera* siano geneticamente ben distinte le una dalle altre.

L'analisi filogenetica resa attraverso le sequenze ITS ed ETS chiarisce ulteriormente le relazioni tra i taxa studiati confermando e superando quanto viene evidenziato dai cariotipi e dagli AFLP. I taxa *S. callosa*, *S. hirsuta* e *S. villosa* formano un clado distinto sostenuto dal 100% di bootstrap. Inoltre, quando sono aggiunte le sequenze omologhe di altre specie di *Scorzonera* (dato non mostrato), diventa evidente che questi taxa non formano un gruppo monofiletico rispetto alle altre specie di *Scorzonera*; pertanto, è possibile concludere che ad essi spetta una collocazione tassonomica indipendente. Anche per le specie $2n = 14$ è verificato quanto suggerito dagli AFLP poiché si formano due distinti cladi: B e C. Il clado B ingloba *S. hispanica*, *S. glastifolia*, *S. trachysperma* e *S. deliciosa*; C potrebbe essere ulteriormente suddiviso in un clado contenente *S. aristata* e *S. humilis* ed un altro contenente le specie appartenenti a *Podospermum* con *S. purpurea* "sister" di quest'ultimo.

Sfortunatamente la collocazione di *S. austriaca* non è risolta dal Maximum likelihood tree, ma risulta come sister group nel Bayesian tree.

In conclusione, tutti i dati emersi da questo studio – cariologici, AFLP, sequenza – sono in accordo tra loro. Essi mostrano che *Scorzonera* s.l. è una entità tassonomica polifiletica. Sulla base del numero cromosomico è proponibile la divisione in due ampi cladi con $2n = 12$ e $2n = 14$ così come già commen-

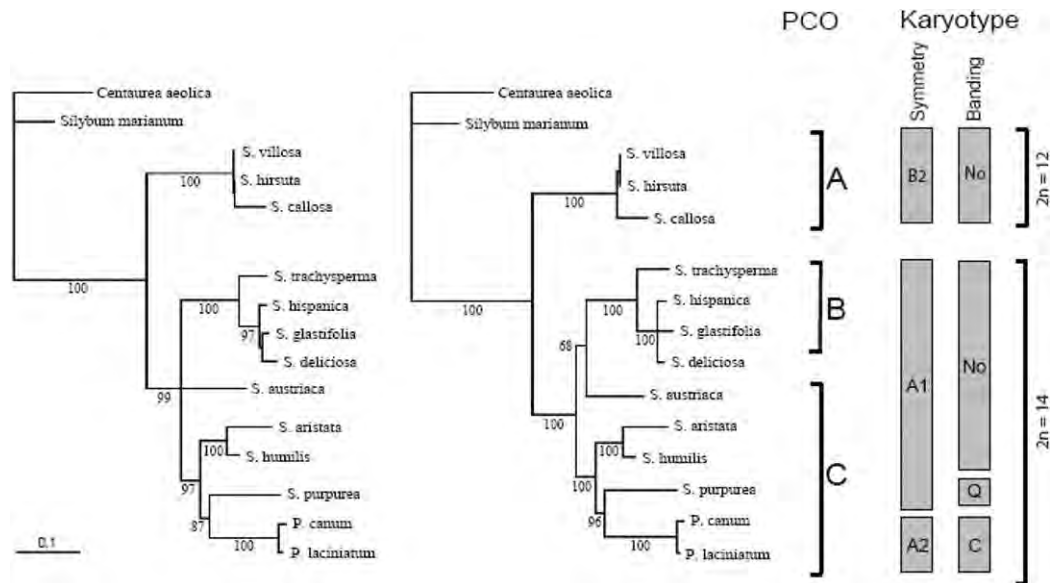


Fig. 4

Alberi filogenetici: a sinistra *Maximum likelihood* (ML); a destra *Bayesian tree*. Raffronti e corrispondenze con i dati cario-
logici e AFLP.

Phylogenetic trees: left *Maximum likelihood* (ML); right *Bayesian tree*. Comparison and agreement with chromosomal and
AFLP data.

tato da altri autori (DIAZ DE LA GUARDIA, BLANCA, 1985, 1987; NAZAROVA, 1997). L'analisi AFLP, anche essa in accordo, suggerisce la divisione in almeno tre distinti gruppi. I dati di sequenza non contraddicono quanto sopra, ma suggeriscono una interpretazione che richiede la scissione di *Scorzonera s. l.* in diversi distinti gruppi ognuno dei quali, forse, potrebbe essere trattato indipendentemente.

Ringraziamenti – Si ringraziano la Signora Elettra Pepe D'Amato ed il Signor Carlo Gregori, per la preziosa assistenza tecnica.

LETTERATURA CITATA

- BREMER K., 1994 - *Asteraceae cladistic & classification*. Timber press, Portland, Oregon.
- CHARTER A.O., 1976 - *Scorzonera*. In: TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A. (Eds.), *Flora Europaea*, 4: 317-322. Cambridge University Press, Cambridge.
- D'AMATO G.F., CAPINERI R., MARCHI P., 1977 - *Localization of heterochromatin segments in the chromosome complement of Tragopogon dubius Scop. and T. pratensis L. (Compositae) by quinacrine fluorescence and Giemsa techniques*. Ann. Bot. (Roma), 35: 447-462.
- D'AMATO G.F., DE DOMINICIS R.I., 1996 - *Heterochromatin pattern, nucleolar organizer regions and rDNA in Pancratium illicum and P. maritimum (Amaryllidaceae)*. Cytobios, 85: 185-194.
- DIAZ DE LA GUARDIA C., BLANCA G., 1987 - *Karyology of the Scorzonera (Compositae) species from the Iberian peninsula Spain Portugal*. Plant Syst. Evol., 156: 29-42
- , 1987 - *Karyology of the Scorzonera (Compositae)*

species from the Iberian peninsula, Spain, Portugal. Plant Syst. Evol., 156: 29-42.

- HEITZ E., 1936 - *Die Nuclear-Quetschmethode*. Ber. Deutsch. Ges., 53: 870-878.
- MAVRODIEV E.V., EDWARDS C.E., ALBACH D.C., GITZENDANNER M.A., PAMELA S. SOLTIS P.S. SOLTIS D.E., 2004 - *Phylogenetic relationships in subtribe Scorzonerinae (Asteraceae: Cichorioideae: Cichorieae) based on ITS sequence data*. Taxon, 53 (3): 699-712.
- NAZAROVA E.A., 1997 - *Karyosystematic investigation of the genus Scorzonera L. s.l. (Lactuceae, Asteraceae)*. Caryologia, 50: 239-261.
- PAYNE R.W., LAND P.W., DIGBY P.G.N., 1993 - *Genstat 5 Reference Manual, release 5*. Oxford University Press.
- PIGNATTI S., 1982 - *"Flora d'Italia"*. Ed agricole, Bologna.
- ROGERS S.O., BENDICH A., 1994 - *Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi*. In: STANTON B.G., SCHILPEROORT R.A. (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publisher, Dordrech.
- STEBBINS L., 1971 - *Chromosomal evolution in higher Plants*. E. Arnold ed., London.
- WINFIELD M.O., D'AMATO G.F., DE DOMINICIS R.I., SALIMBENI P., TUCCI G.F., 2006 - *A cytological and molecular study of the genera Scorzonera L. and Podospermum (L.) DC. (Asteraceae)*. Caryologia, 59: 153-163.
- WINFIELD M.O., WILSON P.J., LABRA M., PARKER J.S., 2003 - *A brief evolutionary excursion comes to an end: the genetic relationship of British species of Gentianella sect. Gentianella (Gentianaceae)*. Plant Syst. Evol., 237: 137-151.

RIASSUNTO – La sottotribù delle *Scorzonerinae* è un gruppo monofiletico all'interno del quale, tuttavia, le relazioni tra i generi e le specie sono problematiche. In parti-

colare il genere *Scorzonera* risulta essere suddiviso in due generi: in "Flora d'Italia" (*Scorzonera* e *Podospermum*, mentre in "Flora Europaea" il gruppo viene considerato monogenerico (genere *Scorzonera*). In questo studio si riportano dati cariologici e molecolari utili a chiarire i rap-

porti tra i due generi e le specie. I nostri risultati mostrano che il gruppo non può essere considerato un genere monofiletico, ma che deve essere suddiviso in almeno tre gruppi distinti, in maggiore accordo con i dati riportati in "Flora d'Italia".

AUTORI

Gianfranco Tucci, Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo
Giovanni Federico D'Amato, Raffaele Ilio De Dominicis, Beniamino Trombetta, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Roma "La Sapienza", P.le A. Moro 5, 00185 Roma
Winfield Mark Owen, Functional Genomics Group, OB120 School of Biological Sciences, University of Bristol, Woodland Road Bristol BS8 1UG, United Kingdom

Funghi delle rocce Antartiche: nuovi generi e specie endemici per genotipi unici

S. ONOFRI, L. ZUCCONI, L. SELBMANN, D. BARRECA e S. RUISI

ABSTRACT - *Fungi from the Antarctic rocks: new endemic genera and species for unique genotypes* - Microfungi living in cryptoendolithic microbial communities inside the porosity of rocks in the Antarctic desert have been studied with molecular tools in order to clarify their taxonomical position. On the basis of phylogenetic results new endemic *taxa* have been described and hypothesis on their origin and evolution are put forward.

Key words: Antarctica, black fungi, phylogeny, rDNA

Le zone deglacciate della Terra Vittoria, la più estesa delle quali è costituita dalle Valli Secche di McMurdo, sono considerate gli ambienti terrestri più ostili. Le estreme condizioni ambientali presenti in queste aree limitano la presenza di forme di vita microbica; ad eccezione, quindi, di rari licheni che colonizzano le superfici delle rocce più protette dall'azione dei venti, la forma di vita predominante in queste aree è quella endolitica. All'interno di rocce porose, apparentemente sterili in superficie, si sviluppano delle comunità microbiche dette criptoendolitiche, che vivono al limite del loro potenziale biologico; tra queste, le più diffuse e studiate sono quelle dominate dai licheni, descritte per la prima volta da E.I. Friedmann nel 1982 in campioni antartici di arenaria del Beacon (FRIEDMANN, 1982).

Tali comunità sono costituite da produttori e decompositori; funghi, lichenizzati e non, alghe e talvolta cianobatteri, colonizzano 1 cm circa di spessore di roccia al di sotto di una crosta rossa superficiale, disposti a formare delle bande differenti biologicamente (Fig. 1).

La forma di crescita criptoendolitica rappresenta probabilmente la forma di adattamento morfologico più significativo dei licheni alle condizioni ambientali estreme delle Valli Secche antartiche. Il lichene, infatti, non produce il tipico tallo e si ritira all'interno di nicchie microscopiche sotto la superficie, dove le condizioni di vita sono più favorevoli. La potenzialità di formare il tallo è comunque mantenuta e, in nicchie protette sulla superficie delle rocce, quali spaccature o crepe poco profonde, è possibile osservare anche strutture riproduttive.

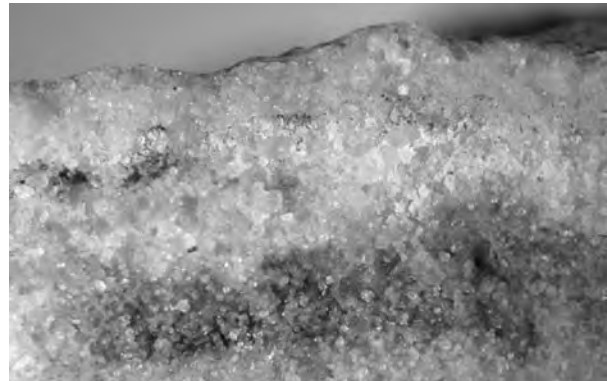


Fig. 1

Frammento di arenaria dalle Valli Secche di McMurdo colonizzato da una comunità criptoendolitica dominata dai licheni (bar 10mm).

Sandstone fragment from McMurdo Dry Valleys colonized by a lichen dominated community (bar 10mm).

Tali comunità sono rimaste isolate dal pool genico globale per tempi significativamente lunghi e le pressioni ambientali hanno contribuito in modo incisivo ai fenomeni di speciazione; pertanto esse sono da considerarsi elettive per la ricerca di specie endemiche (VINCENT, 2000). Le nostre indagini si sono focalizzate sull'enigmatico gruppo dei funghi meristemati neri, sempre rappresentati in tali comunità microbiche, al fine di studiare il processo evolutivo in condizioni ambientali stressanti. Questi organismi presentano caratteristiche morfologiche peculiari:

crescita estremamente lenta, accrescimento meristematico, che assicura un rapporto superficie/volume ottimale, cellule con pareti spesse e fortemente melanizzate (Fig. 2), in grado di prevenire la perdita d'acqua e i danni da radiazione UV, e presenza di sostanze polimeriche extracellulari. A causa della loro scarsa differenziazione ed elevata plasticità morfologica, l'inquadramento tassonomico dei funghi neri criptoendolitici non può prescindere da un approccio di tipo molecolare (DE HOOG, 1999).

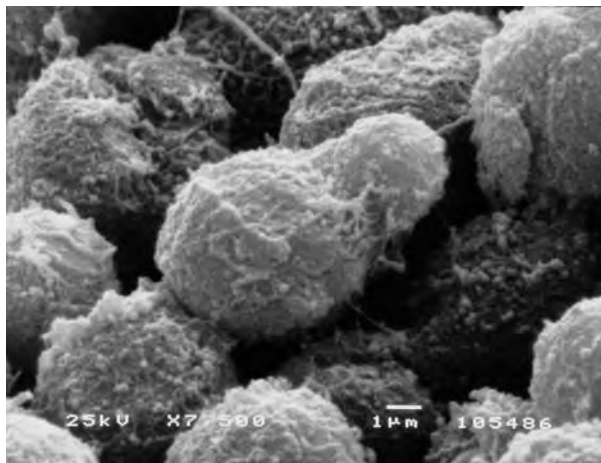


Fig. 2

Cryomyces antarcticus. Cellule melanizzate e con parete spessa osservate con il microscopio elettronico a scansione.
Cryomyces antarcticus. Melanized thick walled cells observed under electronic scanning microscope.

Gli studi filogenetici, condotti al momento su 26 diversi ceppi fungini isolati da rocce raccolte in aree deglacciate sia della Terra Vittoria del Nord che della Terra Vittoria del Sud, hanno permesso di inquadrare la maggior parte dei ceppi fungini studiati in diversi ordini della sottoclasse *Dothideomycetidae* e molti, in particolare, nell'ordine *Dothideales*. Un solo isolato è risultato incluso nell'ordine *Hysteriales* mostrando una certa affinità con altri microfunghi del genere *Coniosporium* Link isolati da monumenti nel bacino del mediterraneo. In particolare è stato descritto un nuovo genere endemico per l'Antartide, il genere *Cryomyces* Selbmann *et al.*, e tre nuove specie endemiche: *C. antarcticus* Selbmann *et al.* (Fig. 2), *C. minteri* Selbmann *et al.* e *Friedmanniomyces simplex* Selbmann *et al.* (SELBMANN *et al.*, 2005). Il genere endemico *Friedmanniomyces* Onofri, con la specie *F. endolithicus* Onofri, precedentemente descritti su base morfologica (ONOFRI *et al.*, 1999), sono stati confermati ora anche su base molecolare. Il genere *Cryomyces*, in particolare, presenta delle caratteristiche genotipiche uniche. Sulla base dei dati ottenuti al momento, si è ipotizzato che questo genere, ritrovato solamente in una ristretta area delle Valli Secche di McMurdo nella Terra Vittoria del Sud, si

possa essere originato localmente e che poi sia rimasto confinato in una zona circoscritta, sia per la velocità di crescita estremamente lenta, sia perché la dispersione, che avviene solo grazie a frammenti di roccia erosi dai venti e dall'attività microbica stessa (NIENOW, FRIEDMANN, 1993), è piuttosto inefficiente.

Tale ipotesi sembra trovare conferma nel fatto che la specie *C. minteri* è stata rinvenuta solo a Battleship Promontory, una località posizionata più a nord rispetto alle zone di ritrovamento di *C. antarcticus*. È quindi plausibile che il tempo di dispersione necessario per coprire uno spazio relativamente breve sia stato comunque sufficientemente lungo da consentire un fenomeno di speciazione.

Sia i due generi endemici *Cryomyces* e *Friedmanniomyces*, che gli altri funghi studiati non inclusi in questi generi, sono risultati filogeneticamente non direttamente correlati tra di loro ma, piuttosto, ciascuno di essi mostra un'affinità più diretta con altri funghi estremofili isolati da ambienti differenti. Si è quindi ipotizzato che tali organismi si siano originati a partire da una micodiversità esistente sulle rocce dell'Antartide quando il continente era posizionato a latitudini più elevate e che, solo alcuni particolarmente estremotolleranti, siano stati positivamente selezionati durante la migrazione del continente verso il Polo Sud. L'adattamento alla vita endolitica in condizioni sempre più proibitive ne avrebbe favorito, quindi, l'isolamento portando alla formazione di endemismi.

I genotipi unici ritrovati in questo studio potrebbero indicare che il processo di speciazione, a causa della forte pressione ambientale, sia avvenuto molto rapidamente, nonostante il lento tempo di accrescimento. I dati indicano, inoltre, che la biodiversità fungina all'interno di queste comunità è comunque lunga dall'essere completamente chiarita. Ci si propone, quindi, di continuare gli studi in Antartide ed in altre zone caratterizzate da condizioni climatiche paragonabili, al fine sia di arricchire le nostre conoscenze sulla biodiversità fungina delle rocce, che di chiarire i meccanismi che governano i processi evolutivi in condizioni estreme.

Ringraziamenti – Si desidera ringraziare il Programma Nazionale per le Ricerche in Antartide (PNRA) e l'European Commission's Research Infrastructure (SYNTHESYS Project).

LETTERATURA CITATA

- DE HOOG, 1999 - *Ecology and evolution of black yeasts and their relatives*. In: DE HOOG G.S. (Ed.), *Studies in Mycology*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn/Delft, The Netherlands. 208 pp.
- FRIEDMANN E.I., 1982 - *Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert*. *Science*, 215: 1045-1053.
- NIENOW J.A., FRIEDMANN E.I., - 1993 *Terrestrial litho-phytic (rock) communities*. In: FRIEDMANN E.I. (Ed.), *Antarctic Microbiology*: 343-412. Wiley-Liss, New York, U.S.A.
- ONOFRI S., PAGANO S., ZUCCONI L., TOSI S., 1999 - *Friedmanniomyces endolithicus* (Fungi, Hyphomycete).

tes), *anam.-gen. and sp. nov., from continental Antarctica*. Nova Hedwigia, 68: 175-181.

SELBMANN L., DE HOOG G.S., MAZZAGLIA A., FRIEDMANN E.I., ONOFRI S., 2005 - *Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic deserts*. Stud. Mycol., 51: 1-32.

VINCENT W.F., 2000 - *Evolutionary origin of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism*. Antarctic Sci., 12: 374-385.

RIASSUNTO – I microfunghi che vivono nelle comunità criptoendolitiche nelle porosità delle rocce del deserto antartico sono stati studiati attraverso indagini molecolari al fine di chiarire la loro posizione tassonomica. Sulla base delle analisi filogenetiche sono stati descritti nuovi *taxa* endemici e sono state formulate delle ipotesi riguardo alla loro origine ed evoluzione.

AUTORI

Silvano Onofri, Laura Zucconi, Laura Selbmann, Donatella Barreca, Serena Ruisi, Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia, Largo dell'Università snc, 01100 Viterbo