

Impiego di analisi morfologica, citologica e molecolare per la caratterizzazione di popolazioni naturali Italiane di *Schoenus* (Cyperaceae)

A. MARIANI, A. CANDOLINI, I. SCOTTI, V. VERONA, C.A. CENCI e A.M. OLIVIERI

ABSTRACT – *Use of morphological, cytological and molecular analyses for the characterization of Italian natural populations of Schoenus (Cyperaceae)* – In the district of Udine, in Northeastern Italy, plants of *Schoenus* (Cyperaceae) were found, which had intermediate characters between *S. nigricans* and *S. ferrugineus*, and were fruitless. This is the first time such plants have been reported in Italy. Morphological, cytological and molecular analyses were therefore carried out on plants of that population – named R after the name of the site – and on plants of *S. nigricans* and *S. ferrugineus* collected from other two sites in the same district – called C and V populations, respectively. The aim of those analyses was to characterize the population of the two original species and determine the genetic structure of the plants displaying intermediate characters and therefore thought to be putative hybrids. The data obtained by using AFLP molecular markers suggests that the putative hybrid population is genetically intermediate between neighbouring populations of the parental species. Cytological analysis confirms the hybrid nature of population R, strongly supporting the initial assumption based on morphological observation and, in particular, on the apparently total sterility of the plants from that population. Further research will be necessary to assess the genetic structure of the hybrids, their stability and their fertility, in order to better understand their significance in the evolution of the genus *Schoenus* and to verify the hypothesis of a genic flow between *S. nigricans* and *S. ferrugineus*.

Key words: AFLP molecular markers, cytology, hybridization, *Schoenus* spp.

Ricevuto il 13 Maggio 2002
Accettato il 23 Ottobre 2002

INTRODUZIONE

Il genere *Schoenus* (Cyperaceae) ha un'ampia diffusione in Europa dalla penisola Scandinava (HEDRÉN, 1997) al sud dell'Europa e fino al Nord Africa (ZANGHERI, 1976).

Di norma viene trovato in suoli umidi e torbosi di differente tipo. Le due uniche specie del genere *Schoenus* che sono presenti in Europa sono *Schoenus nigricans* L. e *Schoenus ferrugineus* L. (WEBB, 1996). *S. nigricans* è principalmente diffuso nella regione mediterranea, compresa l'Italia, e nell'Europa Centrale e Occidentale, incluse le isole Britanniche (HULTÉN, FRIES, 1986). Inoltre è presente nella regione mediterranea orientale fino all'Asia Centrale. *S. ferrugineus* ha invece una distribuzione più ristretta limitatamente alle regioni montuose dell'Europa Centrale, tuttavia è più diffuso di *S. nigricans* nel Nord Europa, più precisamente nell'estremo nord della Norvegia e Finlandia e nel sud della Lapponia fino al Mar Bianco in Russia (HULTÉN, 1971).

Queste due specie, anche se spesso sono state trovate nella stessa zona in aree di sovrapposizione, hanno

esigenze di habitat diverse (EKSTAM *et al.*, 1984). Infatti *S. ferrugineus* cresce in modo predominante in terreni calcarei paludosi ed anche in acque di infiltrazione fredde e, rispetto a *S. nigricans*, è presente in climi più freddi e in pascoli di altura. In certe zone dell'Europa Centrale la sua distribuzione si sovrappone a quella di *S. nigricans*. *S. nigricans*, invece, cresce di solito in zone calcaree con acqua bassa stagnante, ma a volte si trova sui litorali marini; è caratterizzato da un alto contenuto di silicio (ERNEST *et al.*, 1995) ed è considerato una tipica specie pioniera assai importante nelle dune costiere paludose (ERNEST *et al.*, 1988, 1996). Recentemente *S. ferrugineus* ha incontrato un certo interesse in agricoltura in Germania (JILG, BRIEMLE, 1992) e in Inghilterra (GORDON, 1989) in regioni interessate alla riconversione di prati da fieno meso e oligotrofici. Questa specie viene trovata principalmente in condizioni naturali, ma è stata anche oggetto di studi finalizzati al miglioramento della gestione dei prati (SCHOPPGUTH *et al.*, 1994).

S. ferrugineus e *S. nigricans*, invariabilmente considerati dai tassonomisti come due specie (HYLANDER, 1966; WEBB, 1996), possono essere distinti su base morfologica prendendo in considerazione certi caratteri quali il numero delle spighette, la forma e la dimensione dell'infiorescenza, la dimensione della brattea più bassa che circonda l'infiorescenza, la lunghezza delle foglie basali e delle setole perigoniali (HEGI, 1966; HESS *et al.*, 1976; TUTIN *et al.*, 1996). La distinzione tra questi due taxa può essere fatta anche in base al numero cromosomico e cioè $2n=76$ in *S. ferrugineus* e $2n=44-54$ in *S. nigricans* come riportato da HESS *et al.*, 1976; ZANGHERI, 1976; LID, 1985; TUTIN *et al.*, 1996.

Il frutto di *S. nigricans* e *S. ferrugineus* è una noce che viene rilasciata dalla spiga per azione del vento cadendo al suolo. Il rilascio del frutto è più difficile in *S. ferrugineus* tanto che a volte per la sua dispersione è necessaria l'azione degli animali (PETTERSSON, 1958).

Sia *S. ferrugineus* che *S. nigricans* sono a impollinazione incrociata prevalentemente di tipo anemofilo e, pertanto, suscettibile di verificarsi anche a grandi distanze sempre che le barriere riproduttive non siano troppo forti. Tuttavia sembra che in *S. nigricans* possa verificarsi anche autoimpollinazione (SPARLING, 1968).

Sulla base di caratteri morfologici (HESS *et al.*, 1976; TUTIN *et al.*, 1996) ed isoenzimatici (HEDRÉN, 1997) sono state individuate piante e popolazioni ibride tra le due specie di *Schoenus*.

Secondo quanto riportato da HEDRÉN (1997) gli ibridi vengono trovati più frequentemente nelle aree in cui entrambe le specie di *Schoenus* convivono, tuttavia ibridi vitali sono tuttora presenti in qualche area dell'estremo sud della Svezia continentale, anche se in queste zone *S. nigricans* è estinto. Le differenze del numero cromosomico tra le due specie parentali e la bassa produzione di frutti o a volte la loro totale assenza negli ibridi suggeriscono che la maggior parte di loro siano ibridi F1. Comunque, poiché alcune osservazioni relative alla morfologia indicano la presenza di un certo grado di variabilità nelle specie parentali, è importante verificare se gli ibridi sono capaci di produrre piante F2 o di reincrociarsi con le specie parentali e di conseguenza se si può ipotizzare l'esistenza di un flusso genico tra queste specie.

Uno studio condotto da HEDRÉN (1997) a livello molecolare su popolazioni svedesi di *Schoenus* ha messo in evidenza che le due specie parentali erano fertili e differivano soltanto per due dei sette loci polimorfici variabili presenti. Le piante classificate come ibridi per i loro caratteri morfologici intermedi tra quelli dei putativi genitori erano, invece, completamente sterili e condividevano la maggior parte degli alleli presenti nelle specie originali. Sicuramente un'indagine più approfondita per il polimorfismo è possibile se vengono utilizzati marcatori molecolari basati su sequenze di DNA quali, ad es., AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms). Infatti, molti autori hanno utilizzato gli AFLP, in quanto marcatori stabili e riproducibili, in

studi tassonomici per distinguere specie imparentate e varietà e per determinare le loro distanze genetiche (KIERS *et al.*, 2000; QUAGLIARO *et al.*, 2001). Rimane tuttavia importante in studi tassonomici utilizzare, oltre ai marcatori molecolari, anche un'analisi citologica, in quanto essa rappresenta il metodo più incisivo per mettere in evidenza la comparsa di un incrocio interspecifico.

Scopo del presente lavoro è stato quello di studiare, in un'area del Nord Est Italiano in stretta vicinanza del versante sud delle Alpi, popolazioni naturali di *Schoenus* e di verificare, mediante analisi morfologica, citologica e molecolare la presenza di ibridi putativi di *S. ferrugineus* e *S. nigricans*. In questa zona *S. ferrugineus* va considerato marginale (ZANGHERI, 1976; PIGNATTI, 1982), mentre per *S. nigricans* questa stessa regione rappresenta una collocazione più centrale (ZANGHERI, 1976). Dal punto di vista metodologico abbiamo utilizzato l'approccio citologico e molecolare per caratterizzare le piante putativamente ibride; in particolare l'analisi cromosomica è utilizzata per confermare in esse la presenza di riarrangiamenti genetici e per indagare sulla loro capacità riproduttiva.

Inoltre, è sottolineata l'importanza di studiare popolazioni ibride per trarne informazioni di carattere evolutivo e per verificare fino a che punto la variabilità genetica è geograficamente strutturata.

MATERIALI E METODI

Per la presente ricerca sono state utilizzate popolazioni naturali di *Schoenus* spp. collezionate in tre località del Nord Est Italiano. Le tre popolazioni sono state classificate come *S. nigricans*, *S. ferrugineus* e ibridi putativi sulla base dei caratteri morfologici e della fertilità. *S. ferrugineus* è stato raccolto nella località Vuarbis (V), *S. nigricans* a Codroipo (C) e l'ibrido putativo a Raspano (R) dove è stato trovato in associazione con una popolazione di *S. nigricans*. Piante appartenenti a *Eleocharis carniolica* sono state raccolte a Eggeralm, Austria, e sono state indicate con O (outgroup) e usate come materiale di controllo. Tutte le località di raccolta, eccetto quella della popolazione O, sono situate nella provincia di Udine, e più dettagliate informazioni sono disponibili presso uno degli Autori: A. CANDOLINI.

I caratteri morfologici, quali l'altezza della pianta, la lunghezza della brattea e il numero di frutti per infiorescenza, sono stati rilevati su 25 – 30 piante per ciascuna popolazione. Porzioni vegetative di queste piante sono state trapiantate in vaso e poste parte in serra e parte in campo per poter essere utilizzate per analisi citologiche e molecolari. Le analisi citologiche e molecolari sono state eseguite su quattro piante per ciascuna popolazione.

Va inoltre tenuto presente che il ciclo vitale, la germinabilità dei semi estremamente bassa a seguito della particolare costituzione del tegumento e la biologia fiorale delle piante di *Schoenus* non permettono di effettuare analisi citologiche su vasta scala. Pertanto è stato deciso di focalizzare l'analisi citologica e molecolare su un campione di piante per il

quale era possibile ottenere dati completi e inequivocabili. L'analisi molecolare è stata effettuata anche su quattro piante di *Eleocharis carniolica* che hanno rappresentato la specie di riferimento. Il numero cromosomico somatico ($2n$) è stato ottenuto da apici radicali e sono state usate antere prima della deiscenza per verificare il comportamento dei cromosomi durante la microsporogenesi. Antere mature sono state usate per la determinazione della vitalità e della morfologia dei granuli pollinici.

In particolare, apici radicali sono stati pretrattati per 24 ore in ghiaccio e quindi per altre 4 ore a temperatura ambiente in una soluzione satura di α -bromonaftalina prima di essere fissati in FAA (alcol 70% 90%, acido acetico 5%, formaldeide 5%). La colorazione è stata eseguita secondo la tecnica di Feulgen (fucsina basica) con idrolisi in HCL/N a 60°C per 30 minuti. Successivamente, gli apici radicali sono stati macerati in cellulasi all'1% a 40°C per 15 minuti e poi schiacciati in orceina acetica al 2%. Il conteggio cromosomico è stato eseguito su 30 metafasi ben aperte per ogni campione. Per l'analisi della meiosi, le spighette sono state fissate in alcool assoluto-acido acetico 3:1, idrolizzate in HCL/N a 60°C per 15 minuti e quindi poste in fucsina basica per 1 ora. Le antere sono state schiacciate in orceina acetica al 2% per intensificare la colorazione delle cellule madri del polline e delle microspore. Data la particolare durezza dei tessuti è stato necessario aumentare la durata dell'idrolisi sia per le preparazioni mitotiche che meiotiche e utilizzare il trattamento con cellulasi come ammorbidente. Per l'analisi del polline i vetrini sono stati preparati con carminio acetico al 2% e glicerina 1:1.

Per quanto riguarda l'analisi molecolare le sedici piante analizzate sono state saggiate con marcatori AFLP come descritto in SCOTTI *et al.* (2002) combinando i primer *EcoRI* E65 e E69 con i primer *MseI*, M48, M52, M53, M58, M59 e M60. In totale sono stati identificati e registrati 130 frammenti come presenza/assenza di banda. Questi dati sono stati sottoposti ad analisi statistica secondo il metodo della massima parsimonia di Wagner usando il programma MIX del pacchetto PHYLIP (FELSENSTEIN, 2001). Tale analisi è stata effettuata con un data set artificiale di 1000 repliche, ottenuto applicando il programma SEQBOOT, dello stesso pacchetto, ai dati originali. In base a questa analisi è stato ottenuto

un cladogramma che rappresenta le relazioni di similarità genetica tra le singole piante analizzate. Inoltre è stata prodotta una matrice delle distanze genetiche tra singole piante, utilizzando il programma RESTDIST, incluso nel pacchetto PHYLIP, basato su una derivazione della misura di distanza genetica di NEI, LI (1979).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Analisi morfologica

Durante un sopralluogo della flora locale in un'area della provincia di Udine, località Raspano, a stretto ridosso del versante Sud delle Alpi, sono state osservate piante di *Schoenus* che mostravano un aspetto intermedio tra *S. nigricans* e *S. ferrugineus* e che erano prive di frutti. Queste piante sono risultate sterili per due anni successivi, sia durante osservazioni condotte nel sito originale che dopo trapianto in serra e in campo. La produzione di seme è stata normale per le due specie originali.

I risultati dell'analisi morfologica relativa ai tre caratteri considerati, utilizzati comunemente per classificare *S. nigricans* e *S. ferrugineus*, cioè, altezza del fusto, lunghezza della brattea basale dell'infiorescenza e numero di frutti (achenii) per infiorescenza, sono riportati nella Tab. 1.

I valori osservati per le due specie originali sono in accordo con quelli riportati da precedenti Autori (HOFLER, KNOLL, 1959; TUTIN *et al.*, 1996; PIGNATTI, 1982) per cui si può affermare ragionevolmente che le popolazioni di Vuarbis (V) e di Codroipo (C) appartengono rispettivamente a *S. ferrugineus* e *S. nigricans*. Ciò appare confermato anche dal fatto che i valori, non riportati nella Tabella, relativi al carattere lunghezza delle setole perigoniali, sono compresi entro il range di variabilità indicato in letteratura. In *S. ferrugineus* le setole perigoniali sono molto più lunghe dell'achenio, mentre in *S. nigricans* sono corte tanto che non superano in lunghezza la cariosside. Per quanto riguarda la popolazione della palude di Raspano (R) i valori dei tre caratteri considerati sono intermedi rispetto alle due popolazioni identificate come *S. ferrugineus* e *S. nigricans*, anche se i valori della lunghezza della brattea sono più vicini a quelli di *S. ferrugineus*. La stessa cosa si può dire anche per la forma e le dimensioni dell'infiorescenza (Fig. 1a-d).

TABELLA 1

Caratteristiche morfologiche e fertilità in popolazioni di *Schoenus* spp. del Nord-Est d' Italia.
Morphological characters and fertility of *Schoenus* spp. populations from Northeastern Italy.

Specie	Località di raccolta	Altezza del fusto cm \pm es	Lunghezza brattea basale dell'infioresc. mm \pm es	Numero di frutti per infiorescenza
<i>S. nigricans</i>	Codroipo (C)	56,8 \pm 1,5	32,8 \pm 4,5	17,2 \pm 1,6
Ibridi putativi	Raspano (R)	53,1 \pm 1,3	17,3 \pm 0,6	0
<i>S. ferrugineus</i>	Vuarbis (V)	48,2 \pm 2,0	15,8 \pm 1,2	1,4 \pm 0,9

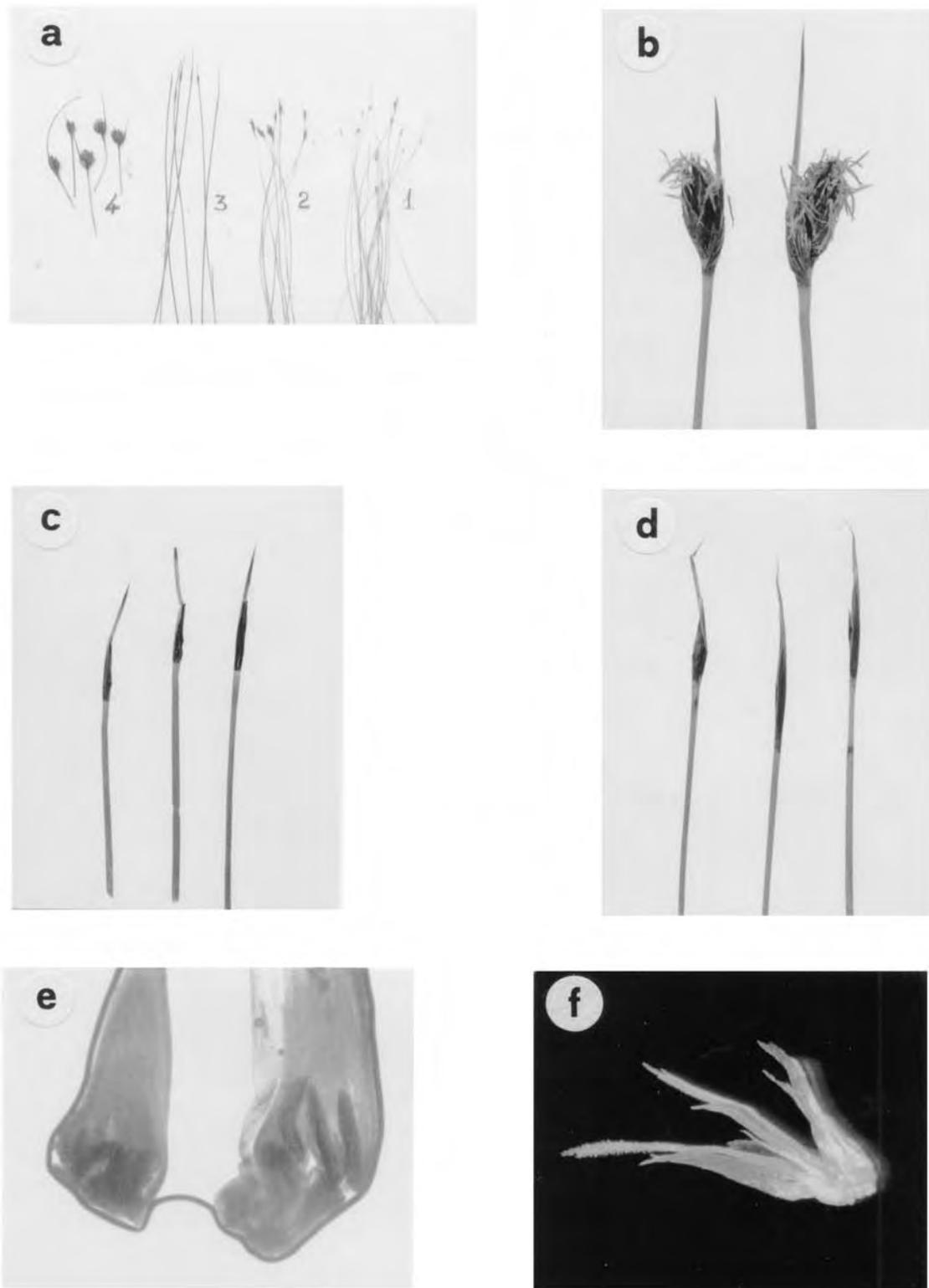


Fig. 1

Schoenus spp.: [a] - Fusti di ibrido putativo (1), *S. nigricans* (2), *S. ferrugineus* (3); particolare di fusti di *S. nigricans* con infiorescenze (4). Infiorescenze di: [b] - *S. nigricans*, [c] - *S. ferrugineus*, [d] - ibrido putativo. Ibrido putativo: [e] - fiore normale con antere (a destra), fiore senza antere (a sinistra), [f] - fiore con due pistilli.

Schoenus spp.: [a] - Stems of putative hybrid (1), *S. nigricans* (2), *S. ferrugineus* (3); detail of stems of *S. nigricans* with inflorescences (4). Inflorescences of: [b] - *S. nigricans*, [c] - *S. ferrugineus*, [d] - putative hybrid. Putative hybrid: [e] - normal flower with anthers (right), flower without anthers (left), [f] - flower with two pistils.

Ad ogni modo il dato interessante della Tab. 1 che ci spinge a sostenere l'ipotesi della natura ibrida della popolazione R è l'osservazione che tutte le piante di questa popolazione non hanno prodotto frutti. Questa osservazione conferma i nostri dati precedenti (AMICI *et al.*, 1998; MARIANI *et al.*, 1998) e suggerisce con forza la possibilità di incrocio e quindi di flusso genico tra *S. nigricans* e *S. ferrugineus*. Inoltre, i nostri dati suggeriscono per la prima volta l'esistenza anche in Italia di popolazioni ibride che in letteratura vengono indicate come *S. intermedius* Čelak (HOFLER, KNOLL, 1959; ROTHMALER *et al.*, 2002).

Analisi citologica

Sebbene il numero cromosomico somatico sia stato determinato in ciascun campione per ognuna delle tre popolazioni esaminate, non è stato possibile condurre un'accurata analisi cariologica. Infatti, particolari difficoltà sono state trovate specialmente per quanto riguarda l'identificazione dei cromosomi nucleolari, a causa del gran numero dei cromosomi, delle loro piccole dimensioni e del loro elevato grado di somiglianza.

I risultati dell'analisi citologica sono riportati nella Tab. 2. Tutte le piante di *S. nigricans* hanno presentato un numero cromosomico $2n=46$ sebbene precedenti dati avevano indicato per questa specie un numero cromosomico $2n=44$ o $2n=54$ (HEGI, 1966; LID, 1985; LÖVE, LÖVE, 1961). Il numero cromosomico da noi determinato pari a $2n=46$ ha ricevuto conferma dall'analisi meiotica in microsporogenesi che ha mostrato in tutte le piante la presenza di diacinesi (stadio della profase della prima divisione meiotica) con 23 bivalenti (Fig. 2a). La costante pre-

senza di bivalenti, generalmente ad anello, sembra denotare un alto grado di omologia dei cromosomi e una notevole stabilità del genoma.

Le piante appartenenti a *S. ferrugineus* hanno mostrato un numero cromosomico $2n=70$ o 72 (Fig. 2c) che è diverso da quello riportato in letteratura e cioè $2n=76$ (HEGI, 1966; LID, 1985; TUTIN *et al.*, 1996). Tale differenza potrebbe essere dovuta al fatto che il grande numero e le dimensioni molto piccole dei cromosomi conducono a conteggi non precisi. Per ottenere una maggiore precisione è preferibile calcolare il numero cromosomico su strisci, come nel nostro caso, anziché su sezioni di apici radicali. L'analisi di microsporogenesi di *S. ferrugineus* è stata condotta solo su due campioni in quanto le altre piante non hanno fiorito.

Comunque, tutte le piante analizzate hanno mostrato diacinesi con 35 o 36 bivalenti eccetto poche cellule del campione V3 in cui sono stati osservati 34 bivalenti più 2 univalenti. Il numero di bivalenti conferma pertanto i numeri cromosomici determinati nelle cellule somatiche. Gli altri stadi sia della prima che della seconda divisione meiotica hanno presentato situazioni normali, sia in *S. nigricans* che in *S. ferrugineus*.

Le piante appartenenti al gruppo di ibridi putativi (popolazione R) hanno mostrato un numero cromosomico $2n=60$ (Fig. 2e), sebbene nel campione R2 (Tab. 2) siano stati osservati 58 cromosomi. Tali numeri cromosomici, che sono intermedi tra quelli riscontrati in *S. ferrugineus* e *S. nigricans*, sono stati confermati anche dal numero di bivalenti determinato nelle cellule meiotiche. Infatti, come risulta dalla Tab. 2, nei gruppi R1 e R4 sono state trovate diaci-

TABELLA 2

Numeri cromosomici e comportamento dei cromosomi meiotici di Schoenus spp.
Chromosome numbers and meiotic chromosome behaviour of Schoenus spp.

Specie	Campioni	Numero Cromosomico	Diacinesi 1ª Divisione Meiotica	2ª Divisione Meiotica
<i>S. nigricans</i>	C1	46	23 biv.	normale
	C2	46	23 biv.	normale
	C3	46	23 biv.	normale
	C4	46	23 biv.	normale
Ibridi putativi	R1	60	26/28 biv.+4-8 univ.	anormale
	R2	58/60	= = =	----
	R3	60	= = =	----
	R4	60	26/28 biv.+4-8 univ.	anormale
<i>S. ferrugineus</i>	V1	70	++++	----
	V2	70	++++	----
	V3	70	35 biv.	normale
	V4	70/72	35/36 biv.	normale

LEGENDA

biv.: bivalenti
univ.: univalenti
= = =: assenza di cellule sporigene
++++: piante non fiorite

nesi con 26–28 bivalenti più qualche univalente. Inoltre le piante di questi due gruppi hanno mostrato nella seconda divisione meiotica cellule con diverse anomalie, quali cromosomi ritardatari, ponti di cromatina, asincronia e sincizi. Ad ogni modo, negli

ibridi putativi sono state trovate, generalmente, antere con poche cellule sporigene; inoltre una pianta ha presentato fiori soltanto con primordi di antere e assenza di tessuto sporigeno (Fig. 1e) ed in un'altra pianta sono stati osservati fiori con due pistilli (Fig.

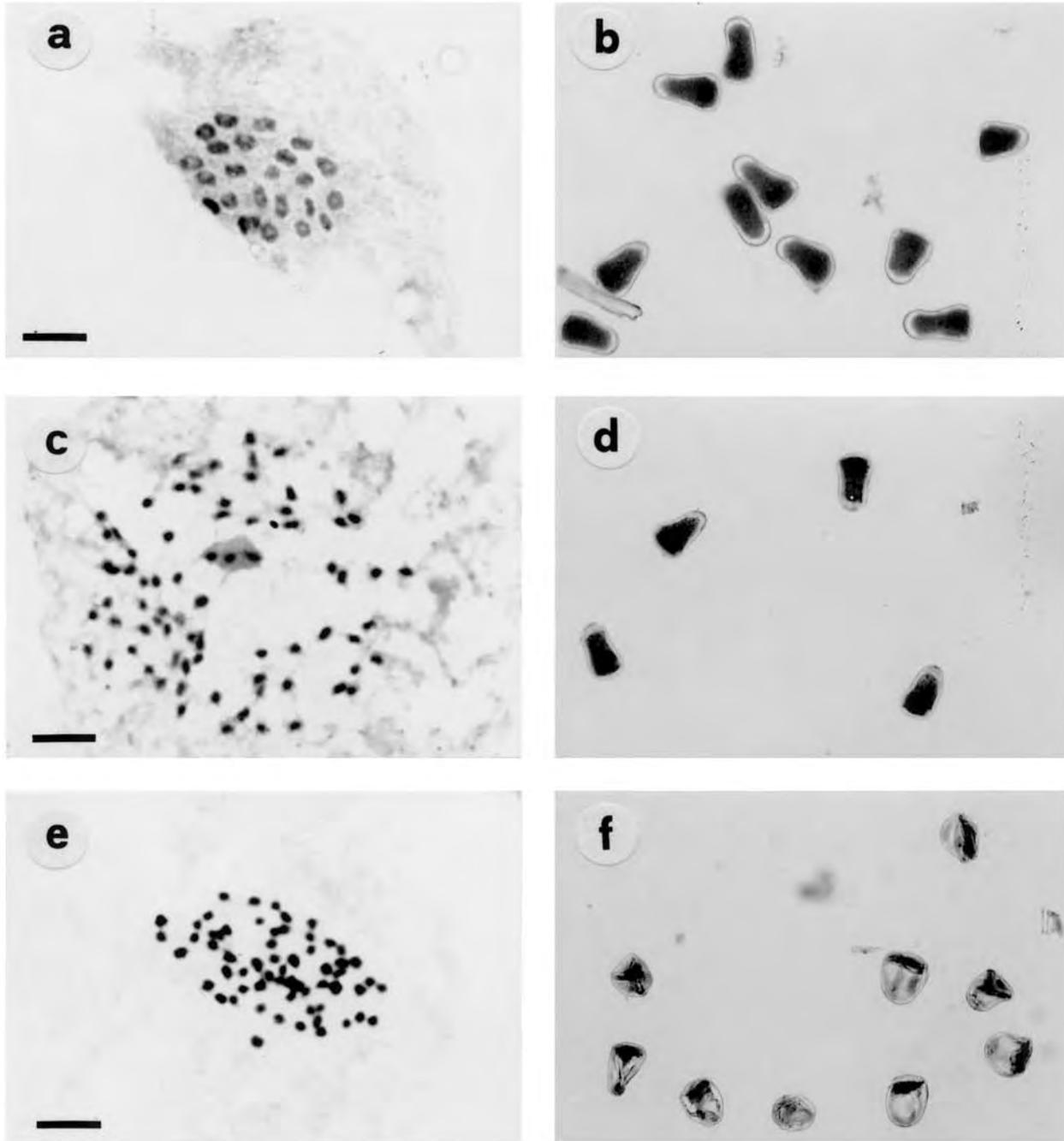


Fig. 2

[a] - *Schoenus nigricans*: diacinesi con 23 bivalenti. [c] - *S. ferrugineus*: metafase mitotica con $2n=72$ cromosomi. [e] - Ibrido putativo: metafase mitotica con $2n=60$ cromosomi. Granuli pollinici di: [b] - *S. nigricans*, [d] - *S. ferrugineus*, [f] - ibrido putativo. Barra = 5 μ m. Polline (250x).

[a] - *Schoenus nigricans*: diakinesi con 23 bivalenti. [c] - *S. ferrugineus*: mitotic metaphase with $2n=72$ chromosomes. [e] - Putative hybrid: mitotic metaphase with $2n=60$ chromosomes. Pollen grains of: [b] - *S. nigricans*, [d] - *S. ferrugineus*, [f] - putative hybrid. Scale bar = 5 μ m. Pollen grains (250x).

1f). Pertanto le osservazioni a livello citologico sembrano, nel loro insieme, confermare che questo gruppo di piante possiede una fertilità molto limitata o completa sterilità, come era stato già messo in evidenza dai rilievi morfologici, appoggiando fortemente l'ipotesi della loro natura ibrida. Ciò appare confermato anche dai risultati dell'analisi del polline. Infatti in tutte le piante di *S. nigricans* sono stati osservati granuli pollinici di forma allungata-triangolare, ben colorati e quindi pienamente vitali (Fig. 2b). Le piante di *S. ferrugineus* hanno presentato granuli pollinici più piccoli, ma per la maggior parte pieni e colorati con una vitalità del 70% (Fig. 2d). Negli ibridi putativi invece, il polline osservato era di piccole dimensioni, di forma irregolare, con la maggior parte dei granuli solo parzialmente colorati o completamente vuoti (Fig. 2f). Inoltre, il polline ha presentato una sterilità del 90–95%.

Analisi molecolare

I risultati dell'analisi molecolare con marcatori AFLP

sono indicati nella Tab. 3 che mostra la distanza genetica tra le singole piante dei quattro gruppi esaminati. Da questa analisi risulta evidente come piante appartenenti alla stessa specie siano più simili tra loro (minore distanza reciproca) e che le distanze delle piante di *S. nigricans* da quelle di *S. ferrugineus* sono sempre maggiori di quelle di piante di ciascuna di queste specie rispetto alle piante ibride putative, che confermano così la loro posizione intermedia. Le distanze maggiori, come atteso, si osservano con le piante di *Eleocharis carniolica* (controllo).

Anche il cladogramma (Fig. 3), ottenuto sempre sulla base dei risultati AFLP, mostra che le piante ibride putative formano un gruppo la cui posizione è intermedia tra *S. nigricans* e *S. ferrugineus*, come atteso per un gruppo con caratteristiche intermedie tra altri due. Benché l'analisi di ricostruzione filogenetica non sia completamente appropriata in questo caso, essa mostra comunque cladi internamente consistenti, come provato dal supporto statistico dei rami.

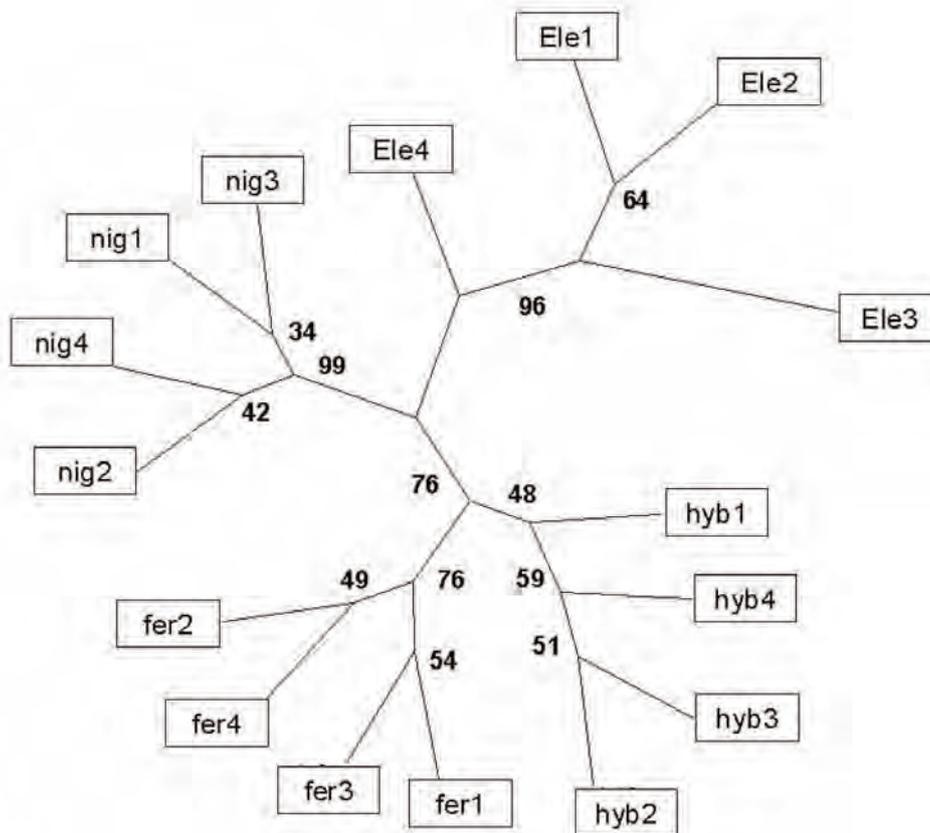


Fig. 3

Ele = *Eleocharis carniolica*; nig = *Schoenus nigricans*; fer = *S. ferrugineus*; hyb = ibridi putativi. I numeri in corrispondenza dei rami rappresentano il supporto statistico di ciascun clade, espresso come percentuale di cladogrammi (su un totale di 1000) nei quali compare il clade corrispondente.

Ele = *Eleocharis carniolica*; nig = *Schoenus nigricans*; fer = *S. ferrugineus*; hyb = putative hybrids. Figures near the branches represent the statistical support for the corresponding clade, expressed as percentage of cladograms (out of 1000) in which the clade occurs.

TABELLA 3

Distanze genetiche secondo NEL, LI (1979), modificato da FELSENSTEIN (2001). Ele=Eleocharis carniolica; nig=S. nigricans; fer=S. ferrugineus; hyb= ibridi putativi. I riquadri continui indicano le distanze tra piante della stessa specie; i riquadri tratteggiati indicano le distanze tra piante delle specie vere e ibridi putativi. Genetic distances NEL, LI (1979), modified by FELSENSTEIN (2001). Ele=Eleocharis carniolica; nig= S. nigricans; fer= S. ferrugineus; hyb= putative hybrids. Boxes with lines show within-species comparisons; dashed boxes show comparisons between samples of true species and putative hybrids.

	Ele1x	Ele2x	Ele3x	Ele4	fer1x	fer2x	fer3x	fer4x	hyb1x	hyb2x	hyb3x	hyb4x	nig1x	nig2x	nig3x
Ele2x	0.01														
Ele3x	0.01	0.02													
Ele4x	0.06	0.06	0.06												
fer1x	0.74	0.66	0.66	0.69											
fer2x	0.72	0.73	0.64	0.78	0.01										
fer3x	0.74	0.66	0.65	0.80	0.00	0.00									
fer4x	0.72	0.73	0.63	0.78	0.01	0.00	0.01								
hyb1x	0.72	0.73	0.72	0.67	0.06	0.07	0.06	0.07							
hyb2x	0.72	0.66	0.72	0.76	0.07	0.08	0.07	0.08	0.03						
hyb3x	0.72	0.66	0.65	0.88	0.07	0.08	0.07	0.08	0.03	0.01					
hyb4x	0.73	0.67	0.66	0.69	0.05	0.06	0.06	0.07	0.02	0.02	0.01				
nig1x	1.06	0.87	1.06	0.69	0.34	0.41	0.36	0.41	0.15	0.12	0.15	0.14			
nig2x	0.73	0.66	0.73	0.68	0.36	0.37	0.36	0.40	0.18	0.14	0.16	0.16	0.04		
nig3x	1.06	0.87	1.06	0.68	0.30	0.38	0.31	0.37	0.15	0.13	0.15	0.14	0.03	0.06	
nig4x	0.88	0.76	0.88	0.82	0.31	0.36	0.33	0.36	0.16	0.13	0.14	0.15	0.03	0.04	0.04

CONCLUSIONI

I risultati dell'analisi con i marcatori AFLP sostengono con forza l'ipotesi dell'origine ibrida dei campioni della popolazione R, in quanto il pool dei dati mostra che il gruppo R condivide un gran numero di caratteristiche molecolari sia con il gruppo V che con il gruppo C, mentre il confronto tra V e C indica un grado di similarità inferiore. L'analisi molecolare riesce inoltre ad evidenziare un livello di variazione tra individui più alto per *S. nigricans* che per *S. ferrugineus* contrariamente a quanto si verifica nelle popolazioni Svedesi studiate da HEDRÉN (1997). Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la regione in cui è stato effettuato il campionamento (Nord-Est Italiano) è centrale rispetto all'area di distribuzione naturale di *S. nigricans* e marginale per *S. ferrugineus*, mentre nel Nord Europa la situazione è esattamente opposta.

I dati dell'analisi citologica sembrano sostenere pienamente i dati molecolari in quanto: i) il numero cromosomico negli ibridi putativi è risultato intermedio tra quello delle due specie originali come accadrebbe con l'impollinazione incrociata; ii) la presenza di aberrazioni cromosomiche nelle cellule meiotiche osservate nei campioni appartenenti alla popolazione R conferma la natura ibrida di queste cellule; iii) la percentuale di polline sterile è risultata nettamente più alta nella popolazione ibrida rispetto alla specie originali.

In definitiva la combinazione delle analisi morfologica, citologica e molecolare ha permesso di caratterizzare popolazioni naturali di *S. nigricans* e di *S. ferrugineus* presenti in una regione del Nord-Est Italiano e di individuare, per la prima volta in Italia, ibridi tra le due specie di *Schoenus* come già osservato in altre aree geografiche.

L'importanza di tale dato richiede comunque ulteriori verifiche e conferme sia con approcci citologici e molecolari che con tecniche adeguate di incrocio specialmente a causa della differenza di ploidia tra *S. nigricans* e *S. ferrugineus*. La migliore comprensione della struttura genetica degli ibridi, della loro fertilità e stabilità potrà chiarire il loro significato nell'evoluzione del genere *Schoenus* e dare indicazioni sul loro possibile impiego come piante foraggere.

LETTERATURA CITATA

- AMICI S., CANDOLINI A., MARIANI A., CENCI C.A., 1998 – Study in *Schoenus complex* growing in North East Italy. 7° IOBS Symposium "Plant Evolution in Man Made Habitats". Amsterdam, The Netherlands, August 10–15, 1988.
- EKSTAM V., JACOBSON R., MATTSON M., PORSNE T., 1984 – Ölands och Gotlands växtvärld. Stockholm: natur och kultur.
- ERNEST W.H.O., SLINGS Q.L., NELISSEN H.J.M., 1996 – Pedogenesis in coastal wet dune slacks after sod-cutting in relation to revegetation. *Plant Soil*, 180: 219-230
- ERNEST W.H.O., VIS R.D., PICCOLI F., 1995 – Silicon in developing nuts of the sedge *Schoenus*. *J. Plant Physiol.*, 146: 481-488.
- ERNEST W.H.O., VAN DER HAM N.F., 1988 – Population structure and rejuvenation potential of *Schoenus nigricans* in coastal wet dune slacks. *Acta Bot. Neerl.*, 37: 451-465.
- FELSENSTEIN J., 2001 – *PHYLIP, Phylogeny Inference Package*. Univ. Washington, Seattle, W.A.
- GORDON I.J., 1989 – Vegetation community selection by ungulates on the Isle of Rhum. II. Vegetation community election. *J. Appl. Ecol.*, 26: 53-64.
- HEDRÉN M., 1997 – Genetic variation and hybridization in Swedish *Schoenus* (Cyperaceae). *Pl. Syst. Evol.*, 204: 21-37.
- HEGI G., 1966 – *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, Vd. 2/1. Carl Hauser, München, Germany.
- HESS H.E., LANDOLT E., HIRZEL R., 1976 – *Flora der Schweiz*, Vol. B.1. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- HOFER K., KNOLL F., 1959 – *Catalogus Florae Austriae* vol. 4: 757. Springer – Verlag, Wien, Austria.
- HULTÉN E., 1971 – *Atlas över växternas utbredning i Norden*, 2nd edn. Stockholm, Generalstabens Litografiska Anstalts Förlag.
- HULTÉN E., FRIES M., 1986 – *Atlas of North European vascular plants*. Königstein, Koeltz.
- HYLANDER N., 1966 – *Nordisk Kärnväxtflora II*. Stockholm, Almquist and Wiksell.
- JILG H., BRIEMBLE G., 1992 – Acceptance of hay from litter meadows in comparison with barley straw by growing heifers. *Wirtschaftseigene – Futter*, 38: 91-104.
- KIERS A.M., MES T.H.M., VAN DER MEIJDEN R., BACHMANN K., 2000 – A search for diagnostic AFLP markers in *Cichorium* species with emphasis on endive and chicory cultivar groups. *Genome*, 43: 470-476.
- LID J., 1985 – *Norsk, svensk, finsk flora*. 5th edn. Det norske samlaget, Oslo, Norway.
- LÖVE A., LÖVE D., 1961 – Chromosome numbers of Central and North-West European plant species. *Opera Bot.*, 5: 22.
- MARIANI A., CANDOLINI A., AMICI S., CENCI C.A., OLIVIERI A., 1998 – Caratterizzazione citogenetica e molecolare di popolazioni naturali Italiane di *Schoenus* (Cyperaceae). Atti Convegno "Biodiversità: Germoplasma locale e sua valorizzazione": 911-914. Alghero, Italia, 11 Settembre 1998.
- NEI M., LI W.H., 1979 – Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. National Academy Sciences, USA*, 76: 5269-5273.
- PETTERSSON B., 1958 – Dynamik och Konstans i Gotlands vegetation och flora. *Acta Phytogeogr. Suec.*, 40.
- PIGNATTI S., 1982 – *Flora d'Italia* vol. 3. Edagricole, Bologna, Italia.
- QUAGLIARO G., VISCHI M., TYRKA M., OLIVIERI A.M., 2001 – Identification of wild and cultivated sunflower for breeding purposes by AFLP markers. *J. Heredity* (in stampa).
- ROTHMALER W., JÄGER E.J., WERNER K., 2002 – *Exkursions Flora von Deutschland*. Band 4. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- SCHOPP GUTH A., MAAS D., PFADENHAUER J., 1994 – Influence of management on the seed production and seed bank of calcareous fen species. *J. Veg. Sci.*, 5: 569-578.
- SCOTTI I., MARIANI A., VERONA V., CANDOLINI A., CENCI C.A., OLIVIERI A.M., 2002 – AFLP markers and cytotoxic analysis reveal hybridization in the genus *Schoenus* (Cyperaceae). *Genome*, 45: 222-228.
- SPARLING J.H., 1968 – Biological flora of the British Isles: *Schoenus nigricans* L. *J. Ecol.*, 56: 883-899.
- TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M., WEBB D.A.,

- 1996 – *Flora Europaea*, Vol. 5 Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- WEBB D.A., 1996 – *Schoenus* – 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*, 5: 289 – Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
- ZANGHERI P., 1976 – *Flora Italica*, Vol. 1. CEDAM, Padova, Italy.

RIASSUNTO – In un'area della Provincia di Udine, Nord-Est dell'Italia, sono state trovate piante di *Schoenus* (*Cyperaceae*) che presentavano caratteri intermedi tra *S. nigricans* e *S. ferrugineus* e assenza di frutti. Questa è la prima segnalazione di piante di tale tipo in Italia. Pertanto sulle piante di questa popolazione (denominata R dal luogo di origine) e su piante di *S. nigricans* e *S. ferrugineus*

collezionate in altre due aree della stessa regione (popolazioni C e V, rispettivamente) è stata effettuata un'analisi morfologica, citologica e molecolare per caratterizzare le popolazioni delle due specie originali e per definire la struttura genetica delle piante con caratteri intermedi considerate ibridi putativi. I dati ottenuti con marcatori molecolari (AFLP) dimostrano che la popolazione di ibridi putativi è geneticamente intermedia tra le popolazioni vicine delle specie parentali. I risultati dell'analisi citologica confermano la natura ibrida di questa popolazione sostenendo con forza quanto indicato inizialmente dai rilievi morfologici ed in particolare dal grado di sterilità delle piante della popolazione medesima. Resta da approfondire la conoscenza degli ibridi individuati, della loro stabilità e fertilità, del loro significato nell'evoluzione del genere *Schoenus*, così che sarà possibile verificare l'ipotesi di flusso genico tra *S. nigricans* e *S. ferrugineus*.

AUTORI

Anna Mariani*, Istituto di Genetica Vegetale - Sezione di Perugia (IGV) – CRN, Via della Madonna Alta 130, 06128 Perugia

Alberto Candolini**, Via Mazzini 97, Tarcento (Udine)

Ivan Scotti, Angelo M. Olivieri, Università di Udine, Dipartimento di Produzione Vegetale e Tecnologie Agrarie, Via delle Scienze 208, 33100 Udine

Valentino Verona, Carlo Alberto Cenci, Università di Udine, Via delle Scienze 208, 33100 Udine

*Autore a cui va indirizzata la corrispondenza, e-mail anna.mariani@igv.cnr.it, tel. 075 5014856, fax: 075 5014869

**Autore presso il quale sono disponibili le informazioni sui siti precisi di collezionamento, e-mail: albertocandolini@libero.it, tel. 0432 785597